



Funktionelle Analyse der Histon- Demethylase UTX in hämatopoetisch differenzierenden murinen ES-Zellen

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

vorgelegt von
Justyna Kampka
geboren in Zabrze, Polen

Würzburg, Oktober 2014



Funktionelle Analyse der Histon- Demethylase UTX in hämatopoetisch differenzierenden murinen ES-Zellen

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

vorgelegt von
Justyna Kampka
geboren in Zabrze, Polen

Würzburg, Oktober 2014

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Albrecht M. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Zusammenfassung	6
3	Summary	8
4	Einleitung	10
4.1	Stammzellen	10
4.1.1	Stammzellen <i>in vivo</i>	10
4.1.2	Embryonale Stammzellen	11
4.2	Hämatopoetische Differenzierung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	13
4.3	Epigenetik	15
4.3.1	Epigenetische Regulierung der Pluripotenz	15
4.3.2	Epigenetische Regulierung durch PRC- und MLL-Komplexe	17
4.3.3	Histon-Demethylasen in ES-Zellen und während der Differenzierung	19
4.3.4	UTX/KDM6A während der Differenzierung und Deregulierung in der Leukämie	21
4.4	Zielsetzung und experimentelle Strategie	23
5	Ergebnisse	24
5.1	UTX wird ubiquitär exprimiert	24
5.2	Gezielte Ablation von UTX in embryonalen Stammzellen	25
5.3	Ablation von UTX hat keine Auswirkung auf Pluripotenz, Zellzyklus und Zellproliferation von ES-Zellen	30
5.4	Globale Histonmodifikationen in UTX-Knockdown und -Knockout-ES-Zellen	32
5.5	Verlust der UTX-Expression führt zu verminderter mesodermaler ES-Zell-Differenzierung	34
5.6	UTX wird für die frühe hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung benötigt	39
5.7	Die H3K27-Methylierung ist an Promotoren mesodermaler Marker in UTX-Knockout-EBs unverändert	44
5.8	Inhibition der H3K27-spezifischen Demethylase-Aktivität während der ES-Zell-Differenzierung induziert DNA-Schäden	48
5.9	Generierung einer konditionellen UTX-Knockout-Maus	50
6	Diskussion	52
6.1	ES-Zell-Proliferation und -Pluripotenz sind unabhängig von UTX	52
6.2	UTX wird für die mesodermale und hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung benötigt	56
6.3	H3K27me ^{2/3} -unabhängige Regulierung mesodermaler und hämatopoetischer Marker	61

6.4 Generierung einer konditionellen UTX-Knockout-Maus.....	64
6.5 Schlussfolgerung.....	65
7 Material und Methoden.....	66
7.1 Material.....	66
7.1.1 Murine ES-Zelllinien.....	66
7.1.2 Mäuse.....	66
7.1.3 shRNA-Sequenzen und Vektoren.....	67
7.1.4 Zellkulturmedien.....	67
7.1.5 Antikörper.....	69
7.1.6 Primer.....	70
7.1.7 Reagenzien und Kits.....	72
7.1.8 Puffer und Lösungen.....	73
7.1.9 Zellkulturplastik.....	75
7.1.10 Geräte.....	75
7.1.11 Software.....	76
7.2 Methoden.....	77
7.2.1 Zellkultur.....	77
7.2.1.1 MEFs.....	77
7.2.1.2 ES-Zellen.....	77
7.2.1.3 KDM6-Inhibition.....	78
7.2.1.4 Transfektion von ES-Zellen.....	78
7.2.1.5 Generierung von UTX-Knockdown/Knockout-ES-Zellen.....	78
7.2.1.6 LacZ-Färbung.....	79
7.2.1.7 Kumulative Populationsverdopplungen (CPDs).....	79
7.2.1.8 EB-Differenzierung.....	80
7.2.1.9 Beating Body Assay.....	80
7.2.1.10 Blast colony-forming cell (BL-CFC) Assay.....	80
7.2.1.11 Hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung.....	81
7.2.2 Teratom-Test.....	82
7.2.3 Isolierung primärer Mauszellen.....	83
7.2.3.1 Isolierung von Knochenmarkszellen.....	83
7.2.3.2 MEF-Isolierung.....	83
7.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	84
7.2.4.1 Bakterienkultur und Maxipräparation.....	84
7.2.4.2 RNA-Isolierung.....	84
7.2.4.3 cDNA-Synthese.....	84
7.2.4.4 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	85
7.2.4.5 Quantitative Realtime-PCR (qPCR).....	85
7.2.4.6 Western Blot.....	86
7.2.4.7 Extraktion genomischer DNA.....	87
7.2.4.8 Cytospin und Hämatoxylin & Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	87
7.2.4.9 Alkaline Comet Assay.....	87
7.2.5 Zellsortierung: MACS.....	88
7.2.6 Durchflusszytometrie.....	88

7.2.6.1 Zellzyklus-Analyse	88
7.2.6.2 Flk1-Oberflächenfärbung.....	89
7.2.7 Generierung einer konditionellen UTX-Knockout-Maus.....	89
8 Literaturverzeichnis.....	91
9 Affidavit	105
Danksagung.....	107
Publikationsliste	108

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	<i>Amino Acid</i> , Aminosäure
Abb	Abbildung
Ac	Acetylierung
AGM	Aorta, Gonaden, Mesonephros
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloid Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
BIT	BSA, Insulin, Transferrin
BL-CFC	<i>Blast colony-forming cell</i> , Blast-Koloniebildende Zelle
bp	Basenpaare
Bry	Brachyury
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CDS	<i>Coding sequence</i> , kodierende Sequenz
CFC	<i>Colony-forming cell</i> , Koloniebildende Zelle
CFU	<i>Colony-forming unit</i> , Koloniebildende Einheit
CFU-G	CFU-Granulocyte
CFU-GEMM	CFU-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte
CFU-GM	CFU-Granulocyte, Macrophage
CFU-M	CFU-Macrophage
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
Cp	<i>Crossing point</i>
CPD	<i>Cumulative population doublings</i> , Kumulative Populationsverdopplungen
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid
Cre	<i>Causes recombination</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
ddH ₂ O	<i>Double distilled water</i> , bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	<i>Embryonic day</i> , embryonaler Tag
EB	<i>Embryoid body</i> , Embryonales Körperchen
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EED	<i>Embryonic ectoderm development</i>
Epo	Erythropoetin

EryD	Definitve Erythrozyten
EryP	Primitive Erythrozyten
ESC/ES-Zelle <i>et al.</i>	<i>Embryonic stem cell</i> , Embryonale Stammzelle <i>et alii</i> , und andere
EtOH	Ethanol
EUCOMM	<i>European Conditional Mouse Mutagenesis Program</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste 2</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
Flp	Flippase
FRT	<i>Flippase recognition target</i> , Flp-Erkennungs-Sequenz
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
Gy	Gray
h	Stunde
H	Histon
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HOX	<i>Homeobox</i> , Homöobox
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i> , Hämatopoetische Stammzelle
ICM	<i>Inner cell mass</i> , Innere Zellmasse
IgG	Immunglobulin G
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IL	Interleukin
iPS	Induzierte pluripotente Stammzelle
JmjC	Jumonji C
JMJD3	<i>JmjC domain-containing protein 3</i>
K	Lysin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KDM	Lysin(K)-spezifische Histon-Demethylase
LB	<i>Lysogeny broth</i>
L-Glu	L-Glutamat
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> , Leukämiehemmender Faktor
loxP	<i>Locus of crossing over, P1</i>
LSD1	Lysin(K)-spezifische Demethylase 1
MACS	<i>Magnetic cell separation</i> , magnetische Zell-Separierung
MC	Methylcellulose
m	Murin/Maus
M	Mol

me	Methylierung
me ^{2/3}	Di- und Trimethylierung
min.	Minute
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i> , embryonaler Maus-Fibroblast
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase</i>
M-MuLV	<i>Molony Murine Leukemia Virus</i> , Murines Leukämievirus
MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i>
MTG	Mono-Thio-Glycerol
PFA	Paraformaldehyd
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PcG	<i>Polycomb group protein</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD	Populationsverdopplungen
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
PI	Propidium Iodid
PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RBP2	<i>Retino-blastoma binding protein 2</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minutes</i> , Umdrehungen pro Minute
SCF	<i>Stem cell factor</i> , Stammzell-Faktor
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SS	<i>Staining solution</i> , Färbelösung
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
SUZ12	<i>Suppressor of zeste 12</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	<i>Tail moment</i>
TPR	<i>Tetratricopeptide Repeats</i>
Trx	<i>Tritborax</i>
TSS	<i>Transcriptional start site</i> , Transkriptionsstartpunkt
U	<i>Unit</i> , Einheit
UTX	<i>Ubiquitously transcribed TPR gene on the X chromosome</i>
UTY	<i>Ubiquitously transcribed TPR gene on the Y chromosome</i>
VE	Vollentsalzt
WF	Wachstumsfaktor
wt	Wildtyp

2 ZUSAMMENFASSUNG

Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) stellen mit ihrem Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial einen einzigartigen Zelltyp für die Grundlagenforschung und angewandte Wissenschaften dar. Auf Grund ihrer Fähigkeit, *in vitro* die embryonale Entwicklung eines Organismus nachzuahmen, sind sie für die Untersuchung der Zell-Differenzierung, wie z.B. der embryonalen Hämatopoese geeignet. Während der ES-Zell-Selbsterneuerung und -Differenzierung spielen epigenetischen Modifikationen, unter anderem Histon-Methylierungen, eine wichtige Rolle. Transkriptionell aktivierende (H3K4me^{2/3}, di- bzw. trimethyliertes Lysin 4 an Histon 3) und reprimierende (H3K27me^{2/3}; di- bzw. trimethyliertes Lysin 27 an Histon 3) Histon-Methylierungs-Muster und die epigenetische Gen-Regulierung werden unter anderem durch die entgegensetzenden PcG- und MLL-Protein-Komplexe koordiniert. Die H3K27me^{2/3}-spezifische Demethylase UTX/KDM6A ist eine Komponente des MLL-Komplexes und somit an aktivierenden Gen-Regulationsmechanismen beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit war es mein Ziel zu untersuchen, inwieweit UTX für die Aufrechterhaltung der ES-Zell-Pluripotenz und für die ES-Zell-Differenzierung, insbesondere die hämatopoetische Differenzierung, von Bedeutung ist. Meine Daten zeigten, dass UTX in undifferenzierten ES-Zellen, während der ES-Zell-Differenzierung und in adulten Geweben ubiquitär exprimiert ist. Um Aufschluss über die UTX-Funktion zu bekommen, wurde UTX in ES-Zellen mittels RNA-Interferenz und Gene-Targeting gezielt ablatiert. Genexpressions-Analysen zeigten, dass die Expression von Pluripotenzgenen, genauso wie die Zellproliferation und die Verteilung der Zellzyklus-Phasen in ES-Zellen durch den Verlust von UTX unbeeinflusst blieben, während globale H3K4me³- sowie H3K27me³-Level reduziert waren. Während der ES-Zell-Differenzierung konnte ich eine verminderte Induktion der mesodermalen und hämatopoetischen Marker Flk1, Brachyury, Runx1 und Gata1 beobachten. Zudem war die Expression von UTY, dem auf dem Y-Chromosom kodierten UTX-Homolog, in ES-Zellen und während der Differenzierung runterreguliert, was auf eine Regulierung durch UTX schließen lässt. Des Weiteren zeigten UTX-Knockdown und -Knockout-Zellen in funktionellen hämatopoetischen *in vitro* Assays eine verminderte Fähigkeit, Blast-Kolonien und hämatopoetische Vorläuferzellen zu generieren. Interessanterweise zeigten ChIP-Analysen in differenzierenden wt und UTX-Knockout-EBs unveränderte H3K27me³-Level an Promotoren der hämatopoetischen Gene, was auf eine Demethylase-unabhängige Funktion von UTX während der frühen Hämatopoese

hindeutet. Um die Funktion von UTX während der Entwicklung *in vivo*, insbesondere während der embryonalen Hämatopoese, untersuchen zu können, habe ich eine konditionelle UTX-Knockout-Maus hergestellt, die für eine gezielte UTX-Deletion im hämatopoetischen System verwendet wird. Zusammenfassend zeigen meine Daten, dass UTX für die ES-Zell-Proliferation und –Pluripotenz unbedeutend ist und die Reduzierung der H3K27-Trimethylierung auch bei fehlendem UTX weiterhin herbeigeführt werden kann. Im Gegensatz dazu übernimmt UTX eine entscheidende Rolle während der mesodermalen und hämatopoetischen ES-Zell-Differenzierung, vermutlich über eine Histon-Demethylase-unabhängige Funktion.

3 SUMMARY

Mouse embryonic stem cells (ESCs) through their potential to self-renew and to differentiate provide a unique cell type for basic and applied research. Due to their ability to mimic the embryonic development of an organism *in vitro*, they are suitable for the study of cellular differentiation such as embryonic hematopoiesis. ESC self-renewal and differentiation are associated with epigenetic modifications, including histone methylation. The opposing PcG and MLL protein complexes coordinate transcriptionally repressing (H3K27me^{2/3}, di- and trimethylated histone 3 at lysine 27) and activating (H3K4me^{2/3}; di- and trimethylated histone 3 at lysine 4) histone methylation patterns respectively, and epigenetic gene regulation. The H3K27me^{2/3}-specific demethylase UTX/KDM6A is a component of the MLL complex and thus involved in transcriptional activation of gene expression. Within the scope of my thesis, I aimed to analyze to what extent UTX contributes to the maintenance of ESC pluripotency and differentiation, in particular to the hematopoietic differentiation. My data showed that UTX is ubiquitously expressed in undifferentiated ESCs, during ESC differentiation and in adult tissue. In order to study the UTX specific function, I specifically down-regulated UTX in ESCs *via* RNA interference and gene targeting. Gene expression profiling of ESCs showed that the expression of pluripotency genes, as well as cell proliferation and cell cycle phase distribution remained unaffected by the loss of UTX. However, global H3K4me³ and H3K27me³ levels were reduced. I observed a decreased induction of the mesodermal and hematopoietic genes Flk1, Brachyury, Runx1 and Gata1 in differentiating ESCs. Furthermore, the expression of UTY, the homologue of UTX encoded on the Y chromosome, was down-regulated in ESCs and in EBs, suggesting a regulatory function of UTX. In addition, using functional hematopoietic *in vitro* assays, UTX knockdown and knockout cells showed reduced blast colony formation and decreased differentiation of hematopoietic progenitor cells. Interestingly, ChIP analysis of wt and UTX KO EBs revealed comparable enrichment of H3K27me³ at the promoters of the hematopoietic genes, suggesting a demethylase independent role for UTX during early hematopoiesis. In order to investigate the role of UTX during development *in vivo*, particularly during embryonic hematopoiesis, I generated a conditional UTX knockout mouse, which will be used for a specific deletion of UTX in the hematopoietic system. In conclusion, my data revealed that UTX is insignificant for ESC proliferation and pluripotency and that the loss of H3K27 trimethylation is induced even in the absence of UTX. Furthermore, the data reported in this work suggest that UTX is

required for mesodermal and hematopoietic ESC differentiation, presumably *via* a histone demethylase independent function.

4 EINLEITUNG

4.1 Stammzellen

4.1.1 Stammzellen *in vivo*

Stammzellen stellen den Ursprung unterschiedlicher adulter Gewebe dar. Sie sind zum einen durch ihre Fähigkeit charakterisiert, sich durch Mitose teilen zu können ohne ihr Differenzierungspotenzial zu verlieren und so weitere Stammzellen mit gleichem Potenzial hervor zu bringen. Zum anderen besitzen sie die Eigenschaft, zu multiplen Zell-Linien zu differenzieren (Bell *et al.*, 2004; Reya *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 1997). Je nach Differenzierungspotenzial wird zwischen totipotenten, pluripotenten und multipotenten Stammzellen unterschieden. Totipotente Stammzellen besitzen das höchste Differenzierungspotenzial, da sie vollständige, lebensfähige multizelluläre Organismen und extra-embryonale Zelltypen generieren können (Kato *et al.*, 1993). Durch die Befruchtung einer Eizelle entsteht eine totipotente Stammzelle, die Zygote. Diese bringt durch Zellteilung bis zum Morula-Stadium ebenfalls totipotente Zellen hervor. Im weiteren Verlauf der Entwicklung, während des Embryo-Entwicklungsstadiums der Blastozyste, entstehen die pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse (*inner cell mass*, ICM). Pluripotente Stammzellen können zu allen Zellen der drei Keimblätter differenzieren, welche einen Organismus bilden (Endoderm, Ektoderm, Mesoderm), sowie zu Zellen der Keimbahn. Sie sind jedoch nicht in der Lage, extra-embryonale Zelltypen zu generieren. Werden diese Zellen aus der inneren Zellmasse isoliert und *in vitro* kultiviert, bleiben sie undifferenziert und vermehren sich als embryonale Stammzellen (ES-Zellen) (Martin, 1981; Evans und Kaufman, 1981). Adulte Stammzellen, d.h. multipotente oder unipotente Stammzellen, findet man in verschiedenen Geweben des adulten Organismus, wo sie hauptsächlich für die Regenerierung von Gewebe und für die zelluläre Homöostase verantwortlich sind (Conti *et al.*, 2010; Schroeder, 2010; Deans *et al.*, 2000; Jaks *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 2008). Das Differenzierungspotenzial adulter Stammzellen wird durch spezifische Nischen reguliert und ist auf ein Organsystem beschränkt, das heißt sie generieren lediglich differenzierte Zellen eines bestimmten Stammzell-Systems (Voog *et al.*, 2010; Mitsiadis *et al.*, 2007). Beispielsweise findet man hämatopoetische Stammzellen (HSCs) in bestimmten Nischen des Knochenmarks, wo die Selbsterneuerung, die Differenzierung zu allen Blutzellen und die Migration von HSCs reguliert wird (Oh *et al.*, 2010; Seita und Weissman, 2010). Adulte Stammzellen haben eine geringe

Selbsterneuerungsfähigkeit und verbleiben oft in einem quieszenten Zustand (Jude *et al.*, 2008).

4.1.2 Embryonale Stammzellen

Wie bereits erwähnt, werden ES-Zellen aus der inneren Zellmasse von Embryos im Blastozysten-Stadium gewonnen (Martin, 1981; Evans und Kaufman, 1981). ES-Zellen sind pluripotent und haben somit ein uneingeschränktes Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial. Bisher wurden ES-Zell-Linien aus der Maus, Mensch und anderen Spezies gewonnen (Martin, 1981; Evans und Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 1995). Die standardisierte Kultivierung von murinen ES-Zellen erfolgt auf Gelatine- oder MEF-beschichteten Platten unter Zugabe von Serum und LIF (*leukemia inhibitory factor*). LIF bindet an den spezifischen LIF-Rezeptor, welcher mit GP130 ein Heterodimer bildet. Hierdurch wird STAT3 über den JAK/STAT Signalweg aktiviert (Boeuf *et al.*, 1997; Niwa *et al.*, 1998; Nichols und Smith, 2012; Suman *et al.*, 2013). STAT3-Aktivität fördert die Selbsterneuerung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz, indem Pluripotenzfaktoren wie Nanog, Klf4 als auch c-myc transkriptionell induziert werden (Matsuda *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2006; Cartwright *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2009). Allerdings führt die Kultivierung von ES-Zellen mit LIF und Serum oft zu Schwankungen in der Expression von Pluripotenzfaktoren und somit zu heterogenen Zellpopulationen (Cui *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2008; Graf *et al.*, 2008; Chambers *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008). Bei Kultivierung von ES-Zellen ohne Serum unter Zugabe von GSK3- und MAPK/Erk-Inhibitoren (2i) hingegen, bleiben die Zellen in einem undifferenzierten, homogenen Zustand (Nichols und Smith, 2012).

Die Aufrechterhaltung der Pluripotenz erfolgt durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, wobei Oct4, Nanog und Sox2 die Kern-Komponenten darstellen (Loh und Lim, 2011). Oct4 spezifiziert die ICM während der embryonalen Entwicklung, indem die Differenzierung in die trophektodermale Richtung inhibiert wird. Bei der Trennung von ICM und trophektodermalen Linien im Blastozysten-Stadium ist die Repression von Oct4 durch Cdx2 im Trophektoderm entscheidend (Strumpf *et al.*, 2005). Für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz sind ausbalancierte Level der Transkriptionsfaktoren notwendig. Zum Beispiel fördert die Überexpression von Oct4 die mesodermale Differenzierung (Ivanova *et al.*, 2006; Niwa *et al.*, 2000). Die Expressions-Level von Nanog in der Blastozyste sind entscheidend für die Differenzierung zu Epiblast-Zellen und primitivem Endoderm (Chazaud *et al.*, 2006). Sox2

ist für die Aufrechterhaltung des Epiblasten notwendig und Sox2-defiziente ES-Zellen differenzieren zu Trophektoderm (Avilion *et al.*, 2003; Ivanova *et al.*, 2006; Masui *et al.*, 2007). Nanog, Oct4 und Sox2 wirken zusammen, um das regulatorische Netzwerk der Selbsterneuerung und Pluripotenz aufrecht zu erhalten, indem viele Gene gemeinsam reguliert und regulatorische Loci besetzt werden (Jaenisch und Young, 2008; Boyer *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006). Pluripotenzfaktoren wie Oct4 und Sox2 sind jedoch nicht nur in der Lage die Pluripotenz aufrecht zu erhalten, sondern verursachen bei induzierter Überexpression in somatischen Zellen, in Kombination mit Klf4 und c-myc, eine Reprogrammierung zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS; Takahashi und Yamanaka, 2006). Die Reprogrammierung mit spezifischen Faktoren bietet eine weitere Methode, die molekularen Mechanismen der Pluripotenz genauer zu analysieren.

Wird LIF aus dem Kulturmedium entfernt, differenzieren ES-Zellen spontan zu dreidimensionalen Zell-Aggregaten, sogenannten *Embryoid Bodies* (EBs), welche bis zu einem bestimmten Maße die embryonale Entwicklung eines Organismus nachahmen (Desbaillets *et al.*, 2000). Dabei entstehen Zellen und Vorläufer verschiedener Linien in zufälliger Anzahl. Um ES-Zellen gezielt zu bestimmten Zelltypen zu differenzieren, können spezifische Kultivierungsmethoden und Zell-Linien-spezifische Wachstumsfaktoren angewandt werden (Murry *et al.*, 2008). Somit stellen ES-Zellen ein geeignetes Werkzeug dar, um die frühe embryonale Entwicklung *in vitro* zu untersuchen. Da ES-Zellen zudem relativ einfach genetisch modifizierbar sind, sind sie besonders für die Erforschung spezifischer Gen-Funktionen in ES-Zellen und während der ES-Zell-Differenzierung geeignet. Werden ES-Zellen *in vivo* subkutan injiziert, differenzieren diese unkontrolliert zu Zellen der drei Keimblätter und bilden somit Teratome (Kooreman und Wu, 2010). Die stringenteste Methode des Nachweises der Pluripotenz ist jedoch die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten, wodurch Keimbahn-kompetente Chimäre entstehen (Bradley *et al.*, 1984).

4.2 Hämatopoetische Differenzierung *in vivo* und *in vitro*

Die Hämatopoese beginnt zwischen Tag 7.0 und 7.5 der embryonalen Entwicklung im extra-embryonalen Dottersack, wo erste primitive erythroide Zellen neben endothelialen Zellen in Blutinseln entstehen (Sabin, 1920; Metcalf und Moore, 1971). Kurz nach der primitiven Erythropoese an Tag 8.0 können Zellen der myeloiden Linie, sowie Vorläufer definitiver Zellen detektiert werden (Palis *et al.*, 1999). Diese multipotenten Vorläufer sind jedoch zu diesem Zeitpunkt der Hämatopoese noch nicht in der Lage, das gesamte hämatopoetische System einer Maus zu generieren (Medvinsky *et al.*, 1993; Medvinsky *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1994). Erste definitive HSCs werden ab Tag 10.0 im Embryo detektiert. Allerdings entstehen erst ab Tag 11.5 erste definitive HSCs im Dottersack (Cumano *et al.*, 2001), was auf zwei voneinander unabhängige Orte der Hämatopoese hindeutet, den extra-embryonalen Dottersack für die primitive und die intra-embryonale AGM-Region (Aorta-Gonaden-Mesonephros) für die definitive Hämatopoese (Müller *et al.*, 1994). Nach der Entstehung von HSCs in der AGM-Region, migrieren diese in die fötale Leber, welche den wichtigsten Ort der definitiven Hämatopoese während der fötalen Entwicklung darstellt. Hier erlangen HSCs kurz vor der Geburt die Fähigkeit, das Knochenmark zu besiedeln, wo sie bis zum Lebensende verbleiben (Orkin *et al.*, 2008).

Auf Grund der zeitlich und räumlich nah beieinander liegenden Entwicklung endothelialer und hämatopoetischer Vorläuferzellen im Dottersack, wird angenommen, dass diese Zelltypen aus einem gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblasten, hervorgehen (Sabin, 1920; Choi *et al.*, 1998). Demgegenüber steht eine andere Theorie, welche die ersten hämatopoetischen Zellen mit differenzierten endothelialen Zellen mit hämatopoetischem Potenzial, dem *Hemogenic Endothelium*, assoziiert (Jaffredo *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 1998; North *et al.*, 2002). Mittlerweile belegt eine Studie die Generierung von hämatopoetischen Zellen aus dem Hämangioblast über die Zwischenstufe des Hemogenic Endothelium (Lancrin *et al.*, 2009). Die Identifizierung des Hämangioblasten basiert größtenteils auf der Expression des VEGF-Rezeptors Flk1 (Huber *et al.*, 2004; Ema *et al.*, 2003; Faloon *et al.*, 2000; Fehling *et al.*, 2003). Flk1 wird für die Bildung von Blutinseln benötigt (Shalaby *et al.*, 1997; Shalaby *et al.*, 1995). Des Weiteren stammen nahezu alle Blutzellen der embryonalen Hämatopoese und des adulten Knochenmarks von Flk1⁺ mesodermalen Vorläufern ab (Lugus *et al.*, 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Genexpressions-Muster als auch die Differenzierungskinetik des frühen Embryos, der Entwicklung innerhalb von EBs *in vitro* entsprechen (Keller *et al.*, 1993; Kabrun *et al.*, 1997). Auf Grund ihrer Fähigkeit, in Kultur Blast-Kolonien mit

hämatopoetischem und endothelialestem Potenzial zu bilden, werden *blast colony-forming cells* (BL-CFCs) als *in vitro* Entsprechung zum Hämangioblast angesehen (Abb. 4.1; Choi *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 1997). Neben Flk1 exprimieren BL-CFCs den mesodermalen Marker Brachyury sowie Tal1 und Gata1 (Faloon *et al.*, 2000; Fehling *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 1997; Yokomizo *et al.*, 2007). Während der Differenzierung bilden Blast-CFCs dichte Cluster Tie2⁺c-Kit⁺ endothelialer Zellen, welche wiederum nicht-adhärenente Blut-Vorläufer generieren (Abb. 4.1; Lancrin *et al.*, 2009). Schließlich entstehen reife Blast-Kolonien, die den hämatopoetischen Marker CD41 hoch- und gleichzeitig endotheliale Marker runterregulieren. Im letzten Differenzierungs-Schritt regulieren CD41⁺ Zellen CD45 hoch (Lancrin *et al.*, 2009). Während Tal1/Scl für die Spezifizierung des Hemogenic Endothelium benötigt wird, ist Runx1 für die Entstehung definitiver hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Hemogenic Endothelium notwendig. Eine große Anzahl weiterer Transkriptionsfaktoren ist an der Kontrolle der hämatopoetischen Zell-Generierung beteiligt, wie zum Beispiel LMO2, Fli1, Gata1, Gata2, CBFβ, C-myb, Pu.1 usw. (Costa *et al.*, 2012).

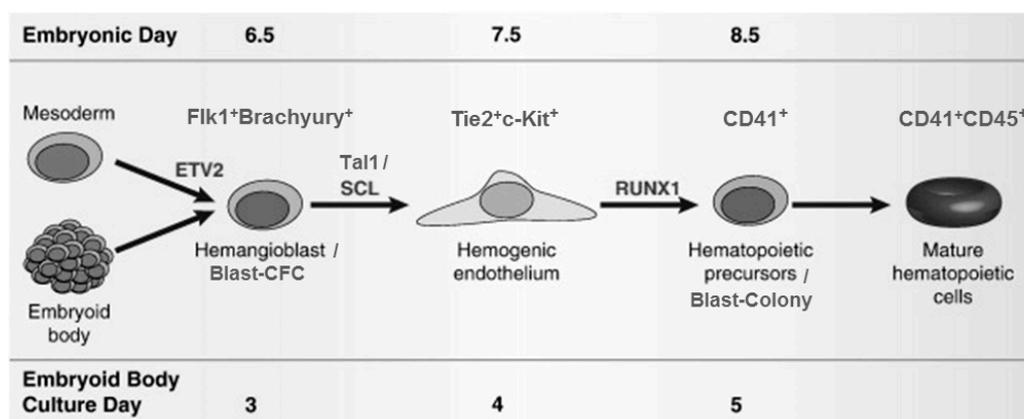


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der hämatopoetischen Differenzierung *in vivo* und *in vitro*. Embryonales Mesoderm differenziert über das Hämangioblast-Stadium zu hämatopoetischen Zellen. Werden ES-Zellen zu EBs differenziert, entstehen Hämangioblast-ähnliche BL-CFCs. Der Transkriptionsfaktor Tal1/Scl reguliert die Differenzierung vom Hämangioblast zum Hemogenic Endothelium, *in vivo* und *in vitro*. Unter der Regulierung von Runx1 knospen hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Hemogenic Endothelium und bilden hämatopoetische Cluster (modifiziert nach Moignard *et al.*, 2013)

4.3 Epigenetik

Die Epigenetik befasst sich mit mitotisch oder meiotisch vererbbaaren Veränderungen der Genexpression, die nicht durch Veränderung der DNA-Sequenz erklärt werden können (Russo *et al.*, 1996; Roloff *et al.*, 2005). Zu den epigenetischen Mechanismen und Faktoren, welche die Genexpression regulieren, zählen chemische DNA-Modifikationen, nicht-kodierende RNA-Moleküle, Transkriptionsfaktoren und Chromatin-Modifikationen. Chromatin ist ein Komplex aus DNA, Histonen und anderen Proteinen. Die Haupt-Einheit des Chromatins bildet das Nukleosom, bestehend aus einem Oktamer der vier Kern-Histone H3, H4, H2A und H2B, um das 146bp DNA gewickelt sind (Campos *et al.*, 2009). N-terminale Enden der Histone können kovalent und reversibel durch Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung modifiziert werden (Berger *et al.*, 2002; Shiio und Eisenmann, 2003). Durch diese Modifikationen wird die Genexpression entweder direkt oder indirekt durch die Rekrutierung bestimmter Protein-Komplexe reguliert. Hierbei korrelieren einige Histon-Modifikationen, wie H3K4me^{2/3} (Di- und Trimethylierung von Lysin 4 an Histon 3), H3K36me^{2/3}, H3K79me^{2/3} und H3K9ac (Acetylierung von Lysin 9 an Histon 3) mit transkriptioneller Aktivierung von Genen, während andere, wie z.B. H4K20me³, H3K9me^{2/3} und H3K27me^{2/3} mit transkriptioneller Reprimierung assoziiert sind (Mikkelsen *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2009). Darüber hinaus kann Chromatin als transkriptionell aktives Euchromatin oder als transkriptionell inaktives Heterochromatin vorliegen (Franke *et al.*, 1980). Heterochromatin ist stark kondensiert und die Nukleosomen sind dicht verpackt, weswegen die DNA nur schwer zugänglich ist und Gene nicht transkribiert werden können. Euchromatin hingegen ist eher diffus und deswegen leichter für Transkriptions-Komplexe und RNA-Polymerasen zugänglich.

4.3.1 Epigenetische Regulierung der Pluripotenz

Die Fähigkeit von ES-Zellen, zu multiplen Zell-Linien zu differenzieren, erfordert eine hohe Flexibilität in der Gen-Expression. Zudem weisen ES-Zellen eine höhere basale transkriptionelle Aktivität auf als somatische Zellen (Efroni *et al.*, 2008; Stock *et al.*, 2007). Dekondensiertes, plastisches Euchromatin ist eine wichtige Voraussetzung dafür, dass Gene zugänglich bleiben und gegebenenfalls schnell aktiviert werden können. Differenzierte Zellen

hingegen zeichnen sich vielmehr durch definiertes Heterochromatin aus (Meshorer *et al.*, 2006). So geht auch die ES-Zell-Differenzierung mit einer Zunahme von kompaktem Chromatin und einer verminderten Dynamik Chromatin-assoziiertes Proteine einher (Meshorer *et al.*, 2006; Wiblin *et al.*, 2005; Pajerowski *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind in ES-Zellen hohe Level bestimmter Histon-Modifikationen, welche i.d.R. mit transkriptioneller Aktivität assoziiert sind (z.B. H3K4me³), zu beobachten. Reprimierende Modifikationen hingegen (z.B. H3K9me^{2/3}, H3K27me³) kommen vermehrt in differenzierten Zellen an Linien-spezifischen Genen, in Form von ausgedehnten Anreicherungen (*broad local enrichments*; BLOCs), und intergenischen Regionen vor (Mikkelsen *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2009; Pauler *et al.*, 2009). Das Chromatin pluripotenter ES-Zellen ist also durch eine hohe Zugänglichkeit und transkriptionelle Hyperaktivität charakterisiert, wodurch eine permanente Stilllegung von Differenzierungs-spezifischen Genen verhindert wird. Um eine kontrollierte Gen-Expression zu gewährleisten, sind jedoch regulatorische Mechanismen notwendig. Ein Beispiel für regulatorische Mechanismen sind bivalente Chromatin-Domänen, die durch die Anwesenheit sowohl aktivierender (H3K4me³) als auch reprimierender (H3K27me³) Histon-Modifikationen charakterisiert sind (Bernstein *et al.*, 2006). Durch die Kollokalisierung von H3K4me³ und H3K27me³ an Promotoren, sind bivalent markierte Differenzierungs-Gene reprimiert und für eine schnelle Aktivierung vorbereitet (Boyer *et al.*, 2006). H3K4me³ markiert einen Großteil CpG-reicher Promotoren, wobei die Histon-Methylierung auf punktuelle Intervalle begrenzt ist. H3K27me³ ist in ES-Zellen an einer geringeren Anzahl Differenzierungs-spezifischer Promotoren zu finden, allerdings meistens zusammen mit H3K4me³, mit einer ausgedehnteren Verteilung der Methylierung (Mikkelsen *et al.*, 2007; Bernstein *et al.*, 2006). Differenzieren ES-Zellen zu spezifizierteren Vorläufer-Zellen, löst sich ein großer Teil der bivalenten Domänen auf, so dass nur noch H3K27me³, H3K4me³ oder keine der beiden Markierungen vorhanden ist (Mikkelsen *et al.*, 2007; Gifford *et al.*, 2013). Einige Linien-spezifische Gene behalten dabei den bivalenten Zustand bei, um die Expression zu einem späteren Zeitpunkt aktivieren zu können. Nicht mehr benötigte Gene hingegen werden endgültig abgeschaltet. Bivalente Domänen sind nicht nur auf ES-Zellen beschränkt, sondern kommen auch in anderen Zell-Typen, wie beispielsweise in hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) oder in T-Zellen vor (Roh *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2009; Abraham *et al.*, 2013). Darüber hinaus werden einige Promotoren erst im Laufe der Differenzierung bivalent markiert (Abraham *et al.*, 2013; Burney *et al.*, 2013). Die Notwendigkeit bivalenter Domänen für die Regulierung der ES-Zell-Differenzierung wurde jedoch durch eine Studie relativiert, in welcher ES-Zellen entweder in 2i und LIF oder Serum und LIF kultiviert wurden (Marks *et al.*,

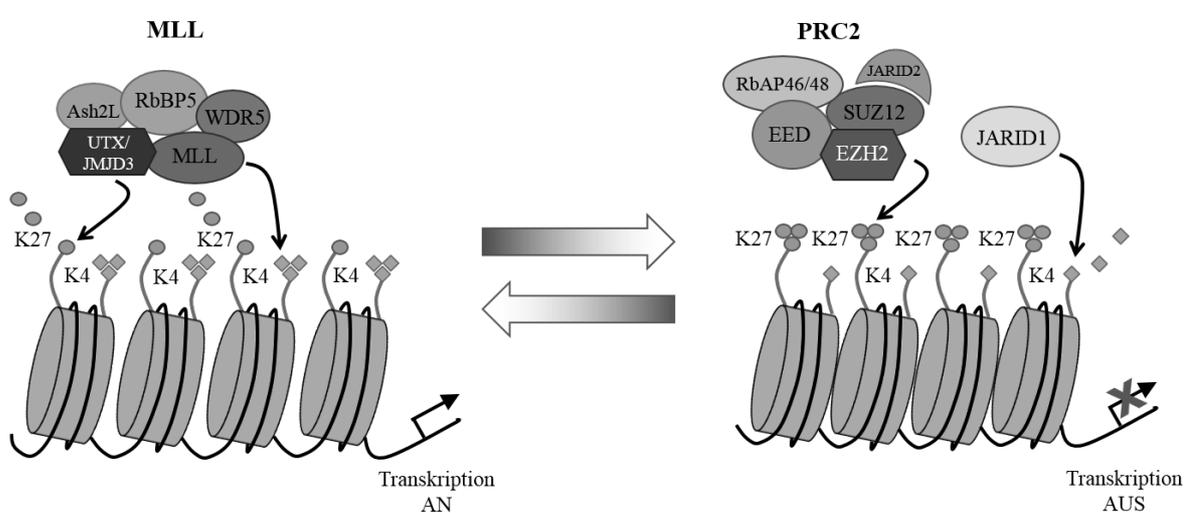
2012). Die Kultivierung von ES-Zellen in 2i lässt diese in einem homogenen, pluripotenten Zustand. Die Autoren beobachteten eine verringerte Anzahl bivalenter Domänen in 2i-ES-Zellen im Vergleich zu Serum-kultivierten ES-Zellen, bedingt durch reduzierte H3K27me³-Anreicherungen an reprimierten Promotoren, während das Differenzierungs-Potenzial unverändert blieb.

4.3.2 Epigenetische Regulierung durch PRC- und MLL-Komplexe

Bivalente Chromatin-Domänen und die epigenetische Gen-Regulierung werden durch die entgegengewirkenden PcG- und MLL-Protein-Komplexe koordiniert (Schema 4.1). PcG-Proteine sind Bestandteile der Komplexe PRC1 und PRC2, die für die Gen-Repression zuständig sind (Di Croce und Helin, 2013; Simon und Kingston, 2013; Surface *et al.*, 2010, Margueron und Reinberg, 2011). Der PRC2-Komplex enthält die Kern-Komponenten Suz12, EZH2, EED und RbAp46/48 und induziert die H3K27-Di- und Trimethylierung durch die Methyltransferase-Aktivität von EZH2. H3K27me^{2/3} rekrutiert den PRC1-Komplex, welcher die H2AK119-Mono-Ubiquitinierung mittels der Ubiquitin-Ligasen Ring1A und Ring1B induziert, wodurch die Elongation durch RNA Pol II gehemmt wird (Margueron und Reinberg, 2011; Stock *et al.*, 2007). Der Zusammenhang zwischen H3K27-Methylierung durch PRC2 und der PRC1-Rekrutierung ist allerdings umstritten (Sauvageau und Sauvageau, 2010; Surface *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2012). Knockout-Versuche von PRC2-Komponenten zeigten, dass PRC2 für die Aufrechterhaltung der ES-Zell-Pluripotenz nicht notwendig ist, obwohl keine H3K27-Trimethylierungen vorhanden sind. Während der ES-Zell-Differenzierung übernimmt PRC2 jedoch eine wichtige Funktion (Chamberlain *et al.*, 2008; Pasini *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008). Mit der Regulierung der Gen-Repression sind zudem H3K4-spezifische Demethylasen assoziiert, wie z.B. LSD1 und JARID1A/KDM5A (Rudolph *et al.*, 2007; Pasini *et al.*, 2008).

MLL-Komplexe vermitteln die H3K4-Methylierung und Aktivierung von Genen (Dou *et al.*, 2006). Sie beinhalten, je nach Komplex, MLL1-4 als katalytische Untereinheiten und die Kern-Komponenten WDR5, RbBP5 und Ash2L. Die Funktion der verschiedenen MLL-Komplexe unterscheidet sich in ES-Zellen, je nachdem, ob diese die globale H3K4-Methylierung oder die H3K4-Methylierung innerhalb bivalenter Chromatin-Regionen regulieren. MLL2 methyliert spezifisch H3K4 an bivalenten Promotoren, z.B. an Promotoren von HOX-Genen. Interessanterweise hat der Verlust von MLL2 jedoch keinen Einfluss auf die globale H3K4-

Methylierung und die ES-Zell-Selbsterneuerung, trägt aber zu der Koordinierung der frühen Differenzierung bei (Lubitz *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 2004). Die Abrogation von WDR4 hingegen, einer Kern-Komponente eines anderen MLL-Komplexes, hat eine Genom-weite Reduzierung der H3K4-Methylierung und eine gestörte ES-Zell-Selbsterneuerung zur Folge (Wysocka *et al.*, 2006; Ang *et al.*, 2011). Dies weist darauf hin, dass MLL-Komplexe, welche globale H3K4me³-Level regulieren, die ES-Zell-Selbsterneuerung beeinflussen, während andere, welche bivalente Chromatin-Domänen regulieren, die Differenzierung beeinflussen, was auf eine subtilere Rolle bivalenter Domänen in der ES-Zell-Pluripotenz hindeutet (Zhou *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013).



Schema 4.1: Regulierung bivalenter Chromatin-Domänen in ES-Zellen durch MLL- und PRC2-Komplexe. Während Trithorax-Group-Proteine (trxG) die H3K4-Methylierung katalysieren, wird H3K27me^{2/3} durch spezifische Demethylasen demethyliert und die Transkription Differenzierungs-spezifischer Gene wird angeschaltet. Als Gegenspieler wirkt Polycomb repressive complex 2 (PRC2), der die H3K27-Methylierung katalysiert. H3K4-Methylierungen werden durch JARID1 oder LSD1 entfernt, wodurch nicht benötigte Gene ausgeschaltet werden.

Darüber hinaus sind die H3K27me^{2/3}-spezifischen Demethylasen UTX und JMJD3/KDM6B mit dem MLL-Komplex assoziiert und an der Regulierung der Gen-Aktivierung beteiligt (Dou *et al.*, 2006; Agger *et al.*, 2007). Die Regulierung spezifischer Gene in ES-Zellen und während der Differenzierung wird somit durch das Gleichgewicht zwischen MLL- und PRC-Aktivität bestimmt, wodurch eine dynamische Wechselwirkung zwischen Methylierung und Demethylierung von H3K4 und H3K27 besteht (Schema 4.1).

4.3.3 Histon-Demethylasen in ES-Zellen und während der Differenzierung

Histon-Methylierungen übernehmen wichtige Funktionen in der Regulierung von Gen-Expressions-Programmen und somit Entscheidungen von Zell-Schicksalen. Nachdem methyliertes Arginin und Lysin an Histonen lange Zeit als statische Modifikationen angesehen wurden, ist mittlerweile eine dynamische Wechselwirkung zwischen der Methylierung und der Demethylierung von Histonen bekannt. Je nach Mechanismus, wird zwischen zwei Klassen von Histon-Demethylasen unterschieden. Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängige Amino-Oxidasen, zu denen Histon-Demethylasen der LSD1/KDM1-Familie zählen, wirken nur an mono- und dimethylierten Lysin-Resten (Shi *et al.*, 2004). Histon-Demethylasen der anderen Klasse sind Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängige Enzyme und durch die Jumonji (JmjC)-Domäne charakterisiert (Tsukada *et al.*, 2006). Tabelle 4.1 veranschaulicht die Nomenklatur der Histon-Demethylasen sowie die Substratspezifitäten.

Verschiedene Histon-Demethylasen sind an der Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu verschiedenen Zell-Linien beteiligt. Die H3K4me^{2/1}-spezifische Demethylase LSD1/KDM1 spielt eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung. Die Deletion von LSD1 führt zu embryonaler Letalität (Wang *et al.*, 2007) und in ES-Zellen beeinträchtigt sie Wachstum und Differenzierung (Wang *et al.*, 2009). LSD1 ist vermutlich an der transkriptionellen Regulierung von Oct4 beteiligt, denn die Inhibition von LSD1 in Maus-Embryos führt zu einer Hochregulierung von Oct4. Und auch humanes LSD1 bindet an Oct4-Promotoren und entfernt die H3K4me-Modifikation, wodurch die Gen-Expression reprimiert wird und Zellen differenzieren können (Wang *et al.*, 2007; Adamo *et al.*, 2011). Darüber hinaus wird LSD1 für die Expression hämatopoetischer Marker, wie z. B. Tal1, und für die Hämatopoese benötigt (Hu *et al.*, 2009; Saleque *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2009). Auch die H3K9-spezifischen Demethylasen KDM3 und KDM4 werden mit der Aufrechterhaltung der Pluripotenz in Verbindung gebracht. Die Deletion beider Demethylasen führt zu niedrigeren Oct4-, Sox2 und Nanog-Leveln (Loh *et al.*, 2007). Es wird ferner angenommen, dass Oct4 die Expression dieser Demethylasen reguliert, welche in einem positiven regulatorischen Feedback die Pluripotenz, durch die Aktivierung von Nanog und anderen Pluripotenzgenen, begünstigen (Loh *et al.*, 2007). Während der Differenzierung werden KDM3 und KDM4 runterreguliert, wodurch die H3K9-Methylierung erhöht und Oct4 und Nanog reprimiert werden. Die H3K4-spezifischen Demethylasen der KDM5-Familie sind mit der Regulierung bivalenter Domänen und der Expression Differenzierungs-spezifischer Gene assoziiert. So interagieren KDM5A, KDM5B und KDM5D beispielsweise mit dem PRC2-Komplex und

sind somit an der transkriptionellen Repression beteiligt (Pasini *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). Die Deletion von KDM5A inhibiert die Reprimierung von PRC2-Ziel-Genen. Darüber hinaus hat die Deletion von PRC2 eine verminderte Promotor-Bindung von KDM5A zur Folge, was auf eine Rekrutierung von KDM5A durch PRC2 schließen lässt (Pasini *et al.*, 2008). Während der Differenzierung wird KDM5A von Differenzierungs-spezifischen Genen, wie z. B. HOX-Genen, entfernt und ermöglicht somit deren Expression (Christensen *et al.*, 2007).

Tab. 4.1: Nomenklatur der Histon-Demethylasen und Substratspezifitäten

Standardisierter Familienname	Bezeichnung	Ursprüngliche Bezeichnung	Substrat-Spezifität
KDM1	KDM1A	AOF2/LSD1	H3K4me ^{2/1} ; H3K9me ^{2/1}
	KDM1B	AOF1/LSD2	H3K4me ^{2/1}
KDM2	KDM2A	JHDM1A/FBXL11	H3K36me ^{2/1}
	KDM2B	JHDM1B/FBXL10	H3K36me ^{2/1} ; H3K4me ^{3/2}
KDM3	KDM3A	JHDM2A/JMJD1A/TSGA	H3K9me ^{2/1}
	KDM3B	JHDM2B/JMJD1B	
	JMJD1C	JHDM2C/TRIP8	
KDM4	KDM4A	JHDM3A/JMJD2A	H3K9me ^{3/2} H3K36me ^{3/2}
	KDM4B	JHDM3B/JMJD2B	
	KDM4C	JHDM3C/JMJD2C/GASC1	
	KDM4D	JHDM3D/JMJD2D	
KDM5	KDM5A	JARID1A/RBP2	H3K4me ^{3/2}
	KDM5B	JARID1B/PLU1	
	KDM5C	JARID1C/SMCX	
	KDM5D	JARID1D/SMCY	
KDM6	KDM6A	UTX	H3K27me ^{3/2}
	KDM6B	JMJD3	
	UTY		
KDM7	KDM7A	JHDM1D/KIAA1718	H3K9me ^{2/1} ; H3K27me ^{2/1}
KDM8		JMJD5	H3K36me ²

Die KDM6-Familie beinhaltet KDM6A/UTX, KDM6B/JMJD3 und KDM6C/UTY. Wie bereits erwähnt sind UTX und KDM6B Mitglieder des H3K4-Methyltransferase-Komplexes MLL und somit in die Aktivierung Differenzierungs-spezifischer Gene (z. B. HOX-Gene) involviert (Agger *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; De Santa *et al.*, 2007). JMJD3 wird darüber hinaus während der Makrophagen-Differenzierung induziert und während der Stammzell-Differenzierung für die neuronale Festlegung benötigt (De Santa *et al.*, 2007; Jepsen *et al.*, 2007). Weitere Funktionen von UTX während der Differenzierung werden im Folgenden beschrieben.

4.3.4 UTX/KDM6A während der Differenzierung und Deregulierung in der Leukämie

Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat on Chromosome X (UTX)/KDM6A ist eine H3K27me^{2/3}-spezifische, auf dem X-Chromosom kodierte, Demethylase. UTX enthält 8 TPR (*Tetratricopeptide Repeats*)- und eine JmjC-Domäne (Abb. 4.2) und ist eines der wenigen Gene, das der X-Inaktivierung in murinen Weibchen entgeht (Greenfield *et al.*, 1998).

Die Demethylase-Aktivität von UTX und JMJD3 ist von der JmjC-Domäne abhängig, die Bindestellen für die Co-Faktoren Fe(II) und 2-Oxoglutarat enthält (Lan *et al.*, 2007; Agger *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; De Santa *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007). Das auf dem Y-Chromosom kodierte Homolog UTY besitzt, trotz konservierter JmjC-Domäne und 88% Sequenz-Homologie mit dem UTX-Protein, keine bzw. nur eine verminderte Demethylase-Aktivität (Abb. 4.2; Shpargel *et al.*, 2012; Morales Torres *et al.*, 2013; Walport *et al.*, 2014).

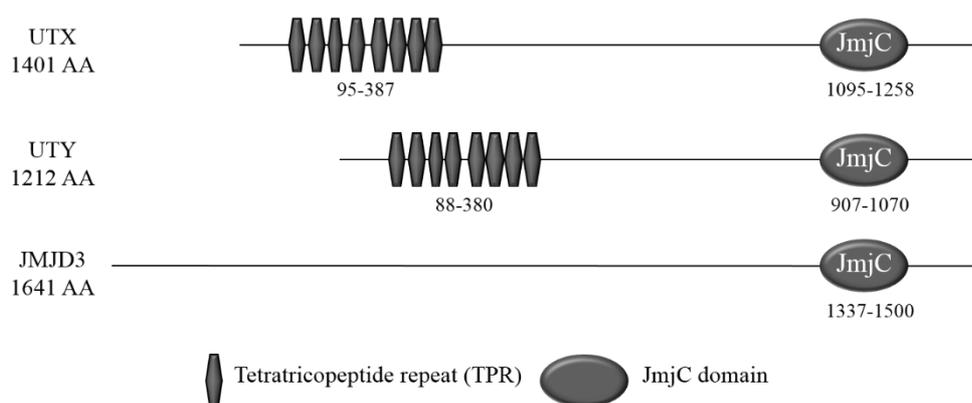


Abb. 4.2: Struktur und Protein-Domänen der Histon-Demethylasen der KDM6-Familie.

Neben ihrer Funktion als Histon-Demethylasen innerhalb des aktivierenden H3K4-Methyltransferase-Komplexes MLL, interagieren UTX und JMJD3 mit dem Brg1-enthaltenden SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplex und sie sind somit an der Umstrukturierung des Chromatins beteiligt. Auf diese Weise spielen sie eine Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung von T-Box-Transkriptions-Faktoren, Regulatoren früher Zell-Schicksals-Entscheidungen, der Differenzierung und Organogenese (Miller *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2002). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass dUTX, die ATPase Brm und die Histon-Acetyltransferase CBP (*Creb-binding protein*) gemeinsam an Polycomb-Ziel-Gene binden und die H3K27-Acetylierung regulieren, wodurch der Polycomb-assozierten Gen-Reprimierung entgegengewirkt wird (Tie *et al.*, 2012). Eine Demethylase-abhängige Funktion

übernimmt UTX in der HOX-Gen-Regulierung. UTX bindet an HOX-Gene in humanen Fibroblasten, was mit einer Reduzierung der H3K27-Trimethylierung einhergeht (Lan *et al.*, 2007). Die Deletion von UTX in HEK293T-Zellen führt zu transkriptioneller Repression von HOX-Genen (Lee *et al.*, 2007). In murinen ES-Zellen hingegen, wo HOX-Gene nicht exprimiert werden, konnte keine UTX-Bindung detektiert werden (Lan *et al.*, 2007). Obwohl UTX in ES-Zellen keine wichtige Funktion übernimmt (Lee *et al.*, 2012; Welstead *et al.*, 2012; Morales Torres *et al.*, 2013), spielt es, durch seine Demethylase-Aktivität, bei der Re-Aktivierung Pluripotenz-spezifischer Gene während der Reprogrammierung eine entscheidende Rolle (Mansour *et al.*, 2012). Des Weiteren trägt UTX zu einer Reihe Gewebe- und Entwicklungs-spezifischer Prozesse bei, wie z. B. der kardialen Differenzierung, Hämatopoese, Myogenese, Osteogenese, Wund-Heilung und Alterungs-Prozessen (Lee *et al.*, 2012; Shpargel *et al.*, 2012; Thieme *et al.*, 2013; Seenundan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Hemming *et al.*, 2014; Shaw *et al.*, 2009; Maures *et al.*, 2011).

Die epigenetische Deregulierung ist ein wichtiger Faktor in der Krebs-Pathogenese, insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen (Claus *et al.*, 2010; Neff *et al.*, 2009). So wurden Mutationen im MLL-Protein bereits in vielen AML (*Acute Myeloid Leukemia*)- und ALL (*Acute Lymphocytic Leukemia*)-Patienten gefunden (Mar *et al.*, 2012). Auch UTX-Mutationen wurden in verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen detektiert, z. B. in multiplen Myelomen, ALL und anderen Leukämien, sowie in soliden Tumoren (Dalglish *et al.*, 2010; Van Haaften *et al.*, 2009; Mar *et al.*, 2012; Gui *et al.*, 2011). Eine der höchsten UTX-Mutations-Frequenzen weist der Blasenkrebs mit Mutationen in der JmjC-Domäne auf (Gui *et al.*, 2011), was auf eine Deregulierung der H3K27-Methylierung hindeutet. Mit der fehlerhaften H3K27-Methylierung einhergehend wurden auch Mutationen der PRC2-Komponenten EZH2, EED und Suz12 mit lymphoiden und myeloiden Tumoren sowie ETP (*Early T-Cell Precursor*)-ALL in Verbindung gebracht (Ernst *et al.*, 2010; Morin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Interessanterweise wurden in CMML (*Chronic Myelomonocytic Leukemia*)-Studien Mutationen sowohl in UTX als auch in EZH2 entdeckt, zwei entgegengesetzten H3K27me³-Regulatoren (Jankowska *et al.*, 2011). Allerdings schlossen sich diese Mutationen in CMML-Patienten-Proben gegenseitig aus. Zusammenfassend deuten diese Studien auf die Bedeutsamkeit der korrekten epigenetischen Regulierung des Chromatins für die Homöostase gesunden Gewebes hin. Die Regulierung vieler Entwicklungs-spezifischer Prozesse durch UTX und die UTX-Deregulierung in hämatologischen Erkrankungen zeigen eine wichtige Funktion von UTX in Differenzierungs-spezifischen Mechanismen, insbesondere in der Hämatopoese, auf.

4.4 Zielsetzung und experimentelle Strategie

Die H3K27me^{2/3}-spezifische Demethylase UTX ist ein Mitglied des aktivierenden H3K4-Methyltransferase-Komplexes MLL und seine katalytische Aktivität wurde bereits mit der Regulierung Differenzierungs-spezifischer Gene in Verbindung gebracht. Auch eine Histon-Demethylase-unabhängige Funktion bei der Chromatin-Umorganisation, verbunden mit der Interaktion mit dem SWI/SNF-Komplex, wurde belegt. UTX-Mutationen sind mit malignen hämatologischen Erkrankungen assoziiert und deuten auf eine Rolle von UTX in der Hämatopoese hin. In dieser Studie sollte die Funktion in undifferenzierten und differenzierenden murinen ES-Zellen, insbesondere während der hämatopoetischen Differenzierung, untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte UTX in ES-Zellen mittels Knockdown und Knockout ablatiert und hinsichtlich der Gen-Expression, Histon-Modifikationen, Zell-Eigenschaften und des Differenzierungspotenzials *in vitro* analysiert werden. Um das Differenzierungs-Potenzial *in vivo* zu untersuchen, wurden Teratom-Assays durchgeführt und eine konditionelle UTX-Knockout-Maus hergestellt, mit deren Hilfe die UTX-Funktion in der embryonalen Hämatopoese und die Deregulierung in leukämischen Erkrankungen analysiert werden soll. Die daraus gewonnenen Daten sollen einen besseren Einblick in die epigenetische Regulierung der ES-Zell-Pluripotenz und der hämatopoetischen Differenzierung vermitteln.

5 ERGEBNISSE

5.1 UTX wird ubiquitär exprimiert

Um Aufschluss über die Funktion von UTX zu bekommen, habe ich zunächst überprüft, in welchen Geweben UTX exprimiert wird. Hierfür wurde die UTX-Expression in verschiedenen Organen und in Knochenmark aus adulten Mäusen sowie in ES-Zellen mittels qRT-PCR analysiert. Wie in Abbildung 5.1A ersichtlich ist, wird UTX ubiquitär in ES-Zellen und im Gehirn, aber auch in Niere, Thymus, Herz und anderen Geweben exprimiert. Als nächstes wurde überprüft, ob sich die Expression von UTX während der Differenzierung ändert. qRT-PCR-Analysen der UTX-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten der ES-Zell-Differenzierung (Abb. 5.1B) zeigten, dass die Expression in undifferenzierten ES-Zellen und während der Differenzierung konstant blieb. Zusammenfassend deuten die Expressionsdaten darauf hin, dass UTX sowohl in der frühen ES-Zell-Differenzierung als auch in adultem Gewebe eine Rolle spielen könnte.

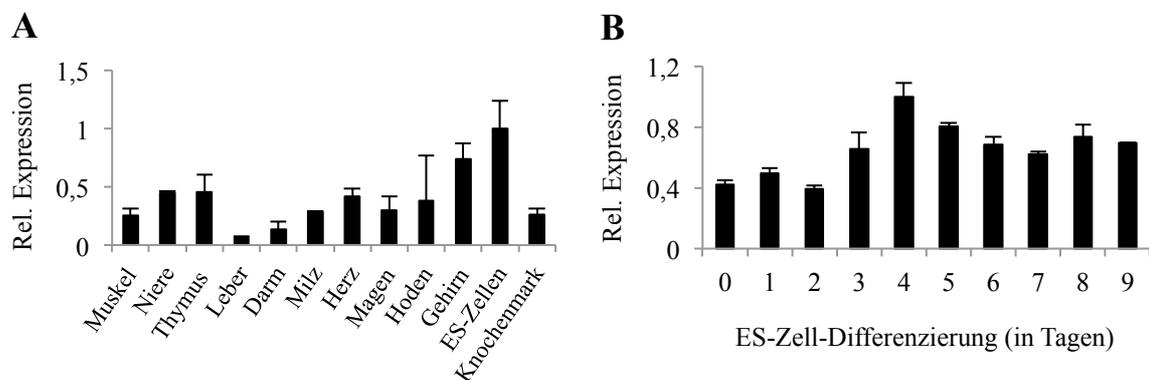


Abb. 5.1: UTX-Expression in verschiedenen Geweben und während der ES-Zell-Differenzierung. A. UTX-Expression in adultem murinen Gewebe relativ zur Expression von β -Actin und B2M. **B.** UTX-Expression in V6.5 wt ES-Zellen und während der Differenzierung relativ zur Expression von β -Actin und GAPDH. 0=undifferenzierte ES-Zellen; 1-9=Tag 1 bis 9 der ES-Zell-Differenzierung (EBs). **A-B.** n=2. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (STABW) dar.

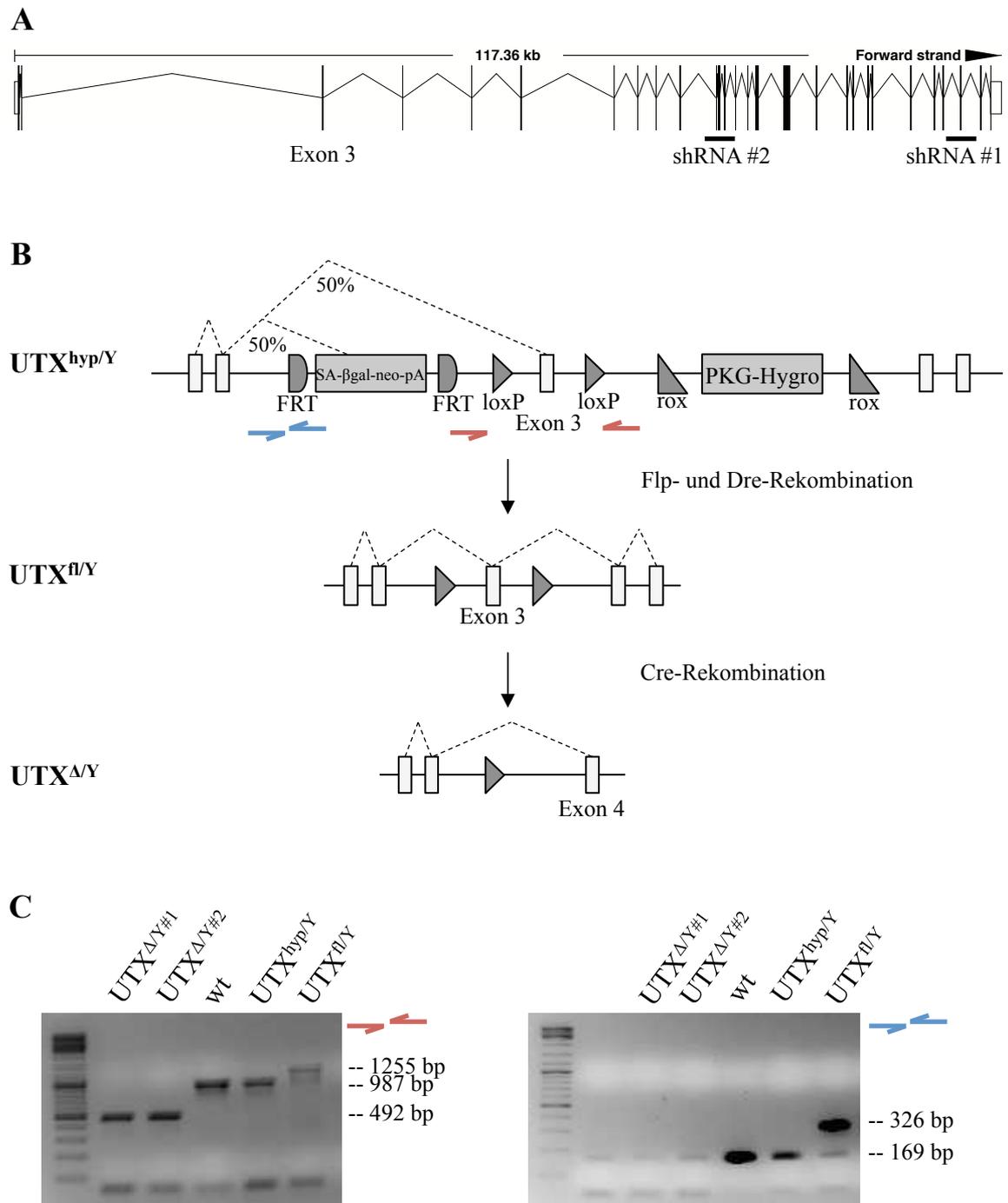
5.2 Gezielte Ablation von UTX in embryonalen Stammzellen

Für eine gezielte Ablation von UTX in ES-Zellen habe ich zwei verschiedene Strategien verwendet. 1) RNA-Interferenz-vermittelter Knockdown. Hierfür wurden Plasmid-Vektoren, die für fünf verschiedene UTX-spezifische shRNA-Sequenzen kodierten, in V6.5 wt ES-Zellen stabil transfiziert. Als Kontrolle diente eine *Scramble* shRNA-Sequenz, welche zu keinem bekannten Transkript komplementär ist. Zur Überprüfung der Knockdown-Effizienz wurde die UTX-Expression mit Hilfe von qRT-PCR-Analysen quantifiziert. Wie in Abbildung 5.3A zu sehen ist, führte die Expression der shRNA-Sequenzen #1 und #2 zu einem Knockdown von 65% bzw. 50% der UTX-Expression. In Abbildung 5.2A ist die schematische Darstellung des UTX-Locus gezeigt sowie die Bindestellen dieser beiden shRNA-Sequenzen.

2) Genomische Deletion von UTX mittels Gene-Targeting. R1 UTX^{hyp/Y} sowie UTX^{fl/Y} ES-Zellen, welche ein UTX-Target-Konstrukt beinhalten, wurden von Mitarbeitern von K. Anastassiadis (Dresden) generiert (Thieme *et al.*, 2013) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Generierung erfolgte mit Hilfe der *Multipurpose Allele Strategy* wie von Testa *et al.* beschrieben (2004). UTX^{hyp/Y} (*Knockout First*) Zellen besitzen eine SA-βgal-Neo-pA-Kassette, welche von FRT-Erkennungssequenzen flankiert ist (Abb. 5.2B). Bei der Transkription von UTX wird von Exon 2 direkt zum *Splice Acceptor* (SA) gespleißt und durch das Polyadenylierungssignal (pA) lediglich ein verkürztes UTX-Protein translatiert. Da teilweise auch direkt zu Exon 3 gespleißt wird, resultieren diese Zellen in einer hypomorphen UTX-Expression (Abb. 5.3B rechts). Des Weiteren ist in UTX^{hyp/Y} Zellen das kritische Exon 3 von loxP-Erkennungs-Sequenzen und eine HKG-Hygro-Kassette von Rox-Sequenzen flankiert. Nach Flp- und Dre-Rekombination erhält man eine konditionelle Version (UTX^{fl/Y}). Die UTX-Expression dieser Zellen entspricht etwa der Expression von Wildtyp-Zellen (Abb. 5.3B rechts). Da UTX^{hyp/Y} Zellen einen βgal-Reporter haben, wurde eine LacZ-Färbung zur Überprüfung einer erfolgreichen Flp-Rekombination in UTX^{fl/Y} Zellen durchgeführt. Wie in Abbildung 5.2D zu sehen ist, wurden lediglich UTX^{hyp/Y} Zellen blau gefärbt. Für einen vollständigen UTX-Knockout wurden UTX^{fl/Y} Zellen mit einem Cre-Rekombinase-Vektor transfiziert und einzelne Klone genotypisiert. Die Genotypisierung von R1 wt, UTX^{hyp/Y}, UTX^{fl/Y} Zellen und von zwei Knockout-Klonen (UTX^{Δ/Y} #1, UTX^{Δ/Y} #2) ist in Abbildung 5.2C gezeigt. Der Knockout wurde außerdem auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR bestätigt (Abb. 5.3B rechts). Außer den R1 UTX Zellen wurden JM8A3.N1 ES-Zellen (EUCOMM) verwendet, welche dasselbe Target-Konstrukt besitzen (ohne PKG-Hygro-Kassette und Rox-

Erkennungs-Sequenzen). Die UTX-Expression dieser Zellen ist in Abbildung 5.3B (links) gezeigt.

Alle Versuche wurden, bis auf die Teratom-Tests, sowohl mit R1 UTX als auch mit JM8A3.N1 UTX Zellen (EUCOMM) durchgeführt. JM8A3.N1 wt Zellen waren in unserem Labor allerdings *in vitro* nicht hämatopoetisch differenzierbar, weswegen in dieser Arbeit nur Ergebnisse der R1 Zellen gezeigt sind.



D

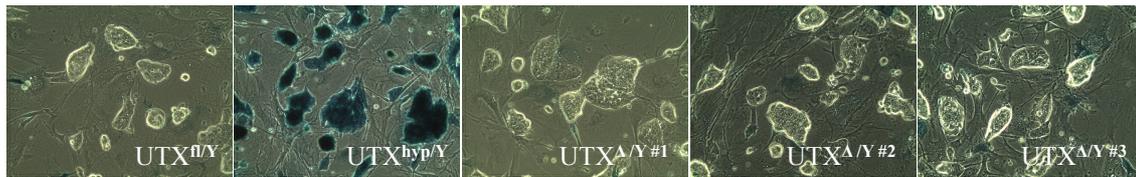


Abb. 5.2: Strategien für den gezielten Knockdown und Knockout von UTX. **A.** Schematische Darstellung des UTX-Locus (nicht maßstabsgetreu). Eingezeichnet sind die Bindestellen der shRNAs #1 und #2 und das für den Knockout kritische Exon 3 (siehe B). **B.** Schematische Darstellung der UTX-Knockout-Strategie. In $UTX^{hyp/Y}$ ES-Zellen (Knockout First; hypomorphe Expression) ist das kritische Exon 3 von zwei loxP-Erkennungs-Sequenzen flankiert. Die Splice-Acceptor- β gal-Neo-pA-Kassette ist von zwei FRT-Erkennungs-Sequenzen, die HYG-Hygro-Kassette von zwei Rox-Sequenzen flankiert. Unterbrochene Linien zeigen Splice-Varianten an. Das konditionelle Allel ($UTX^{fl/Y}$) entsteht nach Flp- und Dre-Rekombination. Eine anschließende Cre-Rekombination resultiert im UTX-Knockout ($UTX^{\Delta/Y}$). **C.** Genotypisierung des konditionellen Allels ($UTX^{fl/Y}$) und der Knockout-Klone ($UTX^{\Delta/Y}$ #1 und $UTX^{\Delta/Y}$ #2). Agarose-Gel links: Genotypisierung mit UTX-Flp1.1/lox2 Primern; Bandengrößen für wt/ $UTX^{hyp/Y}$ ES-Zellen 987 bp, $UTX^{fl/Y}$ 1255 bp, $UTX^{\Delta/Y}$ 492 bp. Agarose-Gel rechts: Genotypisierung mit UTX-Flp-1/2 Primern; Bandengrößen für wt/ $UTX^{hyp/Y}$ ES-Zellen 169 bp, $UTX^{fl/Y}$ 326 bp, $UTX^{\Delta/Y}$ kein Produkt. Pfeile kennzeichnen die Position der Primer im UTX-Knockout-Konstrukt (siehe B). **D.** LacZ Färbung der mit den Konstrukten transfizierten ES-Zellen.

Einige JmjC-enhaltende Histon-Demethylasen, wie KDM6B, KDM7 oder UTY weisen gleiche Substrat-Spezifitäten oder Sequenzhomologien zu UTX auf (Agger *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007; Walport *et al.*, 2014; Tsukada *et al.*, 2010). Andere wiederum haben entgegengesetzte Funktionen, wie die H3K4me^{2/3}-spezifischen Demethylasen KDM5A und B (Christensen *et al.*, 2007; Iwase *et al.*, 2007; Klose *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007). Um zu überprüfen, ob die Ablation von UTX in ES-Zellen eine kompensatorische Hoch- oder Runterregulierung dieser Demethylasen zur Folge hat, wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Abbildung 5.4B zeigt, dass die Expression von KDM5A, KDM5B und KDM6B durch den UTX-Knockdown unbeeinflusst blieb. UTY/KDM6C hingegen, ein UTX-Homolog auf dem Y-Chromosom, wies verglichen mit wt oder Scramble eine erniedrigte Expression in UTX shRNA #1 ES-Zellen auf, nicht aber in UTX shRNA #2 ES-Zellen. Die Ursache für die differenzielle UTY-Expression in den beiden Knockdown-Klonen könnte in der unterschiedlichen UTX-Knockdown-Effizienz oder in klonaler Varianz begründet sein. Die oben genannten Ergebnisse konnten mit UTX-Knockout-Zellen bestätigt werden. Während KDM5A, KDM5B, KDM6B und KDM7 sowohl in ES-Zellen als auch an Tag 3, 5 und 7 der ES-Zell-Differenzierung in den Knockout-Zellen genau so hoch exprimiert waren wie in Kontrollzellen, war UTY in ES-Zellen und während der Differenzierung runterreguliert, wobei die UTY-Expression in $UTX^{fl/Y}$ Zellen während der Differenzierung grundsätzlich niedriger war als in wt Zellen.

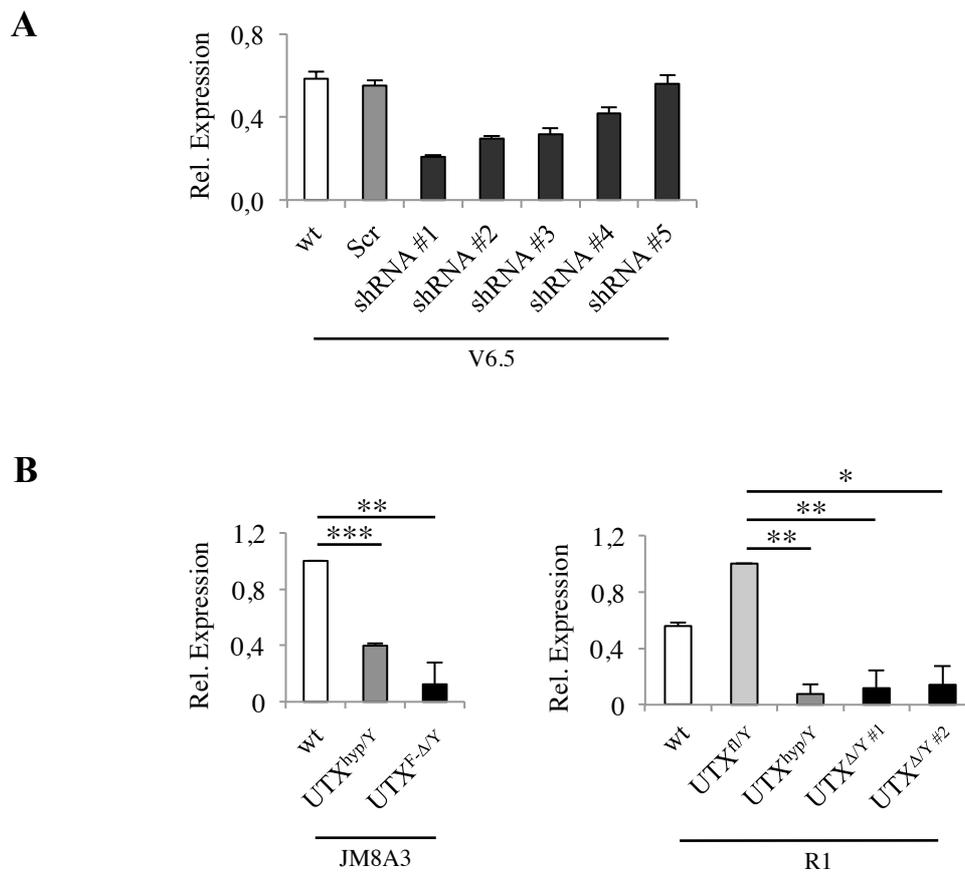


Abb. 5.3: UTX-Genexpression in Knockdown- und Knockout-ES-Zellen. **A.** UTX-Expression in V6.5 wt, Scramble- bzw. shRNA-exprimierenden ES-Zellen relativ zur Expression von β -Actin und GAPDH. **B.** UTX-Expression in JM8A3.N1 wt, JM8A3.N1 UTX^{hyp/Y} und JM8A3.N1 UTX^{F-Δ/Y} ES-Zellen sowie in R1 wt, R1 UTX^{hyp/Y}, UTX^{hyp/Y} und R1 UTX^{Δ/Y} ES-Zellen relativ zur Expression von RPL6 und RPS29. **A-B.** n=2. Fehlerbalken=STABW. Student t-test *: p \leq 0,05; **: p \leq 0,01; *** : p \leq 0,001.

UTX ist eine Komponente des MLL-Komplexes (Cho *et al.*, 2007; Issaeva *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007), welcher als transkriptioneller Aktivator die entgegengesetzte Funktion des repressiven PRC2-Komplexes besitzt (Agger *et al.*, 2007). Um zu überprüfen, ob der UTX-Knockout einen autoregulatorischen oder kompensatorischen Effekt auf Komponenten dieser beiden Komplexe hat, wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Abbildung 5.4B (unten) zeigt, dass die Komponenten Ash2L, MLL, EED und EZH2 in Knockout-ES-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nicht differenziell exprimiert waren.

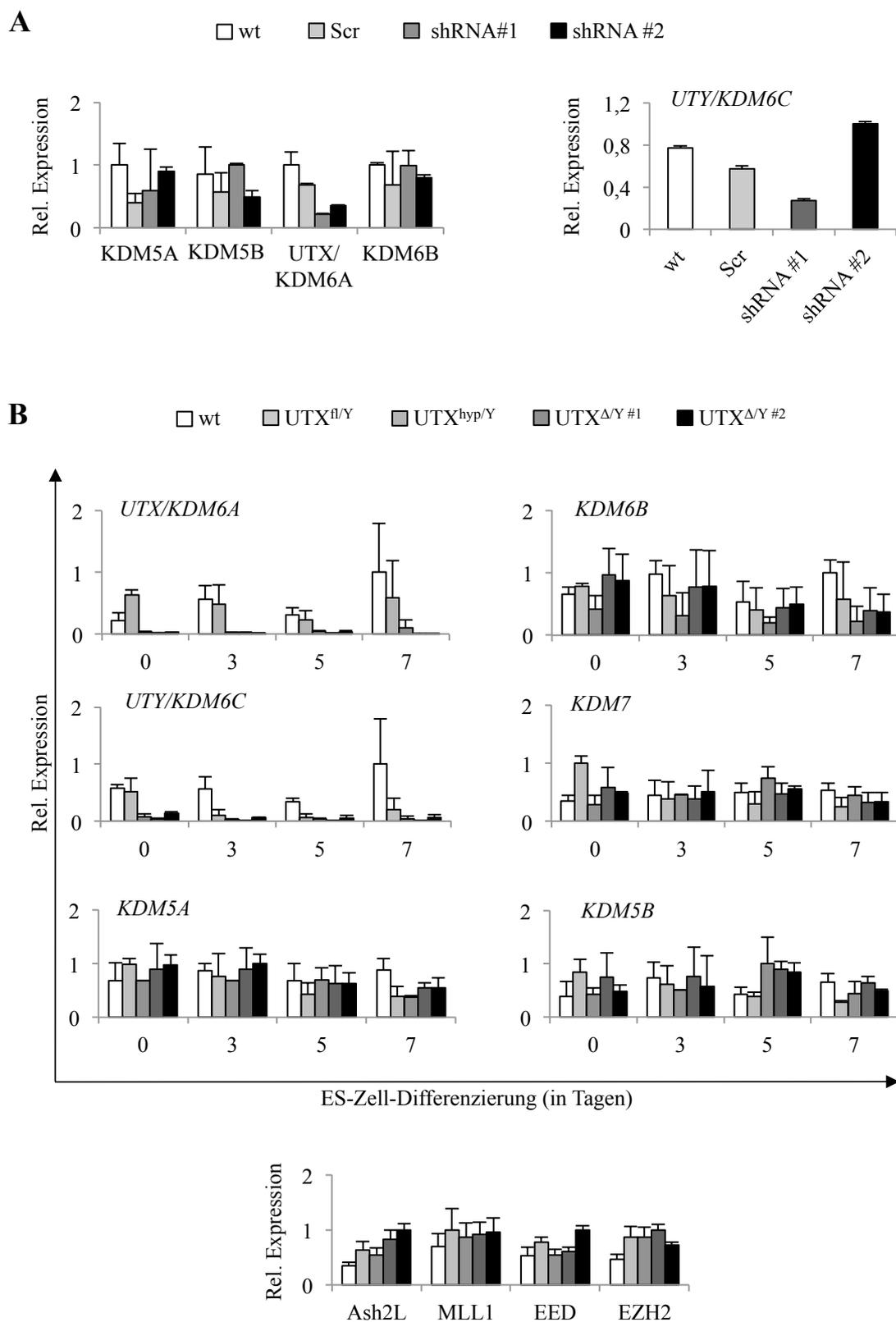


Abb. 5.4: Expression Keimblatt-spezifischer Gene sowie weiterer Histon-Demethylasen der JmjC-Protein-Familie in UTX-Knockdown/Knockout-ES-Zellen und -EBs. A. Expression der H3K4me^{2/3}-spezifischen Demethylasen KDM5A und KDM5B und der H3K27me^{2/3}-spezifischen Demethylasen KDM6A, 6B und 6C in V6.5 wt, Scramble und Knockdown-ES-Zellen relativ zur Expression von β -Actin und GAPDH.

B. Oben: Relative Expression der Demethylasen KDM5A, 5B, 6A, 6B, 6C und 7 in ES-Zellen (Tag 0) und während der ES-Zell-Differenzierung (Tag 3 bis 7 EBs). **Unten:** Expression einiger PRC- sowie Trx-Gene relativ zur Expression von RPL6 und RPS29. **A-B.** n=2. Fehlerbalken=STABW.

5.3 Ablation von UTX hat keine Auswirkung auf Pluripotenz, Zellzyklus und Zellproliferation von ES-Zellen

Um zu überprüfen, ob UTX eine Funktion bei der Aufrechterhaltung charakteristischer ES-Zell-Eigenschaften hat, wurde zunächst analysiert, ob die Expression von Faktoren des Kern-Pluripotenz-Netzwerks verändert war. Die Kern-Pluripotenzgene Sox2, Nanog und Oct4 waren im Vergleich zu Kontrollzellen weder in UTX-Knockdown- noch in Knockout-ES-Zellen differenziell exprimiert (Abb. 5.5A und B). Auch die charakteristische ES-Zell-Morphologie war nicht beeinträchtigt (Abb. 5.2D).

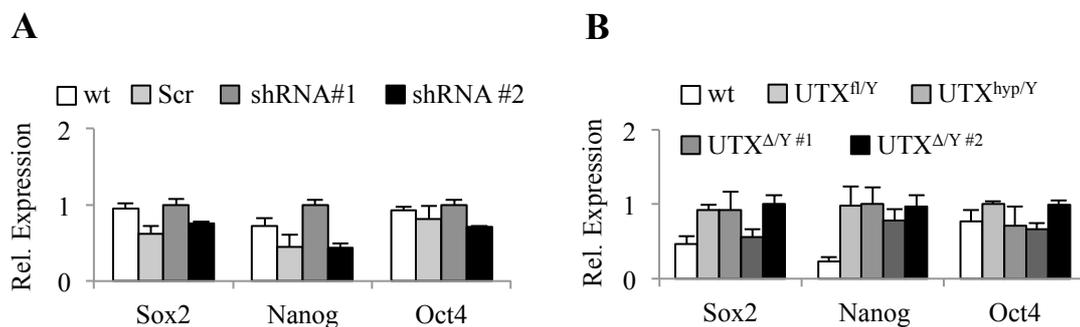


Abb. 5.5: Expression Pluripotenz-spezifischer Gene in UTX-Knockdown und -Knockout-ES-Zellen. A. Expression der Pluripotenz-spezifischen Gene Sox2, Nanog und Oct4 in V6.5 wt, Scramble und Knockdown-ES-Zellen relativ zur Expression von β -Actin und GAPDH. **B.** Expression der Pluripotenz-spezifischen Gene Sox2, Nanog und Oct4 relativ zur Expression von RPL6 und RPS29. **A-B.** n=2. Fehlerbalken=STABW.

Als nächstes wurde überprüft, ob die UTX-Ablation einen Effekt auf die ES-Zell-Proliferation hat. Hierzu wurden Kumulative Populationsverdopplungen (CPDs) von Knockdown- und Knockout-ES-Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 5.6A und B (jeweils links) zu sehen ist, gab es keine Unterschiede in der Zell-Proliferation zwischen Kontrollzellen und Knockdown- bzw. Knockout-ES-Zellen. Des Weiteren wurde die Fraktion der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmt. Sowohl in Knockdown- als auch in Knockout-ES-Zellen und -

EBs (Tag 3, 5, 7 und 9 der Differenzierung) gab es keine Unterschiede in der Verteilung der G0/G1, S und G2/M Zellzyklusphasen. Wie zu erwarten war, nahm die Fraktion der Zellen in der G0/G1-Phase, sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Knockdown- bzw. Knockout-Zellen, zu. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Ablation von UTX keinen Einfluss auf Pluripotenz, Zellzyklus oder die Proliferation von ES-Zellen hat.

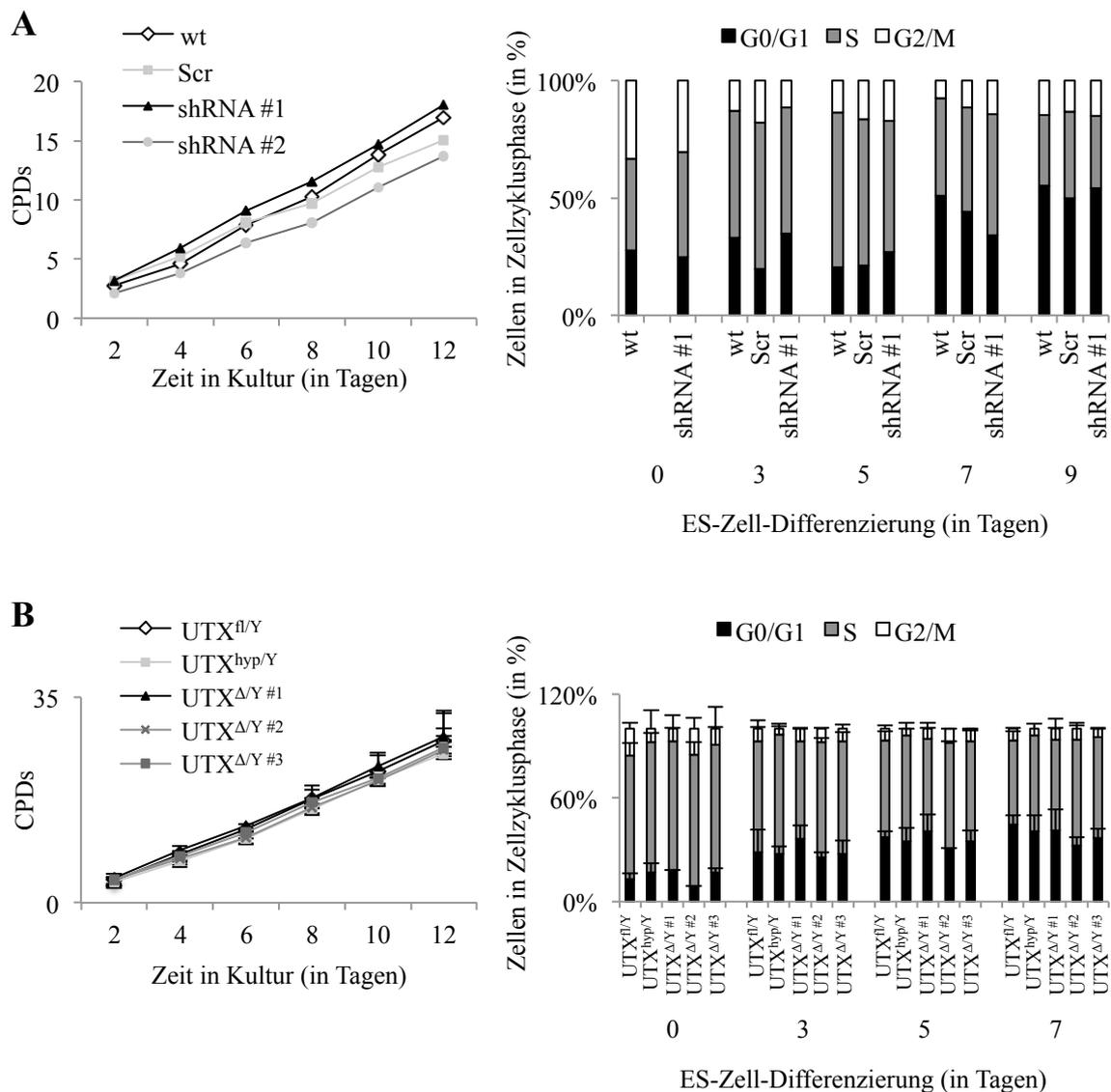


Abb. 5.6: Proliferation und Zellzyklus in ES-Zellen und EBs nach UTX-Ablation. A. Links: Kumulative Populationsverdopplungen (*Cumulative Population Doublings*; CPDs) von V6.5 wt, Scramble und UTX-Knockdown ES-Zellen. n=1. **Rechts:** Zellzyklusanalyse. n=1. **B. Links:** Kumulative Zellzahlen von R1 UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y} #1, UTX^{Δ/Y} #2 und UTX^{Δ/Y} #3 ES-Zellen. n=2. **Rechts:** Zellzyklusanalyse. n=2. **A-B. Links:** Für die Erfassung der kumulativen Zellzahlen wurden je 5×10⁵ ES-Zellen in ES-Zell-Medium ausplattiert und jeden zweiten Tag passagiert. **Rechts:** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen (G0/G1, S, G2/M). 0=ES-Zellen; 3-9=Tag 3, 5, 7 bzw. 9 der ES-Zell-Differenzierung (EBs). Fehlerbalken=STABW.

5.4 Globale Histonmodifikationen in UTX-Knockdown und -Knockout-ES-Zellen

Da UTX eine H3K27me^{2/3}-spezifische Demethylase ist, würde man nach UTX-Deletion einen globalen oder Gen-spezifischen Anstieg der H3K27-Methylierung erwarten. Um die globalen Level in der gesamten Protein-Fraktion zu überprüfen, wurden Western Blot-Analysen mit H3K27me³-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Außerdem wurden die globalen Level von H3K4me² und H3K4me³ untersucht, da sich UTX zusammen mit MLL2 in einem Komplex befindet (Cho *et al.*, 2007; Issaeva *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007), die eine H3K4-spezifische Methyltransferase-Aktivität in ES-Zellen hat (Hu *et al.*, 2013; Denissov *et al.*, 2014). Auch globale H3K27ac-Level wurden bestimmt, da beschrieben ist, dass H3K27ac-Level in *Drosophila* unter anderem von UTX abhängen (Tie *et al.*, 2012). Abbildung 5.7A zeigt Western Blot-Analysen von UTX-Knockdown-Protein-Proben (links) sowie deren densitometrische Quantifizierung (rechts). Unerwarteterweise waren die H3K27me³-Level in UTX-Knockdown-Zellen verglichen zu Kontrollzellen um etwa 30% erniedrigt. Das gleiche galt für H3K4me³-Level. Dieses Ergebnis wurde mit UTX-Knockout-ES-Zellen bestätigt (Abb. 5.7B). H3K27me³-Level waren in UTX^{Δ/Y} #1 und UTX^{Δ/Y} #2 Zellen niedriger als in UTX^{fl/Y} Zellen (Abb. 5.7B oben). Ebenso waren H3K4me³-Level in UTX^{Δ/Y} #1, UTX^{Δ/Y} #2 und UTX^{hyp/Y} Zellen niedriger als in UTX^{fl/Y} Zellen (Abb. 5.7B unten). Im Gegensatz dazu blieben H3K4me²-Level in Knockout-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen unverändert (Abb. 5.7B unten). Auch für H3K27ac gab es keine Differenzen zwischen Knockout- und Kontrollzellen (Abb. 5.7B oben).

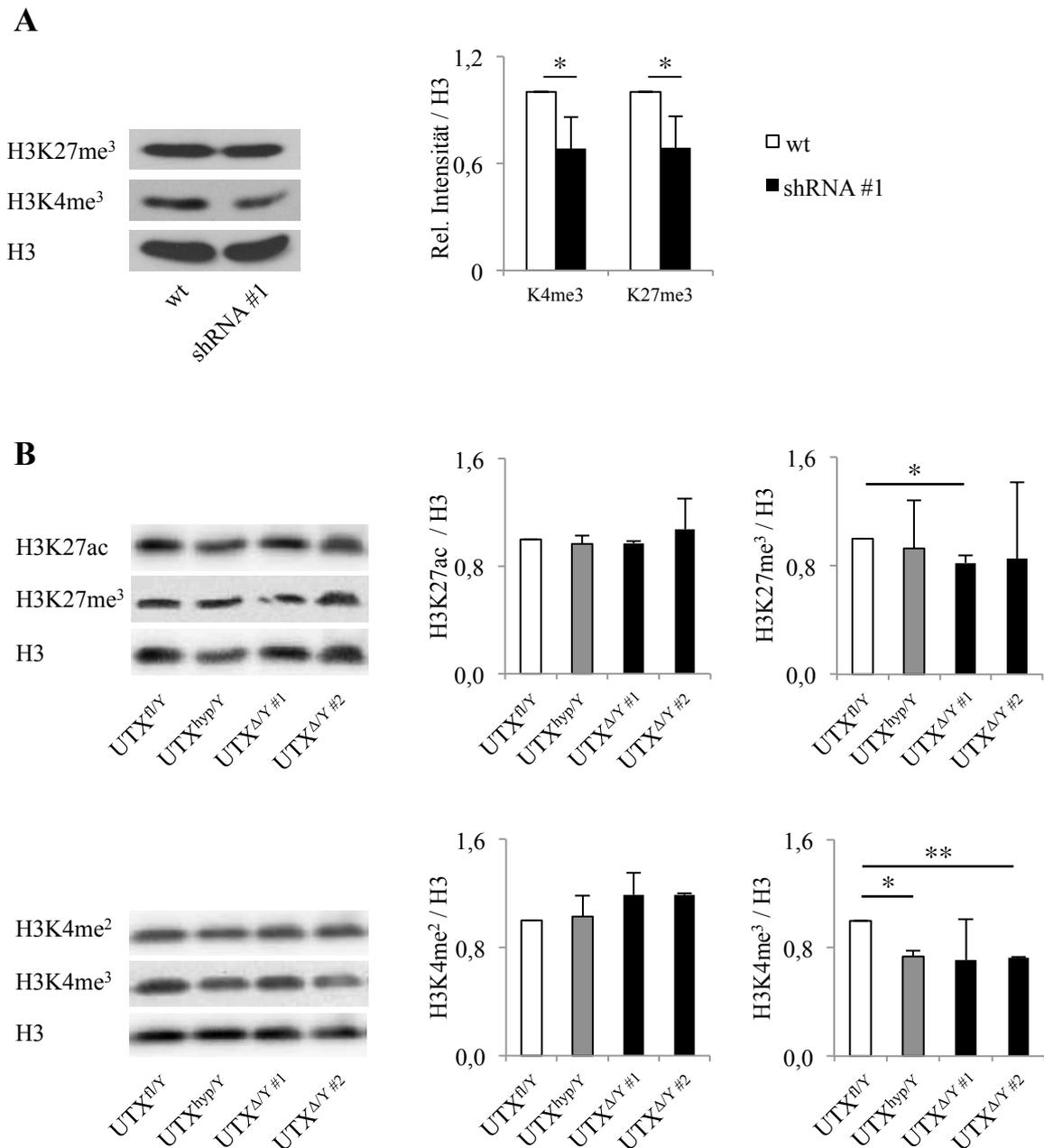
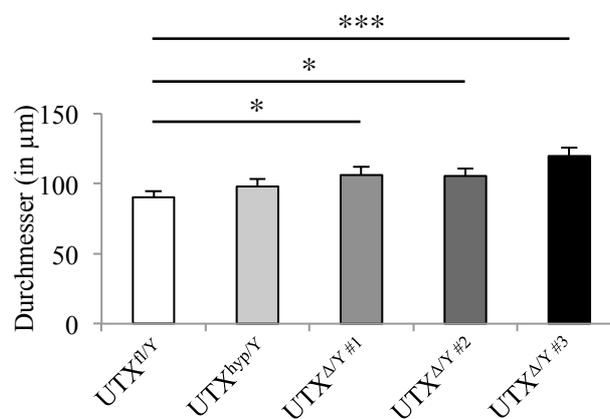
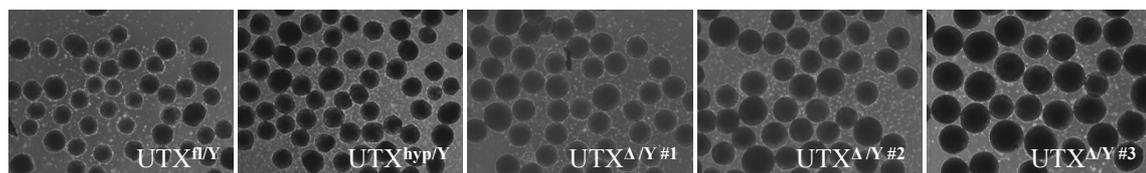


Abb. 5.7: Globale Histon-Modifikationen. A. Links: Western Blot-Analyse von V6.5 wt und Knockdown-ES-Zell-Protein-Proben. Die Detektion erfolgte mittels H3-, H3K27me³- und H3K4me³-spezifischen Antikörpern. Die Massen von H3, H3K4me³, H3K27me³ waren: 17 kDa. **Rechts:** Densitometrische Analyse der Western Blots. Gezeigt sind die Intensitäten der H3K4me³- und H3K27me³-Banden relativ zur Intensität von H3. n=5. Student t-test *: p ≤ 0,05. **B. Links:** Western Blot-Analyse von R1 UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y} #1 und UTX^{Δ/Y} #2 ES-Zell-Protein-Proben. Die Detektion erfolgte mittels H3K27me³-, H3K4me²- und H3K4me³-spezifischen Antikörpern. Die Massen von H3, H3K4me², H3K4me³, H3K27me³, H3K27ac waren: 17 kDa. **Rechts:** Densitometrische Analyse der Western Blots. Gezeigt sind Intensitäten der Banden relativ zu H3. n=2. Student t-test *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01.

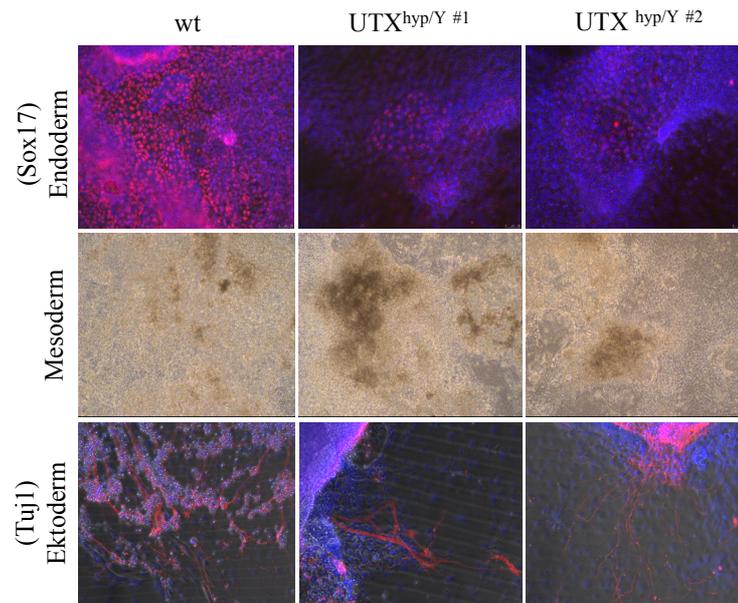
5.5 Verlust der UTX-Expression führt zu verminderter mesodermaler ES-Zell-Differenzierung

Um zu untersuchen, ob UTX eine Rolle während der ES-Zell-Differenzierung spielt, wurden Knockdown- und Knockout-ES-Zellen zunächst zu *Embryoid Bodies* (EBs) differenziert und morphologisch analysiert. In Abbildung 5.8A sind mikroskopische Aufnahmen von UTX-Knockout-EBs sowie von Kontrollzellen gezeigt. Die Auswertung der Durchmesser der EBs ist ebenfalls dargestellt. Alle drei Knockout-Klone formten größere EBs im Vergleich zu EBs aus Kontrollzellen. Größere Durchmesser wurden auch bei Knockdown-EBs beobachtet (Daten nicht gezeigt). Als nächstes wurde überprüft, ob ES-Zellen bei Ablation von UTX in der Lage sind, *in vitro* in Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren. Hierfür wurden JM8A3.N1 wt, UTX^{hyp/Y} #1 und UTX^{hyp/Y} #2 ES-Zellen (EUCOMM) in Kollaboration mit M. Boiani (Münster) mit verschiedenen Differenzierungs-Ansätzen in die mesodermale, endodermale und ektodermale Richtung differenziert. Wie in Abbildung 5.10A zu sehen ist, war es mit beiden UTX^{hyp/Y} Klonen möglich in Zellen aller Keimblätter zu differenzieren. Um die kardiale Differenzierung zu quantifizieren, wurden anschließend R1 wt und Knockout-Zellen von mir zu spontan kontrahierenden Kardiomyocyten (Beating Bodies) differenziert (Abb. 5.8B).

A



B



C

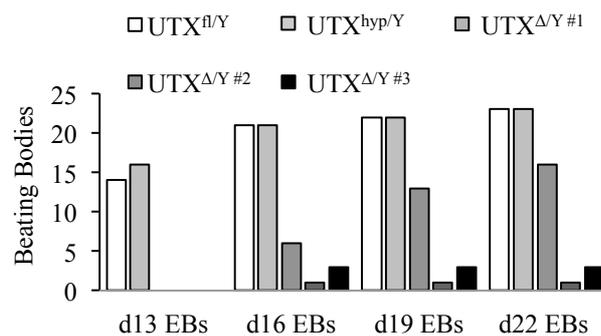


Abb. 5.8: *In vitro* Differenzierungs-Assays mit Knockout-ES-Zellen. **A.** Differenzierung von R1 UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y} #1, UTX^{Δ/Y} #2 und UTX^{Δ/Y} #3 ES-Zellen zu Embryoid Bodies. Gezeigt sind Beispiele mikroskopischer Aufnahmen (oben) und die Auswertung der Durchmesser der EBs mit Hilfe von ImageJ (unten). **B.** *In vitro* Differenzierung von JM8A3.N1 wt und UTX^{hyp/Y} ES-Zellen in Zellen der drei Keimblätter. **Oben:** Endodermale Zellen (Immunohistochemische Färbung mit Sox17), **Mitte:** Kardiomyocyten (Mesoderm), **Unten:** Neurale Zellen (Ektoderm, Immunohistochemische Färbung mit Tuj1). In Kollaboration mit Michele Boiani, MPI Münster. **C.** Differenzierung von R1 UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y} #1, UTX^{Δ/Y} #2 und UTX^{Δ/Y} #3 ES-Zellen zu Beating Bodies. ES-Zellen wurden zunächst zu EBs differenziert. Nach fünf Tagen wurde je ein EB in ein Well einer 24-Well-Platte transferiert. Nach 13, 16, 19 und 22 Tagen der Differenzierung (Tag 0=ES-Zellen) wurden kontrahierenden EBs (Beating Bodies) ausgezählt.

Zwei der drei UTX-Knockout-Klone (UTX^{Δ/Y} #2 und UTX^{Δ/Y} #3) bildeten bis Tag 22 der Differenzierung einen bzw. drei Beating Bodies, während ein Klon (UTX^{Δ/Y} #1) 16 Beating Bodies und die Kontrollzellen (UTX^{fl/Y} und UTX^{hyp/Y}) je 23 von 24 Beating Bodies bildeten. Dieses Ergebnis zeigt, dass UTX vermutlich eine Funktion während der ES-Zell-

Differenzierung, insbesondere während der kardialen Differenzierung, hat.

Auf Grund der veränderten Größe der EBs und der beeinträchtigten Differenzierung, wurde untersucht, ob die Expression Keimblatt-spezifischer Marker in Knockdown-ES-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen verändert ist (Abb. 5.9A). Eine verminderte Expression in allen drei Knockdown-Klonen (shRNA #1, #2 und #3) wurde vor allem für Brachyury beobachtet, aber auch für GSC und eine leichte Erniedrigung für Nestin. Sox21-Expression hingegen war in Knockdown-Zellen leicht erhöht. Da sowohl die Kardiomyocyten-Differenzierung als auch die Expression des mesodermalen Markers Brachyury durch den Knockdown beeinflusst war, wurde daraufhin die Expression weiterer mesodermaler Marker (Flk1, Tal1, Runx1, Tie2 und Gata1) während der ES-Zell-Differenzierung nach UTX-Ablation untersucht (Abb. 5.9B). Auch in diesen Zellen ($UTX^{hyp/Y}$, $UTX^{\Delta/Y}$ #1 und $UTX^{\Delta/Y}$ #2) war Brachyury zu allen drei Zeitpunkten der Differenzierung (Tag 3, 5 und 7) im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich runterreguliert. Auch Flk1 und Runx1 waren ab Tag 5 runterreguliert. Das Gleiche galt für Gata1 ab Tag 7 der *in vitro* Differenzierung. Für Tal1 und Tie2 hingegen wiesen die Knockout-Zellen keine signifikant veränderte Expression im Vergleich zu Kontrollzellen auf.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Differenzierung von Knockout-ES-Zellen auch *in vivo* beeinträchtigt ist. Hierzu wurden in Kollaboration mit M. Boiani (MPI Münster) Teratom-Tests durchgeführt wurden. Wt, $UTX^{hyp/Y}$ #1 und $UTX^{hyp/Y\#2}$ ES-Zellen wurden subkutan in Mäuse injiziert und nach einigen Wochen wurde die Teratombildung analysiert. Das Gewicht der Teratome war bei $UTX^{hyp/Y}$ Zellen im Durchschnitt deutlich höher verglichen mit wt Kontrollzellen (Abb. 5.10 oben). Dies korrelierte mit dem Durchmesser der UTX-Knockout-EBs. HE-Färbungen von Teratom-Schnitten machten deutlich, dass Strukturen aller drei Keimblätter (Epithel, Muskelfasern, Fettzellen, Knorpel und neuroektodermale Strukturen) in $UTX^{hyp/Y}$ Teratomen vorhanden waren.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die mesodermale ES-Zell-Differenzierung bei Ablation von UTX *in vitro* beeinträchtigt ist und UTX vermutlich eine Funktion in der Regulierung der mesodermalen Differenzierung übernimmt.

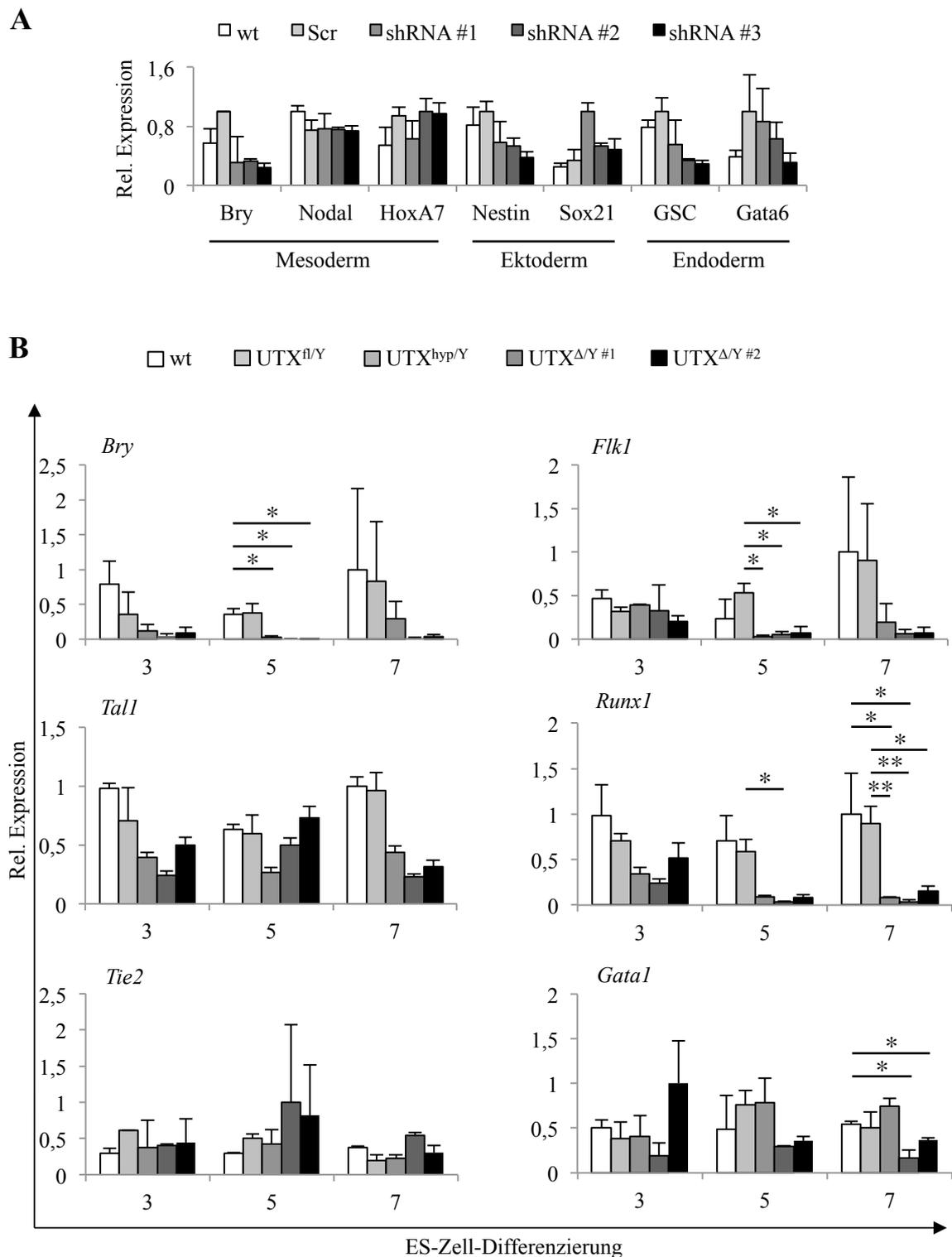


Abb. 5.9: Expression Keimblatt-spezifischer Gene in UTX-Knockdown/Knockout-ES-Zellen und -EBs.
A. Expression Keimblatt-spezifischer Gene in V6.5 wt, Scramble und Knockdown-ES-Zellen relativ zur Expression von β -Actin und GAPDH. **B.** Expression mesodermaler Marker während der ES-Zell-Differenzierung (R1 wt, UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y #1} und UTX^{Δ/Y #2} Tag 3 bis 7 EBs) relativ zur Expression von RPL6 und RPS29. **A-B.** n=2. Fehlerbalken=STABW. Student t-test *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01.

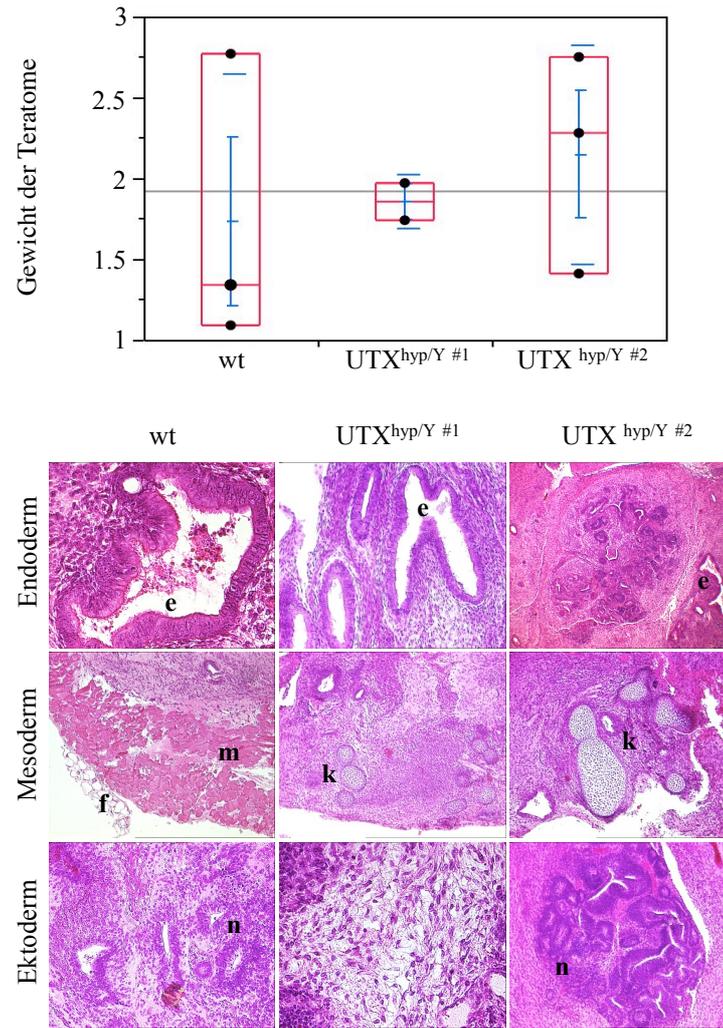


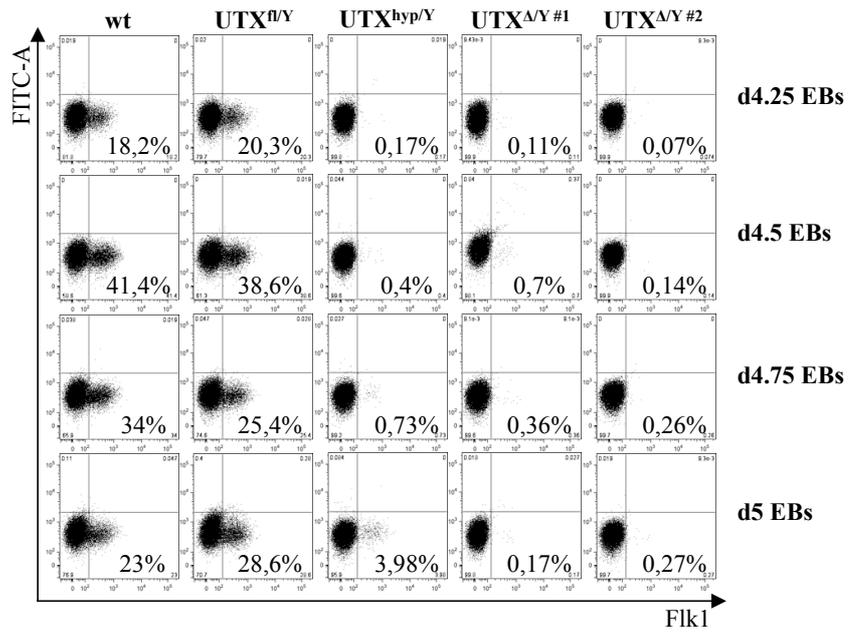
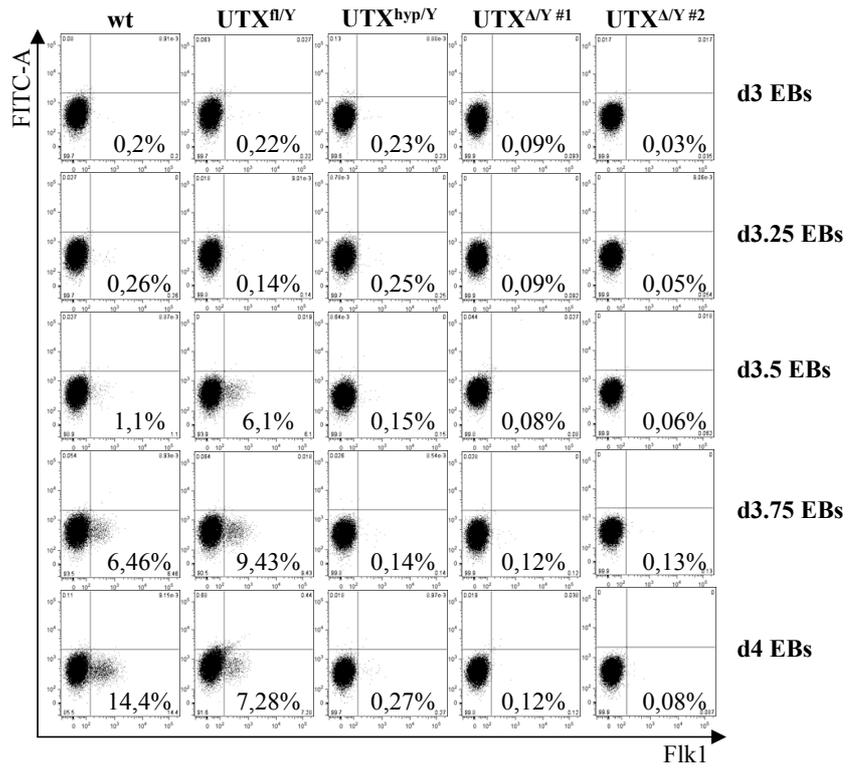
Abb. 5.10: *In vivo* Differenzierungspotenzial von UTX^{hyp/Y} ES-Zellen. Teratom-Test mit JM8A3.N1 wt und UTX^{hyp/Y} ES-Zellen. ES-Zellen wurden subkutan in NOD scid Mäuse injiziert. Nach 4 bis 10 Wochen wurden die Teratome entfernt, in Paraffin eingebettet und geschnitten. **Oben:** Gewicht der Teratome. **Unten:** HE-Färbungen. Gezeigt sind Beispielbilder endodermaler (e=Epithel), mesodermaler (m=Muskelfasern; f=Fettzellen; k=Knorpel) und ektodermaler Strukturen (n=Neuroektoderm). In Kollaboration mit Michele Boiani, MPI Münster.

5.6 UTX wird für die frühe hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung benötigt

Die Genexpressionsanalysen mesodermaler Marker haben gezeigt, dass unter anderem Flk1, ein spezifischer Marker der Hämangioblasten (Blast Colony Forming Cell; BL-CFC), ein gemeinsamer Vorläufer von Endothel- und Blutzellen, in differenzierenden UTX-Knockout-Zellen runterreguliert ist. Es ist bekannt, dass die Flk1-Expression in differenzierenden ES-Zellen transient ist und innerhalb weniger Stunden variieren kann (Kabrun *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob Flk1-positive Zellen während der ES-Zell-Differenzierung von UTX-Knockout-Zellen gar nicht erst entstehen oder zu einem späteren oder früheren Zeitpunkt gebildet werden als in wt-Zellen, wurde die Frequenz Flk1-positiver Zellen alle 6 Stunden in EBs zwischen Tag 3 und Tag 5 der Differenzierung durchflusszytometrisch erfasst. Des Weiteren konnte auf diese Weise ein geeigneter Zeitpunkt für BL-CFC Assays bestimmt werden. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie in zwei separaten Experimenten (Tag 3 bis Tag 4 bzw. Tag 4 bis Tag 5). Abbildung 5.11A zeigt die Dotplot-Diagramme und die Anzahl Flk1-positiver Zellen in UTX-Knockout-EBs sowie in Kontrollzellen. Die Flk1-Expression setzte ab Tag 3.5 (6,1% in UTX^{fl/y} Zellen) bzw. Tag 3.75 (6,46% in wt Zellen) der Differenzierung in den Kontrollzellen ein und stieg bis zu einem Peak an Tag 4.5 (38,6% in UTX^{fl/y} Zellen; 41,4% in wt Zellen) an. Anschließend verringerte sich die Frequenz Flk1-positiver Zellen wieder bis Tag 5 (28,6% in UTX^{fl/y} Zellen; 23% in wt Zellen). In UTX^{hyp/y} Zellen blieb die Fraktion Flk1-positiver Zellen bis einschließlich Tag 4.75 unter einem Prozent. Erst an Tag 5 wurde Flk1 zu 3,98% exprimiert. In beiden UTX-Knockout-Klonen (UTX^{Δ/y} #1 und UTX^{Δ/y} #2) blieb die Expression zwischen Tag 3 und Tag 5 immer unter einem Prozent. Die Flk1-Expression zu allen Zeitpunkten ist in Abbildung 5.11B in einem Balkendiagramm zusammengefasst.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit UTX-Knockdown-EBs erzielt. Während wt und Scramble EBs an Tag 5 der Differenzierung etwa 20% Flk1-positive Zellen enthielten, waren es bei UTX shRNA #1 weniger als 1%. UTX shRNA #2 Zellen enthielten etwa 30% Flk1-positiver Zellen, was wiederum in der geringeren UTX-Knockdown-Effizienz begründet sein könnte (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch zeigt, dass Flk1 in UTX-Knockout-Zellen zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung exprimiert wird, d.h. dass unter UTX-Knockout keine zeitliche Verschiebung der Expression stattfindet und Flk1-positive Zellen nicht entstehen.

A



B

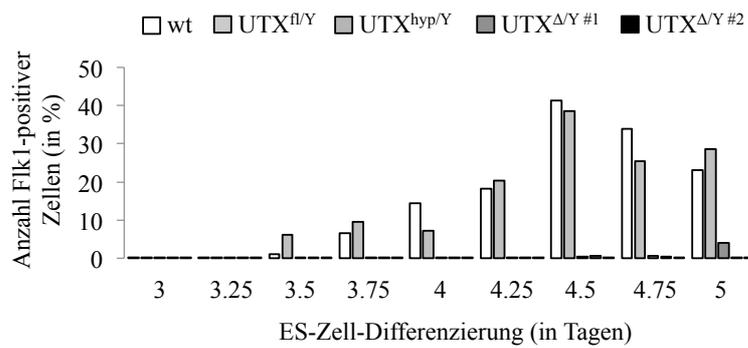


Abb. 5.11: Frequenzen Flk1⁺ Zellen während der EB-Differenzierung. A-B. ES-Zellen wurden zu EBs differenziert und nach 3, 3.25, 3.5, 3.75 und 4 Tagen bzw. 4.25, 4.5, 4.75 und 5 Tagen zu Einzelzellen dissoziiert und mit einem Anti-Flk1-Antikörper angefärbt. Der Anteil Flk1-positiver Zellen wurde am Durchflusszytometer bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo relativ zur IgG-Isotypen-Kontrolle. **A.** Frequenzen der Flk1⁺ Zellen in R1 wt, UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y #1} und UTX^{Δ/Y #2} EBs, dargestellt als Dot-Plots- **Oben:** Tag 3 bis Tag 4 EBs. **Unten:** Tag 4.25 bis Tag 5 EBs. **B.** Quantitative Auswertung Flk1-positiver Zellen in UTX-Knockout-EBs.

Da die UTX-Ablation zu einer stark verminderten Expression des Hämangioblasten-Markers Flk1 führte, wurde als nächstes die Blast-Kolonie-Formierung nach UTX-Ablation überprüft (Kennedy *et al.*, 1997). Hierfür wurde der BL-CFC Assay mit 4.5 Tage alten EBs in Methylcellulose-Medium in Gegenwart von VEGF durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die höchste Frequenz Flk1-positiver Zellen in wt EBs zu beobachten war. Da kaum Flk1-positive Zellen in Knockdown- oder Knockout-EBs vorhanden waren, habe ich auf einen Flk1-sort verzichtet und alle EB-Einzelzellen eingesetzt. Abbildung 5.12A zeigt eine beispielhafte mikroskopische Aufnahme einer Blast-Kolonie nach etwa 5 Tagen in Methylcellulose-Kultur. In Abbildung 5.12B ist die Anzahl der Blast-Kolonien aus Knockdown-Zellen gezeigt. UTX-Knockdown-Zellen formten etwa 60% weniger Blast-Kolonien verglichen mit wt Zellen. Allerdings formten auch Scramble Kontrollzellen vergleichsweise weniger Kolonien. Während UTX wt und UTX^{fl/Y} Kontrollzellen 700 bis 900 Blast-Kolonien formten, formten UTX^{hyp/Y} Zellen etwa 500, und UTX^{Δ/Y #1} und UTX^{Δ/Y #2} Zellen lediglich etwa 200 Blast-Kolonien. Zusammenfassend stellen diese Ergebnisse dar, dass UTX bei der Regulierung von Flk1 und Brachyury und somit an der Generierung hämatopoetischer und endothelialer Vorläuferzellen funktionell beteiligt ist.

Die hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung erfolgt schrittweise in EBs. Nach der transienten Generierung von BL-CFCs entstehen primitive erythroide Vorläuferzellen, gefolgt von definitiv erythroiden und myeloiden Vorläufern (Keller *et al.*, 1993). Um zu überprüfen, ob auch die frühe hämatopoetische Differenzierung vom UTX-Knockdown oder -Knockout betroffen ist, wurden hierfür Einzelzellen 6 bis 8 Tage alter EBs in Methylcellulose-Medium mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren ausgesät und nach etwa 10 Tagen wurde die Anzahl hämatopoetischer Kolonien bestimmt. Abbildung 5.13A zeigt Beispiele mikroskopischer Aufnahmen hämatopoetischer Kolonien. Sowohl in Knockdown- als auch in Knockout-Zellkulturen wurden CFU-G, CFU-M, CFU-GM und CFU-GEMM identifiziert. Abbildungen 5.13B und C zeigen die relative Anzahl aller Kolonietypen aus Knockdown- (B) und Knockout-Zellen (C) verglichen mit Kontrollzellen. Sowohl in Knockdown- als auch in Knockout-Kulturen war die Gesamtzahl hämatopoetischer Kolonien reduziert. Dieses

Ergebnis zeigt, dass nicht nur die Generierung hämatopoetischer/endothelialer Vorläufer durch den UTX-Knockdown oder -Knockout beeinträchtigt ist, sondern auch die frühe hämatopoetische Differenzierung.

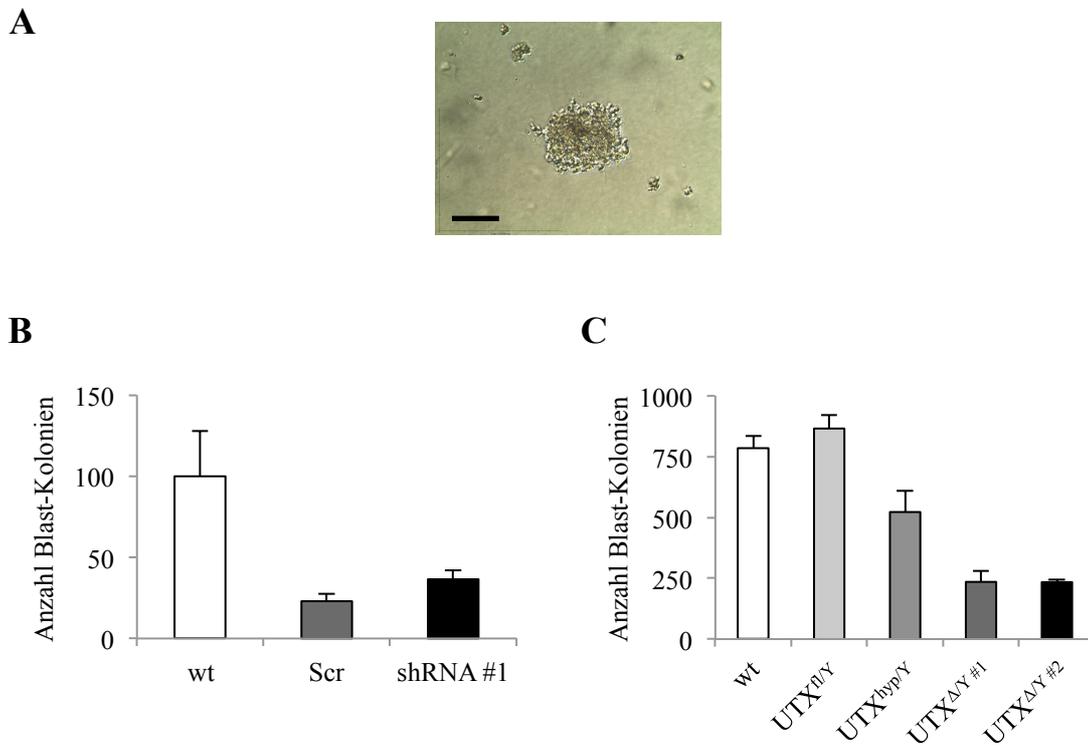


Abb. 5.12: BL-CFC Assay. **A.** Repräsentative mikroskopische Aufnahme einer Blast-Kolonie. Maßstabsbalken=500µm. **B.** Anzahl der Blast-Kolonien aus V6.5 wt, Scramble und Knockdown Tag 4.5 EBs. n=2. **C.** Anzahl der Blast-Kolonien aus R1 wt, UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y} #1 und UTX^{Δ/Y} #2 Tag 4.5 EBs. n=2. **A-B.** Einzelzellsuspensionen aus 4.5 Tage alten EBs wurden in Methylcellulose-Medium zusammen mit Wachstumsfaktoren (VEGF, IL6, SCF, Holo-Transferrin, Ascorbinsäure, TPO) kultiviert. Nach etwa 5 Tagen wurde die Anzahl der Blast-Kolonien bestimmt.

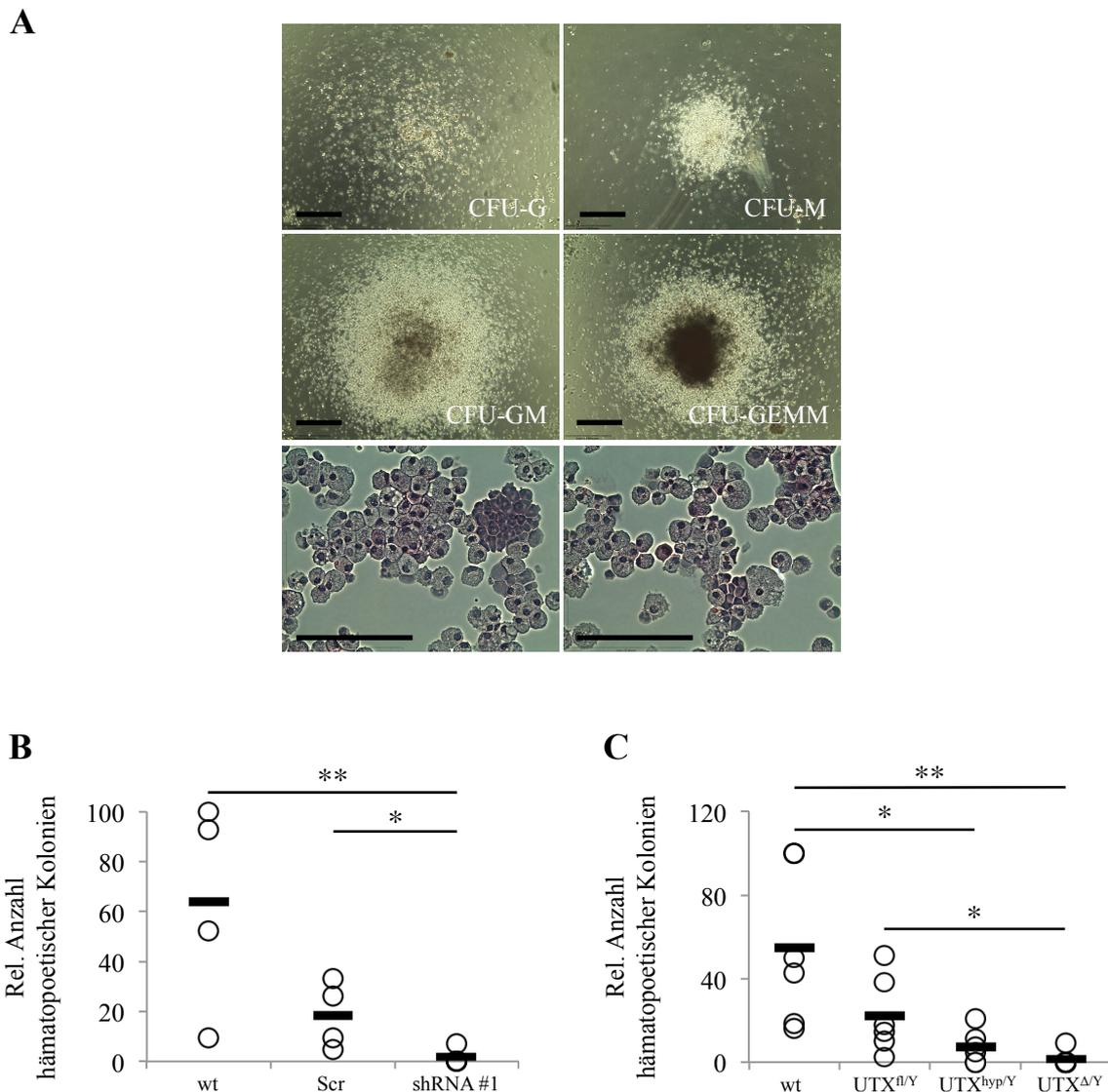


Abb. 5.13: Hämatopoetische Differenzierung von UTX-Knockdown und -Knockout-ES-Zellen. A. Obere Reihen: Beispiele mikroskopischer Aufnahmen hämatopoetischer Kolonien. CFU-G=Colony-Forming Unit Granulocyte; CFU-M=CFU Macrophage; CFU-GM=CFU Granulocyte, Macrophage; CFU-GEMM=Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte. Maßstabsbalken=500 μ m. **Untere Reihe:** Histologische Analyse hämatopoetischer Kolonien aus ES-Zellen. HE-Färbung. Maßstabsbalken=127 μ m. **B.** Anzahl hämatopoetischer Kolonien aus V6.5 wt, Scramble und Knockdown Tag 7 EBs. Es sind die einzelnen Werte aus 4 unabhängigen Experimenten (•) und der Durchschnitt (–) gezeigt. Student t-test *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. **C.** Anzahl hämatopoetischer Kolonien aus R1 wt, UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y} Tag 6 bis 8 EBs. **A-B.** Einzelzellsuspensionen aus 6, 7 oder 8 Tage alten EBs wurden in Methylcellulose-Medium zusammen mit Wachstumsfaktoren (IL3, IL6, SCF, GM-CSF, Epo) kultiviert. Nach etwa 10 Tagen wurde die Anzahl hämatopoetischer Kolonien bestimmt.

5.7 Die H3K27-Methylierung ist an Promotoren mesodermaler Marker in UTX-Knockout-EBs unverändert

Wie die bisherigen Ergebnisse zeigen, ist sowohl die Expression mesodermaler Marker als auch die frühe hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung abhängig von UTX. Um zu überprüfen, ob dies von der H3K27-Methylierung abhängt, habe ich H3K27me³-Level an den Promotoren von Brachyury, Flk1, Tal1 und Runx1 während der Differenzierung mittels ChIP analysiert (Abb. 5.14). An den Promotoren von Brachyury und Flk1 wurden die H3K27-Trimethylierungslevel sowohl up- als auch downstream der TSS überprüft, für Tal1 und Runx1 wurde jeweils nur eine Position untersucht. Es gab keine Unterschiede der H3K27-Trimethylierungslevel an den Promotoren an Tag 3, 5 und 7 der Differenzierung. H3K27-Trimethylierungslevel in Knockout-Zellen waren an Positionen downstream der TSS von Brachyury und Flk1 an Tag 7 im Vergleich zu Kontrollzellen sogar leicht erniedrigt. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Regulierung von Brachyury und Flk1 unabhängig von der H3K27-Methylierung erfolgt.

Da globale H3K4me³-Level in Knockout ES-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen niedriger waren, war es von Interesse zu sehen, ob dies auch lokal an den Promotoren der mesodermalen Marker der Fall ist. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede in den H3K4-Trimethylierungsleveln. An Tag 7 waren die Level downstream der TSS von Brachyury etwas niedriger.

Da bekannt ist, dass in *Drosophila* bei UTX-Knockdown H3K27ac-Level reduziert werden (Tie *et al.*, 2012), war es auch hier von Interesse, ob die Regulierung von Brachyury und Flk1 mit H3K27-Acetylierungsleveln korreliert. An Tag 3 der Differenzierung waren die H3K27ac-Level in Knockout-Zellen an Promotoren von Brachyury, Flk1 und Tal1 leicht erhöht. Im weiteren Verlauf der Differenzierung gab es wiederum keine Unterschiede. Jedoch ist anzumerken, dass EBs eine heterogene Zellpopulation darstellen. Neben endodermalen und ektodermalen Zellen, entstehen in der mesodermalen Fraktion abhängig vom Fortschreiten der Differenzierung Bry⁻Flk1⁻, Bry⁺Flk1⁻ oder Bry⁺Flk1⁺ Zellpopulationen, welche Stadien des Prä-Mesoderm, Prä-Hämangioblast und Hämangioblast darstellen (Fehling *et al.*, 2003). Unterschiede in den Histonmodifikationen könnten durch diese Heterogenität untergehen. Um dies zu umgehen, wurde im nächsten Versuch eine Separierung Flk1-positiver von Flk1-negativen Zellen in R1 wt Tag 4.5 EBs durchgeführt (Abb. 5.15). Mit den Flk⁺ und Flk1⁻ Zellproben wurden ChIP- sowie Genexpressions-Analysen vorgenommen. Abbildung 5.15A zeigt die schematische Darstellung der experimentellen Strategie.

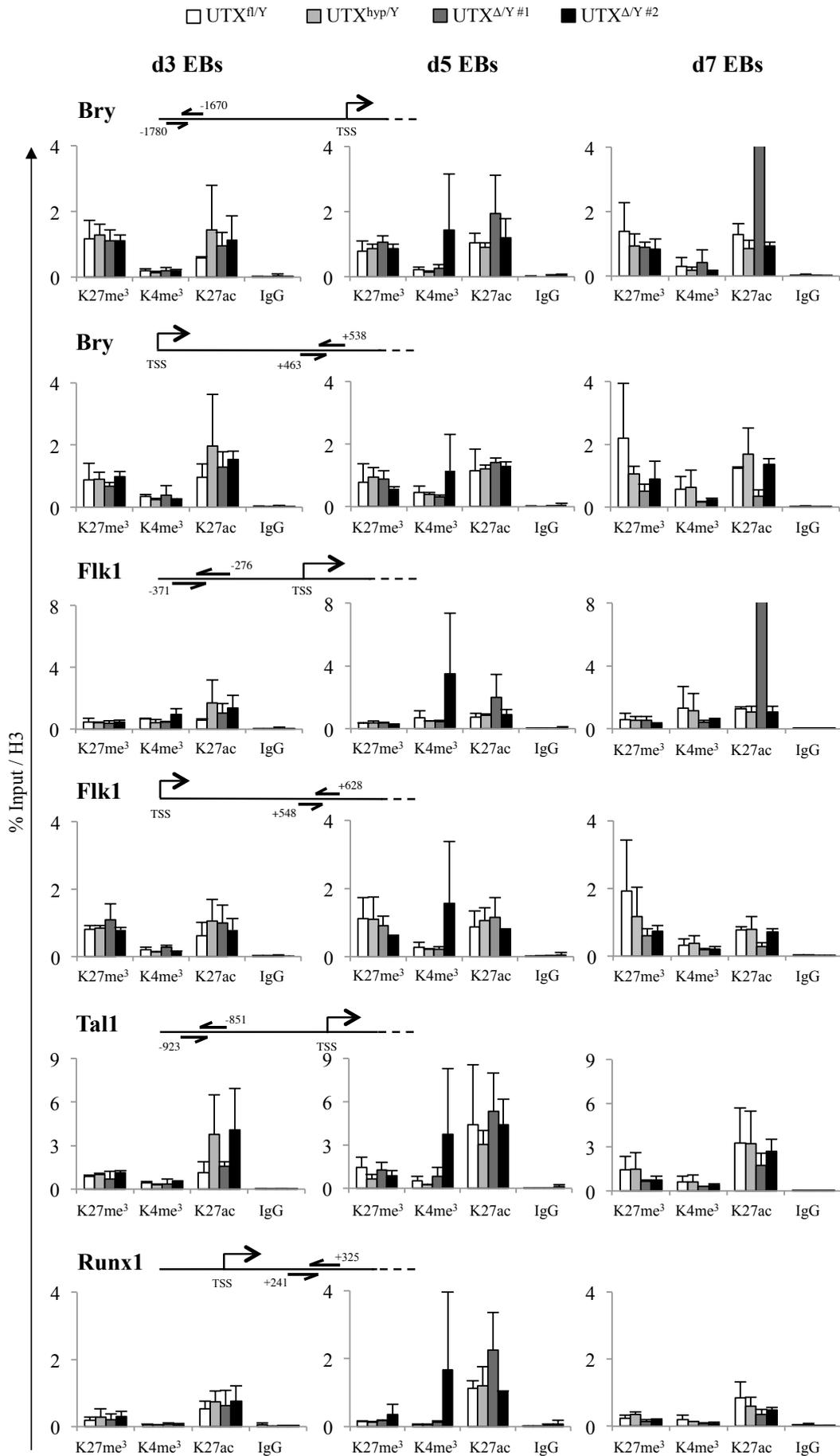


Abb. 5.14: H3K4me³, H3K27me³, H3K27ac-spezifische ChIP-Analysen in UTX-Knockout EBs. H3K4-, H3K27-Methylierungs- und H3K27-Acetylierungslevel an Promotoren mesodermaler Marker in R1 UTX^{fl/Y}, UTX^{hyp/Y}, UTX^{Δ/Y} #1, UTX^{Δ/Y} #2 Tag 3, 5 und 7 EBs relativ zum Input und zu H3. Die genaue Position der qPCR-Primer ist jeweils relativ zur TSS schematisch dargestellt. n=2. Fehlerbalken=STABW.

In Abbildung 5.15B ist die Genexpression von Bry, Flk1, Tal1 und Runx1 in Flk1-positiven und -negativen R1 wt EBs gezeigt. Flk1 wurde wie erwartet in Flk1⁻ Zellpopulationen kaum exprimiert. Brachyury wurde sowohl in Flk1⁺ als auch in Flk1⁻ Zellpopulationen exprimiert, was darauf hindeutet, dass sich die Zellen zum Teil im Prä-Hämangioblast, zum Teil im Hämangioblast-Stadium befanden. Tal1 und Runx1 wurden jeweils in Flk1⁻ Zellen niedriger exprimiert als in Flk1⁺ Zellen. Abbildung 5.15C zeigt H3K27-, H3K4-Trimethylierungslevel und H3K27-Acetylierungslevel upstream und downstream der TSS sowie unmittelbar an der TSS von Brachyury und Flk1 bzw. upstream von Tal1 und downstream von Runx1 in Flk1-positiven und Flk1-negativen Zellpopulationen. Für Brachyury waren die H3K27-Trimethylierungslevel upstream und downstream der TSS sowie an der TSS in Flk1⁺ und Flk1⁻ Zellen etwa gleich hoch. Dies korrelierte nicht mit der Genexpression von Brachyury. H3K4-Trimethylierungslevel waren upstream der TSS etwa gleich hoch, direkt an der TSS in Flk1⁻ Zellen höher und downstream niedriger als in Flk1⁺ Zellen. H3K27-Acetylierungslevel waren an allen Positionen in Flk1⁻ Zellen höher. Die H3K27-Trimethylierungslevel waren in Flk1⁻ Zellen upstream der TSS und an der TSS von Flk1 niedriger, downstream etwa gleich hoch in Flk1⁺ und Flk1⁻ Zellen. H3K4-Trimethylierungs- und H3K27-Acetylierungslevel waren in Flk1⁻ Zellen an allen Positionen jeweils höher als in Flk1⁺ Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Regulierung von Brachyury und Flk1 entweder Methylierungs- und Acetylierungs-unabhängig oder über Methylierungen an Positionen downstream der TSS abläuft.

Upstream von Tal1 war die H3K27-Trimethylierung in Flk1⁻ Zellen höher als in Flk1⁺ Zellen. Dies korrelierte mit einer niedrigeren Tal1-Genexpression in Flk1⁻ Zellen, was auf eine H3K27-Methylierungs-abhängige Regulierung hindeuten könnte. Downstream von Runx1 waren die H3K4- und H3K27- Trimethylierungslevel in beiden Zellpopulationen gleich hoch. Lediglich die H3K27-Acetylierungslevel waren in Flk1⁻ Zellen höher als in Flk1⁺ Zellen.

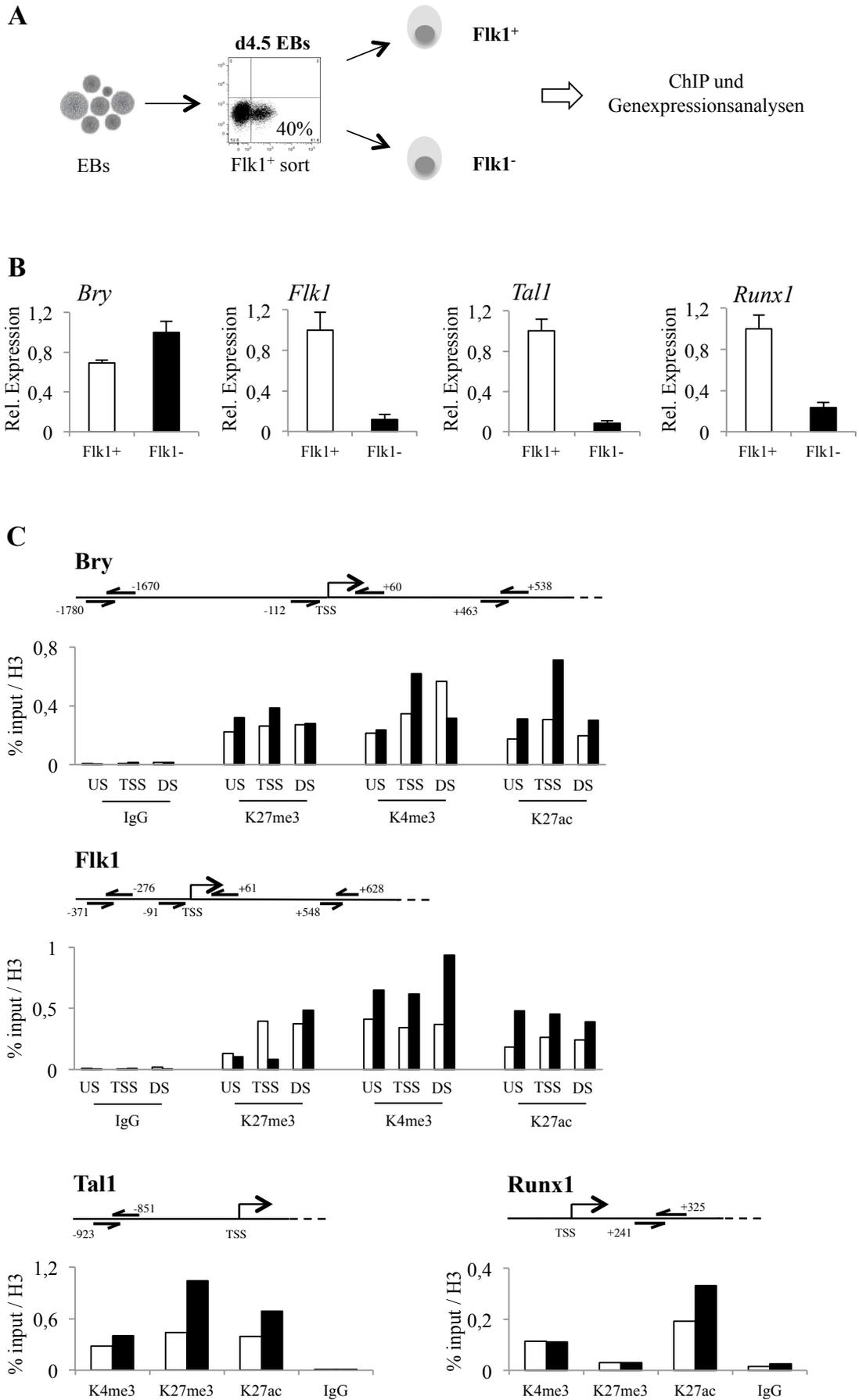


Abb. 5.15: H3K4me³, H3K27me³, H3K27ac-spezifische ChIP-Analysen in Flk1-positiven und Flk1-negativen R1 wt EBs. **A.** Experimentelle Strategie. Einzelzellen von 4.5 Tage alten R1 wt EBs wurden mit einem Flk1-spezifischen Antikörper gefärbt und anschließend an MicroBeads gekoppelt. Die Sortierung Flk1-positiver Zellen erfolgte über magnetischen Säulen. Die Ausbeute wurde anschließend am Durchflusszytometer überprüft. **B.** Expression von Brachyury, Flk1, Tal1 und Runx1 in Flk1-positiven und -negativen R1 wt EBs relativ zur Expression von RPL6 und RPS29. **C.** H3K4-, H3K27-Methylierungs- und H3K27-Acetylierungslevel upstream, downstream und unmittelbar an der TSS von Flk1 und Bry bzw. H3K4-, H3K27-Methylierungs- und H3K27-Acetylierungslevel an Promotoren von Tal1 und Runx1 in Flk1-positiven und -negativen R1 wt EBs relativ zum Input und H3. Die genaue Position der qPCR-ChIP-Primer ist jeweils relativ zur TSS angegeben. n=1.

5.8 Inhibition der H3K27-spezifischen Demethylase-Aktivität während der ES-Zell-Differenzierung induziert DNA-Schäden

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigen, dass die Demethylase-Aktivität von UTX für die Regulation mesodermaler Gene nicht entscheidend ist oder eine indirekte Regulierung durch UTX stattfindet. Um zu analysieren, welche Rolle die H3K27-spezifische Demethylase-Aktivität in ES-Zellen und während der ES-Zell-Differenzierung spielt, wurde ein spezifischer Inhibitor (GSK-J4; Kruidenier *et al.*, 2012) eingesetzt (Hofstetter *et al.*, eingereicht). Die Behandlung von ES-Zellen und EBs durch Christine Hofstetter mit GSK-J4 resultierte in erhöhten H3K27me³-Leveln im Vergleich zu behandelten Zellen mit den Kontrollsubstanzen GSK-J5 und DMSO. Die Inhibitor-Behandlung hatte keinen Effekt auf Zellproliferation, Pluripotenz und Zellzyklus von ES-Zellen, wohingegen EBs nach einer zweitägigen Behandlung apoptisch wurden und erhöhte Level an cleaved Caspase-3 aufwiesen (Abb. 5.16A). Einhergehend mit der geringeren Zellzahl in EBs wurde von C. Hofstetter eine Anreicherung der Zellen in der G1 Phase und weniger Zellen in der S Phase des Zellzyklus beobachtet. Microarray-Analysen an Tag 0.75 der Differenzierung, vor Beginn der Apoptose, zeigten keine differenzielle Expression Mesoderm-spezifischer Gene, jedoch eine differenzielle Expression von Zelltod- und Zellproliferations-Genen, unter anderem auch von DNA-Schaden-assoziierten Genen. Auch Signalwege der DNA-Reparatur wurden aktiviert, was an erhöhten γ H2AX und p-p53 Leveln ersichtlich wurde. Um zu überprüfen, ob dies mit erhöhten DNA-Strangbrüchen einherging, führte ich einen Alkaline Comet Assay durch (Abb. 5.16B). Als Zeitpunkt wurde Tag 1 der Differenzierung gewählt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Apoptose statt fand (Hofstetter *et al.*, eingereicht und Abb. 5.16B). Als Positivkontrolle für DNA-Schaden wurden EBs 2 Gy und 6 Gy ionisierender Strahlung ausgesetzt. Wie in Abbildung 5.16B zu sehen ist, wiesen mit GSK-J4 behandelte EBs im Vergleich zu Kontroll-

EBs erhöhte Tail moments (TM) auf. Diese Werte waren vergleichbar mit TMs von 6 Gy bestrahlten EBs.

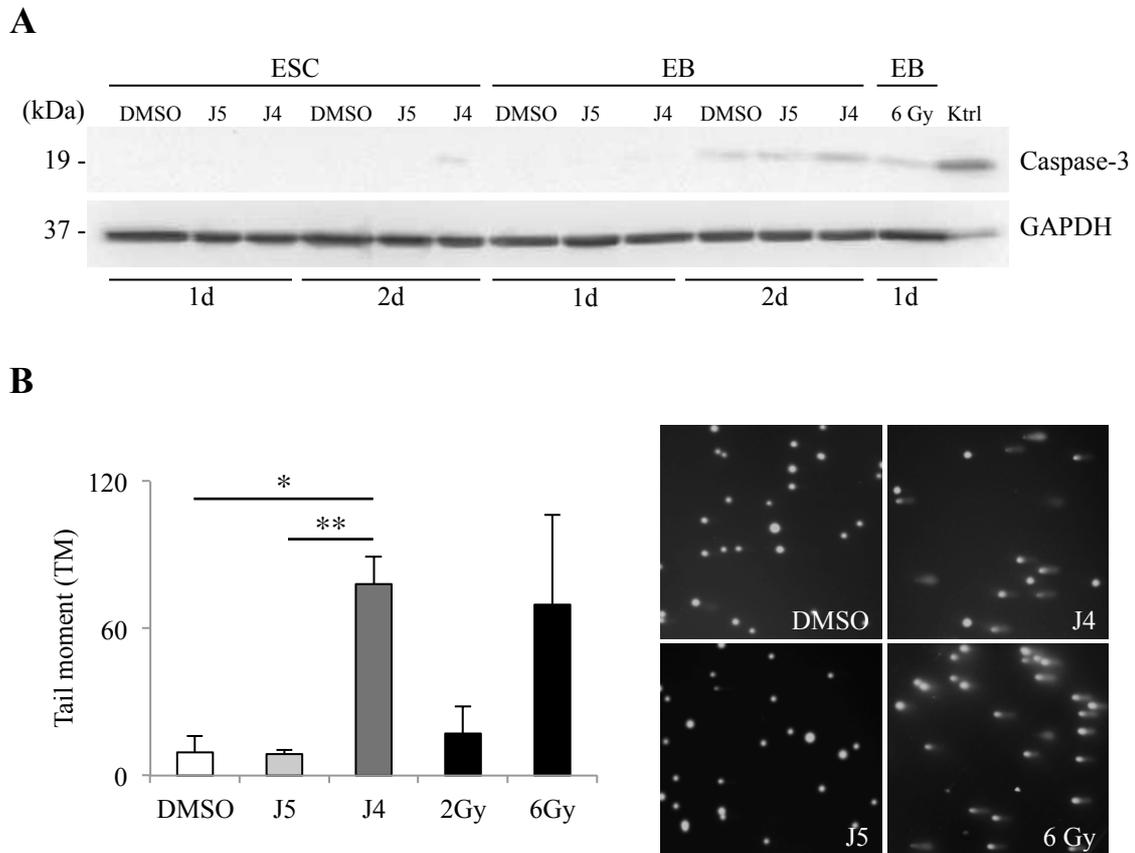
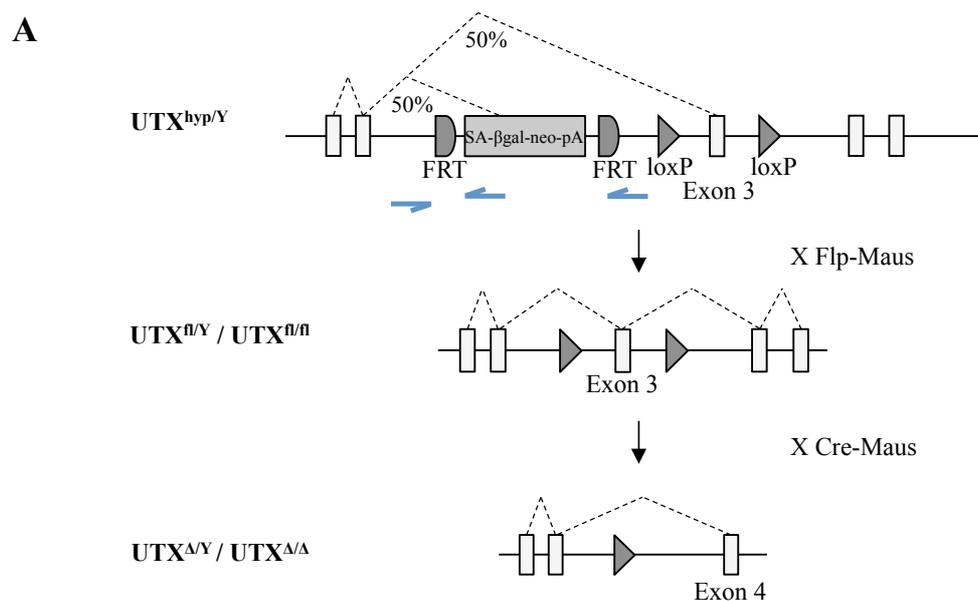


Abb. 5.16: KDM6-Inhibition in ES-Zellen und während der Differenzierung mit einem H3K27-Demethylase-spezifischen Inhibitor. A. Western Blot Analyse von R1 wt ES-Zellen und EBs, welche mit DMSO, GSK-J5 oder GSK-J4 (für 1 oder 2 Tage) behandelt wurden. Als Kontrolle wurden EBs 2 und 6 Gray ionisierender Strahlung ausgesetzt bzw. NIH3T3 Zellen für 4h mit Staurosporin behandelt (Ktrl=Kontrolle). Die Membran wurde mit cleaved Caspase-3 und GAPDH-spezifischen Antikörpern inkubiert. Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme von zwei unabhängigen Experimenten. **B.** Comet Assay. 1 Tag alte R1 wt EBs, welche mit DMSO, GSK-J5 oder GSK-J4 behandelt wurden, wurden mit Hilfe des Comet Assays auf DNA-Damage untersucht. Als Kontrolle wurden EBs 2 bzw. 6 Gray ionisierender Strahlung ausgesetzt. **Links** ist die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Fehlerbalken=SEM dar. Student t-test *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. **Rechts:** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Comet Tails.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass fehlendes H3K27me³ in differenzierenden EED-Knockout-ES-Zellen den GSK-J4-induzierten Effekt auf die ES-Zell-Differenzierung verringerte (Hofstetter *et al.*, eingereicht). Diese Ergebnisse weisen auf, dass eine Inhibition der H3K27-spezifischen Demethylase-Aktivität DNA-Schäden während der frühen ES-Zell-Differenzierung induziert.

5.9 Generierung einer konditionellen UTX-Knockout-Maus

Um die Funktion von UTX während der Entwicklung *in vivo* zu untersuchen, habe ich eine konditionelle UTX-Knockout-Maus hergestellt (Abb. 5.17). Bei Verpaarung dieser Maus mit einer transgenen Maus, welche eine Cre-Rekombinase in einer Zeit- und Gewebe-spezifischen Art und Weise exprimiert, entsteht ein UTX-Knockout im gewünschten Gewebe zum gewünschten Zeitpunkt der Entwicklung. Auf diese Weise kann zum Beispiel die Rolle von UTX während der embryonalen Hämatopoese *in vivo* untersucht werden. Abbildung 5.17A zeigt die schematische Darstellung der genetischen Strategie für die Generierung der Knockout-Maus. Abbildung 5.17B zeigt das Verpaarungsschema. Heterozygote $UTX^{hyp/X}$ Mäuse wurden durch Blastozysteninjektion generiert. Unter den Nachkommen gab es keine $UTX^{hyp/Y}$ Männchen, vermutlich weil diese bereits vor der Geburt auf Grund des UTX-Knockout abgegangen sind (Shpargel *et al.*, 2012). Nachdem eine stabile Erhaltungszucht der $UTX^{hyp/X}$ Weibchen gewährleistet war, wurden heterozygote konditionelle Allele durch Verpaarung mit Flp-Transgenen Mäusen generiert. Nach einer weiteren Verpaarung dieser Mäuse mit Wildtyp-Mäusen, um das Flp-Rekombinase-Transgen wieder raus zu kreuzen, wurden heterozygote Tiere untereinander verpaart. Homozygote Nachkommen können nun mit Cre-Transgenen Mäusen verpaart werden. In Abbildung 5.17C ist die Genotypisierung der Mäuse gezeigt.



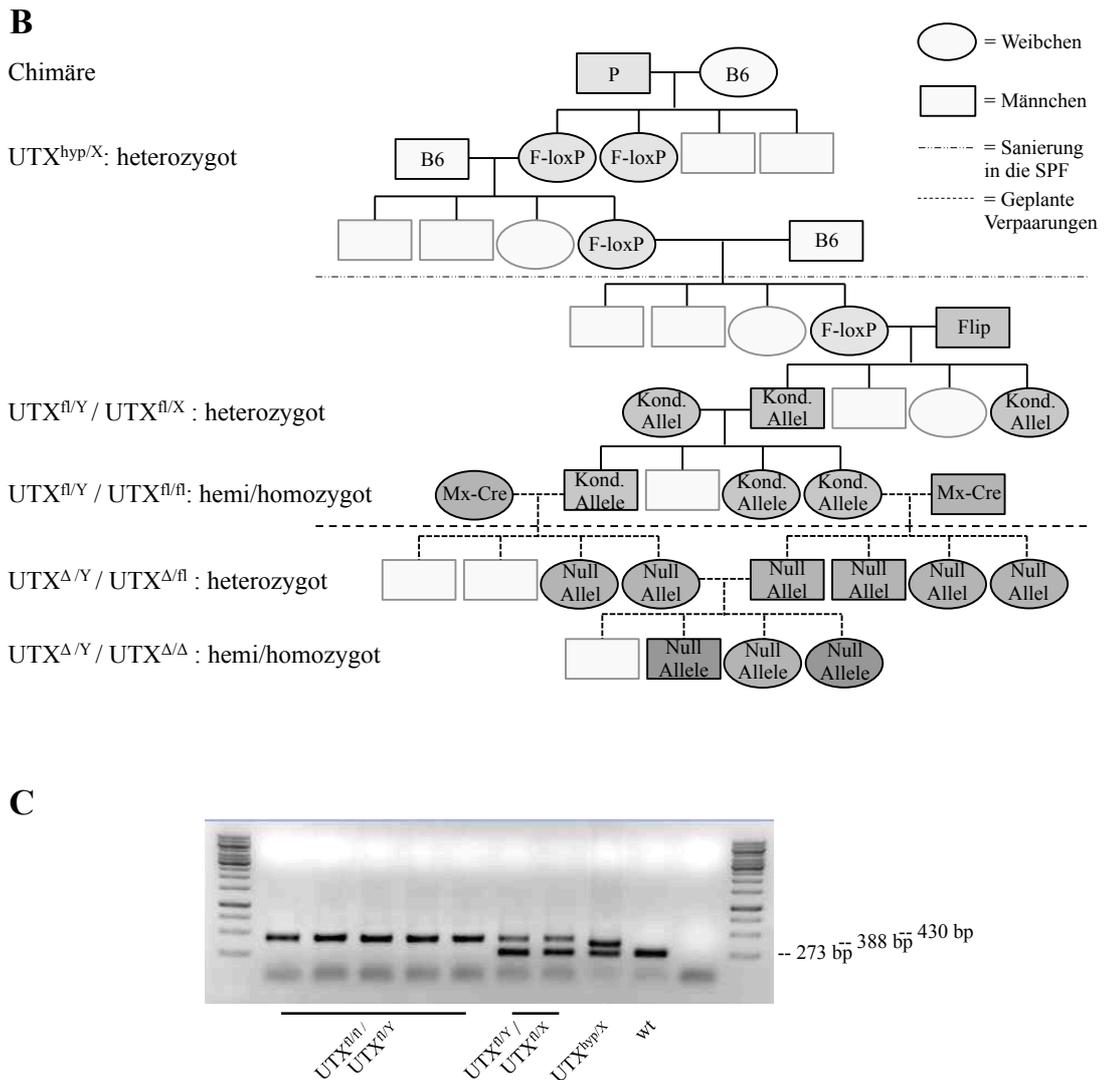


Abb. 5.17: Generierung einer konditionellen UTX-Knockout-Maus. **A.** Schematische Darstellung der genetischen Strategie für die Generierung einer Knockout-Maus. In UTX^{hyp/X} Mäusen (Knockout-First; hypomorphe Expression) ist das kritische Exon 3 von zwei loxP-Erkennungs-Sequenzen flankiert. Die Splice-Acceptor-βgal-Neo-pA Kasette ist von zwei FRT-Erkennungs-Sequenzen flankiert. Unterbrochene Linien zeigen Splice-Varianten an. Mäuse mit konditionellen Allelen (UTX^{fl/Y} / UTX^{fl/fl}) entstehen nach Verpaarung mit einer Maus, welche eine Flp-Rekombinase exprimiert. Eine anschließende Verpaarung mit einer Maus, welche eine Gewebe-spezifische Cre-Rekombinase exprimiert, resultiert im UTX-Knockout in den entsprechenden Geweben bzw. Organen (UTX^{Δ/Y} / UTX^{Δ/Δ}). Pfeile kennzeichnen die Position der Primer für die Genotypisierung (siehe C.). **B.** Verpaarungsschema für die Generierung einer UTX-Knockout-Maus. Hervorgehobene Symbole kennzeichnen Mäuse mit dem richtigen Genotyp, die für nachfolgende Verpaarungen verwendet wurden. Gestrichelte Linien markieren geplante Verpaarungen. P=Parentalgeneration Chimäre. **C.** Genotypisierung der UTX^{hyp/X} und der UTX^{fl/Y} / UTX^{fl/fl} (Konditionelle Allele) Mäuse mit isolierter DNA aus Mausschwänzen. Bandengrößen für wt 273 bp, UTX^{hyp/X} 388 bp, UTX^{fl/Y} 430 bp. Die Primer-Positionen sind im Schema (siehe A.) eingezeichnet.

6 DISKUSSION

Das Ziel meiner Arbeit war es, die Funktion der H3K27me^{2/3}-spezifischen Histon-Demethylase UTX in undifferenzierten und differenzierenden murinen ES-Zellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde UTX sowohl mittels RNA-Interferenz als auch durch „Gene-Targeting“ in ES-Zellen ablatiert. Zusammenfassend zeigten meine Ergebnisse, dass der Verlust von UTX die Pluripotenz, Zellproliferation und den Zellzyklus von ES-Zellen nicht beeinflusste, während globale H3K4me³- sowie H3K27me³-Level in Knockdown- und Knockout-ES-Zellen reduziert waren. Während der ES-Zell-Differenzierung war die Expression mesodermaler und hämatopoetischer Marker verringert und sowohl die Hämangioblasten- als auch die hämatopoetische Differenzierung beeinträchtigt. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass H3K27-Trimethylierungs-Level an Promotoren mesodermaler Marker in UTX-Knockout-EBs im Vergleich zu Kontrollzellen unverändert blieben. Um die Funktion von UTX während der Entwicklung *in vivo* untersuchen zu können, habe ich eine konditionelle UTX-Knockout-Maus hergestellt. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

6.1 ES-Zell-Proliferation und -Pluripotenz sind unabhängig von UTX

Kovalente Histon-Modifikationen, wie z.B. Histon-Methylierungen, spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Gen-Expression. H3K27-Di- und Trimethylierungen sind dabei mit transkriptioneller Repression assoziiert (Mikkelsen *et al.*, 2007) und werden durch die Methyltransferase-Aktivität der PRC2-Komponente EZH2 katalysiert (Cao *et al.*, 2002). In ES-Zellen bindet PRC2 an mehrere hundert H3K27-trimethylierte Differenzierungs-spezifischen Gene, die im pluripotenten Zustand reprimiert sind und während der Differenzierung aktiviert werden (Lee *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2006). Die transkriptionelle Aktivierung H3K27-methylierter Gene ist mit der H3K27me^{2/3}-Demethylierung verbunden. UTX ist eine H3K27me^{2/3}-spezifische Demethylase, die bereits mit der Aktivierung Differenzierungs-spezifischer Gene in Verbindung gebracht werden konnte (Hong *et al.*, 2007; Agger *et al.*, 2007). Inwiefern die Demethylaseaktivität von UTX für die Aufrechterhaltung der ES-Zell-Pluripotenz und die ES-Zell-Differenzierung von Bedeutung ist, war zu Beginn dieser Arbeit

noch nicht untersucht. Meine Expressions-Analysen zeigten, dass UTX in undifferenzierten ES-Zellen, während der ES-Zell-Differenzierung und in adulten Geweben der Maus exprimiert wird (Abb. 5.1A, B). Dies stimmt mit publizierten Daten überein und könnte auf eine mögliche Rolle von UTX in ES-Zellen und während der ES-Zell-Differenzierung hindeuten (Greenfield *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2012; Welstead *et al.*, 2012; Morales Torres *et al.*, 2013). Um dies zu analysieren, habe ich zwei unterschiedliche Methoden der UTX-Ablation verwendet. UTX wurde zum einen mittels RNA-Interferenz und zum anderen mit einer konventionellen Knockout-Strategie gezielt ablatiert, um Methoden-bedingte Artefakte ausschließen zu können.

Bei der Deletion einer H3K27-Demethylase, würde man mit einer Anreicherung der H3K27-Trimethylierung rechnen. Überraschenderweise waren globale H3K27me³-Level bei UTX-Knockdown bzw. -Knockout in ES-Zellen reduziert (Abb. 5.7A, B). Dieses Ergebnis führt zu der Frage, ob andere Demethylasen für diese Reduzierung verantwortlich sind. Neben UTX gehört KDM6B/JMJD3 zu den H3K27-spezifischen Demethylasen (Agger *et al.*, 2007). Genauso wie das auf dem Y-Chromosom kodierte Homolog UTY weist es eine starke Homologie sowie strukturelle Verwandtschaft zu UTX auf. Eine weitere Histon-Demethylase, KDM7, demethyliert H3K27me² (Huang *et al.*, 2010; Loenarz *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass diese Demethylasen einander teilweise kompensieren können (Wang *et al.*, 2012; Welstead *et al.*, 2012; Morales Torres *et al.*, 2013). In meinen Gen-Expressions-Analysen konnte ich nach Ablation von UTX, auf transkriptioneller Ebene, keine kompensatorische Auswirkung auf KDM6B oder KDM7 feststellen. UTY hingegen, für das keine *in vivo* Demethylase-Aktivität belegt ist (Shpargel, 2012; Walport *et al.*, 2014), wird vermutlich durch UTX reguliert, da die Expression sowohl in UTX-Knockdown als auch -Knockout-ES-Zellen sowie während der ES-Zell-Differenzierung reduziert war (Abb. 5.4A, B). Dieser Effekt wurde durch jüngst veröffentlichte Studien bestätigt (Wang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012). Bisherige Studien machten widersprüchliche Aussagen darüber, ob globale H3K27-Methylierungslevel bei Ablation von UTX unverändert bleiben, ansteigen oder abfallen (Morales Torres *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012; Welstead *et al.*, 2012; Shpargel *et al.*, 2014). Mittlerweile beschreibt eine neue Studie die mögliche Existenz einer weiteren H3K27me^{2/3}-spezifischen Demethylase, die bei einem Knockout der gesamten KDM6-Familie die Demethylierung aufrecht erhalten könnte (Shpargel *et al.*, 2014). Die Unterschiede zwischen den Studien könnten vor allem in unterschiedlichen Zelltypen und untersuchten Systemen, aber auch in unterschiedlichen Ablationsmethoden bzw. Kulturbedingungen, begründet sein. Eine weitere Erklärung könnte die Verwendung verschiedener H3K27me³-Antikörper mit

unterschiedlichen Spezifitäten sein.

Bivalente Chromatin-Domänen, bestehend aus aktivierenden (H3K4me³) und reprimierenden (H3K27me³) Histon-Modifikationen, werden durch die entgegenwirkenden PRC- und MLL-Protein-Komplexe erzeugt. UTX und KDM6B sind mit dem MLL-Komplex assoziiert (Agger *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Issaeva *et al.*, 2007), die H3K4me^{2/3}-spezifischen Demethylasen der KDM5-Familie interagieren mit dem PRC2-Komplex und regulieren die Gen-Repression (Pasini *et al.*, 2008). Bestimmte Methylierungsmuster und die Regulierung spezifischer Gene werden durch das Gleichgewicht dieser beiden Komplexe bestimmt (Pasini *et al.*, 2008; Cloos *et al.*, 2008). Die Ablation von UTX in ES-Zellen könnte dieses Gleichgewicht stören und einen Effekt auf die H3K4-Methylierung oder auf die Expression von KDM5A, KDM5B oder andere PRC2-Komponenten haben. In der vorliegenden Studie waren globale H3K4me³-Level in UTX-Knockout und -Knockdown-ES-Zellen reduziert (Abb. 5.7A, B), während auf transkriptioneller Ebene keine kompensatorischen Effekte auf KDM5A, KDM5B oder auf die Polycomb-Komponenten beobachtet werden konnten (Abb. 5.4A, B). In Übereinstimmung mit der von mir beobachteten Reduzierung globaler H3K4me³-Level, belegten bereits mehrere Studien eine globale H3K4me³-Reduzierung bei UTX-Ablation, z.B. in *Drosophila* dUTX Mutanten (Herz *et al.*, 2010; Herz *et al.*, 2012). Eine weitere Studie zeigt reduzierte H3K4me³-Level an Herz-spezifischen Genen in UTX-Knockout-Zellen während der Differenzierung (Lee *et al.*, 2012). Darüber hinaus können sowohl UTX als auch UTY mit RBBP5, einem Mitglied des MLL2-Komplexes, interagieren. Folglich könnte die eigentliche Aufgabe von UTX und UTY darin bestehen, die H3K4-Methylierung, über die Interaktion mit MLL-Methyltransferasen und deren Rekrutierung an spezifische Gene, und weniger die H3K27me^{2/3}-Demethylierung an Zielgenen zu regulieren (Shpargel *et al.*, 2012).

Meine Genexpressions-Analysen zeigten außerdem, dass die Ablation von UTX keinen Einfluss auf die Transkription weiterer MLL-Komplex-Mitglieder wie Ash2L und MLL hatte (Abb. 5.4). Eine Studie machte allerdings deutlich, dass bei Knockout der PRC2-Komponente EED, EZH2 mRNA-Level unverändert bleiben, während EED- und EZH2-Protein-Level drastisch reduziert sind (Montgomery *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wäre eine weitere Untersuchung auf Protein-Ebene ratsam, um auf die Stabilität des MLL/UTX-Komplexes oder auf eine kompensatorische Regulierung anderer Histon-Demethylasen nach Ablation von UTX schließen zu können. Dadurch könnten UTX-spezifische oder Komplex-spezifische Funktionen in ES-Zellen oder während der ES-Zell-Differenzierung genauer identifiziert und möglicherweise die reduzierten H3K27me³-Level in UTX-Knockdown und -Knockout-ES-Zellen erklärt werden.

Da das Expressionsmuster der Pluripotenz-Faktoren Oct4, Nanog und Sox2, in UTX-Knockdown und -Knockout-ES-Zellen mit Kontrollzellen überein stimmte (Abb. 5.5), und auch die Zell-Proliferation und Zellzyklus-Verteilung unbeeinträchtigt blieben (Abb. 5.6A, B), kann geschlussfolgert werden, dass UTX für die Aufrechterhaltung der ES-Zell-Pluripotenz entbehrlich ist. Dies stimmt mit kürzlich publizierten Studien überein (Welstead *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Morales Torres *et al.*, 2013). Interessanterweise hat auch der Knockout verschiedener PRC2-Komponenten in ES-Zellen keine Auswirkung auf die ES-Zell-Pluripotenz (Chamberlain *et al.*, 2008). Da EED-defiziente ES-Zellen, trotz fehlender H3K27-Di- und Trimethylierung und erhöhter Expression Linien-spezifischer Faktoren, pluripotent bleiben, schlagen Chamberlain *et al.* ein Modell vor, in dem die Repression der Differenzierung für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz nicht notwendig ist. ES-Zellen bleiben einzig auf Grund der positiven Regulierung kritischer Pluripotenz-Faktoren pluripotent und reagieren nicht auf Differenzierungs-Signale (Chamberlain *et al.*, 2008). In Übereinstimmung mit diesem Modell sind H3K27me³-Level in ES-Zellen, welche in 2i-Medium kultiviert werden und sich somit in einem *ground state* der Pluripotenz befinden, im Vergleich zu in Serum kultivierten ES-Zellen, reduziert (Marks *et al.*, 2012). Zusammen mit meinen Beobachtungen deuten diese Daten darauf hin, dass die Regulierung der H3K27-Methylierung und die damit verbundene epigenetische Repression für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in ES-Zellen nicht notwendig sind.

Das Ende der Pluripotenz ist mit einer Chromatin-Umorganisation verbunden. Dekondensiertes, plastisches Euchromatin in ES-Zellen enthält aktive Histon-Modifikationen und locker gebundene Chromatin-Proteine. Während der Differenzierung erfolgt eine Zunahme reprimierender Histon-Modifikationen und strukturelle Chromatin-Proteine assoziieren stabil mit Chromatin. Damit einhergehend kondensiert das Chromatin zu kompaktem Heterochromatin mit dicht verpackten Nukleosomen (Meshorer *et al.*, 2006). Die Chromatin-Umorganisation ist mit der Rekrutierung Histon-modifizierender Enzyme assoziiert (Meshorer *et al.*, 2006). Da UTX in ES-Zellen exprimiert wird, die Ablation jedoch keinen Einfluss auf die Pluripotenz hat, führt dies zu der Frage, ob UTX in der ES-Zell-Differenzierung und der damit verbundenen Chromatin-Umorganisation eine Rolle spielt.

6.2 UTX wird für die mesodermale und hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung benötigt

UTX trägt zu mehreren Gewebe- und Entwicklungs-spezifischen Prozessen bei. So wird UTX für die kardiale ES-Zell-Differenzierung benötigt und ist an der Myogenese sowie Osteogenese beteiligt (Seenundan *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Hemming *et al.*, 2014). Des Weiteren sind Funktionen in der Wundheilung, in Alterungsprozessen sowie in der adulten Hämatopoese belegt (Shaw *et al.*, 2009; Maures *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Thieme *et al.*, 2013; Chatuverdi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob UTX eine Funktion während der ES-Zell-Differenzierung hat, wurden UTX-Knockdown und -Knockout-ES-Zellen zu EBs differenziert. Die Beobachtung, dass sowohl Knockdown- als auch Knockout-Klone etwas größere EBs im Vergleich zu Kontrollzellen formten (Abb. 5.8A), steht in Kontrast zu anderen Studien. So beschreiben Morales Torres *et al.* (2013) unveränderte EB-Größen unter UTX-Knockout, im Gegensatz zu Wang *et al.* (2012), die sogar kleinere EBs mit fehlender cystischer Morphologie ab Tag 8 der ES-Zell-Differenzierung beobachteten. Der Grund für diese Unterschiede könnten verschiedene Kulturbedingungen sein. ES-Zellen wurden von Wang *et al.* in Suspension zu EBs differenziert, in den hier vorgestellten Experimenten wurden EBs in Hanging Drop-Kulturen differenziert. Ebenso könnten unterschiedliche genetische Hintergründe der ES-Zell-Linien verschiedene Auswirkungen auf den Knockout haben (Linder, 2006). Eine Analyse der Zellproliferation oder eine quantitative Auswertung der Anteile verschiedener Zelltypen innerhalb der EBs könnte eine Erklärung für die größeren UTX-Knockout-EBs in meinen Versuchen liefern.

Die Untersuchung des Differenzierungspotenzials von UTX^{hyp/Y} ES-Zellen *in vitro* ergab, dass beide Knockout-First-Klone mit hypomorpher UTX-Expression, das heißt mit keinem kompletten Knockout, die Fähigkeit hatten, in Strukturen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Abb. 5.8B). Im Gegensatz dazu zeigten meine Genexpressionsanalysen eine reduzierte Expression mesodermaler, ektodermaler und endodermaler Marker in UTX-Knockdown-ES-Zellen (Abb. 5.9A), was mit der beschriebenen verminderten Induktion Keimblatt-spezifischer Gene in der Literatur korreliert (Morales Torres *et al.*, 2013; Welstead *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). Die Diskrepanz zwischen Differenzierungspotenzial und Genexpression kann dadurch erklärt werden, dass es sich in der vorliegenden Differenzierungsstudie lediglich um Knockout-First-Zellen mit hypomorpher UTX-Expression handelte. Des Weiteren wurde in diesem Versuch keine quantitative Auswertung des Differenzierungspotenzials in die drei Keimblätter

vorgenommen. Die Differenzierung von UTX-Knockout-Zellen mit quantitativer Analyse ergab eine deutlich reduzierte Anzahl kontrahierender Kardiomyocyten (Beating Bodies; Abb. 5.8C), was wiederum mit einer fehlenden Entstehung von Beating Bodies in publizierten Studien vereinbar ist (Lee *et al.*, 2012). Expressionsanalysen weiterer mesodermaler Marker während der ES-Zell-Differenzierung ergaben reduzierte mRNA-Werte für Brachyury, Flk1, Runx1 und Gata1 in UTX-Knockout-EBs (Abb. 5.9). Flk1 ist ein VEGF-Rezeptor und ein bedeutsamer Faktor für die vaskuläre Endothel-Zell-Differenzierung (Shalaby *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1997). Da eine Studie zeigte, dass die Kardiomyocyten-Differenzierung durch Flk1-Aktivierung begünstigt wird (Chen *et al.*, 2006), könnte die reduzierte Anzahl an kontrahierenden Kardiomyocyten in diesem Versuch möglicherweise durch die reduzierte Flk1-Expression erklärt werden. Darüber hinaus entwickeln auch Brachyury-defiziente Mäuse bis Tag E9.5 strukturell anomale Herzen mit fehlerhafter Herzscherleife (King *et al.*, 1998). Ein ähnlicher Phänotyp, nämlich Herzmissbildungen mit linearer Herzscherleife, wurde auch in UTX-Knockout-Mäusen beobachtet (Welstead *et al.*, 2012; Shpargel *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012), welcher möglicherweise durch die verringerte Brachyury-Expression hervorgerufen wird. Da Lee *et al.* (2012) zeigen konnten, dass die kardiale Differenzierung von UTX-Knockout-Zellen auf Grund von fehlender Induktion kardialer Transkriptionsfaktoren gestört ist, könnte dies eine weitere Erklärung für die verminderte Anzahl an Beating Bodies in meinen und publizierten Daten sein. Diese Daten führen zu der Frage, ob UTX an der Regulierung der kardialen Differenzierung beteiligt ist, indem es die Flk1-Expression reguliert. Ein spezifischer UTX- oder Flk1-Knockout im kardialen System könnte Aufschluss darüber bringen.

Flk1-defiziente Mäuse sterben zwischen E8.5 und E9.5 auf Grund von fehlerhafter Bildung von Blutinseln im Dottersack sowie endothelialen und hämatopoetischen Zellen (Shalaby *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1997; Lugus *et al.*, 2009). Interessanterweise weisen auch UTX-Knockout-Mäuse eine reduzierte Bildung von Blutgefäßen im Dottersack und eine fehlerhafte Hämatopoese auf (Shpargel *et al.*, 2013). Diese Phänotypen könnten demnach durch die niedrigere Expression von Flk1 begründet sein. *In vivo* wird Flk1 von gemeinsamen Vorläufern primitiver Erythrozyten und anderer hämatopoetischer Linien exprimiert, den sogenannten Hämangioblasten, die die Flk1-Expression mit fortschreitender Differenzierung verlieren (Kabrun *et al.*, 1997). Die *in vitro* Entsprechung der Hämangioblasten sind BL-CFCs, die während der ES-Zell-Differenzierung innerhalb von EBs entstehen (Kennedy *et al.*, 1997). In EBs treten erste Flk1-positive Zellen an Tag 3 der ES-Zell-Differenzierung auf. Die Frequenz Flk1-positiver Zellen steigt bis etwa Tag 4 an und fällt schließlich bis Tag 14 ab (Yamaguchi *et*

al., 1993; Vittet *et al.*, 1996; Kabrun *et al.*, 1997). Eine genauere Analyse der Flk1-Expression in wt EBs zeigte, dass diese sich innerhalb nur weniger Stunden ändert (Kabrun *et al.*, 1997). So steigt die Expression von 2% an Tag 3 innerhalb von 6 Stunden auf 20% an Tag 3.25, auf 34% an Tag 3.5, auf 50% an Tag 3.75 und schließlich auf 55% an Tag 4 an. Eine ähnliche Kinetik konnte ich mit R1 wt und UTX^{fl/y} Zellen beobachten. Die Flk1-Expression setzte an Tag 3.5 ein, stieg alle sechs Stunden bis Tag 4.5 an und fiel bis Tag 5 wieder ab (Abb. 5.11A, B). Die im Vergleich zu publizierten Daten leichte zeitliche Verschiebung der Expression nach hinten könnte durch ES-Zellen mit verschiedenen genetischen Hintergründen und durch abweichende Kulturbedingungen erklärt werden. UTX^{hyp/y} und UTX^{Δ/y} Zellen hingegen exprimierten zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung Flk1. Zusammen mit meinen qRT-PCR-Daten deuten diese Ergebnisse auf eine Regulierung von Flk1 durch UTX hin.

BL-CFCs bilden in Kultur unter Zugabe von VEGF Blast-Kolonien (Kennedy *et al.*, 1997). Die Mehrzahl an BL-CFCs findet man in Flk1⁺ bzw. Bry⁺ Flk1⁺ Zell-Fraktionen (Kabrun *et al.*, 1997; Fehling *et al.*, 2003; Faloon *et al.*, 2000). In meinen Versuchen formten Zellen unter UTX-Ablation bis zu 80% weniger Blast-Kolonien im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 5.11A, B). In Hinblick auf die verringerte Expression von Flk1 und Bry in UTX-Knockout-EBs, würde man von einer verminderten Anzahl an Blast-Kolonien ausgehen, da Bry⁺Flk1⁺ Zell-Populationen kaum Blast-Kolonien bilden (Fehling *et al.*, 2003). In UTX-Knockout-Kulturen konnte ich zudem eine erhöhte Anzahl an sekundären EBs feststellen (Daten nicht gezeigt), was mit der erhöhten Entstehung sekundärer EBs aus Bry⁺Flk1⁻ Zell-Populationen korreliert (Fehling *et al.*, 2003).

Neben Flk1 und Brachyury ist der Transkriptionsfaktor Tal1 ein bestimmender Faktor der Hämangioblasten (Chung *et al.*, 2002). Einige Autoren definieren den Hämangioblasten als eine Flk1⁺Tal1⁺ Zellpopulation, welche hauptsächlich zur Bildung von Blast-Kolonien beiträgt (Chung *et al.*, 2002; Lancrin *et al.*, 2009), andere spezifizieren diese Aussage. BL-CFCs werden demnach in Abwesenheit von Tal1 generiert, brauchen diesen Transkriptionsfaktor allerdings, um hämatopoetische und endotheliale Nachfolger *in vitro* zu generieren (D'Souza *et al.*, 2005; Moignard *et al.*, 2013). In meinen Expressions-Analysen war Tal1 in UTX-Knockout-Zellen lediglich ab Tag 7 der ES-Zell-Differenzierung leicht runterreguliert und könnte, in Übereinstimmung mit einer Funktion während der Differenzierung zu hämatopoetischen und endothelialen Nachfolgern, eine Rolle in der Differenzierung hämatopoetischer Vorläufer spielen, trägt aber wahrscheinlich nicht zu der Generierung von BL-CFCs bei.

Auch Runx1 stellt einen wichtigen Faktor in der BL-CFC-Differenzierung dar, da Runx1-defiziente EBs bis zu 20-Mal weniger Blast-Kolonien bilden als wt Kontrollzellen (Lacaud *et*

al., 2002). Aus diesem Grund kann die reduzierte Bildung von Blast-Kolonien aus UTX-Knockout-Zellen auch mit der von mir gezeigten verminderten Runx1-Expression korreliert sein. Runx1 ist außerdem entscheidend für die Generierung definitiver CD41⁺ckit⁺ hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Hemogenic Endothelium (Stroczynska *et al.*, 2009; Lancrin *et al.*, 2009; Moignard *et al.*, 2013; Mikkola *et al.*, 2003). Fehlt Runx1, führt dies zu einem Verlust definitiver hämatopoetischer Linien, die primitive erythroide Differenzierung bleibt jedoch unbeeinflusst (Wang *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1996).

CFU-Assays mit UTX-Knockout und -Knockdown-Zellen wiesen eine verminderte Anzahl verschiedener gemischter hämatopoetischer Kolonien auf (Abb. 5.13A, B, C), was auf die verminderte Expression von Runx1 und Gata1 in UTX-Knockout-EBs zurück geführt werden könnte. Dafür spricht auch, dass in der adulten Hämatopoese UTX an Runx1-Promotor-Regionen bindet und die Expression beeinträchtigt, indem es die H3K27-Methylierung an diesen Loci reguliert (Liu *et al.*, 2012). UTX-Knockdown in murinen hämatopoetischen Vorläufer-Zell-Linien und Knochenmarkszellen vermindert die Fähigkeit hämatopoetische Kolonien zu bilden (Liu *et al.*, 2012). Solch eine Regulierung wäre auch während der ES-Zell-Differenzierung möglich.

Gata1 wird in differenzierenden ES-Zellen ab Tag 4 in Flk1⁺ Zellen exprimiert (Fujimoto *et al.*, 2001). Flk1⁺Gata1⁺ Zellpopulationen bilden *in vitro* primitive Erythrozyten, Makrophagen sowie definitive erythroide Linien. Im Vergleich dazu besitzen Flk1⁻Gata1⁻ Zellen keine CFU-C-Aktivität. Weitere Studien zeigten, dass die Inaktivierung von Gata1 in ES-Zellen die Generierung erythroider Zellen *in vivo* und *in vitro* beeinträchtigt (Pevny *et al.*, 1991; Simon *et al.*, 1992). Während EryP Vorläufer gar nicht generiert werden, verläuft die Differenzierung von EryD Vorläufern zunächst normal, endet allerdings schließlich durch Zelltod im Proerythroblast-Stadium (Weiss *et al.*, 1994). Des Weiteren spiegeln Gata1-Knockdown-Mäuse den Phänotyp des Myelodysplastischen Syndroms wider (Takahashi *et al.*, 1998; Raaijmakers *et al.*, 2010, Kogan *et al.*, 2002). Interessanterweise weisen auch UTX-Knockout-Mäuse einige dieser Symptome auf. Zudem wurde eine reduzierte Expression von Gata1 in Knochenmark von UTX-Knockout-Mäusen beobachtet (Thieme *et al.*, 2013). Da eine kürzlich veröffentlichte Studie auf eine mögliche Aktivierung von Gata1 durch Runx1 hin deutet (Moignard *et al.*, 2013), wäre hier ein Zusammenhang zwischen der verminderten Expression von Runx1 und Gata1 in UTX-Knockout-EBs möglich.

Zusammenfassend deuten meine und publizierte Daten auf eine Regulierung der mesodermalen und hämatopoetischen Marker Brachyury, Flk1, Runx1 und Gata1 durch UTX hin und lassen auf eine Funktion von UTX während der mesodermalen und

hämatopoetischen ES-Zell-Differenzierung schließen. Zum Zeitpunkt des Entstehens der vorliegenden Arbeit, konnten Morales Torres *et al.* (2013) zeigen, dass UTX während der Differenzierung an Promotoren von Brachyury und Flk1 bindet und diese reguliert, vermutlich indem es die H3K4-Methyltransferasen MLL3 und MLL4 rekrutiert.

Interessanterweise führt auch der Knockout einiger PRC2-Komponenten zu multiplen und schwerwiegenden Defekten in der Hämatopoese (Xie *et al.*, 2014). Z. B. ist EZH2 für die fötale Hämatopoese durch die Regulierung von H3K27me³ essenziell, nicht aber für HSCs im Knochenmark, wo EZH1 bei Verlust von EZH2 kompensieren kann (Mochizuki-Kashio *et al.*, 2011). Darüber hinaus führt die EZH2-Überexpression zu verschiedenen Krebsarten hämatopoetischer Herkunft (Savageau und Savageau, 2010) und Mutationen der PRC2-Komponenten wurden in verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen entdeckt (Lohr *et al.*, 2012; Morin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Dies lässt den Schluss zu, dass H3K27me^{2/3}-Level wichtig für die Hämatopoese sind. Auch UTX-Mutationen wurden bereits in mehreren Leukämien und soliden Tumoren detektiert, was auf eine H3K27-Deregulierung hindeutet. Insgesamt deuten diese Daten auf bedeutende Funktionen der H3K27-Regulatoren PRC2 und UTX während der Hämatopoese hin.

Das Differenzierungspotenzial von UTX^{hyp/Y} ES-Zellen *in vivo* wurde mit Hilfe von Teratom-Assays untersucht. UTX^{hyp/Y} Teratome waren schwerer und größer als wt Teratome (Abb. 5.10; Daten nicht gezeigt). Dies korrelierte mit der Größe der Knockdown- und Knockout-EBs (Abb. 5.8A). PCNA-Färbungen der Teratom-Schnitte durch Sebastian Serfling (Dissertation Sebastian Serfling) machten eine höhere proliferative Aktivität in den Knockout-Tumoren deutlich, womit auch die Größe der EBs erklärt werden könnte. Die Identifizierung zellulärer Derivate aller drei Keimblätter in UTX^{hyp/Y} Teratom-Schnitten (Abb. 5.10) ist vergleichbar mit Beobachtungen von Welstead *et al.* (2012) in UTX-Knockout-Teratomen. Dies entspricht der Entwicklung von UTX-Null Embryos, welche bis zur Mitte der Gestation überleben (Welstead *et al.*, 2012). Eine Erklärung für das uneingeschränkte Differenzierungspotenzial von UTX-Knockout-ES-Zellen *in vivo* im Gegensatz zu einer gestörten Differenzierung *in vitro*, könnte die kompensatorische Wirkung von UTY sein. Während UTY in ES-Zellen sowie während der ES-Zell-Differenzierung *in vitro* runterreguliert ist (Abb. 5.4), wird es *in vivo* in UTX-Knockout-Mäusen unverändert exprimiert und kompensiert so zum Teil den UTX-Verlust (Lee *et al.*, 2012; Shpargel *et al.*, 2012). Um eine mögliche Kompensation durch UTY zu untersuchen, wurden durch Sebastian Serfling UTY-Genexpressionsanalysen in UTX-Knockout-Teratomen durchgeführt. UTY war hier im Vergleich zu Kontroll-Teratomen unverändert exprimiert und könnte somit auch in

Teratomen eine kompensatorische Funktion übernehmen. Des Weiteren könnten systemische Einflüsse durch das *in vivo* System, welche in der Zellkultur nicht gegeben sind, eine Rolle spielen.

6.3 H3K27me^{2/3}-unabhängige Regulierung mesodermaler und hämatopoetischer Marker

Während der ES-Zell-Differenzierung sind Veränderungen globaler und Gen-spezifischer Histon-Modifikationen mit veränderter Genaktivität assoziiert (Lee *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob die Expression der mesodermalen und hämatopoetischen Marker Flk1, Brachyury, Runx1 und Tal1 mit der Modifikation von H3K27me³, H3K4me³ oder H3K27ac an regulatorischen Bereichen dieser Gene korreliert, habe ich ChIP-Analysen an Promotoren dieser Gene durchgeführt. Es gab keine signifikanten Unterschiede der H3K27-, H3K4-Trimethylierungs- oder H3K27-Acetylierungslevel an den Promotoren in UTX-Knockout-EBs verglichen mit Kontroll-EBs (Abb. 5.14). Da EBs eine heterogene Zellpopulation mit ektodermalen, endodermalen und mesodermalen Fraktionen darstellen, habe ich außerdem ChIP-Analysen mit Flk1-positiven und Flk1-negativen R1 wt Zellen durchgeführt (Abb. 5.15). Auch diese Daten zeigten, dass die Regulierung von Brachyury, Flk1, Tal1 und Runx1 nicht mit der Methylierung bzw. Acetylierung von H3K27 oder der Methylierung von H3K4 an den von mir untersuchten Regionen assoziiert ist. Allerdings gibt es bisher zum Teil widersprüchliche Studien darüber, ob der Effekt auf die ES-Zell-Differenzierung durch Verlust von UTX H3K27-Demethylase-abhängig oder -unabhängig ist. So konnten Welstead *et al.* (2012) in UTX-Verlustmutanten einen genomweiten Anstieg von H3K27me³ an Promotoren, unter anderem am Brachyury-Promotor, zeigen, während H3K4me³-Level an diesem Promotor reduziert waren. Eine andere Studie zeigte unveränderte H3K27me³- und H3K4me³-Level an Promotoren von Flk1 und Brachyury in UTX-Knockout-Zellen während der ES-Zell-Differenzierung (Morales Torres *et al.*, 2013). Sowohl katalytisch inaktives als auch wt UTX konnten den Effekt auf die Brachyury-Expression in der letztgenannten Studie wieder umkehren, was auf eine H3K27me³-Demethylase-unabhängige Funktion von UTX hindeutet.

Auch UTY kann teilweise für den Verlust von UTX kompensieren (Morales Torres *et al.*, 2013). UTX entgeht der X-Inaktivierung (Greenfield *et al.*, 1998). Es wurde vermutet, dass Gene, welche der X-Inaktivierung entgehen, ein weit exprimiertes, funktionell äquivalentes Y-

Homolog aufweisen (Greenfield *et al.*, 1998). Da das UTX-Homolog UTY vermutlich keine Histon-Demethylase-Aktivität besitzt, bekräftigt die Kompensation die Vermutung einer H3K27me³-Demethylase-unabhängigen Funktion von UTX. Demgegenüber steht die Annahme, dass aktive, auf dem Y-Chromosom kodierte Gene, Funktionen in der Differenzierung entwickelt haben, welche sich von den generellen Funktionen der X-kodierten Homologe unterscheiden (Graves *et al.*, 1995). Damit einhergehend wurde eine Geschlecht-abhängige dimorphe Expression von UTX und anderen X/Y-kodierten Genen in murinen neonatalen Hirnrinden/Hippocampi beobachtet, die in einer zwischen den Geschlechtern differenziellen neuronalen Entwicklung, kognitiven Funktionen und neurologischen Erkrankungen involviert ist (Armoskus *et al.*, 2014). Darüber hinaus reguliert UTX Fortpflanzungs-assoziierte Gene durch H3K27-Demethylierung in murinen Weibchen, nicht aber in Männchen (Berletch *et al.*, 2013). Insgesamt deuten diese Daten auf funktionelle Unterschiede zwischen UTX und UTY sowie Histon-Demethylase-abhängige und –unabhängige Funktionen von UTX hin.

Auch die Regulierung der kardialen Differenzierung verläuft vermutlich über zwei Mechanismen. Zum einen verhindert fehlendes UTX die transkriptionelle Aktivierung Herzspezifischer Gene durch H3K27me^{2/3}-Demethylierung. Zum anderen wird in Abwesenheit von UTX die Interaktion zwischen dem SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplex und kardialen Transkriptionsfaktoren gestört, was auf eine H3K27me^{2/3}-Demethylase-unabhängige Aktivität von UTX zurück zu führen ist (Miller *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012).

In *Drosophila* acetyliert die Acetyltransferase CREB-binding protein (CBP) H3K27 und blockiert somit die PRC2-vermittelte Trimethylierung (Tie *et al.*, 2012). Es konnte nachgewiesen werden, dass auch dUTX zusammen mit dem SWI/SNF-Komplex-Mitglied BRM *in vivo* mit CBP assoziiert und somit die H3K27-Acetylierung moduliert (Tie *et al.*, 2012). So könnte auch die Regulierung hämatopoetischer Gene über Demethylase-unabhängige Mechanismen ablaufen, wie z. B. über die Interaktion von UTX mit dem SWI/SNF-Komplex an hämatopoetischen Genen, mit oder ohne Modulierung der H3K27-Acetylierung. SWI/SNF-Komplexe sind ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Komplexe, welche Nukleosomen restrukturieren, wodurch die DNA während der Transkription zugänglich gemacht wird. SWI/SNF-Komplexe sind somit an der transkriptionellen Regulierung beteiligt (Tang *et al.*, 2010).

Meine Daten zeigten, dass es in UTX-Knockout-EBs an Promotoren der hämatopoetischen Marker keine Unterschiede in der H3K27-Acetylierung im Vergleich zu Kontrollzellen gab, was im Einklang mit Ergebnissen von Wang *et al.* (2012) steht. Allerdings konnten H3K27-

Acetylierungen transkriptionell aktiver Gene sowohl an Promotoren und Enhancern als auch innerhalb der Genkörper nachgewiesen werden (Herz *et al.*, 2012). Deswegen wäre eine Überprüfung der H3K27-Acetylierung an Enhancern hämatopoetischer Marker in UTX-Knockout-EBs von Bedeutung, um auf eine H3K27ac-abhängige Regulierung schließen zu können.

Wie bereits erwähnt, wird angenommen, dass JMJD3 und UTY teilweise für den Verlust von UTX in Demethylase-abhängiger oder -unabhängiger Weise kompensieren können. Die spezifische Inhibition der gesamten KDM6 H3K27-Demethylase-Aktivität sollte Aufschluss über die Funktion der Demethylase-Aktivität während der ES-Zell-Differenzierung geben. Wir konnten zeigen, dass bei spezifischer Inhibition H3K27me³-Level erhöht waren und DNA-Schäden während der ES-Zell-Differenzierung induziert wurden (Abb. 5.16; Hofstetter *et al.*, eingereicht). Eine neue Studie hingegen zeigte, dass trotz fehlender KDM6 H3K27-Demethylase-Aktivität, die Reduzierung von H3K27me³-Leveln während der Differenzierung nach wie vor herbeigeführt werden kann (Shpargel *et al.*, 2014). Auch hier könnte die Existenz einer bisher unbekanntenen Protein-Familie, welche H3K27me³ demethyliert, eine Erklärung für die reduzierten H3K27me³-Level sein. Eine andere Vermutung wäre, dass H3K27me³ durch passive Mechanismen entfernt wird, indem modifizierte Histone im Laufe mehrerer Zellzyklen durch nicht-modifizierte Histone ausgetauscht werden (Shpargel *et al.*, 2014). PRC-Komplexe bleiben während der DNA-Replikation am Chromatin gebunden und katalysieren die H3K27-Trimethylierung in sich teilenden Zellen (Hansen *et al.*, 2008; Petruk *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2009). KDM6 könnte Transkriptions-Komplexe wie PRC2 zu reprimierten Genen rekrutieren. Gemäß diesem passiven Modell wäre bei Verlust von KDM6 die Rekrutierung von PRC2 und somit die assoziierte H3K27-Methylierung während der Replikation gestört und H3K27me³-Level reduziert (Shpargel *et al.*, 2014).

Zusammenfassend zeigen meine Daten, dass die hämatopoetische Gene Flk1, Brachyury, Tal1 und Runx1 während der ES-Zell-Differenzierung nicht über UTX-abhängige H3K27-Methylierungen an Promotoren reguliert werden. Da andere Studien bereits die Interaktion von UTX mit Chromatin-Remodeling-Komplexen belegten, könnte diese Interaktion auch in der hämatopoetischen Regulierung eine Rolle spielen. Die spezifische Inhibition der H3K27me³-Demethylase-Aktivität hingegen erhöhte H3K27me³-Level und induziert DNA-Schäden während der ES-Zell-Differenzierung, was sowohl Demethylase-abhängige als auch –unabhängige Funktionen von UTX aufzeigt. Um aufzuklären, wie UTX die mesodermalen und hämatopoetischen Marker sowie die Hämangioblasten- und hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung reguliert, sind in unserem Labor Klonierungen verschiedener UTX-

Deletions-Mutanten geplant (z.B. UTX mit fehlenden TPR-Regionen oder fehlender JmjC-Domäne). Mit diesen Mutanten sollen Rescue-Experimente unternommen werden, um Aufschluss darüber zu bekommen, welche UTX-Protein-Domäne für die Regulierung verantwortlich ist bzw. mit anderen Komponenten oder Komplexen interagiert und somit die hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung reguliert.

6.4 Generierung einer konditionellen UTX-Knockout-Maus

Verschiedene Studien zeigten bereits, dass ein kompletter Verlust von UTX in murinen UTX^{Δ/Δ} Weibchen zu einer gestörten Entwicklung von Dottersack, Neuralrohr sowie der kardialen Differenzierung und schließlich zum Tod zwischen Tag 10.5 und 12.5 der embryonalen Entwicklung führt. Heterozygote UTX^{Δ/+} Weibchen hingegen sind lebensfähig und fertil (Lee *et al.*, 2012; Welstead *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Shpargel *et al.*, 2012; Thieme *et al.*, 2013). UTX^{Δ/Y} Männchen weisen eine reduzierte embryonale Überlebensfähigkeit und Entwicklungsstörungen auf. Überlebende adulte UTX^{Δ/Y} Männchen sind kleiner im Vergleich zu den Wurfgeschwistern und fertil. Interessanterweise phänotypieren UTX^{Δ/UtYΔ} Männchen UTX^{Δ/Δ} Weibchen, was auf eine Kompensation durch UTY für den Verlust von UTX schließen lässt (Shpargel *et al.*, 2012; Van der Meulen, 2014). Auf Grund der Sterblichkeit von UTX^{Δ/Δ} und UTX^{Δ/UtYΔ} Mäusen ist eine genaue Untersuchung der Funktion von UTX in der embryonalen Hämatopoese schwierig. Um dies zu umgehen, habe ich eine konditionelle UTX-Knockout-Maus hergestellt, deren Nachkommen, bei Verpaarung mit einer Maus mit Gewebe-spezifischer Cre-Expression, einen UTX-Knockout in diesem Gewebe erlaubt. Auf diese Weise kann UTX im hämatopoetischen System, zum Beispiel durch Verpaarung mit einer Mx-Cre-Maus und Injektion von Interferon, gezielt deletiert werden (Kühn *et al.*, 1995). Die Untersuchung der Funktion von UTX in der embryonalen Hämatopoese *in vivo* ist für das Verständnis der hämatopoetischen Regulierung essenziell.

6.5 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass UTX eine wichtige regulatorische Funktion in der ES-Zell-Hämatopoese übernimmt. Die Ablation von UTX führt zu einer fehlenden Induktion der Expression mesodermaler und hämatopoetischer Gene und hat eine reduzierte Bildung von Hämangioblasten sowie hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Folge. Dabei erfolgt die Regulierung nicht über die H3K27-Methylierung an Promotoren hämatopoetischer Gene und lässt somit auf eine Demethylase-unabhängige UTX-Funktion schließen. Es bleibt weiterhin offen, ob die Expression über die Regulierung der H3K27-Acetylierung an Enhancern dieser Gene verläuft, welche UTX-Protein-Domänen an der Regulierung beteiligt sind und mit welchen Chromatin-Regulatoren UTX während der Hämatopoese interagiert. Darüber hinaus ist die von mir generierte konditionelle UTX-Knockout-Maus für die Untersuchung der Funktion während der embryonalen Hämatopoese *in vivo* von großer Bedeutung. Da UTX in mehreren malignen hämatologischen Erkrankungen, wie z.B. AML und ALL, mutiert ist (Mar *et al.*, 2012; Van der Meulen *et al.*, 2014), ist ein umfassendes Verständnis der hämatopoetischen Regulierung durch UTX und der Deregulierung in der Leukämie zudem von großer klinischer Relevanz.

7 MATERIAL UND METHODEN

7.1 Material

7.1.1 Murine ES-Zelllinien

Bezeichnung	Genetischer Hintergrund	Spezifische Eigenschaft	Herkunft
V6.5	129/Sv X C57BL6	Wildtyp	Open Biosystems
R1	129X1/SvJ X 129S1/Sv	Wildtyp	AG Müller, Würzburg
JM8A3.N1	C57BL/6N	Wildtyp	EUCOMM
JM8A3.N1 EPD0506_3_G01	C57BL/6N	UTX <i>Gene target</i> Konstrukt	EUCOMM
R1 UTX (UTX ^{hyp/Y})		UTX <i>Gene target</i> Konstrukt	Zur Verfügung gestellt von Dr. Konstantinos Anastassiadis, Dresden
R1 UTX-Flp-Dre (UTX ^{n/Y})	129X1/SvJ X 129S1/Sv	UTX <i>Conditional Mutant Allele</i>	Zur Verfügung gestellt von Dr. Konstantinos Anastassiadis, Dresden

7.1.2 Mäuse

Bezeichnung	Charakteristik	Herkunft
B6(Cg)-Tyr ^{c-2J} /J	C57BL/6J albino	Charles River
C57BL/6NCrl	Wildtyp	Zur Verfügung gestellt von der ZEMM-Zucht Würzburg
DR4	C57BL6 mit vier Antibiotika-Resistenzgenen	Zur Verfügung gestellt von Prof. Lübbert, Freiburg
C57BL/6J.Flip	C57BL6 mit Flp Rekombinase Transgen	Zur Verfügung gestellt von Prof. Nieswandt, Würzburg
NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ	NOD scidγC	Zur Verfügung gestellt von Dr. Beilhack, Würzburg

7.1.3 shRNA-Sequenzen und Vektoren

Bezeichnung	Sequenz	Vektor	Hersteller
UTX shRNA #1	CCGGCCAGCTCATTATTGTAGTATTCTCGAGA ATACTACAATAATGAGCTGGTTTTTG	pLKO.1	Sigma
UTX shRNA #2	CCGGTGGACTTGCAGCACGAATTAACCTCGAG TTAATTCGTGCTGCAAGTCCATTTTTG	pLKO.1	Sigma
UTX shRNA #3	CCGGAGTTAGCAGTGGAACTTATGCTCGAG CATAACGTTCCTACTGCTAACTTTTTTG	pLKO.1	Sigma
Scramble shRNA	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG	pLKO.1	Sigma
pCAG-CreERT2	https://www.addgene.org/14797/sequences/	pCAGEN	Addgene

7.1.4 Zellkulturmedien

ES-Zell-Medium

Bestandteile	End-Konzentration	Volumen (625 ml)	Hersteller
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	1,7 g/l	500 ml	PAA
FCS (Vorgetestet für ES-Zellen)	15 %	93,75 ml	PAA
LIF-konditioniertes Medium		0,625 ml	Eigene Produkt.
Amino Acids Non Essential	1x	6,25 ml	PAA
L-Glu	2 mM	6,25 ml	PAA
Pen/Strep	10 U/ml, 0,1 mg/ml	6,25 ml	PAA
Sodium-Pyruvat	1 mM	6,25 ml	PAA
β -Mercaptoethanol	0,1 mM		Sigma

2 Inhibitor ES-Zell-Medium (2i)

Bestandteile	End-Konzentration	Volumen	Hersteller
DMEM F12 Ham	50 %	50 ml	Invitrogen
Neurobasal	50 %	50 ml	Invitrogen
Glutamax	2 mM	0,5 ml	Invitrogen
B27 Supplement	1 %	1 ml	Invitrogen
N2 Supplement	0,5 %	0,5%	Invitrogen
Insulin	1 mg/100 ml	1 mg	Sigma
BSA	2,5 mg/100 ml		Sigma
β -Mercaptoethanol	0,1 mM		Sigma
LIF-konditioniertes Medium		100 μ l	Eigene Produktion
Pen/Strep	10 U/ml, 0,1 mg/ml	100 μ l	PAA
CHIR 99021	3 μ M	30 μ l	Axon Medchem
PD 0325901	1 μ M	10 μ l	Axon Medchem

ES-Zell-Differenzierungs-Medium

Bestandteile	End-Konzentration	Volumen (588 ml)	Hersteller
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	1,9 g/l	500 ml	PAA
FCS (Vorgetestet für die Differenzierung)	10 %	58,8 ml	Gibco, Lot#41Q2105K
Amino Acids Non Essential	1x	5,88 ml	PAA
L-Glu	2 mM	5,88 ml	PAA
Pen/Strep	10 U/ml, 0,1 mg/ml	5,88 ml	PAA
Sodium-Pyruvat	1 mM	5,88 ml	PAA
β-Mercaptoethanol	0,1 mM		Sigma

MEF-Medium

Bestandteile	End-Konzentration	Volumen (565 ml)	Hersteller
DMEM Low Glucose (1 g/l)	0,56 g/l	500 ml	PAA
FCS	10 %	5 ml	PAA
L-Glu	2 mM	5 ml	PAA
Pen/Strep	10 U/ml, 0,1 mg/ml	5 ml	PAA
Sodium-Pyruvat	1 mM	5 ml	PAA

Methylcellulose-Medium für den BL-CFC Assay

Bestandteile	End-Konzentration	Volumen (100 ml)	Hersteller
ES-Cult [®] M3120 „Base“			
Methylcellulose for the „In Vitro“ Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells	1x	40 ml	StemCell Technologies
FCS (Vorgetestet für die Differenzierung)	10%	10ml	Gibco, Lot#41Q2105K
L-Glu	2mM	1ml	PAA
Pen/Strep	1:100	1 ml	PAA
MTG (gefiltert in IMDM)	45 µM	38 µl	Sigma
IMDM	ad 100%	47 ml	PAA
mSCF	100 ng/ml		PepröTech
mVEGF	5 ng/ml		PepröTech
hIL-6	10 ng/ml		PepröTech
Holo-Transferrin	200 µg/ml		Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure	25 µg/ml		Sigma-Aldrich
Thrombopoietin	100 ng/ml		PepröTech

Methylcellulose-Medium für die hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung

Bestandteile	End-Konzentration	Volumen (100 ml)	Hersteller
ES-Cult [®] M3120 „Base“ Methylcellulose for the „In Vitro“ Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells	1x	40 ml	StemCell Technologies
FCS (Vorgetestet für die Differenzierung)	10 %	10 ml	Gibco, Lot#41Q2105K
L-Glu	2 mM	1 ml	PAA
MTG (1:100 gefiltert in IMDM)	150 µM	0,124 ml	Sigma
BIT 9500 (5x)	1% BSA, 10 µg/ml Insulin, 200 µg/ml Transferrin	20 ml	StemCell Technologies
IMDM	ad 100%	24 ml	PAA
mSCF	150 ng/ml		PepröTech
mIL-3	30 ng/ml		PepröTech
hIL-6	30 ng/ml		PepröTech
mGM-CSF	50 ng/ml		Invitrogen
Epo	3 U/ml		Invitrogen

7.1.5 Antikörper**Primär-Antikörper**

Spezifität	Spezies	Hersteller
H3	Rabbit polyclonal	Abcam
H3K4me ²	Rabbit polyclonal	Abcam
H3K4me ³	Rabbit polyclonal	Diagenode
H3K27me ³	Rabbit polyclonal	Diagenode
H3K27ac	Rabbit polyclonal	Abcam
GAPDH	Mouse monoclonal	Millipore
Cleaved Caspase-3	Rabbit monoclonal	R&D Systems
Flk1 APC	Rat monoclonal	eBioscience
IgG2a K Isotype Ctrl APC	Rat monoclonal	eBioscience
Flk1 Biotin	Rat monoclonal	Miltenyi Biotec

Sekundärantikörper/Reagenzien

Spezifität	Spezies	Hersteller
Rabbit	Goat; Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific
Mouse	Goat; Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific
Biotin	Rat; Anti-Biotin-konjugierte MicroBeads	Miltenyi Biotec

7.1.6 Primer

Genexpressions-Primer

Gen	Sequenz
UTX/KDM6A	GCTGGAACAGCTGGAAAGTC GAGTCAACTGTTGGCCCATT
UTX Exon 3	CTGAAGGGAAAAGTGGAGTCTG TCGACATAAAGCACCTCCTG
KDM6B	GGAAGCCACAGCTACAGGAG CCACCAGGAACCAGTCAAGT
UTY/KDM6C	ATAGTGTCCAGACAGCTTCA GAGGTAGGAATACGTAAGAA
KDM5A	CCTGGCAGTAGGAGCAAAAG CGACCACAAAACATGCAAAC
KDM5B	AGTGGCTTTCCTGTTTCGAGA AAGCACATGCCACATACAA
KDM7	GGAAGTGGCACAGGCATGACT CCTGAGTCCAAGGTCATCTAATTTA
Sox2	GCGGAGTGGAAACTTTTGTCC CGGGAAGCGTGTACTTA TCCTT
Nanog	TCCTCCTGGTCCCCACAGTTT GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA
Oct4	AGGCCCGGAAGAGAAAGCGAACTA TGGGGGCAGAGGAAAGGATACA GC
Ash2L	TTGGTCCTGCTTATGACAACC CCATCTTGCTGCTTACGCTTG
MLL1	TGGATGGTCTTCGTGCGTG GCTTGGGTTTAGGGAAGCIGT
EED	GCACAGAGATGAAGTTCTGAGTGCTG ATAAGACTCCTTAATTGCATTCATCATCCT
EZH2	TCCATGCAACACCCAACACAT GGGTCTGCTACTGTTATTCGGAA
Brachyury	CCACCACGGCTGTATTTATG GGTCACAATCATCTCGTTAGTTAGC
Nodal	ACTTTCTGCTCGACTGGACA CAGATGCTGCCCTACATGAAC
GSC	CAGATGCTGCCCTACATGAAC TCTGGGTACTTCGTCTCCTGG
HoxA7	TATGTGAACGCGCTTTTATAGCA GGGGGCTGTTGACATTTGTATAA
Sox21	GCGGTGCTTTACGATACGTTG CCGAACATCAGAACCGAGCT
Nestin	CAGAGAGGCGCTGGAACAGAGATT AGACATAGGTGGGATGGGAGTGCT
Gata6	TTGCTCCGGTAAACAGCAGTG

Flk1	GTGGTCGCTTGTGTAGAAGGA AGGGGAACTGAAGACAGGCTA GATGCTCCAAGGTCAGGAAGT
Tal1/Scl	ATTGCACACACGGGATTCTG GAATTCAGGGTCTTCCTTAG
Runx1	GCAGGCAACGATGAAACTACTC CAAACCTGAGGTCGTGAATCTC
Tie2	ATGGACTCTTAGTCGGCTTA CCTTATAGCCTGTCCTCGAA
Gata1	CATTGGCCCCTTGTGAGGCCAGAGA ACCTGATGGAGCTTGAAATAGAGGC
GAPDH	TGGAGAAACCTGCCAAGTATG TCATACCAGGAAATGAGCTTGA
β -Actin	GATATCGCTGCGCTGGTCGTC ACGCAGCTCATTGTAGAAGGTGTGG
B2M	CCGGCCTGTATGCTATCC CTTGCTGAAGGACATATCTGACA
RPL6	CGGGAGTACCTGCCAATTCC GGTGAAAAAGCGCCTGATACA
RPS29	GTCTGATCCGCAAATACGGG AGCCTATGTCCTTCGCGTACT
HPRT	CACAGGACTAGAACACCT GCTGGTGAAAAGGACCTCT

Genotypisierung-Primer

Gen/Name	Sequenz
Myo	TTACGTCCATCGTGGACAGC TGGGCTGGGTGTTAGTCTTA
UTX-Flp1.1	AGAATGTGCATTTGTAAAGTGCTCC
UTX-loxd2	CCATTAGGAAAACGTAAGTGTGGCC
UTX-Flp-1	GGTTTGATGTATCAGCAGAGA
UTX-Flp-2	AAGTATTTATCAGTGATTCCAC
LAR3`	CAACGGGTCTTCTGTTAGTCC
KDM6A-5`arm	AGAAAGGAAATGTGAGAGCAAGGG
KDM6A-3`arm	GTAATCTCTGCTGATACAATCAAACC
oIMR0042	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
oIMR0043	GTAGGTGGAAATCTAGCATCATCC
oIMR1348	CACIGATATIGTAAGTAGTTTIGC
oIMR1349	CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG

ChIP-Primer

Gen	Sequenz
Brachyury Upstream	TGGAGAACAGTTCCAGAGCA TTTAACCTCTGGCGTGAAGG
Brachyury TSS	GCAGGGACCCAGGTGTAAT CAGGTGGTCCACTCGGTACT
Brachyury Downstream	CTGACGAAACCTGAGGAGGA GCAAACCTGGTCATTCAGT
Flk1 Upstream	TTGCTCTCAGATGCGACTTG CCCCTGGATAACCAGGTTTG
Flk1 TSS	GCATACCGCCTCTGTGACTT GAGTGGGCTTCTTACCCACA
Flk1 Downstream	CAGAGTTTACCCCAGGACCA TGTGACAGCTTCTCCAGGTG
Tal1	GTGAGAGTGCTTGCCTGAG ACACGACCTATCGCCAAAAG
Runx1	GGCTTCTAGGCTTGGATGT GAACACTTCTCCCGCAGTT

7.1.7 Reagenzien und Kits

Reagenz	Hersteller
ABsolute qPCR SybrGreen Mix	Thermo Scientific
Agarose	Sigma-Aldrich
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent
Ampicillin	Roth
BSA	Sigma-Aldrich
Chloroform	Applichem
DEPC	Applichem
DMSO	Applichem
Dynabeads Protein A	Life Technologies
Ethidium Bromid	Merck
ECL Select Western Blotting Detection Kit	Amersham
Ethanol	Applichem
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
G418 Sulphate	PAA
GSK-J4	Tocris
GSK-J5	Cayman
Isopropanol	Applichem
Labeling Check Reagent	Miltenyi Biotec
LB-Agar-Pulver (nach Miller)	AppliChem
LB-Medium-Pulver (nach Miller)	AppliChem
Methanol	Applichem
Mitomycin C from <i>Streptomyces caespitosus</i>	Sigma-Aldrich

Mouse ES Cell Nucleofactor Solution	Lonza
Mouse Methylcellulose Complete Medium	R&D
OxiSelect Comet Assay Kit	Cell Biolabs Inc
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Paraformaldehyd	Applichem
peqGold RNAPure	Peqlab
Phenol/Chloroform	Applichem
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Applichem
Protran BA85 Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen
Puromycin	PAA
RNase	Sigma-Aldrich
Super Taq Polymerase	Enzyme Technologies
Tamoxifen	Sigma-Aldrich
T3 Thermocycler	Biometra
TrypLE Express	Gibco
Trypsin-EDTA	PAA
Tween 20 BioChemica	Applichem
X-Gal	Peqlab
Xylol	Roth

7.1.8 Puffer und Lösungen

DEPC-H₂O

200 µl C₆H₁₀O₅ in 200 ml ddH₂O

FACS-Puffer

0,3% BSA in PBS, pH 7.4, steril-filtriert

Gelatine

0,1% in PBS

Gey Solution

Lösung A: 35 g NH₄Cl, 1,85 g KCl, 1,5 g Na₂HPO₄×12H₂O, 0,12 g KH₂PO₄, 5 g Glucose, 50 mg Phenolrot, auf 1 L mit H₂O auffüllen.

Lösung B: 0,84 g MgCl₂×6H₂O, 0,28 g MgSO₄×7H₂O, 0,46 g CaCl₂×H₂O, auf 200 ml mit H₂O auffüllen

Lösung C: 4,5 g NaHCO₃, auf 200 ml mit H₂O auffüllen

20% Lösung A, 5% Lösung B und 5% Lösung C mischen und mit H₂O auffüllen.

PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7.4

Western Blot**Lysis-Puffer 6×SS nach Lämmli**

0,5 M Tris pH 6,8, 600 µl β-Mercaptoethanol, 0,4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerol, auf 20 ml mit H₂O auffüllen.

Lower Tris

1,5 M Tris HCl, 10 ml 20×SDS, gelöst in 500 ml ddH₂O (pH 8,8).

Upper Tris

0,5 M Tris HCl, 10 ml 20×SDS, gelöst in 500 ml ddH₂O (pH 6,8).

Stripping-Lösung

0,2 N NaOH

Trenngel

H₂O, 14% Acrylamid, 375 mM Lower Tris, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED

Sammelgel

H₂O, 4,5% Acrylamid, 125 mM Upper Tris, 0,1% SDS, 0,1 % APS, 0,05% TEMED

Elektrophoresepuffer

895 ml VE-H₂O, 100 ml Lämmli, 5 ml SDS

Blot-Puffer

700 ml H₂O, 100 ml Lämmli, 200 ml Methanol

ChIP-Puffer**Lysis-Puffer**

50 mM Tris HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 1% (wt/vol) SDS. Protease Inhibitor Mix 1:100 und 1 mM PMSF frisch dazu geben.

RIPA-Puffer:

10 mM Tris HCl, pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5mM EGTA, 1% (vol/vol) Triton X-100, 0,1% (wt/vol) SDS.

RIPA-ChIP-Puffer

Protease Inhibitor Mix 1:100 und 1mM PMSF frisch zum RIPA Puffer dazu geben.

TE-Puffer

10 mM Tris HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA.

Elutions-Puffer

20 mM Tris HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl

Komplettierter Elutions-Puffer

50 µg/µl Proteinase K und 1% (wt/vol) SDS frisch zum Elutions-Puffer dazu geben.

Puffer A

10 mM Hepes, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25% Triton X-100, H₂O. Protease Inhibitor 1:100 frisch dazu geben.

Puffer B

10 mM Hepes, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,01% Triton X-100, 200 mM NaCl, H₂O. Protease Inhibitor 1:100 frisch dazu geben.

LacZ-Färbung**Fixierlösung**

37% Formaldehyd, 25% Glutaraldehyd, PBS

Färbelösung200 mg/ml X-Gal, 1 M MgCl₂, 50 mM K-Ferri-Cyanide, 50 mM K-Ferro-Cyanide, PBS**7.1.9 Zellkulturplastik**

Zellkulturplastik	Hersteller
2 ml Cryotubes	Thermo Scientific
24-Well-Platten, adhären	Greiner
12-Well-Platten, adhären	Greiner
6-Well-Platten, adhären	Greiner
3,5 cm Petrischalen	Greiner
6 cm Platten, adhären	Greiner
10 cm Petrischalen	Greiner
10 cm Platten, adhären	Greiner
15 cm Petrischalen	Greiner
75 cm ² Flaschen, roter Deckel, adhären	Sarstedt
175 cm ² Flaschen, roter Deckel, adhären	Sarstedt
15 ml Falcon Röhrchen	Greiner
50 ml Falcon Röhrchen	Greiner
70 µm Zellsiebe	BD Falcon

7.1.10 Geräte

Gerät	Hersteller
Cell culture microscope EVOS	Life Technologies
CP-160 Cabinet X-Radiator System	Faxitron X-Ray LLC
Cytospin 4 Zentrifuge	Thermo Scientific
FACS Canto I	BD
Gel Imaging System	Biorad
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM780	Zeiss
Light Cycler 480 II	Roche
M220 Focused-ultrasonicator	Covaris
Nucleofactor II	Amaxa/Lonza
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies

7.1.11 Software

Software	Hersteller
FACS Diva	BD
FlowJo	Tree Star, Inc.
geNorm	CMG Gent
ImageJ	NIH
Integrative Genomics Viewer	Broad Institute
ModFit	Verity Software House

7.2 Methoden

7.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Cryokonservierung wurden Zellen in FCS, das 10% DMSO enthielt bei -80°C eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

7.2.1.1 MEFs

MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) wurden entweder frisch nach der Isolation oder aufgetaut verwendet. Die Zellen wurden in T75 oder T175 Kulturflaschen in MEF-Medium kultiviert und alle zwei bis vier Tage in einem Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf neue Kulturflaschen umgesetzt. Dafür wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, mit Trypsin (37°C, 5 min) inkubiert, in MEF-Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen auf die entsprechende Anzahl an Flaschen verteilt. Für die ES-Zell-Kultur wurden konfluent gewachsene MEFs mit Mitomycin C (10 µg/ml) für zwei Stunden mitotisch inaktiviert, zwei Mal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und je $0,3 \times 10^6$ Zellen auf eine 6 cm Zellkulturplatte ausgesät. Nach einigen Stunden hatten sich die MEFs angeheftet und konnten als Fütterzellen für die ES-Zellkultur verwendet werden.

Für die Selektion mit Antibiotika wurden ES Zellen mit vierfach-resistenten DR4-MEFs kultiviert.

7.2.1.2 ES-Zellen

Murine embryonale Stammzellen wurden aufgetaut und entweder auf MEFs oder auf Gelatine in ES-Zell-Medium kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden Tag. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:10 passagiert. Hierfür wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mit Trypsin (37°C, 5 min) inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde mit ES-Zellmedium abgestoppt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 90×g wurde das Pellet in frischem ES-Zell-Medium resuspendiert und je 1/10 auf eine MEF- oder Gelatine-beschichtete Platte ausgesät.

Für die Kultivierung von ES-Zellen auf Gelatine wurden diese zunächst von den MEFs

separiert. Hierfür wurden 10 cm Zellkulturplatten mit Gelatine beschichtet und anschließend die trypsinisierte heterogene Zellsuspension einer 6 cm Kulturplatte 45 min. lang auf einer Gelatineplatte inkubiert. Dabei können MEFs an der Kulturschale adhären, wohingegen ES-Zellen nur locker anhaften und nach Absaugen des Überstandes mit Medium abgespült werden können.

ES-Zellen, welche für die Blastozysteninjektionen vorgesehen waren, wurden in 2i-Medium auf Gelatine-beschichteten 3,5 cm Kulturplatten kultiviert. Das Passagieren erfolgte hierbei jeden Tag, wobei jeweils 1×10^6 ES-Zellen auf eine frische Platte ausgesät wurden. Lebende Zellzahlen wurden durch Trypanblau-Färbung in Neubauer-Zählkammern bestimmt.

7.2.1.3 KDM6-Inhibition

Die Inhibition von KDM6 erfolgte mit dem spezifischen Inhibitor GSK-J4, welcher in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 1,8 μM frisch zur ES-Zell- oder EB-Kultur gegeben wurde. Als Kontrolle diente GSK-J5, ein inaktives Regio-Isomer von GSK-J4, sowie DMSO, die in derselben Konzentration bzw. Menge zu Kontrollzellen gegeben wurden.

7.2.1.4 Transfektion von ES-Zellen

2×10^6 MEF-freie ES-Zellen wurden in 100 μl Mouse ES Cell Nucleofactor Solution resuspendiert und 2 μg der Plasmid-DNA dazu pipettiert. Die Lösung wurde in eine Amaxa Cuvette pipettiert, im Nucleofactor II Device (Programm A-23) elektroporiert und anschließend mit einer Amaxa Pipette mit etwas ES-Zellmedium wieder entnommen und auf eine MEF-beschichtete Platte getropft.

7.2.1.5 Generierung von UTX-Knockdown/Knockout-ES-Zellen

Für die Generierung von UTX-Knockdown-Zellen wurden V6.5 ES-Zellen mit shRNA-Vektoren transfiziert und ab dem darauffolgenden Tag, mindestens 7 Tage lang, mit 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Puromycin selektiert. Der Knockdown wurde auf RNA-Ebene mittels quantitativer Realtime PCR überprüft. R1 ES-Zellen mit dem *UTX Knockout First* Konstrukt ($\text{UTX}^{\text{hyp}/Y}$) wurden mit 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 selektiert. $\text{UTX}^{\text{fl}/Y}$ ES-Zellen wurden nicht selektiert, da keine Antibiotika-

Resistenzen vorhanden sind. Bei einer Transfektion dieser Zellen mit einem Tamoxifen-induzierbaren Vektor (pCAG-CreERT2) wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 1 μM Tamoxifen behandelt. Nach zwei Tagen wurden einzelne ES-Zellkolonien gepickt, trypsinisiert und in ein Well einer MEF-beschichteten 24-Well-Platte transferiert. Hochwachsende Klone wurden schrittweise auf Kulturplatten mit größerer Fläche bis hin zu 6 cm Platten umgesetzt. Um zu überprüfen, ob die Cre-Rekombination erfolgreich war, wurde genomische DNA isoliert und genotypisiert. Dafür wurde jeweils 1 μl DNA mit 0,2 μl Taq Polymerase, 2 μl 2,5 mM dNTPs, 2 μl Polymerase-Puffer, 1 μl DMSO, je 0,5 μl UTX-Flp1.1/lox2- bzw. je 0,5 μl UTX-Flp-1/Flp-2-Primern (10 pM) und 11,8 μl H₂O gemischt und folgendes PCR-Programm durchgeführt: 95°C 3 min., 35 \times (95°C 30 sec, 62°C 30 sec., 72°C 30 sec), 72°C 3 min., 4°C ∞ . Die PCR erfolgte am T3 Thermocycler. Die Analyse der Fragmentlänge erfolgte durch Gelelektrophorese.

7.2.1.6 LacZ-Färbung

ES-Zellen wurden einen Tag vor der Färbung auf 6 cm Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und für zwei Minuten mit der Fixierlösung fixiert. Diese wurde möglichst schnell wieder abgesaugt, um eine Überfixierung zu vermeiden. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen mit der X-Gal enthaltenden Färbelösung bei 37°C über Nacht inkubiert. Nur in Zellen, welche ein LacZ-Reportergen enthalten, wird X-Gal von der β -Galactosidase hydrolysiert. Das Produkt bildet nach Oxidation an der Luft einen blauen Farbstoff.

7.2.1.7 Kumulative Populationsverdopplungen (CPDs)

Für die Bestimmung der CPDs wurden 5×10^5 ES-Zellen auf MEF-beschichtete Platten ausgesät, nach zwei Tagen trypsinisiert und lebende Zellzahlen mit Trypanblau-Färbung bestimmt. Anschließend wurden erneut 5×10^5 Zellen ausgesät und der Vorgang für 5 weitere Passagen wiederholt. Die Populationsverdopplungen (PD) wurden bei jeder Passage mit folgender Gleichung berechnet: $PD = \log[\log_{10}(N_1) - \log_{10}(N_H)]$; N_1 =ausgesäte Zellzahl, N_H =ausgezählte Zellzahl. Neu berechnete PD Werte wurden zu den vorherigen addiert, um CPDs zu errechnen.

7.2.1.8 EB-Differenzierung

Für die Differenzierung zu EBs (*embryoid bodies*), Embryo-ähnlichen dreidimensionalen Zellaggregaten, wurden ES-Zellen zunächst von MEFs separiert. Die spontane Differenzierung erfolgte in hängenden Tropfen (*hanging drops*, 1000 Zellen/30 µl Medium) in Differenzierungsmedium an der Innenseite von 15 cm Petrischalen-Deckeln (etwa 120 Tropfen pro Deckel). Die Petrischalen waren für die Befeuchtung mit PBS gefüllt. Die entstehenden EBs konnten nach zwei Tagen ab gespült, in 10 cm Petrischalen in 10 ml frischem Differenzierungsmedium überführt und bis zu 7 weiteren Tagen in Suspension kultiviert werden. Alle zwei Tage wurde das Medium der Suspensionskultur gewechselt.

Für weitere Analysen wurden EBs dissoziiert, indem diese zunächst in Falcon Röhren gesammelt und ein Mal mit PBS gewaschen wurden. Die Trypsinisierung erfolgte mit TrypLE Express (3 min., 37°C). Um Zellklumpen zu entfernen, wurde die Zellsuspension anschließend durch ein Zellsieb filtriert.

7.2.1.9 Beating Body Assay

Für die Differenzierung von ES-Zellen zu spontan kontrahierenden Cardiomyocyten, wurden EBs, wie oben beschrieben, bis Tag 5 der ES-Zell-Differenzierung kultiviert. Je ein EB wurde in ein Well einer Gelatine-beschichteten 24-Well-Platte, zusammen mit Differenzierungsmedium, überführt. Ein Mediumwechsel sowie eine mikroskopische Untersuchung zur Identifizierung von Kontraktionen erfolgte jeden Tag.

7.2.1.10 Blast colony-forming cell (BL-CFC) Assay

Je 6×10^4 Einzelzellen von 4 bis 5 Tage alten EBs wurden in 1 ml BL-CFC Methylcellulose-Medium in Duplikaten in 3,5 cm Petrischalen ausgesät. Blast Kolonien wurden nach etwa 5 weiteren Tagen in Kultur auf Grund ihrer Morphologie identifiziert und die Anzahl ausgezählt.

7.2.1.11 Hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung

Je 1×10^5 Einzelzellen von 6 bis 8 Tage alten EBs wurden in 1 ml Methylcellulose-Medium für die hämatopoetische Differenzierung in Duplikaten in 3,5 cm Petrischalen ausgesät. Hämatopoetische Kolonien wurden nach etwa 10 weiteren Tagen in Kultur auf Grund ihrer Morphologie identifiziert und die Anzahl ausgezählt.

Für die Etablierung und Optimierung der hämatopoetischen ES-Zell-Differenzierung wurde zunächst bestimmt, welcher Tag der ES-Zell-Differenzierung der geeignetste für den Assay ist. Hierfür wurden 6 bis 10 Tage alte EBs wie oben beschrieben behandelt und in Triplikaten in Methylcellulose-Medium kultiviert. Mit einer durchschnittlichen Anzahl von 39 bzw. 43 Kolonien pro Platte wurden Tag 7 und 8 als geeignete Zeitpunkte ausgewählt (siehe Tab. 7.1).

Tab. 7.1: EB-Kultivierungsdauer

Dauer der EB-Kultivierung (in Tagen)	Durchschnittliche Anzahl Kolonien
6	6
7	39
8	43
9	17
10	8

Desweiteren wurde untersucht, welche Kultivierungsmethoden für die primäre Differenzierung (EB-Differenzierung) bzw. die sekundäre Differenzierung (hämatopoetische Differenzierung) am besten geeignet sind. Für die primäre Differenzierung wurde die übliche ES-Zell-Differenzierung in Suspension (siehe oben) sowie zwei Differenzierungen in Methylcellulose-Medium (Komplettmedium von R&D und Methylcellulose-Medium mit mSCF) in den Test integriert. Für die sekundäre/hämatopoetische Differenzierung wurde entweder das Komplettmedium oder das Methylcellulose-Medium gewählt. Mit durchschnittlich 38 Kolonien wurde die Suspensionskultur mit anschließender Kultivierung im zusammengesetzten Methylcellulose-Medium für die hämatopoetische Differenzierung als Standard-Protokoll gewählt, da dieses eine schnellere und günstigere Alternative zur primären Differenzierung in Methylcellulose darstellt (41 Kolonien; siehe Tab. 7.2).

Tab. 7.2: Hämatopoetische Differenzierung in verschiedenen Medien

Medium		Durchschnittliche Anzahl Kolonien
Primäre Differenzierung	Sekundäre Differenzierung	
MC+mSCF	MC+WF	41
Komplettmedium	Komplettmedium	0
Suspensionskultur	MC+WF	38
Suspensionskultur	Komplettmedium	13

Schließlich wurde ausgetestet, welches FCS für die hämatopoetische ES-Zell-Differenzierung geeignet ist. Die Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben unter Zugabe verschiedener Fötaler Kälberseren, sowohl zum primären Differenzierungs- als auch zum Methylcellulose-Medium (siehe Tab. 7.3). Mit 32 Kolonien, 21% CD45- und 15% Mac1-positiven Zellen wurde Serum Nr.3 für die hämatopoetische Differenzierung ausgewählt.

Tab. 7.3: Hämatopoetische Differenzierung in verschiedenen FCS

FCS Nr.	Anzahl Kolonien	Anzahl CD45- positiver Zellen (%)	Anzahl Mac1-positiver Zellen (%)
1	9	9,5	8
2	8	-	-
3	32	21	15
4	11	16	13
5	13	38	11
6	13	18	-
7	4	10	-
8	5	7	2
9	4	2	-

7.2.2 Teratom-Test

Zum Nachweis der Pluripotenz von UTX-Knockdown/Knockout-ES-Zellen wurden, sowohl in Kollaboration mit Michele Boiani (MPI Münster) als auch von mir in der Tierhaltung ZEMM, Teratom-Tests durchgeführt. Hierfür wurden je 1×10^6 ES-Zellen in einem Gesamteinjektionsvolumen von 100 μ l subkutan in die dorsalen Flanken von NOD scid Mäusen injiziert. Nach erfolgter Injektion wurde der Gesundheitszustand, sowie die Tumorgroße (maximal 1,5 cm im Durchmesser) der Mäuse täglich kontrolliert. Nach 4 bis maximal 10 Wochen erfolgte die Tumorentnahme nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation. Die Teratome wurden für einen Tag in 4% PFA fixiert und anschließend in 70% Ethanol gelegt. Nach Paraffin-Einbettung von Mitarbeitern der Neuropathologie (Institut für

Pathologie, Uni Würzburg) wurden die Teratome geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Alle Experimente erfolgten nach Vorgabe und Bestimmungen der Regierung von Unterfranken, Würzburg, Deutschland.

7.2.3 Isolierung primärer Mauszellen

7.2.3.1 Isolierung von Knochenmarkszellen

Tibia- und Femur-Knochen von Mäusen wurden entfernt, Knochenmarkszellen mit einer 27 gauge Nadel und 5 ml Spritze ausgespült und durch ein 70 μm Zellsieb gefiltert. Das Pellet wurde zwei Mal mit PBS gewaschen und für die Lyse von roten Blutkörperchen in Gey Solution resuspendiert. Nach einer 5 min. Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension, die nun hauptsächlich weiße Blutkörperchen enthielt, in FCS zentrifugiert (7 min., 1350 rpm) und erneut zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für Genexpressionsanalysen und CFU-Assays in Methylcellulose eingesetzt.

7.2.3.2 MEF-Isolierung

Trächtige Mäuse wurden an Tag 13.5 p.c. durch zervikale Dislokation getötet, Embryos wurden entnommen und Plazenta und extraembryonisches Gewebe entfernt. Kopf und alle roten Organe wurden entfernt und in Trypsin über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die enzymatische Aktivität zunächst für 30 min. bei 37°C verstärkt und danach mit MEF-Medium abgestoppt. Das Gewebe wurde durch Pipettieren weiter zerkleinert und kurz in 50 ml Falcon Röhrchen stehen gelassen, um größere Gewebestücke absinken zu lassen. Der Überstand wurde abzentrifugiert, in frischem MEF-Medium resuspendiert und auf Zellkulturplatten ausgesät. Nach ein oder zwei Tagen konnten adhärente Fibroblasten für die ES-Zellkultur weiter verwendet oder cryokonserviert werden.

7.2.4 Molekularbiologische Methoden

7.2.4.1 Bakterienkultur und Maxipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte mit dem PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit. Hierfür wurden Bakterienkulturen (aus Glycerol stocks der shRNA#1 bis 5 und pCAG-CreERT2 Plasmide) zunächst auf LB-Amp-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und schrittweise zunächst in 5 ml LB-Medium (+Amp) über Nacht bei 37°C und anschließend 10 µl der Kultur in 100 ml LB-Medium (+Amp) geschüttelt (über Nacht, 170 rpm). Die Plasmidisolation erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in Tris-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

7.2.4.2 RNA-Isolierung

Die Extraktion von RNA aus MEF-freien ES-Zellen, EBs, Geweben oder NIH3T3 Zellen erfolgte mit dem peqGold RNAPure Kit gemäß der Anleitung des Herstellers. Die RNA wurde in 20 µl DEPC-H₂O gelöst und die Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt.

7.2.4.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit aus aufgereinigter RNA. Um Reste genomischer DNA zu entfernen wurde zunächst je 1 µg RNA mit DNase für 30 min. bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend mit 50 mM EDTA für 10 min. bei 65°C abgestoppt. *Random hexamer primer* wurden zur RNA hinzu gegeben, für 5 min. bei 65°C annealt und auf Eis gestellt. Schließlich wurde die cDNA mit 10 mM dNTPs, M-MuLV Reverse Transcriptase, RiboLock RNase Inhibitor in einem Reaktionspuffer für 1 h bei 37°C synthetisiert. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

7.2.4.4 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation wurde nach dem Protokoll von Dahl und Collas (μ ChIP: Chromatin Immunoprecipitation for Small Cell Numbers, *Methods in Molecular Biology* 2009) durchgeführt. Hierfür wurden $1,3 \times 10^6$ Zellen in PBS mit 1% PFA (8 min., Raumtemperatur) fixiert. Die Reaktion wurde mit 2 M Glycin abgestoppt und zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die Extraktion der Nuklei wurde das Pellet in Puffer A und anschließend in Puffer B, rotierend für 10 min. bei 4°C, gelöst und abzentrifugiert. Die Extrakte wurden in 120 μ l Lysispuffer resuspendiert und die DNA im M220 Focused-Ultrasonicator für 18 min. bei einem *Duty Factor* von 10% geschert. Die DNA-Fragment-Größe und Quantifizierung wurde mit dem Agilent High Sensitivity DNA Kit am 2100 Bioanalyzer überprüft und betrug für gewöhnlich 200 bp. Um die SDS-Konzentration in den Proben zu reduzieren, wurden die Proben nach dem Scheren mit RIPA-Puffer verdünnt. 10% des Materials wurden als Input-Material verwendet. Parallel zur Vorbereitung des Chromatins wurden die Antikörper (H3, H3K4me³, H3K27me³, H3K27ac und IgG) an Dynabeads-Protein A für 2 h bei 4°C rotierend gekoppelt. Anschließend wurde je 1/10 des Chromatin-Materials mit dem Antikörper-Beads-Komplex für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert, wodurch die Antikörper an das Chromatin binden konnten. Die DNA-Elution, die Reversion des Cross-Link und der Proteinase K-Verdau erfolgte in komplettiertem Elutions-Puffer für 2 h bei 68°C und 1300 rpm im Thermomixer. Nach dem Entfernen der Dynabeads durch einen *Magnet Separation Rack*, wurde das ChIP-Material durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Die DNA wurde in 20 μ l TE-Puffer gelöst und für kurze Zeit bei -20°C gelagert bevor sie für RT-PCRs weiter verwendet wurde.

7.2.4.5 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

qPCR wurden sowohl für die Genexpressionsanalyse als auch zur Quantifizierung von ChIP-DNA durchgeführt. Für Genexpressions-Analysen wurde je 1 μ l cDNA mit 8,5 μ l H₂O, 10 μ l qPCR SybrGreen Mix und je 0,25 μ l pro Primer (100 pM) gemischt. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten im Light Cycler 480 II mit folgendem PCR-Programm durchgeführt: 95°C 15 min., 40 \times (95°C 10 s, 60°C 20 s, 72°C 30 s, 80°C 20 s), 50°C 1 min. Cp-Werte wurden von der Roche Light Cycler Software berechnet. Für die Normalisierung wurden zunächst zwei geeignete Referenzgene für jede Zelllinie mit Hilfe von geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) bestimmt. Die Expressionslevel der Zielgene

wurden dann relativ zu den Expressionslevel der Referenzgene (β -Actin und GAPDH bzw. B2M für V6.5; RPL6 und RPS29 für R1) normalisiert.

Für die qPCR von ChIP-DNA wurden je 2 μ l ChIP- oder Input-DNA mit 10 μ l qPCR SybrGreen Mix, 8,5 μ l H₂O und je 0,25 μ l pro Primer (100 pM) gemischt. Alle Reaktionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Cp-Werte wurden von der Roche Light Cycler Software berechnet und Methylierungs- bzw. Acetylierungslevel relativ zur nicht-präzipitierten Input-DNA sowie H3 berechnet.

ChIP Primer wurden mit Hilfe von IGV (Integrative Genomics Viewer) und Mouse BLAT search designed. Zunächst wurde die Zielsequenz gemäß den Histon-Methylierungsmustern aus annotierten ChIPseq-Datensätzen bestimmt (<http://www.broadinstitute.org/igv/Genomes>). Anschließend wurde mit Mouse BLAT search überprüft, ob sich die ausgewählte Sequenz unmittelbar upstream oder downstream der Transcriptional Start Site (TSS) befand (<http://genome.ucsc.edu>). Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) wurde schließlich verwendet, um Primer in der ausgewählten Sequenz zu designen, welche ein Produkt von 100-200 bp ergaben.

7.2.4.6 Western Blot

Für Western Blot-Analysen wurden 1×10^6 Zellen nach zwei bis drei Waschschritten mit PBS in 120 μ l Lysis-Puffer resuspendiert und durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 21 gauge Nadel homogenisiert. Die Proben wurden für 5 min. bei 95°C erhitzt, abgekühlt, abzentrifugiert und der Überstand für die Protein-Auftrennung durch SDS-PAGE auf ein 14% SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Anschließend wurde die Membran für 30 min. in PBS 5% Magermilch, 0,1% Tween20 bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Die Membran wurde dann mit dem primären Antikörper in PBS 1% Magermilch, 0,1% Tween20 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurde mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper in PBS 0,1% Tween20 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Spezifische Proteinbanden wurden nach Inkubation der Membran mit der ECL Western Blotting Detection Lösung am Biorad Imaging System detektiert. Die Membranen konnten danach mit NaOH gestrippt und für weitere Detektionen verwendet werden. Die densitometrische Quantifizierung der Intensität von Proteinbanden erfolgte relativ zur Intensität der H3 oder GAPDH Bande mit Hilfe von ImageJ.

7.2.4.7 Extraktion genomischer DNA

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte entweder aus ES-Zellen oder Schwanzproben von Mäusen. Dafür wurden Schwanzproben oder Zellen in Lysis-Puffer mit 1% Proteinase K über Nacht bei 56°C rotiert. Am nächsten Tag wurden die Proben in zwei Schritten mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Isopropanol bei 4°C gefällt. Nach zwei Waschschrritten mit 70% Ethanol wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst.

7.2.4.8 Cytospin und Hämatoxylin & Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Hämatopoetische Kolonien wurden entweder gepickt oder mit erwärmtem PBS ausgespült, ein Mal mit PBS gewaschen, in 400 µl PBS 0,3% BSA resuspendiert und in einer Cytospin-Zentrifuge für 2 min. bei 500 rpm auf Objektträger zentrifugiert.

Für die HE-Färbung wurden die Proben kurz bei Raumtemperatur getrocknet und für 5 min. mit -20°C kaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Proben wie folgt gefärbt: kurz VE-H₂O, 5 min. Hämatoxylin, 5 min. Leitungswasser (mehrmals wechseln), 2 min. Eosin, kurz VE-H₂O, ½ - 1 min. 70% EtOH, 7 – 8 min. 100% EtOH (in insgesamt 3 Behältern), 5 – 6 min. Xylol. Danach wurden die Proben unmittelbar mit Vitroclud eingedeckelt, getrocknet und am Cell Culture microscope EVOS fotografiert.

7.2.4.9 Alkaline Comet Assay

Comet Assays wurden mit dem OxiSelect™ Comet Assay Kit (Cell Biolabs Inc.) durchgeführt. Hierfür wurden Einzelzellsuspensionen von EB-Kulturen, welche entweder mit GSK-J4 oder mit der Kontrollsubstanz GSK-J5 oder mit DMSO behandelt wurden, nach dem Trypsinisieren, zunächst für 15 min. bei 37°C in Gegenwart von GSK-J4, GSK-J5, DMSO oder ohne Inhibitor inkubiert, um Trypsin-induzierte Schäden auszuschließen. Für die Bestrahlung (CP-160 Cabinet X-Radiator System; 160kV; 6,3 mA; 0,4 Gray/min; Filter: 0,5mm Cu) wurden EB-Einzelzellsuspensionen in Differenzierungs-Medium ohne FCS überführt und nach der Bestrahlung sofort bei 4°C gekühlt, um DNA-Reperatur-Mechanismen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in vorgekühltem PBS resuspendiert und mit flüssiger OxiSelect™ Comet Agarose gemischt. 10⁴ Zellen wurden

pro OxiSelect™ Comet Slide Well pipettiert und für 15 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Alkaline Elektrophorese wurde bei 4°C mit Alkaline Elektrophorese Lösung (30 min., 1 V/cm, 300 mA) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Slides drei Mal in vorgekühltem H₂O gewaschen und für 5 min. in eiskaltem 70% Ethanol inkubiert. Slides wurden luftgetrocknet und mit Vista Green DNA Dye angefärbt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Epifluoreszenz-Mikroskop. Für die Quantifizierung wurden > 50 Nuclei pro Kondition ausgewert. Die Auswertung der Tail Moments (TM) erfolgte mit der CASP software (CASP Lab).

7.2.5 Zellsortierung: MACS

Die Isolierung Flk1-positiver Zellen erfolgte aus Einzelzellsuspensionen 4.5 Tage alter EBs unter Verwendung des CD309 (Flk1) MicroBead Kit mouse gemäß der Anleitung des Herstellers. Dafür wurden Zellen zunächst mit dem CD309-Biotin-Antikörper inkubiert und anschließend an Anti-Biotin MicroBeads gekoppelt. Als nächstes wurden zur Überprüfung der Frequenz Flk1-positiver Zellen in der Gesamtzellpopulation vor und nach der Isolierung, die Proben mit dem Labeling Check Reagent-APC inkubiert und vor der Isolierung im Durchflusszytometer analysiert. Die magnetische Separierung der Zellen erfolgte im Anschluss mit *LS Columns* im *MACS Separator*. Flk1-negative Zellen wurden dabei im Durchfluss gesammelt. Die Frequenz Flk1-positiver Zellen im Eluat und im Durchfluss wurde im Durchflusszytometer überprüft. Anschließend wurde die Eluat-Fraktion (Flk1⁺) und die Durchfluss-Fraktion (Flk1⁻) für Genexpressionsanalysen und ChIP weiter verwendet.

7.2.6 Durchflusszytometrie

7.2.6.1 Zellzyklus-Analyse

Um den Anteil an Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen zu bestimmen, wurden 2×10^5 Zellen in 70% eiskaltem Ethanol für mindestens 30 min. bei -20°C fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 200 µl PBS mit 100 µg/ml RNase und 50 µg/ml Propidiumiodid für 30 min. bei 37°C gefärbt. Die Proben wurden direkt danach am Durchflusszytometer analysiert.

7.2.6.2 Flk1-Oberflächenfärbung

Für die Detektion von Flk1 auf der Zelloberfläche, wurden 2×10^5 Zellen aus EB-Einzelzellsuspensionen vor der Färbung ein Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 μ l Flk1-APC-Antikörper in 100 μ l FACS-Puffer für 20 min. bei 4°C inkubiert, zwei Mal mit Puffer gewaschen und im Durchflusszytometer in einem Gesamtvolumen von 200 μ l analysiert.

7.2.7 Generierung einer konditionellen UTX-Knockout-Maus

Zur Generierung einer konditionellen UTX-Knockout-Maus wurden Blastozysteninjektionen mit JM8A3.N1 UTX^{hyp/Y} ES-Zellen in BL/6 albino Mäuse durchgeführt. Da diese ES-Zellen agouti/braune Tiere hervorbringen, konnten chimäre Nachkommen an der gescheckten Fellfarbe bestimmt werden. Weiterhin wurden Genotypisierungs-PCRs aus Schwanzproben durchgeführt (siehe Extraktion genomischer DNA und unten). 1:2 Verpaarungen von chimären Männchen mit Wildtyp-Weibchen resultierten in 50% UTX^{hyp/X} Weibchen, welche auf einem Allel ein hypomorphes UTX-Allel aufweisen. Nachfolgende 1:2 Verpaarungen von Wildtyp-Männchen mit UTX^{hyp/X} Weibchen wurden fortgeführt bis genügend Weibchen für einen Embryotransfer aus dem Experimentellen Bereich in der Tierhaltung in die SPF vorhanden waren. Hierfür wurden bei den Weibchen Superovulationen herbeigeführt. Nach der Befruchtung wurden die Embryos in Ammentiere in der SPF transferiert. Nachdem eine Erhaltungszucht der UTX^{hyp/X} Weibchen in der SPF gewährleistet war, wurden diese mit B6.Flip-Mäusen verpaart und die Nachkommen auf eine erfolgreiche Deletion der SA- β gal-Neo-PA-Kassette hin genotypisiert. Resultierende UTX^{n/Y} und UTX^{n/X} Tiere wurden zunächst erneut mit Wildtyp-Tieren verpaart, um das Flip-Rekombinase-Transgen wieder zu eliminieren, bevor heterozygote UTX^{n/Y} und UTX^{n/X} Tiere ohne das Transgen untereinander verpaart wurden, um homo- bzw. hemizygoten UTX^{n/Y} / UTX^{n/n} (konditionelle Allele) Mäuse zu erhalten. Diese Mäuse können nun mit Cre-Rekombinase-Mäusen verpaart werden, um z.B. eine gewebe-spezifische Deletion von UTX im fötalen hämatopoetischen System zu generieren.

Genotypisierungen der UTX^{hyp/X}, UTX^{n/Y} und UTX^{n/n} Mäuse erfolgten mit jeweils 1 μ l genomischer DNA und 0,2 μ l Taq Polymerase, zusammen mit 2 μ l 2,5 mM dNTPs, 2 μ l Polymerase-Puffer, 1 μ l DMSO, 1 μ l LAR3', 0,5 μ l KDM6A-5'arm und 0,5 μ l KDM6A-3'arm Primern (10 pM) und 11,8 μ l H₂O mit folgendem PCR-Programm: 95°C 3 min., 35 \times (95°C

30 sec, 62°C 30 sec., 72°C 30 sec), 72°C 3 min., 4°C ∞. Zur Detektion des Flip-Rekombinase-Transgens wurde die DNA und die Polymerase mit 0,2 µl 10 mM dNTPs, 2 µl Polymerase-Puffer, je 0,1 µl oIM0042, oIM0042, oIM1348, oIM1349 Primern und 16,2 µl H₂O gemischt und folgendes PCR-Programm durchgeführt: 94°C 3 min., 35× (94°C 30 sec, 58°C 1 min., 72°C 1 min.), 72°C 2 min., 10°C ∞. Alle PCR erfolgten am T3 Thermocycler von Biometra. Die Analyse der Fragmentlänge erfolgte durch Gelelektrophorese.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, B.J., Cui, K., Tang, Q., and Zhao, K. (2013). Dynamic regulation of epigenomic landscapes during hematopoiesis. *BMC genomics* 14, 193.
- Adamo, A., Sese, B., Boue, S., Castano, J., Paramonov, I., Barrero, M.J., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). LSD1 regulates the balance between self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Nature cell biology* 13, 652-659.
- Agger, K., Cloos, P.A., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449, 731-734.
- Ang, Y.S., Tsai, S.Y., Lee, D.F., Monk, J., Su, J., Ratnakumar, K., Ding, J., Ge, Y., Darr, H., Chang, B., et al. (2011). Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell* 145, 183-197.
- Armoskus, C., Moreira, D., Bollinger, K., Jimenez, O., Taniguchi, S., and Tsai, H.W. (2014). Identification of sexually dimorphic genes in the neonatal mouse cortex and hippocampus. *Brain research* 1562, 23-38.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17, 126-140.
- Barker, N., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes & development* 22, 1856-1864.
- Bell, D.R., and Van Zant, G. (2004). Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogene* 23, 7290-7296.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development* 12, 142-148.
- Berletch, J.B., Deng, X., Nguyen, D.K., and Disteché, C.M. (2013). Female bias in RhoX6 and 9 regulation by the histone demethylase KDM6A. *PLoS genetics* 9, e1003489.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N., and Kedinger, C. (1997). Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* 138, 1207-1217.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., et al. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from

embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.

Burney, M.J., Johnston, C., Wong, K.Y., Teng, S.W., Beglopoulos, V., Stanton, L.W., Williams, B.P., Bithell, A., and Buckley, N.J. (2013). An epigenetic signature of developmental potential in neural stem cells and early neurons. *Stem cells* 31, 1868-1880.

Campos, E.I., and Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. *Annual review of genetics* 43, 559-599.

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039-1043.

Carter, M.G., Stagg, C.A., Falco, G., Yoshikawa, T., Bassey, U.C., Aiba, K., Sharova, L.V., Shaik, N., and Ko, M.S. (2008). An in situ hybridization-based screen for heterogeneously expressed genes in mouse ES cells. *Gene expression patterns : GEP* 8, 181-198.

Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885-896.

Chamberlain, S.J., Yee, D., and Magnuson, T. (2008). Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency. *Stem cells* 26, 1496-1505.

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230-1234.

Chaturvedi, C.P., Hosey, A.M., Pali, C., Perez-Iratxeta, C., Nakatani, Y., Ranish, J.A., Dilworth, F.J., and Brand, M. (2009). Dual role for the methyltransferase G9a in the maintenance of beta-globin gene transcription in adult erythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 18303-18308.

Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Developmental cell* 10, 615-624.

Chen, Y., Amende, I., Hampton, T.G., Yang, Y., Ke, Q., Min, J.Y., Xiao, Y.F., and Morgan, J.P. (2006). Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291, H1653-1658.

Cho, Y.W., Hong, T., Hong, S., Guo, H., Yu, H., Kim, D., Guszczynski, T., Dressler, G.R., Copeland, T.D., Kalkum, M., et al. (2007). PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *The Journal of biological chemistry* 282, 20395-20406.

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725-732.

Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell* 128, 1063-1076.

Chung, Y.S., Zhang, W.J., Arentson, E., Kingsley, P.D., Palis, J., and Choi, K. (2002). Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* 129, 5511-5520.

Claus, R., Plass, C., Armstrong, S.A., and Bullinger, L. (2010). DNA methylation profiling in acute myeloid leukemia: from recent technological advances to biological and clinical insights. *Future oncology* 6, 1415-1431.

Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., and Helin, K. (2008). Erasing the methyl mark: histone demethylases at

the center of cellular differentiation and disease. *Genes & development* 22, 1115-1140.

Conti, L., and Cattaneo, E. (2010). Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature reviews Neuroscience* 11, 176-187.

Costa, G., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2012). Origin of blood cells and HSC production in the embryo. *Trends in immunology* 33, 215-223.

Cui, K., Zang, C., Roh, T.Y., Schones, D.E., Childs, R.W., Peng, W., and Zhao, K. (2009). Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell stem cell* 4, 80-93.

Cui, L., Johkura, K., Yue, F., Ogiwara, N., Okouchi, Y., Asanuma, K., and Sasaki, K. (2004). Spatial distribution and initial changes of SSEA-1 and other cell adhesion-related molecules on mouse embryonic stem cells before and during differentiation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 52, 1447-1457.

Cumano, A., Ferraz, J.C., Klaine, M., Di Santo, J.P., and Godin, I. (2001). Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15, 477-485.

Dahl, J.A., and Collas, P. (2009). MicroChIP: chromatin immunoprecipitation for small cell numbers. *Methods in molecular biology* 567, 59-74.

Dalgliesh, G.L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., Davies, H., Edkins, S., Hardy, C., Latimer, C., et al. (2010). Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* 463, 360-363.

De Santa, F., Totaro, M.G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G., and Natoli, G. (2007). The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 130, 1083-1094.

Deans, R.J., and Moseley, A.B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology* 28, 875-884.

Denissov, S., Hofemeister, H., Marks, H., Kranz, A., Ciotta, G., Singh, S., Anastassiadis, K., Stunnenberg, H.G., and Stewart, A.F. (2014). Mll2 is required for H3K4 trimethylation on bivalent promoters in embryonic stem cells, whereas Mll1 is redundant. *Development* 141, 526-537.

Desbaillets, I., Ziegler, U., Groscurth, P., and Gassmann, M. (2000). Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Experimental physiology* 85, 645-651.

Di Croce, L., and Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature structural & molecular biology* 20, 1147-1155.

Dou, Y., Milne, T.A., Ruthenburg, A.J., Lee, S., Lee, J.W., Verdine, G.L., Allis, C.D., and Roeder, R.G. (2006). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nature structural & molecular biology* 13, 713-719.

D'Souza, S.L., Elefanty, A.G., and Keller, G. (2005). SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood* 105, 3862-3870.

Efroni, S., Duttagupta, R., Cheng, J., Dehghani, H., Hoepfner, D.J., Dash, C., Bazett-Jones, D.P., Le Grice, S., McKay, R.D., Buetow, K.H., et al. (2008). Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell stem cell* 2, 437-447.

- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W.J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W.L., Orkin, S., Choi, K., and Rossant, J. (2003). Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes & development* 17, 380-393.
- Ernst, P., Fisher, J.K., Avery, W., Wade, S., Foy, D., and Korsmeyer, S.J. (2004). Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Developmental cell* 6, 437-443.
- Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., et al. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature genetics* 42, 722-726.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C.X., Porcher, C., Orkin, S., and Choi, K. (2000). Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 127, 1931-1941.
- Fehling, H.J., Lacaud, G., Kubo, A., Kennedy, M., Robertson, S., Keller, G., and Kouskoff, V. (2003). Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 130, 4217-4227.
- Francis, N.J., Follmer, N.E., Simon, M.D., Aghia, G., and Butler, J.D. (2009). Polycomb proteins remain bound to chromatin and DNA during DNA replication in vitro. *Cell* 137, 110-122.
- Franke, W.W., Scheer, U., Zentgraf, H., Trendelenburg, M.F., Muller, U., Krohne, G., and Spring, H. (1980). Organization of transcribed and nontranscribed chromatin. *Results and problems in cell differentiation* 11, 15-36.
- Fujimoto, T., Ogawa, M., Minegishi, N., Yoshida, H., Yokomizo, T., Yamamoto, M., and Nishikawa, S. (2001). Step-wise divergence of primitive and definitive haematopoietic and endothelial cell lineages during embryonic stem cell differentiation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 6, 1113-1127.
- Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., and Reinberg, D. (2012). PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Molecular cell* 45, 344-356.
- Gifford, C.A., Ziller, M.J., Gu, H., Trapnell, C., Donaghey, J., Tsankov, A., Shalek, A.K., Kelley, D.R., Shishkin, A.A., Issner, R., et al. (2013). Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell* 153, 1149-1163.
- Graf, T., and Stadtfeld, M. (2008). Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell stem cell* 3, 480-483.
- Graves, J.A. (1995). The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes--an evolving understanding. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 17, 311-320.
- Greenfield, A., Carrel, L., Pennisi, D., Philippe, C., Quaderi, N., Siggers, P., Steiner, K., Tam, P.P., Monaco, A.P., Willard, H.F., et al. (1998). The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Human molecular genetics* 7, 737-742.
- Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., Gao, S., Wu, R., Chen, C., Li, X., Zhou, L., et al. (2011). Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature genetics* 43, 875-878.
- Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., et al. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell stem cell* 5, 597-609.

- Hansen, K.H., Bracken, A.P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S.S., Monrad, A., Rappsilber, J., Lerdrup, M., and Helin, K. (2008). A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nature cell biology* 10, 1291-1300.
- Hayashi, K., Lopes, S.M., Tang, F., and Surani, M.A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell stem cell* 3, 391-401.
- Hemming, S., Cakouros, D., Isenmann, S., Cooper, L., Menicanin, D., Zannettino, A., and Gronthos, S. (2014). EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. *Stem cells* 32, 802-815.
- Herz, H.M., Madden, L.D., Chen, Z., Bolduc, C., Buff, E., Gupta, R., Davuluri, R., Shilatifard, A., Hariharan, I.K., and Bergmann, A. (2010). The H3K27me3 demethylase dUTX is a suppressor of Notch- and Rb-dependent tumors in *Drosophila*. *Molecular and cellular biology* 30, 2485-2497.
- Herz, H.M., Mohan, M., Garruss, A.S., Liang, K., Takahashi, Y.H., Mickey, K., Voets, O., Verrijzer, C.P., and Shilatifard, A. (2012). Enhancer-associated H3K4 monomethylation by Trithorax-related, the *Drosophila* homolog of mammalian Mll3/Mll4. *Genes & development* 26, 2604-2620.
- Hong, S., Cho, Y.W., Yu, L.R., Yu, H., Veenstra, T.D., and Ge, K. (2007). Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18439-18444.
- Hu, D., Garruss, A.S., Gao, X., Morgan, M.A., Cook, M., Smith, E.R., and Shilatifard, A. (2013). The Mll2 branch of the COMPASS family regulates bivalent promoters in mouse embryonic stem cells. *Nature structural & molecular biology* 20, 1093-1097.
- Hu, X., Li, X., Valverde, K., Fu, X., Noguchi, C., Qiu, Y., and Huang, S. (2009). LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 10141-10146.
- Huang, C., Xiang, Y., Wang, Y., Li, X., Xu, L., Zhu, Z., Zhang, T., Zhu, Q., Zhang, K., Jing, N., et al. (2010). Dual-specificity histone demethylase KIAA1718 (KDM7A) regulates neural differentiation through FGF4. *Cell research* 20, 154-165.
- Huber, T.L., Kouskoff, V., Fehling, H.J., Palis, J., and Keller, G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432, 625-630.
- Issaeva, I., Zonis, Y., Rozovskaia, T., Orlovsky, K., Croce, C.M., Nakamura, T., Mazo, A., Eisenbach, L., and Canaani, E. (2007). Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. *Molecular and cellular biology* 27, 1889-1903.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., and Lemischka, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442, 533-538.
- Iwase, S., Lan, F., Bayliss, P., de la Torre-Ubieta, L., Huarte, M., Qi, H.H., Whetstine, J.R., Bonni, A., Roberts, T.M., and Shi, Y. (2007). The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell* 128, 1077-1088.
- Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A., and Dieterlen-Lievre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 125, 4575-4583.

- Jaks, V., Kasper, M., and Toftgard, R. (2010). The hair follicle-a stem cell zoo. *Experimental cell research* 316, 1422-1428.
- Jankowska, A.M., Makishima, H., Tiu, R.V., Szpurka, H., Huang, Y., Traina, F., Visconte, V., Sugimoto, Y., Prince, C., O'Keefe, C., et al. (2011). Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood* 118, 3932-3941.
- Jepsen, K., Solum, D., Zhou, T., McEvelly, R.J., Kim, H.J., Glass, C.K., Hermanson, O., and Rosenfeld, M.G. (2007). SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. *Nature* 450, 415-419.
- Jiang, W., Wang, J., and Zhang, Y. (2013). Histone H3K27me3 demethylases KDM6A and KDM6B modulate definitive endoderm differentiation from human ESCs by regulating WNT signaling pathway. *Cell research* 23, 122-130.
- Jin, C., Li, J., Green, C.D., Yu, X., Tang, X., Han, D., Xian, B., Wang, D., Huang, X., Cao, X., et al. (2011). Histone demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* life span by targeting the insulin/IGF-1 signaling pathway. *Cell metabolism* 14, 161-172.
- Jude, C.D., Gaudet, J.J., Speck, N.A., and Ernst, P. (2008). Leukemia and hematopoietic stem cells: balancing proliferation and quiescence. *Cell cycle* 7, 586-591.
- Kabrun, N., Buhring, H.J., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W., and Keller, G. (1997). Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 124, 2039-2048.
- Kato, Y., and Tsunoda, Y. (1993). Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. *Molecular reproduction and development* 36, 276-278.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T., and Wiles, M.V. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Molecular and cellular biology* 13, 473-486.
- Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N., and Keller, G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488-493.
- King, T., Beddington, R.S., and Brown, N.A. (1998). The role of the brachyury gene in heart development and left-right specification in the mouse. *Mechanisms of development* 79, 29-37.
- Klose, R.J., Yan, Q., Tothova, Z., Yamane, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Gilliland, D.G., Zhang, Y., and Kaelin, W.G., Jr. (2007). The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell* 128, 889-900.
- Kogan, S.C., Ward, J.M., Anver, M.R., Berman, J.J., Brayton, C., Cardiff, R.D., Carter, J.S., de Coronado, S., Downing, J.R., Fredrickson, T.N., et al. (2002). Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood* 100, 238-245.
- Kooreman, N.G., and Wu, J.C. (2010). Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 7 Suppl 6, S753-763.
- Kruidenier, L., Chung, C.W., Cheng, Z., Liddle, J., Che, K., Joberty, G., Bantscheff, M., Bountra, C., Bridges, A., Diallo, H., et al. (2012). A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* 488, 404-408.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.

- Lacaud, G., Gore, L., Kennedy, M., Kouskoff, V., Kingsley, P., Hogan, C., Carlsson, L., Speck, N., Palis, J., and Keller, G. (2002). Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro. *Blood* 100, 458-466.
- Lan, F., Bayliss, P.E., Rinn, J.L., Whetstone, J.R., Wang, J.K., Chen, S., Iwase, S., Alpatov, R., Issaeva, I., Canaani, E., et al. (2007). A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* 449, 689-694.
- Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457, 892-895.
- Lee, J.H., Hart, S.R., and Skalnik, D.G. (2004). Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis* 38, 32-38.
- Lee, M.G., Norman, J., Shilatifard, A., and Shiekhattar, R. (2007). Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and Ring6a/MBLR, a polycomb-like protein. *Cell* 128, 877-887.
- Lee, M.G., Villa, R., Trojer, P., Norman, J., Yan, K.P., Reinberg, D., Di Croce, L., and Shiekhattar, R. (2007). Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* 318, 447-450.
- Lee, S., Lee, J.W., and Lee, S.K. (2012). UTX, a histone H3-lysine 27 demethylase, acts as a critical switch to activate the cardiac developmental program. *Developmental cell* 22, 25-37.
- Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., et al. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125, 301-313.
- Linder, C.C. (2006). Genetic variables that influence phenotype. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 47, 132-140.
- Liu, J., Mercher, T., Scholl, C., Brumme, K., Gilliland, D.G., and Zhu, N. (2012). A functional role for the histone demethylase UTX in normal and malignant hematopoietic cells. *Experimental hematology* 40, 487-498 e483.
- Loenarz, C., Ge, W., Coleman, M.L., Rose, N.R., Cooper, C.D., Klose, R.J., Ratcliffe, P.J., and Schofield, C.J. (2010). PHF8, a gene associated with cleft lip/palate and mental retardation, encodes for an Nepsilon-dimethyl lysine demethylase. *Human molecular genetics* 19, 217-222.
- Loh, K.M., and Lim, B. (2011). A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers. *Cell stem cell* 8, 363-369.
- Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature genetics* 38, 431-440.
- Loh, Y.H., Zhang, W., Chen, X., George, J., and Ng, H.H. (2007). Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes & development* 21, 2545-2557.
- Lohr, J.G., Stojanov, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Chapuy, B., Sougnez, C., Cruz-Gordillo, P., Knoechel, B., Asmann, Y.W., Slager, S.L., et al. (2012). Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 3879-3884.
- Lubitz, S., Glaser, S., Schaft, J., Stewart, A.F., and Anastassiadis, K. (2007). Increased apoptosis and skewed differentiation in mouse embryonic stem cells lacking the histone methyltransferase Mll2. *Molecular biology of*

the cell 18, 2356-2366.

Lugus, J.J., Park, C., Ma, Y.D., and Choi, K. (2009). Both primitive and definitive blood cells are derived from Flk-1+ mesoderm. *Blood* 113, 563-566.

Mansour, A.A., Gafni, O., Weinberger, L., Zviran, A., Ayyash, M., Rais, Y., Krupalnik, V., Zerbib, M., Amann-Zalcenstein, D., Maza, I., et al. (2012). The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* 488, 409-413.

Mar, B.G., Bullinger, L., Basu, E., Schlis, K., Silverman, L.B., Dohner, K., and Armstrong, S.A. (2012). Sequencing histone-modifying enzymes identifies UTX mutations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26, 1881-1883.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-349.

Marks, H., Kalkan, T., Menafrá, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A.F., Smith, A., et al. (2012). The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149, 590-604.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7634-7638.

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature cell biology* 9, 625-635.

Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *The EMBO journal* 18, 4261-4269.

Maures, T.J., Greer, E.L., Hauswirth, A.G., and Brunet, A. (2011). The H3K27 demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* lifespan in a germline-independent, insulin-dependent manner. *Aging cell* 10, 980-990.

Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.

Medvinsky, A.L., Samoylina, N.L., Muller, A.M., and Dzierzak, E.A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-67.

Meshorer, E., and Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 540-546.

Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P.J., Brown, D.T., and Misteli, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Developmental cell* 10, 105-116.

Metcalf, D.a.M., M. (1971). (North-Holland, Amsterdam).

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553-560.

Mikkola, H.K., Fujiwara, Y., Schlaeger, T.M., Traver, D., and Orkin, S.H. (2003). Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood* 101, 508-516.

- Miller, S.A., Mohn, S.E., and Weinmann, A.S. (2010). Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Molecular cell* 40, 594-605.
- Mitsiadis, T.A., Barrandon, O., Rochat, A., Barrandon, Y., and De Bari, C. (2007). Stem cell niches in mammals. *Experimental cell research* 313, 3377-3385.
- Mochizuki-Kashio, M., Mishima, Y., Miyagi, S., Negishi, M., Saraya, A., Konuma, T., Shinga, J., Koseki, H., and Iwama, A. (2011). Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood* 118, 6553-6561.
- Moignard, V., Woodhouse, S., Fisher, J., and Gottgens, B. (2013). Transcriptional hierarchies regulating early blood cell development. *Blood cells, molecules & diseases* 51, 239-247.
- Montgomery, N.D., Yee, D., Chen, A., Kalantry, S., Chamberlain, S.J., Otte, A.P., and Magnuson, T. (2005). The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation. *Current biology : CB* 15, 942-947.
- Morales Torres, C., Laugesen, A., and Helin, K. (2013). Utx is required for proper induction of ectoderm and mesoderm during differentiation of embryonic stem cells. *PloS one* 8, e60020.
- Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature genetics* 42, 181-185.
- Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.
- Muller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.
- Murry, C.E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132, 661-680.
- Neff, T., and Armstrong, S.A. (2009). Chromatin maps, histone modifications and leukemia. *Leukemia* 23, 1243-1251.
- Nichols, J., and Smith, A. (2012). Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a008128.
- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H., and Katsura, Y. (1998). In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 8, 761-769.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & development* 12, 2048-2060.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* 24, 372-376.
- North, T.E., de Bruijn, M.F., Stacy, T., Talebian, L., Lind, E., Robin, C., Binder, M., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2002). Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* 16, 661-672.
- Oh, I.H., and Kwon, K.R. (2010). Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. *Stem cells* 28, 1243-1249.

- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Pajerowski, J.D., Dahl, K.N., Zhong, F.L., Sammak, P.J., and Discher, D.E. (2007). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15619-15624.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073-5084.
- Pasini, D., Hansen, K.H., Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., and Helin, K. (2008). Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. *Genes & development* 22, 1345-1355.
- Pauler, F.M., Sloane, M.A., Huang, R., Regha, K., Koerner, M.V., Tamir, I., Sommer, A., Aszodi, A., Jenuwein, T., and Barlow, D.P. (2009). H3K27me3 forms BLOCs over silent genes and intergenic regions and specifies a histone banding pattern on a mouse autosomal chromosome. *Genome research* 19, 221-233.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Johnston, D.M., Hodgson, J.W., Black, K.L., Kovermann, S.K., Beck, S., Canaani, E., Brock, H.W., and Mazo, A. (2012). TrxG and PcG proteins but not methylated histones remain associated with DNA through replication. *Cell* 150, 922-933.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.
- Raaijmakers, M.H., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J.A., Ebert, B.L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R.P., Scadden, E.O., et al. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 464, 852-857.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Roh, T.Y., Cuddapah, S., Cui, K., and Zhao, K. (2006). The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15782-15787.
- Roloff, T.C., and Nuber, U.A. (2005). Chromatin, epigenetics and stem cells. *European journal of cell biology* 84, 123-135.
- Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schafer, C., Phalke, S., Walther, M., Schmidt, A., Jenuwein, T., et al. (2007). Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Molecular cell* 26, 103-115.
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., and Riggs, A.D. (1996). *Epigenetic mechanisms of gene regulation* (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sabin, F.R. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Embryology* 9, 213-262.
- Saleque, S., Kim, J., Rooke, H.M., and Orkin, S.H. (2007). Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Molecular cell* 27, 562-572.

- Sauvageau, M., and Sauvageau, G. (2010). Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell stem cell* 7, 299-313.
- Schroeder, T. (2010). Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior. *Cell stem cell* 6, 203-207.
- Seenundun, S., Rampalli, S., Liu, Q.C., Aziz, A., Pali, C., Hong, S., Blais, A., Brand, M., Ge, K., and Dilworth, F.J. (2010). UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *The EMBO journal* 29, 1401-1411.
- Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 2, 640-653.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981-990.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shaw, T., and Martin, P. (2009). Epigenetic reprogramming during wound healing: loss of polycomb-mediated silencing may enable upregulation of repair genes. *EMBO reports* 10, 881-886.
- Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.C., and Orkin, S.H. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Molecular cell* 32, 491-502.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13225-13230.
- Shpargel, K.B., Sengoku, T., Yokoyama, S., and Magnuson, T. (2012). UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. *PLoS genetics* 8, e1002964.
- Shpargel, K.B., Starmer, J., Yee, D., Pohlars, M., and Magnuson, T. (2014). KDM6 Demethylase Independent Loss of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation during Early Embryonic Development. *PLoS genetics* 10, e1004507.
- Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2013). Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. *Molecular cell* 49, 808-824.
- Simon, M.C., Pevny, L., Wiles, M.V., Keller, G., Costantini, F., and Orkin, S.H. (1992). Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nature genetics* 1, 92-98.
- Sroczyńska, P., Lancrin, C., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2009). The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic hematopoiesis. *Blood* 114, 5279-5289.
- Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G., and Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nature cell biology* 9, 1428-1435.
- Strumpf, D., Mao, C.A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132, 2093-2102.

- Su, S.T., Ying, H.Y., Chiu, Y.K., Lin, F.R., Chen, M.Y., and Lin, K.I. (2009). Involvement of histone demethylase LSD1 in Blimp-1-mediated gene repression during plasma cell differentiation. *Molecular and cellular biology* 29, 1421-1431.
- Suman, P., Malhotra, S.S., and Gupta, S.K. (2013). LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *Jak-Stat* 2, e25155.
- Surface, L.E., Thornton, S.R., and Boyer, L.A. (2010). Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. *Cell stem cell* 7, 288-298.
- Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J.C. (2006). Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10294-10299.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi, S., Komeno, T., Suwabe, N., Yoh, K., Nakajima, O., Nishimura, S., Kuroha, T., Nagasawa, T., and Yamamoto, M. (1998). Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroid and megakaryocytic cells in vivo. *Blood* 92, 434-442.
- Tang, L., Nogales, E., and Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Progress in biophysics and molecular biology* 102, 122-128.
- Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H., et al. (2012). RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* 148, 664-678.
- Testa, G., Schaft, J., van der Hoeven, F., Glaser, S., Anastassiadis, K., Zhang, Y., Hermann, T., Stremmel, W., and Stewart, A.F. (2004). A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles. *Genesis* 38, 151-158.
- Thieme, S., Gyarmas, T., Richter, C., Ozhan, G., Fu, J., Alexopoulou, D., Muders, M.H., Michalk, I., Jakob, C., Dahl, A., et al. (2013). The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. *Blood* 121, 2462-2473.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7844-7848.
- Tie, F., Banerjee, R., Conrad, P.A., Scacheri, P.C., and Harte, P.J. (2012). Histone demethylase UTX and chromatin remodeler BRM bind directly to CBP and modulate acetylation of histone H3 lysine 27. *Mol Cell Biol* 32, 2323-2334.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.
- Tsukada, Y., Ishitani, T., and Nakayama, K.I. (2010). KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes & development* 24, 432-437.

- Van der Meulen, J., Speleman, F., and Van Vlierberghe, P. (2014). The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 9, 658-668.
- van Haafden, G., Dalglish, G.L., Davies, H., Chen, L., Bignell, G., Greenman, C., Edkins, S., Hardy, C., O'Meara, S., Teague, J., et al. (2009). Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nature genetics* 41, 521-523.
- Vittet, D., Prandini, M.H., Berthier, R., Schweitzer, A., Martin-Sisteron, H., Uzan, G., and Dejana, E. (1996). Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 88, 3424-3431.
- Voog, J., and Jones, D.L. (2010). Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell stem cell* 6, 103-115.
- Walport, L.J., Hopkinson, R.J., Vollmar, M., Madden, S.K., Gileadi, C., Oppermann, U., Schofield, C.J., and Johansson, C. (2014). Human UTY(KDM6C) Is a Male-specific N-Methyl Lysyl Demethylase. *The Journal of biological chemistry* 289, 18302-18313.
- Wang, A.H., Zare, H., Mousavi, K., Wang, C., Moravec, C.E., Sirotkin, H.I., Ge, K., Gutierrez-Cruz, G., and Sartorelli, V. (2013). The histone chaperone Spt6 coordinates histone H3K27 demethylation and myogenesis. *The EMBO journal* 32, 1075-1086.
- Wang, C., Lee, J.E., Cho, Y.W., Xiao, Y., Jin, Q., Liu, C., and Ge, K. (2012). UTX regulates mesoderm differentiation of embryonic stem cells independent of H3K27 demethylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 15324-15329.
- Wang, J., Hevi, S., Kurash, J.K., Lei, H., Gay, F., Bajko, J., Su, H., Sun, W., Chang, H., Xu, G., et al. (2009). The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nature genetics* 41, 125-129.
- Wang, J., Scully, K., Zhu, X., Cai, L., Zhang, J., Prefontaine, G.G., Kronen, A., Ohgi, K.A., Zhu, P., Garcia-Bassets, I., et al. (2007). Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 446, 882-887.
- Wang, J.K., Tsai, M.C., Poulin, G., Adler, A.S., Chen, S., Liu, H., Shi, Y., and Chang, H.Y. (2010). The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control. *Genes & development* 24, 327-332.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H., and Speck, N.A. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3444-3449.
- Weiss, M.J., Keller, G., and Orkin, S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes & development* 8, 1184-1197.
- Welstead, G.G., Creyghton, M.P., Bilodeau, S., Cheng, A.W., Markoulaki, S., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2012). X-linked H3K27me3 demethylase Utx is required for embryonic development in a sex-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 13004-13009.
- Wen, B., Wu, H., Shinkai, Y., Irizarry, R.A., and Feinberg, A.P. (2009). Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nature genetics* 41, 246-250.
- Wiblin, A.E., Cui, W., Clark, A.J., and Bickmore, W.A. (2005). Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells. *Journal of cell science* 118, 3861-3868.
- Wilson, V., and Conlon, F.L. (2002). The T-box family. *Genome biology* 3, REVIEWS3008.

- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., et al. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86-90.
- Xie, H., Xu, J., Hsu, J.H., Nguyen, M., Fujiwara, Y., Peng, C., and Orkin, S.H. (2014). Polycomb repressive complex 2 regulates normal hematopoietic stem cell function in a developmental-stage-specific manner. *Cell stem cell* 14, 68-80.
- Yamaguchi, T.P., Dumont, D.J., Conlon, R.A., Breitman, M.L., and Rossant, J. (1993). *flk-1*, an *flt*-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118, 489-498.
- Yokomizo, T., Takahashi, S., Mochizuki, N., Kuroha, T., Ema, M., Wakamatsu, A., Shimizu, R., Ohneda, O., Osato, M., Okada, H., et al. (2007). Characterization of GATA-1(+) hemangioblastic cells in the mouse embryo. *The EMBO journal* 26, 184-196.
- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., et al. (2012). The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481, 157-163.
- Zhou, W., Chen, H., and Zhang, L. (2009). The PcG protein hPc2 interacts with the N-terminus of histone demethylase JARID1B and acts as a transcriptional co-repressor. *BMB reports* 42, 154-159.
- Zhou, Y., Kim, J., Yuan, X., and Braun, T. (2011). Epigenetic modifications of stem cells: a paradigm for the control of cardiac progenitor cells. *Circulation research* 109, 1067-1081.

9 AFFIDAVIT

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Analyse der Histon-Demethylase UTX in hämatopoetisch differenzierenden murinen ES-Zellen“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, mit Ausnahme der in Kollaboration durchgeführten Analysen (siehe nächste Seite).

Ich erkläre, dass ich diese Dissertation bisher oder gleichzeitig keiner anderen Prüfungsbehörde unter Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Justyna Kampka

Ort, Datum.....Unterschrift

Hiermit wird bestätigt, dass Justyna Kampka, selbständig folgende Tätigkeiten und Experimente ihrer Doktorarbeit durchgeführt hat:

ES-Zell-Kultur, RNA-Isolierung, DNA-Isolierung, Zellzyklus-Verteilung, Elektroporation, LacZ-Färbungen, ES-Zell-Differenzierung, MACS-Zell-Separierung, Isolierung primärer Mauszellen, Bakterienkultur und Maxipräparation, Genexpressionsanalysen (qRT-PCR), Western Blot-Analysen, FACS-Analysen, Alkaline Comet Assay, ChIP-Analysen, Cytospin, HE-Färbungen, Koordinierung von Verpaarungen und Genotypisierung verwendeter Maus-Linien.

Abb. 5.8B: Für die endodermale, mesodermale und ektodermale ES-Zell-Differenzierung wurden wt und UTX^{hyp/Y} ES-Zellen von Justyna Kampka kultiviert, eingefroren und verschickt. Die ES-Zellen wurden durch Michele Boiani (MPI Münster) differenziert, Immunfärbungen durchgeführt und fotografiert.

Abb. 5.10: Für Teratom-Assays wurden wt und UTX^{hyp/Y} ES-Zellen von Justyna Kampka kultiviert, eingefroren und verschickt. Die Injektion der ES-Zellen in NOD scid-Mäuse sowie die Entfernung und Fixierung der Teratome erfolgte durch Michele Boiani (MPI Münster). Die Paraffin-Einbettung und das Schneiden der Teratome wurde von Mitarbeitern der Neuropathologie (Institut für Pathologie, Uni Würzburg) durchgeführt.

Justyna Kampka

Ort, Datum Würzburg, 17.10.14 Unterschrift J. Kampka

Prof. Dr. Albrecht M. Müller

Ort, Datum Würzburg, 17.10.14 Unterschrift AM Müller

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Albrecht Müller und Dr. Matthias Becker bedanken, die mir die Möglichkeit gaben, diese Arbeit durchzuführen. Vielen Dank für eure wissenschaftliche Betreuung, hilfreiche Ratschläge und Unterstützung während der gesamten Zeit!

Bei meinem zweiten Betreuer Prof. Dr. Ricardo Benavente bedanke ich mich für die großzügige Bereitschaft, die Zweitkorrektur dieser Dissertation zu übernehmen.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen und ehemaligen Kollegen der AG Müller für eine gute Zusammenarbeit sowie die stets freundliche und aufrichtige Unterstützung. Ein großes Dankeschön gilt insbesondere Vroni für ihre Hilfsbereitschaft und Linda für alles andere.

Dieses Projekt wurde von der DFG/SPP1463 gefördert. Deswegen danke ich der DFG für die finanzielle Unterstützung und für hilfreiche wissenschaftliche Veranstaltungen.

Im Besonderen bedanke ich mich bei meinen Eltern, Bogumila und Karl, und meiner Schwester, Marcelina, denen ich gar nicht genug für die liebevolle Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken kann. Ihr seid die Besten. Danke!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen lieben Burschen und Daniel für ihre Freundschaft bedanken und dafür, dass sie während der Doktorarbeit immer für mich da waren.

PUBLIKATIONSLISTE

Christine Hofstetter, **Justyna M. Kampka**, Heike Weber, Albrecht M. Müller, and Matthias Becker (2014). Inhibition of H3K27-specific demethylase activity during murine ES cell differentiation induces DNA damage. (Eingereicht)

Poster-Präsentationen

Xiaoli Li, Nadine Obier, **Justyna Kampka**, Matthias Becker, Michael Meisterernst, Albrecht Müller. *Functional analyses and chromatin studies of ES cell pluripotency by reversible knockdown of Bmi1 paralog Pcgf6*. Kompetenznetzwerk Stammzellforschung NRW – 6th International Meeting, Essen 2011.

Justyna Kampka, Christine Hofstetter, Sebastian Serfling, Michele Boiani, Matthias Becker and Albrecht M. Müller. *Functional analysis of the histone demethylases KDM6A and 6B in differentiating murine ESCs*. International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden 2012.

Christine Hofstetter, **Justyna Kampka**, Albrecht Müller, Matthias Becker. *Functional analysis of histone demethylases during hematopoietic development*. Kompetenznetzwerk Stammzellforschung NRW – 7th International Meeting, Köln 2013.

Justyna M. Kampka, Christine Hofstetter, Matthias Becker, Albrecht M. Müller. *Functional analysis of the histone demethylases KDM6A and KDM6B in differentiating murine ESCs*. GSCN Conference, Berlin 2013.

Matthias Becker, Christine Hofstetter, **Justyna Kampka**, Claus-Jürgen Scholz, Albrecht M. Müller. *Inhibition of H3K27-specific demethylase activity during murine ES cell differentiation induces DNA damage response*. 30th Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine, Köln 2014.