

**Die Rolle von DNA-Methylierungen in der
Entwicklung und Physiologie von
Agrobacterium-induzierten *Arabidopsis*-Tumoren**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jochen Gohlke

aus Moers

Würzburg, 2013

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> als Verursacher von Wurzelhalsgallen.....	1
1.1.1	Der <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformationsprozess.....	1
1.1.2	Die Rolle der agrobakteriellen Onkogene bei der Tumorbildung	3
1.2	Massive Änderungen in der Genexpression und im Stoffwechsel begleiten die Wurzelhalsgallenentwicklung.....	5
1.3	Wurzelhalsgallen als Modell für die Entwicklung maligner Tumore	6
1.4	DNA-Methylierungen.....	7
1.4.1	Mechanismen der DNA-Methylierung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.4.2	SiRNA-abhängige Methylierung	9
1.4.3	Erhaltung der genomischen Integrität und epigenetische Reprogrammierung	11
1.4.4	Das Methylierungsmuster von <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.4.5	Auswirkungen von DNA-Methylierungen auf die Transkription	14
1.4.6	DNA-Methylierungen als Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress... 14	
1.4.7	Einfluss von Phytohormonen auf DNA-Methylierungsprozesse	16
1.4.8	Die Rolle epigenetischer Faktoren in tierischen Tumoren	17
1.5	Zielsetzung.....	19
2.	Material & Methoden	20
2.1	Arbeiten mit Bakterien	20
2.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	20
2.1.2	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.1.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	21
2.1.4	Transformation elektrokompetenter Bakterien.....	21
2.1.5	Kryokonservierung.....	22
2.2	Medien und Antibiotika	22

2.3	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.3.1	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	23
2.3.2	Sterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen	23
2.3.3	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.3.4	Erzeugung von Tumoren an <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.3.5	ABA-abhängige Keimungsexperimente.....	25
2.4	Arbeiten mit DNA.....	25
2.4.1	Verwendete Vektoren	25
2.4.2	DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.4.3	Gelextraktion und Reinigung von PCR-Produkten	26
2.4.4	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen.....	26
2.4.5	Ethanol-Fällung von DNA.....	27
2.4.6	Restriktionsenzyme	27
2.4.7	Ligation	27
2.4.8	Ligation von PCR-Produkten (TA-Klonierung)	28
2.4.9	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	28
2.4.10	Gateway-Klonierung von PCR-Produkten.....	29
2.4.11	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.4.12	Extraktion von Plasmid-DNA	30
2.4.13	Extraktion genomischer DNA anhand der CTAB-Methode	31
2.4.14	Schnelle Extraktion von genomischer DNA.....	32
2.4.15	Silikat-basierte Extraktion von genomischer DNA.....	32
2.4.16	Phenol-Chloroform-basierte Reinigung von DNA-Extrakten.....	32
2.4.17	DNA-Sequenzanalysen.....	32
2.5	Arbeiten mit RNA.....	33
2.5.1	Extraktion von RNA.....	33
2.5.2	cDNA-Synthese	33

2.5.3	Quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase-PCR (<i>quantitative real-time reverse transcription pcr</i> , qRT-PCR)	34
2.5.4	DNA-Standard zur Quantifizierung der Transkriptanzahl.....	35
2.6	Methoden zur Analyse von DNA-Methylierungen	36
2.6.1	Bisulfit-Sequenzierung.....	36
2.6.2	Methylcytosin-Immunopräzipitation	36
2.6.3	Microarray-Analysen	37
2.7	Durchflusszytometrie.....	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Methylierung der Transfer-DNA (T-DNA)	39
3.1.1	Methylierungsmuster der T-DNA im voll entwickelten Tumor	39
3.1.2	Induktion der T-DNA-Methylierung durch komplementäre siRNAs und Untersuchung des Tumorwachstums	41
3.1.3	Hemmung der Onkogen-Expression.....	42
3.2	Das Methylierungsmuster des Tumor-Genoms.....	43
3.2.1	Etablierung der Methylcytosin-Immunopräzipitation zur Anreicherung methylierter DNA.....	44
3.2.2	Anteil methylierter Regionen im Tumor- und Sprossgenom	45
3.2.3	Methylierungsunterschiede zwischen Tumor- und Kontrollgewebe	47
3.2.4	Verifizierung der Tiling-Array-Analysen mittels Bisulfit-Sequenzierung	48
3.2.5	Untersuchung des Ploidiegrades in Wurzelhalsgallen	50
3.2.6	Differenziell methylierte Sequenzmotive.....	51
3.3	Methylierungsveränderungen und ihre Auswirkungen auf die Genexpression	52
3.3.1	Positionen der Methylierungsänderungen innerhalb verschiedener Genkategorien	52
3.3.2	Korrelation von DNA-Methylierungen mit der Genexpression.....	54
3.3.3	Gen-Kategorien mit differenzieller Methylierung im Tumor	55
3.4	Einfluss von DNA-Methylierungsprozessen auf das Tumorwachstum.....	58

3.5	ABA-abhängige DNA-Methylierungen und deren Auswirkung auf die Transkription.	60
3.5.1	ABA-vermittelte Induktion von DNA-Methylierungen	60
3.5.2	Korrelation von Tiling-Array- und Bisulfitsequenzierungs-Daten ABA-regulierter Gene im Tumor	62
3.5.3	ABA-vermittelte Methylierung korreliert mit reduzierter Transkription	64
4.	Diskussion	65
4.1	DNA-Methylierung als Strategie zur Abwehr von Fremd-DNA	65
4.1.1	Die agrobakteriellen Onkogene werden nicht methyliert	66
4.1.2	Eine Induktion der Onkogen-Methylierung unterdrückt die Onkogen-Expression und die Tumorbildung	67
4.2.	Das Methylierungsmuster der durch <i>Agrobacterium</i> induzierten Wurzelhalsgallen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
4.2.1	Die Qualität der Methylomdaten ist mit anderer Studien vergleichbar	70
4.2.2	Methylierungsveränderungen von Nicht-CG-Motiven sind essenziell für die Tumorgenese	73
4.2.3	DNA-Methylierungen korrelieren mit der Genexpression	76
4.2.4	DNA-Methylierungsänderungen betreffen Tumor-relevante Prozesse	78
4.2.5	Der Effekt von Methylierungsunterschieden auf die Tumorentwicklung ist abhängig vom Differenzierungsgrad des betroffenen Gewebes	80
4.3	DNA-Methylierungen beeinflussen physiologische Prozesse im Wurzelhalsgallentumor in Abhängigkeit von ABA	83
4.4	Epigenetische Veränderungen unterscheiden sich in pflanzlichen und tierischen Tumoren	84
5.	Zusammenfassung	87
6.	Summary	89
7.	Literaturverzeichnis	90
8.	Anhang	109
8.1	Primer-Liste	109

8.2	DNA-Größenstandards.....	112
8.3	Abkürzungen.....	113
8.4	Differenziell methylierte Gene signifikant veränderter Gen-Kategorien.	115
	Lebenslauf	139
	Publikationen.....	140
	Danksagung	141
	Erklärung.....	142

1. Einleitung

1.1 *Agrobacterium tumefaciens* als Verursacher von Wurzelhalsgallen

Agrobacterium tumefaciens ist ein gramnegatives Bodenbakterium, welches 1907 als Verursacher der Wurzelhalsgallen-Krankheit an dikotylen Pflanzen identifiziert wurde (Smith & Townsend 1907). Typisch für diese Krankheit ist tumorartiges Wachstum von pflanzlichem Gewebe, meistens Sprossgewebe in Bodennähe. In der Landwirtschaft stellt die Krankheit ein erhebliches Problem bei der Kultivierung von Wein, Nuss- und zahlreichen Steinfrüchten dar, da sie zu erheblichen Ertragseinbußen führen kann. Durch die Fähigkeit, DNA in pflanzliche Zellen zu übertragen, ist *Agrobacterium tumefaciens* jedoch auch ein wichtiger Modellorganismus im Hinblick auf das Verständnis von interspezifischem Gentransfer (Gelvin 2010). Agrobakterien spielen daher auch eine bedeutende Rolle in der Pflanzenbiotechnologie, insbesondere bei der Erzeugung transgener Pflanzen.

1.1.1 Der *Agrobacterium*-vermittelte Transformationsprozess

Die Transformation der pflanzlichen Zelle mittels *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt in mehreren Schritten (Abbildung 1.1 A-G), deren Abfolge von den zellulären Aktivitäten beider Interaktionspartner abhängig ist (Binns & Thomashow 1988). Der erste Schritt ist dabei die bakterielle Kolonialisierung und Anheftung in der Nähe pflanzlicher Verwundungsstellen (Abbildung 1.1 A), da ein physischer Kontakt Voraussetzung für den späteren DNA-Transfer ist (Lippincott & Lippincott 1969). Es folgt die Erkennung pflanzlicher Signale durch ChvE/VirA, welche zur Phosphorylierung von VirG führen (Abbildung 1.1 B). Hierdurch wird die Expression von Genen der sogenannten Vir-Region induziert, welche auf einem zusätzlichen Plasmid der Agrobakterien, dem Ti-Plasmid lokalisiert sind (Abbildung 1.1 C). Verantwortlich für die Induktion dieser Gene ist die verwundungsbedingte Freisetzung phenolischer Substanzen und Aldose-Monosaccharide durch die Pflanze (Stachel *et al.* 1985), welche in einer phosphatarmen und sauren (pH=5,5) Umgebung eine durch VirA/VirG-Proteine vermittelte Expression der Gene des Vir-Regulons (Stachel & Nester 1986, Winans *et al.* 1988) erlaubt. Die so exprimierten VirD1 und VirD2-Proteine sorgen für die Produktion eines einzelsträngigen DNA-Moleküls, der sogenannten T-DNA, welche sich ebenfalls auf dem Ti-Plasmid befindet (Abbildung 1.1 D). Diese enthält Gene für die Cytokinin- und Auxinsynthese sowie für Enzyme des

Opinstoffwechsels. Die Bildung des DNA-Einzelstrangs beginnt an Sequenzwiederholungen der T-DNA, welche diese an der rechten Seite in Wildtyp-Orientierung begrenzen (*right border*, RB) und stoppt in der Regel an der linksseitigen Begrenzung (*left border*, LB) der T-DNA (Peralta & Ream 1985, Shaw *et al.* 1984, Wang *et al.* 1984).

Der T-DNA-Einzelstrang liegt dabei nicht frei vor, sondern ist am 5'-Ende durch eine Phosphodiesterbindung kovalent an einen Tyrosinrest des VirD2-Proteins gebunden (Vogel & Das 1992). Zudem befinden sich zahlreiche weitere Vir-Proteine in einem Komplex mit der DNA, welche schließlich durch das VirB-Typ4-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle transportiert wird (Abbildung 1.1 E). Dort binden zahlreiche VirD2-Moleküle an die T-DNA und bilden den T-Komplex (Abbildung 1.1 F), welcher der Translokation der DNA zum pflanzlichen Zellkern dient. Im Zellkern wird die T-DNA schließlich stabil in das pflanzliche Genom integriert (Abbildung 1.1 G).

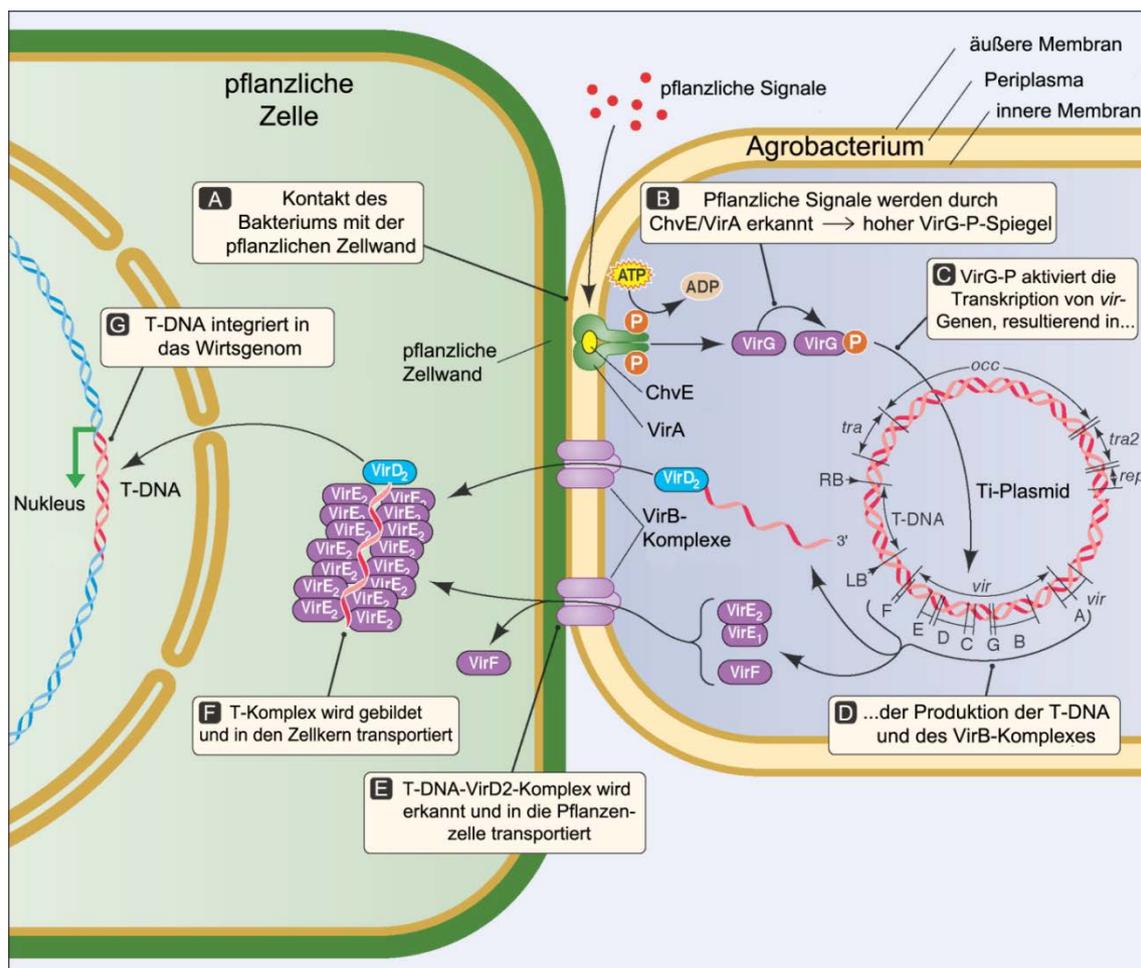


Abbildung 1.1: Modell der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation einer pflanzlichen Zelle. Erläuterungen siehe Text. Abbildung verändert nach McCullen & Binns (2006).

1.1.2 Die Rolle der agrobakteriellen Onkogene bei der Tumorbildung

Voraussetzung für die Entwicklung von Wurzelhalsgallen ist eine fundamentale Umsteuerung des pflanzlichen Stoffwechsels (Deeken *et al.* 2006), welche letztlich das Agrobakterien-Wachstum unterstützt. Ursächlich für diese Umsteuerung ist die Integration der bakteriellen T-DNA in das pflanzliche Genom (vergleiche 1.1.1), da auf dieser eine Reihe von sogenannten Onkogenen codiert ist. Zu den am längsten bekannten und damit am besten untersuchten Onkogenen gehören die Gene für die Synthese von Auxin (*iaaH* und *iaaM*) und Cytokinin (*ipt*). Entdeckt wurden diese Onkogene durch Transposon-Mutagenisierung einer *Agrobacterium*-Population (Garfinkel & Nester 1980). Hierdurch wurden *Agrobacterium*-Mutanten identifiziert, welche zu einer veränderten Tumormorphologie führen. Diese wurden als *tms* (*tumor morphology shooty*)- und *tmr* (*tumor morphology rooty*)- Mutanten bezeichnet, da Infektionen mit diesen Mutanten zu einer charakteristischen phänotypischen Ausprägung des Tumorwachstums führen (Akiyoshi *et al.* 1983). Ursächlich für den *tms*-Phänotyp sind Mutationen in den Genen *iaaH* und *iaaM*, welche für eine Tryptophan-Monooxygenase und eine Indol-3-Acetamid-Hydrolase codieren und in einer zwei-Schritt-Reaktion die Umwandlung von Tryptophan in das Auxin Indol-3-Essigsäure (*indole-3-acetic acid*, IAA) katalysieren (Thomashow *et al.* 1984). Der *tmr*-Phänotyp wird durch das Fehlen des IPT-Proteins verursacht, welches die Kondensierung einer Isoprenoid-Vorstufe mit Adenosin-Monophosphat begünstigt. Diese Reaktion stellt in Pflanzen den limitierenden Faktor im Hinblick auf die Cytokinin-Synthese dar (Astot *et al.* 2000).

Die Aktivität der *Ipt*- und *Iaa*-Genprodukte führt zu erheblich erhöhten Konzentrationen von Auxin und Cytokinin in den Wurzelhalsgallen. Während das Niveau an freiem IAA mehr als zehnfach gegenüber dem umgebendem Gewebe erhöht ist, kann der Cytokinin-Spiegel mehr als das Hundertfache der gewöhnlichen Konzentration erreichen (Weiler & Spanier 1981). Zwar sind *Ipt* und *IaaH/IaaM* durch die Förderung der Teilungsaktivität und des Streckungswachstums die primären Verursacher des Tumorwachstums, dennoch trägt eine Hormonkaskade zur Entwicklung und Morphologie des Tumors bei. Die sich entwickelnden Wurzelhalsgallen werden dabei zu Sink-Gewebe, welches die pflanzlichen Ressourcen zur Produktion von Opinen verwendet. Hierbei handelt es sich um Arginin-Kondensate mit Pyruvat (Opopin) oder α -Ketoglutarat (Nopalin), welche spezifisch vom infizierenden Agrobakterien-Stamm metabolisiert werden können. In Abhängigkeit vom

metabolisierten Opine werden Ti-Plasmide daher entweder dem Octopin- oder dem Nopalinn-Typ zugeteilt. Für eine ausreichende Versorgung mit Wasser und Nährstoffen benötigen pflanzliche Tumore ein gut ausgebildetes System von Leitbündeln. Da Wurzelhalshallen einen Durchmesser von bis zu 30 cm erreichen können, sind solche Strukturen bis hinein in die schnell wachsende Tumorpheripherie notwendig. Während niedrige Auxin/Cytokinin-Verhältnisse die Bildung von Siebelementen begünstigen, induzieren hohe Auxin-Konzentrationen die Xylem-Bildung (Ullrich & Aloni 2000). Tumore, welche sich am Spross entwickeln, bilden dabei konzentrische Bündel aus, bei denen das innere Xylem von Phloem umgeben ist. Neben Auxin und Cytokinin ist auch Ethylen wichtig für die Vaskularisierung. So entstehen auf Ethylen-insensitive Tomatenpflanzen kleine, glatte Tumore im Gegensatz zu großen, unregelmäßigen Tumoren auf Wildtyp-Pflanzen. Es wird vermutet, dass hohe Auxin- und Cytokinin-Level die Ethylensynthese aktivieren, welche zu einer Erniedrigung des Durchmessers von Xylem-Gefäßen in der Umgebung des Tumors führen. Daneben ist bei hohen Ethylen-Spiegeln auch die Tumoroberfläche vergrößert, wodurch sich dessen Transpiration erhöht. Im Zusammenspiel mit Auxin und Cytokinin stellen diese Ethylen-Effekte die Wasser- und Nährstoffversorgung des Tumors sicher (Aloni *et al.* 1998)

Eine Erhöhung des Ethylen-Spiegels verursacht ihrerseits einen Anstieg der ABA-Konzentration im Tumor (Veselov *et al.* 2003). Dabei vermittelt ABA die Suberinisierung der äußeren Tumorzellschichten und verhindert so einen unkontrollierten Wasserverlust, welcher durch das Fehlen einer intakten Epidermis und den hohen Transpirationssog entstehen könnte. Zusätzlich beeinflusst ABA die Expression ABA-abhängiger Aquaporine und trägt dadurch zur Regulation des Wasserhaushalts bei (Efetova *et al.* 2007).

1.2 Massive Änderungen in der Genexpression und im Stoffwechsel begleiten die Wurzelhalsgallenentwicklung

Neben der Ausbildung von Leitbündeln sind Veränderungen im Stofftransport und Metabolismus eine Grundvoraussetzung für die Entstehung von Wurzelhalsgallen. So konnte durch Microarray-Analysen nachgewiesen werden, dass das Expressionsprofil des Tumors im Hinblick auf Gene, welche an Stofftransport, Photosynthese, mitochondrialem Elektronentransport und Fermentierung beteiligt sind, signifikant verändert ist (Deeken *et al.* 2006). Insgesamt sind 22% des *Arabidopsis*-Genoms von Änderungen in der Genexpression betroffen. Davon sind 12% der Gene (2714) herunterreguliert, während 10% (2340) erhöht exprimiert sind. Daher stellt sich die Frage, welche Faktoren diese massiven Transkriptom-Veränderungen hervorrufen.

Transkriptionsfaktoren rufen ein Tumor-spezifisches Expressionsmuster hervor. So konnte durch Experimente mit *Arabidopsis*-Zellkulturen demonstriert werden, dass das Expressions-Niveau von Genen diverser Transkriptionsfaktor-Familien (Myb, bHLH, bZIP, AP2 domain) nach Agrobakterien-Infektion verändert ist (Ditt *et al.* 2006). Transkriptionsfaktoren stellen eine Möglichkeit dar, das Expressionsmuster im Tumor zu determinieren. Eine weitere Möglichkeit der Genregulierung sind epigenetische Mechanismen wie Chromatin-Modifikationen oder DNA-Methylierung (vergleiche 1.4), welche in pflanzlichen Tumoren bisher nur unzureichend untersucht wurden. Bekannt ist, dass eine Reihe von Genen, welche am Aufbau der Chromatin-Struktur beteiligt sind, eine wichtige Funktion bei der Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom besitzen (Crane & Gelvin 2007). So führt beispielsweise die Überexpression der Histone H2A, H4 und H3-11 sowohl zu einer erhöhten Transformationseffizienz als auch zu einer stärkeren Expression von Transgenen (Tenea *et al.* 2009). Der Einfluss epigenetischer Faktoren auf die Expression der pflanzlichen Gene ist hingegen wenig untersucht. Lediglich für die T-DNA ist seit langem bekannt, dass diese häufig das Ziel transkriptioneller Genexpressionshemmung im Wirtsgenom durch DNA-Methylierungen ist (Gelvin *et al.* 1983, Hepburn *et al.* 1983). In einer Studie von Gelvin *et al.* (1983) war stets mindestens eine Kopie der T-DNA in den verschiedenen Tumorgewebelinien unmethyliert, was die Expression der Onkogene und die Tumor-Proliferation ermöglichte. Hieraus wurde geschlossen, dass eine Demethylierung der Onkogene eine erhöhte Expression zur Folge

hat und die Onkogenexpression durch DNA-Methylierungen zumindest partiell unterdrückt werden kann.

1.3 Wurzelhalsgallen als Modell für die Entwicklung maligner Tumore

In der frühen Phase der Agrobakterien-Forschung Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Entwicklung von Wurzelhalsgallen als gutes Modellsystem betrachtet, um die fundamentalen Prinzipien malignen neoplastischen Wachstums besser zu verstehen. Zwar war bereits bekannt, dass Bakterien die Ursache für die Krankheit waren (Smith & Townsend 1907). Es zeigte sich jedoch, dass das pflanzliche Tumorgewebe auch ohne jegliche Anzeichen von Bakterien transplantierbar war (Jensen 1910). Zudem konnte, ähnlich der Metastasenbildung bei Säuger-Tumoren, die Bildung von Sekundär-Gallen in einigem Abstand vom primären Tumor beobachtet werden, weshalb man beide Systeme für vergleichbar hielt (Smith 1916). Lange Zeit favorisierte Armin Braun, einer der führenden Agrobakterien-Forscher seiner Zeit, epigenetische Grundlagen als Basis für die Tumorentwicklung. Seine Annahme beruhte insbesondere darauf, dass pflanzliche Tumorzellen nach wie vor die Möglichkeit zur Differenzierung besaßen und somit seiner Ansicht nach die Entwicklung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle reversibel sein musste (Braun 1981).

Das Interesse an Agrobakterien im Hinblick auf allgemeine karzinogene Prinzipien ließ jedoch merklich nach als klar wurde, dass eine DNA bakteriellen Ursprungs die Grundlage des sogenannten Tumor-induzierenden Prinzips (TIP) war. Erste Hinweise auf eine bakterielle DNA als Basis der Tumorentwicklung zeigten sich durch Versuche einer Gruppe um Georges Morel. Diese ergaben, dass bakterienfreie Wurzelhalsgallen-Kulturen Opine (Octopin und Nopalin) produzieren, wobei die Art des gebildeten Opins ausschließlich vom infizierenden Agrobakterien-Stamm abhängig war (Goldmann *et al.* 1968). Einige Jahre später konnte in virulenten *Agrobacterium*-Stämmen ein großes Plasmid nachgewiesen werden, welches in keinem der untersuchten avirulenten Stämme vorhanden war (Zaenen *et al.* 1974). Der endgültige Nachweis der T-DNA in pflanzlichen Zellen gelang schließlich 1977 (Chilton *et al.* 1977).

Ungeachtet der Unterschiede in Bezug auf die Tumor-Initiation gibt es fundamentale Gemeinsamkeiten zwischen pflanzlichen und tierischen Tumoren, hierzu zählen unkontrollierte Proliferation, eine starke Vaskularisierung des betroffenen Gewebes sowie ein aberranter Energiemetabolismus.

1.4 DNA-Methylierungen

Bei DNA-Methylierungen handelt es sich um eine chemische Modifikation von DNA. Während dieses Prozesses wird eine Methylgruppe vom Methyl donor, dem S-Adenosyl-L-Methionin (Cantoni 1952), auf die 5'-Position des Pyrimidinrings von Cytosin übertragen (Abbildung 1.2).

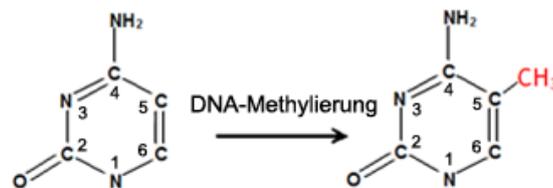


Abbildung 1.2: Cytosin-Methylierung

DNA-Methylierungen können auf transkriptionelle Prozesse einwirken und bleiben bei der DNA-Replikation erhalten, somit gehören sie zur Gruppe der epigenetischen Regulationsmechanismen. Unter Epigenetik versteht man meiotisch oder mitotisch vererbte Veränderungen in der Genexpression, welche nicht durch die DNA-Sequenz selbst codiert sind (Egger *et al.* 2004). Neben DNA-Methylierungen gehören dazu zum Beispiel auch Histonmodifikationen und Histonvarianten. DNA-Methylierungen treten in nahezu allen Organismen auf, von Bakterien über Pflanzen und Pilze bis hin zu Vertebraten und Invertebraten (Zemach *et al.* 2010). In einigen Modellorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* sind diese jedoch verloren gegangen (Chan *et al.* 2005, Gutierrez & Sommer 2004).

DNA-Methylierungen können die Genexpression beeinflussen, indem sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern. Dies geschieht entweder durch sterische Hinderung, eine engere Bindung der DNA um die Histone (Lee & Lee 2011) und/oder eine veränderte Positionierung der Nukleosomen (Chodavarapu *et al.* 2010, Segal *et al.* 2006). Zudem sind methylierte Cytosine anfällig für Mutationen, da 5-Methyl-Cytosin durch spontane Deaminierung leicht in Thymin umgewandelt werden kann (Coulondre *et al.* 1978). Dieser Vorgang gilt als einer der häufigsten Ursachen für Mutationen.

1.4.1 Mechanismen der DNA-Methylierung in *Arabidopsis thaliana*

Sowohl in Säugern als auch in Pflanzen dienen Methylierungen der Expressions-Regulation endogener Gene (Bird 2002). Pflanzen nutzen DNA-Methylierungen für das genomische Imprinting sowie zur Inaktivierung parasitärer DNA-Elemente, welche das Genom des

Wirtes zur Replikation nutzen, insbesondere Transposons. In *Arabidopsis thaliana* konnte beispielsweise demonstriert werden, dass durch reduzierte DNA-Methylierung in hohem Maße Transposons mobilisiert werden (Miura *et al.* 2001, Singer *et al.* 2001). DNA-Methylierungen werden daher wichtige Funktionen in Bezug auf die Verteidigung des Genoms gegen parasitäre DNA-Elemente zugeschrieben, nicht nur gegenüber Transposons, sondern auch gegenüber Viroiden, RNA- und DNA-Viren sowie bakterieller DNA (Matzke *et al.* 2000).

DNA-Methylierungen können in Abhängigkeit des Sequenz-Zusammenhangs, in dem sie auftreten, in drei Typen unterteilt werden: CG-, CHG- und CHH-Methylierungen (H =A, C oder T). CG-Methylierungen werden durch konservierte Methyltransferasen (*DNA methyltransferases*, DNMT) katalysiert. Im Allgemeinen treten DNA-Methylierungen in Vertebraten genomweit auf, wobei CG-Stellen sehr stark methyliert sind. Eine Ausnahme bilden CpG-Inseln, also Regionen mit einer sehr hohen CG-Dichte, welche sich häufig im Promoterbereich aktiver Gene befinden und eher unmethyliert sind. In Invertebraten, Pflanzen und Pilzen erfolgt die Methylierung dagegen eher mosaikartig und ist charakterisiert durch viele verstreute methylierte und unmethylierte Regionen (Suzuki & Bird 2008).

Katalysiert werden DNA-Methylierungen durch sogenannte Methyltransferasen, welche hinsichtlich ihrer Enzymaktivität in zwei Klassen unterschieden werden können – *de novo* und Erhaltungs-Methylierungen (*maintenance*-Methylierungen). Letztere sind notwendig, um das Methylierungsmuster nach jedem Zellteilungszyklus aufrechterhalten zu können. Ohne diese Form der Methylierung würden bei der DNA-Replikation unmethylierte Tochterstränge entstehen, was nach einiger Zeit zu einer passiven Demethylierung führen würde. In Säugern übernimmt die Methyltransferase DNMT1 diese Funktion. Dieses Enzym ist evolutionär stark konserviert und methyliert hauptsächlich CG-Dinukleotide (Goll & Bestor 2005). In Pflanzen ist das DNMT1-Homolog MET1 (*METHYLTRANSFERASE1*) für diese Form der Methylierung zuständig, während die Methyltransferasen DRM2/3 (*DOMAINS REARRANGED METHYLASE 1/2*) und CMT3 (*CHROMOMETHYLASE3*) auf Methylierungen an Nicht-CG-Stellen einwirken (Abbildung 1.3). CMT3 ist eine pflanzenspezifische Methyltransferase, welche hauptsächlich CHG-Motive methyliert (Lindroth *et al.* 2001). Für die in Pflanzen abundanten CHH-Methylierungen sind die Methyltransferasen DRM1 und DRM2 zuständig (Chan *et al.* 2005). Diese sind zu den DNMT3a/b-Methyltransferasen in Säugern homolog.

De novo-Methylierungen erfolgen in allen Sequenz-Zusammenhängen durch DRM-Proteine. Sie werden von kurzen RNA-Abschnitten vermittelt (*RNA-directed DNA methylation*, RdDM). Das AGO4-Protein (*ARGONAUTE4*) bindet diese doppelsträngigen RNA-Moleküle mit einer Länge zwischen 21 und 24 Nukleotiden (*small interfering RNAs*, siRNAs) und lenkt auf diese Weise die Aktivität der DRM-Enzyme zu den korrespondierenden genomischen Regionen (Zilberman *et al.* 2004). Neben Methylierungsprozessen existieren auch aktive Demethylierungsprozesse in Pflanzen. In *Arabidopsis thaliana* können Methylierungen durch DNA-Glykosylasen der DEMETER (DME)-Familie entfernt werden. Diese Enzyme sind in der Lage, spezifisch die N-glycosidische Bindung von 5-Methylcytosinen zu spalten. Im Anschluss daran wird das Methylcytosin mittels endogener Reparaturmechanismen durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt (Zhu 2009).

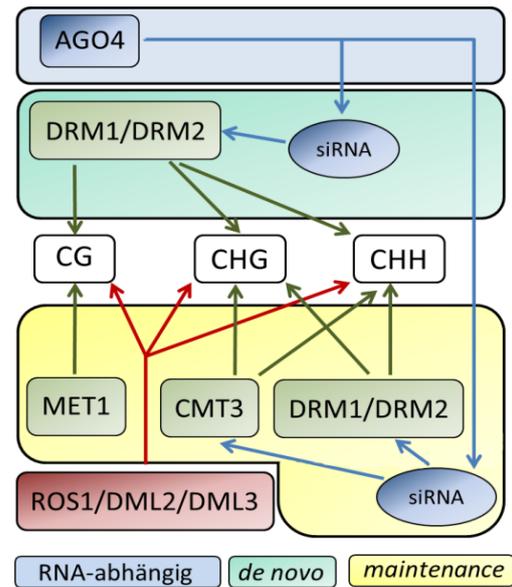


Abbildung 1.3: Wege der *de novo*- und Erhaltungsmethylierung in *Arabidopsis thaliana*. Erläuterung siehe Text.

Das DME-Protein kontrolliert die Allel-spezifische Expression von Genen und ist damit essenziell für genomisches Imprinting. Drei weitere Mitglieder der DME-Familie sind ROS1 (*REPRESSOR OF SILENCING1*), DML2 und DML3 (*DEMETER-LIKE 2/3*). Verlustmutanten dieser drei Enzyme (*ddd*) zeigen zwar eine ähnliche Gesamt-Methylierungsrate wie der Wildtyp-Pflanzen, jedoch treten an bestimmten Stellen im Genom Hypermethylierungen auf. Diese betreffen vornehmlich Promotoren und 3'-UTRs (Lister *et al.* 2008). Daher wird vermutet, dass diese drei Enzyme hauptsächlich dem Schutz der DNA vor potenziell schädlichen Methylierungen dienen, indem sie RNA-abhängigen Methylierungen entgegenwirken (Penterman *et al.* 2007).

1.4.2 SiRNA-abhängige Methylierung

Durch siRNAs können über einen RNA-abhängigen Mechanismus Methylierungen ausgelöst werden (Mette *et al.* 2000). Produziert werden diese siRNAs durch die Aktivität von RDR2 (*RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2*) und DCL3 (*DICER-LIKE 3*). Eine von der pflanzenspezifischen Polymerase IV produzierte einzelsträngige RNA (Abbildung 1.4 A)

wird dabei zunächst von RDR2 zu einem Doppelstrang umgewandelt (B; Mosher *et al.* 2008), welcher anschließend von DCL3 zu 24 Nukleotide langen siRNAs prozessiert wird (C). Diese werden schließlich von AGO4 gebunden (D) und führen durch Interaktion mit der Methyltransferase DRM2 und weiteren Proteinen zur Methylierung der korrespondierenden DNA-Sequenzen (E). Die Produktion von siRNAs ist auch durch die Spaltung invertierter Sequenzwiederholungen durch DCL3 möglich (F). Im Einklang mit der Funktion von siRNAs als Auslöser von Methylierungen ist der Großteil aller in *Arabidopsis* auftretenden siRNA-Cluster mit Methylierungen assoziiert (Zhang *et al.* 2006). Bei etwa 63% aller Methylierungen sind derartige siRNA-Cluster jedoch nicht zu finden und erfordern somit RNA-unabhängige Wege zur Aufrechterhaltung der Methylierung.

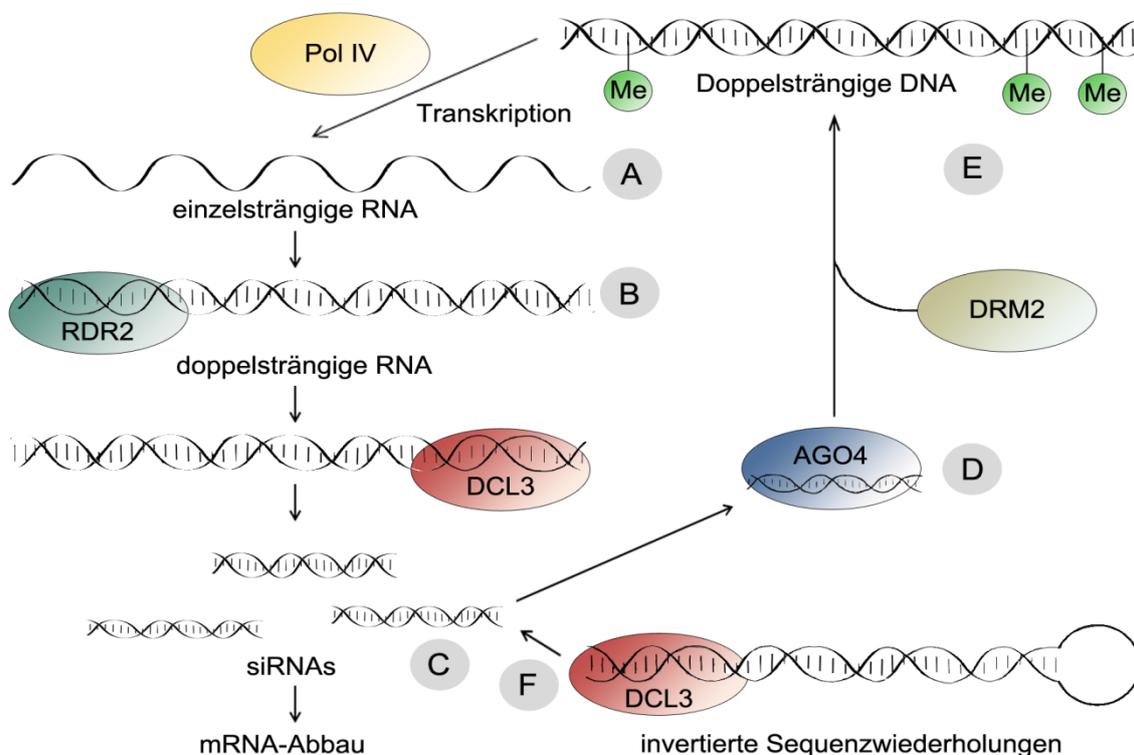


Abbildung 1.4: Modell der RNA-vermittelten DNA-Methylierung . Erläuterungen siehe Text.

SiRNA-abhängige Methylierungen haben einen vergleichsweise geringen Anteil an Methylierungen der transkribierten Genabschnitte (9% gegenüber einem Genom-Durchschnitt von 37%).

1.4.3 Erhaltung der genomischen Integrität und epigenetische Reprogrammierung

Um die genomische Integrität von Generation zu Generation zu erhalten ist es notwendig, Transposons und repetitive DNA-Elemente in reproduktiven Zellen unter starker regulatorischer Kontrolle zu behalten. Vorwiegend geschieht dies durch die stabile Vererbung von DNA-Methylierungen. So wird die transkriptionelle Hemmung potenziell schädlicher DNA-Elemente in der Regel meiotisch vererbt. Zusätzlich findet in reproduktiven Zellen eine umfassende epigenetische Reprogrammierung statt, obwohl dort keine genom-weiten Demethylierungen erfolgen, welche mit denen in tierischen Systemen vergleichbar sind (Feng *et al.* 2010b). Diese Reprogrammierung wird jedoch ebenfalls durch aktive Cytosin-Demethylierung induziert. Während die DNA-Glykosylasen ROS1, DML2, und DML3 hauptsächlich in vegetativem Gewebe exprimiert werden, verursacht das DME-Protein eine globale Demethylierung im Endosperm, dem extraembryonalen Nährgewebe der Samen (Gehring *et al.* 2009, Hsieh *et al.* 2009). Diese resultiert in einer Reaktivierung der Transposon-Expression, wodurch aus Transposon-Transkripten siRNAs produziert werden können (vergleiche 1.4.2). Wahrscheinlich können diese siRNAs auch in den Embryo transportiert werden, wo sie schließlich DNA-Methylierungen zu den korrespondierenden Sequenzen lenken (Hsieh *et al.* 2009) und zur Stilllegung von Transposons führen. Auf diese Weise wird eine epigenetische Reprogrammierung induziert, welche vermutlich die Hemmung der Transposon-Expression im Embryo verstärkt. Da DME vorwiegend vor der Befruchtung in der Zentralzelle des weiblichen Gametophyten exprimiert wird, kommt es zusätzlich zu maternaler allel-spezifischer Genexpression (Imprinting) im Endosperm, welches sich aus der Zentralzelle entwickelt. Ein ähnliches Modell existiert auch für die paternale Reprogrammierung im männlichen Gametophyten (Slotkin *et al.* 2009).

Fehler während der epigenetischen Reprogrammierung können die Ursache für die Ausbildung sogenannter Epiallele sein. Diese Epiallele resultieren in einigen Fällen auch in einer phänotypischen Variation, zum Beispiel veränderter Blütenmorphologie, -Symmetrie, Blühzeit, Pigmentierung oder Krankheitsresistenz (Kalisz & Purugganan 2004). Die Epimutationsrate, also zum Beispiel die Methylierung eines zuvor unmethylierten Cytosins, ist wesentlich höher als die Rate spontaner genetischer Mutationen. Sie liegt bei 4.46×10^{-4} gegenüber 7×10^{-9} Mutationen pro Motiv und Generation (Schmitz *et al.*

2011), was für die genetischen Mutationen etwas weniger als einer Mutation pro Generation entspricht.

Von generationsübergreifenden epigenetischen Variationen sind fast ausschließlich CG-Methylierungen betroffen. Ihre Anzahl steigt jedoch nicht linear über die Zeit an, weil in recht hohem Maße epigenetische Rückmutationen stattfinden (Becker *et al.* 2011). Auch bezieht sich die Mutationsrate auf einzelne Nukleotide. In größeren zusammenhängenden Regionen verändert sich die Methylierung über mehrere Generationen eher selten, was aber für transkriptionelle Veränderungen notwendig wäre. Die Epimutationsrate größerer Regionen ist vergleichbar mit der genetischer Mutationen und hat in der Regel auch einen Einfluss auf die Genexpression (Becker *et al.* 2011). Transposons sind weniger von Epimutationen betroffen als Gene. Vermutlich hängt dies damit zusammen, dass die Methylierung von Transposons in hohem Maße vom siRNA-abhängigen Methylierungsweg gesteuert wird (Kasschau *et al.* 2007). SiRNAs tragen somit auch zur epigenetischen Stabilität bei (Teixeira *et al.* 2009).

1.4.4 Das Methylierungsmuster von *Arabidopsis thaliana*

Mittels einer Hochdurchsatz-Sequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA wurde das Methylierungsmuster von *Arabidopsis thaliana* in Einzelnukleotid-Auflösung genomweit bestimmt (Cokus *et al.* 2008, Lister *et al.* 2008). Mit Hilfe dieser Methode wurde festgestellt, dass etwa 5% aller Cytosine methyliert sind. Der Großteil der Methylierungen findet dabei an CG-Nukleotiden statt (55%, Abbildung 1.5 A), während sich die übrigen Methylierungen gleichmäßig auf die CHG- und CHH-Motive verteilen (23% bzw. 22%). Die Methylierungsdichte ist in allen Sequenz-Zusammenhängen am höchsten in der Pericentromer-Region der Chromosomen (Abbildung 1.5 B). In diesen Bereichen sind CHG-Methylierungen sehr stark angereichert, vermutlich da sie präferenziell Transposon-Sequenzen und repetitive Elemente betreffen, welche dort besonders häufig vorkommen (Kato *et al.* 2003, Tompa *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu sind CG- und CHH-Methylierungen, obwohl auch diese am dichtesten in pericentromeren Regionen sind, in wesentlich stärkerem Maße im Euchromatin lokalisiert. Alle drei Methylierungstypen unterscheiden sich hinsichtlich der Methylierungsrate. Vorwiegend sehr stark methyliert sind CG-Motive, CHG-Motive hingegen besitzen eine große Bandbreite unterschiedlicher Methylierungsniveaus (Abbildung 1.5 C). An CHH-Stellen ist immer auch ein recht hoher Anteil unmethylierter Cytosine präsent, was darauf hindeuten könnte, dass diese

Methylierungen entweder spezifisch innerhalb eines Zelltyps des untersuchten Gewebes auftreten oder aber innerhalb eines Zelltyps sehr variabel sind.

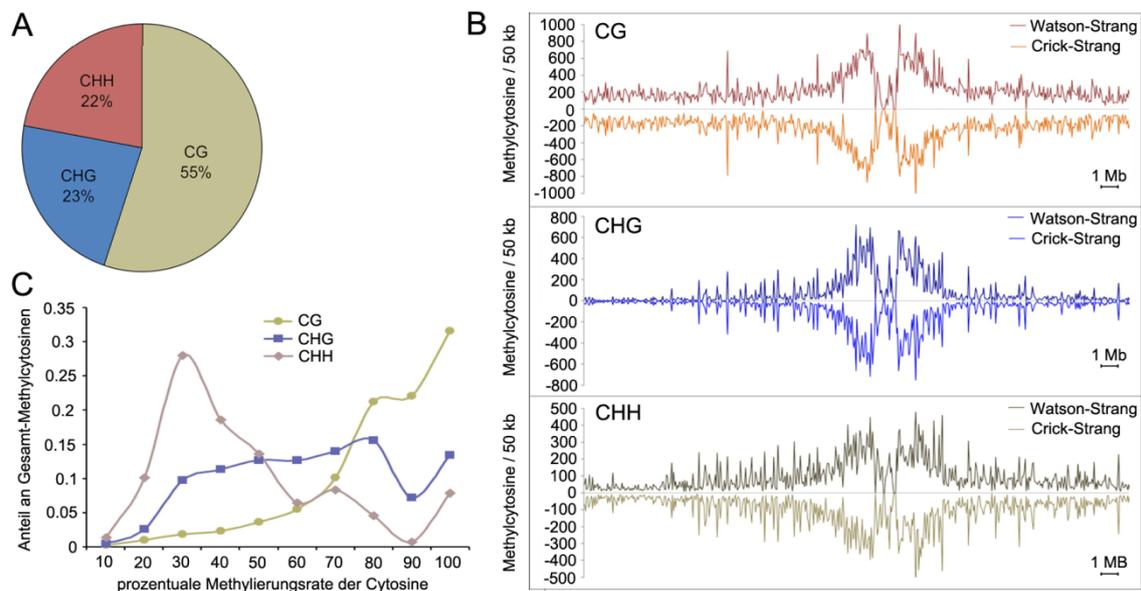


Abbildung 1.5: Motiv-abhängige Verteilung von DNA-Methylierungen in *Arabidopsis thaliana*. (A) Prozentuale Verteilung der DNA-Methylierungen in *Arabidopsis thaliana* entsprechend ihrer Sequenzzusammenhänge. Dargestellt sind die Anteile von Methylcytosinen der Motive CG, CHG und CHH (H=A,C,T). (B) Chromosomale Verteilung der Methylierungsdichte in den drei Sequenzzusammenhängen (CG, CHG, CHH), angegeben als Methylcytosinanzahl pro 50 kb entlang der beiden DNA-Stränge (Watson- bzw. Crick-Strang) von Chromosom 1. (C) Verteilung der prozentualen Methylierungsrate von CG-, CHG- und CHH-Motiven. Für diese Motive wurde der Anteil von Methylcytosinen mit unterschiedlicher Methylierungsrate (X-Achse, eingeteilt in 10%-Schritten) an allen Methylcytosinen mit entsprechendem Sequenzmotiv (Y-Achse) bestimmt. Die Daten beruhen auf einer genomweiten Sequenzierungsdatenanalyse Bisulfit-behandelter DNA vom *Arabidopsis*-Ökotyp Col-0. Abbildung verändert nach Lister *et al.* (2008).

Transposons und repetitive Elemente sind laut der Sequenzanalyse Bisulfit-behandelter DNA in hohem Maße von DNA-Methylierungen betroffen (Abbildung 1.6 B & C). Obwohl die transkribierten Regionen (*gene bodies*) von *Arabidopsis*-Genen in der Regel keine Transposons enthalten, sind diese häufig hochgradig methyliert (Zhang *et al.* 2006). Diese Methylierungen treten häufiger in 3'-Richtung des betroffenen Gens auf, Transkriptionsstart und -Ende sind dagegen stark hypomethyliert (Abbildung 1.6 A). Vermutlich werden Methylierungen in diesen Bereichen ausselektiert, da sie dort Vorgänge wie die Transkriptionsinitiation und -termination beeinträchtigen. Diese Tendenz zur Hypomethylierung ist interessanterweise nicht in Pseudogenen zu finden (Abbildung 1.6 B). In invertierten Sequenzwiederholungen treten DNA-Methylierungen hauptsächlich in der transkribierten Region auf (bei proteincodierenden Genen auch als *gene body* bezeichnet) und korrelieren stark mit der siRNA (*small interfering RNA*)-Dichte (Abbildung

1.6 C), was die Bedeutung von siRNAs bei der Induktion von DNA-Methylierungen unterstreicht (siehe 1.4.2).

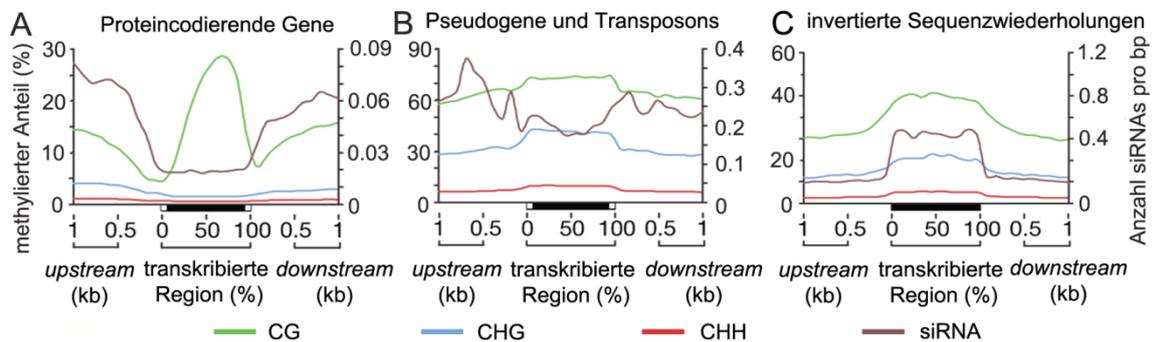


Abbildung 1.6: Methylierungsverteilung und siRNA-Dichte von proteincodierenden Genen (A), Pseudogenen und Transposons (B) sowie invertierten Sequenzwiederholungen (C) im Genom von *Arabidopsis thaliana*. Gezeigt ist der prozentuale Anteil methylierter Cytosine (linke Y-Achse) und die Anzahl der siRNAs pro Basenpaar (rechte Y-Achse) in Abhängigkeit von der Position im Gen-Locus von einem Kilobasenpaar (kb) stromaufwärts (upstream) bis zu einem kb stromabwärts (downstream). Positionen im Zentrum der jeweiligen Loci sind prozentual angegeben. Abbildung verändert nach Cokus *et al.* (2008).

1.4.5 Auswirkungen von DNA-Methylierungen auf die Transkription

DNA-Methylierungen können die Transkription über verschiedene Mechanismen beeinflussen (siehe 1.4). Betrachtet man die Auswirkungen in Abhängigkeit von der Position der Methylierungen so ist festzustellen, dass die Expression von Genen mit Methylierungen im transkribierten Bereich (*gene body*) höher ist als die unmethylierter Gene. Bei Promotormethylierungen ist diese Korrelation umgekehrt (Zhang *et al.* 2006). Eine erhöhte Methylierungsrate im Promoter führt also zu niedrigerer Expression. Der Effekt von Methylierungen im transkribierten Bereich ist jedoch weniger eindeutig und stärker umstritten als der von Methylierungen im Promoterbereich. Methylierungen im transkribierten Bereich führen in vielen Fällen auch zu einer Transkriptionshemmung, welche vermutlich durch Beeinträchtigung der transkriptionellen Elongation hervorgerufen wird (Zilberman *et al.* 2007). In jedem Fall sind Methylierungen im transkribierten Bereich ein typisches Merkmal exprimierter Gene (Jones 2012). Aufgrund des verstärkten Auftretens von Methylierungen in Exon-Bereichen wird vermutet, dass sie auch eine Funktion bei der Exon-Definierung haben (Feng *et al.* 2010a).

1.4.6 DNA-Methylierungen als Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress

Unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen kann sich auch das Methylierungsmuster verändern (Boyko & Kovalchuk 2008). So konnte bereits

demonstriert werden, dass eine Kälte-Behandlung bei Mais, Tabak und *Arabidopsis* in einer Hypomethylierung resultiert (Burn *et al.* 1993, Finnegan *et al.* 1998, Steward *et al.* 2002).

Viroide hingegen, welche in das pflanzliche Genom integriert werden, lösen eine RNA-abhängige Hypermethylierung homologer Sequenzen aus (Wassenegger *et al.* 1994). Epigenetische Prozesse können eine Rolle im Hinblick auf die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen spielen. So führt die vererbare, epigenetische Variation des BAL-Locus zu einer konstitutiven Überexpression eines pflanzlichen Resistenz-Gens (R-Gen, Ellis *et al.* 2000). Die Überexpression dieses Gens resultiert in einer konstitutiven Aktivierung von Salizylsäure-abhängigen Abwehrwegen, was sich sowohl in Zwergwuchs als auch in einer geringeren Anfälligkeit gegenüber Pathogenen wie *Pseudomonas syringae* äußert (Stokes *et al.* 2002).

Desweiteren wurde gezeigt, dass sich die DNA-Methylierung unmittelbar (24 h) nach der Infektion mit *Pseudomonas* verändert (Pavet *et al.* 2006). So führt diese Infektion zur Hypomethylierung repetitiver Centromer-Sequenzen. In diesen Transposon-reichen Regionen sind häufig Gene angereichert, deren Genprodukte eine Nukleotid-Bindestelle (*nucleotide binding site*, NBS) und eine Leucin-reiche Region (*leucine-rich repeat*, LRR) besitzen. Diese NBS-LRR-codierenden Gene bilden die größte Klasse pflanzlicher Resistenzgene (Dangl & Jones 2001), zu denen auch das bereits erwähnte R-Gen des BAL-Locus gehört. Es wäre daher denkbar, dass eine *Pseudomonas*-induzierte Hypomethylierung von R-Genen unmittelbar in einer erhöhten Krankheitsresistenz resultiert. Zudem erhöht sich durch Hypomethylierungen möglicherweise die genomische Plastizität und Variabilität im Hinblick auf die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen in der nächsten Generation (Pavet *et al.* 2006), da Hypomethylierungen häufig auch eine erhöhte Rekombinationsrate zur Folge haben (Mirouze *et al.* 2012).

In der Tat führt eine Behandlung von Pflanzen mit *Pseudomonas syringae* in der Folgegeneration zu einer erhöhten Resistenz gegenüber den hemibiotrophen Pathogenen *Hyaloperonospora arabidopsidis* und *Pst* DC3000 (Luna *et al.* 2012). Die Nachkommen der behandelten Pflanzen zeigen dabei eine stärkere und schnellere Aktivierung von Salizylsäure-abhängigen Abwehrwegen, welche über eine stressfreie Generation hinweg erhalten bleibt. Dieser generationsübergreifende Phänotyp ist auch in unbehandelten *ddc*-Mutanten zu finden, welche in der Nicht-CG-Methylierung beeinträchtigt sind. Daher ist anzunehmen, dass die erhöhte Resistenz durch Hypomethylierung von Genen ausgelöst

wird, welche das Priming Salizylsäure-abhängiger Abwehrwege regulieren. Diese These wird weiterhin unterstützt durch Beobachtungen nach denen Gene, welche einer Stress-induzierten Hypomethylierung unterliegen, auch in den Methylierungsmutanten *met1* und *ddc* verstärkt exprimiert werden (Dowen *et al.* 2012).

1.4.7 Einfluss von Phytohormonen auf DNA-Methylierungsprozesse

Abiotische und biotische Stressbedingungen gehen häufig mit veränderten Phytohormon-Spiegeln einher. Da auch im Tumor eine Reihe von Phytohormonen wie Cytokinin, Auxin und ABA in erhöhten Konzentrationen vorliegen wäre es denkbar, dass diese eine Rolle bei der Vermittlung von Signalen für Methylierungsprozesse spielen.

So konnte beispielsweise anhand von *Arabidopsis*-Mutanten der S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase (SAHH) gezeigt werden, dass Cytokinine die DNA-Methylierung hemmen (Rocha *et al.* 2005). SAHH-Verlustmutanten akkumulieren hohe Konzentrationen von Cytokinin und besitzen phänotypische Ähnlichkeiten mit Cytokinin-Überexpressionspflanzen, während gleichzeitig das DNA-Methylierungsniveau global erniedrigt wird. Einen weiteren indirekten Hinweis auf eine inhibitorische Funktion von Cytokinin auf Methylierungsprozesse liefern Experimente zur Dedifferenzierung von Tabak-Zellen zu Kallus-Gewebe (Koukalova *et al.* 2005). Während dieses Prozesses erfolgt eine Demethylierung von ribosomaler DNA, welche auch mit einer erhöhten Transkription von rRNA-Genen einhergeht. Die Autoren führen diesen Effekt auf die erhöhte Cytokinin-Konzentration im Kallus-Induktionsmedium zurück, da die rRNA-Transkription in *Arabidopsis* auch durch Cytokinin induziert werden kann (Gaudino & Pikaard 1997). Über Auxin-Effekte auf Methylierungsprozesse ist nur wenig bekannt. In Karotten-Zellkulturen bewirkt eine Erhöhung der Auxinkonzentration einen Anstieg des Methylierungsgrades (LoSchiavo *et al.* 1989).

Ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierungen und Phytohormonen konnte auch für Abscisinsäure (*abscisic acid*, ABA) demonstriert werden. Dieses pflanzliche Hormon ist insbesondere an der Stressanpassung beteiligt. Das DNA-Methylierungsmuster verändert sich in Reaktion auf Kältestress, Salzstress, osmotischen Stress (Choi & Sano 2007, Kovařík *et al.* 1997, Steward *et al.* 2002) und auch in Reaktion auf Wassermangel (Labra *et al.* 2002). Aufgrund der essenziellen Rolle als Signalmolekül bei diesen Prozessen wäre es naheliegend, dass ABA als Auslöser für die Methylierungsveränderungen fungiert. Allerdings konnte dies bisher nur für *Physcomitrella patens* unmittelbar gezeigt werden

(Khraiwesh *et al.* 2010). Dort wird durch ABA die Bildung von miRNAs induziert, welche in der Folge Methylierungsprozesse an ihrer korrespondierenden genomischen Sequenz auslösen können.

1.4.8 Die Rolle epigenetischer Faktoren in tierischen Tumoren

Im Gegensatz zu Pflanzen ist die Rolle epigenetischer Faktoren während der Entwicklung tierischer Tumore gut untersucht. In die Beobachtung epigenetischer Prozesse werden daher große Hoffnungen im Hinblick auf die Diagnose und das Monitoring verschiedener Krebsarten gesetzt (Anglim *et al.* 2008, Levenson 2010, Lofton-Day *et al.* 2008, Tsou *et al.* 2002). Wie auch bei der Entwicklung pflanzlicher Tumore (Tenea *et al.* 2009) sind bei Mammaliern die Histone von großer Relevanz, indem durch Deacetylierung die Zugänglichkeit des Chromatins verringert wird (Glozak & Seto 2007). Dieser Verlust von Histon-Acetylierung fördert die Tumorentwicklung und ist somit ein Kennzeichen der Krebsentwicklung (Fraga *et al.* 2005). Auch hinsichtlich der Veränderungen des Methylierungsmusters sind Säuger-Tumore gut untersucht. So ist in diversen Studien gezeigt worden, dass es häufig zu Promotormethylierungen von Tumorsuppressorgenen kommt, welche das Wachstum des Tumors im unmethylierten Zustand begrenzen (Johnson *et al.* 2008, Karpf & Jones 2002). Demnach ist das Genexpressionsmuster im Tumor zumindest teilweise auch auf epigenetische Veränderungen, insbesondere Promotor-Hypermethylierungen, zurückzuführen (Baylin 2005).

Diese Hypermethylierungen finden sich am häufigsten innerhalb von sogenannten CpG-Inseln, das sind meist Gen-nahe Bereiche mit einem erhöhten Anteil von CG-Nukleotiden (Gardiner-Garden & Frommer 1987). Im Gegensatz dazu sind Hypomethylierungen in der Regel in Regionen mit vielen Sequenzwiederholungen zu finden. Hierzu zählen heterochromatische Bereiche, Retrotransposons und endogene retrovirale Elemente (Ehrlich 2002). Insgesamt gesehen ist ein größerer Teil des Genoms maligner humaner Tumore eher weniger stark methyliert im Vergleich zum Genom aus gesundem Gewebe. Jedoch ist die Hypomethylierung sehr variabel und stark abhängig von der Art des betroffenen Gewebes (Estécio *et al.* 2007). In seltenen Fällen treten sogar genomweite Hypermethylierungen auf (Hakkarainen *et al.* 1996). Hypomethylierungen können auch zur Tumorentwicklung beitragen, wenn es durch *cis*- oder *trans*-Effekte zur Aktivierung Tumorfördernder Gene kommt (Ehrlich 2002). Zusätzlich legen Experimente mit dem demethylierenden Cytidin-Analogon 5-Azacytidin nahe, dass Hypomethylierungen die

Dekondensierung von Heterochromatin bewirken, welche wiederum die Rekombination zwischen DNA-Sequenzwiederholungen fördert (Hernandez *et al.* 1997, Ji *et al.* 1997).

Weiterhin lässt das häufige Auftreten von DNA-Hypomethylierungen in stark repetitiven DNA-Sequenzen maligner Tumore vermuten, dass diese die karyotypische Instabilität fördern und damit zu einem stärkeren Tumorwachstum beitragen (Qu *et al.* 1999). Diese These wird durch Experimente gestützt mit denen demonstriert werden konnte, dass der Verlust einer Methyltransferase in einem hypomethylierten Genom resultiert, welches durch Aneuploidie, Polyploidie und weitere chromosomale Aberrationen wie Brüche und Fusionen charakterisiert ist (Dodge *et al.* 2005).

1.5 Zielsetzung

Das *Agrobacterium*-vermittelte Wachstum von Wurzelhalsgallen ist mit großen transkriptionellen und physiologischen Veränderungen verbunden. Zudem wird in jüngster Zeit epigenetischen Prozessen wie DNA-Methylierungen eine wachsende Aufmerksamkeit im Hinblick auf Entwicklungsprozesse, biotische und abiotische Stressreaktionen sowie dem Schutz des Genoms vor schädlichen DNA-Elementen zuteil. Obwohl bereits vor über 50 Jahren postuliert wurde, dass die Wurzelhalsgallen-Entwicklung möglicherweise auch epigenetische Ursachen hat, ist bis heute nur wenig darüber bekannt.

Daher wurde in dieser Arbeit die Rolle von DNA-Methylierungen bei der durch *Agrobacterium* induzierten Tumorentwicklung anhand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht. Hierbei war zu beachten, dass für die Tumorentwicklung sowohl die pflanzlichen Gene als auch die integrierten Tumor-auslösenden Onkogene relevant sind.

Die Analyse der Onkogene erfolgte durch Bisulfit-Sequenzierung von Tumorgenese-relevanten Genabschnitten der in das pflanzliche Genom integrierten T-DNA. DNA-Methylierungen können durch den Einsatz geeigneter Vektorkonstrukte induziert werden und so die Genexpression reprimieren. Daher wurde in dieser Arbeit geprüft, welchen Einfluss dieser RNA-abhängige Mechanismus auf die Onkogenexpression und das Tumorstadium hat.

Für die genomweiten Untersuchungen der DNA-Methylierung wurden in dieser Arbeit Microarray-Analysen mit immunopräzipitierter DNA durchgeführt. Ein Vergleich der Methylierungsmuster von Tumor-DNA mit DNA aus nicht infiziertem Sprossgewebe sollte die differenziell methylierten Regionen im Tumorgenom zu Tage fördern. Außerdem sollte festgestellt werden, welche Auswirkungen Veränderungen im Methylierungsmuster auf die Genexpression im Tumor haben. Eine funktionelle Kategorisierung der von Methylierungsänderungen betroffenen Genkategorien wurde durchgeführt, um die Gengruppen ausfindig zu machen, die eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielen. Ein weiteres Interesse dieser Arbeit bestand darin, Signalwege zu identifizieren, welche im Tumor Methylierungsveränderungen induzieren könnten.

2. Material & Methoden

2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

In dieser Arbeit wurden zur Vermehrung von Plasmiden Bakterien der *E. coli*-Stämme XL1-Blue MRF' oder DB3.1 verwendet (siehe Tabelle 2.1). Während der Stamm XL-Blue MRF' standardmäßig zur Transformation von Plasmiden verwendet wurde, dienten Bakterien des Typs DB3.1 als Träger von Plasmiden mit bakteriellen Selektionsmarkern wie dem *ccdB*-Gen. Dieses Gen war beispielsweise auf den verwendeten pHellsgate-Vektoren (siehe 2.4.1) präsent und codiert für einen Gyrase-Hemmer, der normalerweise toxisch auf die verwendeten Bakterien wirkt. Der Stamm *E. coli* DB3.1 besitzt eine mutierte Form der A-Untereinheit der Topoisomerase II (*gyrA462*), welche den CcdB-Effekt unterdrückt und damit die Propagierung der entsprechenden Vektoren ermöglicht. Für die Plasmidpräparation (siehe 2.4.12) wurden die Bakterien in etwa 5 ml flüssigem LB-Medium (siehe 2.2) in einem 15 ml Reaktionsgefäß bei 37°C geschüttelt (G25 Incubator Shaker; New Brunswick Scientific). Nach einer Transformation (siehe 2.1.3) wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten (LB-Medium + 1,5% Agar) ausgestrichen und im Wärmeschrank (BE600; Memmert) bei 37°C über Nacht inkubiert.

Tabelle 2.1: Verwendete *E. coli*-Stämme mit den wichtigsten Merkmalen des Genotyps

Organismus	Genotyp	Verwendung	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$ <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> <i>lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> DB3.1	<i>F- gyrA462 endA1 glnV44 $\Delta(\text{sr1-recA})$</i> <i>mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galk2</i> <i>lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1</i>	Vermehrung von Plasmiden mit <i>ccdB</i> -Gen	Life Technologies, Darmstadt

2.1.2 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Induktion von Tumoren bei *Arabidopsis thaliana* wurden Agrobakterien des Nopaline-katabolisierenden Stammes C58_{noc} (*nopaline catabolism construction number 584*, Tabelle 2.2) verwendet. Dieser wurde zunächst auf Platten über Nacht bei 28°C kultiviert und für die *Arabidopsis*-Infektion in Flüssigmedium bis zu einer OD von 0,4 inkubiert. Je nach Anwendung kam dabei KB- oder YEB-Medium zum Einsatz.

Bei Agrobakterien mit einem zusätzlichen Plasmid zur Pflanzentransformation (Stamm GV3101) wurden dem Anzuchtmedium die entsprechenden Antibiotika (siehe Tabelle 2.3) zugesetzt. Die Stammkulturen wurden zur Erhaltung der Virulenz bei -80°C gelagert und für jedes Experiment frisch angeimpft.

Tabelle 2.2: Verwendete *A. tumefaciens*-Stämme

Organismus	Virulenz	Resistenz	Referenz
<i>A. tumefaciens</i> C58 _{noc}	wildtyp, onkogen	-	Hamilton & Fall 1971
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Derivat von C58, enthält kein pMP90-Plasmid, nicht onkogen	Rifampicin, Kanamycin	Koncz & Schell 1983

2.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Bakterienmembran wurde vor der Transformation permeabilisiert, um eine effektive Aufnahme von DNA in die Zellen zu gewährleisten. Die Herstellung solcher chemisch kompetenter Bakterien erfolgte durch die Behandlung der Zellmembran mit divalenten Rb^+ -Kationen (Hanahan 1983). Die Transformation wurde nach Inoue *et al.* durchgeführt (Inoue *et al.* 1990).

2.1.4 Transformation elektrokompenter Bakterien

Für die *Agrobacterium*-Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien eingesetzt. Zur Herstellung wurden 500 LB-Medium (siehe 2.2) mit 5 ml einer *Agrobacterium*-Übernachtskultur inokuliert bei 28°C bis zu einer OD_{550} von 0,5-0,8 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien eisgekühlt, 10 min bei 4°C abzentrifugiert und in 500 ml eiskaltem H_2O resuspendiert. Nach dreimaligem Waschen mit H_2O wurden die Bakterien in 5 ml 10% (v/v) kaltem, sterilen Glycerin aufgenommen, zu je 50 μl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden 50 μl kompetente Bakterien und 1 μl des Plasmids auf Eis gemischt, in eine kalte 2 mm Elektroporationsküvette gegeben und einem Spannungspuls von 2500 V mit einer Dauer von ca. 4,8 ms ausgesetzt (Elektroporator Eppendorf 2510). Sofort nach der Elektroporation wurden die Bakterien in einem Milliliter LB-Medium resuspendiert und für 4 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz zentrifugiert, das Medium bis auf 200 μl entfernt und die resuspendierten Bakterien auf

LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (siehe 2.2) 3-4 Tage bei 28°C inkubiert.

2.1.5 Kryokonservierung

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden diese mit Glycerin versetzt. Hierfür wurden 600 µl Bakterienkultur mit 300 µl 30%igem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2 Medien und Antibiotika

Zur Medienherstellung wurden die unten angegebenen Feinchemikalien H_2O_{bidest} gelöst und der pH-Wert mit KOH auf pH 7,2 eingestellt. Die Medien wurden bei 120°C für 30 min autoklaviert und gegebenenfalls mit Antibiotika (siehe Tabelle 2.3) versetzt. Für Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 1,5% Agar hinzugefügt. Dem Kings Broth Medium (KB) wurden K_2HPO_4 und $MgSO_4$ erst nach dem Autoklavieren aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Medienplatten wurden bei 4°C gelagert und innerhalb von zwei Monaten verbraucht.

LB-Medium:		YEB-Medium:		KB (Kings Broth)-Medium:	
Trypton	10 g/l	Trypton	0,5%	Protease peptone #3	2%
Hefeextrakt	5 g/l	Hefeextrakt	0,5%	Glycerol	1%
NaCl	10 g/l	Saccharose	0,5%	$MgSO_4$	0,15%
		$MgSO_4$	50 mM	K_2HPO_4	0,15%

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration	gelöst in
Spectinomycin	100 mg/ml	100 µg/ml	H_2O
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml	H_2O
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	H_2O

2.3 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

2.3.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Als Pflanzenmaterial für die Agrobakterieninfektion diente *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Wassilewskija-2, Columbia-0, oder Landsberg erecta). Es wurden verschiedene Mutanten verwendet, welche in Tabelle 2.4 aufgelistet sind. Bei den ddc (*drm1 drm2 cmt3*) und rdd (*ros1, dml2, dml3*) tripel-Mutanten handelte es sich um T-DNA-Insertionslinien, während die ago4-line durch Ethylmethansulfonat (EMS) erzeugt wurde. Die Pflanzen wurden aus getrockneten und bei 4°C gelagerten Samen in Percival-Pflanzenanzuchtkammern (Philipps, USA) auf Erde angezogen. Nach etwa drei Wochen wurden die Pflanzen pikiert und unter folgenden Bedingungen weiter kultiviert:

Lichtperiode (Tag/Nacht): 12 h/12 h

Lampentyp: Fluoreszenzlampen F32T8/TL741 (Philips)

Lichtquantität: 80-120 µE

Luftfeuchtigkeit: 55%

Temperatur (Tag/Nacht): 22°C/16°C

Tabelle 2.4: Verwendete *Arabidopsis*-Mutanten

Ökotyp	Mutante	Typ	Referenz
Col-0	<i>drm1 drm2 cmt3</i> (ddc)	T-DNA-Insertionsmutante, homozygot	(Chan <i>et al.</i> 2006)
Col-0	<i>ros1-3 dml2-1 dml3-1</i> (rdd)	T-DNA-Insertionsmutante, homozygot	(Penterman <i>et al.</i> 2007)
Ler	<i>ago 4-1</i>	EMS-Mutante, homozygot	(Zilberman <i>et al.</i> 2003)

2.3.2 Sterilisation von *Arabidopsis*-Samen

Zur Sterilisierung von Samen wurden diese für zwei Minuten in 70%igem Ethanol und anschließend für fünf Minuten in NaOCl (5%) inkubiert. Anschließend wurden die Samen fünfmal mit sterilem H₂O gewaschen und auf autoklaviertem Whatman-Papier getrocknet.

2.3.3 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzen wurden für die Transformation bis zur Blühinduktion kultiviert, daraufhin wurde die Hauptsprossachse entfernt, um die Bildung von Seitensprossen zu induzieren. Die Transformation der Pflanzen durch *floral dip* (Clough & Bent 1998) wurde

durchgeführt, sobald sich eine hohe Anzahl ungeöffneter Blüten gebildet hatte. Zu diesem Zweck wurden Agrobakterien des Stammes GV3101 (pMP90) in LB-Medium mit Kanamycin bis zu einer OD_{600} von 0,4 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 5500 g abzentrifugiert und in *floral dip*- Inokulationsmedium (5% Sucrose & 0.05% Silwet L-77) resuspendiert (End- OD_{600} 0,8). Sämtliche *Arabidopsis*-Blüten wurden mit dem Inokulationsmedium beträufelt. Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen und somit die Transformationseffizienz zu verbessern, wurden die Pflanzen für 24 h mit einer Kunststoffhaube abgedeckt und für diesen Zeitraum im Dunkeln aufbewahrt. Danach wurde die Haube entfernt und die Pflanzen bis zur Samenreife in Pflanzenanzuchtkammern kultiviert. Das reife Saatgut (T1-Generation) wurde sterilisiert (siehe 2.3.2), zur Selektion der transgenen Pflanzen auf MS-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und Langtagbedingungen ausgesetzt. Kanamycin-resistente Keimlinge wurden nach 3-4 Wochen in Erdkultur transferiert.

MS-Medium:

MS-Salze mit Vitaminen	4,32 g/l
MES (pH 7,5)	0,5 g
myo-Inositol	100 mg/l
Saccharose	10 g/l
Bacto-Agar	0,75%

2.3.4 Erzeugung von Tumoren an *Arabidopsis thaliana*

Für die Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit *Agrobacterium tumefaciens* wurden Agrobakterien auf KB-Agar vereinzelt und anschließend in KB-Flüssigmedium über Nacht inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,4 erreicht war. Die Bakterien wurden daraufhin mit einer 0,4 mm Kanüle sechs Mal am übereinander am unteren Ende der Infloreszenzachse injiziert. Diese Prozedur wurde (jeweils um 90 Grad versetzt) dreimal wiederholt. Der Einstich in das Pflanzengewebe erfolgte dabei nicht sehr tief, um den Spross nicht zu stark zu verletzen. Zur Infektion wurden Pflanzen verwendet, die bereits eine 3-5 cm lange Infloreszenzachse ausgebildet hatten. Nach 28 bis 32 Tagen wurden die Tumore mit einem Skalpell unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops von der Pflanze abgetrennt. Als Referenz wurden Pflanzen verwendet, bei denen statt Bakterien-Flüssigkultur KB-Medium (siehe 2.2) injiziert wurde.

2.3.5 ABA-abhängige Keimungsexperimente

Die in dieser Arbeit durchgeführten Keimungsexperimente erfolgten nach dem Protokoll von Nishimura *et al.* (2007). Hierzu wurden *Arabidopsis*-Samen (Ökotyp WS-2) vier Tage lang bei 4°C stratifiziert. Die Keimung erfolgte anschließend für zwei Tage auf MS-Agar-Platten (siehe 2.3.3) mit oder ohne ABA (0,5 µM). Anschließend wurde aus den Keimlingen genomische DNA isoliert und einer Bisulfit-Sequenzierung unterzogen (siehe 2.4.15 und 2.6.1)

2.4 Arbeiten mit DNA

2.4.1 Verwendete Vektoren

Der Vektor pGEM-T Easy wurde zur TA-Klonierung von PCR-Produkten für die Bisulfit-Sequenzierung verwendet (Tabelle 2.5). Der pENTR/D-TOPO Vektor (Tabelle 2.5) wurde zur Zwischenklonierung für die pHellsgate-Konstrukte eingesetzt, da dieser attL-Rekombinationsstellen für die folgende Gateway-Klonierung in pHellsgate12 (Tabelle 2.5) besitzt. Durch Klonierung in diesen Vektor entstehen zwei komplementäre Sequenzen, welche durch zwei Introns in entgegengesetzter Orientierung voneinander getrennt sind. Diese Sequenz steht unter der Kontrolle eines CaMV-35S-Promoters, welcher eine pflanzenspezifische Überexpression ermöglicht. Die bei der Expression entstehende Haarnadel-Struktur wird nach der Expression in 21-24 Nukleotide lange siRNAs gespalten, welche in der pflanzlichen Zelle durch verschiedene Mechanismen zur Stilllegung des betroffenen Gens führen können (vergleiche 1.4.2).

Tabelle 2.5: Verwendete Vektoren

Vektor	Resistenz	Länge (bp)	Bezugsquelle/Referenz
pGEM-T Easy	amp ^r	3016	Promega, Mannheim
pENTR/D-TOPO	kan ^r	2580	Life Technologies, Darmstadt
pHellsgate12	spec ^r	17681	Helliwell & Waterhouse, 2003

2.4.2 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von Fragmenten zur Bisulfit-Sequenzierung, zur Erstellung der pHellsgate-Konstrukte sowie zum Screening transgener Pflanzen eingesetzt. Die für die PCR verwendeten Primer und deren Anlagerungstemperaturen sind unter 8.1 aufgelistet. Ein Standard-PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Taq-Puffer (10-fach, +KCl, -MgCl ₂)	5 µl
Taq-Polymerase (10 U/µl)	0,25 µl
<i>forward</i> -Primer (10 µM)	5 µl
<i>reverse</i> -Primer (10 µM)	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1µl
DNA-Matrize	1 µl
ad 50 µl	H ₂ O (HPLC-Qualität)

Es wurde standardmäßig folgendes PCR-Programm verwendet:

Prädenaturierung	→ 94°C (2 min)	
Denaturierung	→ 94°C (30 s)	
Annealing	→ 60-62°C (45 s)	
Elongation	→ 72°C (30 s pro 500 bp)	
Endsynthese	→ 72°C (5 min)	
Kühlung	→ 10°C (∞)	

2.4.3 Gelextraktion und Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten aus PCR-Ansätzen oder Agarosegelen wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction- bzw. des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.4.4 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers (Nanodrop 2000c) mittels Messung der Extinktion bei 260 nm (Absorption der Nukleinbasen) und 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren). Aus den daraus erhaltenen Werten sowie der Extinktion bei 230 nm wurden sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der zu untersuchenden Proben ermittelt. Für DNA

wurde ein A260/280-Verhältnis von 1,8 als optimal angesehen, für RNA ein Verhältnis von 2,0. Das A260/230-Verhältnis sollte dabei idealerweise über 2,0 liegen.

2.4.5 Ethanol-Fällung von DNA

Zur DNA-Fällung wurden zunächst zur Erhöhung der Konzentrationen monovalenter Kationen 0,1 Volumen Na-Acetat (3 M) zur Probe hinzugegeben. Daraufhin wurden 2 Volumen eiskalter Ethanol hinzugefügt, die Lösung gevortext und 1 h bei -80°C gelagert. Die Probe wurde abzentrifugiert (20 min) und der Überstand entfernt. Nach einem Waschschrift mit 200 µl 70%igem Ethanol wurde 5 min zentrifugiert, der Überstand erneut entfernt und der verbliebene Ethanol durch Inkubation der offenen Reaktionsgefäße bei 37°C verdampft. Das Pellet wurde je nach Anwendung in 50-100 µl TE (siehe 2.4.12) gelöst.

2.4.6 Restriktionsenzyme

Rekombinierte Plasmide wurden durch eine Behandlung mit Restriktionsendonukleasen auf erfolgreiche Insertion untersucht bzw. die Orientierung des Inserts ermittelt. Daneben wurden Vektoren und Inserts durch den Verdau mit Restriktionsenzymen für Ligationen präpariert oder genomische DNA für ein effektivere Bisulfit-Umwandlung vorbereitet. Zur Restriktion wurden die Endonukleasen nach Anleitung des Herstellers (Fermentas oder NEB) eingesetzt.

2.4.7 Ligation

Bei der Ligation werden Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden von doppelsträngigen DNA-Molekülen hergestellt. Für die Ligation wurde folgender Ansatz für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert:

10x T4-Ligase-Puffer (Fermentas)	1 µL
Vektor-DNA	300 ng
Insert-DNA	1-5 fache Menge an Vektor
T4-DNA Ligase (Fermentas)	1 µl
dd H ₂ O	ad 10 µl

2.4.8 Ligation von PCR-Produkten (TA-Klonierung)

Die native Taq-Polymerase besitzt eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität, welche am 3'-Ende der generierten PCR-Produkte zur Addition eines Nukleotides, vorzugsweise Adenin, führt (Clark 1988). Durch Verwendung eines Vektors mit Thyminnukleotid-Überhängen können PCR-Produkte effizient mit diesem verknüpft werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das pGEM®-T Easy Vector System (Promega) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.9 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um die Religation von Vektoren nach einer Behandlung mit Restriktionsenzymen zu verhindern, wurden die 5'-Phosphat-Reste der beiden Enden des linearen, doppelsträngigen Plasmids mittels alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu wurde die geschnittene Plasmid-DNA (10 µg) einer einmaligen Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (siehe 2.4.16 und 2.4.5) unterzogen und in 80 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) gelöst. Anschließend wurde die DNA gemäß folgendem Reaktionsansatz behandelt:

lineare Plasmid-DNA	10 µg
10 x Reaktionspuffer	10 µl
Alkalische Phosphatase (<i>shrimp alkaline phosphatase</i> , Fermentas)	1 u/µmol DNA-Enden
HPLC-Wasser	ad 100 µl

Abschließend wurde die Phosphatase durch 15-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Es folgten je eine Extraktion mit Phenol und Phenol-Chloroform mit anschließender Ethanol-Fällung (siehe 2.5.15 und 2.5.23). Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer Puffer gelöst und bei -20° C gelagert.

2.4.10 Gateway-Klonierung von PCR-Produkten

Die Gateway-Klonierung wurde zur Herstellung von Haarnadel-Konstrukten eingesetzt und ermöglicht eine schnelle und gerichtete Klonierung von Genen und Genfragmenten unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Das System beruht auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen λ , welches durch das Zusammenwirken der Integrase des Phagen und *E. coli*-Wirtsfaktoren die Rekombination des Inserts mit dem Zielvektor ermöglicht. Voraussetzung hierfür sind spezifische Sequenzabschnitte (*attachment sites, att*) in der Ziel-DNA, zwischen denen die zu übertragenden genetischen Informationen eingefügt werden können. Die pHellsgate-Zielvektoren enthalten attR1- und attR2-Stellen. Die für die Rekombination notwendigen homologen Bereiche (attL1 und attL2) sind in Eingangsvektoren enthalten. Die zu untersuchenden Genabschnitte wurden zunächst in den pENTR-D-TOPO-Eingangs-Vektor (Invitrogen) kloniert. Anschließend wurden diese Abschnitte durch eine LR-Rekombinationsreaktion nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen) in den Zielvektor (pHellsgate) eingebracht. Anschließend wurden die Plasmide in den *E. coli* Stamm XL1-Blue MRF' transformiert (siehe 2.1.3) und auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (siehe 2.2) inkubiert. Durch die LR-Rekombination erfolgt ein Austausch des ccdB-Gens des Zielvektors gegen den zu untersuchenden Genabschnitt, was die Propagierung des Vektors im verwendeten *E. coli*-Stamm ermöglicht (vergleiche 2.1.1). Bedingt durch die doppelte Selektion durch Antibiotikum und ccdB-Gen wird eine vergleichsweise hohe Klonierungseffizienz erreicht.

2.4.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen nach Sambrook *et al.* (1989). Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden unterschiedliche Agarose-Konzentrationen (zwischen 0,7% und 2%) in TAE-Puffer verwendet. Um die DNA später sichtbar machen zu können, wurden die Gele vor der Polymerisation mit einprozentigem Ethidiumbromid (5 μ l /100 ml Gel, Roth) oder GelGreenTM Nucleic Acid Stain (5 μ l/100 ml Gel, Biotium) versetzt. Die Trennung der Proben erfolgte nach Zugabe von 10-fachem Ladepuffer bei einer Spannung von 100 V. Als Größenstandard (siehe 8.2) diente PstI-verdaute λ -Phagen-DNA (Fermentas) oder Forever 100 bp ladder (BioCat). Die Detektion und Analyse der Fragmentgrößen erfolgte unter UV-Licht an einem Gel iX Imager (Intas).

TAE-Puffer (50x):	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	500 mM EDTA (pH 8.0)	100 ml
10x Ladepuffer:	Ficoll-400	2,5 g
	Tris-Cl (1M pH 7,4)	1 ml
	0,5 M EDTA	2 ml
	Xylen Cyanol	25 mg
	Orange G	25 mg
	HPLC-Wasser	Ad 10 ml

2.4.12 Extraktion von Plasmid-DNA

Zur Extraktion von Plasmiden aus *E. coli* wurde die *ten minute plasmid mini prep* (Zhou *et al.* 1990) eingesetzt, welche auf dem Prinzip der alkalische Lyse beruht. Hierfür wurden zunächst 1,5 ml Bakterien-Flüssigkultur (siehe 2.1.1) durch Zentrifugation (30 s, 13000 g) pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 50 µL verworfen und die Bakterien im verbliebenen Medium resuspendiert. Durch die Zugabe von 300 µL TENS-Puffer (siehe unten) und anschließendes vortexen wurden die Zellwände lysiert und die bakterielle DNA freigesetzt. Das Lysat wurde mit Hilfe von 150 µl 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) neutralisiert. Durch Zentrifugation (13000 g, 5 min) wurden die Zellwandbestandteile, die genomische DNA, Lipide und Proteine zum Großteil aus der Lösung entfernt. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 600 µl Isopropanol ausgefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (13000 g, 5 min) wurde die DNA mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C im Heizblock getrocknet und abschließend in 50 µl HPLC-Wasser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gelöst.

War, beispielsweise für Sequenzierreaktionen, ein hoher Reinheitsgrad der Plasmid-DNA notwendig, so wurde die Isolierung mit dem Wizard®*Plus* Miniprep-System (Promega) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

TENS-Puffer:	TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA)	9,4 ml
	SDS (10%)	500 µl
	NaOH (10M)	100 µl
	RNase	100 µg/ml

2.4.13 Extraktion genomischer DNA anhand der CTAB-Methode

Genomische DNA hoher Konzentration wurde aus *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe der CTAB-Methode extrahiert. Hierfür wurden 300 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 300 µl EBA- und 900 µl EBB-Puffer sowie 100 µl SDS (20%) hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde gevortext und 10 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 410 µl kaltem Kaliumacetat (5 M) erfolgte eine 3-minütige Inkubation auf Eis. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die DNA durch Inkubation mit 540 µl kaltem Isopropanol gefällt (20 min auf Eis). Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C im Heizblock getrocknet und in 600 µl TE (siehe 2.4.12) gelöst. Danach wurden 60 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 360 µl kaltes Isopropanol zugegeben, der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert und das Pellet erneut mit 70%igem Ethanol gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und das Pellet abschließend in 100 µl TE-Puffer gelöst.

Puffer EBA:	Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	2%
	Tris-HCl pH 8,0	100 mM
	EDTA pH 8,0	20 mM
	NaCl	1,4 M
	Polyvinylpyrrolidon (PVP)	4%
	Ascorbat	0,1%
	β-Mercaptoethanol	10 mM

Puffer EBB:	Tris-HCl	100 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	100 mM
	β-Mercaptoethanol	10 mM

2.4.14 Schnelle Extraktion von genomischer DNA

Für die Extraktion genomischer DNA zur Genotypisierung von *Arabidopsis*-Mutanten wurden etwa 50 mg Blattgewebe mit flüssigem Stickstoff gemörsert und in 400 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation wurden zum Überstand 300 µl Isopropanol hinzugefügt und der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (5 min, 12000 g) pelletiert. Daraufhin wurde der Überstand entfernt und die DNA in 50 µl HPLC-Wasser (Roth) resuspendiert.

Lysis-Puffer:	Tris-HCl, pH 8	200 mM
	NaCl	250 mM
	EDTA, pH 8,0	25 mM
	SDS	0,5 %

2.4.15 Silikat-basierte Extraktion von genomischer DNA

War für die weitere Verwendung ein hoher Reinheitsgrad der genomischen DNA erforderlich, so wurde die DNA-Isolierung unter Verwendung des DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um eine möglichst hohe DNA-Konzentration zu erreichen, wurde zweimal mit 50 µl TE-Puffer eluiert und die Eluate vereinigt.

2.4.16 Phenol-Chloroform-basierte Reinigung von DNA-Extrakten

Für die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde zur DNA-Probe ein Volumen Phenol:Chloroform (Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1, Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Diese Mischung wurde gevortext und 2 min bei 12000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis kein Protein mehr an der Grenzfläche zwischen der organischen und der wässrigen Phase sichtbar war. Anschließend wurde ein Volumen Chloroform hinzugefügt und die übrigen Schritte wie bei der Phenol-Chloroform-Mischung wiederholt.

2.4.17 DNA-Sequenzanalysen

Alle Sequenzierungsreaktionen mit gereinigter Plasmid-DNA (siehe 2.4.12) basierten auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977) und wurden entweder hausintern mit dem LiCOR 4200-Sequenzierer oder von GATC Biotec (Konstanz) durchgeführt. Für die

Sequenzierung verwendete Primer sind unter 8.1 aufgeführt. Zur Überprüfung der erhaltenen Sequenzen wurden diese mit bekannten Sequenzen verglichen unter Verwendung der Geneious-Software (Biomatters Ltd, Auckland). Bei der Sequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA wurden die erstellten Sequenzvergleiche anschließend mit Hilfe von Cymate (www.cymate.org) analysiert, einem Programm, das die *in silico* Analyse von DNA-Methylierung an Cytosin-Nukleotiden und deren Darstellung ermöglicht.

2.5 Arbeiten mit RNA

2.5.1 Extraktion von RNA

RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst mit einem Mikropistill im Reaktionsgefäß vorgemörsert und anschließend mit zwei Keramikugeln (Peglab) in einer Schwingmühle (Retsch) homogenisiert. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben (Protokoll für Isolierung aus pflanzlichem Gewebe). Für RNA-Extraktionen aus Tumormaterial wurde zweimal ein DNase-Verdau durchgeführt, einmal vor der RNA-Reinigung und einmal während der Reinigung auf dem Säulenmaterial (vergleiche Anhang D und E im Protokoll des Herstellers). Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (siehe 2.4.3). Alle RNA-Proben wurden kurzfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C aufbewahrt.

2.5.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde eine M-MLV Reverse Transkriptase (Promega) verwendet. Der Reaktionsansatz (siehe unten) wurde 2 min bei 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,4 µl (= 80 U) der Reversen Transkriptase erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 42°C

Reaktionsansatz für Reverse Transkription:	5x Puffer	2 µl
	dNTPs (10 mM)	0,5 µl
	oligo-dT-Primer (100 µM)	0,4 µl
	RNA	6,7 µl

2.5.3 Quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase-PCR (*quantitative real-time reverse transcription pcr*, qRT-PCR)

Für die Quantifizierung der Expression verschiedener Gene wurden die Transkripte mittels qPCR analysiert. Die Menge des zu bestimmenden Trankriptes kann bei dieser Methode durch eine kontinuierliche Detektion der Fluoreszenz von Sybr Green, welches präferenziell an doppelsträngige DNA bindet, bestimmt werden. Für die qRT-PCR wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.5.1), in cDNA umgeschrieben (siehe 2.5.2) und mit t-RNA Wasser 20-fach verdünnt. Bei t-RNA-H₂O handelte es sich um HPLC-H₂O (Roth), welches mit 10 ng/µl t-RNA (Sigma-Aldrich) versetzt wurde, um durch unspezifische Bindung niedrig konzentrierter cDNA an die Gefäßwände einen Probenverlust zu verhindern.

Die qPCR-Analyse erfolgte entweder in einem LightCycler (LightCycler 2.0 Carousel-based Instrument, Roche) oder einem Realplex (Mastercycler ep realplex 2, Eppendorf) unter Verwendung des Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix (Thermo Fisher Scientific). Es wurde folgender Reaktionsansatz zusammengestellt:

Absolute QPCR SYBR® Green Capillary Mix	10,0 µl
Primer fwd (50 µM)	0,12 µl
Primer rev (50 µM)	0,12 µl
HPLC-H ₂ O	7,76 µl
Template	2,0 µl

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 8.1 aufgeführt. Für das Primer-Design wurde „LightCycler Probe Design“ (Roche) oder „OLIGO“ (Molecular Biology Insights) verwendet. Alle Primer hatten eine Länge zwischen 16 und 20 Nukleotiden und waren für eine Produktlänge zwischen 150 und 200 bp ausgelegt. Die präferenzielle Annealing-Temperatur lag zwischen 55°C und 60°C. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von TIB Molbiol oder Metabion bezogen. Das Standard-qPCR-Programm war folgendermaßen angelegt:

<i>Hot start</i>	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	15 s	} 40-45 Zyklen
Primer-Annealing	Primer-spezifisch	20 s	
Elongation	72°C	20 s	
Detektion	79°C	10 s	
Schmelzpunktanalyse	95°C	10 s	
	60°C	15 s	
	ΔT_m (60°C → 95°C)	[0,3°C/s]	
	95°C	5 s	
Ende	40°C	2 min	

2.5.4 DNA-Standard zur Quantifizierung der Transkriptanzahl

Zur Herstellung einer DNA-Verdünnungsreihe von bekannter DNA-Konzentration (Standard) zur Berechnung der amplifizierten Transkripte wurden die Produkte mehrerer PCR-Ansätze vereinigt und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, siehe 2.4.3) gereinigt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, siehe 2.4.3) und auf eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt. Ausgehend von dieser Konzentration wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

# Standard	Verdünnung	in	Konzentration
1	einstellen auf 10 ng/μl	HPLC-H ₂ O	10 ng/μl
3	198 μl + 2 μl von Standard 1	HPLC-H ₂ O	100 pg/μl
5	198 μl + 2 μl von Standard 3	HPLC-H ₂ O	1 pg/μl
7	198 μl + 2 μl von Standard 5	tRNA-H ₂ O	10 fg/μl
8	180 μl + 20 μl von Standard 7	tRNA-H ₂ O	1 fg/μl
9	180 μl + 20 μl von Standard 8	tRNA-H ₂ O	0,1 fg/μl
10	180 μl + 20 μl von Standard 9	tRNA-H ₂ O	0,01 fg/μl

Mit Hilfe solcher Standardreihen wurden Eichgeraden erstellt, mit denen über einen festgelegten CT-Wert (*cycle threshold*) der Proben die Ausgangsmenge der Transkripte ermittelt werden konnte. Für die Messung wurden die Standards 7-10 eingesetzt. Um zuverlässige Messungen zu erreichen, sollte der CT-Wert des Standard 7 zwischen 18 und 20 liegen und der Abstand der CT-Werte der einzelnen Standards sollte mit etwa 3,5 dem Faktor 10 der Konzentrationsunterschiede entsprechen. Für die Berechnung der absoluten Molekülzahlen wurden die berechnete Produktmengen auf die konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gene Aktin2 und Aktin8 normiert und so die Anzahl der Moleküle eines bestimmten qRT-PCR-Produktes pro 10.000 Molekülen Aktin bestimmt.

2.6 Methoden zur Analyse von DNA-Methylierungen

2.6.1 Bisulfit-Sequenzierung

Für die Methylierungsanalyse in Einzelnukleotidauflösung wurde die Bisulfit-Sequenzierung eingesetzt. Dafür wurde genomische DNA mittels des DNeasy Plant Mini Kit isoliert (siehe 2.4.15) und mit einem geeigneten Enzym, welches nicht in der zu analysierenden Sequenz schneidet (EcoRI oder BamHI), verdaut (siehe 2.4.6). Daraufhin wurde die genomische DNA mit dem „EpiTect Bisulfite Kit“ (Qiagen) nach dem Hersteller-Protokoll für niedrig konzentrierte Lösungen behandelt. Der zu analysierende Sequenzabschnitt wurde mit Bisulfit-Primern durch PCR amplifiziert und in einen geeigneten Vektor (pGEM-T Easy, Promega) kloniert. Die amplifizierten DNA-Fragmente hatten eine Länge von unter 500 Basenpaaren, da die Intaktheit der Matrizen-DNA bedingt durch die Bisulfit-Behandlung (hohe Temperatur, niedriger pH) häufig stark beeinträchtigt ist. Die Primer wurden mit dem Online-Programm Kismeth (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>) für eine Anlagerungs-Temperatur von 60°C erstellt. Bei Einsatz dieser Software werden die Cytosin-Nukleotide im *forward*-Primer und die Guanine-Nukleotide im *reverse*-Primer durch degenerierte Basen (Y = Cytosin/Thymin bzw. R = Adenin/Guanin) ersetzt. Pro zu analysierendem Fragment wurden in der Regel zehn Klone sequenziert.

2.6.2 Methylcytosin-Immunopräzipitation

Genomische DNA (siehe 2.4.15) aus Tumor- und Kontrollgewebe wurde mit Hilfe eines Bioruptor (Diagenode) auf eine Fragmentgröße von etwa 600 bp sonifiziert (4 x 5 min auf niedrigster Stufe), für 10 min bei 99°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt (10 min). Je 100 ng DNA wurden entnommen und als Vergleichsproben (*input*) für die Array-Hybridisierung verwendet. Für die Immunopräzipitation wurde 1 µg sonifizierte DNA in 600 µl IP-Puffer mit 10 µg eines monoklonalen 5-Methylcytosin-Antikörpers bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurden 100 µl Dynabeads Protein G (Life Technologies) hinzugefügt und 3 h Stunden bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Dynabeads mit 600 µl IP-Puffer (je 10 min) wurde die DNA durch vortexen mit je 200 µl TE-Puffer mit steigenden SDS Konzentrationen (0,1%, 0,5%, 1,5%) eluiert. Abschließend wurde diese durch Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.4.16) und Ethanol-Fällung (siehe 2.4.5) gereinigt.

IP-Puffer:	Na-Phosphat Puffer, pH 7,0	10 mM
	NaCl	0,14 M
	Triton X-100	0,05%

2.6.3 Microarray-Analysen

Die Durchführung und Auswertung der Microarray-Experimente erfolgte am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg durch Dr. Claus-Jürgen Scholz und Dr. Susanne Kneitz.

Zur genomweiten Methylierungsanalyse wurden Tiling-Arrays (GeneChip *Arabidopsis* Tiling 1.0R Array, Affymetrix) verwendet. Diese Array-Chips decken das gesamte *Arabidopsis*-Genom mit einer durchschnittlichen Auflösung von 35 Basenpaaren (bp) ab. Die Länge der verwendeten Oligonukleotide liegt dabei bei 25 bp, während sich zwischen den Sonden eine Lücke von durchschnittlich 10 bp befindet. Werden die durch Methylcytosin-Immunopräzipitation (mCIP, siehe 2.6.2) angereicherten methylierten Fragmente mit einem Farbstoff (Phycoerythrin) markiert und mit den komplementären Sonden dieses Chips hybridisiert, so können diese Fragmente nach dem Auslesen des Array-Chips anhand einer erhöhten Signalintensität detektiert werden.

Sowohl die *Input*- als auch die mCIP-Proben (siehe 2.6.2) wurden mit Hilfe des *GeneChip Mapping 10K Xba kit* (Affymetrix) markiert und mit den Tiling-Arrays nach Herstellerangaben hybridisiert. Nach einer Loess-Normalisierung der Array-Rohdaten von *Input*- und mCIP-Proben wurden für Tumor- und Sprossgewebe *signal log ratios* (SLRs) aus mCIP- gegenüber *Input*-Proben berechnet. Diese wurden Quantil-normalisiert und die Sonden nach TAIR9-Version der *Arabidopsis thaliana*-Sequenz ihren genomischen Positionen zugeordnet. Mit den Sonden-SLRs aus drei biologischen Replikaten der beiden unterschiedlichen Gruppen (Tumor- und Sprossgewebe) wurde eine Mediänglättung durchgeführt (500 bp *sliding window*-Ansatz), um für alle Sondenpositionen robuste und geglättete SLRs (*smoothed signal log ratios*, sSLRs) zu erhalten. Mindestens fünf benachbarte Sonden mit einem sSLRs höher als die Hintergrundsignalstärke in einer der beiden Gruppen wurden mit Hilfe des CMARRT-Algorithmus identifiziert und als genomische Regionen gewertet. Für alle Regionen, welche eine Signalanreicherung zeigten, wurden auf Basis von medianen sSLRs die Veränderungen von Tumor- gegenüber Spross-Proben ermittelt (*log fold change*, logFC). Zur Beurteilung, welche der Regionen als differenziell methyliert definiert werden, wurde die Verteilung der logFCs in der Gruppe

der Regionen, welche im Tumorgenom angereichert sind, gegenüber denen im Tumorfremden Gewebe ermittelt (D_{null}). Als hypermethyliert wurden alle Regionen bewertet, deren log FCs größer waren als das 75%-Quantil von D_{null} . Entsprechend wurden Regionen mit logFCs kleiner dem 25%-Quantil von D_{null} als hypomethyliert definiert. Alle übrigen Regionen wurden als unverändert eingestuft. Die Analysen wurden mit der frei verfügbaren R-Software (<http://www.r-project.org>) mit den Bioconductor-Erweiterungspaketen IRanges, Ringo und Starr (<http://www.bioconductor.org>) durchgeführt.

2.7 Durchflusszytometrie

Die Analysen mittels Durchflusszytometrie wurden von Jörg Fuchs (IPK Gatersleben) durchgeführt. Hierzu wurden Zellkerne einen Monat nach Infektion aus Wurzelhalsgallengewebe und bzw. Sprossgewebe isoliert und mit Propidiumiodid gefärbt. Anschließend wurden diese mit Hilfe eines FACStarPLUS Durchflusszytometers (BD Biosciences), welches mit einem Innova 90-C Argon-Laser (Coherent), ausgerüstet war, analysiert. Die Propidiumiodid-Fluoreszenz wurde bei 500 mW und einer Wellenlänge von 514 nm angeregt und mit Hilfe des FL-1 Kanals unter Einsatz eines 630 nm Bandpassfilter gemessen. Es wurden 10.000 Zellkerne pro Probe untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Methylierung der Transfer-DNA (T-DNA)

Bereits vor fast drei Jahrzehnten konnte mittels Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen gezeigt werden, dass die T-DNA, welche bei der *Agrobacterium*-Infektion in das Wirts-Genom integriert wird, häufig das Ziel von DNA-Methylierungen ist. Mit dieser Methode werden allerdings nur Methylierungen von CCGG-Sequenzen erfasst und eine exakte Lokalisierung der Modifikationen auf der T-DNA ist nicht möglich.

3.1.1 Methylierungsmuster der T-DNA im voll entwickelten Tumor

In dieser Arbeit wurden daher Bisulfit-Analysen mit einem 5249 Basenpaaren (bp) langen Fragment des pTiC58-Plasmids aus *Agrobacterium tumefaciens* C58_{noc} durchgeführt. Dieses Fragment umfasste die T-DNA-Onkogene *iaaH*, *iaaM* und *ipt* sowie die zwei intergenischen Regionen (IGR1, IGR2; Abbildung 3.1 A). Auf diese Weise wird eine Übersicht über alle methylierten Cytosin-Nukleotide eines für die Tumorentwicklung essenziellen Teils der T-DNA in Einzelnukleotid-Auflösung gewonnen.

Das 5429 bp lange T-DNA-Fragment wurde dazu aus Bisulfit-behandelter genomischer DNA in Form von 15 einzelnen PCR-Produkten amplifiziert, kloniert und je fünf unabhängige Klone sequenziert (siehe 2.6.1). Dabei zeigte sich, dass die Methylierungsrate bezogen auf die gesamte Nukleotidsequenz (5429 bp) äußerst gering war (0,94% Methylierung pro Cytosin). Bei keinem einzigen der 15 untersuchten Fragmente wurden in mehr als einem untersuchten Klon Methylierungen festgestellt. Bereits eine unvollständige Umwandlung unmethylierter Cytosine bei der Bisulfit-Behandlung kann zu einer Detektion von Methylierungen führen. Bei der ersten der genomweiten Methylom-Sequenzierung von *Arabidopsis thaliana* wurden beispielsweise 99,14 % Umwandlung erreicht (Lister *et al.* 2008). Daher ist das gesamte untersuchte Onkogen-Cluster unter Einbeziehung der typischen Cytosin-Umwandlungsraten eher als unmethyliert zu betrachten. Auffälligerweise waren die intergenischen Regionen vollständig unmethyliert, wodurch eine kontinuierliche Expression der Onkogene gewährleistet ist (Abbildung 3.1 B).

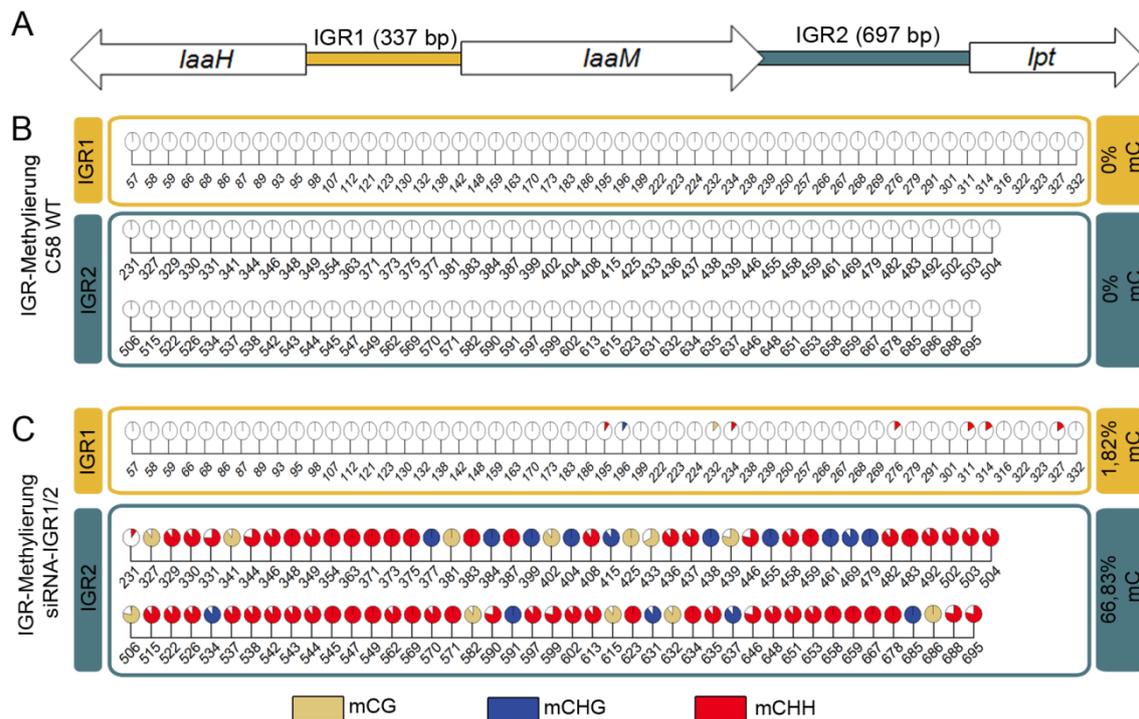


Abbildung 3.1: Die intergenischen Regionen (IGRs) der auf der T-DNA lokalisierten Onkogene sind unmethyliert in *Arabidopsis*-Tumoren, werden jedoch als Antwort auf ein siRNA-Signal methyliert. (A) Abschnitt des pTIC58-Plasmids mit den codierenden Abschnitten von *laaH*, *laaM* und *ipt* und den dazwischen liegenden intergenischen Regionen IGR1 und IGR2 (Modell nicht maßstabsgetreu). Die codierenden Sequenzen sind als offene Pfeile, IGR1 und IGR2 als farbige Balken dargestellt. (B) Grad der Cytosinmethylierungen von IGR1 und IGR2 an einzelnen Positionen in Tumoren, die durch das Wildtyp-*Agrobacterium* (C58 WT) hervorgerufen wurden. (C) Methylierungsgrad von IGR1 und IGR2 pro Position in Pflanzenmaterial nach Infektion mit dem *Agrobacterium* C58, welches zusätzlich zum pTIC58-Plasmid eine zweite T-DNA mit einer Haarnadelstruktur gegen beide IGRs (siRNA-IGR1/2) enthält. Der prozentuale Methylierungsgrad ist an jeder Position durch farbige Kreisdiagramme für die drei verschiedenen Sequenzmotive (mCG, mCHG, mCHH) dargestellt. Hierzu wurden für (B) jeweils fünf, für (C) jeweils zehn Klone pro Fragment sequenziert. Bei IGR2 sind nur Positionen mit Methylierungen gezeigt. Die Prozentwerte an der rechten Seite von (B) und (C) geben den Anteil der Methylcytosine (mC) bezogen auf alle Cytosinnukleotide der jeweiligen intergenischen Region an.

3.1.2 Induktion der T-DNA-Methylierung durch komplementäre siRNAs und Untersuchung des Tumorwachstums

Die Beobachtung, dass die T-DNA im vollständig entwickelten Tumor nahezu unmethyliert vorliegt warf die Frage auf, ob die Onkogen-Expression und damit die Tumorentwicklung durch die Aktivierung von Methylierungsprozessen unterbunden werden kann. Durch *Agrobacterium*-Transformation in Pflanzen eingebrachte Transgene werden mit Hilfe von haarnadelförmigen DNA-Strukturen, deren Sequenzen beispielsweise komplementär zum Transgen-Promoter sind, sehr effektiv in ihrer Transkription gehemmt. Dies geschieht durch spezifische Methylierung des betroffenen Promoters über siRNA-abhängige Prozesse (siehe 1.4.2).

In dieser Arbeit sollte deshalb geprüft werden, ob durch diesen Mechanismus auch die Methylierung der intergenischen Regionen der Onkogene ausgelöst werden kann. Dazu wurden virulente *Agrobakterien* vom Stamm C58 mit einem binären Plasmid transformiert, welches ein Haarnadel-Konstrukt mit homologen Sequenzen zu den intergenischen Regionen (IGRs) enthielt (Abbildung 3.2). Diese IGRs sind jeweils stromaufwärts der codierenden Abschnitte von *laaH*, *laaM* und *IPT*-Gene auf der T-DNA des pTiC58 Plasmids lokalisiert (Abbildung 3.1 A). Die Haarnadel-Strukturen wurden unter der Kontrolle des CaMV35S-Promoters exprimiert. Mit diesen transgenen *Agrobakterien* wurden schließlich Experimente zum Tumorwachstum durchgeführt.

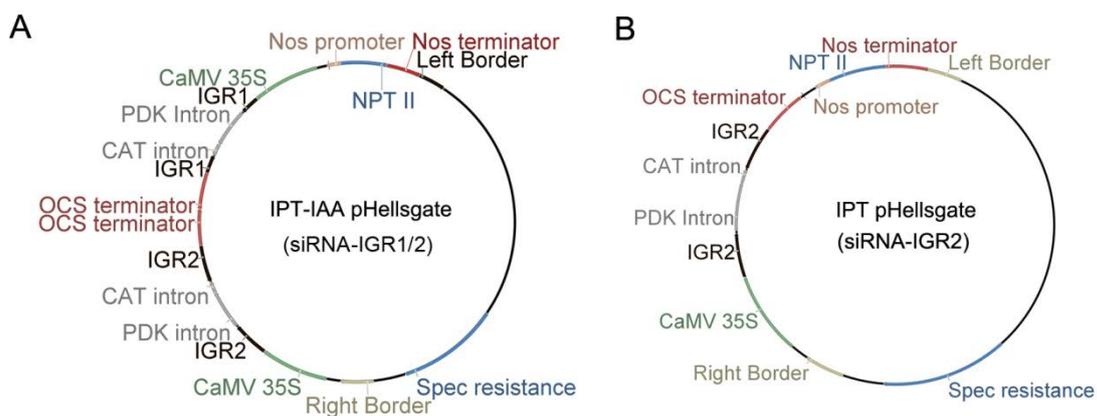


Abbildung 3.2: Vektorkarten der rekombinanten binären pHellgate12-Vektoren für die siRNA-vermittelte Genexpressionshemmung der *Ipt*- und *laa*-Onkogene mittels *A. tumefaciens* Stamm C58. (A) Der IPT-IAA pHellgate Vektor enthält zwei Kassetten in entgegengesetzter Orientierung zwischen der linken und der rechten T-DNA-Begrenzung (Left Border/Right Border). Beide Kassetten enthalten einen CaMV35S-Promotor und die intergenischen Regionen von *laaH* (IGR1, 337 bp) bzw. *ipt* (IGR2, 697 bp) jeweils sowohl in sense- und in antisense-Orientierung, getrennt durch zwei entgegengesetzt orientierte Introns (PDK/CAT) sowie einen OCS-Terminator. (B) Die Kasette des IPT pHellgate-Vektors enthält zwei Kopien der 697 bp langen intergenischen Region 2 (IGR2) in sense und antisense-Orientierung. Der IAA pHellgate-Vektor (nicht gezeigt) ist abgesehen von der IGR1 mit 337 bp identisch zum IPT pHellgate-Vektor.

Wurde *Arabidopsis thaliana* mit Agrobakterien infiziert, welche ein Haarnadelkonstrukt gegen beide IGRs enthielten (Abbildung 3.2 A), so war das Tumorwachstum sehr gering (siRNA-IGR1/2, Abbildung 3.3 A). Im Gegensatz dazu war das Tumorwachstum vergleichbar mit Pflanzen, die mit Wildtyp-Agrobakterien infiziert worden waren, wenn nur eine intergenische Region (IGR) vom Haarnadel-Konstrukt betroffen war. Das schwache Tumorwachstum bei Verwendung des *Ipt-iaa*-Konstruktes wies darauf hin, dass die IGRs möglicherweise von Methylierungen betroffen waren. Daher wurde für Pflanzenmaterial, welches mit diesen Konstrukten transformiert worden war, ähnlich wie für Wildtyp-Tumore (siehe 2.3.4) das Methylierungsmuster mittels Bisulfit-Sequenzierung bestimmt (siehe 2.6.1). Dies erfolgte jedoch ausschließlich für die potenziell von Methylierung betroffenen IGRs. Dabei wurden für beide IGRs Methylierungen in allen drei Sequenzzusammenhängen detektiert (Abbildung 3.1 C). Während die Methylierung von IGR1 eher gering war (1,82% aller Cytosinnukleotide), erreichte die von IGR2 eine Rate von 66,83%.

3.1.3 Hemmung der Onkogen-Expression

Eine solch hohe Methylierungsrate geht häufig auch mit der Hemmung der Transkription einher. Daher wurden die Transkriptmengen der Onkogene sechs Tage nach Infektion mit den entsprechenden transgenen *Agrobacterium*-Stämmen bestimmt (Abbildung 3.2). Die Onkogen-Transkription wurde dabei immer dann gehemmt, wenn das Pflanzengewebe mit einem *Agrobacterium*-Stamm transformiert worden war, der ein Haarnadelkonstrukt gegen einzelne oder beide IGRs enthielt (Abbildung 3.3 B). Für die gegen *iaaH* oder *ipt* gerichteten Einzelkonstrukte (siRNA-IGR1/siRNA-IGR2) bedeutet dies, dass die Expression des jeweils anderen Onkogens nicht beeinträchtigt war. Bei Verwendung des siRNA-IGR1/2-Konstruktes, welches gleichzeitig gegen IGR1 und IGR2 gerichtet war, hatten die *iaaH*- und *Ipt*-Gene ein äußerst geringes Expressionsniveau. Interessanterweise führte nur die transkriptionelle Hemmung beider Onkogene durch siRNA-vermittelte Methylierung zur Unterdrückung des Tumorwachstums (Abbildung 3.3 A).

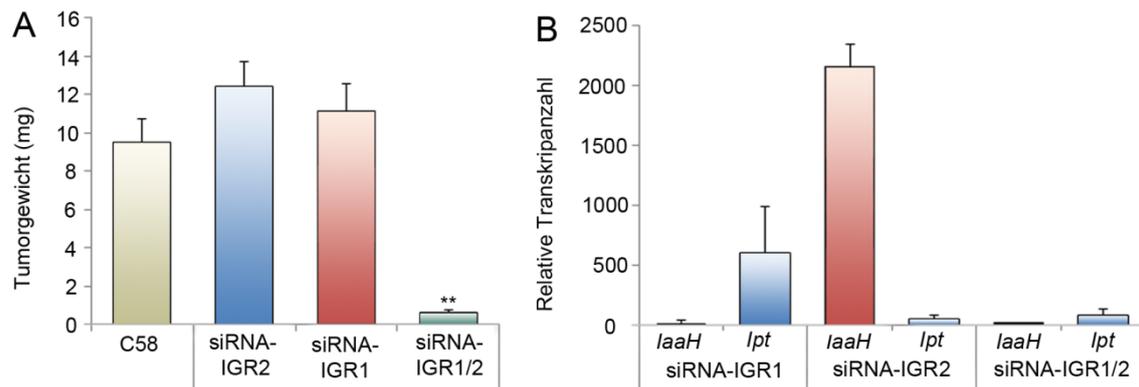


Abbildung 3.3: Die Tumorentwicklung und Onkogen-Expression werden durch siRNA-vermittelte DNA-Methylierung inhibiert. (A) Die Tumorgewichte wurden vier Wochen nach Infektion von *Arabidopsis thaliana*-Sprossgewebe (Ökotyp WS2) mit rekombinanten virulenten *Agrobacterium tumefaciens* C58-Stämmen bestimmt. Diese rekombinanten Stämme enthielten entweder einen leeren pHellsgate12-Vektor (C58) oder ein Haarnadelkonstrukt, welches entweder gegen IGR1 (*iaa*), IGR2 (*ipt*) oder gegen beide IGRs (*ipt* & *iaa*) gerichtet war. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens 38 infizierten Pflanzen pro *Agrobacterium*-Genotyp \pm Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels T-Tests: Signifikanzwert < 0,01 (**). (B) Relative Transkriptmengen der Onkogene (*iaaH*, *ipt*) von *A. tumefaciens* in *A. thaliana*-Sprossgewebe sechs Tage nach Infektion mit den transgenen *A. tumefaciens*-Genotypen wie in Experiment (A). Die relative Transkriptanzahl wurde durch qRT-PCR ermittelt und auf 10.000 Moleküle ACTIN2/8 normalisiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Das Methylierungsmuster des Tumor-Genoms

DNA-Methylierungen spielen eine essenzielle Rolle während der Tumorentwicklung in Säugern, wo sie sowohl durch lokale Hypermethylierungen von Tumorsuppressor-Genen als auch durch genomweite Hypomethylierung zur Tumorbildung beitragen (siehe 1.4.8). In Wurzelhalsgallen ist dagegen in Bezug auf Methylierungen wenig bekannt. Lediglich für die integrierte T-DNA konnte gezeigt werden, dass diese methyliert vorliegen kann, was zur transkriptionellen Hemmung der Onkogenexpression führt (siehe 3.1.2). Da die Entwicklung pflanzlicher Tumore in vielerlei Hinsicht ähnlich der von Säugern verläuft (siehe 1.3) wäre es denkbar, dass DNA-Methylierungen auch dort eine bedeutsame Funktion besitzen. Daher wurde das Methylierungsmuster sowohl in *Agrobacterium*-induziertem Tumorgewebe als auch in tumor-freiem Sprossgewebe genomweit analysiert. Hierzu wurden Genom-umfassende Tiling Arrays verwendet, welche das *Arabidopsis*-Genom in einer Auslösung von 35 Basenpaaren abdecken.

3.2.1 Etablierung der Methylcytosin-Immunopräzipitation zur Anreicherung methylierter DNA

Um methylierte DNA spezifisch detektieren zu können, muss diese zunächst durch einen Methylcytosin-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Für die Präzipitation sind Fragment-Längen von unter 1000 Basenpaaren optimal. Daher wurden zunächst die optimalen Bedingungen ermittelt, bei der solche Fragment-Längen mittels Ultraschallbehandlung der genomischer *Arabidopsis*-DNA erreicht werden. Mit Hilfe des ausgearbeiteten Protokolls (siehe 2.6.2) wurden für alle Proben gleichmäßige Fragment-Längen von 200-700 bp erzielt (Abbildung 3.4).

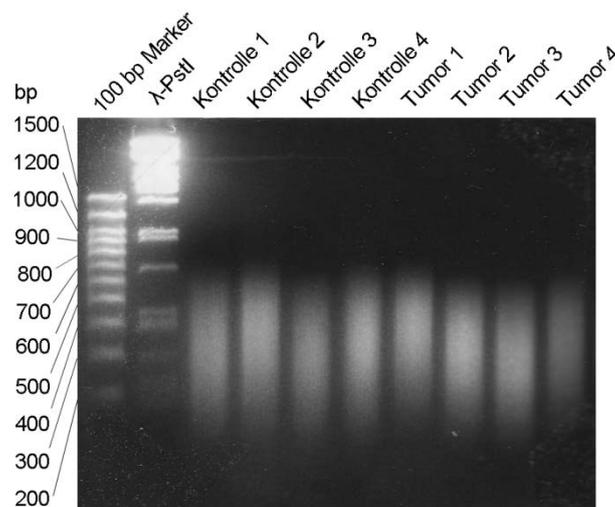


Abbildung 3.4: Fragmentlängen der für die Methylcytosin-Immunopräzipitation verwendeten DNA von vier biologischen Replikaten aus Spross- (Kontrolle 1-4) bzw. Tumorgewebe (Tumor 1-4). Die DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und 4x5 min auf niedrigster Stufe mit dem Bioruptor (Diagenode) sonifiziert. Anschließend wurden je 300 µg DNA in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mittels SYBR Gold (Invitrogen) sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der sonifizierten DNA sind in der linken Spur die Fragmentlängen des verwendeten Größenstandards (100 bp Marker) angegeben.

Die auf diese Weise sonifizierte DNA wurde anschließend einer Immunopräzipitation (siehe 2.6.2) unterzogen. Um die Spezifität der verwendeten Methode für die Anreicherung methylierter DNA zu testen, wurden die relativen DNA-Mengen verschiedener Gen-Loci mit bekanntem Methylierungsgrad in den vom Antikörper gebundenen und ungebundenen Fraktionen bestimmt. Diese Analyse zeigte, dass die als methyliert bekannten Regionen der Loci *FWA*, *AtSN1* und *Ta3* sowohl in den Kontroll- als auch in den Tumor-Proben alle zum überwiegenden Teil vom Antikörper gebunden und präzipitiert worden waren (Abbildung 3.5). Der als unmethyliert beschriebene Actin7-Promotor war hingegen fast ausschließlich in der ungebundenen Fraktion nachweisbar.

Die Anreicherung methylierter Regionen mittels des Methylcytosin-sensitiven Antikörpers war somit als spezifisch anzusehen und die entsprechenden Proben 2-4 aus beiden Geweben konnten für die Tiling-Array-Hybridisierung eingesetzt werden.

Je drei Arrays wurden mit dem wie beschrieben überprüften Material hybridisiert. Daneben wurden im Hinblick auf die nachfolgende Analyse für jeden Gewebetyp drei Array-Hybridisierungen mit Gesamt-DNA (*Input*) durchgeführt. Wenn mindestens fünf zusammenhängenden Sonden des Antikörper-angereicherten Materials Signal-Intensitäten über dem *Input*-Hintergrund zeigten, wurden diese als methylierte Regionen definiert. Die Zuordnung der Array-Signale zum *Arabidopsis*-Genom erfolgte mittels der Datenbank *The Arabidopsis Information Resource*, TAIR (Version TAIR9).

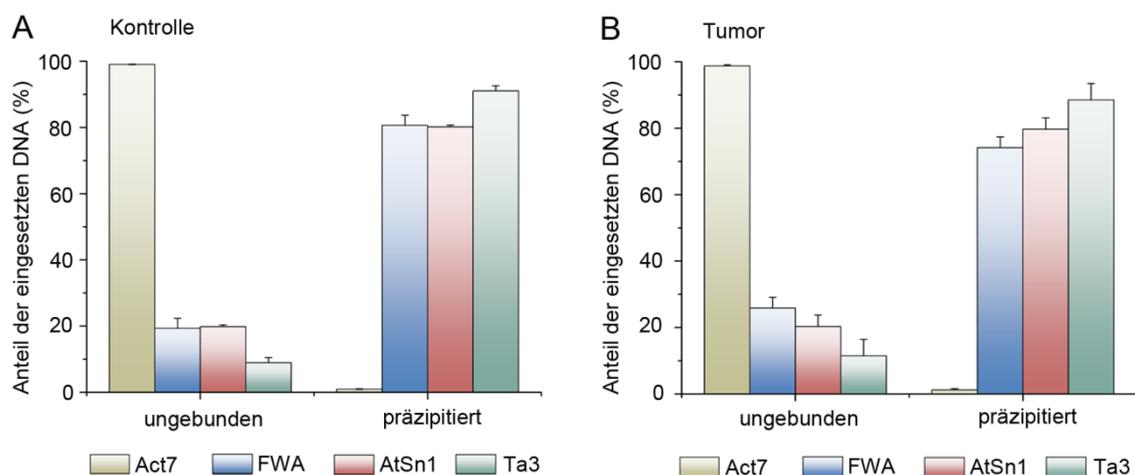


Abbildung 3.5: Der verwendete Methylcytosin-Antikörper ist spezifisch für methylierte DNA. Genomische DNA wurde wie unter 2.4.15 beschrieben aus Spross- (A) und Tumormaterial (B) isoliert und einer Methylcytosin-Immunopräzipitation (2.6.2) unterzogen. Mit Hilfe der Realtime-PCR wurden die Schwellenwert-Zyklen von vier Genen (Act7, FWA, AtSn1 und Ta3) in den verschiedenen Fraktionen (ungebundene DNA und präzipitierte DNA) bestimmt und so der relative Anteil dieser Gene in den Fraktionen errechnet. Bei allen getesteten Loci handelt es sich um Gene mit bekanntem Methylierungsgrad. Während Act7 unmethyliert ist, sind die drei übrigen Gene in verschiedenen Sequenz-Zusammenhängen stark methyliert und sind daher zum Großteil in der präzipitierten Fraktion zu finden. Die dargestellten Werte wurden aus drei der vier Tumor- und Kontrollproben \pm Standardabweichung (Proben 2-4, siehe Abbildung 3.4) errechnet.

3.2.2 Anteil methylierter Regionen im Tumor- und Sprossgenom

Insgesamt wurden in beiden Gewebetypen zusammen 15.431 Regionen durch mCIP angereichert und mittels Tiling-Array detektiert, welche daher als methyliert betrachtet wurden. Diese distinkten Regionen decken 26,287 kb (22,06%) des *Arabidopsis*-Kerngenoms ab. In einer früheren genomweiten Studie zu Methylierungen war die Abdeckung mit 19,3% ähnlich hoch (Zhang *et al.* 2006), was die Validität der Methode

bestätigt. Die geringfügigen Unterschiede sind entweder auf verschiedene Algorithmen zur Detektion der Methylierungen oder auf die unterschiedlichen untersuchten Gewebetypen (gesamtes überirdisches Gewebe gegenüber Sprossgewebe) zurückzuführen.

In einem nächsten Schritt wurden die Methylierungen den verschiedenen Kategorien annotierter *Arabidopsis*-Gene separat für das Genom des Tumor- und Kontrollgewebes zugeordnet. Die Kategorien umfassen proteincodierende Gene, transposable Elemente (TEs) und Pseudogene. Zusätzlich sind verschiedene RNA-Kategorien annotiert (miRNA, tRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, otherRNA), welche zur Gruppe der nicht-codierenden RNAs (ncRNA) zusammengefasst wurden. Um einen Einblick in die Verteilung der Methylierungen innerhalb dieser vier Gruppen zu erhalten, wurde für jede Gruppe separat der prozentuale Anteil methylierter Regionen in Bezug auf die Gesamtheit aller methylierten Regionen der jeweiligen Genkategorie berechnet. Dies erfolgte für 60 Positionen, deren Prozent-Werte entlang der Strukturen eines hypothetischen Gens aufgetragen wurden. Dabei wurde jedes Gen von einem Kilobasenpaar (kb) stromabwärts bis hin zu einem kb stromabwärts analysiert. Die transkribierte Region wurde aufgrund der unterschiedlichen Längen prozentual betrachtet.

Die Zuordnung des Anteils methylierter Regionen zu den verschiedenen Kategorien annotierter Gene zeigte ein hohes Maß an Methylierungen in der transkribierten Region proteincodierender Gene sowohl im Tumor- als auch im Sprossgenom (Abbildung 3.6). Am Transkriptionsstart (*transcription start site*, TSS) sowie am Transkriptionsende (*transcription end site*, TES) war die Methylierungsrate eher niedrig, nahm aber weiter außerhalb der transkribierten Bereiche in beiden Richtungen wieder zu. Bei ncRNAs war das Methylierungsmuster ähnlich, nur war der Methylierungsanteil in dieser Kategorie insgesamt höher und stieg innerhalb des transkribierten Bereichs kaum an. Methylierungen spielen bei der Inaktivierung von transposablen Elementen (TEs) eine essenzielle Rolle. Entsprechend waren diese im transkribierten Bereich sehr stark methyliert. Den höchsten Methylierungsgrad wiesen Pseudogene auf, bei denen die Methylierungen fast gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt waren. Insgesamt stimmen diese DNA-Methylierungsmuster gut mit jenen überein, welche bereits in früheren Studien für *Arabidopsis thaliana* beschrieben wurden (Zhang *et al.* 2006, Zilberman *et al.* 2007). Dieser Befund untermauert die Glaubwürdigkeit der Datenauswertung.

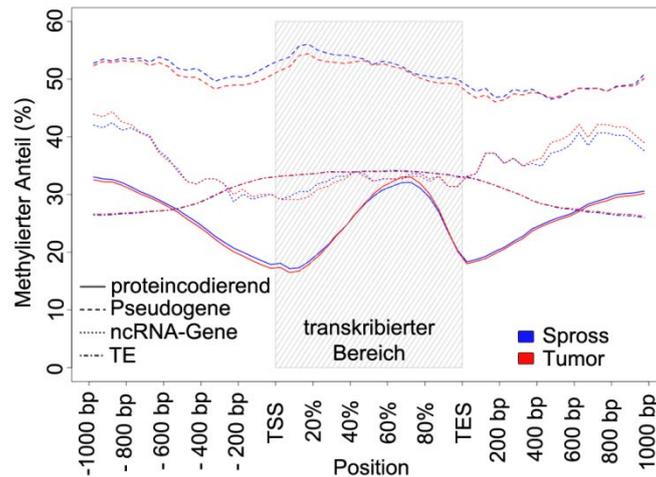


Abbildung 3.6: Verteilung methylierter Regionen im Genom des Tumor- und Sprossgewebes. Der prozentuale Anteil methylierter Regionen an allen methylierten Regionen einer Kategorie wurde entlang der Nukleotidsequenz für verschiedene Gentypen (protein-codierende Gene, Pseudogene, nicht-codierende (nc) RNA-Gene und transposable Elemente (TEs)) berechnet. Jede Kategorie ist modellhaft von einem Kilobasenpaar (kb) stromaufwärts bis zu einem kb stromabwärts des Gens dargestellt. Methylierungen in der transkribierten Region (gestrichelter Bereich) sind als relative Positionen dargestellt. TSS: Transkriptionsstart (*transcription start site*); TES: Transkriptionsende (*transcription end site*).

3.2.3 Methylierungsunterschiede zwischen Tumor- und Kontrollgewebe

Da das eigentliche Ziel dieser Arbeit darin bestand, Methylierungsunterschiede zwischen Tumor- und Sprossgewebe zu finden, wurden die beide Gewebe im Hinblick auf Methylierungsunterschiede untersucht. Hierzu wurden die Methylierungsniveaus der als methyliert definierten Regionen miteinander verglichen und bei entsprechenden Unterschieden als differenziell methylierte Regionen (DMRs) definiert (siehe 2.6.3). Insgesamt waren 2876 Gene von differenzieller Methylierung betroffen. Der Großteil aller DMRs war im Tumor-Genom hypermethyliert (1822), während 1100 Regionen Hypomethylierungen aufwiesen. Da ein Gen auch mehrere DMRs enthalten kann, ist die Gesamtzahl der hyper- und hypomethylierten Regionen höher als die der betroffenen Gene.

Von allen DMRs, welche zwischen Tumor- und Sprossgewebe bestimmt wurden, konnte der Großteil den protein-codierenden Genen (71,3%) und Transposons (25,3%) zugeordnet werden (Abbildung 3.7 A), welche zusammen nahezu 97% aller DMRs ausmachen. Daneben konnten DMRs auch in Pseudogenen (1,8%) und ncRNAs (1,5%) detektiert werden. Betrachtet man jedoch den Anteil von DMRs jeweils innerhalb der vier Kategorien, so war dieser bei protein-codierenden Genen am höchsten (7,7%), gefolgt von

Pseudogenen (6,1%) und ncRNAs (3,4%), während lediglich 2,4% aller TEs differenziell methyliert waren (Abbildung 3.7 B). Hypermethylierungen waren gegenüber Hypomethylierungen in proteincodierenden Genen (5,1% vs. 1,6%), Pseudogenen (3,8% vs. 2,3%) und ncRNAs (2,3% vs. 1,1%) stärker präsent. In TEs waren beide Methylierungsveränderungen gleichmäßig verteilt (1,2% vs. 1,2%).

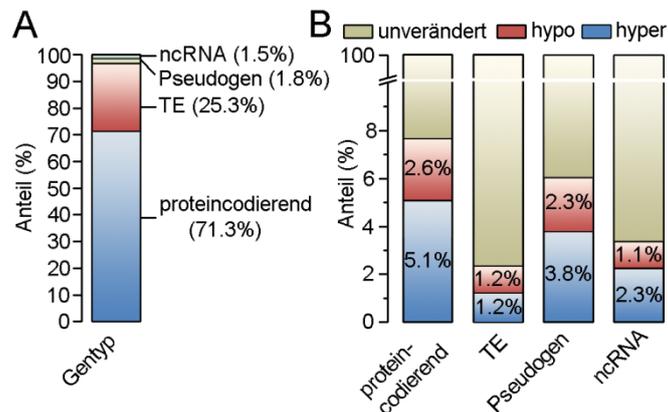


Abbildung 3.7: Verteilung differenziell methylierter Regionen (DMRs) des *Arabidopsis* Tumorgenoms im Vergleich zum Sprossgenom. (A) Prozentualer Anteil von DMRs der jeweiligen annotierten Genkategorien (proteincodierend, TE, Pseudogen, ncRNA) an allen DMRs. (B) Prozentualer Anteil der unveränderten, hyper- und hypomethylierten Regionen an allen annotierten Genen der jeweiligen Kategorie.

3.2.4 Verifizierung der Tiling-Array-Analysen mittels Bisulfit-Sequenzierung

Die anhand von Tiling Arrays ermittelten Methylierungsunterschiede wurden mit einer unabhängigen Methode verifiziert. Fünf zufällig ausgewählte DMRs, eine von jedem Chromosom des *Arabidopsis*-Kerngenoms wurden dazu mittels Bisulfit-Sequenzierung untersucht. Diese Methode gilt wegen der Einzelnukleotid-Auflösung als zuverlässige Kontrolle für die Überprüfung von Array-basierten Methylierungsstudien. Für die Bisulfit-Sequenzierung wurde genomische DNA aus Tumor- und Kontrollgewebe isoliert, mit Bisulfit behandelt und die entsprechenden DMRs mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert (siehe 2.6.1). Von mindestens zehn Klonen pro DMR wurde der prozentuale Anteil der Methylcytosine am Gesamt-Cytosingehalt des untersuchten Sequenzabschnitts bestimmt. Neben dem gesamten Anteil methylierter Cytosine wurden dabei auch die unterschiedlichen Sequenzmotive (CG, CHG, CHH) in die Auswertung einbezogen. Es zeigte sich, dass sich der Gesamt-Methylierungsanteil (mC) bei allen getesteten DMRs, außer dem Locus At2g16595 von Chromosom 2, in die gleiche Richtung wie bei der Methylcytosin-Immunopräzipitation (mCIP) veränderte (Abbildung 3.8). Dieser Locus war

zwar in immunopräzipitierter DNA angereichert, was auf einen höheren Methylierungsgrad im Tumor hinweist. Laut Bisulfit-Sequenzierung war der Gesamt-Methylierungsanteil (mC) jedoch unverändert. Dennoch bestätigen die Ergebnisse für die anderen vier Genloci die spezifische Anreicherung methylierter DNA durch die Immunopräzipitation und somit die Validität der angewandten Methode.

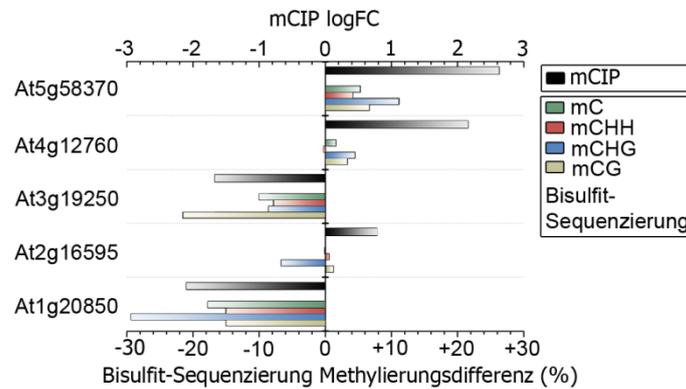


Abbildung 3.8: Verifizierung von Array-basierten mCIP-Daten der Methylcytosin-Immunopräzipitation mit Bisulfit-Sequenzierungsdaten. Fünf Genloci (einer pro Chromosom) wurden zufällig für die Bisulfit-Sequenzierung ausgewählt. Die Methylierungsveränderung laut Array-Daten sind als logarithmische Werte (mCIP logFC) für den Tumor im Vergleich zum Spross angegeben. Die mittels Bisulfit-Sequenzierung ermittelten Änderungen der Anzahl methylierter Cytosin-Nukleotide zwischen Tumor und Spross sind als prozentualer Anteil aller Cytosin-Nukleotide dargestellt. Für die Bisulfit-Sequenzierung wurden die Sequenzen von zehn unterschiedlichen Klonen pro Locus ausgewertet.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Methylierungsmuster im Genom von Tumor- und Kontrollgewebe deutlich voneinander unterscheiden. Es überwiegen dabei die hypermethylierten DMRs im Tumor-Genom. Einhergehend mit diesen Beobachtungen weisen Gene, welche für Enzyme codieren, die an Methylierung (MET1, DRM2, CMT3, AGO4) oder Demethylierung (ROS1/DML1) beteiligt sind, im Tumor ein erhöhtes Expressionsniveau auf (Tabelle 3.1)

Tabelle 3.1: Expressionsveränderung von Genen im Tumor, die für Methylierungsenzyme codieren. Die Expressionsdaten stammen aus einer Microarray-Studie von Deeken *et al.* (2006) mit jeweils vier biologischen Replikaten.

AGI Code	Gen-Bezeichnung	Expressionsveränderung (Tumor vs. Referenz)	P-Wert
Methylierung			
At5g49160	MET1	1.7	0.0183943
At1g28330	DRM1	0.9	0.780176
At5g14620	DRM2	1.4	0.00989613
At1g69770	CMT3	1.5	0.00530434
At2g27040	AGO4	2.2	0.00824403
Demethylierung			
At2g36490	ROS1/DML1	2.0	0.0132496
At3g10010	DML2	0.9	0.0806717
At4t34060	DML3	n.b.	n.b.

3.2.5 Untersuchung des Ploidiegrades in Wurzelhalsgallen

Während der Entwicklung von Säuger-Tumoren treten häufig Instabilitäten hinsichtlich des Karyotyps und/oder des Ploidiegrades der betroffenen Gewebe auf (Storchova & Pellman 2004). Es ist bekannt, dass Ploidieveränderungen in *Arabidopsis* Methylierungsveränderungen hervorrufen können (Lee & Chen 2001). Um diese Möglichkeit als Ursache für den Befund des hypermethylierten Tumor-Genoms (3.2.3) auszuschließen, wurden die Ploidie-Grade des Tumor- und Tumor-freien Gewebes anhand von Durchflusscytometrie bestimmt (siehe 2.7). Der mit Hilfe dieser Methode von J. Fuchs (IPK Gatersleben) bestimmte 2C- und 4C-DNA-Gehalt entspricht dabei der G1-beziehungsweise der G2-Phase während der Mitose (Abbildung 3.9). Das 4C/2C-Verhältnis war in den Tumoren nur halb so hoch wie im Sprossgewebe (1,11 gegenüber 2,32; Abbildung 3.9), was auf eine erhöhte Zellteilungsrate im Tumor hindeutet. Ploidiegrade, welche über 4C liegen, sind ein Resultat von Endoreduplikationen, welche bekanntermaßen in *Arabidopsis* auftreten (Galbraith *et al.* 1991). Bei diesem Vorgang erfolgt eine Chromosomen-Verdopplung ohne eine anschließende mitotische Zellteilung. Der Anteil von Zellen mit erhöhten Ploidiegraden war in beiden Gewebetypen vergleichbar (Abbildung 3.9 B). Dabei lag der Zyklus-Wert, welcher die durchschnittliche Anzahl der Endoreduplikationen pro Zellkern angibt, bei 0,784 im Tumor und bei 0,899 in Tumor-

freiem Gewebe. Dies deutet nicht auf eine erhöhte Rate der Endopolyploidisierung im Tumor hin. Weiterhin sind keine Veränderungen in der Schärfe der Histogramm-*Peaks* des Tumor-Gewebes zu beobachten (Abbildung 3.9 A), was ein Anzeichen für eine mögliche Aneuploidie wäre. All diese Beobachtungen belegen, dass die im Tumor festgestellten Hypermethylierungen nicht auf einen veränderten DNA-Gehalt im *Arabidopsis*-Kerngenom zurückzuführen sind.

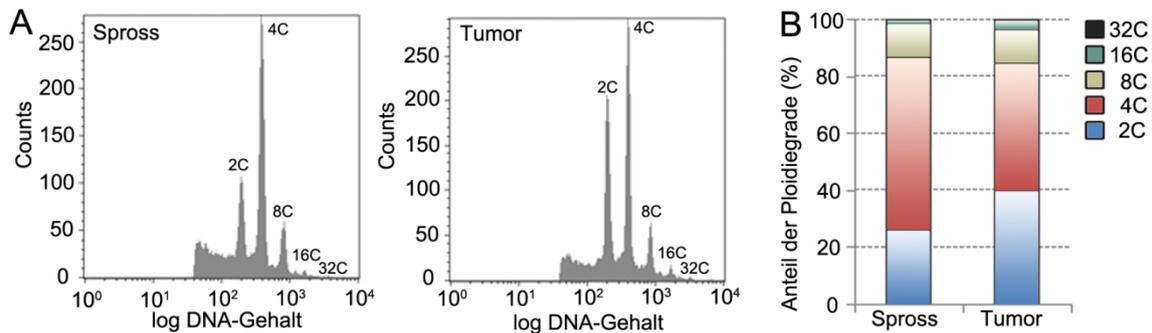


Abbildung 3.9: Vergleich der Ploidiegrade von tumor-freiem Sprossgewebe und Tumorgewebe von *Arabidopsis thaliana*. (A) Repräsentative Histogramme von Sprossgewebe (links) und Tumorgewebe (rechts). (B) Prozentuale Anteile der einzelnen Ploidiegrade von Zellkernen aus Spross- und Tumorgewebe auf der Basis von fünf unabhängigen Messungen.

3.2.6 Differenziell methylierte Sequenzmotive

Im Gegensatz zu tierischen Systemen findet in Pflanzen ein großer Anteil von Methylierungen im Nicht-CG-Kontext statt. Um die Sequenzmotive zu identifizieren, welche in *Arabidopsis*-Tumoren am ehesten von differenzieller Methylierung betroffen sind, wurden alle methylierten DNA-Fragmente zunächst in Abhängigkeit von ihrer Methylierungsrate im Tumor im Vergleich zum Kontrollgewebe in drei verschiedene Klassen (hypomethyliert, unverändert oder hypermethyliert) eingeteilt. Anschließend wurden die Methylierungshäufigkeiten der drei Sequenzmotive (CG, CHG oder CHH) innerhalb der drei Klassen ermittelt. Mit Hilfe von paarweisen Wilcoxon-Rangsummentests wurde daraufhin überprüft, inwieweit sich die Häufigkeiten zwischen den Klassen und innerhalb eines Sequenzmotivs unterscheiden. Die Unterschiede in der Methylierungshäufigkeit zwischen den hypomethylierten, unveränderten und hypermethylierten Regionen waren dabei für das CG-Motiv weniger signifikant (P-Wert >0,01, Abbildung 3.10) als für die CHG und CHH-Motive (P-Wert <0,01). Somit findet im pflanzlichen Tumorgenom der überwiegende Teil der Methylierungsveränderungen vermutlich an Nicht-CG-Motiven statt, während CG-Motive eher weniger betroffen sind.

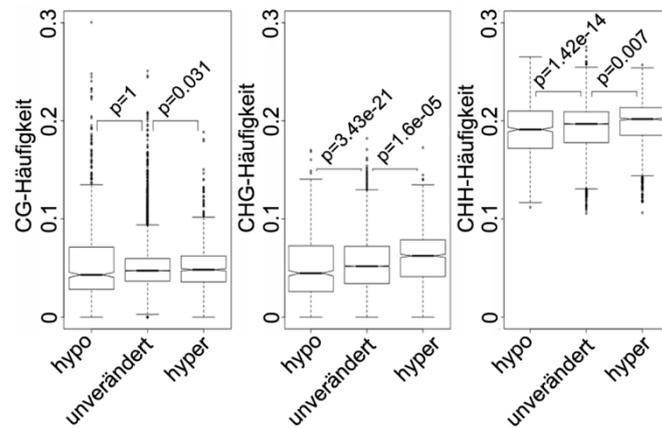


Abbildung 3.10: Häufigkeit der Sequenzmotive in methylierten Regionen des Wurzelhalsgallen-Genoms im Vergleich zum Spross von *Arabidopsis thaliana*. Die relative Anzahl von CG-, CHG- und CHH-Motiven pro Nucleotid wurde für hypo- und hypermethylierte sowie für unverändert methylierte Regionen berechnet. Die angegebenen Signifikanzwerte (p) resultieren aus Bonferroni-korrigierten paarweisen Wilcoxon-Rangsummentests. P-Werte unter 0,01 wurden als signifikant angesehen.

3.3 Methylierungsveränderungen und ihre Auswirkungen auf die Genexpression

Falls DNA-Methylierungen an bestimmten genomischen Positionen auftreten, kann dies einen Einfluss auf die Expression von Genen haben (siehe 1.4.5). Daher wurden die Positionen der Methylierungsveränderungen innerhalb einer Genkategorie lokalisiert und hinsichtlich ihrer Auswirkung auf Transkriptionsänderungen untersucht. Zudem wurden die von den Veränderungen am stärksten betroffenen Genkategorien ermittelt.

3.3.1 Positionen der Methylierungsänderungen innerhalb verschiedener Genkategorien

Hypo- und Hypermethylierungen des Tumorgenoms im Vergleich zum Sprossgenom wurden separat im Hinblick auf ihre Position entlang proteincodierender Gene und Transposons betrachtet. Dazu wurde der Anteil der Gene mit differenziell methylierten Regionen in Bezug auf die Gesamtheit aller Gene mit Methylierungsänderungen in der jeweiligen Kategorie an 60 Positionen berechnet. Diese Anteile wurden entlang der Strukturen eines Genmodells aufgetragen, jeweils von einem KB stromabwärts bis hin zu einem KB stromaufwärts des Gens. Die Lage innerhalb der transkribierten Regionen ist dabei prozentual angegeben. Mit Hilfe dieser Darstellung ließ sich erkennen, an welchen Positionen die stärksten Veränderungen stattfinden und auch welche Richtung der Methylierungsveränderung dabei überwog. Im Tumor-Genom waren proteincodierende Gene in der 3'-Hälfte der transkribierten Regionen präferenziell hypermethyliert,

wohingegen sowohl die Region stromaufwärts des Transkriptionsstarts als auch die 5'-Region der transkribierter Regionen vergleichsweise hypomethyliert waren (Abbildung 3.11 A). Am Transkriptionsstart (TSS) war der Anteil der Hypomethylierungen zwar leicht reduziert, aber deutlich höher als der Anteil der Hypermethylierungen. Betrachtet man das Transkriptionsende (TES), so waren die Methylierungsveränderungen hier gleichermaßen niedrig. In der Kategorie der TEs dominierten hingegen Hypomethylierungen in der transkribierten Region, während die distalen 5' und 3'-Regionen eher hypermethyliert waren (Abbildung 3.11 B).

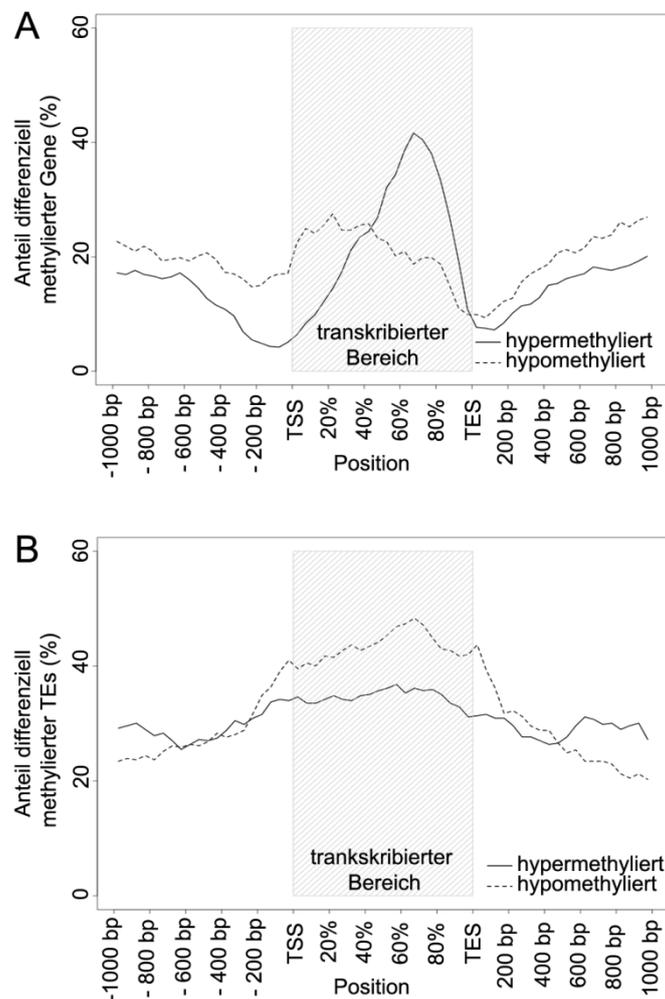


Abbildung 3.11: Verteilung von hyper- und hypomethylierten Regionen entlang einer hypothetischen Sequenz von proteincodierenden Genen und transposablen Elementen (TEs) im *Arabidopsis*-Wurzelhalsgallengenom. Die prozentualen Anteile differenziell methylierter Regionen an allen differenziell methylierten Regionen einer Genkategorie wurden getrennt nach hyper- und hypomethylierten Regionen für proteincodierende Gene (A) und TEs (B) von einem kb stromaufwärts bis zu einem kb stromabwärts aufgetragen. Transkribierte Bereiche (gestrichelt) sind als relative Positionen dargestellt. TSS, Transkriptionsstart (*transcription start site*); TES, Transkriptionsende (*transcription end site*).

3.3.2 Korrelation von DNA-Methylierungen mit der Genexpression

DNA-Methylierungen tragen in hohem Maße zur Genomstabilität bei. Insbesondere eine Reduktion von Methylierungen im transkribierten Bereich von Transposons könnte die Genomstabilität beeinträchtigen, da diese dadurch mobilisiert werden können (siehe 1.4). In proteincodierenden Genen können Methylierungsveränderungen sowohl am Transkriptionsstart als auch im *gene body* die Genexpression beeinflussen (Zhang *et al.* 2006, Zilberman *et al.* 2007). Da der Anteil von Hypomethylierungen an der TSS im Wurzelhalsgallengenom relativ hoch ist und viele Hypermethylierungen im *gene body* lokalisiert sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese differenziellen Methylierungen auch Veränderungen in der Genexpression nach sich ziehen.

Die transkriptionellen Veränderungen im Tumor wurden bereits in einer früheren Expressionsarray-Studie mit Hilfe von ATH1-Chips (Affymetrix) für 35 Tage altes Tumorgewebe bestimmt (Deeken *et al.* 2006). Um zu ermitteln, inwieweit Methylierungsänderungen und mit Transkriptionsänderungen einhergehen, wurde daher der Transkriptions-Datensatz mit den MethyloM-Daten verglichen. Es waren 73,5 % aller proteincodierender Gene auf beiden Arrays vertreten. Diese wurden zunächst abhängig von der Position der Methylierungsveränderungen entlang der Genstruktur (TSS, *gene body*, TES) eingeteilt. Anschließend wurden für jene Gene die logarithmischen Veränderungen (logFC) der Genexpression und der Methylierung miteinander multipliziert. Erhält man dabei ein negatives Produkt, so sind die beiden Vorgänge antikorreliert. Eine solche negative Korrelation war sowohl an der TSS als auch an der TES zu beobachten (Abbildung 3.12). Im *gene body* dagegen verändern sich Methylierung und Genexpression zum überwiegenden Teil in die gleiche Richtung, wodurch sich ein positives logFC-Produkt ergibt. Dabei ist zu beachten, dass nur verhältnismäßig wenige methylierte Bereiche welche mit der mit TSS oder TES überlappen in beiden Array-Analysen präsent sind (n=12). Die Anzahl der Gene mit *gene body*-Methylierung ist hier wesentlich höher (n=266). Insgesamt betrachtet stimmen diese Beobachtungen mit den bekannten genomweiten Analysen zur Methylierung in *Arabidopsis* überein (Zhang *et al.* 2006). Dort konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Methylierungen an Transkriptionsstart und -Ende einen negativen Einfluss auf die Genexpression haben, während Gene mit Methylierungen im *gene body* häufig stark exprimiert sind.

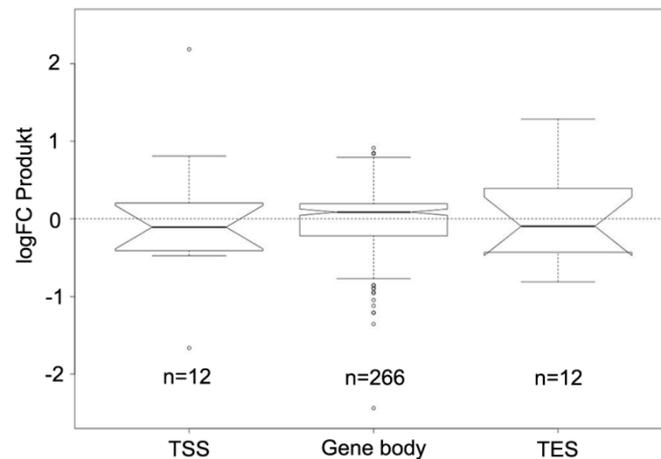


Abbildung 3.12: Vergleich von DNA-Methylierungsveränderungen mit differenzieller Genexpression. Durch Multiplikation der Veränderungen in der Genexpression mit den Methylierungsveränderungen im Tumor (jeweils als logarithmischer *fold change*) wurden logFC-Produkte errechnet. Ein positives logFC-Produkt steht dabei für Expressions- und Methylierungsveränderungen in die gleiche Richtung, während diese beiden Prozesse bei einem negativen Wert antikorreliert sind. Die Analyse erfolgte für Abschnitte, die den Transkriptionsstart (*transcription start site*, TSS), das Transkriptionsende (*transcription end site*, TES) oder den *gene body* betrafen.

3.3.3 Gen-Kategorien mit differenzieller Methylierung im Tumor

Da Methylierungsänderungen im Tumor die Transkription beeinflussen, wäre es interessant zu wissen, welche funktionellen Kategorien der proteincodierenden *Arabidopsis*-Gene am stärksten davon betroffen sind. Mit dem Programm MAPMAN (Thimm *et al.* 2004, Usadel *et al.* 2005) können Gene abhängig von ihrer Funktion verschiedenen funktionellen Haupt- und Unterkategorien zugeordnet werden. Dadurch ist es möglich, die genomweiten Methylierungsveränderungen im Zusammenhang mit physiologischen Anpassungen des Tumors zu betrachten. Die am signifikantesten veränderten Kategorien sind in Tabelle 3.2 angegeben. Der Signifikanzwert (P-Wert) ist bei dieser Art der Analyse nicht besonders aussagekräftig, da sich durch die große Anzahl der statistischen Tests die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse erhöht. Daher wurde zusätzlich eine Anreicherungs-FDR (*false discovery rate*) berechnet, wodurch die P-Werte in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Tests korrigiert werden. Das Quotenverhältnis gibt dabei an, ob die Wahrscheinlichkeit der Methylierungsveränderung einer Gruppe gegenüber der Gesamtheit aller Gene höher oder niedriger ist. Ein Quotenverhältnis über eins entspricht einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Veränderung in der jeweiligen Kategorie.

Tabelle 3.2: Genkategorien mit signifikant erhöhtem Anteil an differenziell methylierten proteincodierenden Genen im Tumor. Einseitige exakte Fisher-Tests wurden angewandt, um die funktionellen Kategorien mit einem signifikant erhöhten Anteil an DMRs zu ermitteln. Es sind alle Gen-Kategorien mit einer FDR <0,1 aufgelistet.

Kategorie	Anzahl	P-Wert	Quotenverhältnis	Anreicherungs-FDR
Entwicklung	72	3,45E-06	2,0	0,001521296
Entwicklung (unspezifiziert)	66	1,04E-05	1,9	0,002022296
Zelle	87	6,19E-04	1,5	0,077132288
Zellteilung	18	7,83E-04	2,8	0,082083656
Cytochrom P450	24	9,14E-04	2,3	0,082083656
Signalübertragung	120	1,62E-03	1,4	0,09843198
biotischer Stress	73	1,83E-03	1,5	0,09843198

Differenzielle Methylierungen betreffen insbesondere entwicklungspezifische Gene (FDR \leq 0,002). DMRs sind ebenfalls, wenn auch weniger signifikant (FDR<0.1) überrepräsentiert in den Kategorien „Zelle“ (hier besonders in der Unterkategorie „Zellteilung“), „Cytochrom P450“, „Signalübertragung“ sowie „biotischer Stress“. Viele der betroffenen Gene stehen im unmittelbaren Zusammenhang mit Prozessen, welche essenziell für die Tumorentwicklung sind. So finden im Tumor enorme transkriptionelle Veränderungen statt. Entsprechend sind Faktoren, welche Einfluss auf die transkriptionelle Regulation haben, von Methylierungsveränderungen betroffen (z.B. *FCA*-, *ELF8*- und *NAC*-Domänen-Transkriptionsfaktoren). Die Zellteilungsrate in *Arabidopsis*-Tumoren ist erhöht (siehe 3.2.5), was auf die differenzielle Methylierung von Zellzyklusproteinen zurückzuführen sein könnte (z.B. *KRP2*, *APC6*, *CYCT1;2*, *CYCB2*). Im Zusammenhang mit der Teilungsrate stehen wohl auch die Veränderungen in der Chromatin-Kondensierung (z.B. *SMC1*, *SMC3*, *SMC6A*, *ATSCC2*). Die Vorgänge, an denen Cytochrom P450-Gene in Wurzelhalsgallen beteiligt sein könnten, stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Verschiebung des Tumor-Stoffwechsels in Richtung anaerober Prozesse. Möglicherweise spielen auch Methylierungsveränderungen bei Genen eine Rolle in Bezug auf das Tumorstoffwachstum, welche wichtig für die Pathogenabwehr sind (z.B. zahlreiche Resistenzgene der NBS-LRR-Klasse sowie Defensin-ähnliche Proteine). Eine Übersicht über

die einzelnen differenziell methylierten Gene der in Tabelle 3.2 angegebenen Kategorien ist im Anhang zu finden (siehe 8.4).

Beispiele für differenziell methylierte Gene sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Hierzu gehören Proteine welche eine Rolle bei der Embryonalentwicklung (At2g22870, Abbildung 3.13 A), Mikrotubuli-basiertem Transport (At1g63640, Abbildung 3.13 B), Stress-abhängiger Signalübertragung (At4g11480, Abbildung 3.13 C) oder der Pathogenabwehr spielen (At1g78780, Abbildung 3.13 D). All diese Gene zeigten sowohl eine differenzielle Methylierung stromaufwärts der codierenden Sequenz als auch eine veränderte Transkription. Somit tragen diese möglicherweise zu einer Umsteuerung entwicklungsspezifischer oder stress-induzierter Prozesse im Tumor bei.

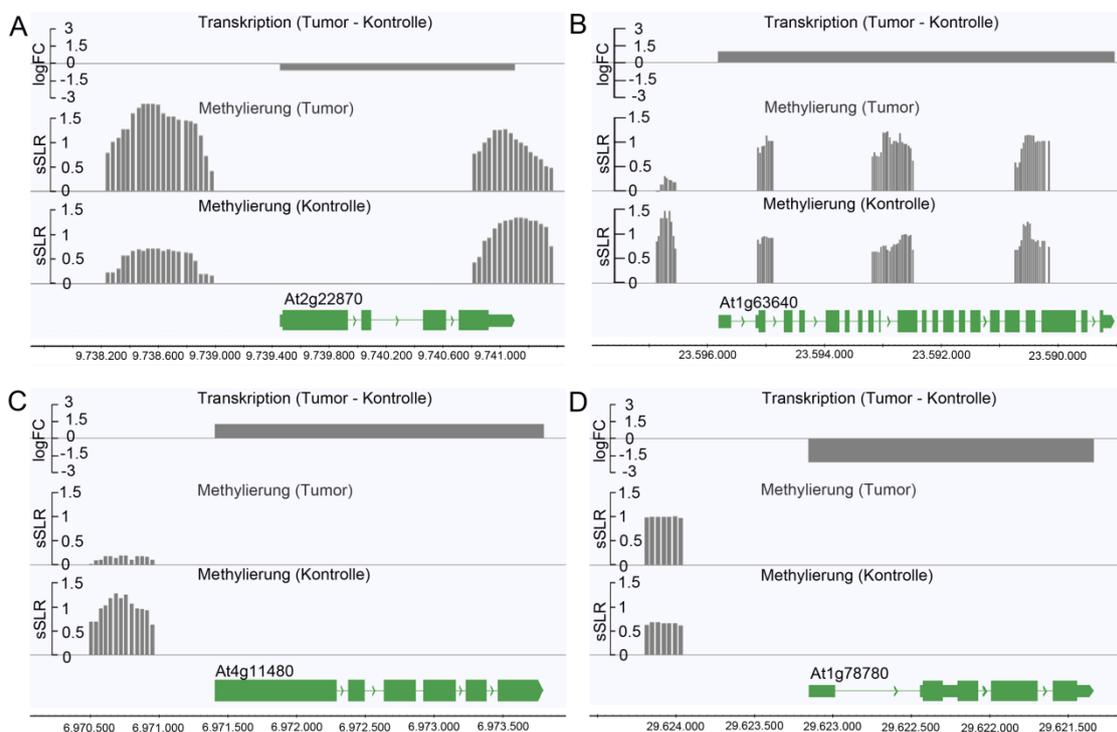


Abbildung 3.13: Beispiele für differenziell methylierte und transkribierte proteincodierende Gene aus den am signifikantesten von Methylierungsänderungen betroffenen Genkategorien (Tabelle 3.2). Dargestellt ist die Methylierung in Tumor- und Sprossgewebe von Genen in den Kategorie Entwicklung (A), Zellteilung (B), Signalübertragung (C) und biotischer Stress (D). Transkriptionelle Veränderungen im Tumor im Verhältnis zur Kontrolle sind logarithmisch dargestellt (logFC). DNA-Methylierungen (graue Balken) sind als *smoothed signal log ratios*, sSLRs (siehe 2.6.3) an ihrer entsprechenden Position angegeben. Unter den Methylierungsniveaus sind die Genmodelle (grün) mit ihren jeweiligen genomischen Positionen abgebildet. Intronbereiche sind als Linien und Exons als Balken symbolisiert.

3.4 Einfluss von DNA-Methylierungsprozessen auf das Tumorwachstum

Die bisher erzielten Ergebnisse legen nahe, dass DNA-Methylierungen an der Regulation der Genexpression im Tumor beteiligt sind. Daher wurde getestet, inwieweit diese auch einen Einfluss auf die Tumorentwicklung haben. Dazu wurden *Arabidopsis*-Mutanten, welche in Methylierungs- und Demethylierungsprozessen beeinträchtigt sind, mit dem virulenten *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm C58 am Spross infiziert. Die Methyltransferase MET1 katalysiert CG-Methylierungen, entsprechend geht diese Form der Methylierung in Verlustmutanten fast vollständig verloren (Cokus *et al.* 2008, Saze *et al.* 2003). Allerdings sind Homozygote *met1-3* Verlustmutanten mit einer Reihe von unterschiedlich stark ausgeprägten Entwicklungsstörungen wie Kleinwuchs, verzögertem Blühbeginn, einer veränderten Blütenmorphologie und reduzierter Fertilität assoziiert. Zudem ist die Rate der embryonalen Letalität sehr hoch. In der Regel überleben nur etwa 2% der nach den Mendelschen Regeln vorausgerechneten Nachkommenanzahl heterozygoter *met1-3*-Mutanten (Saze *et al.* 2003). Aufgrund der pleiotropen Phänotypen und der niedrigen Überlebensrate homozygoter Pflanzen wurde diese Mutante daher nicht im Hinblick auf die Tumorentwicklung untersucht.

Für die Untersuchung der Auswirkung von Nicht-CG-Methylierungen auf das Tumorwachstum existiert eine dreifach-Mutante (*drm1/drm2/cmt3, ddc*), in der sowohl CHG als auch CHH-Methylierungen deutlich reduziert sind (Cao & Jacobsen 2002). Auch der Verlust dieser drei Methylierungsenzyme resultiert, speziell im ursprünglichen Landberg erecta (Ler)-Hintergrund, in phänotypischen Besonderheiten wie nach unten gebogenen Blatträndern der Rosettenblätter, einem leicht reduzierten Wuchs und reduzierter Fertilität (Chan *et al.* 2006). Letzteres ist auf kürzere Schoten zurückzuführen, welche weniger Samen produzieren als der Wildtyp. Insgesamt sind die Auswirkungen im verwendeten Columbia-0 (Col-0) Hintergrund jedoch weniger stark ausgeprägt. In den durchgeführten Experimenten war lediglich der Blatt-Phänotyp sichtbar (Abbildung 3.14), so dass die Pflanzen problemlos für Tumorwachstums-Experimente verwendet werden konnten. Dabei zeigte sich, dass das Tumorwachstum der *ddc*-Mutanten nach Infektion mit virulenten Agrobakterien im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht war (Abbildung 3.15).

Das AGO4-Protein spielt eine Rolle bei RNA-vermittelten Methylierungsvorgängen. Der Phänotyp von *ago4*-Verlustmutanten ist weitestgehend normal, allerdings fehlen bei den Pflanzen Trichome auf der Blatt- und Sprossoberfläche (Abbildung 3.14). Auch diese

Pflanzen wurden hinsichtlich ihres Potenzials zur Tumorbildung untersucht. Im Vergleich mit dem Wildtyp war auch hier wie bei den *ddc*-Mutanten das Tumorgewicht erhöht (Abbildung 3.15). Dabei ist zu beachten, dass die Tumore an *ago4*-Pflanzen generell wesentlich kleiner waren als die der *ddc*-Pflanzen. Dies ist auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der beiden Mutanten zurückzuführen. Wildtyp Ler-Pflanzen entwickeln generell wesentlich kleinere Tumore als Pflanzen des Col-0-Ökotyps (Nam *et al.* 1997).

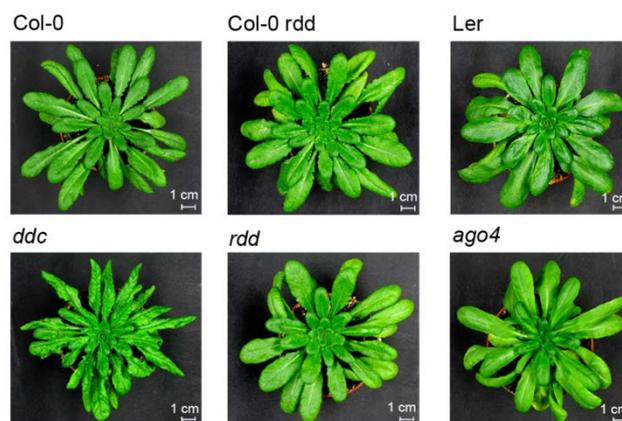


Abbildung 3.14: Phänotypen der für die Tumorstudien verwendeten *Arabidopsis*-Mutanten mit ihrem entsprechenden Wildtyp-Hintergrund (Col-0/*ddc*; Col-0 *rdd/rdd*; Ler/*ago4*)

Die DNA-Glykosylasen ROS1, DML2 und DML3 sind für Demethylierungsprozesse essenziell. Auch von diesen Enzymen existiert eine Dreifach-Verlustmutante (*ros1-3/dml2-1/dml3-1, rdd*), in der lokale Hypermethylierungen auftreten. Diese weist jedoch keinen morphologischen Phänotyp auf (Abbildung 3.14). Neben der *ddc*- und der *ago4*-Mutante wurde auch die *rdd*-Mutante mit virulenten Agrobakterien infiziert und im Hinblick auf das Tumorstudium untersucht (Abbildung 3.15). Diese Mutante zeigte im Gegensatz zu den Verlustmutanten der Nicht-CG-Methylierung keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Die *ros1-3*- und *dml2-1*-Allele stammen aus Pflanzen mit einem Wassilewskija (Ws) Hintergrund. Sie wurden in *dml3-1* Pflanzen mit dem genetischen Hintergrund von Col-0 eingekreuzt, weshalb in den *rdd*-Pflanzen noch große polymorphe Bereiche vorhanden sind und ein entsprechender Wildtyp dieser Kreuzungen (Col-0 *rdd*) als Vergleichspflanze verwendet werden muss. Der Ws-Anteil am Genom könnte erklären, warum Wildtyp-Pflanzen aus diesem genetischen Hintergrund (Col-0 *rdd*) größere Tumore ausbilden als normale Col-0 Pflanzen (Abbildung 3.15), da der

Ws-Ökotyp als besonders anfällig gegenüber *Agrobacterium*-Infektionen gilt (Nam *et al.* 1997).

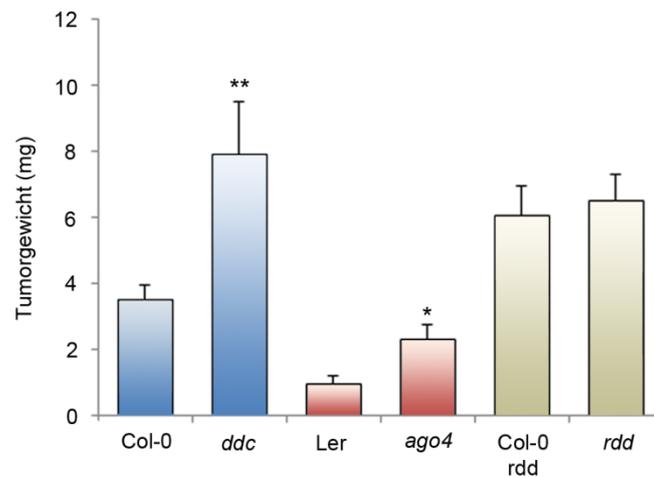


Abbildung 3.15: Tumorwachstum bei *Arabidopsis* Methylierungs- (*ddc/ago4*) bzw. Demethylierungs- (*rdd*) Mutanten. Die Pflanzen wurden an der Basis der Infloreszenzachse mit dem virulenten *Agrobacterium*-Stamm C58 infiziert und nach vier Wochen wurde das Tumorgewicht bestimmt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte (\pm Standardfehler) von mindestens 45 Pflanzen pro *Arabidopsis*-Genotyp. Die statistische Analyse erfolgte durch T-Tests: Signifikanzwert $<0,05$ (*); Signifikanzwert $<0,01$ (**).

Das verstärkte Tumorwachstum an Pflanzen, welche in DNA-Methylierungsprozessen beeinträchtigt sind (*ddc* und *ago4*) deutet darauf hin, dass ein hypomethyliertes Genom förderlich für die Tumorentwicklung ist. Es wäre jedoch auch möglich, dass bereits die Transformation der pflanzlichen Zelle beeinträchtigt ist, da DNA-Methylierungen auch die Transkription der Onkogene beeinflussen können (Hepburn *et al.* 1983). Demethylierungsprozesse dagegen haben offensichtlich keine Auswirkungen auf das Wachstum *Agrobacterium*-induzierter Tumore.

3.5 ABA-abhängige DNA-Methylierungen und deren Auswirkung auf die Transkription

3.5.1 ABA-vermittelte Induktion von DNA-Methylierungen

Die Analyse des Methylierungsmusters im Tumor zeigte, dass dieses beträchtlichen Veränderungen unterliegt (siehe 3.2), welche mit Transkriptionsänderungen einhergehen (siehe 3.3). Methylierungsänderungen resultieren letztendlich auch in einem veränderten Tumorwachstum (siehe 3.4). Schließlich wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, welche Signale im Tumor Methylierungsprozesse induzieren könnten und so die Ausbildung des Tumor-Methyloms begünstigen. Als Signalmoleküle würden Phytohormone

in Frage kommen, insbesondere Auxin, Cytokinin, Ethylen, und Abscisinsäure (ABA), welche im Tumor in deutlich erhöhten Konzentrationen vorliegen (siehe 1.1.2). Für ABA ist gezeigt worden, dass es eine wichtige Funktion bei der Trockenstressanpassung in *Arabidopsis*-Tumoren besitzt. Daneben ist im Tumor auch die Transkription vieler Gene, welche durch Trockenstress oder ABA induzierbar sind (z.B. *LEA*, *HVA22c* und *AtDI21*), deutlich verändert (Efetova *et al.* 2007). Um bewerten zu können, inwieweit ABA auch DNA-Methylierungsprozesse in Wurzelhalsgallen beeinflusst, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, bei dem ABA eine nachprüfbare Wirkung auf die Expression von Genen hat, die mit DNA-Methylierungsänderungen im Zusammenhang stehen.

Für ein solches Experiment muss gewährleistet sein, dass ABA leicht applizierbar ist und möglichst gleichmäßig und effizient von der Pflanze aufgenommen wird. Darüber hinaus sollte es sich nach Möglichkeit um eine Langzeitwirkung von ABA handeln, da die Methylierungsveränderungen im voll entwickelten Tumor 28 Tagen nach Infektion mit Agrobakterien analysiert wurden. Für die Auswahl geeigneter Gene wurde die Online-Anwendung Genevestigator (Hruz *et al.* 2008) verwendet, da es die Möglichkeit bietet, Microarray-Daten aus unterschiedlichen *Arabidopsis*-Gewebe oder nach verschiedenen Behandlungen auf Transkriptionsveränderungen hin zu durchsuchen. Unter anderem sind dort Expressionsdaten von verschiedenen ABA-Behandlungen hinterlegt. Um methylierungsabhängige Genexpressionsänderungen im Tumor aufzudecken, wurde ein Datensatz zur ABA-abhängigen Samenkeimung herangezogen, da bei den meisten anderen bei Genevestigator hinterlegten Daten eher kurzzeitige ABA-Antworten betrachtet wurden. Der entsprechende Datensatz (Nishimura *et al.* 2007) wurde nach Genen durchsucht, welche bei der ABA-abhängigen Keimung signifikant in ihrer Expression gehemmt waren. Als weiteres Kriterium mussten diese Gene im Tumor sowohl signifikant herunterreguliert sein als auch einen hohen Grad an Methylierung aufweisen. Schließlich wurden Keimungsexperimente in Gegenwart von ABA unter identischen Bedingungen wie in der Nishimura-Studie durchgeführt. Danach wurde das Methylierungsmuster in dem Genabschnitt durch Bisulfit-Sequenzierung bestimmt, welcher im Tumor von den Methylierungsveränderungen betroffen war. Mit diesem Ansatz war es möglich, den ABA-Effekt auf die Methylierung der betroffenen Region zu bewerten.

Die ausgewählten Gene spielen eine Rolle bei lichtabhängigen Prozessen, welche insgesamt besonders stark im Tumor herunterreguliert sind (Deeken *et al.* 2006). So codieren diese beispielsweise für Proteine welche am zyklischen Elektronenfluss im

Photosystem I (NDF4), an der lichtabhängigen Transkription der Untereinheit D2 im Photosystem II (SIG5) sowie der alpha-/beta-Hydrolase-Aktivität im Chloroplasten (F12A4.4) beteiligt sind. In diesen drei Genen führte eine ABA-Behandlung nach zwei Tagen zu einer erhöhten Methylierungsrate (Abbildung 3.16) bei NDF4 (+100%), SIG5 (+43%) und F12A4.4 (+94%). Besonders CHG- und CHH-Motive sind nach ABA-Behandlung hypermethyliert, während CG-Motive weitgehend unverändert sind.

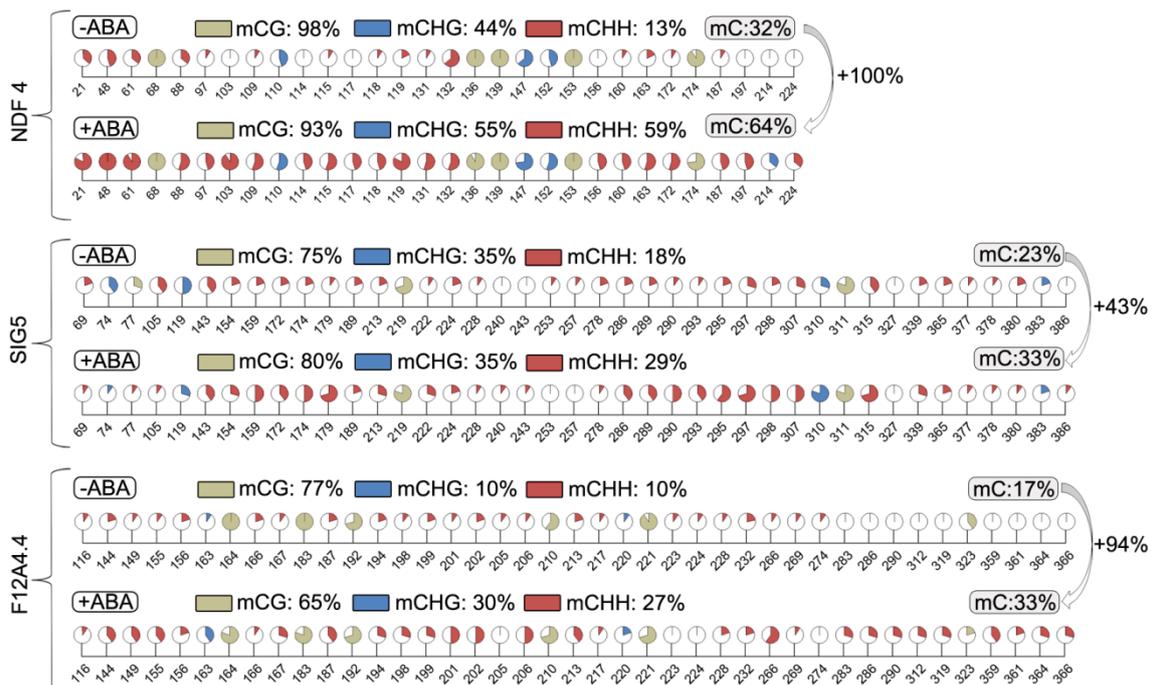


Abbildung 3.16: ABA-abhängige Änderungen der DNA-Methylierungsprofile stromaufwärts der Arabidopsis-Gene *NDF* (At3g16250), *SIG5* (At5g24120) und *F12A4.4* (At1g35420). Der Methylierungs-Status wurde durch Bisulfit-Sequenzierung zwei Tage nach der Keimung in Abwesenheit (-ABA) oder Anwesenheit von ABA (+ABA) bestimmt. Kreisdiagramme visualisieren den prozentualen Anteil an methylierten Cytosinnukleotiden an den unterschiedlichen genomischen Positionen. Der prozentuale Anteil der Anzahl methylierter Cytosine wurde für die verschiedenen Sequenzmotive (CG, CHG, CHH) berechnet. Veränderungen in der Gesamt-Cytosinmethylierung (mC) sind als prozentuale Erhöhung der Gesamtanzahl methylierter Cytosine in -ABA- im Verhältnis zu +ABA-Proben angegeben. Pro Probe und Gen wurden zehn verschiedene Klone sequenziert.

3.5.2 Korrelation von Tiling-Array- und Bisulfitsequenzierungs-Daten ABA-regulierter Gene im Tumor

Die im Hinblick auf die ABA-Abhängigkeit untersuchten Bereiche sind jeweils stromaufwärts der codierenden Abschnitte der Gene lokalisiert (Abbildung 3.17 A-C, jeweils unteres Drittel), wo anhand der Tiling-Array-Analysen im Tumorgenom ein höherer Anteil an methylierten Cytosinnukleotiden im Vergleich zum Sprossgenom entdeckt worden war (Abbildung 3.17 A-C, jeweils oberes Drittel). Diese stromaufwärts gelegenen

Regionen überlappen exakt mit den durch ABA-Behandlung induzierten Hypermethylierungen (Abbildung 3.17). Dieses Ergebnis verifiziert zum einen die Tiling-Array-Daten und zeigt zum anderen, dass ABA DNA-Methylierungsprozesse induziert.

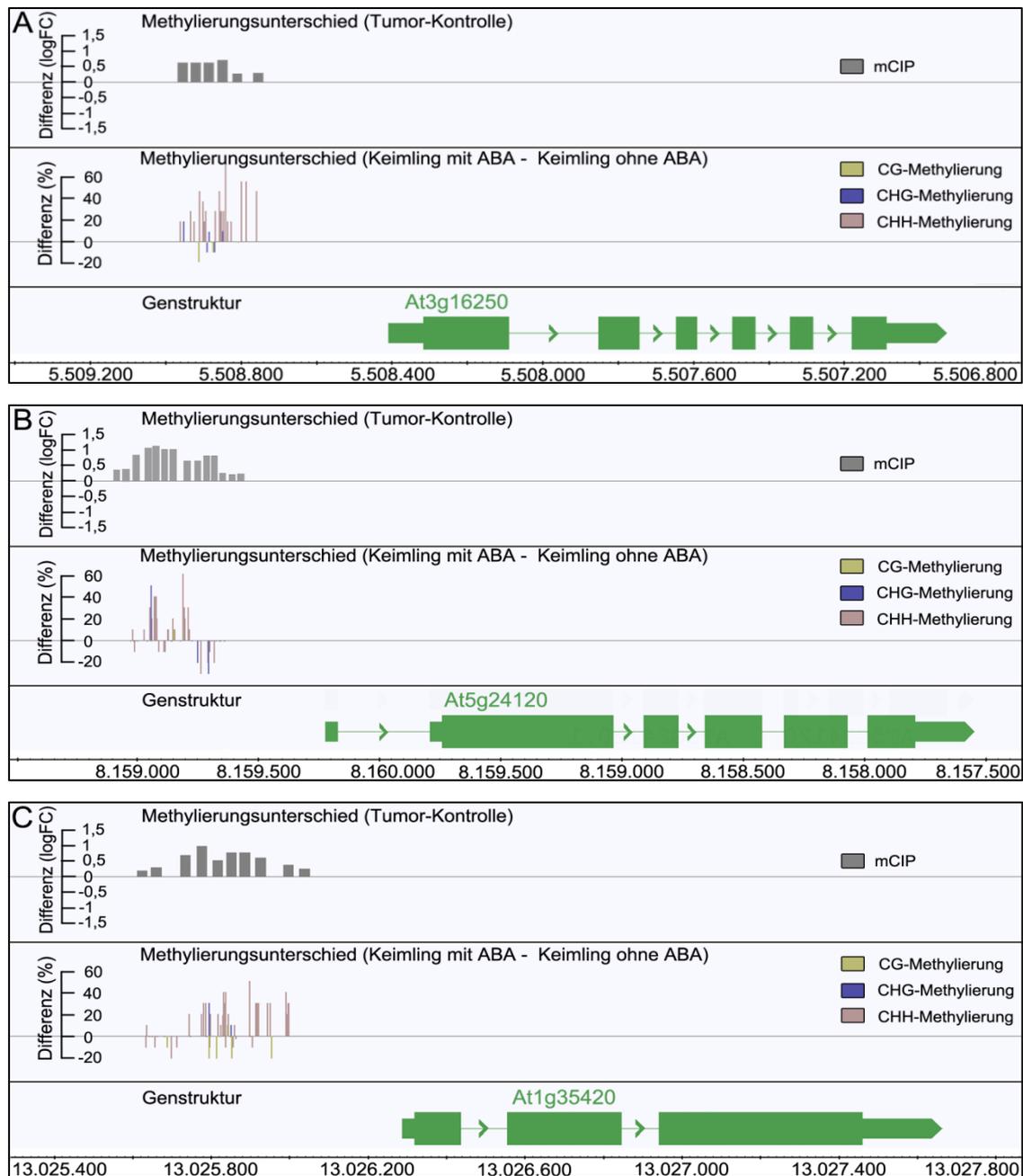


Abbildung 3.17: ABA-abhängige Zunahme von methylierten Cytosin-Nukleotiden im Tumor im Vergleich zum Kontrollgewebe stromaufwärts von *NDF4* (A), *SIG5* (B) und *F12A4.4* (C) bei 2 Tage alten Keimlingen mit und ohne ABA-Behandlung (siehe 2.3.5). Dargestellt sind die laut Tiling-Array ermittelten Methylierungsunterschiede in Tumor- gegenüber Kontrollgewebe (obere Spalte, mCIP) bzw. mittels Bisulfit-Sequenzierung gefundenen Unterschiede in Keimlingen mit ABA gegenüber ohne ABA (mittlere Spalte). Die verschiedenen Sequenzmotive (CG, CHG, CHH) sind farblich unterschieden. Die untere Spalte zeigt die Genstruktur (grün). Hierbei sind untranslatierte Bereiche als schmale Balken dargestellt, Exons dagegen als dicke Balken. Dünne Linien stehen für Introns während Pfeile die Transkriptionsrichtung anzeigen. Die prozentualen Methylierungs-Differenzen der Keimlinge wurden aus den Ergebnissen der Bisulfit-Sequenzierung (Abbildung 3.16) errechnet.

3.5.3 ABA-vermittelte Methylierung korreliert mit reduzierter Transkription

Da die ABA-abhängige Methylierungs-Zunahme (Abbildung 3.18 A, oben) auch die Expression der drei Gene beeinflussen könnte, wurden für diese auch die Expressionsniveaus in Keimlingen mit und ohne Zugabe von ABA bestimmt. In allen Fällen war die Transkription durch ABA deutlich reduziert (Abbildung 3.18 A, unten). Dies zeigt, dass durch ABA die Methylierung und transkriptionelle Inaktivierung von Genen induziert werden kann. Dieser Zusammenhang ähnelt der Situation im pflanzlichen Tumor, wo erhöhte ABA-Konzentrationen ebenfalls mit zunehmender DNA-Methylierung (Abbildung 3.18 B, oben) und einer Expressionshemmung einhergehen (Abbildung 3.18 B, unten).

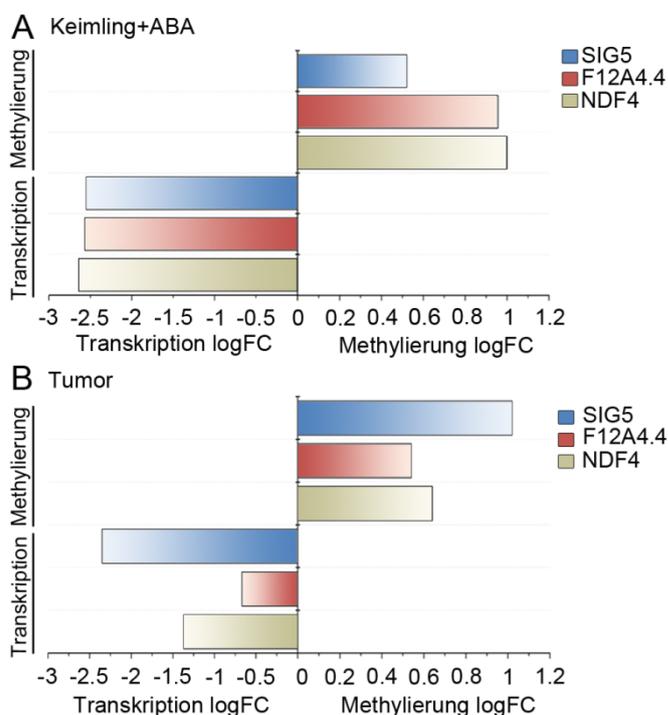


Abbildung 3.18: Erhöhte ABA-Konzentrationen induzieren DNA-Methylierungen und die transkriptionelle Inhibierung von *Arabidopsis*-Genen. (A) *Arabidopsis*-Keimlinge wurden zwei Tage lang mit und ohne ABA nach dem Protokoll von Nishimura *et al.* kultiviert (Nishimura *et al.* 2007). Die Methylierungsprofile wurden stromaufwärts der Gene *NDF*, *SIG5* und *F12A4.4* durch Bisulfit-Sequenzierung bestimmt. Die Methylierungsänderungen (Methylierung logFC) wurden aus den Bisulfitsequenzierungsdaten der mit ABA behandelten und unbehandelten Pflanzen errechnet. Die Transkriptlevel wurden durch qRT-PCR von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten bestimmt und daraus die logarithmischen *fold changes* (logFC) berechnet. (B) Methylierungs- und Transkriptionsveränderungen im Tumor im Vergleich zum Spross der mCIP-Daten (Methylierung logFC) und Expressions-Microarray-Daten (Transkription logFC) einer früheren Studie (Deeken *et al.* 2006).

4. Diskussion

4.1 DNA-Methylierung als Strategie zur Abwehr von Fremd-DNA

DNA-Methylierungen wird eine wichtige Funktion in Bezug auf den Schutz des Genoms gegenüber parasitären DNA-Elementen zugeschrieben (Matzke *et al.* 2000). Hierzu gehört neben Transposons, Viroiden sowie RNA- und DNA-Viren auch bakterielle DNA. So werden beispielsweise Teile bakterieller Vektoren nicht ohne Weiteres im *Arabidopsis*-Genom toleriert und daher nach einer genomischen Integration häufig spontan in hohem Maße methyliert (Jakowitsch *et al.* 1999a). Unter Umständen kann sich diese Methylierung auch auf benachbarte Transgene ausbreiten und so zu deren Stilllegung führen. Gründe für die Induktion der Methylierung werden in einer ungewöhnlichen Zusammensetzung der Sequenzen oder einem erhöhten GC-Gehalt gegenüber dem eukaryotischen Genom vermutet (Scrabble & Stambrook 1997, Scrabble & Stambrook 1999). Auch die fehlende Fähigkeit zur Bindung eukaryotischer Kernproteine könnte die Methylierung bakterieller Fremd-DNA begünstigen. Häufig ist eine transkriptionelle Hemmung von Transgenen zu beobachten, welche durch die T-DNA in die Pflanze übertragen werden. Ein Großteil dieser Effekte ist jedoch auf den Einsatz der binären Vektoren zurückzuführen, welche zur Übertragung der T-DNA verwendet werden. Diese liegen im Verhältnis zum Ti-Plasmid in höherer Kopienzahl vor, wodurch die Integration von Concatemeren gefördert wird. Sie können große Teile der Vektorsequenz enthalten (Wenck *et al.* 1997) und werden somit mit höherer Wahrscheinlichkeit von pflanzlichen Abwehrmechanismen erkannt. Studien von Francis & Spiker legen nahe, dass etwa 30% solcher durch Binärvektoren hervorgerufener T-DNA-Integrationen in einer Hemmung der Transgen-Expression resultieren (Francis & Spiker 2005). Im Fall von mehrfach-Integrationen der T-DNA kommt es häufig zur Stilllegung der Transgenexpression, insbesondere wenn diese in Form von invertierten Sequenzwiederholungen auftreten (Stam *et al.* 2000). Diese Stilllegung erfolgt häufig über posttranskriptionelle Mechanismen, kann aber auch auf transkriptioneller Ebene durch DNA-Methylierungen ausgelöst werden (Matzke *et al.* 1989, Meyer *et al.* 1993, Neuhuber *et al.* 1994, Renckens *et al.* 1992). Über Gründe, weshalb die native T-DNA diesen Mechanismen widersteht, wie beispielhaft anhand der Onkogene in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann jedoch nur spekuliert werden (siehe 4.1.1).

4.1.1 Die agrobakteriellen Onkogene werden nicht methyliert

Wurzelhalsgallen entstehen durch die Einschleusung bakterieller Fremd-DNA (T-DNA), welche für die Proliferation essenzielle Onkogene beinhaltet, in das pflanzliche Genom. Die erste systematische Untersuchung der T-DNA-Methylierung in Tumoren, welche durch Wildtyp-Agrobakterien erzeugt wurden, erfolgte bereits 1983 durch Gelvin *et al.* (Gelvin *et al.* 1983). Dabei wurden vier Tumorlinien des Octopin-Typs und eine Linie des Nopalintyps mit Hilfe von Methylcytosin-sensitiven Restriktionsenzymen untersucht. In zwei Linien des Octopin-Typs wurden dabei Methylierungen festgestellt, jedoch war stets mindestens eine Kopie der T-DNA unmethyliert. Dies ist nicht überraschend angesichts der Tatsache, dass die Expression der Onkogene eine Grundvoraussetzung für die Tumorbildung ist. Die Methylierungsanalysen in Wildtyp-Tumoren beschränken sich jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt auf wenige Sequenzzusammenhänge, da hierfür bisher ausschließlich Methylcytosin-sensitive Restriktionsenzyme verwendet wurden.

Aus diesem Grund und auch aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse zur Methylierung in unterschiedlichen Tumorlinien in der Gelvin-Studie wurde die T-DNA-Methylierung in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Bisulfit-Sequenzierung in *Arabidopsis* Tumoren untersucht, welche durch den *A. tumefaciens* Stamm C58_{noc} erzeugt wurden. Die Analyse in Einzelnukleotid-Auflösung zeigte einen Methylierungsgrad von 0,94%, was angesichts der erreichten Umwandlungsrate von 99,14 % in anderen Studien (Lister *et al.* 2008) als unmethyliert zu betrachten ist. In der Regel reicht eine solche Methylierungsrate nicht für eine Expressionshemmung aus, zudem waren die intergenischen Regionen der Onkogene, welche Promotorfunktion besitzen (persönliche Mitteilung R. Deeken, Universität Würzburg), vollständig unmethyliert. Es ist anzunehmen, dass die native T-DNA der Agrobakterien sich den Schutzmechanismen des pflanzlichen Genoms verhältnismäßig gut entziehen kann, möglicherweise durch eine eukaryotische Sequenzstruktur mit regulatorischen Abschnitten wie TATA- und CAAT-Box (Dymock *et al.* 1991, Goldberg *et al.* 1984, de Pater *et al.* 1987), welche von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Möglicherweise haben auch Faktoren des verwendeten *Agrobacterium*-Stammes einen Einfluss auf die DNA-Methylierung, da Nopalinstämme wie C58 sowohl in der Gelvin-Studie als auch in dieser Arbeit keine T-DNA-Methylierung zeigten. Ein weiterer möglicher Grund für die niedrige Methylierungsrate ist die Hemmung der siRNA-Synthese im Tumor, auf die im nachfolgenden Abschnitt noch genauer eingegangen wird.

4.1.2 Eine Induktion der Onkogen-Methylierung unterdrückt die Onkogen-Expression und die Tumorbildung

Da die Onkogenexpression elementar für die Tumorentwicklung ist, wurden Überlegungen angestellt, ob eine Methylierung und Hemmung der Transgen-Expression künstlich induziert werden kann, um die Tumorentwicklung zu unterbinden. Hinweise, dass Methylierungen durch komplementäre RNAs ausgelöst werden können, fanden sich erstmals 1994 in einer Arbeit von Wassenecker *et al.* (Wassenecker *et al.* 1994). In dieser Studie wurden vier verschiedene cDNAs des Kartoffelspindelknollen-Viroids (Potato Spindle-Tuber-Viroid, PSTVd) durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Blattscheiben in das Tabak-Genom integriert. Dies führte zur Methylierung der PSTVd-spezifischen Sequenzen, während die flankierende T-DNA und die pflanzliche DNA unverändert blieben. Die Methylierung konnte nur nach autonomer RNA-Replikation des Viroids beobachtet werden. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass ein Mechanismus zur *de novo*-Methylierung von Genen existiert, welcher in einer sequenzspezifischen Art und Weise durch homologe mRNA induziert werden kann. Hohe Kopien-Zahlen ($\approx 10^3$) von Pararetrovirus-artigen Sequenzen in gesunden Pflanzen weisen darauf hin, dass durch diesen Mechanismus möglicherweise Homologie-abhängigen Virusresistenzen entstehen können (Jakowitsch *et al.* 1999b).

Daneben konnte demonstriert werden, dass auch exogene Promotor-Sequenzen über RNA-abhängige Wege zur Methylierung und Stilllegung homologer Promotoren in *trans* führen können (Mette *et al.* 1999). Voraussetzung hierfür ist, dass die Promotor-Sequenzen als invertierte Sequenzwiederholungen im Genom angeordnet sind und stark überexprimiert werden, z.B. durch Einsatz des viralen CaM35S-Promoters. So kann durch die Bildung von komplementären siRNAs eine Methylierung der DNA induziert werden. Speziell in Bezug auf exogene Sequenzen scheint eine solche transkriptionelle Stilllegung der Genexpression über RNA-abhängige Methylierungs-Mechanismen effizient zu funktionieren (Mette *et al.* 2000). Während in *Agrobacterium*-infiziertem Gewebe verstärkt siRNAs gebildet werden, die gegen die T-DNA-Onkogene gerichtet sind, wird die Synthese solcher siRNAs im sich entwickelnden Tumor offenbar spezifisch gehemmt (Dunoyer *et al.* 2006). Dieser Zustand, in dem keine oder nur wenige gegen die T-DNA gerichtete siRNAs gebildet werden, ist möglicherweise dafür verantwortlich dass die T-DNA-Onkogene in dieser Arbeit unmethyliert im Tumorgenom vorgefunden wurden (siehe 3.1.1).

Da die beiden intergenischen Regionen (IGRs) der Onkogene *iaaH*, *iaaM* und *ipt* im Tumorgenom vollständig unmethyliert vorlagen, wurde geprüft, ob diese grundsätzlich unempfindlich für Methylierungen sind. Es zeigte sich, dass beide IGRs in allen drei Sequenz-Zusammenhängen Methylierungen aufwiesen, wenn ein Agrobakterien-Stamm mit einem Haarnadel-Konstrukt gegen diese Promotorabschnitte zur Infektion verwendet wurde (Abbildung 3.1). Eine Methylierungsrate von 1,82%, wie sie bei IGR1 gefunden wurde, hat in der Regel keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität. In den Fällen, in denen siRNA-induzierte Methylierungen eine Expressionshemmung auslösen, liegt das Methylierungsniveau der betroffenen Regionen in der Regel wesentlich höher. Im Fall des *Apetala1*-Gens beispielsweise beträgt die durch invertierte Sequenzwiederholungen erreichte Methylierungsrate je nach Sequenzmotiv zwischen 30% und 90% (Zilberman *et al.* 2004).

Die Methylierungsrate von IGR2 (stromaufwärts von IPT) ist mit 66,83% sehr wahrscheinlich ausreichend, um eine transkriptionelle Stilllegung des IPT-Gens zu bewirken. Die geringe DNA-Methylierungsrate von einem der Onkogene, in diesem Fall von IGR1, ist vermutlich dem Umstand geschuldet, dass diese im Tumormaterial bestimmt wurde. Für die Tumorentwicklung ist die Expression mindestens eines Onkogens notwendig (Akiyoshi *et al.* 1983). Eine starke Methylierung beider IGRs im bereits entwickelten Tumor ist somit unwahrscheinlich, da eine Hemmung der Onkogene *iaaH*, *iaaM* und *ipt* das Tumorstadium unterbunden hätte. Sinnvoll wäre deshalb eine Analyse des Onkogen-Methylierungsstatus in frisch infiziertem Pflanzengewebe. Aus Bisulfit-behandelter DNA von Sprossgewebe sechs Tage nach Infektion mit Agrobakterien war jedoch keine Amplifikation der intergenischen Onkogen-Regionen möglich. Vermutlich ist die Konzentration der agrobakteriellen DNA in frisch infiziertem Gewebe zu gering, um diese nach einer Bisulfit-Behandlung noch amplifizieren zu können. Prinzipiell jedoch kann durch die Produktion doppelsträngiger RNA-Haarnadelkonstrukte die Methylierung beider intergenischer Regionen induziert werden.

Die künstlich herbeigeführte Methylierung der Onkogen-DNA legte nahe, dass möglicherweise deren Expression inhibiert wird. Die Ermittlung der *ipt*- und *iaaH*-Transkriptanzahl in infiziertem Sprossgewebe nach sechs Tagen zeigte, dass die Expression beider Gene signifikant gehemmt werden kann. Wurden Konstrukte für die Infektion verwendet, die nur gegen eines der untersuchten Gene gerichtet war, so war die Expression des jeweils anderen Gens nicht von einer transkriptionellen Hemmung

betroffen. Bei Einsatz des Haarnadelkonstruktes gegen beide IGRs war entsprechend nahezu keine Expression von *ipt* und *iaaH* nachweisbar. Eine transkriptionelle Hemmung durch siRNA-vermittelte Methylierung stellt somit einen sehr effizienten Mechanismus zur Steuerung der Onkogenexpression dar. In einer früheren Arbeit wurde bereits demonstriert, dass durch post-transkriptionelle Mechanismen eine Hemmung der Onkogene möglich ist (Escobar *et al.* 2001). In der Studie konnte für *ipt* und *iaaH* nach zehn Tagen eine Suppression der Expression von über 90% erreicht werden. Die in dieser Arbeit untersuchte transkriptionelle Hemmung der Onkogenexpression durch Promotor-Methylierung ist annähernd ebenso effizient. Die Expressionsraten des *iaaH*- bzw. des *ipt*-Gens betragen bei Verwendung des Haarnadelkonstruktes gegen beide Onkogene noch 0,98% bzw. 14,35% des Expressionsniveaus ohne siRNA-vermittelte transkriptionelle Hemmung.

Tumorstadiumsexperimente mit den transgenen *Agrobacterium*-Stämmen, welche die jeweiligen Haarnadelkonstrukte beinhalten (siehe 3.1.2) ergaben, dass das Tumorstadium fast vollständig unterbunden wurde, wenn eine transkriptionelle Hemmung beider Onkogene durch komplementäre siRNAs erfolgte. Die durchschnittliche Biomasse betrug in diesem Fall nur noch 6,37% des Gewichts von Wildtyp-Tumoren. Somit wurde in dieser Arbeit durch die RNA-abhängige Onkogen-Promotor-Methylierung für Spross-Tumore eine vergleichbare Reduktion des Tumorstadiums erreicht wie in den Studien von Escobar *et al.* (2001). Dort war die Biomasse von *Arabidopsis*-Wurzeltumoren nach post-transkriptioneller Hemmung beider Onkogene im Vergleich mit Wildtyp-Tumoren ebenfalls zu über 90% reduziert (Escobar *et al.* 2001). Ähnlich wie die Hemmung durch post-transkriptionelle Mechanismen eignet sich somit auch ein Ansatz auf Ebene der Transkription für eine Kontrolle der Wurzelhalsgallen-Krankheit. Zwar gibt es nur wenige systematische Untersuchungen zur Effizienz der transkriptionellen Expressionshemmung (Ossowski *et al.* 2008), im Hinblick auf die T-DNA-codierten Onkogene ist die in dieser Arbeit verwendete Methode jedoch äußerst wirksam. Die siRNA-abhängige Methylierung eines einzelnen Promoters hatte dagegen kaum einen Einfluss auf die Tumorentwicklung. Letztere Beobachtung stimmt mit einer Studie überein, die mit mutagenisierten *Agrobacterium*-Populationen durchgeführt wurde. In dieser Studie wurden Mutanten mit veränderter Tumormorphologie identifiziert (siehe 1.1.2). Diese Mutanten wiesen Defekte entweder im *tms*- und/oder *tmr*-Locus auf, welche für die Phytohormon-produzierenden IaaM-, IaaH- und IPT-Enzyme codierten (Garfinkel & Nester 1980, Ooms *et al.* 1981, Ream

et al. 1983). Einzelmutanten der *tms*- oder *tmr*-Loci sind nach wie vor in der Lage, signifikantes Tumorwachstum zu erzeugen, bei Mutationen in beiden Loci verlieren die Agrobakterien jedoch diese Fähigkeit.

Eine transkriptionelle Hemmung von *ipt* und einem der beiden *iaa*-Gene führt somit vermutlich dazu, dass ein Anstieg der Cytokinin- und Auxin-Konzentration verhindert und so die Tumorentwicklung unterbunden wird. Bei transkriptioneller Hemmung nur eines Onkogens verläuft die Tumorgenese wie nach Infektion mit Wildtyp-Agrobakterien. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine Verschiebung des Verhältnisses von Auxin zu Cytokinin häufig ausreichend ist, um tumorartiges Wachstum auszulösen. Frank *et al.* konnten dies anhand von EMS-mutagenisierten *Arabidopsis*-Linien demonstrieren, welche in Bezug auf die tumorartige Dedifferenzierung des Gewebes nach der Keimung (Kallus-Bildung) untersucht wurden (Frank *et al.* 2000). In der erwähnten Studie wurden 14 Linien identifiziert, welche im Gegensatz zum Wildtyp auf Hormon-freiem Medium als Kalli weiter propagiert werden konnten. Alle Tumorphänotypen waren entweder auf veränderte Verhältnisse von Auxin zu Cytokinin zurückzuführen oder auf Defekte in den Phytohormon-abhängigen Signalwegen von einer der beiden Substanzen. Eine zuverlässige Hemmung beider Onkogene ist somit eine essenzielle Voraussetzung, um tumorartiges Wachstum zu unterbinden.

4.2. Das Methylierungsmuster der durch *Agrobacterium* induzierten Wurzelhalsgallen von *Arabidopsis thaliana*

4.2.1 Die Qualität der Methylomdaten ist mit anderer Studien vergleichbar

Abgesehen von den bereits beschriebenen Untersuchungen der ins *Arabidopsis*-Genom integrierten agrobakteriellen T-DNA (siehe 3.1) ist über die Rolle von DNA-Methylierungen in der Entwicklung pflanzlicher Tumore wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde deshalb das Methylierungsmuster von *Arabidopsis* Wurzelhalsgallen Genom-umfassend im Vergleich mit Tumor-freiem Sprossgewebe analysiert. Hierfür wurde die Methode der Methylcytosin-Immunopräzipitation verwendet. Die Ultraschallbehandlung der DNA mit Hilfe des Bioruptors ermöglichte eine gut reproduzierbare Fragmentierung der DNA, was für eine effiziente und gleichmäßige Präzipitation methylierter DNA essenziell ist. Durch die relative Quantifizierung verschiedener Genloci mit bekanntem Methylierungsmuster konnte demonstriert werden, dass methylierte DNA durch den verwendeten Antikörper

sehr spezifisch angereichert werden kann. Das FWA-Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor, dessen Expression in vegetativem Gewebe stets durch Methylierung von Tandem-Sequenzwiederholungen gehemmt wird (Soppe *et al.* 2000). Diese Methylierungen werden durch die Methyltransferase MET1 reguliert und treten daher hauptsächlich an CG-Motiven auf. AtSN1 ist ein SINE (*short interspersed elements*) Retrotransposon, welches in hohem Maße an Nicht-CG Nukleotiden und wenig im CG-Sequenzzusammenhang methyliert ist (Johnson *et al.* 2007). Das perizentromer lokalisierte Retrotransposon Ta3 ist ebenso wie AtSN1 vorwiegend an CHG- und CHH-Motiven methyliert (Johnson *et al.* 2002). Die deutliche Anreicherung aller drei Loci ist somit auch eine Bestätigung, dass Methylcytosine sowohl im CG- (FWA) als auch im Nicht-CG-Kontext (AtSN1 und Ta3) zuverlässig vom Antikörper gebunden werden. Die Anreicherung methylierter DNA erreichte bei allen drei Loci mit mindestens 75% der eingesetzten DNA-Menge vergleichbare Werte wie in einer Studie von Zhang *et al.* (2006). Da der unmethylierte Actin7-Promoter überwiegend in der ungebundenen Fraktion präsent war, ist die Anreicherung als spezifisch anzusehen.

Auch die Methylom-Veränderungen im Tumor, auf die später noch detailliert eingegangen wird, wurden durch Bisulfit-Sequenzierung bestätigt. Veränderungen im Methylierungsmuster waren bei jenen Genen, in denen die Methylierung im Promotorbereich nahe der TSS betrachtet wurde, besonders deutlich (At1g20850, At3g19250 und At5g58370). Wesentlich schwächer waren die Änderungen der Gene At4g12760 und At2g16595, welche in Bezug auf die Methylierung im *gene body* untersucht wurden. Letzterer Locus besitzt hauptsächlich methylierte CG-Motive, welche typischerweise verstärkt innerhalb der codierenden Abschnitte von Genen auftreten (Tran *et al.* 2005), auch einige wenige CHG-Methylierungen. Diese CHG-Methylierungen machen hier einen Großteil der Methylierungsveränderungen aus, jedoch bleibt das Gesamt-Methylierungsniveau nahezu unverändert. Im Unterschied dazu treten die Methylierungen im Promotorbereich der drei Loci At1g20850, At3g19250 und At5g58370 hauptsächlich im Nicht-CG-Kontext auf. Gleichzeitig überlappen diese Methylierungen mit Regionen gegen die eine hohe Anzahl komplementärer siRNAs gerichtet sind (Lister *et al.* 2008). Es scheint naheliegend, dass in diesen Bereichen die Methylierungsveränderungen über RNA-abhängige Wege reguliert ablaufen und deshalb entsprechend reproduzierbar detektiert werden. Nicht-CG-Methylierungen sind vermutlich sehr stabil und seltener von zufälligen Veränderungen betroffen. Hingegen erscheinen Bereiche mit deutlich weniger Nicht-CG-

Methylierungen, wie der Locus At2g16595, im Genom des tumorfreien Kontrollgewebes unverändert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Veränderungen im CG-Methylierungsmuster im Gegensatz zu Nicht-CG-Methylierungen in erster Linie zufällig durch Fehler bei der DNA-Replikation entstehen. Da mCIP- und Bisulfit-Daten aus unterschiedlichen Tumorproben generiert wurden, wäre es möglich, dass sich das Material hinsichtlich der zufällig auftretenden Veränderungen der CG-Motive unterscheidet. Dies ist beispielsweise auch der Fall bei Methylierungsveränderungen über mehrere Generationen (Becker *et al.* 2011, Schmitz *et al.* 2011). Insgesamt betrachtet stimmten die Ergebnisse der mCIP-Analysen jedoch recht gut mit denen der Bisulfit-Sequenzierung überein.

Die detektierten methylierten Regionen decken insgesamt etwa 22% des *Arabidopsis*-Kerngenoms ab. Im Vergleich mit den ersten genomweiten Studien zur DNA-Methylierung in *Arabidopsis* (19%, Zhang *et al.* 2006) wurden somit mehr methylierte Regionen identifiziert. Dieser Unterschied könnte auf die verschiedenen untersuchten Gewebe zurückzuführen sein. In den Studien von Zhang *et al.* wurde oberirdisches Gewebe verwendet, während das DNA-Methylierungsmuster in der vorliegenden Arbeit von Sprossachsengewebe bestimmt wurde. Möglicherweise erklären sich die Unterschiede aber auch durch die verschiedenen statistischen Methoden, welche zur Analyse der Methylomdatensätze eingesetzt wurden. Für die Identifizierung der methylierten Regionen wurde in der Arbeit von Zhang *et al.* ein Hidden Markov Model verwendet. Vermutlich stellt die hier verwendete Implementierung des CMARRT-Algorithmus einen sensitiveren und weniger konservativeren Ansatz dar als das in der Zhang-Studie angewandte Hidden Markov Modell (Kuan *et al.* 2008). Dies würde die geringere Anzahl methylierter Regionen in der Studie von Zhang *et al.* im Vergleich zu dieser Arbeit erklären.

Die bisher erfolgten Genom-weiten Studien zur Methylierung in *Arabidopsis* (Cokus *et al.* 2008, Lister *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2006, Zilberman *et al.* 2007) beschreiben für proteincodierende Gene ein hohes Maß an Methylierung im *gene body* und reduzierte Methylierung am Transkriptions-Start und -Ende. Transposable Elemente und Pseudogene sind insgesamt wesentlich stärker methyliert als proteincodierende Gene, jedoch treten an den Genenden keine Hypomethylierungen auf. Dies weist darauf hin, dass Methylierungen im Promoterbereich und am 3'-Ende von proteincodierenden Genen einem hohen Selektionsdruck unterliegen, da sie an diesen Positionen potenziell mit wichtigen

Prozessen wie Transkriptions-Initiation und -Termination interferieren. Verglichen mit dem in dieser Arbeit bestimmten Methylierungsmuster ist der Methylierungsverlauf der anderen Genom-weiten Studien zur Methylierung in *Arabidopsis* bei proteincodierenden Genen, Transposons und Pseudogenen identisch. Somit konnten die unterschiedlichen Schritte der Methylierungsanalyse, von der spezifischen Anreicherung methylierter DNA über den Methylierungsverlauf und differenziell methylierten Regionen, durch Kontrollversuche bestätigt werden beziehungsweise lieferten im Vergleich mit früheren Studien vergleichbare Ergebnisse. Daher ist der erzeugte Datensatz als sehr zuverlässig anzusehen.

4.2.2 Methylierungsveränderungen von Nicht-CG-Motiven sind essenziell für die Tumorgenese

Eine Genom-umfassende Methylom-Analyse mit Hilfe von Tiling-Arrays erlaubt keine unmittelbare Zuordnung der Sequenzzusammenhänge, in denen die Methylierungen erfolgen. Betrachtet man jedoch die Frequenz der Sequenzmotive in den differenziell methylierten Regionen, so lassen sich Aussagen über die Methylierungswahrscheinlichkeit der verschiedenen Sequenzmotive CG, CHH und CHG treffen.

In hypomethylierten DNA-Bereichen im Tumor ist die CG-Dichte ähnlich hoch wie in unveränderten Regionen. Somit findet dort vermutlich kein Verlust an methylierten CG-Motiven statt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass CG-Methylierungen in der Regel während der DNA-Replikation erhalten bleiben. Der hemimethylierte DNA-Strang dient bei CG-Methylierungen als Matrize für die Methylierung durch MET1, somit ist dieser Prozess RNA-unabhängig (Saze *et al.* 2003). In Bezug auf hypermethylierte Bereiche im Tumor ist die CG-Dichte in den betroffenen DNA-Abschnitten leicht erhöht. Die Erhöhung der CG-Dichte könnte auf die Methylierung von CG-Nukleotiden in Bereichen zurückzuführen sein, welche auch von Nicht-CG-Methylierungen betroffen sind. Hierfür sprechen Studien von Teixeira *et al.*, welche demonstrieren konnten, dass unmethylierte CG-Nukleotide Methylierungen erlangen können, sofern die betroffene Region auch das Ziel von Nicht-CG-Methylierungen ist (Teixeira *et al.* 2009). Nicht-CG-Motive werden häufig RNA-abhängig methyliert und besitzen somit einen Kontrollmechanismus, um nach der DNA-Replikation Fehler in der DNA-Methylierung zu erkennen (Vaillant & Paszkowski 2007).

Im Tumorgewebe deuten die ermittelten Motivdichten darauf hin, dass Nicht-CG-Motive stärker verändert methyliert sind als CG-Nukleotide. Diese Annahme wurde durch die

Bisulfit-Sequenzierung der ABA-abhängig methylierten Promoterregionen bestätigt (siehe 3.5). Hier erfolgten die Methylierungsveränderungen fast ausschließlich an Nicht-CG-Motiven. In den Microarray-Kontrollen, bei denen die Methylierung einzelner Gene ebenfalls durch Bisulfit-Sequenzierung überprüft wurde, sind in den getesteten Loci neben Nicht-CG-Motiven auch CG-Methylierungen prozentual stark verändert (At5g58370, At3g19250 und At1g20850, Abbildung 3.8). Jedoch sind diese Loci alle gleichzeitig ein Ziel von siRNAs und damit von veränderter RNA-abhängiger Nicht-CG-Methylierung (Cokus *et al.* 2008). Letztere ruft häufig auch Veränderungen der CG-Methylierungen in den betroffenen Regionen hervor (siehe oben). Dagegen erscheint die DNA-Methylierung im Tumor weniger variabel, wenn in den untersuchten Bereichen ausschließlich RNA-unabhängige CG- oder CHG-Methylierungen auftreten, wie es bei den Genen At4g12760 oder At2g16595 der Fall ist. Zusammen mit den stark von Veränderungen betroffenen CHG- und CHH-Motivdichten in differenziell methylierten Regionen (siehe 3.2.6) legt dies den Schluss nahe, dass Methylierungsveränderungen im Tumor vorwiegend durch RNA-abhängige Wege reguliert werden. RNA-abhängige Nicht-CG-Methylierungen verändern sich sehr stark in beide Richtungen, da ein Verlust des entsprechenden RNA-Signals in der Regel einen Verlust der Methylierung zur Folge hat (Vrbsky *et al.* 2010). Die wichtige Rolle RNA-abhängiger Methylierungen in der Tumorentwicklung wird durch das stark veränderte Tumorstadium der *ddc*- und vor allem der *ago4*-Mutanten untermauert, welche Defekte in RNA-abhängigen Methylierungsprozessen aufweisen (siehe 3.4).

Auch in der bisher einzigen umfassenden Studie zum Methylierungsmuster nach Befall mit einem bakteriellen Pathogen, *Pseudomonas syringae*, wurden differenzielle Methylierungen fast ausschließlich an Nicht-CG-Motiven detektiert (Downen *et al.* 2012). Fünf Tage nach Infektion mit dem Pathogen wurde eine Hypomethylierung des pflanzlichen Genoms festgestellt, hierbei befanden sich nur 8,9% der unterschiedlich methylierten Cytosine an CG-Nukleotiden. Möglicherweise sind bei Pathogen-induzierten Vorgängen lediglich Nicht-CG-Methylierungen flexibel genug, um die notwendigen Genexpressionsänderungen hervorrufen zu können. Dies wäre naheliegend, da bereits Veränderungen in der siRNA-Produktion zur Induktion einer differenziellen Methylierung ausreichen würden.

Die Bestimmung der differenziell methylierten Regionen (DMRs) zwischen den untersuchten Geweben zeigte, dass das Tumor-Methylom überwiegend hypermethyliert gegenüber Tumor-freiem Sprossgewebe ist. Hypermethylierte Regionen überwiegen in

allen Gengruppen außer bei den Transposons, die zudem im Vergleich zu proteincodierenden Genen insgesamt nur schwach von differenzieller Methylierung betroffen sind. Somit scheinen Methylierungen in Transposons während der Tumorentwicklung wesentlich stabiler zu sein als bei proteincodierenden Genen. Ein Verlust von Transposon-Methylierungen könnte weitreichende Folgen haben, indem Transposon-Aktivierungen mit zuweilen mutagenen Konsequenzen induziert werden (Kato et al. 2003, Miura et al. 2001, Singer et al. 2001). Da der Anteil differenziell methylierter Transposons im Vergleich mit den anderen untersuchten Gruppen jedoch eher gering ist, kann der Einfluss von Transposons bei der Tumorentwicklung vernachlässigt werden.

Im Hinblick auf die Methylierungsstabilität stimmen diese Beobachtungen mit Studien zur Methylierung in unterschiedlichen *Arabidopsis*-Ökotypen überein (Vaughn et al. 2007). Diese zeigten, dass nur rund 6% aller Transposons in Columbia-0 eine differenzielle Methylierung gegenüber dem Ökotyp Landsberg erecta aufweisen. In proteincodierenden Genen hingegen unterscheiden sich 45% aller methylierten Regionen zwischen den beiden Ökotypen. Es wird vermutet, dass die höhere Stabilität der Transposon-Methylierung mit den unterschiedlichen Mechanismen zur Aufrechterhaltung von Methylierungen während der Replikation zusammenhängt. Da Transposons in wesentlich stärkerem Maße von Nicht-CG-Methylierungen betroffen sind (Zhang u. a. 2006, Abbildung 1.6 B), sinkt in diesem Gentyt auch die Wahrscheinlichkeit epigenetischer Variation. Dies hängt damit zusammen, dass wie bereits erwähnt bei einem Verlust von Methylierungen an Nicht-CG-Motiven eine Remethylierung erfolgen kann. Eine Voraussetzung hierfür ist die Produktion von siRNAs, die gegen die betroffene Region gerichtet sind, da diese *de novo* Methylierungen induzieren können. CG-Sequenzen können zwar auch remethyliert werden, allerdings nur wenn in der betroffenen Region auch RNA-abhängigen Nicht-CG-Methylierungen auftreten (Teixeira et al. 2009). Im *gene body* proteincodierender Gene überwiegen MET1-abhängige CG-Methylierungen (Cokus u. a. 2008, Abbildung 1.6 A). Für die Aufrechterhaltung von CG-Methylierungen spielen RNA-abhängige Mechanismen nur eine untergeordnete Rolle, da an CG-Motiven bei der Replikation die Tochterstränge entsprechend des Musters der Elternstränge MET1-abhängig methyliert werden. Ein Fehlen von RNA-abhängiger Methylierung macht CG-Methylierungen jedoch auch anfälliger für zufällige Methylierungsveränderungen. Der Grund hierfür ist, dass kein Kontrollmechanismus existiert, welcher nach der DNA-Replikation in der Lage wäre, Fehler in der DNA-Methylierung zu korrigieren (Vaillant & Paszkowski 2007). Die Befunde zu den

Methylierungsänderungen in pflanzlichen Tumoren bestätigen somit frühere Studien im Hinblick auf die wesentlich höhere Stabilität der Methylierung von Transposons im Vergleich mit proteincodierenden Genen.

4.2.3 DNA-Methylierungen korrelieren mit der Genexpression

Transkriptionsfaktoren sind wichtige Regulatoren der Genexpression und diverse Transkriptionsfaktor-Familien werden auch durch eine *Agrobacterium*-Infektion induziert (Ditt *et al.* 2006). Da schon die veränderte Expression weniger Transkriptionsfaktoren einen merklichen Einfluss auf die Gesamtexpression haben kann (Mitsuda & Ohme-Takagi 2009), tragen diese sicherlich zur Etablierung des Tumor-Transkriptoms bei.

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Genexpression stellen DNA-Methylierungen dar. Die Bedeutung von Methylierungen für das Genexpressionsmuster lässt sich durch einen Vergleich mit Transkriptomdaten abschätzen. Im Einklang mit den ersten genomweiten Studien zur Methylierung in *Arabidopsis* (Zhang *et al.* 2006) wurde auch in dieser Arbeit eine negative Korrelation der beiden Prozesse für den Promoterbereich von proteincodierenden Genen festgestellt, während diese im *gene body* positiv war. Der negative Einfluss von Promotor-Methylierungen auf die Transkription ist gut untersucht und basiert auf einer Hinderung der Transkriptionsfaktor-Bindung. Diese kann durch sterische Hinderung, eine engere DNA-Bindung um die Histone oder eine veränderte Nukleosomen-Positionierung erfolgen (Chodavarapu *et al.* 2010, Lee *et al.* 2010, Segal *et al.* 2006). In seltenen Fällen können DNA-Methylierungen im Promotor-Bereich auch zur transkriptionellen Aktivierung führen, wenn diese innerhalb oder in der Nähe von negativen *cis*-Elementen stattfinden (Shibuya *et al.* 2009). Die Funktion von *gene body*-Methylierungen wird wesentlich kontroverser diskutiert als dies bei Promoter-Methylierungen der Fall ist. Einerseits ist das Expressionsniveau von Genen deutlich erhöht, wenn diese innerhalb des Gens methyliert sind (Zhang *et al.* 2006). Daher wird dieser Form der Methylierung im Allgemeinen ein positiver Effekt auf die Transkription zugeschrieben, was mit den Beobachtungen zur *gene body*-Methylierung in Tumoren übereinstimmt (siehe 3.3.2). Andererseits postulieren Zilberman *et al.*, dass *gene body*-Methylierungen die transkriptionelle Elongation beeinträchtigen (Zilberman *et al.* 2007). Grundlage dieser Annahme ist das erhöhte Expressionsniveau vieler Gene in MET1-Verlustmutanten. Da *gene body*-Methylierungen fast ausschließlich durch das MET1-Enzym katalysiert werden, nehmen die Autoren an, dass die erhöhte Expression in der

Mutante auf den Verlust von CG-Methylierungen zurückzuführen ist. Jedoch wird in den Mutanten nicht nur die Expression methylierter, sondern auch unmethylierter Gene induziert. Dies lässt Zweifel daran aufkommen, dass die Induktion der Genexpression unmittelbar durch den Verlust von DNA-Methylierungen ausgelöst wird. Zudem widersprechen diese Ergebnisse der Studie von Zhang et al., in der es bei *gene body*-methylierten Genen in MET1-Verlustmutanten nicht zu einer genomweiten transkriptionellen Aktivierung kommt (Zhang et al. 2006). Weil insbesondere transkribierte Gene innerhalb des Gens stark methyliert sind wird davon ausgegangen, dass diese Form der Methylierung eine Konsequenz konstitutiver Transkription darstellt (Saze & Kakutani 2011). Da präferenziell Exons methyliert werden und nukleosomale DNA stark methyliert ist, wird *gene body*-Methylierungen auch eine Rolle bei der Exon-Definition zugeschrieben (Chodavarapu et al. 2010). Auch eine Kombination von CG- und CHG-Methylierungen kann sehr unterschiedliche Effekte auf die Transkription proteincodierender Gene haben. Während einige Gene reprimiert werden, wenn sie im *gene body* zusätzlich CHG-Methylierungen akkumulieren, sind andere Gene unverändert oder sogar stärker exprimiert (Miura et al. 2009).

Es ist davon auszugehen, dass DNA-Methylierungen sich nicht in jedem Fall direkt auf die Transkription auswirken. So existieren beispielsweise in Bezug auf den Heterosis-Effekt durch die Kreuzung der beiden *Arabidopsis*-Ökotypen C24 und Landsberg erecta zwar sowohl Methylierungs- als auch Transkriptionsunterschiede in der Filialgeneration. Trotz der ausgeprägten Leistungsfähigkeit der Hybriden, welche unter anderem auf die Methylierungsveränderungen zurückgeführt wird, ist in keinem der 77 transkriptionell reprimierten Gene eine Korrelation mit Methylierungsveränderungen festzustellen (Shen et al. 2012). Bereits die differenzielle Methylierung weniger Gene wäre ausreichend, um einen fundamentalen Effekt auf die Transkription auszuüben, wenn es sich bei den betroffenen Genen beispielsweise um Transkriptionsfaktoren handelt (Lee et al. 2005, Tohge et al. 2005). Daneben könnte differenzielle Methylierung auch durch eine Aktivierung der siRNA- tasiRNA- oder microRNA-Produktion mittels post-transkriptioneller Hemmung der Genexpression zu Veränderungen der Genexpression beitragen (Chen et al. 2011, Yoshikawa et al. 2005). Dies könnte auch erklären, warum in dieser Arbeit trotz großer Methylierungs- und Transkriptionsunterschiede zwischen Tumor- und Sprossgewebe bei lediglich zwölf Loci an der TSS und der TES Korrelationen mit der Genexpression festgestellt wurden.

Im Wurzelhalsgallen-Genom sprechen sowohl die Positionen der Methylierungsänderungen als auch die davon betroffenen Motive dafür, dass die transkriptionelle Aktivität von proteincodierenden Genen beeinflusst ist. Sowohl Promotor-Hypomethylierung als auch Hypermethylierungen im *gene body* mit einem erhöhten Anteil methylierter CHG-Motive könnten einen positiven Effekt auf die Transkription im Pflanzentumor haben.

4.2.4 DNA-Methylierungsänderungen betreffen Tumor-relevante Prozesse

Die Korrelationen zwischen Methylierung und Transkription legen nahe, dass differenzielle Methylierungen einen profunden Einfluss auf Prozesse in der Tumorentwicklung haben können. Im Einklang mit dieser Idee zeigte die funktionelle Kategorisierung differenziell methylierter Gene, dass dabei insbesondere Vorgänge wie Entwicklung, Zellteilung, Signalübertragung und biotischer Stress betroffen sind.

Veränderte DNA-Methylierungen betreffen in hohem Maße Entwicklungsgene, welche ihrerseits auf die Transkription einer Vielzahl verschiedener Gene einwirken können. Hierzu gehören transkriptionelle Regulatoren wie der FCA-Faktor (*flowering time control locus A*). Dieser Transkriptionsfaktor fördert die DNA-Methylierungen einer Reihe verschiedener DNA-Loci (Bäurle *et al.* 2007) und spielt eine Rolle bei der 3'-RNA-Prozessierung sowie der transkriptionellen Termination (Sonmez *et al.* 2011). Auch das Gen des Elf8-Proteins, welches an Histon-Modifikationen beteiligt ist (Oh *et al.* 2004), liegt im Tumor verändert methyliert vor. Aus der Gruppe der NAC-Domänen-Transkriptionsfaktoren, welche zu der größten Gruppe pflanzlicher Transkriptionsfaktoren zählt (Olsen *et al.* 2005), sind sieben Gene im Hinblick auf ihr Methylierungsmuster im Tumor verändert (siehe 8.4). Diese sind an Prozessen wie der Bildung des Spross-Apikalmeristems (Aida *et al.* 1997) oder der Epidermis-Differenzierung (ANAC13) beteiligt (Bruex *et al.* 2012). Zusätzlich besitzen NAC-Domänen-Proteine eine essenzielle Funktion in der Bildung von Leitbündeln (Kubo *et al.* 2005, Yamaguchi *et al.* 2008). Es wäre denkbar, dass diese Transkriptionsfaktoren auf das Tumorstadium einwirken, indem sie essenzielle Prozesse wie die Leitbündelbildung steuern und somit die Versorgung des Tumors mit Wasser und Nährstoffen sicherstellen.

In Wurzelhalsgallen wurde gegenüber dem Referenzgewebe eine erhöhte Zellteilungsrate detektiert. Der Prozess der Zellteilung könnte durch die differenzielle Methylierung eines Kinesin-Motorproteins (At1g63640) beeinflusst werden, indem es durch reduzierte

Promotor-Methylierung und eine erhöhte Expression zur Cytoskelett-Organisation beiträgt. Ähnliches gilt für das APC6-Protein, welches neben der Zellzyklusregulation auch die bereits erwähnte Leitbündelbildung und -differenzierung beeinflusst (Marrocco *et al.* 2009) und dessen Expression ebenfalls mit der DNA-Methylierung korreliert. Die in ihrer Methylierung veränderten Cycline (*CYCT1;2*, *CYCB2*) regulieren Cyclin-abhängige Kinasen, welche für das Fortschreiten des eukaryotischen Zellzyklus essenziell sind (Wang *et al.* 2004) und somit möglicherweise auch zu der erhöhten Zellteilungsrate im Tumor beitragen.

Methylierungsveränderungen in Cytochrom P450-Genen könnten die Umstellung des Tumor-Stoffwechsels in Richtung eines heterotrophen, importabhängigen und eher anaeroben Metabolismus bewirken. Bekanntermaßen führen hypoxische Bedingungen zu einer Induktion von Cytochrom P450-Genen (Mustroph *et al.* 2010). Speziell die Glykolyse und Ethanol-Fermentation sind im Tumor erhöht (Deeken *et al.* 2006). Hierfür wird NADP benötigt, welches beispielsweise durch Monooxygenierungsprozesse von Cytochrom P450 bereitgestellt werden könnte.

Bezogen auf Gene der Kategorie Signalübertragung sind beispielsweise Stress-induzierbare Proteinkinasen wie CRK32 (At4g11480, Wrzaczek *et al.* 2010) differenziell methyliert. Möglicherweise trägt die transkriptionelle Aktivierung von Stress-assoziierten Genen unmittelbar zur Limitierung des Tumorwachstums bei. In der Kategorie „biotischer Stress“ sind Defensin-ähnliche Gene sowie Gene der NBS-LRR-Klasse (*nucleotide binding site leucine rich repeat*) besonders stark von differenzieller Methylierung betroffen (siehe 8.4). NBS-LRR-Proteine stellen neben transmembranen PRR-Proteinen (*pattern recognition receptors*) einen wesentlichen Teil der pflanzlichen Immunabwehr dar, indem sie Pathogen-Effektoren binden und Abwehrreaktionen auslösen können (Jones & Dangl 2006). Defensin-ähnliche Proteine bilden mit über 300 Mitgliedern eine weitere große Gruppe pflanzlicher Abwehrgene (Silverstein *et al.* 2005). Sie codieren für Peptide, welche beispielsweise antifungale (Gao *et al.* 2000), antibakterielle (Segura *et al.* 1998) oder insektizide (Chen *et al.* 2002) Wirkung besitzen und damit ein breites Spektrum pflanzlicher Abwehrreaktionen abdecken. Verglichen mit einer *Pseudomonas*-Infektion, bei der Methylierungsunterschiede vorwiegend in der Gruppe der pflanzlichen Abwehrgene auftreten (Downen *et al.* 2012), sind Gene für pflanzliche Abwehrreaktionen in Wurzelhalsgallen-Tumoren jedoch in wesentlich geringerem Maße von differenzieller Methylierung betroffen.

4.2.5 Der Effekt von Methylierungsunterschieden auf die Tumorentwicklung ist abhängig vom Differenzierungsgrad des betroffenen Gewebes

Ein Verlust von Genen mit Methylierungsfunktion hat erhebliche Auswirkungen auf das Wachstum von Wurzelhalsgallen. Sowohl die *ddc*- als auch die *ago4*-Mutante, welche beide in erster Linie bei der Methylierung von Nicht-CG-Motiven beeinträchtigt sind, bilden signifikant größere Tumore als die entsprechenden Wildtyp-Referenzpflanzen. Dies ist vermutlich nicht auf eine erhöhte Transformationseffizienz zurückzuführen, da zwei verschiedene DRM2-RNAi-Linien keine erhöhte Transformationseffizienz aufweisen (Crane & Gelvin 2007). Es spricht hingegen dafür, dass Tumorwachstumsprozesse zu einem großen Teil von CHG- und CHH-Methylierungen beeinflusst werden. In Übereinstimmung mit dieser Feststellung waren diese Motive entsprechend deutlich häufiger von Methylierungsänderungen betroffen als CG-Motive (Abbildung 3.10).

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch CG-Methylierungen eine Rolle bei der Tumorgenese spielen. Diese Annahme konnte jedoch nicht überprüft werden, da sich die homozygoten Mutanten aufgrund der hohen embryonalen Letalität und der pleiotropen Phänotypen (siehe 3.4) nicht für Tumorwachstumsexperimente eignen. Derartige Analysen wären lediglich mit anderen *met1*-Mutanten möglich, in welchen die CG-Methylierung nur partiell reduziert ist. Pflanzen mit *met1-1*- und *met1-2*-Allelen beispielsweise weisen nur 50-75% der Wildtyp-CG-Methylierung auf, da die katalytischen MET1-Domänen dort durch Punktmutationen von nicht konservierten Aminosäuren in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (Tariq & Paszkowski 2004). Bis auf eine verzögerte Blühinduktion sind bei diesen Pflanzen im Gegensatz zu *met1-3*-Mutanten keine schwerwiegenden Entwicklungsdefekte zu beobachten (Kankel *et al.* 2003). Aufgrund der nur partiellen und eher zufälligen Reduktion der Methylierung sind aber auch diese Pflanzen nicht optimal für vergleichbare Tumorwachstumsstudien geeignet wie jene, die für *ddc* und *ago4* durchgeführt wurden. Verschiedene MET1-RNAi-Linien wurden allerdings in einer Studie von Crane & Gelvin anhand von Wurzelfragmenten auf ihre Transformationseffizienz getestet (Crane & Gelvin 2007). Die verwendeten Linien zeigten dort jedoch sowohl in Abhängigkeit von der verwendeten Methode als auch von der Linie selbst sehr unterschiedliche Resultate. In einigen Fällen wurde eine erniedrigte Transformationseffizienz festgestellt, zum Großteil war diese jedoch unverändert oder leicht erhöht. Diese Varianz führen die Autoren auf eine unvollständige und

unterschiedlich starke Transkriptionshemmung von MET1 zurück. Ausgehend von der Annahme, dass CG-Methylierungen eine eher untergeordnete Rolle während der Tumorentwicklung spielen, wären jedoch auch keine großen Unterschiede in der Transformationseffizienz zu erwarten.

Dagegen resultiert das Fehlen der Methyltransferasen DRM1, DRM2 und CMT3 in deutlich erhöhtem Tumorwachstum. Im Hinblick auf die Transformationseffizienz (beispielsweise durch die Bestimmung der Anzahl von transformierten *Arabidopsis*-Wurzelfragmenten) hat eine durch RNAi erniedrigte Expression von DRM2 jedoch keinen Einfluss (Crane & Gelvin 2007). Da sowohl die *ago4*- als auch die *ddc*-Mutante größere Tumore als ihre Wildtyp-Referenzen bilden ist davon auszugehen, dass Hypomethylierungen einen wachstumsfördernden Effekt ausüben. In pflanzlichen Zellkulturen beispielsweise ähnelt das DNA-Methylierungsmuster dem in *Agrobacterium*-induzierten Tumoren. Dort kann im Euchromatin eine Hypermethylierung beobachtet werden, während proteincodierende Gene in Wurzelhalsgallen ebenfalls hypermethyliert sind. Transposons sind in Suspensionskulturen tendenziell hypomethyliert (Tanurdzic *et al.* 2008). Letzteres ist in Wurzelhalsgallen zwar nicht festzustellen, aber die Hypo- und Hypermethylierungen sind im Gegensatz zu den anderen Genkategorien gleichmäßig verteilt (Abbildung 3.7).

Im Einklang mit dem verstärkten Wachstum von Wurzelhalsgallen nach Infektion der hypomethylierten *ddc*- und *ago4*-Mutanten ist auch die Kallus-Induktion in der Methyltransferase-KO-Mutante CMT3 gegenüber dem Wildtyp erhöht (Berdasco *et al.* 2008). Daneben führen chemisch induzierte Hypomethylierungen mit dem Cytidin-Analogen 5-Azacytidin, einem Methyltransferase-Inhibitor, zu verstärkter Kallusbildung. Eine Behandlung von Blatt-Explantaten aus Mais mit dieser Substanz resultiert neben einer Erniedrigung des Methylierungsniveaus in einer erhöhten Fähigkeit der Kallusbildung. Diese Kalli wachsen zudem stärker als unbehandelte Kontrollen (Brown *et al.* 1989). In dieser Studie kann ebenfalls ein erniedrigter Grad an DNA-Methylierung mit einem stärkeren Wachstum in Verbindung gebracht werden. Möglicherweise ist eine globale Genom-Hypomethylierung somit ein Kennzeichen beschleunigter Wachstumsprozesse. Erhöhte Wachstums- und Differenzierungs-Prozesse stehen unter dem Einfluss von NAC-Domänen- und Zellzyklus-Proteinen welche im *Arabidopsis*-Tumor differenziell methyliert vorliegen.

In Bezug auf vollständig entwickelte Pflanzen scheinen Hypomethylierungen jedoch den entgegengesetzten Effekt auf das Wachstum zu haben, wenn man den sogenannten Heterosis-Effekt betrachtet, der die besonders ausgeprägte Leistungsfähigkeit von Hybriden bezeichnet. F1-Hybriden der beiden *Arabidopsis*-Ökotypen Ler und C24 beispielsweise weisen ein höheres Frischgewicht, eine erhöhte Blattanzahl und längere Wurzeln gegenüber der Parentalgeneration auf (Groszmann *et al.* 2011). Interessanterweise ist das Genom der leistungsfähigeren Hybriden dabei etwa 20% stärker methyliert als das der Elternpflanzen (Shen *et al.* 2012). Der Großteil der verstärkt methylierten Regionen (97%) ist dabei auch das Ziel von siRNAs. Genomweite Hypermethylierungen tragen demnach über RNA-abhängige Methylierungswege zur Heterosis bei. Bezogen auf Heterosis wird hauptsächlich eine veränderte Expression von Genen der circadianen Rhythmik für die wachstumsfördernden Effekte verantwortlich gemacht (Ni *et al.* 2009). Ein hemmender Effekt von Hypomethylierungen auf das Pflanzenwachstum ist auch in einer Methyltransferase-Mutante aus Reis zu beobachten. Auch Methyltransferase-Mutanten in *Arabidopsis* weisen ein reduziertes Wachstum auf. So sind *met1*-Verlustmutanten wesentlich kleiner als Wildtyp-Pflanzen (Mathieu *et al.* 2007) und auch *ddc*-Mutanten weisen im ursprünglichen Ler-Hintergrund Wachstumsdefekte auf (Chan *et al.* 2006). Somit ist zu vermuten, dass der Effekt von differenziellen Methylierungen auf Wachstumsprozesse in hohem Maße vom Differenzierungsgrad des betroffenen Gewebes abhängig ist. Während Hypermethylierungen in weniger stark differenziertem Gewebe einen wachstumshemmenden Effekt besitzen, ist in vollständig entwickelten Pflanzen eine Wachstumsförderung zu beobachten. Es ist daher denkbar, dass die Hypermethylierung des Wurzelhalsgallen-Genoms einen Mechanismus darstellt um durch eine Begrenzung des Tumorwachstums die langfristige Koexistenz von Tumor und Pflanze zu gewährleisten. Zudem sind Hypermethylierungen im *gene body*, wie sie in Wurzelhalsgallen detektiert wurden, möglicherweise ein generelles Kennzeichen von Dedifferenzierung, da besonders an nicht-CG-Motiven im *gene body* auch zwischen humanen embryonalen Stammzellen und Fibroblasten vergleichbare Methylierungsunterschiede auftreten (Lister *et al.* 2009).

4.3 DNA-Methylierungen beeinflussen physiologische Prozesse im Wurzelhalsgallentumor in Abhängigkeit von ABA

Über interne Signale, welche die beschriebenen Methylierungsveränderungen und die damit einhergehenden transkriptionellen Veränderungen während der Entwicklung pflanzlicher Tumore hervorrufen könnten ist wenig bekannt. Einen essenziellen Prozess für die Tumorentwicklung stellt die ABA-abhängige Trockenstressanpassung dar (Efetova *et al.* 2007). In jüngster Zeit wird eine mögliche Funktion ABA-abhängiger Signalwege in der Regulation epigenetischer Prozesse als Antwort auf biotischen und abiotischen Stress diskutiert (Chinnusamy & Zhu 2009). Beispielsweise wird das Erbsen-Genom als Antwort auf Wassermangel hypermethyliert (Labra *et al.* 2002). Die ABA-Behandlung von *Arabidopsis*-Samen während der Keimung induziert sowohl die Methylierung als auch die Expressions-Hemmung von Genen, welche im Tumor methyliert und transkriptionell herunterreguliert werden. Diese Beobachtung zeigt, dass das ABA-Niveau positiv mit DNA-Methylierungen korreliert und ABA-abhängige Signalwege möglicherweise in der Lage sind auf Methylierungsprozesse einzuwirken. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Studie von Khraiwesh *et al.* in der demonstriert werden konnte, dass die Expression von Stress-Genen in *Physcomitrella patens* methylierungsabhängig durch ABA reguliert wird (Khraiwesh *et al.* 2010).

Die ABA-Konzentration ist in Tumoren deutlich erhöht. Gleichzeitig sind Photosynthese-Gene dort stark transkriptionell gehemmt (Deeken *et al.* 2006). Es ist bekannt, dass ABA an der Hemmung von photosynthetischen Prozessen beteiligt ist (Leonhardt *et al.* 2004, Weatherwax *et al.* 1996). Die Funktionen der in dieser Arbeit untersuchten Gene NDF4, SIG5 und F12A4.4 sind alle auf chloroplastidäre Prozesse beschränkt. Es ist somit durchaus denkbar, dass die transkriptionelle Regulation der Photosynthese nicht nur im Tumor, sondern auch in der Pflanze selbst einem ABA-abhängigen epigenetischen Regulationsmechanismus durch DNA-Methylierungen unterliegt. Khraiwesh *et al.* konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass microRNAs für die Induktion der DNA-Methylierung verantwortlich sind. In ähnlicher Weise könnten die Methylierungen im Tumor und im Keimling durch siRNAs reguliert werden, da alle drei methylierten Regionen in Col-0-Pflanzen auch gleichzeitig Ziel von siRNAs sind (Lister *et al.* 2008). Zudem sind in allen Fällen hauptsächlich Nicht-CG-Motive von Methylierungsänderungen betroffen, was ebenfalls für eine Regulation durch RNA-abhängige Methylierungswege spricht.

Die Veränderungen im ABA-Level können jedoch wohl nur für einen Teil aller Methylierungsveränderungen verantwortlich gemacht werden. Möglicherweise spielen auch die erhöhten Cytokinin- und Auxin-Konzentrationen eine Rolle im Hinblick auf DNA-Methylierungswege. So konnte anhand von Karotten-Zellkulturen gezeigt werden, dass die beiden Phytohormone antagonistisch auf den Grad der DNA-Methylierung einwirken (Arnholdt-Schmitt *et al.* 1991, LoSchiavo *et al.* 1989). Während sich das DNA-Methylierungsniveau durch eine Behandlung mit Kinetin (einem Cytokinin) erniedrigt, erhöht es sich nach Behandlung mit dem synthetischen Auxin 2,4-D. Sollten Auxin und Cytokinin auch in *Agrobacterium*-induzierten Tumoren derart antagonistisch wirken, so könnte das Verhältnis der beiden Phytohormone eine entscheidende Rolle im Hinblick auf das Methylierungsmuster in Wurzelhalsgallen spielen. Es ist davon auszugehen, dass dort die Auxin-Produktion gegenüber der Cytokinin-Synthese überwiegt, da an den für die Bestimmung des Methylierungsmusters verwendeten *Agrobacterium*-induzierten *Arabidopsis*-Tumoren eher Wurzel- als Sprossbildung zu beobachten war (vergleiche 1.1.2, Akiyoshi *et al.* 1983). Wenn die im Tumor im Vergleich zu Cytokininen in erhöhter Konzentration vorliegenden Auxine in Wurzelgallen also ähnliche Funktionen übernehmen, wie es in den Studien von Arnholdt-Schmitt *et al.* und LoSchiavo *et al.* beschrieben wurde, könnte neben ABA auch Auxin zur Hypermethylierung des pflanzlichen Tumors beitragen.

4.4 Epigenetische Veränderungen unterscheiden sich in pflanzlichen und tierischen Tumoren

Epigenetische Veränderungen in humanen Tumoren sind sowohl durch globale Hypomethylierungen als auch durch lokale, aberrante Promotor-Hypermethylierungen gekennzeichnet (Ehrlich 2009, Herman & Baylin 2003). Hypomethylierungen beeinflussen in hohem Maße die Tumorentwicklung bei Mammaliern, vermutlich indem sie durch die Aktivierung von Transposons und endogenen Retroviren die karyotypische Instabilität fördern (Ehrlich 2002). Obwohl Transposons in den transkribierten Bereichen des Wurzelhalsgallengenom eher hypomethyliert waren, hat dies wahrscheinlich keinen nennenswerten Einfluss auf deren Mobilisierung, da der Anteil differenziell methylierter Transposons sehr gering ist gegenüber proteincodierenden Genen. Eine größere Auswirkung hat die differenzielle Methylierung proteincodierender Gene. Im Gegensatz zu den meisten tierischen Tumoren sind diese im Promotorbereich und im 5'-Bereich des *gene body* von Pflanzentumoren hypomethyliert, während sie im 3'-Bereich

Hypermethylierungen aufweisen. Normalerweise sind Transkriptions-Start und -Ende nur wenig von DNA-Methylierungen betroffen (siehe 1.4.4). Umso erstaunlicher ist es, dass ein verhältnismäßig hoher Anteil der Methylierungsveränderungen im Genom des pflanzlichen Tumors an proteincodierenden Genen in der Nähe der TSS stattfinden. Besonders in diesem Bereich, aber auch im *gene body* können diese Veränderungen einen erheblichen Einfluss auf die Transkription haben.

Weiterhin gibt es bei tierischen Tumoren Hinweise, dass Demethylierungen das Genom empfänglich für eine Heterochromatin-Dekondensierung machen, welche wiederum die Rekombination zwischen sich wiederholenden DNA-Sequenzen fördert. Hypomethylierungen können so zur Chromosomen-Rekombination führen, ein Verlust des Methyltransferase-Gens *Dnmt1* beispielsweise hat in embryonalen Stammzellen von Mäusen eine verstärkte Rekombination und damit auch eine erhöhte Mutationsrate zur Folge (Chen *et al.* 1998). In *Agrobacterium*-induzierten *Arabidopsis*-Tumoren ist es eher unwahrscheinlich, dass das Tumorwachstum durch derartige Prozesse gefördert wird, da das Genom insgesamt tendenziell hypermethyliert ist.

In humanen Tumoren werden häufig auch chromosomale Aberrationen beobachtet, bei denen es sich meist um Formen der Aneuploidie handelt. Neben Veränderungen in der Chromosomenzahl treten dort auch in hohem Maße Amplifikationen, Deletionen und nicht-reziproke Translokationen auf (Storchova & Pellman 2004). Ploidieänderungen, welche durch DNA-Replikationen ohne anschließende Zellteilung (Endoreduplikation) hervorgerufen werden, können ebenfalls häufig beobachtet werden. Beispielsweise haben Epitheltumore häufig ein triploides oder tetraploides Genom (Haas 2002). Es wäre daher denkbar, dass auch Ploidieänderungen im *Arabidopsis*-Genom die DNA-Methylierung und Tumorbildung beeinflussen. Analysen zum Ploidiegrad von *Agrobacterium*-induzierten *Arabidopsis*-Tumoren zeigten jedoch, dass die Entwicklung von Wurzelhalsgallen nicht mit Änderungen des Ploidiegrades einhergeht (siehe 3.2.5). Der Anteil von Zellen mit erhöhten Ploidiegraden war im Tumor vergleichbar hoch wie im Sprossgewebe und der Zyklus-Wert deutet somit nicht auf eine erhöhte Endoreduplikationsrate hin. Auch auf die in Humantumoren häufig auftretende Aneuploidie gab es auf Basis der Histogramm-Peaks keine Hinweise. Wurzelhalsgallen scheinen somit in Bezug auf den Ploidiegrad außerordentlich stabil zu sein. Dies spiegelt in gewisser Weise die Entstehungsmechanismen der verschiedenen Tumore wieder. Die Karzinogenese tierischer Tumore wird in der Regel durch Mutationen in Genen ausgelöst, welche an Zellzyklus,

Apoptose oder DNA-Reparatur beteiligt sind (Sarasin 2003). Entsprechend fördern chromosomale Aberrationen im tierischen Genom die Tumorentwicklung, da sich dadurch das Risiko einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder einer Aktivierung von Onkogenen weiter erhöht (Albertson *et al.* 2003). Derartige Veränderungen könnten potenziell auch in T-DNA-transformierten Pflanzenzellen das Tumorstadium fördern. Diese sind aber nicht zwingend notwendig für das Fortschreiten der Tumorentstehung, da hierfür bereits die Integration und Expression der bakteriellen Onkogene ausreichend ist. Es ist bekannt, dass Veränderungen im Ploidiegrad in Pflanzen die Ursache von differenzieller Methylierung sein können. So kommt es während einer frühen Phase der Allopolyploidie von Weizen zu umfangreichen epigenetischen Umbildungen (Zhao *et al.* 2011). Auch in *Arabidopsis* kann eine Polyploidisierung zu einer vererbaren Inaktivierung von Genen durch DNA-Methylierungen führen (Scheid *et al.* 2003). Angesichts der recht stabilen Ploidiegrade im pflanzlichen Tumor sind solche Veränderungen jedoch als Ursache für das veränderte Methylierungsmuster im Wurzelhalsgallen-Genom auszuschließen.

Das 4C/2C-Verhältnis war in pflanzlichen Tumoren nur halb so hoch wie im Sprossgewebe. Die Zellteilungsrate des Tumors war somit gegenüber dem Sprossgewebe deutlich erhöht. Dies erklärt das deutlich schnellere Wachstum des Tumors gegenüber Sprossgewebe. Letzteres nimmt an der Basis lediglich durch Kambium-basierte Bildung von sekundärem Leitgewebe im Durchmesser zu (Steeves & Sussex 1989). Im Vergleich mit den meisten tierischen Tumoren sind Wurzelhalsgallen somit stärker durch lokale Methylierungsveränderungen proteincodierender Gene geprägt, welche vermutlich die Zellteilungsrate des Tumors beeinflussen, wohingegen Transposon-Mobilisierung und karyotypische Instabilität eine eher geringe Rolle spielen.

5. Zusammenfassung

Agrobacterium tumefaciens ist ein pathogenes Bodenbakterium, welches nach Integration seiner T-DNA in das pflanzliche Genom die Bildung von tumorartigen Wucherungen, den sogenannten Wurzelhalsgallen, an einer Reihe unterschiedlicher Wirtspflanzen verursacht. Die Expression der T-DNA-codierten Onkogene resultiert in der Proliferation und Differenzierung der sogenannten Wurzelhalsgallen, einem Prozess, welcher mit weitreichenden transkriptionellen und physiologischen Veränderungen verbunden ist. Für DNA-Methylierungen ist bekannt, dass diese zu Genexpressionsveränderungen beitragen, welche neoplastisches Wachstum in Säugetieren begünstigen. Über die Funktion epigenetischer Prozesse für die Physiologie und Entwicklung pflanzlicher Tumore ist bisher hingegen wenig bekannt.

Daher wurde in dieser Arbeit das Methylierungsmuster von Wurzelhalsgallen, welche an *Arabidopsis thaliana* induziert wurden, sowohl genomweit als auch auf Basis einzelner Gene bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Onkogene *ipt*, *iaaH* und *iaaM* welche mit der T-DNA ins Genom integriert werden und die Proliferation auslösen, im Tumorgewebe unmethyliert vorliegen. Dennoch sind die Onkogene empfänglich gegenüber epigenetischen Modifikationen, da die siRNA-vermittelte Methylierung sowohl ihre Transkription als auch das Tumorwachstum unterbindet. Eine genomweite Studie der DNA-Methylierungsmuster mittels Tiling-Array-Analysen von immunopräzipitierter methylierter DNA zeigte ein global hypermethyliertes Tumor-Genom im Vergleich zum tumorfreien Sprossgewebe. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Methylierungsmustern der meisten Säuger-Tumore, welche typischerweise mit globaler Hypomethylierung und lokaler Hypermethylierung von Promotor-Sequenzen assoziiert sind. Im Unterschied dazu waren die Promoter-Sequenzen im Pflanzentumor eher hypomethyliert.

Die Methylierungsunterschiede zwischen Wurzelhalsgallen und Sprossgewebe korrelierten mit transkriptionellen Veränderungen. Speziell Gene, welche in Entwicklungsprozessen und Zellteilung involviert sind, waren von Methylierungsänderungen betroffen. Dies impliziert, dass insbesondere diese Prozesse epigenetisch kontrolliert werden. Die Methylierung von Genen, welche einer transkriptionellen Kontrolle durch ABA unterliegen, war durch eine ABA-Behandlung induzierbar. DNA-Methylierungen kontrollieren somit

wahrscheinlich essenzielle physiologische Prozesse während der Tumorentwicklung wie beispielsweise die ABA-vermittelte Trockenstressanpassung.

Arabidopsis-Mutanten, welche in Nicht-CG-Methylierungsprozessen beeinträchtigt sind, entwickelten größere Tumore als die Kontrollpflanzen der entsprechenden Wildtypen. Dies weist auf eine Inhibierung des Tumor-Wachstums durch ein hypermethyliertes Genom, insbesondere der Nicht-CG-Motive hin. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Genexpression, physiologische Prozesse und die Entwicklung pflanzlicher Tumore einer Regulation durch DNA-Methylierung unterliegen.

6. Summary

Agrobacterium tumefaciens is a plant pathogen which causes formation of crown gall tumors on a wide range of host species as a result of integration of its T-DNA into the plant genome. Expression of the T-DNA encoded oncogenes triggers proliferation and differentiation of crown galls, a process which is associated with severe global gene expression and physiological changes. DNA methylation changes are known to contribute to transcriptional changes which facilitate neoplastic growth in mammals. However, the role of epigenetic processes in physiology and development of plant tumors is not yet understood.

Therefore, in this study the methylation pattern of *Arabidopsis* crown galls was analyzed on a genome-wide and single gene level. The proliferation-provoking oncogenes *ipt*, *iaaH* and *iaaM*, which are integrated into the plant genome along with the T-DNA, were shown to be unmethylated in the tumor genome. Nevertheless, they are susceptible to epigenetic modifications as siRNA-mediated methylation prevented both oncogene transcription and subsequent tumor development. The genome-wide analysis of DNA methylation by methylcytosine immunoprecipitation and tiling arrays revealed a globally hypermethylated tumor genome compared to that of the tumor-free stems. This contrasts the methylation patterns in most mammalian cancers, which are typically associated with global hypomethylation and local hypermethylation of gene promoters. In crown gall tumors, promoters were rather hypomethylated.

Methylation differences of crown galls and stem tissue correlated well with transcriptional changes. Especially genes involved in development and cell division were differentially methylated, implying that these processes are epigenetically controlled in the tumor. Methylation of genes which are known to be transcriptionally inhibited in an ABA-dependent manner was inducible upon ABA treatment. This suggests that DNA methylation controls essential physiological processes during crown gall development, such as ABA-mediated drought stress adaptation.

Arabidopsis mutants impaired in non-CG methylation developed larger tumors than wild-type controls, which indicates that hypermethylation of non-CG motifs inhibits plant tumor growth. In summary, the results of this study provide evidence that gene expression, physiological processes and the development of plant tumors are regulated by DNA methylation.

7. Literaturverzeichnis

- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H & Tasaka M** (1997): Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis: An Analysis of the Cup-Shaped Cotyledon Mutant. *Plant Cell* 9: 841–857.
- Akiyoshi DE, Morris R, Hinz R, Mischke B, Kosuge T, Garfinkel D, Gordon MP & Nester E** (1983): Cytokinin/Auxin Balance in Crown Gall Tumors Is Regulated by Specific Loci in the T-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 407–411.
- Albertson DG, Collins C, McCormick F & Gray JW** (2003): Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34: 369–376.
- Aloni Roni, Wolf A, Feigenbaum P, Avni A & Klee HJ** (1998): The Never ripe Mutant Provides Evidence That Tumor-Induced Ethylene Controls the Morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens*-Induced Crown Galls on Tomato Stems. *Plant Physiol* 117: 841–849.
- Anglim PP, Alonzo TA & Laird-Offringa IA** (2008): DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Mol Cancer* 7: 81.
- Arnholdt-Schmitt B, Holzapfel B, Schillinger A & Neumann K** (1991): Variable methylation and differential replication of genomic DNA in cultured carrot root explants during growth induction as influenced by hormonal treatments. *Theor Appl Genet* 82: 283–288.
- Astot C, Dolezal K, Nordström A, Wang Q, Kunkel T, Moritz T, Chua NH & Sandberg G** (2000): An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14778–14783.
- Bäurle I, Smith L, Baulcombe DC & Dean C** (2007): Widespread role for the flowering-time regulators FCA and FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science* 318: 109–112.
- Baylin SB** (2005): DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Prac Oncol* 2: S4–S11.
- Becker C, Hagmann J, Müller J, Koenig D, Stegle O, Borgwardt K & Weigel D** (2011): Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature* 480: 245–249.

- Berdasco María, Alcázar R, García-Ortiz MV, Ballestar E, Fernández AF, Roldán-Arjona T, Tiburcio AF, Altabella T, Buisine N, Quesneville H, Baudry A, Lepiniec L, Alaminos M, Rodríguez R, Lloyd A, Colot V, Bender J, Canal MJ, Esteller M & Fraga M** (2008): Promoter DNA Hypermethylation and Gene Repression in Undifferentiated Arabidopsis Cells. *PLoS ONE* 3: e3306.
- Binns AN & Thomashow MF** (1988): Cell Biology of Agrobacterium Infection and Transformation of Plants. *Annu Rev Microbiol* 42: 575–606.
- Bird A** (2002): DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. *Genes Dev* 16: 6–21.
- Boyko A & Kovalchuk I** (2008): Epigenetic control of plant stress response. *Environ Mol Mutagen* 49: 61–72.
- Braun AC** (1981): An epigenetic model for the origin of cancer. *Q Rev Biol* 56: 33–60.
- Brown PTH, Yoneyama K & Lörz H** (1989): An investigation into the role of 5-Azacytidine in tissue culture. *Theor Appl Genet* 78: 321–328.
- Bruex A, Kainkaryam RM, Wieckowski Y, Kang YH, Bernhardt C, Xia Y, Zheng X, Wang JY, Lee MM, Benfey P, Woolf PJ & Schiefelbein J** (2012): A Gene Regulatory Network for Root Epidermis Cell Differentiation in Arabidopsis. *PLoS Genet* 8: e1002446.
- Burn J, Bagnall D, Metzger J, Dennis E & Peacock W** (1993): DNA Methylation, Vernalization, and the Initiation of Flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 287–291.
- Cantoni GL** (1952): The nature of the active methyl donor formed enzymatically from l-methionine and adenosinetriphosphate^{1,2}. *J Am Chem Soc* 74: 2942–2943.
- Cao X & Jacobsen SE** (2002): Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 Suppl 4: 16491–16498.
- Chan S, Henderson IR & Jacobsen SE** (2005): Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nat Rev Genet* 6: 351–360.
- Chan S, Henderson IR, Zhang X, Shah G, Chien J & Jacobsen SE** (2006): RNAi, DRD1, and histone methylation actively target developmentally important non-CG DNA methylation in arabidopsis. *PLoS Genet* 2: e83.

- Chen D, Meng Y, Yuan C, Bai L, Huang D, Lv S, Wu P, Chen LL & Chen M** (2011): Plant siRNAs from introns mediate DNA methylation of host genes. *RNA* 17: 1012–1024.
- Chen K, Lin C, Kuan C, Sung H & Chen C** (2002): A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *J Agric Food Chem* 50: 7258–7263.
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L & Jaenisch R** (1998): DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395: 89–93.
- Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP & Nester EW** (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263–271.
- Chinnusamy V & Zhu J-K** (2009): Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12: 133–139.
- Chodavarapu RK, Feng S, Bernatavichute YV, Chen P, Stroud H, Yu Y, Hetzel JA, Kuo F, Kim J, Cokus SJ, Casero D, Bernal M, Huijser P, Clark AT, Krämer U, Merchant SS, Zhang X, Jacobsen SE & Pellegrini M** (2010): Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* 466: 388–392.
- Choi CS & Sano H** (2007): Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics* 277: 589–600.
- Clark JM** (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 16: 9677–9686.
- Clough SJ & Bent AF** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735–743.
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M & Jacobsen SE** (2008): Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452: 215–9.
- Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ & Gilbert W** (1978): Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274: 775–780.
- Crane YM & Gelvin S** (2007): RNAi-mediated gene silencing reveals involvement of *Arabidopsis* chromatin-related genes in *Agrobacterium*-mediated root transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:

- Dangl JL & Jones JDG** (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826–833.
- Deeken R, Engelmann JC, Eftova M, Czirjak T, Müller T, Kaiser WM, Tietz O, Krischke M, Mueller MJ, Palme K, Dandekar T & Hedrich R** (2006): An integrated view of gene expression and solute profiles of Arabidopsis tumors: a genome-wide approach. *Plant Cell* 18: 3617–34.
- Ditt RF, Kerr KF, De Figueiredo P, Delrow Jeff, Comai L & Nester E** (2006): The Arabidopsis thaliana transcriptome in response to Agrobacterium tumefaciens. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 665–81.
- Dodge JE, Okano M, Dick F, Tsujimoto N, Chen T, Wang S, Ueda Y, Dyson N & Li E** (2005): Inactivation of Dnmt3b in Mouse Embryonic Fibroblasts Results in DNA Hypomethylation, Chromosomal Instability, and Spontaneous Immortalization. *J Biol Chem* 280: 17986–17991.
- Downen R, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, Dixon JE & Ecker JR** (2012): Widespread Dynamic DNA Methylation in Response to Biotic Stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E2183–2191.
- Dunoyer P, Humber C & Voinnet O** (2006): Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent Agrobacterium tumefaciens infections. *Nat Genet* 38: 258–263.
- Dymock D, Risiott R, De Pater S, Lancaster J, Tillson P & Ooms G** (1991): Regulation of Agrobacterium tumefaciens T-cyt gene expression in leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) is strongly influenced by plant culture conditions. *Plant Mol Biol* 17: 711–725.
- Eftova M, Zeier J, Riederer M, Lee C-W, Stingl N, Mueller M, Hartung W, Hedrich R & Deeken R** (2007): A Central Role of Abscisic Acid in Drought Stress Protection of Agrobacterium-Induced Tumors on Arabidopsis. *Plant Physiol* 145: 853–862.
- Egger G, Liang G, Aparicio A & Jones PA** (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457–463.
- Ehrlich M** (2002): DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400–5413.
- Ehrlich M** (2009): DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 1: 239–259.

- Ellis J, Dodds P & Pryor T** (2000): Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 3: 278–284.
- Escobar M, Civerolo E, Summerfelt K & Dandekar A** (2001): RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13437–13442.
- Estéicio MRH, Gharibyan V, Shen L, Ibrahim AEK, Doshi K, He R, Jelinek J, Yang AS, Yan PS, Huang TH-M, Tajara EH & Issa J-PJ** (2007): LINE-1 Hypomethylation in Cancer Is Highly Variable and Inversely Correlated with Microsatellite Instability. *PLoS ONE* 2: e399.
- Feng S, Cokus SJ, Zhang Xiaoyu, Chen P-Y, Bostick M, Goll Mary G., Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, Ukomadu C, Sadler KC, Pradhan S, Pellegrini M & Jacobsen SE** (2010a): Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8689–8694.
- Feng S, Jacobsen SE & Reik W** (2010b): Epigenetic Reprogramming in Plant and Animal Development. *Science* 330: 622–627.
- Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, Peacock W & Dennis E** (1998): DNA Methylation and the Promotion of Flowering by Vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5824–5829.
- Fraga M, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris M, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T & Esteller M** (2005): Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37: 391–400.
- Francis KE & Spiker S** (2005): Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. *Plant J* 41: 464–77.
- Frank M, Rupp HM, Prinsen E, Motyka V, Van Onckelen H & Schmölling T** (2000): Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content or signaling. *Plant Physiol* 122: 721–729.
- Galbraith DW, Harkins KR & Knapp S** (1991): Systemic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 96: 985–989.

- Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J & Rommens CM** (2000): Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol* 18: 1307–1310.
- Gardiner-Garden M & Frommer M** (1987): CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261–282.
- Garfinkel DJ & Nester EW** (1980): *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J Bacteriol* 144: 732–743.
- Gaudino RJ & Pikaard CS** (1997): Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 272: 6799–6804.
- Gehring M, Bubb KL & Henikoff S** (2009): Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science* 324: 1447–1451.
- Gelvin S, Karcher SJ & DiRita VJ** (1983): Methylation of the T-DNA in *Agrobacterium tumefaciens* and in several crown gall tumors. *Nucleic Acids Res* 11: 159–74.
- Gelvin SB** (2010): Finding a way to the nucleus. *Curr Opin Microbiol* 13: 53–58.
- Glozak MA & Seto E** (2007): Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 26: 5420–5432.
- Goldberg SB, Flick JS & Rogers SG** (1984): Nucleotide sequence of the *tmr* locus of *Agrobacterium tumefaciens* pTi T37 T-DNA. *Nucleic Acids Res* 12: 4665–4677.
- Goldmann A, Tempé J & Morel G** (1968): Distinctive features of various strains of *Agrobacterium tumefaciens* [Article in French]. *C R Soc Biol* 162: 630–31.
- Goldmann A, Tempé J & Morel G** (n.d.). Quelques particularités de diverses souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. *C R Soc Biol* 162: 630–631.
- Goll Mary Grace & Bestor TH** (2005): Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74: 481–514.
- Groszmann M, Greaves IK, Albertyn ZI, Scofield GN, Peacock WJ & Dennis ES** (2011): Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2617–2622.
- Gutierrez A & Sommer RJ** (2004): Evolution of Dnmt-2 and Mbd-2-Like Genes in the Free-Living Nematodes *Pristionchus Pacificus*, *Caenorhabditis Elegans* and *Caenorhabditis Briggsae*. *Nucl Acids Res* 32: 6388–6396.

- Haas O** (2002): Felix Mitelman: Database of chromosome aberrations in cancer. *Hum Genet* 110: 524–525.
- Hakkarainen M, Wahlfors J, Myöhänen S, Hiltunen MO, Eskelinen M, Johansson R & Jänne J** (1996): Hypermethylation of calcitonin gene regulatory sequences in human breast cancer as revealed by genomic sequencing. *Int J Cancer* 69: 471–474.
- Hamilton RH & Fall MZ** (1971): The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia* 27: 229–230.
- Hanahan D** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557–580.
- Hepburn AG, Clarke LE, Pearson L & White J** (1983): The role of cytosine methylation in the control of nopaline synthase gene expression in a plant tumor. *J Mol Appl Genet* 2: 315–329.
- Herman JG & Baylin SB** (2003): Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042–2054.
- Hernandez R, Frady A, Zhang XY, Varela M & Ehrlich M** (1997): Preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole-arm deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine. *Cytogenet Cell Genet* 76: 196–201.
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W & Zimmermann P** (2008): Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008: 420747.
- Hsieh T-F, Ibarra CA, Silva P, Zemach A, Eshed-Williams L, Fischer RL & Zilberman D** (2009): Genome-Wide Demethylation of Arabidopsis Endosperm. *Science* 324: 1451–1454.
- Inoue H, Nojima H & Okayama H** (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23–28.
- Jakowitsch J, Papp I, Moscone EA, Van Der Winden J, Matzke M & Matzke A** (1999a): Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J* 17, 17: 131, 131–140, 140.

- Jakowitsch, Mette MF, Van der Winden J, Matzke MA & Matzke AJM** (1999b): Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13241–13246.
- Jensen CO** (1910): Von echten Geschwulsten bei Pflanzen. *Deuxieme Conférence Internat pour l'Etude du Cancer, Rapport* 243–54.
- Ji W, Hernandez R, Zhang XY, Qu GZ, Frady A, Varela M & Ehrlich M** (1997): DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res* 379: 33–41.
- Johnson DS, Li W, Gordon DB, Bhattacharjee A, Curry B, Ghosh J, Brizuela L, Carroll JS, Brown M, Flicek P, Koch CM, Dunham I, Bieda M, Xu X, Farnham PJ, Kapranov P, Nix DA, Gingeras TR, Zhang X, Holster H, Jiang N, Green RD, Song JS, McCuine SA, Anton E, Nguyen L, Trinklein ND, Ye Z, Ching K, Hawkins D, Ren B, Scacheri PC, Rozowsky J, Karpikov A, Euskirchen G, Weissman S, Gerstein M, Snyder M, Yang A, Moqtaderi Z, Hirsch H, Shulha HP, Fu Y, Weng Z, Struhl K, Myers RM, Lieb JD & Liu XS** (2008): Systematic evaluation of variability in ChIP-chip experiments using predefined DNA targets. *Genome Res* 18: 393–403.
- Johnson LM, Bostick M, Zhang X, Kraft E, Henderson I, Callis J & Jacobsen S** (2007): The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr Biol* 17: 379–84.
- Johnson LM, Cao X & Jacobsen SE** (2002): Interplay between Two Epigenetic Marks: DNA Methylation and Histone H3 Lysine 9 Methylation. *Current Biology* Vol 12: 1360–1367.
- Jones JDG & Dangl JL** (2006): The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Jones PA** (2012): Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13: 484–492.
- Kalisz S & Purugganan MD** (2004): Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trends Ecol Evol (Amst)* 19: 309–314.
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddloh JA, Riddle NC, Verbsky ML & Richards EJ** (2003): Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163: 1109–1122.

- Karpf AR & Jones DA** (2002): Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* 21: 5496–5503.
- Kasschau KD, Fahlgren N, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA & Carrington JC** (2007): Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol* 5: e57.
- Kato M, Miura A, Bender J, Jacobsen S & Kakutani T** (2003): Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in Arabidopsis. *Curr Biol* 13: 421–426.
- Khraiweh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R & Frank W** (2010): Transcriptional Control of Gene Expression by MicroRNAs. *Cell* 140: 111–122.
- Koncz C & Schell J** (1983): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet* 383–396.
- Koukalova B, Fojtova M, Lim KY, Fulnecek J, Leitch AR & Kovarik A** (2005): Dedifferentiation of Tobacco Cells Is Associated with Ribosomal RNA Gene Hypomethylation, Increased Transcription, and Chromatin Alterations. *Plant Physiol* 139: 275–286.
- Kovařík A, Koukalová B, Bezděk M & Opatrný Z** (1997): Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theor Appl Genet* 95: 301–306.
- Kuan PF, Chun H & Keleş S** (2008): CMARRT: a tool for the analysis of ChIP-chip data from tiling arrays by incorporating the correlation structure. *Pac Symp Biocomput* 515–526.
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H & Demura T** (2005): Transcription Switches for Protoxylem and Metaxylem Vessel Formation. *Genes Dev* 19: 1855–1860.
- Labra M, Ghiani A, Citterio S, Sgorbati S, Sala F, Vannini C, Ruffini-Castiglione M & Bracale M** (2002): Analysis of Cytosine Methylation Pattern in Response to Water Deficit in Pea Root Tips. *Plant Biology* 4: 694–699.
- Lee B, Henderson DA & Zhu J-K** (2005): The Arabidopsis Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. *Plant Cell* 17: 3155–3175.

- Lee HS & Chen Z J** (2001): Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6753–6758.
- Lee J-S, Smith E & Shilatifard A** (2010): The Language of Histone Crosstalk. *Cell* 142: 682–685.
- Lee JY & Lee T-H** (2011): Effects of DNA Methylation on the Structure of Nucleosomes. *J Am Chem Soc* 134: 173–175.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G & Schroeder JI** (2004): Microarray Expression Analyses of *Arabidopsis* Guard Cells and Isolation of a Recessive Abscisic Acid Hypersensitive Protein Phosphatase 2C Mutant. *Plant Cell* 16: 596–615.
- Levenson VV** (2010): DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diagn* 10: 481–488.
- Lindroth AM, Cao X, Jackson J, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S & Jacobsen S** (2001): Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for Maintenance of CpXpG Methylation. *Science* 292: 2077–2080.
- Lippincott BB & Lippincott JA** (1969): Bacterial Attachment to a Specific Wound Site as an Essential Stage in Tumor Initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 97: 620–628.
- Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH & Ecker JR** (2008): Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell* 133: 523–36.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B & Ecker JR** (2009): Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315–322.
- Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C & Sledziewski A** (2008): DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* 54: 414–423.
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S & Terzi M** (1989): DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and

- its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 77: 325–331.
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V & Ton J** (2012): Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol* 158: 844–853.
- Marrocco K, Thomann A, Parmentier Y, Genschik P & Criqui MC** (2009): The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic Arabidopsis cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development* 136: 1475–1485.
- Mathieu O, Reinders J, Čaikovski M, Smathajitt C & Paszkowski J** (2007): Transgenerational Stability of the Arabidopsis Epigenome Is Coordinated by CG Methylation. *Cell* Vol 130: 851–862.
- Matzke MA, Mette MF & Matzke AJ** (2000): Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol* 43: 401–415.
- Matzke MA, Primig M, Trnovsky J & Matzke AJM** (1989): Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J* 8: 643–649.
- McCullen C & Binns A** (2006): Agrobacterium tumefaciens and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 101–127.
- Mette MF, Aufsatz W, Van der Winden J, Matzke MA & Matzke AJM** (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 19: 5194–5201.
- Mette MF, Van der Winden J, Matzke MA & Matzke AJ** (1999): Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *EMBO J* 18: 241–248.
- Meyer P, Heidmann I & Niedenhof I** (1993): Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *Plant J* 4: 89–100.
- Mirouze M, Lieberman-Lazarovich M, Aversano R, Bucher E, Nicolet J, Reinders J & Paszkowski J** (2012): Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 5880–5885.

- Mitsuda N & Ohme-Takagi M** (2009): Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 50: 1232–1248.
- Miura A, Yonebayashi S, Watanabe K, Toyama T, Shimada H & Kakutani T** (2001): Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature* 411: 212–214.
- Mosher RA, Schwach F, Studholme D & Baulcombe DC** (2008): PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3145–3150.
- Mustroph A, Lee SC, Oosumi T, Zanetti ME, Yang H, Ma K, Yaghoubi-Masihi A, Fukao T & Bailey-Serres J** (2010): Cross-Kingdom Comparison of Transcriptomic Adjustments to Low-Oxygen Stress Highlights Conserved and Plant-Specific Responses. *Plant Physiol* 152: 1484–1500.
- Nam J, Matthyse AG & Gelvin S** (1997): Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell* 9: 317–333.
- Neuhuber F, Park YD, Matzke AJ & Matzke MA** (1994): Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. *Mol Gen Genet* 244: 230–241.
- Ni Z, Kim E-D, Ha M, Lackey E, Liu J, Zhang Y, Sun Q & Chen Z Jeffrey** (2009): Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* 457: 327–331.
- Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K & Hirayama T** (2007): ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J* 50: 935–949.
- Oh S, Zhang Hua, Ludwig P & Van Nocker S** (2004): A mechanism related to the yeast transcriptional regulator Paf1c is required for expression of the Arabidopsis FLC/MAF MADS box gene family. *Plant Cell* 16: 2940–2953.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL & Skriver K** (2005): NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci* 10: 79–87.
- Ooms G, Hooykaas PJ, Moolenaar G & Schilperoort RA** (1981): Grown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. *Gene* 14: 33–50.

- Ossowski S, Schwab R & Weigel D** (2008): Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* 53: 674–690.
- De Pater BS, De Kam RJ, Hoge JH & Schilperoort RA** (1987): Effects of mutations in the TATA box region of the *Agrobacterium* T-cyt gene on its transcription in plant tissues. *Nucleic Acids Res* 15: 8283–8292.
- Pavet V, Quintero C, Cecchini NM, Rosa AL & Alvarez ME** (2006): Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 577–587.
- Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Henikoff S & Fischer RL** (2007): DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6752–7.
- Peralta EG & Ream LW** (1985): T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5112–5116.
- Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu MC & Ehrlich M** (1999): Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res* 423: 91–101.
- Ream LW, Gordon MP & Nester EW** (1983): Multiple mutations in the T region of the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1660–1664.
- Renckens S, De Greve H, Van Montagu M & Hernalsteens JP** (1992): Petunia plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. *Mol Gen Genet* 233: 53–64.
- Rocha PSCF, Sheikh M, Melchiorre R, Fagard M, Boutet S, Loach R, Moffatt B, Wagner C, Vaucheret H & Furner I** (2005): The Arabidopsis HOMOLOGUE-DEPENDENT GENE SILENCING1 Gene Codes for an S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Required for DNA Methylation-Dependent Gene Silencing. *Plant Cell* 17: 404–417.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T** (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–5467.

- Sarasin A** (2003): An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 544: 99–106.
- Saze H, Scheid OM & Paszkowski J** (2003): Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* 34: 65–69.
- Scheid OM, Afsar K & Paszkowski J** (2003): Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 34: 450–454.
- Schmitz RJ, Schultz MD, Lewsey MG, O'Malley RC, Urich MA, Libiger O, Schork NJ & Ecker JR** (2011): Transgenerational Epigenetic Instability Is a Source of Novel Methylation Variants. *Science* 334: 369–373.
- Scrabble H & Stambrook P** (1997): Activation of the lac repressor in the transgenic mouse. *Genetics* 147: 297–304.
- Scrabble H & Stambrook P** (1999): A genetic program for deletion of foreign DNA from the mammalian genome. *Mutat Res* 429(2): 255–37.
- Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen Lingyi, Thastrom A, Field Y, Moore IK, Wang J-PZ & Widom J** (2006): A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* 442: 772–778.
- Segura A, Moreno M, Molina A & García-Olmedo F** (1998): Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett* 435: 159–162.
- Shaw CH, Watson MD, Carter GH & Shaw CH** (1984): The right hand copy of the nopaline Ti-plasmid 25 bp repeat is required for tumour formation. *Nucleic Acids Res* 12: 6031–6041.
- Shen H, He H, Li J, Chen W, Wang X, Guo L, Peng Z, He G, Zhong S, Qi Y, Terzaghi W & Deng XW** (2012): Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids. *Plant Cell* 24: 875–892.
- Shibuya K, Fukushima S & Takatsuji H** (2009): RNA-directed DNA methylation induces transcriptional activation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1660–1665.
- Silverstein KAT, Graham MA, Paape TD & VandenBosch KA** (2005): Genome Organization of More Than 300 Defensin-Like Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 600–610.

- Singer T, Yordan C & Martienssen RA** (2001): Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene *Decrease in DNA Methylation (DDM1)*. *Genes Dev* 15: 591–602.
- Slotkin RK, Vaughn M, Tanurdžic M, Borges F, Becker JD, Feijó JA & Martienssen RA** (2009): Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136: 461–472.
- Smith EF** (1916): Studies on crown gall of plants: Its relation to human cancer. *Jour Cancer Res* 1: 231.
- Smith EF & Townsend CO** (1907): A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25: 671–673.
- Sonmez C, Bäurle I, Magusin A, Dreos R, Laubinger S, Weigel D & Dean C** (2011): RNA 3' processing functions of *Arabidopsis* FCA and FPA limit intergenic transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8508–8513.
- Soppe WJ, Jacobsen SE, Alonso-Blanco C, Jackson JP, Kakutani T, Koornneef M & Peeters AJ** (2000): The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Mol Cell* 6: 791–802.
- Stachel S, Messens E, Montagu MV & Zambryski P** (1985): Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624–629.
- Stachel SE & Nester E** (1986): The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 5: 1445–1454.
- Stam M, De Bruin R, Van Blokland R, Van der Hoorn RA, Mol JN & Kooter JM** (2000): Distinct features of post-transcriptional gene silencing by antisense transgenes in single copy and inverted T-DNA repeat loci. *Plant J* 21: 27–42.
- Steeves TA & Sussex IM** (1989): *Patterns in Plant Development*. Cambridge University Press.
- Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, Koizumi N & Sano H** (2002): Periodic DNA Methylation in Maize Nucleosomes and Demethylation by Environmental Stress. *J Biol Chem* 277: 37741–37746.

- Stokes TL, Kunkel BN & Richards EJ** (2002): Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. *Genes Dev* 16: 171–182.
- Storchova Z & Pellman D** (2004): From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 45–54.
- Suzuki MM & Bird A** (2008): DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9: 465–476.
- Tanurdzic M, Vaughn MW, Jiang H, Lee T-J, Slotkin RK, Sosinski B, Thompson WF, Doerge RW & Martienssen RA** (2008): Epigenomic Consequences of Immortalized Plant Cell Suspension Culture. *PLoS Biol* 6: e302.
- Tariq M & Paszkowski J** (2004): DNA and histone methylation in plants. *Trends in Genetics* 20: 244–251.
- Teixeira FK, Heredia F, Sarazin A, Roudier F, Boccara M, Ciaudo C, Cruaud C, Poulain J, Berdasco Maria, Fraga MF, Voinnet O, Wincker P, Esteller M & Colot V** (2009): A Role for RNAi in the Selective Correction of DNA Methylation Defects. *Science* 323: 1600–1604.
- Tenea GN, Spantzel J, Lee L-Y, Zhu Y, Lin K, Johnson SJ & Gelvin SB** (2009): Overexpression of Several Arabidopsis Histone Genes Increases Agrobacterium-Mediated Transformation and Transgene Expression in Plants. *Plant Cell* 21: 3350–3367.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY & Stitt M** (2004): MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37: 914–939.
- Thomashow LS, Reeves S & Thomashow MF** (1984): Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the Agrobacterium Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5071–5075.
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M & Saito K** (2005): Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J* 42: 218–235.

- Tompa R, McCallum CM, Delrow J, Henikoff JG, Van Steensel B & Henikoff S** (2002): Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol* 12: 65–68.
- Tran RK, Henikoff JG, Zilberman D, Ditt RF, Jacobsen S & Henikoff S** (2005): DNA Methylation Profiling Identifies CG Methylation Clusters in Arabidopsis Genes. *Current Biology* 15: 154–159.
- Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL & Laird-Offringa IA** (2002): DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 21: 5450–5461.
- Ullrich CI & Aloni R** (2000): Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *J Exp Bot* 51: 1951–1960.
- Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing OE, Palacios-Rojas N, Selbig J, Hannemann J, Piques MC, Steinhauser D, Scheible W-R, Gibon Y, Morcuende R, Weicht D, Meyer S & Stitt M** (2005): Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol* 138: 1195–1204.
- Vaillant I & Paszkowski J** (2007): Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 528–533.
- Vaughn MW, Tanurdžić M, Lippman Z, Jiang H, Carrasquillo R, Rabinowicz PD, Dedhia N, McCombie WR, Agier N, Bulski A, Colot V, Doerge R & Martienssen RA** (2007): Epigenetic Natural Variation in Arabidopsis thaliana. *PLoS Biol* 5: e174.
- Veselov D, Langhans M, Hartung W, Aloni Roni, Feussner I, Götz C, Veselova S, Schlomski S, Dickler C, Bächmann K & Ullrich C** (2003): Development of Agrobacterium tumefaciens C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta* 216: 512–522.
- Vogel AM & Das A** (1992): Mutational analysis of Agrobacterium tumefaciens virD2: tyrosine 29 is essential for endonuclease activity. *J Bacteriol* 174: 303–308.
- Vrbsky J, Akimcheva S, Watson JM, Turner TL, Daxinger L, Vyskot B, Aufsatz W & Riha K** (2010): siRNA-Mediated Methylation of Arabidopsis Telomeres. *PLoS Genet* 6: e1000986.

- Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang Xiaohong, Zhang W, Altman N, dePamphilis CW & Ma H** (2004): Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in Arabidopsis and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins. *Plant Physiol* 135: 1084–1099.
- Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M & Zambryski P** (1984): Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from agrobacterium to the plant genome. *Cell* 38: 455–462.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L & Sanger HL** (1994): RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567–576.
- Weatherwax SC, Ong MS, Degenhardt J, Bray EA & Tobin EM** (1996): The Interaction of Light and Abscisic Acid in the Regulation of Plant Gene Expression. *Plant Physiol* 111: 363–370.
- Weiler EW & Spanier K** (1981): Phytohormones in the formation of crown gall tumors. *Planta* 153: 326–337.
- Wenck A, Czako M, Kanevski I & Marton L** (1997): Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Mol Biol* 34: 913–922.
- Winans SC, Kerstetter RA & Nester EW** (1988): Transcriptional regulation of the virA and virG genes of Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* 170: 4047–4054.
- Wrzaczek M, Brosche M, Salojarvi J, Kangasjarvi S, Idanheimo N, Mersmann S, Robatzek S, Karpinski S, Karpinska B & Kangasjarvi J** (2010): Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* 10: 95.
- Yamaguchi M, Kubo M, Fukuda H & Demura T** (2008): VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots. *The Plant Journal* 55: 652–664.
- Yoshikawa M, Peragine A, Park MY & Poethig RS** (2005): A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* 19: 2164–2175.
- Zaenen I, Van Larebeke N, Teuchy H, Van Montagu M & Schell J** (1974): Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing Agrobacterium strains. *Journal of Molecular Biology* 86: 109–127.

- Zemach A, McDaniel IE, Silva P & Zilberman D** (2010): Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328: 916–919.
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW-L, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen S & Ecker JR** (2006): Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell* 126: 1189–1201.
- Zhao N, Zhu B, Li M, Wang L, Xu L, Zhang H, Zheng S, Qi B, Han F & Liu B** (2011): Extensive and heritable epigenetic remodeling and genetic stability accompany allohexaploidization of wheat. *Genetics* 188: 499–510.
- Zhou C, Yang Y & Jong AY** (1990): Mini-prep in ten minutes. *BioTechniques* 8: 172–173.
- Zhu J-K** (2009): Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu Rev Genet* 43: 143–166.
- Zilberman D, Cao X & Jacobsen SE** (2003): ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299: 716–9.
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T & Henikoff S** (2007): Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet* 39: 61–69.

8. Anhang

8.1 Primer-Liste

Genotypisierung transgener Pflanzen		
Ago4-1	fwd	TGACTGACAGCTGAAAATGGGATGTGGAT
	rev	GCCACTCCCTAGAACTCACCACCTAAGTT
ROS1-3	fwd	TGGAAGGGATCCGTCGTGGATTCT
	rev	CCCGCGACTCTTGATTGTTTCAGCAACTT
JL-102		CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
DML2-1	fwd	ACCCGGAGAGTACCATTGAGACAC
	rev	GTGGCCAGAGGTACTTTTGAAGT
DML3-1	fwd	GCCAAATCGCAAGAAGGTAAGGA
	rev	GACGTTGCTGTAGATATGAC
Syn-LB3		GCATGTGAATTTATAACCAATCTCGATAC
DRM1-2	fwd	TGCTGCTCTTGTCTTGGTAG
	rev	GTCGATGGAGTGCAACTTCTC
DRM2-2	fwd	CTATTCCAGGCACTTGTTCCG
	rev	AAGATCCTCTCATCCTCGCAC
CMT3-11	fwd	TGCACTAGCTTCAGAAGTTTAAGG
	rev	ATAAGAGAAGGAGCTGCTGCC
<i>iaaH</i> und <i>ipt</i> qRT-PCR		
iaaH RT	fwd	GTCGGCTTCAACAAAGG
	rev	CCTCGACCAGGTGATT
IPT RT	fwd	GAGGGAGGATCTATCTCG
	rev	GCAGGGCGTAACATCT
ABA-abhängige Methylierung qRT-PCR		
NDF 4 RT	fwd	ACTTGCATGGTCGAGA
	rev	CGAGATCATCGTCATTAGGT
ATSIG5 RT	fwd	CAATATGACTGCGGGT
	rev	AATGGGACACGAGTGA
F12A4.4 RT	fwd	GCGATTTGCTTACCG
	rev	GAACCCCATCACTCCT

mCIP-Kontrollen		
FWA	fwd	TGTGGGATACTGACAA
	rev	CGACCAATGTCGAAAAG
AtSN1	fwd	ACAAGCCTAGTTTTAATTC
	rev	TCTCTCAGATAGAGGTG
Ta3	for	GTACATTGCACTAGCG
	rev	GTCCGTTTCGTGATAAA
Act7 prom	fwd	CGTAACCATCAGTCAC
	rev	AAATCTGGGAGAGACA
Bisulfit-Sequenzierung intergenischer Regionen		
IR1 BS	fwd	AGAAGGGYATTTAATGGTTTTG
	rev	ACCATTATCARATCCACCATTTT
IR2 BS 1	fwd	AAGTATTGYAYGTTTTATAAATTG
	rev	TTTCACAATTRACRTAAATTTCCCTCTA
IR2 BS 2	fwd	AGAGGGAAATTTAYGYAATTGTGAAATAG
	rev	AAAATTARACRCARATCCATAA
at1g20850 BS	fwd	TTATTGTTGAGGTTGGYATTTTATYATTGAGG
	rev	TACRTTTRTTTTCTTTTRTCACTT
at2g16595 BS	fwd	ATTAATAATATAGAATAGAATYYGAGGTAA
	rev	CCATTCATCATRCRAARCATCTTTA
at3g19250 BS	fwd	TTTAAATGGTAATYAATTGAAAGAYTTAATTATTG
	rev	CAARTAAAARRACAAACATCAAAAAT
at4g12760 BS	fwd	AGAATATGTGTTTAAAYAGTGAAAYAGGTAGGTT
	rev	CCTTCAAATTATACACACTCTRAACACT
at5g58370 BS	fwd	AGYAAATTGATGGTGATAGTAATGGAA
	rev	TTTAAATARATCAAATTTAAAACTAATTCAAATA
Bisulfit-Sequenzierung ABA-abhängiger Promotor-Methylierung		
F12A4.4 BS	fwd	TTATTTATTAATAATTGTAAAGTATGTTTTAGTTAA
	rev	TTTTTATCATAATTTTTCTTTTRATACATTTTTA
ATSIG5 BS	fwd	AAGAATTTTTAAYATTAGATATAATAAAAAGTTAAG
	rev	ATCATRCAACCCAATAATAAAAAATRAACAT
NDF4 BS	fwd	TAGGAYAAAAYTGGGAGAATAAA
	rev	TARRTTTTARATTTTACAATTAATAAAAAT

Bisulfit-Sequenzierung des Onkogen-Clusters		
T-DNA 1	fwd	ATYGGGAAAGGAAGGAAAATTTA
	rev	AGTAATTTYGATAAGTGGTTTGGA
T-DNA 2	fwd	TTGTATTTAATTGATAGAGTTTG
	rev	CTCCCCACTACCTACTTTTA
T-DNA 3	fwd	GTAAAAGTAGGTAGTGGGGA
	rev	CAAAAACTCAAACRATAATATAAC
T-DNA 4	fwd	GTTTAATATTAATYGGTTTGTTAT
	rev	AATACCCTTCTAACTACAAA
T-DNA 5	fwd	TAGTTTGTAGTTAGAAGGGT
	rev	AACATACTATTCATTAACATC
T-DNA 6	fwd	GGATGTTAATGAATAGTATG
	rev	TACCTTCTCACCACTAAAAT
T-DNA 7	fwd	TGGTGAGAAGGTAGTAGTTTT
	rev	CAATTATTAACCACTACC
T-DNA 8	fwd	GAAATTTGATGTTGAAGTTTT
	rev	TAATAAACCAATTAATATC
T-DNA 9	fwd	ATATTAATTTGGTTTATTAAG
	rev	ATCCAATCATAAAAAAAC
T-DNA 10	fwd	GGTGAAATATGGAGTTTTTT
	rev	ATCATATAACTATTATCAAC
T-DNA 11	fwd	GGTTGATAATAGTTATATGA
	rev	RATTAATTTAAAACTCCC
T-DNA 12	fwd	GGGGGAGTTTTTAAATTTAAT
	rev	CATCATATTATAACACACTTCAAC
T-DNA 13	fwd	TTTTATGATGTTGAAGTGTG
	rev	CACCCTTAAATCAATAAAAC
T-DNA 14	fwd	GTTGTTTTGTATTGTTGATT
	rev	RTTCCTTTCAATTCTTCCACTAT
T-DNA 15	fwd	TAATAGTGGAAGAATTGAAAGGA
	rev	TCTTTCCAAAAATCAACCAA

Klonierung & Sequenzierung		
M13	fwd	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
	rev	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
IPT pro-s topo	fwd	CACCTCTACGGATCCTGTTACAAGTATT
IPT pro-as02 topo	rev	ATATTTGATTAGGTGAGACGTCAA
IPT pro-s01 topo	fwd	CACCTACAAAAGATCTCACTCT
IPT pro-as01 topo	rev	AAGTTTTTTGCGGTATCT
IPT promoter AS	rev	AAGTTTTTTGCGGTATCTTG
IAA promoter AS	rev	TGCTAGAAAAGATTGGTCTT
p27-5	fwd	GGGATGACGCACAATCC
P27-3	rev	GAGCTACACATGCTCAGG
I-3	fwd	TGATAGATCATGTCATTGTG
I-5	rev	ATAATCATACTAATTAACATCAC
attB1	fwd	CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
attB2	rev	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG
Hpin pHel	fwd	GCACTAGTTCGACGAATTAATTCCAATCC
	rev	TAACTAGTTGCATGCCTGCAGGTCCT

8.2 DNA-Größenstandards

Für die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurden folgende Standards eingesetzt:

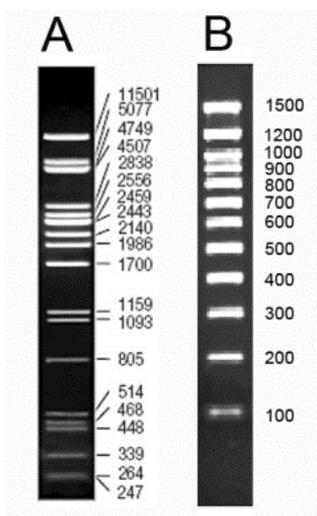


Abbildung 8.1 Verwendete Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese. Es wurde entweder λ -Pst I Marker (A) oder Forever 100 bp ladder (B) verwendet. Dargestellt ist die Verteilung der Fragmentlängen (in Basenpaaren) nach Trennung in einem 1,5%igen (A) bzw. 2%igen (B) Agarose-Gel.

8.3 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
μE	Mikro-Einstein
A	Adenin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Abscisinsäure (<i>abscisic acid</i>)
AGI	<i>arabidopsis genome initiative</i>
att	<i>attachment-site</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	<i>copy-DNA</i>
DMR	differenziell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dT	Deoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMS	Ethylmethansulfonat
FC	<i>fold change</i>
fwd	<i>forward</i> (5'-3'-Orientierung)
<i>g</i>	Maß der Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	Stunden
H (in CHG/CHH)	Nicht-Guanin-Nukleotid (Adenin, Cytosin, Thymin)
IAA	Indol-3-Essigsäure (<i>indole acetic acid</i>)
IPT	Isopentenyltransferase
IR	intergenische Region
KB	Kings Broth
l	Liter
LB	<i>left border</i>
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
M	molar
m	Milli-
mC	Methylcytosin
mCIP	Methylcytosin-Immunopräzipitation
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
miRNA	mikro-RNA
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n.b.	nicht bestimmt
NBS-LRR	<i>nucleotide binding site leucine rich repeat</i>
ncRNA	nicht-codierende RNA
OD	optische Dichte
oligo-dT	Oligo Deoxythymidin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
qRT-PCR	quantitative reverse-Transkriptase-PCR

RB	<i>right border</i>
rev	<i>reverse</i> (3'-5'-Orientierung)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription / reverse Transkriptase
SAAH	S-Adenosyl-L Homocystein-Hydrolase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	small interfering RNA
SLR	<i>signal log ratio</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
sSLR	<i>smoothed signal log ratio</i>
Std	Standard für qRT-PCR
TA	Thymin-Adenin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
T-DNA	Tumor-induzierende DNA
TE	transposables Element
TES	Transkriptionseende (<i>transcription end site</i>)
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
tmr	<i>tumor morphology rooty</i>
tms	<i>tumor morphology shooty</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSS	Transkriptionstart (<i>transcription start site</i>)
U	<i>unit</i> (Maß für die Enzymaktivität)
U	Uracil
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen

8.4 Differenziell methylierte Gene signifikant veränderter Gen-Kategorien.

Aufgelistet sind alle differenziell methylierten Gene der im Tumor am signifikantesten veränderten Gen-Kategorien (siehe 3.3.3). Die Gene sind mit ihrem AGI-Code (AGI), der annotierten Funktion und Position (Funktion/Position) sowie Stärke (logFC) und Richtung der Methylierungsänderungen (Richtung) in Tumor- gegenüber Kontrollgewebe angegeben. Die Lokalisierung der Methylierungsveränderungen ist unterteilt nach *gene body* (insideGene) bzw. *upstream-* oder *downstream-*Bereich (overlapStart/overlapEnd).

AGI	Funktion/Position	Richtung	logFC	Position
Kategorie:Entwicklung				
AT3G29970	germination protein-related chr3:11745211-11746570 FORWARD	-1	-0.656	overlapEnd
AT4G22530	embryo-abundant protein-related chr4:11859004-11860208 REVERSE	-1	-0.523	insideGene
AT2G17040	Symbols: anac036 anac036 (Arabidopsis NAC domain containing protein 36); transcription factor chr2:7407123-7408270 FORWARD	-1	-0.539	overlapEnd
AT1G31280	Symbols: AGO2 AGO2 (argonaute 2); nucleic acid binding chr1:11181711-11185344 FORWARD	-1	-0.69	insideGene
AT5G62380	Symbols: VND6, ANAC101 ANAC101 (ARABIDOPSIS NAC-DOMAIN PROTEIN 101); transcription activator/ transcription factor/ transcription regulator chr5:25050684-25051858 FORWARD	-1	-0.788	overlapEnd
AT1G27595	EXPRESSED IN: 22 plant structures; EXPRESSED DURING: 15 growth stages; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: ESP4 (ENHANCED SILENCING PHENOTYPE 4); binding (TAIR:AT5G01400.1); Has 529 Blast hits to 235 proteins in 85 species: Archae - 0; Bacteria - 3; Metazoa - 125; Fungi - 41; Plants - 31; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 329 (source: NCBI BLink). chr1:9596360-9603255 FORWARD	-1	-0.245	insideGene
AT3G18390	Symbols: EMB1865 EMB1865 (embryo defective 1865); RNA binding chr3:6313485-6317971 FORWARD	-1	-0.417	insideGene
AT5G39500	pattern formation protein, putative chr5:15815274-15820045 FORWARD	-1	-0.173	insideGene
AT5G52250	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr5:21216855-21218226 FORWARD	-1	-0.225	insideGene
AT4G10180	Symbols: DET1, FUS2, ATDET1 DET1 (DE-ETIOLATED 1); catalytic chr4:6346463-6349276 FORWARD	-1	-0.415	overlapStart
AT2G47990	Symbols: SWA1, EDA13, EDA19 SWA1 (SLOW WALKER1); nucleotide binding chr2:19636867-19638678 REVERSE	-1	-0.113	insideGene
AT1G66610	seven in absentia (SINA) protein, putative chr1:24849716-24851450 REVERSE	-1	-0.263	overlapStart
AT1G56200	Symbols: emb1303 emb1303 (embryo defective 1303) chr1:21030794-21032078 FORWARD	-1	-0.252	insideGene
AT1G15270	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: plasma membrane; EXPRESSED IN: 24 plant structures; EXPRESSED DURING: 15 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Translation machinery associated TMA7 (InterPro:IPR015157); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G16040.1); Has 263 Blast hits to 263 proteins in 90 species: Archaea - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 153; Fungi - 48; Plants - 41; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 21 (source: NCBI BLink). chr1:5250650-5252121 REVERSE	-1	-0.439	overlapStart

AT1G63260	Symbols: TET10 TET10 (TETRASPANIN10) chr1:23466800-23469204 REVERSE	-1	-0.216	insideGene
AT2G41260	Symbols: M17, ATM17 M17 chr2:17206510-17207698 FORWARD	-1	-0.524	overlapStart
AT5G14120	nodulin family protein chr5:4555949-4558710 FORWARD	-1	-0.484	insideGene
AT5G04040	Symbols: SDP1 SDP1 (SUGAR-DEPENDENT1); triacylglycerol lipase chr5:1089342-1093179 FORWARD	-1	-0.435	overlapEnd
AT3G45870	integral membrane family protein / nodulin MtN21-related chr3:16867202-16868926 FORWARD	-1	-0.238	overlapStart
AT1G02065	Symbols: SPL8 SPL8 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 8); DNA binding chr1:365209-367340 FORWARD	-1	-0.193	insideGene
AT2G03440	nodulin-related chr2:1039205-1040118 REVERSE	-1	-0.539	insideGene
AT3G10480	Symbols: ANAC050 no apical meristem (NAM) family protein chr3:3264348-3267090 FORWARD	-1	-0.512	overlapStart
AT3G32316	pseudogene, similar to AGAMOUS homolog, blastp match of 37% identity and 1.3e-07 P-value to GP 2981133 gb AAC06238.1 AF052571 AGAMOUS homolog {Populus balsamifera subsp. trichocarpa} chr3:13266253-13267125 FORWARD	-1	-0.535	overlapEnd
AT3G52525	Symbols: ATOFP6, OFP6 OFP6 (OVATE FAMILY PROTEIN 6) chr3:19475159-19475961 FORWARD	-1	-0.883	overlapEnd
AT5G29560	calcium ion binding chr5:11190543-11191963 REVERSE	-1	-0.407	overlapStart
AT1G50600	Symbols: SCL5 SCL5; transcription factor chr1:18737132-18739547 REVERSE	1	0.315	insideGene
AT1G76350	RWP-RK domain-containing protein chr1:28639577-28643086 FORWARD	1	0.298	insideGene
AT1G69170	squamosa promoter-binding protein-like 6 (SPL6) chr1:26005068-26007263 FORWARD	1	0.247	insideGene
AT2G22860	Symbols: ATPSK2 ATPSK2 (PHYTOSULFOKINE 2 PRECURSOR); growth factor chr2:9737607-9738298 FORWARD	1	0.817	overlapEnd
AT4G08300	nodulin MtN21 family protein chr4:5244891-5248342 FORWARD	1	0.255	insideGene
AT5G23660	Symbols: MTN3 MTN3 (Arabidopsis homolog of Medicago truncatula MTN3) chr5:7971651-7973925 REVERSE	1	0.376	insideGene
AT2G34680	Symbols: AIR9 AIR9; protein binding chr2:14616622-14629129 REVERSE	1	0.355	insideGene
AT3G16830	Symbols: TPR2 TPR2 (TOPLESS-RELATED 2) chr3:5731534-5737772 FORWARD	1	0.324	insideGene
AT2G22870	Symbols: EMB2001 EMB2001 (embryo defective 2001); GTP binding chr2:9739457-9741104 FORWARD	1	0.817	overlapStart
AT3G45600	Symbols: TET3 TET3 (TETRASPANIN3) chr3:16733755-16735951 REVERSE	1	0.535	overlapEnd
AT2G29060	scarecrow transcription factor family protein chr2:12481744-12486983 FORWARD	1	0.199	insideGene
AT1G20640	RWP-RK domain-containing protein chr1:7154560-7158218 FORWARD	1	0.696	overlapEnd

AT1G29400	Symbols: AML5 AML5 (ARABIDOPSIS MEI2-LIKE PROTEIN 5); RNA binding / nucleic acid binding / nucleotide binding chr1:10290040-10294478 REVERSE	1	0.235	insideGene
AT1G33270	patatin-related chr1:12068063-12070374 REVERSE	1	0.398	insideGene
AT2G32950	Symbols: COP1, ATCOP1, DET340, FUS1, EMB168 COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1); protein binding / ubiquitin-protein ligase chr2:13977933-13983535 FORWARD	1	0.488	insideGene
AT3G49660	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr3:18413613-18415579 FORWARD	1	0.503	overlapStart
AT1G28560	Symbols: SRD2 SRD2 (SHOOT REDIFFERENTIATION DEFECTIVE 2); DNA binding chr1:10038038-10041453 REVERSE	1	0.239	insideGene
AT1G69970	Symbols: CLE26 CLE26 (CLAVATA3/ESR-RELATED 26); protein binding / receptor binding chr1:26353900-26354256 REVERSE	1	0.356	overlapEnd
AT1G50030	Symbols: TOR TOR (TARGET OF RAPAMYCIN); 1-phosphatidylinositol-3-kinase/ protein binding chr1:18522441-18539995 REVERSE	1	0.425	insideGene
AT5G49680	cell expansion protein, putative chr5:20176385-20188307 FORWARD	1	0.666	insideGene
AT3G05680	Symbols: EMB2016 EMB2016 (embryo defective 2016) chr3:1660552-1672015 REVERSE	1	0.285	insideGene
AT3G10490	Symbols: anac052 anac052 (Arabidopsis NAC domain containing protein 52); transcription factor chr3:3267835-3270883 FORWARD	1	0.255	insideGene
AT5G37870	seven in absentia (SINA) family protein chr5:15073764-15074851 REVERSE	1	0.234	overlapStart
AT2G19430	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr2:8415159-8417960 FORWARD	1	0.582	insideGene
AT3G21540	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr3:7585946-7590856 REVERSE	1	0.191	insideGene
AT1G66650	seven in absentia (SINA) protein, putative chr1:24860113-24861821 REVERSE	1	0.326	overlapStart
AT1G61340	F-box family protein chr1:22628265-22630009 FORWARD	1	0.406	overlapEnd
AT1G66610	seven in absentia (SINA) protein, putative chr1:24849716-24851450 REVERSE	1	0.197	insideGene
AT4G16280	Symbols: FCA FCA; RNA binding chr4:9206597-9214825 REVERSE	1	0.439	insideGene
AT4G16280	Symbols: FCA FCA; RNA binding chr4:9206597-9214825 REVERSE	1	0.252	insideGene
AT5G15540	Symbols: EMB2773, ATSCC2, SCC2 EMB2773 (EMBRYO DEFECTIVE 2773); binding / protein binding / zinc ion binding chr5:5047887-5057411 REVERSE	1	0.368	insideGene
AT4G00800	binding / protein binding / zinc ion binding chr4:336945-345714 REVERSE	1	0.224	insideGene
AT1G32870	Symbols: ANAC13, ANAC013 ANAC13 (Arabidopsis thaliana NAC domain protein 13); transcription factor chr1:11911679-11913947 FORWARD	1	0.754	overlapStart
AT1G52730	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr1:19642490-19645134 FORWARD	1	0.23	insideGene
AT3G10500	Symbols: anac053 anac053 (Arabidopsis NAC domain containing protein 53); transcription factor chr3:3271490-3274030 FORWARD	1	0.255	overlapStart

AT1G65380	Symbols: CLV2, AtrLP10 CLV2 (clavata 2); protein binding / receptor signaling protein chr1:24286826-24289249 FORWARD	1	0.451	insideGene
AT3G30340	nodulin MtN21 family protein chr3:11956601-11959098 FORWARD	1	0.179	overlapEnd
AT5G37930	seven in absentia (SINA) family protein chr5:15102200-15103669 REVERSE	1	0.705	overlapEnd
AT3G11980	Symbols: MS2, FAR2 MS2 (MALE STERILITY 2); fatty acyl-CoA reductase (alcohol-forming)/ oxidoreductase, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor chr3:3814236-3817117 FORWARD	1	0.353	overlapEnd
AT3G43660	nodulin, putative chr3:15565224-15566047 FORWARD	1	0.234	overlapStart
AT2G23810	Symbols: TET8 TET8 (TETRASPANIN8) chr2:10135605-10137561 REVERSE	1	0.327	overlapStart
AT1G66660	seven in absentia (SINA) protein, putative chr1:24861876-24863368 REVERSE	1	0.326	insideGene
AT2G02770	holo-[acyl-carrier-protein] synthase/ magnesium ion binding chr2:775482-779786 REVERSE	1	0.368	overlapEnd
AT2G06210	Symbols: ELF8, VIP6 ELF8 (EARLY FLOWERING 8); binding chr2:2428903-2436687 REVERSE	1	0.184	insideGene
AT1G80490	Symbols: TPR1 TPR1 (TOPLESS-RELATED 1) chr1:30260903-30267038 REVERSE	1	0.183	insideGene
AT3G10480	Symbols: ANAC050 no apical meristem (NAM) family protein chr3:3264348-3267090 FORWARD	1	0.394	insideGene
AT3G13300	Symbols: VCS VCS (VARICOSE); nucleotide binding / protein homodimerization chr3:4303874-4310213 FORWARD	1	0.517	insideGene
AT3G28070	nodulin MtN21 family protein chr3:10447922-10451034 FORWARD	1	0.374	insideGene
AT3G44290	Symbols: anac060 anac060 (Arabidopsis NAC domain containing protein 60); transcription factor chr3:15972909-15975183 REVERSE	1	0.989	insideGene
AT5G27030	Symbols: TPR3 TPR3 (TOPLESS-RELATED 3) chr5:9508718-9515396 REVERSE	1	0.197	insideGene
AT5G27030	Symbols: TPR3 TPR3 (TOPLESS-RELATED 3) chr5:9508718-9515396 REVERSE	1	0.35	insideGene
Kategorie: Entwicklung (unspezifiziert)				
AT3G29970	germination protein-related chr3:11745211-11746570 FORWARD	-1	-0.656	overlapEnd
AT4G22530	embryo-abundant protein-related chr4:11859004-11860208 REVERSE	-1	-0.523	insideGene
AT2G17040	Symbols: anac036 anac036 (Arabidopsis NAC domain containing protein 36); transcription factor chr2:7407123-7408270 FORWARD	-1	-0.539	overlapEnd
AT1G31280	Symbols: AGO2 AGO2 (argonaute 2); nucleic acid binding chr1:11181711-11185344 FORWARD	-1	-0.690	insideGene
AT5G62380	Symbols: VND6, ANAC101 ANAC101 (ARABIDOPSIS NAC-DOMAIN PROTEIN 101); transcription activator/ transcription factor/ transcription regulator chr5:25050684-25051858 FORWARD	-1	-0.788	overlapEnd

AT1G27595	EXPRESSED IN: 22 plant structures; EXPRESSED DURING: 15 growth stages; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: ESP4 (ENHANCED SILENCING PHENOTYPE 4); binding (TAIR:AT5G01400.1); Has 529 Blast hits to 235 proteins in 85 species: Archae - 0; Bacteria - 3; Metazoa - 125; Fungi - 41; Plants - 31; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 329 (source: NCBI BLink). chr1:9596360-9603255 FORWARD	-1	-0.245	insideGene
AT3G18390	Symbols: EMB1865 EMB1865 (embryo defective 1865); RNA binding chr3:6313485-6317971 FORWARD	-1	-0.417	insideGene
AT5G39500	pattern formation protein, putative chr5:15815274-15820045 FORWARD	-1	-0.173	insideGene
AT5G52250	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr5:21216855-21218226 FORWARD	-1	-0.225	insideGene
AT4G10180	Symbols: DET1, FUS2, ATDET1 DET1 (DE-ETIOLATED 1); catalytic chr4:6346463-6349276 FORWARD	-1	-0.415	overlapStart
AT2G47990	Symbols: SWA1, EDA13, EDA19 SWA1 (SLOW WALKER1); nucleotide binding chr2:19636867-19638678 REVERSE	-1	-0.113	insideGene
AT1G66610	seven in absentia (SINA) protein, putative chr1:24849716-24851450 REVERSE	-1	-0.263	overlapStart
AT1G56200	Symbols: emb1303 emb1303 (embryo defective 1303) chr1:21030794-21032078 FORWARD	-1	-0.252	insideGene
AT1G63260	Symbols: TET10 TET10 (TETRASPANIN10) chr1:23466800-23469204 REVERSE	-1	-0.216	insideGene
AT2G41260	Symbols: M17, ATM17 M17 chr2:17206510-17207698 FORWARD	-1	-0.524	overlapStart
AT5G14120	nodulin family protein chr5:4555949-4558710 FORWARD	-1	-0.484	insideGene
AT3G45870	integral membrane family protein / nodulin MtN21-related chr3:16867202-16868926 FORWARD	-1	-0.238	overlapStart
AT2G03440	nodulin-related chr2:1039205-1040118 REVERSE	-1	-0.539	insideGene
AT3G10480	Symbols: ANAC050 no apical meristem (NAM) family protein chr3:3264348-3267090 FORWARD	-1	-0.512	overlapStart
AT3G32316	pseudogene, similar to AGAMOUS homolog, blastp match of 37% identity and 1.3e-07 P-value to GP 2981133 gb AAC06238.1 AF052571 AGAMOUS homolog {Populus balsamifera subsp. trichocarpa} chr3:13266253-13267125 FORWARD	-1	-0.535	overlapEnd
AT3G52525	Symbols: ATOFP6, OFP6 OFP6 (OVATE FAMILY PROTEIN 6) chr3:19475159-19475961 FORWARD	-1	-0.883	overlapEnd
AT5G29560	calcium ion binding chr5:11190543-11191963 REVERSE	-1	-0.407	overlapStart
AT1G50600	Symbols: SCL5 SCL5; transcription factor chr1:18737132-18739547 REVERSE	1	0.315	insideGene
AT1G76350	RWP-RK domain-containing protein chr1:28639577-28643086 FORWARD	1	0.298	insideGene
AT2G22860	Symbols: ATPSK2 ATPSK2 (PHYTOSULFOKINE 2 PRECURSOR); growth factor chr2:9737607-9738298 FORWARD	1	0.817	overlapEnd
AT4G08300	nodulin MtN21 family protein chr4:5244891-5248342 FORWARD	1	0.255	insideGene
AT5G23660	Symbols: MTN3 MTN3 (Arabidopsis homolog of Medicago truncatula MTN3) chr5:7971651-7973925 REVERSE	1	0.376	insideGene
AT2G34680	Symbols: AIR9 AIR9; protein binding chr2:14616622-14629129 REVERSE	1	0.355	insideGene

AT3G16830	Symbols: TPR2 TPR2 (TOPLESS-RELATED 2) chr3:5731534-5737772 FORWARD	1	0.324	insideGene
AT2G22870	Symbols: EMB2001 EMB2001 (embryo defective 2001); GTP binding chr2:9739457-9741104 FORWARD	1	0.817	overlapStart
AT3G45600	Symbols: TET3 TET3 (TETRASPANIN3) chr3:16733755-16735951 REVERSE	1	0.535	overlapEnd
AT2G29060	scarecrow transcription factor family protein chr2:12481744-12486983 FORWARD	1	0.199	insideGene
AT1G20640	RWP-RK domain-containing protein chr1:7154560-7158218 FORWARD	1	0.696	overlapEnd
AT1G29400	Symbols: AML5 AML5 (ARABIDOPSIS MEI2-LIKE PROTEIN 5); RNA binding / nucleic acid binding / nucleotide binding chr1:10290040-10294478 REVERSE	1	0.235	insideGene
AT2G32950	Symbols: COP1, ATCOP1, DET340, FUS1, EMB168 COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1); protein binding / ubiquitin-protein ligase chr2:13977933-13983535 FORWARD	1	0.488	insideGene
AT3G49660	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr3:18413613-18415579 FORWARD	1	0.503	overlapStart
AT1G28560	Symbols: SRD2 SRD2 (SHOOT REDIFFERENTIATION DEFECTIVE 2); DNA binding chr1:10038038-10041453 REVERSE	1	0.239	insideGene
AT1G69970	Symbols: CLE26 CLE26 (CLAVATA3/ESR-RELATED 26); protein binding / receptor binding chr1:26353900-26354256 REVERSE	1	0.356	overlapEnd
AT5G49680	cell expansion protein, putative chr5:20176385-20188307 FORWARD	1	0.666	insideGene
AT3G05680	Symbols: EMB2016 EMB2016 (embryo defective 2016) chr3:1660552-1672015 REVERSE	1	0.285	insideGene
AT3G10490	Symbols: anac052 anac052 (Arabidopsis NAC domain containing protein 52); transcription factor chr3:3267835-3270883 FORWARD	1	0.255	insideGene
AT5G37870	seven in absentia (SINA) family protein chr5:15073764-15074851 REVERSE	1	0.234	overlapStart
AT2G19430	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr2:8415159-8417960 FORWARD	1	0.582	insideGene
AT3G21540	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr3:7585946-7590856 REVERSE	1	0.191	insideGene
AT1G66650	seven in absentia (SINA) protein, putative chr1:24860113-24861821 REVERSE	1	0.326	overlapStart
AT1G61340	F-box family protein chr1:22628265-22630009 FORWARD	1	0.406	overlapEnd
AT1G66610	seven in absentia (SINA) protein, putative chr1:24849716-24851450 REVERSE	1	0.197	insideGene
AT4G16280	Symbols: FCA FCA; RNA binding chr4:9206597-9214825 REVERSE	1	0.252	insideGene
AT4G16280	Symbols: FCA FCA; RNA binding chr4:9206597-9214825 REVERSE	1	0.439	insideGene
AT5G15540	Symbols: EMB2773, ATSCC2, SCC2 EMB2773 (EMBRYO DEFECTIVE 2773); binding / protein binding / zinc ion binding chr5:5047887-5057411 REVERSE	1	0.368	insideGene
AT4G00800	binding / protein binding / zinc ion binding chr4:336945-345714 REVERSE	1	0.224	insideGene

AT1G32870	Symbols: ANAC13, ANAC013 ANAC13 (Arabidopsis thaliana NAC domain protein 13); transcription factor chr1:11911679-11913947 FORWARD	1	0.754	overlapStart
AT1G52730	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr1:19642490-19645134 FORWARD	1	0.230	insideGene
AT3G10500	Symbols: anac053 anac053 (Arabidopsis NAC domain containing protein 53); transcription factor chr3:3271490-3274030 FORWARD	1	0.255	overlapStart
AT1G65380	Symbols: CLV2, AtRLP10 CLV2 (clavata 2); protein binding / receptor signaling protein chr1:24286826-24289249 FORWARD	1	0.451	insideGene
AT3G30340	nodulin MtN21 family protein chr3:11956601-11959098 FORWARD	1	0.179	overlapEnd
AT5G37930	seven in absentia (SINA) family protein chr5:15102200-15103669 REVERSE	1	0.705	overlapEnd
AT3G11980	Symbols: MS2, FAR2 MS2 (MALE STERILITY 2); fatty acyl-CoA reductase (alcohol-forming)/ oxidoreductase, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor chr3:3814236-3817117 FORWARD	1	0.353	overlapEnd
AT3G43660	nodulin, putative chr3:15565224-15566047 FORWARD	1	0.234	overlapStart
AT2G23810	Symbols: TET8 TET8 (TETRASPANIN8) chr2:10135605-10137561 REVERSE	1	0.327	overlapStart
AT1G66660	seven in absentia (SINA) protein, putative chr1:24861876-24863368 REVERSE	1	0.326	insideGene
AT2G02770	holo-[acyl-carrier-protein] synthase/ magnesium ion binding chr2:775482-779786 REVERSE	1	0.368	overlapEnd
AT2G06210	Symbols: ELF8, VIP6 ELF8 (EARLY FLOWERING 8); binding chr2:2428903-2436687 REVERSE	1	0.184	insideGene
AT1G80490	Symbols: TPR1 TPR1 (TOPLESS-RELATED 1) chr1:30260903-30267038 REVERSE	1	0.183	insideGene
AT3G10480	Symbols: ANAC050 no apical meristem (NAM) family protein chr3:3264348-3267090 FORWARD	1	0.394	insideGene
AT3G13300	Symbols: VCS VCS (VARICOSE); nucleotide binding / protein homodimerization chr3:4303874-4310213 FORWARD	1	0.517	insideGene
AT3G28070	nodulin MtN21 family protein chr3:10447922-10451034 FORWARD	1	0.374	insideGene
AT3G44290	Symbols: anac060 anac060 (Arabidopsis NAC domain containing protein 60); transcription factor chr3:15972909-15975183 REVERSE	1	0.989	insideGene
AT5G27030	Symbols: TPR3 TPR3 (TOPLESS-RELATED 3) chr5:9508718-9515396 REVERSE	1	0.197	insideGene
AT5G27030	Symbols: TPR3 TPR3 (TOPLESS-RELATED 3) chr5:9508718-9515396 REVERSE	1	0.350	insideGene
Kategorie: Zelle				
AT1G04160	Symbols: XIB, ATXIB, XI-8, XI-B XIB (MYOSIN XI B); motor chr1:1086495-1096146 FORWARD	-1	-0.202	insideGene
AT1G26940	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin-type family protein chr1:9343126-9345145 FORWARD	-1	-0.886	insideGene
AT1G51405	myosin-related chr1:19057780-19059582 FORWARD	-1	-0.204	insideGene

AT1G62050	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: apoplast; EXPRESSED IN: 6 plant structures; EXPRESSED DURING: F mature embryo stage, petal differentiation and expansion stage, D bilateral stage, E expanded cotyledon stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Ankyrin (InterPro:IPR002110); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: ankyrin repeat family protein (TAIR:AT1G11740.1); Has 967 Blast hits to 722 proteins in 118 species: Archae - 0; Bacteria - 24; Metazoa - 556; Fungi - 45; Plants - 193; Viruses - 2; Other Eukaryotes - 147 (source: NCBI BLink). chr1:22936127-22939024 REVERSE	-1	-0.390	overlapStart
AT1G63640	kinesin motor protein-related chr1:23589043-23595821 REVERSE	-1	-1.096	overlapStart
AT2G18860	syntaxin family protein chr2:8164241-8165974 FORWARD	-1	-0.397	overlapEnd
AT2G27170	Symbols: TTN7, SMC3 TTN7 (TITAN7); ATP binding / protein binding chr2:11609122-11617434 REVERSE	-1	-0.122	insideGene
AT2G38360	Symbols: PRA1.B4 PRA1.B4 (PRENYLATED RAB ACCEPTOR 1.B4) chr2:16069615-16070589 REVERSE	-1	-0.406	insideGene
AT3G54670	Symbols: TTN8, SMC1, ATSMC1 TTN8 (TITAN8); ATP binding / transporter chr3:20235678-20243960 FORWARD	-1	-0.427	overlapEnd
AT4G10170	synaptobrevin-related family protein chr4:6344331-6345537 FORWARD	-1	-0.415	overlapEnd
AT4G10170	synaptobrevin-related family protein chr4:6344331-6345537 FORWARD	-1	-0.584	overlapStart
AT4G14365	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein / ankyrin repeat family protein chr4:8271464-8273765 REVERSE	-1	-1.167	overlapEnd
AT4G22540	Symbols: ORP2A ORP2A (OSBP(OXYSTEROL BINDING PROTEIN)-RELATED PROTEIN 2A); oxysterol binding / phosphoinositide binding chr4:11860444-11866364 REVERSE	-1	-0.523	overlapEnd
AT4G25590	Symbols: ADF7 ADF7 (actin depolymerizing factor 7); actin binding chr4:13058936-13060107 REVERSE	-1	-0.338	overlapEnd
AT5G01760	VHS domain-containing protein / GAT domain-containing protein chr5:291712-294304 FORWARD	-1	-0.184	insideGene
AT5G01770	Symbols: RAPTOR1A, ATRAPTOR1A, RAPTOR2 RAPTOR2 (RAPTOR2); binding / nucleotide binding chr5:294313-301984 REVERSE	-1	-0.184	overlapEnd
AT5G03340	cell division cycle protein 48, putative / CDC48, putative chr5:809948-813228 REVERSE	-1	-0.561	insideGene
AT5G41770	crooked neck protein, putative / cell cycle protein, putative chr5:16717996-16721222 FORWARD	-1	-0.297	insideGene
AT5G54610	Symbols: ANK ANK (ankyrin); protein binding chr5:22184779-22186525 REVERSE	-1	-0.428	overlapStart
AT5G54620	ankyrin repeat family protein chr5:22187761-22189746 REVERSE	-1	-0.428	overlapEnd
AT5G65274	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: regulation of actin filament polymerization; LOCATED IN: cytoskeleton; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: ARP2/3 complex 16 kDa subunit (p16-Arc) (InterPro:IPR006789); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: CRK (CROOKED); actin binding (TAIR:AT4G01710.1); Has 276 Blast hits to 276 proteins in 79 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 212; Fungi - 39; Plants - 19; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 6 (source: NCBI BLink). chr5:26085300-26085960 FORWARD	-1	-0.392	overlapEnd
AT1G20610	Symbols: CYCB2;3 CYCB2;3 (Cyclin B2;3); cyclin-dependent protein kinase regulator chr1:7134790-7137781 REVERSE	1	0.443	overlapStart
AT1G21380	VHS domain-containing protein / GAT domain-containing protein chr1:7485636-7488713 REVERSE	1	0.326	insideGene
AT1G22275	Symbols: ZYP1b, ZYP1 ZYP1b chr1:7867133-7872618 FORWARD	1	0.435	insideGene

AT1G23900	Symbols: GAMMA-ADAPTIN 1, Gamma-ADR GAMMA-ADAPTIN 1 (GAMMA-ADAPTIN 1); binding / clathrin binding / protein binding / protein transporter chr1:8441171-8447519 FORWARD	1	0.345	insideGene
AT1G27060	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein chr1:9395023-9396673 FORWARD	1	0.461	overlapEnd
AT1G28490	Symbols: SYP61, ATSYP61, OSM1 SYP61 (SYNTAXIN OF PLANTS 61); SNAP receptor chr1:10015919-10018047 FORWARD	1	0.258	insideGene
AT1G31730	epsilon-adaptin, putative chr1:11359642-11364288 FORWARD	1	0.195	insideGene
AT1G47750	Symbols: PEX11A PEX11A (PEROXIN 11A) chr1:17569256-17570159 REVERSE	1	0.448	overlapEnd
AT1G49040	Symbols: SCD1 SCD1 (STOMATAL CYTOKINESIS-DEFECTIVE 1); protein binding chr1:18139234-18148981 REVERSE	1	0.439	insideGene
AT1G52360	coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime), putative chr1:19499162-19506170 FORWARD	1	0.293	insideGene
AT1G54090	Symbols: ATEXO70D2 ATEXO70D2 (exocyst subunit EXO70 family protein D2); protein binding chr1:20189567-20191900 FORWARD	1	0.550	overlapStart
AT1G69390	Symbols: ATMINE1 ATMINE1 (Arabidopsis homologue of bacterial MinE 1); protein binding chr1:26084635-26086481 FORWARD	1	0.221	insideGene
AT1G69400	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr1:26086961-26089020 FORWARD	1	0.221	overlapStart
AT1G70620	cyclin-related chr1:26626566-26631104 FORWARD	1	0.202	insideGene
AT1G78770	Symbols: APC6 cell division cycle family protein chr1:29616919-29621447 FORWARD	1	0.206	insideGene
AT2G01910	Symbols: ATMAP65-6, MAP65-6 ATMAP65-6; microtubule binding chr2:416911-420587 FORWARD	1	0.233	insideGene
AT2G04740	ankyrin repeat family protein chr2:1657121-1659689 FORWARD	1	0.210	overlapStart
AT2G04750	fimbrin-like protein, putative chr2:1659762-1662748 REVERSE	1	0.397	insideGene
AT2G16600	Symbols: ROC3 ROC3; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase chr2:7200807-7201574 FORWARD	1	0.780	overlapStart
AT2G20290	Symbols: XIG, ATXIG XIG; motor/ protein binding chr2:8743275-8751878 REVERSE	1	0.202	insideGene
AT2G21380	kinesin motor protein-related chr2:9141631-9149309 FORWARD	1	0.367	insideGene
AT2G32900	Symbols: ATZW10 ATZW10 chr2:13953731-13957748 FORWARD	1	0.646	insideGene
AT2G34560	katanin, putative chr2:14560188-14562950 FORWARD	1	0.264	insideGene
AT2G38440	Symbols: ITB1, SCAR2, DIS3, WAVE4, ATSCAR2 SCAR2 (SCAR HOMOLOG 2) chr2:16095329-16101221 FORWARD	1	0.222	insideGene
AT2G38440	Symbols: ITB1, SCAR2, DIS3, WAVE4, ATSCAR2 SCAR2 (SCAR HOMOLOG 2) chr2:16095329-16101221 FORWARD	1	0.243	insideGene
AT2G40380	Symbols: PRA1.B2 PRA1.B2 (PRENYLATED RAB ACCEPTOR 1.B2) chr2:16864495-16865442 REVERSE	1	0.450	insideGene

AT2G41740	Symbols: VLN2, ATVLN2 VLN2 (VILLIN 2); actin binding chr2:17410715-17417740 REVERSE	1	0.422	insideGene
AT3G05480	Symbols: ATRAD9, RAD9 RAD9 chr3:1585334-1588238 FORWARD	1	0.282	insideGene
AT3G05710	Symbols: SYP43, ATSYP43 SYP43 (SYNTAXIN OF PLANTS 43); SNAP receptor chr3:1685003-1687558 FORWARD	1	0.738	insideGene
AT3G09740	Symbols: SYP71, ATSYP71 SYP71 (SYNTAXIN OF PLANTS 71); protein transporter chr3:2989431-2991661 FORWARD	1	0.337	overlapStart
AT3G09840	Symbols: CDC48, ATCDC48, CDC48A CDC48 (CELL DIVISION CYCLE 48); ATPase/ identical protein binding chr3:3019340-3023052 FORWARD	1	0.198	insideGene
AT3G10220	tubulin folding cofactor B chr3:3161757-3164231 FORWARD	1	0.457	overlapEnd
AT3G10380	Symbols: SEC8, ATSEC8 SEC8 (SUBUNIT OF EXOCYST COMPLEX 8) chr3:3219523-3228933 REVERSE	1	0.289	insideGene
AT3G12280	Symbols: RBR1, RBR, RB, ATRBR1 RBR1 (RETINOBLASTOMA-RELATED 1); transcription factor binding chr3:3913412-3919133 REVERSE	1	0.440	insideGene
AT3G21481	Pseudogene of AT4G34870; ROC5 (ROTAMASE CYP 5); peptidyl-prolyl cis-trans isomerase chr3:7572232-7572483 REVERSE	1	0.252	overlapEnd
AT3G27530	Symbols: GC6 GC6 (golgin candidate 6); binding / protein transporter chr3:10193569-10200013 REVERSE	1	0.220	insideGene
AT3G27530	Symbols: GC6 GC6 (golgin candidate 6); binding / protein transporter chr3:10193569-10200013 REVERSE	1	0.251	insideGene
AT3G50630	Symbols: KRP2, ICK2 KRP2 (KIP-RELATED PROTEIN 2); cyclin-dependent protein kinase inhibitor/ kinase inhibitor/ protein binding chr3:18800380-18801587 FORWARD	1	0.446	overlapStart
AT3G52750	Symbols: FTSZ2-2 FTSZ2-2; GTP binding / GTPase/ structural molecule chr3:19549661-19553014 REVERSE	1	0.178	insideGene
AT3G55005	Symbols: TON1B TON1B (tonneau 1b) chr3:20383956-20386382 FORWARD	1	0.212	insideGene
AT3G61570	Symbols: GC3, GDAP1 GDAP1 (GRIP-RELATED ARF-BINDING DOMAIN-CONTAINING ARABIDOPSIS PROTEIN 1); protein binding chr3:22779441-22783834 REVERSE	1	0.327	insideGene
AT3G61710	Symbols: ATATG6 autophagy protein Apg6 family chr3:22839315-22842432 REVERSE	1	0.280	overlapEnd
AT3G63480	kinesin heavy chain, putative chr3:23440887-23444006 REVERSE	1	0.185	insideGene
AT4G02660	WD-40 repeat family protein / beige-related chr4:1159667-1174321 REVERSE	1	0.369	insideGene
AT4G03505	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: cellular_component unknown; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: ankyrin repeat family protein (TAIR:AT4G03470.1); Has 30 Blast hits to 30 proteins in 1 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 30; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink). chr4:1556888-1557319 REVERSE	1	0.390	overlapStart
AT4G11380	beta-adaptin, putative chr4:6920501-6925969 FORWARD	1	0.243	insideGene
AT4G12770	heat shock protein binding chr4:7506382-7511566 REVERSE	1	1.111	overlapEnd
AT4G14150	Symbols: PAKRP1, KINESIN-12A PAKRP1 (PHRAGMOPLAST-ASSOCIATED KINESIN-RELATED PROTEIN 1); microtubule motor/ plus-end-directed microtubule motor chr4:8158572-8165008 REVERSE	1	0.278	insideGene

AT4G19560	Symbols: CYCT1;2 CYCT1;2; cyclin-dependent protein kinase chr4:10661428-10664716 FORWARD	1	0.183	insideGene
AT4G32760	protein transporter chr4:15799138-15804175 FORWARD	1	0.235	insideGene
AT4G33060	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin-type family protein chr4:15948490-15952223 FORWARD	1	0.285	insideGene
AT5G07660	structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein chr5:2422839-2429912 FORWARD	1	0.518	insideGene
AT5G12350	Ran GTPase binding / chromatin binding / zinc ion binding chr5:3995342-4000801 FORWARD	1	0.542	insideGene
AT5G12370	Symbols: SEC10 SEC10 (EXOCYST COMPLEX COMPONENT SEC10) chr5:4002775-4008804 REVERSE	1	0.514	insideGene
AT5G13990	Symbols: ATEXO70C2 ATEXO70C2 (exocyst subunit EXO70 family protein C2); protein binding chr5:4514568-4516892 REVERSE	1	0.189	overlapEnd
AT5G20470	myosin, putative chr5:6916324-6920120 REVERSE	1	0.412	overlapEnd
AT5G22770	Symbols: alpha-ADR alpha-ADR (alpha-adaptin); binding / protein binding / protein transporter chr5:7579544-7588246 REVERSE	1	0.200	insideGene
AT5G22780	adaptin family protein chr5:7589854-7598049 REVERSE	1	0.245	insideGene
AT5G27000	Symbols: ATK4, KATD ATK4 (ARABIDOPSIS THALIANA KINESIN 4); ATPase/ microtubule binding / microtubule motor chr5:9498052-9503134 FORWARD	1	0.485	insideGene
AT5G37590	binding chr5:14927313-14932787 REVERSE	1	0.257	insideGene
AT5G37590	binding chr5:14927313-14932787 REVERSE	1	0.279	insideGene
AT5G43900	Symbols: MYA2, ATMYA2, XI-2, XI-6 MYA2 (ARABIDOPSIS MYOSIN 2); GTP-dependent protein binding / Rab GTPase binding / motor chr5:17656911-17666826 REVERSE	1	0.196	insideGene
AT5G43900	Symbols: MYA2, ATMYA2, XI-2, XI-6 MYA2 (ARABIDOPSIS MYOSIN 2); GTP-dependent protein binding / Rab GTPase binding / motor chr5:17656911-17666826 REVERSE	1	0.330	insideGene
AT5G48600	Symbols: ATSMC3, ATCAP-C, ATSMC4 ATSMC3 (ARABIDOPSIS THALIANA STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 3); ATP binding / transporter chr5:19701877-19709130 FORWARD	1	0.403	insideGene
AT5G49880	mitotic checkpoint family protein chr5:20282165-20288084 FORWARD	1	0.418	overlapEnd
AT5G54280	Symbols: ATM2, ATMYOS1, ATM4 ATM2 (ARABIDOPSIS THALIANA MYOSIN 2); motor chr5:22039389-22046298 REVERSE	1	0.273	insideGene
AT5G54710	ankyrin repeat family protein chr5:22227574-22230500 REVERSE	1	0.217	overlapStart
AT5G60870	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein chr5:24485655-24487784 REVERSE	1	0.182	overlapEnd
AT5G60930	chromosome-associated kinesin, putative chr5:24515398-24522511 REVERSE	1	0.347	insideGene
AT5G62250	Symbols: MAP65-9 MAP65-9 (MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 65-9) chr5:25005756-25008096 FORWARD	1	0.560	overlapStart

AT5G65930	Symbols: ZWI, PKCBP, KCBP ZWI (ZWICHEL); calmodulin binding / microtubule motor chr5:26370201-26376520 REVERSE	1	0.920	insideGene
Kategorie: Zellteilung				
AT5G03340	cell division cycle protein 48, putative / CDC48, putative chr5:809948-813228 REVERSE	-1	-0.561	insideGene
AT2G27170	Symbols: TTN7, SMC3 TTN7 (TITAN7); ATP binding / protein binding chr2:11609122-11617434 REVERSE	-1	-0.122	insideGene
AT3G54670	Symbols: TTN8, SMC1, ATSMC1 TTN8 (TITAN8); ATP binding / transporter chr3:20235678-20243960 FORWARD	-1	-0.427	overlapEnd
AT5G49880	mitotic checkpoint family protein chr5:20282165-20288084 FORWARD	1	0.418	overlapEnd
AT5G12350	Ran GTPase binding / chromatin binding / zinc ion binding chr5:3995342-4000801 FORWARD	1	0.542	insideGene
AT1G27060	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein chr1:9395023-9396673 FORWARD	1	0.461	overlapEnd
AT5G60870	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein chr5:24485655-24487784 REVERSE	1	0.182	overlapEnd
AT5G07660	structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein chr5:2422839-2429912 FORWARD	1	0.518	insideGene
AT1G78770	Symbols: APC6 cell division cycle family protein chr1:29616919-29621447 FORWARD	1	0.206	insideGene
AT1G69390	Symbols: ATMINE1 ATMINE1 (Arabidopsis homologue of bacterial MinE 1); protein binding chr1:26084635-26086481 FORWARD	1	0.221	insideGene
AT5G48600	Symbols: ATSMC3, ATCAP-C, ATSMC4 ATSMC3 (ARABIDOPSIS THALIANA STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 3); ATP binding / transporter chr5:19701877-19709130 FORWARD	1	0.403	insideGene
AT2G32900	Symbols: ATZW10 ATZW10 chr2:13953731-13957748 FORWARD	1	0.646	insideGene
AT3G09840	Symbols: CDC48, ATCDC48, CDC48A CDC48 (CELL DIVISION CYCLE 48); ATPase/ identical protein binding chr3:3019340-3023052 FORWARD	1	0.198	insideGene
AT3G52750	Symbols: FTSZ2-2 FTSZ2-2; GTP binding / GTPase/ structural molecule chr3:19549661-19553014 REVERSE	1	0.178	insideGene
AT3G12280	Symbols: RBR1, RBR, RB, ATRBR1 RBR1 (RETINOBLASTOMA-RELATED 1); transcription factor binding chr3:3913412-3919133 REVERSE	1	0.440	insideGene
AT1G49040	Symbols: SCD1 SCD1 (STOMATAL CYTOKINESIS-DEFECTIVE 1); protein binding chr1:18139234-18148981 REVERSE	1	0.439	insideGene
AT1G22275	Symbols: ZYP1b, ZYP1 ZYP1b chr1:7867133-7872618 FORWARD	1	0.435	insideGene
AT1G69400	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr1:26086961-26089020 FORWARD	1	0.221	overlapStart
Kategorie: Cytochrom P450				
AT2G05870	transposable element gene chr2:2249081-2249999 REVERSE	-1	-0.406	overlapStart
AT3G26320	Symbols: CYP71B36 CYP71B36; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr3:9644383-9646064 REVERSE	-1	-0.575	overlapEnd

AT3G26310	Symbols: CYP71B35 CYP71B35; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr3:9641089-9642779 REVERSE	-1	-0.575	overlapStart
AT1G64900	Symbols: CYP89A2, CYP89 CYP89A2 (CYTOCHROME P450 89A2); electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr1:24113215-24114984 FORWARD	-1	-0.684	insideGene
AT3G26270	Symbols: CYP71B25 CYP71B25; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr3:9627562-9629200 REVERSE	-1	-0.425	overlapEnd
AT5G44620	Symbols: CYP706A3 CYP706A3; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr5:17997779-17999558 REVERSE	-1	-0.238	overlapEnd
AT3G28740	Symbols: CYP81D1 CYP81D1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr3:10788698-10790553 REVERSE	-1	-0.420	overlapStart
AT3G26210	Symbols: CYP71B23 CYP71B23; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr3:9593132-9595243 REVERSE	-1	-0.467	overlapEnd
AT5G36140	Symbols: CYP716A2 CYP716A2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase chr5:14212212-14213259 REVERSE	-1	-0.318	overlapEnd
AT4G15360	Symbols: CYP705A3 CYP705A3; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr4:8770185-8771899 FORWARD	-1	-0.376	overlapEnd
AT3G20080	Symbols: CYP705A15 CYP705A15; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr3:7008774-7010677 FORWARD	-1	-0.351	insideGene
AT5G42580	Symbols: CYP705A12 CYP705A12; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr5:17023646-17025229 REVERSE	-1	-0.245	insideGene
AT1G66540	cytochrome P450, putative chr1:24824459-24826586 FORWARD	-1	-0.108	insideGene
AT2G23220	Symbols: CYP81D6 CYP81D6; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr2:9884550-9886752 FORWARD	-1	-0.966	overlapEnd
AT1G33730	Symbols: CYP76C5 CYP76C5; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr1:12227279-12228460 FORWARD	-1	-0.350	overlapEnd
AT3G48290	Symbols: CYP71A24 CYP71A24; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr3:17882556-17884268 FORWARD	-1	-0.305	insideGene
AT4G12320	Symbols: CYP706A6 CYP706A6; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr4:7314778-7316669 REVERSE	-1	-0.343	overlapEnd
AT1G55940	Symbols: CYP708A1 CYP708A1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr1:20922459-20925619 REVERSE	1	0.236	overlapEnd
AT5G47990	Symbols: CYP705A5, THAD, THAD1 CYP705A5; oxygen binding / thalian-diol desaturase chr5:19434827-19436689 FORWARD	1	0.326	overlapEnd
AT5G57260	Symbols: CYP71B10 CYP71B10; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr5:23198637-23200318 REVERSE	1	0.168	overlapEnd
AT1G50560	Symbols: CYP705A25 CYP705A25; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr1:18724207-18726272 FORWARD	1	0.296	overlapStart
AT1G65340	Symbols: CYP96A3 CYP96A3; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr1:24268135-24269646 REVERSE	1	0.402	overlapStart

AT5G57260	Symbols: CYP71B10 CYP71B10; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding chr5:23198637-23200318 REVERSE	1	0.168	overlapEnd
AT1G50550	Symbols: CYP705A26P a cytochrome P450 pseudogene chr1:18721898-18722866 FORWARD	1	0.296	overlapEnd
AT4G07031	transposable element gene chr4:4106542-4107491 FORWARD	1	0.378	insideGene
Kategorie: Signalübertragung				
AT2G10450	14-3-3 protein, putative / grf15, putative chr2:4020305-4020773 FORWARD	-1	-0.731	overlapEnd
AT3G10300	calcium-binding EF hand family protein chr3:3186321-3188301 FORWARD	-1	-0.572	insideGene
AT2G38800	calmodulin-binding protein-related chr2:16216999-16219159 FORWARD	-1	-0.595	overlapStart
AT3G59470	far-red impaired responsive family protein / FAR1 family protein chr3:21978961-21980544 REVERSE	-1	-0.318	overlapStart
AT3G21945	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: cellular_component unknown; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF26 (InterPro:IPR002902); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: receptor-like protein kinase-related (TAIR:AT2G31620.1). chr3:7732458-7733294 FORWARD	-1	-0.135	insideGene
AT4G39520	GTP-binding protein, putative chr4:18370968-18374204 REVERSE	-1	-0.304	insideGene
AT4G39520	GTP-binding protein, putative chr4:18370968-18374204 REVERSE	-1	-0.438	overlapStart
AT3G23750	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein chr3:8558332-8561428 FORWARD	-1	-0.133	overlapStart
AT1G33670	leucine-rich repeat family protein chr1:12201963-12203408 FORWARD	-1	-0.383	overlapEnd
AT3G05990	leucine-rich repeat family protein chr3:1796852-1799870 REVERSE	-1	-0.223	overlapStart
AT1G51850	leucine-rich repeat protein kinase, putative chr1:19252847-19256783 REVERSE	-1	-0.513	overlapEnd
AT2G14440	leucine-rich repeat protein kinase, putative chr2:6143073-6147419 FORWARD	-1	-0.524	insideGene
AT1G34110	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative chr1:12417176-12421189 REVERSE	-1	-0.136	overlapStart
AT3G28040	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative chr3:10435057-10438391 FORWARD	-1	-0.415	overlapStart
AT2G47860	phototropic-responsive NPH3 family protein chr2:19599979-19602192 FORWARD	-1	-0.402	insideGene
AT4G04500	protein kinase family protein chr4:2238411-2240865 FORWARD	-1	-0.277	overlapEnd
AT4G04510	protein kinase family protein chr4:2242122-2244930 FORWARD	-1	-0.277	overlapStart
AT4G11470	protein kinase family protein chr4:6967729-6970161 FORWARD	-1	-0.804	overlapEnd
AT4G11480	protein kinase family protein chr4:6971408-6973799 FORWARD	-1	-0.804	overlapStart
AT4G11490	protein kinase family protein chr4:6978848-6981548 FORWARD	-1	-0.358	overlapEnd

AT5G24080	protein kinase family protein chr5:8139253-8141122 REVERSE	-1	-0.515	overlapEnd
AT1G51840	protein kinase-related chr1:19249449-19250709 REVERSE	-1	-0.513	overlapStart
AT1G62090	pseudogene, protein kinase family, similar to light repressible receptor protein kinase (LRRPK) (Arabidopsis thaliana) GI:1321686; contains Pfam profiles PF02536: mTERF, PF00069: Protein kinase domain, PF00560: Leucine Rich Repeat; blastp match of 38% identity and 1.7e-162 P-value to GP 9837280 gb AAG00510.1 AF285172 leaf senescence-associated receptor-like protein kinase {Phaseolus vulgaris} chr1:22950681-22955118 REVERSE	-1	-0.256	overlapEnd
AT4G11500	pseudogene, similar to putative receptor-like serine-threonine protein kinase, blastp match of 59% identity and 6.5e-66 P-value to GP 18076583 emb CAC84552.1 AJ306626 putative receptor-like serine-threonine protein kinase {Solanum tuberosum} chr4:6982597-6983619 FORWARD	-1	-0.358	overlapStart
AT3G45860	receptor-like protein kinase, putative chr3:16863401-16866041 REVERSE	-1	-0.238	overlapStart
AT1G60860	Symbols: AGD2 AGD2 (ARF-GAP DOMAIN 2); ARF GTPase activator/ protein binding / zinc ion binding chr1:22401244-22407777 REVERSE	-1	-0.382	insideGene
AT5G62390	Symbols: ATBAG7 ATBAG7 (ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 7); calmodulin binding chr5:25051978-25054289 REVERSE	-1	-0.788	insideGene
AT5G11180	Symbols: ATGLR2.6, GLR2.6 ATGLR2.6; intracellular ligand-gated ion channel chr5:3557261-3561575 REVERSE	-1	-0.214	insideGene
AT4G18800	Symbols: ATHSGBP, ATRAB11B, ATRABA1D ATRABA1D (ARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG A1D); GTP binding chr4:10319862-10321551 REVERSE	-1	-0.468	overlapEnd
AT4G01370	Symbols: ATMPK4, MPK4 ATMPK4 (ARABIDOPSIS THALIANA MAP KINASE 4); MAP kinase/ kinase chr4:567095-569088 FORWARD	-1	-0.698	overlapStart
AT3G47290	Symbols: ATPLC8, PLC8 phosphoinositide-specific phospholipase C family protein chr3:17420510-17423588 FORWARD	-1	-0.310	insideGene
AT2G21880	Symbols: ATRAB7A, ATRABG2 ATRAB7A; GTP binding chr2:9324633-9326321 REVERSE	-1	-1.195	overlapEnd
AT1G31650	Symbols: ATROPGEF14, ROPGEF14 ROPGEF14; Rho guanyl-nucleotide exchange factor chr1:11326301-11330738 REVERSE	-1	-0.516	overlapEnd
AT5G66210	Symbols: CPK28 CPK28; ATP binding / calcium ion binding / calmodulin-dependent protein kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase chr5:26456291-26459624 REVERSE	-1	-0.281	overlapEnd
AT1G50700	Symbols: CPK33 CPK33; ATP binding / calcium ion binding / calmodulin-dependent protein kinase/ kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase chr1:18781914-18784582 FORWARD	-1	-0.152	insideGene
AT1G80010	Symbols: FR58 FR58 (FAR1-related sequence 8); zinc ion binding chr1:30097401-30099846 FORWARD	-1	-0.524	insideGene
AT2G26990	Symbols: FUS12, ATCSN2, COP12, CSN2 FUS12 (FUSCA 12) chr2:11519507-11522587 REVERSE	-1	-0.218	insideGene
AT5G28490	Symbols: LSH1 LSH1 (LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS 1) chr5:10454393-10455196 REVERSE	-1	-0.128	insideGene
AT2G47590	Symbols: PHR2 PHR2 (photolyase/blue-light receptor 2); DNA photolyase chr2:19521797-19524063 FORWARD	-1	-0.391	insideGene
AT1G60987	Symbols: SCRL5 SCRL5 (SCR-Like 5) chr1:22460377-22461164 FORWARD	-1	-0.360	overlapStart
AT5G13300	Symbols: SFC, VAN3, AGD3 SFC (SCARFACE); ARF GTPase activator/ phosphoinositide binding chr5:4255601-4262314 REVERSE	-1	-0.261	insideGene

AT5G37770	Symbols: TCH2, CML24 TCH2 (TOUCH 2); calcium ion binding chr5:14998854-14999619 REVERSE	-1	-0.286	overlapStart
AT3G22380	Symbols: TIC TIC (TIME FOR COFFEE) chr3:7912905-7919510 FORWARD	-1	-0.196	insideGene
AT3G24929	unknown protein chr3:9104495-9105648 FORWARD weakly similar to (131)AT5G38260serine/threonine protein kinase, putative chr5:15300922-15303067 REVERSE	-1	-0.181	overlapStart
AT4G32710	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase chr4:15781045-15783461 FORWARD	1	0.287	insideGene
AT1G10850	ATP binding / protein binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase chr1:3611747-3614613 FORWARD	1	0.360	insideGene
AT2G27060	ATP binding / protein binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase chr2:11551041-11554775 FORWARD	1	0.769	insideGene
AT2G17930	binding / inositol or phosphatidylinositol kinase/ phosphotransferase, alcohol group as acceptor chr2:7784288-7802230 REVERSE	1	0.206	insideGene
AT2G32450	calcium-binding EF hand family protein chr2:13778449-13781258 FORWARD	1	0.190	insideGene
AT5G28830	calcium-binding EF hand family protein chr5:10856791-10858668 FORWARD	1	0.430	overlapEnd
AT2G22950	calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type, putative / Ca2+ATPase, putative (ACA7) chr2:9766127-9769766 FORWARD	1	0.358	insideGene
AT5G10680	calmodulin-binding protein-related chr5:3373584-3374309 FORWARD	1	0.661	insideGene
AT4G01090	extra-large G-protein-related chr4:470515-473792 REVERSE	1	0.198	overlapStart
AT4G12850	far-red impaired responsive family protein / FAR1 family protein chr4:7537068-7538276 FORWARD	1	0.355	overlapEnd
AT3G22020	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: cellular_component unknown; EXPRESSED IN: 6 plant structures; EXPRESSED DURING: 4 anthesis, petal differentiation and expansion stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF26 (InterPro:IPR002902); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: receptor-like protein kinase-related (TAIR:AT3G22040.1); Has 774 Blast hits to 762 proteins in 12 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 774; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLINK). chr3:7756577-7757491 FORWARD	1	0.443	overlapStart
AT5G08650	GTP-binding protein LepA, putative chr5:2806323-2813264 REVERSE	1	0.622	insideGene
AT3G60860	guanine nucleotide exchange family protein chr3:22484804-22491722 FORWARD	1	0.403	insideGene
AT3G56600	inositol or phosphatidylinositol kinase/ phosphotransferase, alcohol group as acceptor chr3:20968444-20970913 FORWARD	1	0.226	insideGene
AT1G51790	kinase chr1:19206711-19211417 REVERSE	1	0.424	insideGene
AT4G08850	kinase chr4:5636489-5640636 REVERSE	1	0.458	insideGene
AT1G53430	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein chr1:19935167-19941088 FORWARD	1	0.247	insideGene
AT1G56145	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein chr1:21008093-21014012 REVERSE	1	0.554	insideGene
AT1G56145	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein chr1:21008093-21014012 REVERSE	1	0.262	insideGene

AT1G67510	leucine-rich repeat family protein chr1:25297477-25300184 REVERSE	1	0.203	overlapStart
AT5G06940	leucine-rich repeat family protein chr5:2148078-2150771 REVERSE	1	0.458	insideGene
AT1G07550	leucine-rich repeat protein kinase, putative chr1:2322653-2326561 REVERSE	1	0.219	overlapEnd
AT1G35710	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative chr1:13220940-13224681 FORWARD	1	0.213	insideGene
AT1G63430	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative chr1:23522608-23526770 FORWARD	1	0.179	insideGene
AT1G72180	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative chr1:27162820-27167430 FORWARD	1	0.709	insideGene
AT3G28040	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative chr3:10435057-10438391 FORWARD	1	0.252	insideGene
AT5G51350	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative chr5:20867602-20870745 REVERSE	1	0.314	overlapEnd
AT1G64460	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein chr1:23943499-23944680 REVERSE	1	0.299	overlapStart
AT1G34260	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase family protein chr1:12485967-12492169 FORWARD	1	0.414	insideGene
AT3G14205	phosphoinositide phosphatase family protein chr3:4715707-4720951 REVERSE	1	0.312	insideGene
AT5G52390	photoassimilate-responsive protein, putative chr5:21263936-21265264 REVERSE	1	0.165	insideGene
AT1G67900	phototropic-responsive NPH3 family protein chr1:25467024-25470017 FORWARD	1	0.519	insideGene
AT5G48800	phototropic-responsive NPH3 family protein chr5:19786764-19789129 FORWARD	1	0.548	insideGene
AT2G15900	phox (PX) domain-containing protein chr2:6927390-6932704 FORWARD	1	0.592	overlapEnd
AT5G12150	pleckstrin homology (PH) domain-containing protein / RhoGAP domain-containing protein chr5:3924126-3930305 REVERSE	1	0.550	insideGene
AT5G12150	pleckstrin homology (PH) domain-containing protein / RhoGAP domain-containing protein chr5:3924126-3930305 REVERSE	1	0.375	insideGene
AT1G51940	protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein chr1:19295904-19299118 REVERSE	1	0.238	insideGene
AT1G49270	protein kinase family protein chr1:18227334-18230227 REVERSE	1	0.487	insideGene
AT1G04830	RabGAP/TBC domain-containing protein chr1:1358917-1361981 REVERSE	1	0.432	insideGene
AT1G08340	rac GTPase activating protein, putative chr1:2631068-2632871 FORWARD	1	0.383	insideGene
AT1G52380	Ran-binding protein 1 domain-containing protein / RanBP1 domain-containing protein chr1:19508983-19511539 FORWARD	1	0.241	insideGene
AT5G06120	Ran-binding protein, putative chr5:1844078-1852601 FORWARD	1	0.496	insideGene

AT3G22010	receptor-like protein kinase-related chr3:7754311-7755762 FORWARD	1	0.443	overlapEnd
AT1G66880	serine/threonine protein kinase family protein chr1:24946928-24955611 FORWARD	1	0.312	insideGene
AT5G38210	serine/threonine protein kinase family protein chr5:15261005-15265630 FORWARD	1	0.305	overlapEnd
AT5G15730	serine/threonine protein kinase, putative chr5:5130503-5133187 FORWARD	1	0.182	insideGene
AT1G61490	S-locus protein kinase, putative chr1:22685154-22688267 REVERSE	1	0.307	overlapStart
AT3G12000	S-locus related protein SLR1, putative (S1) chr3:3818262-3819620 REVERSE	1	0.353	overlapEnd
AT5G61530	small G protein family protein / RhoGAP family protein chr5:24742048-24744784 FORWARD	1	0.207	insideGene
AT3G59420	Symbols: ACR4 ACR4 (ARABIDOPSIS CRINKLY4); kinase/ transmembrane receptor protein kinase chr3:21959647-21963041 REVERSE	1	0.266	insideGene
AT3G29160	Symbols: AKIN11, SnRK1.2, KIN11 AKIN11 (Arabidopsis SNF1 kinase homolog 11); protein binding / protein kinase chr3:11128625-11132065 REVERSE	1	0.440	insideGene
AT2G20300	Symbols: ALE2 ALE2 (Abnormal Leaf Shape 2); kinase chr2:8755925-8760222 REVERSE	1	0.280	insideGene
AT3G46060	Symbols: ARA3, ARA-3, ATRABE1C, ATRAB8A ATRAB8A; GTP binding chr3:16917589-16920018 FORWARD	1	0.420	insideGene
AT3G51300	Symbols: ARAC11, ROP1, ROP1AT, ATRAC11, ATROP1 ROP1 (RHO-RELATED PROTEIN FROM PLANTS 1); GTP binding / GTPase activating protein binding / GTPase/ protein binding chr3:19042887-19044372 FORWARD	1	0.230	overlapStart
AT3G51300	Symbols: ARAC11, ROP1, ROP1AT, ATRAC11, ATROP1 ROP1 (RHO-RELATED PROTEIN FROM PLANTS 1); GTP binding / GTPase activating protein binding / GTPase/ protein binding chr3:19042887-19044372 FORWARD	1	0.356	overlapEnd
AT4G35950	Symbols: ARAC6, RAC2, ATROP5, ATRAC6, ROP5 ARAC6 (ARABIDOPSIS RAC-LIKE 6); GTP binding chr4:17023837-17025863 REVERSE	1	0.280	overlapStart
AT3G20290	Symbols: ATEHD1 ATEHD1 (EPS15 HOMOLOG DOMAIN 1); GTP binding / GTPase/ calcium ion binding chr3:7074817-7078871 REVERSE	1	0.334	insideGene
AT1G59580	Symbols: ATMPK2, MPK2 ATMPK2 (ARABIDOPSIS THALIANA MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE HOMOLOG 2); MAP kinase/ kinase/ protein kinase chr1:21884043-21886051 FORWARD	1	0.593	insideGene
AT5G60860	Symbols: AtRABA1f AtRABA1f (Arabidopsis Rab GTPase homolog A1f); GTP binding chr5:24484622-24485705 FORWARD	1	0.182	insideGene
AT4G09720	Symbols: ATRABG3A Ras-related GTP-binding protein, putative chr4:6132917-6135183 FORWARD	1	0.532	insideGene
AT5G05940	Symbols: ATROPGEF5, ROPGEF5 ROPGEF5 (ROP GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR 5); Rho guanyl-nucleotide exchange factor chr5:1785927-1788436 FORWARD	1	0.386	insideGene
AT1G22620	Symbols: ATSAC1 ATSAC1 (suppressor of actin 1); phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase chr1:7997676-8002944 REVERSE	1	0.177	insideGene
AT4G17615	Symbols: CBL1, ATCBL1, SCABP5 CBL1 (CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 1); calcium ion binding chr4:9816452-9819312 FORWARD	1	0.221	overlapEnd

AT2G03150	Symbols: emb1579 emb1579 (embryo defective 1579); binding / calcium ion binding chr2:951933-959188 FORWARD	1	0.461	insideGene
AT2G03150	Symbols: emb1579 emb1579 (embryo defective 1579); binding / calcium ion binding chr2:951933-959188 FORWARD	1	0.304	insideGene
AT2G32250	Symbols: FRS2 FRS2 (FAR1-related sequence 2); zinc ion binding chr2:13693105-13696932 FORWARD	1	0.213	insideGene
AT1G51960	Symbols: IQD27 IQD27 (IQ-domain 27); calmodulin binding chr1:19310355-19311683 FORWARD	1	0.518	insideGene
AT1G48050	Symbols: KU80, ATKU80 KU80; double-stranded DNA binding / protein binding chr1:17723452-17727043 FORWARD	1	0.334	insideGene
AT3G13530	Symbols: MAPKKK7, MAP3KE1 MAPKKK7; ATP binding / binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase chr3:4411688-4419320 REVERSE	1	0.242	insideGene
AT3G13530	Symbols: MAPKKK7, MAP3KE1 MAPKKK7; ATP binding / binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase chr3:4411688-4419320 REVERSE	1	0.180	insideGene
AT3G05310	Symbols: MIRO3 MIRO3; GTP binding chr3:1510160-1513301 FORWARD	1	0.369	insideGene
AT1G78610	Symbols: MSL6 MSL6 (MECHANOSENSITIVE CHANNEL OF SMALL CONDUCTANCE-LIKE 6) chr1:29569030-29572126 REVERSE	1	0.193	insideGene
AT5G54490	Symbols: PBP1 PBP1 (PINOID-BINDING PROTEIN 1); calcium ion binding / protein binding chr5:22121404-22121931 FORWARD	1	0.288	overlapEnd
AT2G41210	Symbols: PIP5K5 PIP5K5 (PHOSPHATIDYLINOSITOL- 4-PHOSPHATE 5-KINASE 5); 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase chr2:17173413-17176807 FORWARD	1	0.278	overlapEnd
AT1G69270	Symbols: RPK1 RPK1 (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1); kinase/ protein binding / receptor signaling protein serine/threonine kinase chr1:26040689-26042702 REVERSE	1	0.797	insideGene
AT3G59770	Symbols: SAC9 SAC9; inositol or phosphatidylinositol phosphatase chr3:22079033-22086149 REVERSE	1	0.182	insideGene
AT3G59770	Symbols: SAC9 SAC9; inositol or phosphatidylinositol phosphatase chr3:22079033-22086149 REVERSE	1	0.168	insideGene
AT1G53730	Symbols: SRF6 SRF6 (STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 6); ATP binding / protein binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase chr1:20061701-20065713 FORWARD	1	0.602	insideGene
AT4G12860	Symbols: UNE14 UNE14 (unfertilized embryo sac 14); calcium ion binding chr4:7538444-7538902 REVERSE	1	0.355	overlapStart
AT1G21230	Symbols: WAK5 WAK5 (WALL ASSOCIATED KINASE 5); kinase/ protein serine/threonine kinase chr1:7429980-7432346 FORWARD	1	0.544	insideGene
AT5G41990	Symbols: WNK8, ATWNK8 WNK8 (WITH NO LYSINE (K) KINASE 8); kinase/ protein kinase chr5:16794967-16798006 REVERSE	1	0.264	insideGene
AT4G34390	Symbols: XLG2 XLG2 (extra-large GTP-binding protein 2); guanyl nucleotide binding / signal transducer chr4:16441179-16445005 FORWARD	1	0.350	insideGene
AT4G02730	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr4:1207725-1209287 FORWARD	1	0.338	insideGene
AT1G48570	zinc finger (Ran-binding) family protein chr1:17955278-17957719 REVERSE	1	0.372	insideGene
Kategorie: Biotischer Stress				
AT1G27170	ATP binding / protein binding / transmembrane receptor chr1:9434559-9439417 FORWARD	-1	-0.684	overlapStart

AT1G58602	ATP binding / protein binding chr1:21746373-21764969 FORWARD	-1	-0.282	insideGene
AT1G33830	avirulence-responsive family protein / avirulence induced gene (AIG1) family protein chr1:12279947-12281406 REVERSE	-1	-0.374	overlapEnd
AT1G33930	avirulence-responsive family protein / avirulence induced gene (AIG1) family protein chr1:12323888-12327084 FORWARD	-1	-0.404	insideGene
AT1G33930	avirulence-responsive family protein / avirulence induced gene (AIG1) family protein chr1:12323888-12327084 FORWARD	-1	-1.021	overlapEnd
AT1G33930	avirulence-responsive family protein / avirulence induced gene (AIG1) family protein chr1:12323888-12327084 FORWARD	-1	-0.346	insideGene
AT4G09950	avirulence-responsive family protein / avirulence induced gene (AIG1) family protein chr4:6234762-6236312 FORWARD	-1	-0.727	insideGene
AT1G61180	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative chr1:22551345-22554649 FORWARD	-1	-0.576	overlapStart
AT1G63350	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative chr1:23494935-23497631 REVERSE	-1	-0.221	insideGene
AT5G43740	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative chr5:17564738-17568802 FORWARD	-1	-0.216	insideGene
AT1G66090	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative chr1:24602146-24604763 FORWARD	-1	-0.253	overlapStart
AT4G11170	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr4:6811127-6817130 FORWARD	-1	-0.282	insideGene
AT4G16920	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr4:9519173-9525691 REVERSE	-1	-0.385	overlapStart
AT4G16920	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr4:9519173-9525691 REVERSE	-1	-0.397	overlapStart
AT4G16920	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr4:9519173-9525691 REVERSE	-1	-0.385	overlapStart
AT4G16920	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr4:9519173-9525691 REVERSE	-1	-0.397	overlapStart
AT5G41750	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr5:16693909-16698943 FORWARD	-1	-0.428	insideGene
AT5G51630	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr5:20970030-20974916 FORWARD	-1	-0.219	insideGene
AT4G19470	disease resistance protein-related chr4:10612993-10614339 REVERSE	-1	-0.271	insideGene
AT4G11210	disease resistance-responsive family protein / dirigent family protein chr4:6832691-6833245 FORWARD	-1	-0.773	overlapStart
AT1G63535	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr1:23566045-23566227 REVERSE	-1	-0.346	includeGene
AT2G20463	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr2:8823733-8824122 REVERSE	-1	-0.590	overlapStart
AT2G20465	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr2:8825053-8825544 REVERSE	-1	-0.590	overlapEnd
AT2G22807	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr2:9715085-9715983 FORWARD	-1	-0.551	overlapEnd

AT3G24508	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr3:8930156-8930544 FORWARD	-1	-0.615	includeGene
AT5G43525	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr5:17488149-17488516 FORWARD	-1	-0.141	overlapStart
AT5G48605	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr5:19710215-19710578 FORWARD	-1	-0.448	overlapEnd
AT5G04045	Expressed protein chr5:1093679-1094230 FORWARD	-1	-0.435	insideGene
AT3G48080	lipase class 3 family protein / disease resistance protein-related chr3:17752938-17755190 REVERSE	-1	-0.572	insideGene
AT2G15130	plant basic secretory protein (BSP) family protein chr2:6564945-6566004 FORWARD	-1	-0.416	overlapStart
AT1G65385	pseudogene, putative serpin, blastp match of 51% identity and 9.6e-61 P-value to GP 26224736 gb AAN76362.1 AY158152 serpin-like protein {Citrus x paradisi} chr1:24289658-24291024 REVERSE	-1	-0.431	overlapStart
AT2G15220	secretory protein, putative chr2:6608659-6609506 FORWARD	-1	-0.392	overlapEnd
AT5G47280	Symbols: ADR1-L3 ADR1-L3 (ADR1-like 3); ATP binding / nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding / protein binding chr5:19193157-19195559 FORWARD	-1	-0.362	insideGene
AT2G17430	Symbols: ATMLO7, MLO7 MLO7 (MILDEW RESISTANCE LOCUS O 7); calmodulin binding chr2:7568018-7570840 FORWARD	-1	-0.297	overlapStart
AT3G11010	Symbols: AtRLP34 AtRLP34 (Receptor Like Protein 34); kinase/ protein binding chr3:3450496-3453683 REVERSE	-1	-0.164	overlapStart
AT5G17880	Symbols: CSA1 CSA1 (constitutive shade-avoidance1); ATP binding / transmembrane receptor chr5:5908874-5913099 REVERSE	-1	-0.301	insideGene
AT5G17890	Symbols: DAR4 DAR4 (DA1-RELATED PROTEIN 4); ATP binding / protein binding / zinc ion binding chr5:5916970-5923355 FORWARD	-1	-0.235	overlapEnd
AT1G64070	Symbols: RLM1 RLM1 (RESISTANCE TO LEPTOSPHAERIA MACULANS 1); ATP binding / protein binding / transmembrane receptor chr1:23779949-23783449 FORWARD	-1	-0.302	overlapEnd
AT1G60986	Symbols: SCRL4 SCRL4 (SCR-Like 4) chr1:22459000-22459650 FORWARD	-1	-0.360	overlapEnd
AT2G05117	Symbols: SCRL9 SCRL9 (SCR-Like 9) chr2:1838592-1839014 REVERSE	-1	-0.589	overlapStart
AT5G45240	transmembrane receptor chr5:18313706-18319089 FORWARD	-1	-0.345	insideGene
AT5G45240	transmembrane receptor chr5:18313706-18319089 FORWARD	-1	-0.234	overlapStart
AT5G47260	ATP binding / GTP binding / nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding chr5:19189411-19192516 FORWARD	1	0.172	overlapEnd

AT1G58602	ATP binding / protein binding chr1:21746373-21764969 FORWARD	1	0.352	insideGene
AT1G66090	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative chr1:24602146-24604763 FORWARD	1	0.358	overlapEnd
AT1G72900	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative chr1:27432195-27433782 FORWARD	1	0.442	overlapEnd
AT5G48780	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative chr5:19777468-19779604 FORWARD	1	0.448	overlapStart
AT1G27180	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr1:9439859-9446106 FORWARD	1	0.597	insideGene
AT2G14080	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr2:5925186-5929600 FORWARD	1	0.425	overlapEnd
AT4G16930	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr4:9529564-9530115 REVERSE	1	0.421	overlapStart
AT5G45060	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr5:18182038-18186495 FORWARD	1	0.302	insideGene
AT5G45230	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr5:18302147-18308303 REVERSE	1	0.187	insideGene
AT5G45230	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr5:18302147-18308303 REVERSE	1	0.272	insideGene
AT5G48770	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative chr5:19773277-19777242 REVERSE	1	0.448	overlapStart
AT3G44630	disease resistance protein RPP1-WsB-like (TIR-NBS-LRR class), putative chr3:16195984-16200595 FORWARD	1	0.190	insideGene
AT3G24020	disease resistance-responsive family protein chr3:8678738-8679656 FORWARD	1	0.311	overlapEnd
AT1G48422	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr1:17899422-17900707 REVERSE	1	0.928	overlapStart
AT1G63522	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr1:23562205-23562482 REVERSE	1	0.290	overlapEnd
AT3G33187	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr3:14020687-14021392 REVERSE	1	0.254	overlapEnd
AT5G50423	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr5:20532860-20533471 REVERSE	1	0.558	overlapStart
AT5G08315	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein. chr5:2676177-2676580 REVERSE	1	0.554	overlapEnd
AT1G56680	glycoside hydrolase family 19 protein chr1:21250338-21251417 REVERSE	1	0.499	overlapEnd

AT1G78780	pathogenesis-related family protein chr1:29621340-29622447 REVERSE	1	0.325	overlapStart
AT3G10114	pseudogene of glycosyl hydrolase family 81 protein chr3:3119491-3120025 FORWARD	1	0.706	overlapEnd
AT2G25240	serine-type endopeptidase inhibitor chr2:10751768-10753134 REVERSE	1	0.197	overlapStart
AT5G47280	Symbols: ADR1-L3 ADR1-L3 (ADR1-like 3); ATP binding / nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding / protein binding chr5:19193157-19195559 FORWARD	1	0.172	insideGene
AT5G47280	Symbols: ADR1-L3 ADR1-L3 (ADR1-like 3); ATP binding / nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding / protein binding chr5:19193157-19195559 FORWARD	1	0.419	overlapEnd
AT5G45080	Symbols: AtPP2-A6 AtPP2-A6 (Phloem protein 2-A6); carbohydrate binding chr5:18191575-18193207 REVERSE	1	0.229	insideGene
AT3G24900	Symbols: AtRLP39 AtRLP39 (Receptor Like Protein 39); protein binding chr3:9099183-9101837 REVERSE	1	0.349	overlapStart
AT5G17880	Symbols: CSA1 CSA1 (constitutive shade-avoidance1); ATP binding / transmembrane receptor chr5:5908874-5913099 REVERSE	1	0.247	insideGene
AT2G35520	Symbols: DAD2 DAD2 (DEFENDER AGAINST CELL DEATH 2) chr2:14921493-14922841 FORWARD	1	0.293	overlapStart
AT4G19040	Symbols: EDR2 EDR2; lipid binding chr4:10431520-10437425 REVERSE	1	0.678	insideGene
AT5G42797	Symbols: LCR28 LCR28 (Low-molecular-weight cysteine-rich 28) chr5:17163196-17163574 FORWARD	1	0.280	overlapStart
AT2G10535	Symbols: LCR29 LCR29 (Low-molecular-weight cysteine-rich 29) chr2:4082851-4083168 FORWARD	1	0.235	overlapStart
AT1G10920	Symbols: LOV1 LOV1; ATP binding chr1:3644420-3647768 REVERSE	1	0.345	insideGene
AT2G17480	Symbols: MLO8, ATMLO8 MLO8 (MILDEW RESISTANCE LOCUS O 8); calmodulin binding chr2:7590295-7594090 REVERSE	1	0.493	insideGene
AT1G55010	Symbols: PDF1.5 PDF1.5 (plant defensin 1.5) chr1:20517078-20517403 FORWARD	1	0.269	overlapStart
AT4G26090	Symbols: RPS2 RPS2 (RESISTANT TO P. SYRINGAE 2); protein binding chr4:13224338-13227872 FORWARD	1	0.347	overlapEnd

AT5G45250	Symbols: RPS4 RPS4 (RESISTANT TO P. SYRINGAE 4); receptor chr5:18321914-18326022 REVERSE	1	0.207	insideGene
AT1G05760	Symbols: RTM1 RTM1 (restricted tev movement 1); sugar binding chr1:1723734-1724486 REVERSE	1	0.365	overlapEnd
AT4G37460	Symbols: SRFR1 SRFR1 (SUPPRESSOR OF RPS4-RLD 1); protein complex scaffold chr4:17608378-17615776 REVERSE	1	0.274	overlapStart
AT1G32370	Symbols: TOM2B, TTM1 TOM2B (TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION 2B) chr1:11676962-11678449 FORWARD	1	0.214	overlapEnd
AT5G24620	thaumatin-like protein, putative chr5:8430768-8432414 FORWARD	1	0.396	overlapEnd
AT1G66100	thionin, putative chr1:24605671-24606537 REVERSE	1	0.358	overlapEnd
AT4G17910	transferase, transferring acyl groups chr4:9951173-9953979 REVERSE	1	0.414	insideGene
AT5G45240	transmembrane receptor chr5:18313706-18319089 FORWARD	1	0.284	insideGene

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jochen Gohlke
Geburtsdatum: 02.06.1983
Geburtsort: Moers
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1989-1993 Grundschule Siebethsburg, Wilhelmshaven
1993-1995 Orientierungsstufe Bremer Straße, Wilhelmshaven
1995-2002 Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Wilhelmshaven
2002 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/2002 - 09/2005 Bachelorstudium im Studiengang Biologie der Zellen an der Universität Osnabrück
Abschluss: Bachelor of Science
10/2005 - 07/2007 Masterstudium im Studiengang Biologie der Zellen an der Universität Osnabrück
Abschluss: Master of Science
03/2008 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation; seitdem wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Dr. Rosalia Deeken

Publikationen

Gohlke J, Scholz C-J, Kneitz S, Weber D, Fuchs J, Hedrich R, Deeken R (2013): DNA Methylation Mediated Control of Gene Expression is Critical for Development of Crown Gall Tumors.

PLoS Genet (2): e1003267 (doi:10.1371/journal.pgen.1003267).

Holtgrefe S, **Gohlke J**, Starmann J, Druce S, Klocke S, Altmann B, Wojtera J, Lindermayr C, Scheibe R (2008): Regulation of Plant Cytosolic Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Isoforms by Thiol Modifications

Physiol Plant 133(2): 211-28. (doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01066.x)

Posterpräsentationen

Gohlke J, Scholz CJ, Deeken R: Epigenetic processes regulate gene expression in *Arabidopsis* tumors. Diversity Makes the Difference - Deutsche Botanikertagung, Berlin (09/2011)

Gohlke J, Scholz CJ, Deeken R: DNA Methylation Processes Influence Gene Expression and Tumor Development in Crown Gall Tumors. Communication in Plants and Their Responses to the Environment - Internationales Symposium, Halle (05/2011)

Gohlke J, Scholz CJ, Deeken R: Epigenetic processes regulate gene expression in *Arabidopsis* tumors - 2nd Workshop on Symbiotic Interactions, Würzburg (10/2010)

Vorträge

Gohlke J, Hedrich R, Deeken R. The role of DNA methylations during *Agrobacterium-Arabidopsis* interaction. Plants for the Future - Deutsche Botanikertagung, Leipzig, Germany (09/2009)

Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein persönlicher Dank gilt dabei besonders...

...Dr. Rosalia Deeken für die engagierte Betreuung, die Unterstützung im experimentellen Bereich und vor allem dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für die Diskussion und Weiterentwicklung des Themas hatte.

...Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Julius-von-Sachs-Institut anfertigen zu können, die exzellenten Arbeitsbedingungen und die Bereitschaft, sich für die Begutachtung dieser Arbeit zur Verfügung zu Stellen.

...Prof. Dr. Manfred Schartl für die zahlreichen Korrekturen und Anregungen zur Publikation sowie die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

...Dr. Susanne Kneitz und Dr. Claus-Jürgen Scholz für die Unterstützung bei der Microarray-Analyse und den gewonnenen Einblick in die Bioinformatik.

...meinen Labor- und Bürokollegen Jörn Klinkenberg, Chil-Woo Lee und Stefanie Saupe für die stete Hilfe bei methodischen Fragen im Labor und die netten Unterhaltungen.

...den Bachelor-Studentinnen Dana Weber und Christina Niegl dafür, dass sie mir nach kurzer Einarbeitung einiges an Arbeit abgenommen haben.

...Sowie allen jetzigen und ehemaligen Kollegen für die angenehme Atmosphäre und das gute Arbeitsklima, insbesondere allen Mitgliedern der Mittagsrunde für die vielen unterhaltsamen Stunden auch außerhalb des Labors.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin für die jahrelange Unterstützung und den Rückhalt vor und während dieser Arbeit.

Danke!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

Jochen Gohlke