

**Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ)  
im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM)  
der Universität Würzburg  
Professor Dr. A. Müller**

**Titel**

**Funktion der Histon-Demethylase Kdm6a  
während der Teratombildung**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Sebastian Serfling**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Dezember 2015**

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuclease
DNA	Desoxyribonucleid acid
h	Stunde(n)
H & E	Hämatoxylin-Eosin Färbungen
iPS	Induzierte pluripotente Stammzelle
kb	Kilobase
KO	Knockdown
KD	Knockout
l	Liter
mAK	monoklonaler Antikörper
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute(n)
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PTM	Postrtranslationale Modifikation
Nc	Nichtcodierend
RT-PCR	Real-Time-Polymerase Kettenreaktion
sec	Sekunde(n)
SSC	Salin-Sodium Ziträt
SSEA-1	stage-specific embryonic antigen -1
rTdT	Rekombinante Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
WT	Wildtyp
µl	Mikroliter

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Pluripotenz .....	1
1.2 Teratome .....	2
1.3 Chromatin.....	3
1.4 Die Histon-Demethylase Kdm6a .....	8
1.5 Ziel und Aufgabenstellung der Arbeit.....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Material: Zellen und Mäuse zur Teratombildung .....	11
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Histochemische Färbungen .....	13
2.2.1.1 H & E Färbungen von Gefrierschnitten .....	13
2.2.1.2 Immunhistochemische Färbungen PCNA/SSEA-1 .....	13
2.2.1.3 Darstellung apoptotischer Zellen durch TUNEL-Färbung.....	14
2.2.1.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen .....	15
2.2.2 RNA-Isolierungen .....	16
2.2.3 Elektrophoretische Trennungen der RNA und RNA-Qualität ...	16
2.2.4 cDNA-Synthese.....	18
2.3 Real-Time PCR Assays.....	19
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
3.1 Histologie der Teratome.....	22
3.2 Frequenz apoptotischer Zellen innerhalb der Teratome.....	25
3.3 Proliferation von ES-Zellen innerhalb der Teratome.....	26
3.4 Expression von Pluripotenzmarkern .....	29
3.5 Expressionsanalyse entwicklungsspezifischer Indikatorgene mittels quantitativer Real-Time PCR Assays .....	32
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	36
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>37</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>41</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>44</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## 1. Einleitung

### 1.1 Pluripotenz

Pluripotente Zellen aus Maus und Mensch sind wichtige Zelltypen für die Grundlagenforschung und zukünftige regenerative Ansätze. Pluripotenz bedeutet „zu vielem mächtig“. Pluripotente Zellen haben die Fähigkeit, sich in Zellen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) zu differenzieren. Spezielle Zellen des Prä-Implantationsembryos, davon abgeleitete ESCs, sowie aus Reprogrammierungsansätzen gewonnene induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) besitzen pluripotente Eigenschaften. Pluripotente Stammzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich *in vitro* unbegrenzt erneuern und in fast alle Zelltypen des Organismus entwickeln können. Durch eine kleine Zahl von Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren werden pluripotente Stammzellen in einem "naiven Zustand" gehalten.

Es ist möglich, differenzierte Gewebezellen durch die „erzwungene“ (Über-) Expression von vier TFs, nämlich von Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc, zurück in den pluripotenten Zustand zu reprogrammieren. Dadurch gelingt die Herstellung von iPS-Zellen, die sehr ähnlich zu embryonalen Stammzellen (ESC) sind (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Eine Methode, die Pluripotenz von ES-Zelllinien nachzuweisen, ist die subkutane Injektion von ES-Zellen in eine immunsupprimierte Maus. Falls die Zellen pluripotent sind, bilden sich nach einiger Zeit benigne Tumorteratome, die Gewebe aller drei Keimblätter enthalten.

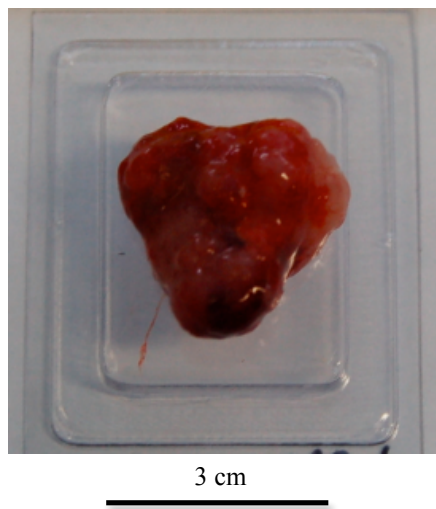
Um die Pluripotenz von Zellen zweifelsfrei nachzuweisen, müssen spezielle Marker (wie Oct4) nachgewiesen werden, deren Expression in ausdifferenzierten Zellen abgeschaltet ist. Des Weiteren sollte die Differenzierung der iPS-Zellen *in vitro*, spontan oder induziert, zur Bildung von Zelltypen der drei Keimblätter führen.

## 1.2 Teratome

Ein Teratom ist ein Keimzelltumor, der Zellen aller drei Keimblätter - des Ektoderms (das Haut und Nerven bildet), Endoderms (für Darm und Leber) und Mesoderms (für Muskel und Knorpel) - enthält (Abb. 1.1). Man unterscheidet zwischen reifen und unreifen Teratomen (Terenziani et al., 2015). Reife Teratome können jegliche Art von Geweben, wie z.B. Haare, Zähne und Haut, enthalten. Die häufigsten Orte zur Bildung natürlicher Teratome sind das Ovar und der Hoden. Seltener entstehen Teratome im zentralen Nervensystem, Darm, Pankreas oder im Retroperitonealraum. Unreife Teratome enthalten wenig differenziertes epitheliales oder mesenchymales Gewebe. Die Pluripotenz von Stammzellen *in vivo* kann, wie oben bereits erwähnt wurde, durch Teratom-Assays nachgewiesen werden (Bustamante-Marin, Garness, & Capel, 2013). Dafür injiziert man die zu testende Zellpopulation subkutan in Mäuse, in denen sie differenzieren und reifen können. Nach einiger Zeit bilden die Stammzellen an dem injizierten Ort ein Teratom, welches durch viele Faktoren - wie das lokale Milieu, Hormone, Zytokine, Vaskularisierung des Gewebes und noch viele weitere unbekannte Faktoren - beeinflusst werden. Nachdem das Teratom einige Zeit in der Maus „gereift“ ist, wird die Maus getötet und das Teratom entnommen, um es für Genexpressionsanalysen, immun-histochemische Färbungen oder für histo-pathologische Analysen zu verwenden.

Für die medizinische Forschung sind die Teratom-Assays von großer Bedeutung. Es werden große Hoffnungen in die Stammzelltherapie gesetzt, indem man sich z.B. verspricht, bei Querschnittsgelähmten durchtrennte Nervenstränge mittels aus ESC-Kulturen erhaltenen Neuronen und glialen Zelltypen funktionell reparieren zu können. Jedoch sind Pluripotenz und Tumorgenität eng mit ESCs verbunden. Nicht selten bilden sich nach experimentellen „Stammzelltherapien“ in den Tiermodellen benigne Teratome (Trounson, 2011). In nicht standardisierten experimentellen Protokollen reichten allein ca. 250 pluripotente Stammzellen aus, um in immun-supprimierten Patienten Tumore entstehen zu lassen (van Haaften et al., 2009). Die Transplantationsprotokolle unterschieden sich jedoch sehr stark in der Anzahl von injizierten Zellen. In unterschiedlichen Publikation

variieren diese von 300 bis 5 Mio. Zellen (Thieme et al., 2013). Des weiteren variieren sie hinsichtlich der zu injizierenden Körperregion und auf welchen Medien die Zellen gezüchtet wurden, und in vielen weiteren Faktoren (van Haaften et al., 2009). Nach jahrelanger Forschung ist es gelungen, die ersten Stammzelltherapien in klinische Studien zu überführen (Sugita et al., 2015). Es muss jedoch vor Beginn einer jeden Stammzelltherapie sichergestellt werden, dass jede zu applizierende Stammzelle nicht mehr pluripotent ist. Stammzellen sollten schon einen gewissen Grad an Differenzierung haben, ansonsten droht die Gefahr von Krebsentstehung. Zudem wären Biomarker, welche die Zellfunktion, den Differenzierungsgrad und die Migration in vivo angeben, sehr wichtig (Goldring et al., 2011). Dazu zählen auch Marker für die Chromatinstruktur - wie z.B. DNase I hypersensitive Orte an ausgewählten Genen - und Histonmodifikationen.



**Abb.: 1.1 Bild eines frisch präparierten Maus-Teratoms**

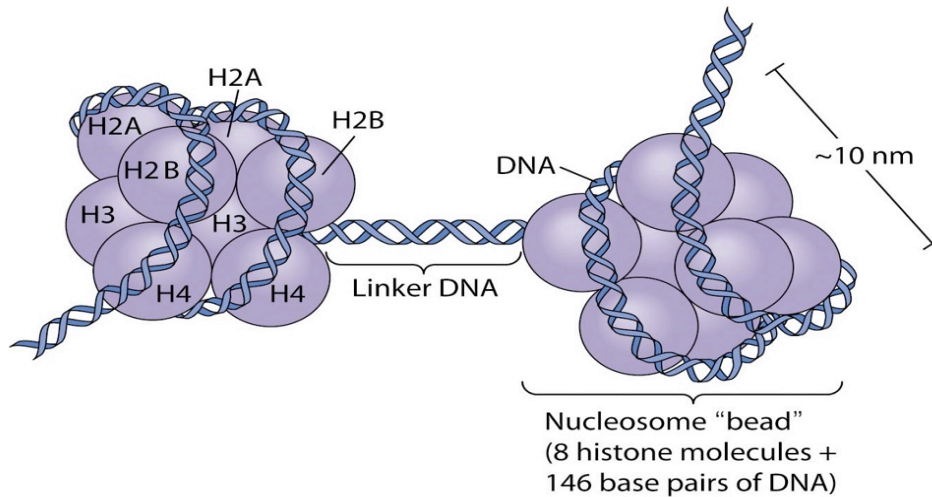
### 1.3 Chromatin

Man unterscheidet zwei Arten von Chromatin, Euchromatin und Heterochromatin. Beim Euchromatin liegt das Chromatin dekondensiert, d.h. weniger dicht gepackt, im Karyoplasma der Zelle vor (Croft et al., 1999). Dies ist der transkriptionsaktive Anteil der DNA, welcher nach dem Ende der Interphase wieder Kondensiert wird. Heterochromatin weist

sowohl in der Inter- als auch in der Metaphase den gleichen Verdichtungsgrad auf. Euchromatin ist oft im Zentrum und Heterochromatin in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert.

Nukleosomen bilden die Grundeinheit des Chromatins. Ein Nukleosom ist ein DNA-Protein-Komplex, der aus jeweils zwei Kopien der „core“ Histone H2A, H2B, H3 und H4 besteht, um den ein 147 Basenpaare langer DNA-Abschnitt 1,7 mal gewunden ist. Somit ist die DNA an der Oberfläche der Nukleosomen angeordnet und „wickelt“ diese – im gewissen Sinne - ein. Die Nukleosomen können eng gepackt vorkommen und bilden dann Fibrillen höherer Struktur, wie das transkriptionell inaktive Heterochromatin.

Histone sind sowohl an der Verpackung der DNA als auch an der Regulation der Genexpression und der Kompartimentierung des Genoms in Euchromatin und Heterochromatin maßgeblich beteiligt (Martin & Zhang, 2005). Histone sind basische Proteine, die ausschließlich im Zellkern vorkommen. Es sind fünf Histon-Proteine bekannt: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Diese Proteine lagern sich zusammen, und jeweils ein H3 und H4 Histon bilden ein H3-H4 Dimer, wie auch H2A und H2B Dimere bilden. Zwei H3-H4 Dimere bilden ein Tetramer, an das sich zwei H2A-H2B Dimere anlagern, wodurch Histon-Oktamere entstehen, die - wie bereits oben angeführt - das Grundgerüst des Nukleosoms bilden (Abb. 1.2). Das Histon H1 führt durch seine Anordnung zwischen zwei Nukleosomen zu einer weiteren Komprimierung (der sog. 30 nm-Faser) (Luger, Mader, Richmond, Sargent, & Richmond, 1997). Histone können vor allem an ihren N-terminalen Fortsätzen chemisch modifiziert werden. Die am meisten untersuchten Modifikationen sind die Methylierung und die (De-) Acetylierung. Über die Phosphorylierung und Ubiquitinierung der Histone ist weitaus weniger bekannt (Grant, 2001). Zudem gibt es noch weitere Histonmodifikationen, wie die Sumoylierung, Carboxylierung und Glycosylierung. Damit sind eine Vielzahl von molekularen Zellmechanismen wie Replikation, Transkription, DNA-Reparaturprogramme und Chromosomenkondensation assoziiert (Kouzarides, 2007)



**Abb.: 1.2 Schematische Struktur von Nucleosomen**

(Quelle: <http://www.mun.ca/biology>)

Um das Oktamer der „core“-Histone H2A, H2B, H3 und H4 ist die DNA ca. 1,7 mal gewunden. An die Linker-DNA, die zwei Nucleosomen verbindet, lagert sich Histon H1 an und führt dadurch zur Vernetzung des Chromatins.

Die Histon-Acetylierung wird durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) ausgeführt und findet an Lysinresten der Histone statt. Durch die Anfügung von Acetylgruppen kommt es zur Neutralisierung der positiven Ladung der Lysine. Dadurch wird der elektrostatische Widerstand zwischen den Lysinresten der Histone und der DNA, die negativ geladen ist, verringert. Damit wird die Struktur des Chromatins derartig verändert, dass Transkriptionsfaktoren (TF) an die DNA binden können. Die Acetylierung kann durch die Aktivität von Histon-Deacetylasen (HDACs) wieder rückgängig gemacht werden (Grant, 2001).

Acetylierte Lysinreste können für Kern-Proteine, die eine Bromodomäne aufweisen als Bindungsstelle dienen. Solche Bromodomänen bestehen aus ca. 110 Aminosäure-Resten, welche spezifisch acetylierte Lysine von Histonen erkennen. Durch diese Bromodomänen kann die Genexpression und die Modifikation von Chromation kontrolliert werden. Neuerdings konnte nachgewiesen werden, dass Bromodomänen nicht nur acetylierte



Lysinreste, sondern auch weitere Histonmodifikationsmuster erkennen können (Aziz, Liu, & Dilworth, 2010).

Im Vergleich zur Histon-Acetylierung wird bei der Histon-Methylierung die Ladung der Histone nicht verändert, sondern die Affinität gegenüber TFen sowie die Hydrophobizität und Basizität der Histone beeinflusst. Histon-Methylierungen werden durch Histon-Methyltransferasen ausgeführt. Histon-Methylierungen können an Lysin- und Arginin-Resten stattfinden. An Lysinen können bis zu drei und an Arginin-Resten bis zu zwei Methylgruppen hinzugefügt werden. Wichtige Kernproteinkomplexe, die die Methylierung von Histonen beeinflussen sind die sog. Polycomb Proteine.

Polycomb-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen. Polycomb-Proteine wurden erstmals für *Drosophila* beschrieben. Sie kontrollieren die Expression von Homeobox (Hox)-Genen, die für die Ausbildung der Körperachse von Insekten wie auch von Wirbeltieren zuständig sind (Lewis EB et al., 1978). Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur die Hox-Gene durch Polycomb-Proteine (siehe Kapitel 1.1) reguliert werden, sondern auch zahlreiche andere Gene, u.a. Gene, die für TFen kodieren (Bravo, Frank, Blundell, & Macdonald-Bravo, 1987). In Säugetieren sind zwei Arten von Polycomb-Proteinkomplexen bekannt - Polycomb repressive complex 1 (PCR1) und Polycomb repressive complex 2 (Margueron & Reinberg, 2011). Zwei weitere Polycombkomplexe wurden in *Drosophila* beschrieben – der "PHO repressive complex" und "Polycomb repressive deubiquitinase". Ihre Funktionweise ist zur Zeit noch nicht ausreichend erforscht (Klymenko et al., 2006; Scheuermann, Gutierrez, & Muller, 2012; Simon & Kingston, 2009).

Die beiden Polycomb-Proteinkomplexe PCR1 und PCR2 bestehen aus einer Reihe von Proteinen, welche verschiedenste Funktionen, u.a. bei der embryonalen Entwicklung, ausüben. PCR2 besteht aus vier Unterproteinen: EZH1/2, RbAp46/48, EED und SUZ12. PCR1 besteht aus den Unterproteinen RING1A/B, zusammen mit MEL18 (PCGF2), BMI1 oder NSPC1 (PCGF1) (Simon & Kingston, 2009; Whitcomb, Basu, Allis, &

Bernstein, 2007). PRC2 kann mit seinen Proteinen DNA-, Histon-, PTM und Nc-RNA Bindungen eingehen (Margueron & Reinberg, 2011). Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Knockout (KO) von Polycomb-Untereinheiten (Eed, Ezh2, Suz12 und Ring1B) zur frühen embryonalen Sterblichkeit von Mausembryonen führt (Schuettengruber & Cavalli, 2009). Zudem sind die Proteine EZH1/2 von PRC2 die einzigen Proteine, welche die Di- und Trimethylierung des Lysins an der Aminosäure-Position 27 von Histon H3 katalysieren (H3K27me) (Margueron & Reinberg, 2011; Schuettengruber & Cavalli, 2009; Simon & Kingston, 2009). Darüber hinaus bewahrt die H3K27-Methylierung durch PRC2 vor der Acetylierung an dieser Position. Es ist bekannt, dass acetyliertes H3K27 in Abwesenheit von PRC2 vermehrt vorliegt (Tie et al., 2009). Da die RNA Polymerase II in „großer Anzahl“ in H3K27me3 angereicherten Promotoren vorhanden ist, können PRC2 und H3K27me3 die Transkription und somit die Genexpression beeinflussen (Stock et al., 2007; Zhao et al., 2007). PRC2 hat auch einen großen Einfluß auf die Pluripotenz von ES-Zellen (Boyer et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass ES-Zellen, in welchen der PRC2-Komplex inaktiviert worden war, undifferenziert bleiben (Obier et al., 2015; Pasini, Bracken, Hansen, Capillo, & Helin, 2007; Shen et al., 2008). Die Inaktivierung der PRC2-Untereinheiten SUZ12 und JARID2 steht in Zusammenhang mit einem insuffizienten „gene silencing“ von Pluripotenzfaktoren, wie NANOG oder POU5F1 (Landeira et al., 2010; Li et al., 2010; Walker et al., 2010).

Der PRC1-Komplex steht in enger Verbindung mit dem PRC2-Komplex. Die CBX-Untereinheit des PRC1-Komplexes bindet spezifisch an H3K27me, welches von PRC2 modifiziert wurde. Dadurch wird das Histon H2Aub1 katalysiert (Ku et al., 2008). Durch diese Histonmonoubiquitinierung wird die Elongation der Transkription durch die RNA Polymerase II behindert (Zhou et al., 2008). Nach diesem Mechanismus zu urteilen wird zu allererst PRC2 benötigt, um H3K27 zu methylieren und anschließend, in der Hierarchie eine Stufe darunter, PRC1, das durch Ubiquitinierung der Histone die Transkription hemmt.

Eine wichtige Histon-Methylierung ist die H3K27me3-Methylierung (H3: Name des Histons, K: Aminosäure Lysin an Position 27, me: Methylierung,

3: drei Methylgruppen). Diese ist mit einer Unterdrückung der Genaktivität verbunden (Shpargel, Sengoku, Yokoyama, & Magnuson, 2012). Di- und Tri-Methylierungen von H3K27 erfolgen durch einen Faktor des Polycomb-Komplexes 2 (Boyer et al., 2006). EZH2 hat eine SET-Domäne, welche für die di- und tri-Methylierung von H3K27 zuständig ist (Margueron & Reinberg, 2011). Durch diese Histonmodifikation wird die Chromatinstruktur modifiziert, und Gen-Promotoren werden reprimiert (Bartova, Krejci, Harnicarova, Galiova, & Kozubek, 2008).

Lange Zeit dachte man, dass Histon-Methylierungen, im Gegensatz zu den Acetylierungen, irreversibel sind. Erst mit der Entdeckung der Lysin-Spezifischen Demethylase 1, LSD1, hat sich diese Sichtweise grundlegend geändert (Kooistra & Helin, 2012).

#### 1.4 Die Histon-Demethylase Kdm6a

Gegenwärtig sind 32 Histon-Demethylasen bekannt (Kooistra & Helin, 2012). Die beiden größten Gruppen sind die LSD (Lysin-Spezifische Demethylase)-Gruppe und die JMJC (Jumonji)-Gruppe. Die LSD-Gruppe, welche als erste Trimethylase beschrieben wurde (Shi et al., 2004) besteht aus den LSD 1 (syn. KDM1A, AOF2, BHC110) und LSD 2 (syn. KDM1B oder AOF1) Lysin- Demethylasen. LSD1 wird im Prostatakarzinom (Chung & Yao, 2012), im undifferenzierten malignen Neuroblastom (Dalglish et al., 2010), im Östrogen-Rezeptor-negativen Mammakarzinom (Herz et al., 2012) und im Urothelkarzinom (Issaeva et al., 2007) überexprimiert. Im Gegensatz dazu wird LSD1 im Mammakarzinom herabreguliert (Jankowska et al., 2011).

Das Gen für das Enzym LSD2 wird im Urothelkarzinom amplifiziert, so dass das LSD2-Protein dort überexprimiert wird (Kondo et al., 2008). Die LSD-Enzyme bestehen aus einer „Amin Oxidase Like“ (AOL)-Domäne und einer SWIRM-Domäne (SWI3, RSC8 und Moira), die einzigartig bei Chromatin-assoziierten Proteinen sind. Die katalytische Aktivität der AOL-Domäne benutzt einen Oxidations-Mechanismus, der vom Co-Faktor FAD abhängt. Durch diesen ist es möglich, Methylgruppen von Histon-Lysinen zu entfernen. Die SWIRM-Domäne interagiert mit dem Androgenrezeptor.

Dadurch kann die Substratspezifität von LSD1 erklärt werden. In LSD2 interagiert die SWIRM-Domäne mit der AOL-Domäne, die für die Demethylaseaktivität notwendig ist. Zusätzlich interagiert die Domäne mit der "Glyoxylate Reductase 1" (GLYR1), die einen positiven Einfluss auf die Stimulation der Demethylaseaktivität ausübt (Chung & Yao, 2012).

Die zweite große Gruppe der Histon-Demethylasen ist die JMJC-Gruppe. Sie besteht aus sieben Untergruppen, welche mit verschiedensten Karzinomarten assoziiert sind: JMJD1 ist überexprimiert im malignen Kolorektalen Karzinom (Uemura et al., 2010), im Nierenzell-Karzinom (Guo, X. et al., 2011) und im Hepatozellulären Karzinom (Yamada, D. et al., 2011). JMJD2 wird beim Urothel-Karzinom herunter- (Issaeva et al., 2007) und beim Mamma-Karzinom hoch-reguliert (M. G. Lee et al., 2007). Zudem wird das *JMJD2*-Gen beim Ösophagus-Karzinom, beim Mamma-Karzinom und beim Medulloblastom amplifiziert (Mansour et al., 2012; Mar et al., 2012).

Eine weitere große Subgruppe stellen die JMJD3-Histondemethylasen dar, welche in Leber-, Pankreas- und Blasenkarzinomen (Miller, Mohn, & Weinmann, 2010) und verschiedenen hämatologischen Malignitäten (Morales Torres, Laugesen, & Helin, 2013) sowie in Hodgkin Lymphomen (Priolo et al., 2012) überexprimiert werden.

Der enzymatische Mechanismus der JMJC-Domänen-Funktion wird durch Fe(II) und 2-Oxoglutarat vermittelt, die mit der JMJC-Domäne verbunden sind. Durch die Reaktion mit Sauerstoff entsteht hochaktives Fe(IV). Durch Fe(IV) wird die Methyl-Lysin-Gruppe hydroxiliert. Diese ist instabil, und es entsteht Formaldehyd. Durch diesen Mechanismus können alle drei Methylierungen (Mono-, Di- und Trimethylierungen) vollzogen werden.

Kdm6a (auch als UTX bezeichnet) ist eine für die H3K27me<sub>2/3</sub> - Methylierung spezifische Histon-Demethylase (Tie, Banerjee, Conrad, Scacheri, & Harte, 2012), die neben den Histon-Methylasen UTY und Kdm6b (die auch als JMJD3 bezeichnet wird) eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielt. Ein Teratom eignet sich sehr gut als

Modell, um die Funktion der KDMs in einem *in vivo* ähnlichen System zu untersuchen. Während der ESC-Differenzierung wird die H3K27me<sub>2/3</sub> Methylierung durch Kdm6a herunterreguliert und verhindert somit die Zell-Differenzierung (C. Wang et al., 2012). Kdm6a hat zudem eine große Bedeutung für die Bildung des mesodermalen Keimblatts (Welstead et al., 2012). *Kdm6a* ist auf dem X-Chromosom, *UTY* auf dem Y-Chromosom lokalisiert. Kdm6b hingegen ist auf den Autosomen angeordnet (S. Lee, Lee, & Lee, 2012). Alle drei Methylasen gehören der JMJC-Familie an, deren Mitglieder eine wichtige Rolle bei der Chromatin- und somit Transkriptions-Regulation spielen (Issaeva et al., 2007).

Besonders der Verlust des *Kdm6a*-Gens hat große Auswirkungen auf die murine Embryogenese. Es kommt zu Neuralrohrdefekten, Fehlbildungen des Herzens sowie zu einem verminderten Wachstum des Embryos (Welstead et al., 2012). UTY ist ca. 96% identisch zu UTX, aber nur ca. 80% zu Kdm6b. Zusammen mit UTX interagiert UTY mit T-Box Proteinen (Miller et al., 2010; Seenundun et al., 2010) und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genen (z.B. bei der *Fnbp1* Expression), die an der mesodermalen Entwicklung beteiligt sind (Shpargel et al., 2012; C. Wang et al., 2012). Lange ging man davon aus, dass UTY ein inaktives KDM-Enzym ist. Aber durch biochemische Studien konnte gezeigt werden, dass UTY durchaus ein aktives KDM-Enzym ist, auch wenn seine Aktivität deutlich geringer als die von Kdm6a und Kdm6b ist. Es ist durchaus möglich, dass UTY - zusätzlich zu den Histonen - mit weiteren Proteinen reagiert. Es wurde in Studien gezeigt, dass die Lysin-Methylierung bzw. Demethylierung von Nicht-Histon-Proteinen durch UTY eine wichtige Rolle bei verschiedenen regulatorischen Prozessen (die z.B. durch p53 und NF-κB gesteuert werden) spielt (Shpargel et al., 2012). Außerdem konnte beobachtet werden, dass ein „Knockdown“ von UTY mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen männlicher Individuen assoziiert ist (Terashima et al., 2010).

## 1.5 Ziel und Aufgabenstellung der Arbeit

Die Zielstellung dieser Arbeit war es, den Einfluss der Histon-Demethylase Kdm6a (UTX) auf die Genexpression und auf die Differenzierung von Teratomen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst histologische Untersuchungen von murinen Teratomen, die nach Injektion von ES-Zellen in die Leistengegend von Mäusen erhalten wurden, durchgeführt. In diesen Teratomen wurde die Expression des *Kdm6a*-Gens entweder durch sh-RNA - „Knockdown“ (KD) stark gehemmt oder durch einen „Knockout“ (KO) vollständig unterdrückt. Schließlich wurden die Veränderungen in der Genexpression durch "real-time" PCR-Assays bestimmt. Als wichtigstes Resultat fanden wir, dass durch den Verlust bzw. die Abnahme der Kdm6a-Aktivität die Transkription der Pluripotenz-Gene Pou5f1/Oct4, Sox2 und Nanog stark in Teratomen gehemmt wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material: Zellen und Mäuse zur Teratombildung

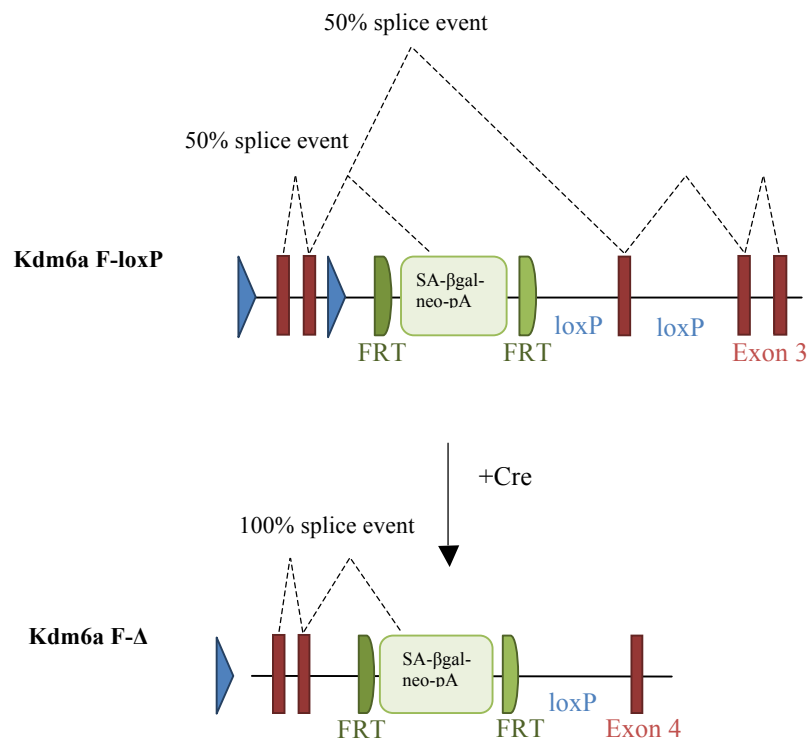
Für die Inaktivierung des *Kdm6a*-Gens in ES-Zellen wurden EUCOMM Zellen verwendet, die ein modifiziertes *Kdm6a*-Gen besitzen. In das modifizierte *Kdm6a*-Gen sind zwei loxP Cre- Erkennungssequenzen eingefügt, die das Exon 3 des Gens flankieren. Damit kann Exon 3 mittels des Cre-Enzyms herausgeschnitten und das Gen inaktiviert werden, da aller Wahrscheinlichkeit nach instabile *Kdm6a*-Transkripte bzw. -Proteine gebildet werden, die keine Funktion besitzen. Darüber hinaus besitzt das modifizierte *Kdm6a*-Gen ein neo-Resistenzgen, das in Analogie zu Exon 3 durch zwei FRT (flippase recombination target) ‚sites‘ flankiert wird. Somit kann das Resistenzgen mit Hilfe der Flip-Rekombinase (von *Saccharomyces*) deletiert werden.

In unserem Falle wurde ein pCAG-CreERT2 System benutzt, womit eine

Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase exprimiert wird. Dadurch kann das *Kdm6a*-Gen durch Tamoxifengabe in KDM6a F-loxP ES-Zellen inaktiviert werden (siehe Abb. 2.1).

Des weiteren kann die Kdm6a Expression durch Nutzung einer shRNA (Small hairpin RNA) vermindert werden. Mittels eines Plasmids wurde die shRNA durch Transfektion in die Zellen eingeschleust.

Zur Erzeugung der Teratome wurden  $10^6$  Wildtyp-V6.5 ES-Zellen bzw. V6.5 ES-Zellen mit dem genetisch modifizierten *Kdm6a*-Gen in die Leistenregion von NOD.SCID Mäusen injiziert. Nach der Bildung der Teratome innerhalb von zwei Wochen wurden die Teratome präpariert. Die eine Hälfte des Teratom-Materials wurde zur Anfertigung von Gefrierschnitten aufbereitet, die andere Hälfte wurde für molekularbiologische Assays schockgefroren.



**Abb. 2.1 Struktur des genetisch modifizierten *Kdm6a*-Gens, das in dieser Arbeit in die verwendeten V6.5 ES Zellen eingeschleust wurde.**

Die kaminroten Kästchen markieren Exons des *Kdm6a*-Gens. Blau sind als Dreiecke die beiden loxP-,sites' dargestellt, die das Exon 3 flankieren; grün sind FRT (flippase

recombination target)-,sites‘ dargestellt, die ein neo-Resistenzgen flankieren. Durch die ‚site-specific recombination‘ entstanden ES-Zellen mit einer hypomorphen (= herabgesetzten) Expression eines *Kdm6a*-Allels.

Durch das Einbringen der bakteriellen Cre-Rekombinase (+Cre) kann das Exon 3 herausgeschnitten und das *Kdm6a*-Gen inaktiviert werden. Gleichfalls kann mittels der Flp-Rekombinase das neo-Resistenzgen herausgeschnitten werden.

J. Kampka (Dissertation, 2014)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Histochemische Färbungen

#### 2.2.1.1 H & E Färbungen von Gefrierschnitten

Für die Darstellung der Gewebestrukturen wurden Gefrierschnitte (die von Frau Doris Heim aus der AG Müller angefertigt wurden) mit H & E gefärbt. Nach dem Trocknen der Gefrierschnitte (eine Stunde bei Raumtemperatur) wurden diese 10 min in destilliertem Wasser gewaschen, 5 min in Hämatoxylin-Lösung (mod. nach Gil III, im sauren Milieu) gefärbt, 5 min in Leitungswasser gewaschen und 30 sec mit Eosin (ca. 0,1 % Eosin in 95 % Alkohol) gefärbt. Die Präparate wurden kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (eine Minute in 70 % igem Alkohol, drei mal zwei min in 100% igem Alkohol) und dann in 100 % Xylol 6 min (mit einem 100 % Xylol Zwischenschritt) überführt. Schließlich wurden die gefärbten Gefrierschnitte in Vitro-Clud (R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik) als Dauerpräparate angefertigt.

#### 2.2.1.2 Immunhistochemische Färbungen PCNA/SSEA-1

Die immunhistochemischen Färbungen von PCNA und SSEA-1 wurden mit Paraffinschnitten von Teratomen durchgeführt. Diese wurden mittels 2 x 10 min Xylol-Inkubation, 3 x 100 % Alkohol, 1 x 70 % Alkohol (jeweils 5 min) und 1 x 5 min Leitungswasser entparaffiniert.

Die Schnitte wurden in Plastikkuvetten in 10 mM Natriumzitat-Puffer (pH



6.0) mehrmals – insgesamt 23 min - kurz aufgeköcht.

Nach dem Aufkochen wurde der Natriumzitat-Puffer allmählich (innerhalb von 15 min) durch Leitungswasser ersetzt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 10 min in PBS, 0,1% Triton X-100 gewaschen und anschließend „blockiert“. Die Blockierlösung bestand aus 5 % Ziegen Serum (50 ml Ziegen Serum in 1 ml PBS) und 0,1 % Triton X-100 (0,5 ml Triton X-100 in 500 ml PBS). Je 100 ml der Blockierlösung wurden auf ein Präparat pipettiert, und die Präparate wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Schließlich wurden die AK-Färbungen durchgeführt. Dazu wurden 100 µl des ersten AK (bei der PCNA-Färbung: BD Pharmingen 555566, 1:1000, ein monoklonaler Maus-AK; bei der SSEA-1-Färbung: BioLegend 125604, 1:500, ein monoklonaler Maus-AK) auf das Präparat pipettiert und über Nacht bei 4° in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 4 mal 10 min in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit je 100 ml des zweiten AK (Ziege-Cy3, anti-Maus, 1:200) zwei h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Präparate drei mal 10 min in PBS gewaschen und 10 min mit DAPI (Stocklösung: 500µg/ml in 1x PBS) zur Darstellung der Zellkerne gefärbt. Es folgte Waschen mit PBS (ein mal fünf min) und mit destilliertem H<sub>2</sub>O. Schließlich wurden die Präparate in Mowiol eingebettet und eingedeckelt.

Für die Negativ-Kontrolle wurde der erste AK weggelassen und nur der zweite AK verwendet.

### 2.2.1.3 Darstellung apoptotischer Zellen durch TUNEL-Färbung

Um die apoptotischen Zellen in den Gewebeschnitten nachzuweisen und zu quantifizieren wurde das „DeadEnd Fluorometric TUNEL System“ (Promega, G3250) Kit verwendet. Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert und 2 x mit je 5 min in Xylol gewaschen. Anschließend in 100 % Alkohol 5 min gewaschen und in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95 %, 85 %, 70 %, 50 %) je 3 min dehydriert, danach jeweils 5 min in

0,85 % NaCl und in PBS gewaschen. Nachdem die Schnitte ent-paraffiniert waren, wurden die Schnitte in 4 % Formaldehyd in PBS 15 min fixiert und 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden pro Schnitt 100 µl einer Proteinase K-Lösung (20 µl/ml) aufgetragen, und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wieder 5 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden nochmals 15 min mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert und 5 min in PBS gewaschen. Für eine Positiv-Kontrolle wurden pro Präparat 100 µl DNase I Puffer hinzugegeben und 5 min inkubiert. Anschließend wurden pro Schnitt 100 µl eines DNase I Puffers, welcher 5.5 – 10 Einheiten/ml DNase I enthält (Promega, Cat. # M6101), aufgetragen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die verbliebene DNase I Lösung wurde 3-4 x durch Waschen in deionisiertem Wasser entfernt. Anschließend wurde mit der Positiv-Kontrolle so verfahren wie mit den restlichen Schnitten.

Bei der Negativ-Kontrolle wurde das Enzym rTdT weggelassen.

Nun wurden pro Präparat 100 µl eines „Equilibration“ - Puffers 15 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurden pro Präparat 50 µl eines rTdT Reaktionsmix aufgetragen und 60 min bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit 2 X SSC Puffer 15 min behandelt. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte jeweils 3 Mal mit PBS 5 min gewaschen, danach mit DAPI (Konz: 1:50 in PBS) behandelt, 5 min in PBS und kurz mit Leitungswasser gewaschen. Die fertigen Färbungen wurden dann in Mowiol eingebettet.

#### 2.2.1.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Um die Frequenz von PCNA/SSEA-1 positiven Zellen auswerten zu können wurden pro Gewebefärbung je 20 zufällige Bildausschnitte unter dem Mikroskop bestimmt. Mittels der Bildbearbeitungssoftware "Rita" wurden die PCNA- bzw. SSEA-1 Immunfluoreszenzbilder über die DAPI-Färbung, welche in jeder lebenden Zelle den Zellkern färbt, transparent übereinandergelegt. Wenn DAPI und PCNA bzw. SSEA-1 positive Zellen deckungsgleich waren wurden diese in der Auszählung erfasst. Die DAPI pos./PCNA pos. Zellen wurden ausgezählt und im Bezug zu den DAPI

pos./PCNA neg. Zellen in Relation gestellt, ausgewertet und in Prozent angeben (Abb. 3.3 und 3.4). Im Gegensatz zu den PCNA pos. Zellen, welche PCNA im Zellkern exprimieren, wird bei SSEA-1 pos. Zellen SSEA-1 im Zytoplasma und Zelloberfläche/Zellmembran exprimiert. Aus diesem Grund wurde bei den SSEA-1 Zellen die Gesamtfläche der SSEA-1 pos. Zellverbände vermessen und in Relation zur Gesamtfläche in Prozent gestellt (Abb. 3.5 und 3.6).

### 2.2.2 RNA Isolierungen

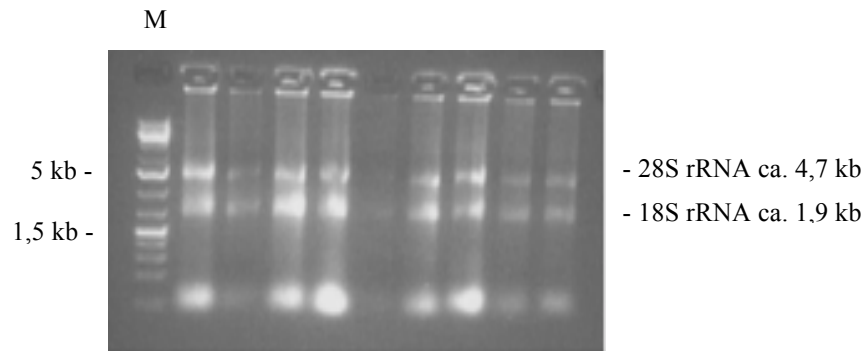
Das in *RNAlater* (Qiagen) - einem RNA Stabilisierungs- Reagenz - aufbewahrte Teratommaterial wurde in peqGOLD RNAPure™ (peqlab) überführt. 100 mg Teratomgewebe wurden in 2 ml peqGold homogenisiert. Danach wurden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. Nach einer Inkubation - 10 min auf Eis - wurden die Proben 5 min bei 12.000 x g zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und ein gleiches Volumen von Isopropanol hinzugegeben. Nach gutem Mischen wurde die RNA bei 4°C 15 min präzipitiert. Die Lösung wurde bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert, wodurch sich die RNA als Präzipitat auf dem Boden des Zentrifugen-Röhrchens absetzte. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, und das RNA Pellet wurde zwei Mal mit je 1 ml 70 % igen Alkohol gewaschen. Schließlich wurde das gewaschene RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Danach wurde die RNA Konzentration im Photometer bestimmt.

### 2.2.3 Elektrophoretische Trennungen der RNA und Bestimmung der RNA-Qualität

Um die erhaltene RNA bezüglich ihrer Qualität zu beurteilen, wurde diese auf Agarosegel aufgetrennt. Zur Herstellung 1,5 % iger Agarosegele wurden 3 g Agarose (NeoUltra, Roth, Cat. # 2667.4) mit 197 ml TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle bei 800 Watt kurz aufgekocht.

Anschließend wurden in die Suspension 6 ml 1% Ethidiumbromid-Lösung (Carl Roth, Cat. # 2218.2) hinzugegeben und mit einem Magnetrührer vermischt. Nun wurde die 1,5% ige Agaroseflüssigkeit in einen Geltrog gegossen, der mit einem 20 zahnigen Taschenkamm versehen ist. Nachdem die Flüssigkeit zu einem Gel erstarrte und der Taschenkamm entfernt worden war, wurden in die erste Geltasche 6 µl eines „RNA Ladder – GeneRuler 1 kb RNALadder Plus“ (Fermentas, Cat. # SM1331/2/3) aufgetragen, der als Molekulargewichtsmarker diente. Nun wurden die jeweiligen RNA Proben – immer 6 µl RNA mit 1 µl eines „6x DNA Loading Dye“ Puffers (Cat. # R0611, Fermentas) - gemischt, bevor diese in die jeweiligen Geltaschen appliziert wurden. Nachdem alle Proben auf das 1,5 % Agarose Gel aufgetragen wurden, wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt, die mit TAE-Puffer gefüllt war. Nach Anlegen einer Spannung von 120 V erhält man nach ca. 30 min ein spezifisches Bandenmuster auf dem Gel. Das Gel wurde anschließend auf einen UV-Lichtkasten gelegt und bei einer Wellenlänge von 360 nm fotografiert.

Die RNA-Banden werden aufgrund des in dem Aggarosegels enthaltenen Ethidiumbromids durch Emission des Fluoreszenzlichtes sichtbar. Die beiden starken Banden ribosomaler RNA (von 28S und 18S) zeigen - bei relativ geringer Hintergrundfärbung - an, dass die RNA-Präparationen intakt sind, d.h. während der Präparation wenig Abbau stattfand. Abgebaute RNA (oder Verunreinigungen) lassen sich durch die Bande, die mit der Pufferfront wandert, erkennen. In dieser Bande sind auch die tRNAs und 5S rRNA zu finden, die durch Benutzung eines höher prozentigen Gels (von 2 % Agarose und mehr) von der Lauffront abgetrennt werden können. Spuren hochmolekularer DNA sind in den Taschen liegen geblieben und nicht in das Gel eingewandert.



**Abb. 2.2 Bandenmuster intakter RNA aus Teratomen nach elektrophoretischer Trennung in einem 1.5 %igen Agarosegel.**

Pro Gelspur wurden 4  $\mu$ l RNA aufgetragen. Die erste Gelspur enthält 6  $\mu$ l eines 1kb Molekulargewichtsmarkers (M).

#### 2.2.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem ‚First Strand cDNA Synthesis Kit‘ (Thermo Scientific, Cat. # 1612) durchgeführt. Pro Eppendorf-Röhrchen wurden 1  $\mu$ g RNA, 1  $\mu$ l 10 X ‚reaction buffer‘ mit  $MgCl_2$ , 7  $\mu$ l DEPC-Wasser und 1  $\mu$ l DNase I hinzugegeben und nach sorgfältigem Mischen und Vortexen bei 37°C 30 min inkubiert. Dann wurden 2  $\mu$ l 25 mM EDTA hinzugefügt, und es wurde 10 min bei 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde ein ‚random hexamer primer‘ (0,2 mg/ml) dazu pipettiert und 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 5 min auf 70°C erhitzt und danach auf Eis gelegt. Nun wurden pro Eppendorf-Röhrchen 4  $\mu$ l 5x Reaktionspuffer, 1  $\mu$ l ‚RiboLock‘ Ribonuklease Inhibitor (20 u/ml) und 2  $\mu$ l 10 mM dNTP Mix dazugegeben. Dies wurde gevortext, zentrifugiert und 5 min bei 25°C inkubiert. Dann wurden pro Eppendorf-Röhrchen 2  $\mu$ l M-MuLV reverse Transkriptase (20 u/ml) hinzugefügt. Schließlich wurde das Reaktionsgemisch bei 25°C 10 min inkubiert, danach 37°C bei 60 min und am Ende 10 min bei 70°C.

Die Negativ-Kontrollen wurden ohne M-MuLV reverse Transkriptase hergestellt.

## 2.3 Real Time PCR-Assays

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der schnellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Mit der PCR kann man kleine Mengen DNA mit spezifischer Sequenz in kurzer Zeit so oft amplifizieren, dass man DNA Mengen erhält, die im Labor weiter untersucht und z.B. sequenziert werden können.

PCR-Assays bestehen aus drei sich wiederholenden Schritten:

1.) Denaturierungsschritt: Der Reaktionsmix (bestehend aus DNA-Molekülen, Primern, Polymerase und Nukleotiden) wird auf 95°C erhitzt. Durch dieses Erhitzen wird die DNA denaturiert und ihre beiden komplementären Stränge trennen sich voneinander.

2.) Hybridisierungsschritt: Nun wird die Temperatur auf 55°C reduziert. Dadurch verbinden sich die Primer mit der DNA. DNA und Primer-Abschnitt müssen komplementär sein.

3.) Elongationsschritt: Bei diesem letzten Schritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Dadurch bauen die Polymerasen weitere Nukleotide in die DNA-Stränge ein.

Da sich diese drei Schritte ständig wiederholen (normalerweise 30x – 40x), verdoppelt sich jedes Mal pro Zyklus die Anzahl der DNA-Moleküle.

Die Temperaturangaben entsprechen dem Standardprotokoll, welches vielfach abgewandelt werden kann.

In dieser Arbeit wurde mit einem abgewandelten Protokoll gearbeitet, da die Primer eine andere ‚annealing‘ Temperatur besitzen. Diese hybridisieren bei 60°C mit der DNA.

Die verwendete RT-PCR Maschine war eine 72-Well RT-PCR ‚Rotor-Gene, RG-3000‘ von Corbett Research.

Für die RT-PCR-Analyse wurden Primer für folgende Gene verwendet:

Ektodermale Marker: Pax5, Nes (Nestin)

Endodermale Marker: Gata4, Gata6, Foxa2, Sox17

Mesodermale Marker: Fgf5, T (brachyury), Kdr (Flk1)

Pluripotente Marker: Oct4 (Pou5f1), Sox2, Nanog

Kontrollprimer: Utx (Kdm6a), Kdm6b, Uty

Housekeeping-Primer: Rpl4, Rps29

Die Sequenzen der Primer sind in unten angeführter Tabelle dargestellt.

Bestandteile des RT-PCR Mixes:

1  $\mu$ l cDNS

1  $\mu$ l F-Primer

1  $\mu$ l R-Primer

7  $\mu$ l DEPC-Wasser

10  $\mu$ l „SYBR Green“ (Qiagen, Cat. # 204143)

Bestandteile der verwendeten Puffer:

Name des Puffers	Bestandteile
TAE-Puffer	0,04 M Tris 0,02 M Essigsäure 0,001 M EDTA pH 8.0
Natrium-Zitrat-Puffer	9 ml Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure (19,2 g Zitronensäure in 1 l H <sub>2</sub> O) 41 ml Stammlösung B: 0,1 M Natrium-2-Hydrat (29,4 g Natrium-2-hydrat in 1 l H <sub>2</sub> O) 450 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
PBS-Puffer	8 g/l NaCl 0.2 g/l KCl 1.15 g/l Dinatriumhydrogenphosphat 0.2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat pH 7.4
2x SSC-Puffer	0,6 M NaCl 60 mM Natriumcitrat pH 7,2

Primernamen und Sequenzen:

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
Pax5	FW: 5'-GAA CTT GCC CAT CAA GGT GT -3' RV: 5'-TGT CCG AAT GAT CCT GTT GA-3'
Nes (Nestin)	FW: 5'-CAGAGAGGCGCTGGAACAGAGATT-3' RV: 5'-AGACATAGGTGGGATGGGAGTGCT-3'
Gata4	FW: 5'-CCC TAC CCA GCC TAC ATG G -3' RV: 5'-ACA TAT CGA GAT TGG GGT GTC T-3'
Gata6	FW: 5'-TTGCCTCCGGTAACAGCAGTG-3' RV: 5'-GTGGTCGCTTGTGTAGAAGGA-3'
Foxa2	FW: 5'-TAG CGG AGG CAA GAA GAC C -3' RV: 5'-CTT AGG CCA CCT CGC TTG T-3'
Sox17	FW: 5'-GATGCGGGATACGCCAGTG-3' RV: 5'-CCACCACCTCGCCTTTCAC-3'
T (brachyury)	FW: 5'-CAGCCCACCTACTGGCTCTA-3' RV: 5'-GAGCCTCGAAAGAAGTACTGAGC-3'
Kdr (Flk1)	FW: 5'-TTT GGC AAA TAC AAC CCT TCA GA-3' RV: 5'-GCA GAA GAT ACT GTC ACC ACC-3'
Fgf5	FW: 5'-GAA GCG TCT CAC TCC CGA AG-3' RV: 5'-GAA GAA AAC GTC GCG CTA CT -3'
Oct4 (Pou5f1)	FW: 5'-AGGCCCGGAAGAGAAAGCGAACTA-3' RV: 5'-TGGGGGCAGAGGAAAGGATACAGC-3'
Nanog	FW: 5'-TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT-3' RV: 5'-GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA-3'
Sox2	FW: 5'-GCGGAGTGGAACTTTTGTCC-3' RV: 5'-CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT-3'
Utx (Kdm6a)	F: 5'-GGAAGCCACAGCTACAGGAG-3' RV: 5'-CCACCAGGAACCAGTCAAGT-3'
Uty	FW: 5'-ATAGTGTCCAGACAGCTTCA-3' RV: 5'-GAGGTAGGAATACGTAAGAA-3'
Kdm6b	FW: 5'-GGAAGCCACAGCTACAGGAG-3' RV: 5'-CCACCAGGAACCAGTCAAGT-3'
Rpl4 (Housekeeping gene)	FW: 5'-TTGGGTTGTATTCCTCTGCG-3' RV: 5'-CAGACCAGTGCTGAGTCTTGG-3'
Rps29 (Housekeeping gene)	FW: 5'-GTCTGATCCGCAAATACGGG-3' RV: 5'-AGCCTATGTCCTTCGCGTACT-3'



### 3. Ergebnisse

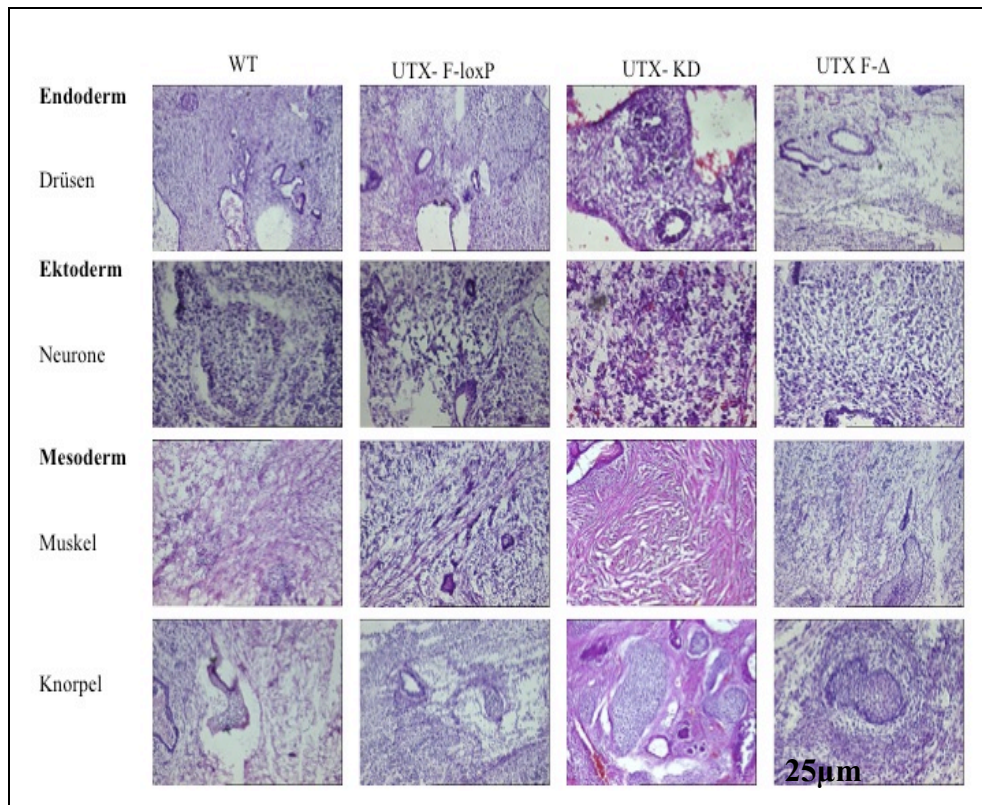
#### 3.1 Histologie der Teratome

Als erste experimentelle Aufgabe sollte die Gewebsbildung von Teratomen, in denen die Expression des *Kdm6a*-Gens deutlich gehemmt war, bestimmt werden. Es ist bekannt, dass bei Inaktivierung des *Kdm6a*-Gens die mesodermale Gewebeformung wesentlich beeinflusst wird (C. Wang et al., 2012). Teratome sind - wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde - Keimbahntumore, die sich nach Injektion von ES-Zellen in die Maus bilden und in denen Gewebe der drei Keimblätter nachweisbar sind (Bustamante-Marin et al., 2013). In dem Experiment wurden  $10^6$  ES-Zellen in die Leistenregion von NOD.SCID-Mäusen subkutan injiziert, woraufhin sich Teratome bildeten. Diese wurden anschließend histologisch, immunohistochemisch und zur Durchführung von Genexpressionsanalysen aufgearbeitet.

Es wurde nach morphologischen Merkmalen die Bildung der unterschiedlichen Gewebe an Teratom-Schnitten nach HE-Färbung bestimmt. Dazu wurden die histologischen Schnitte mikroskopisch inspiziert, und die häufigsten Gewebeformungen – Knorpel, Drüsen und Muskel – prozentual im Hinblick auf die Gewebegesamtfläche bestimmt. Insgesamt wurden vier unterschiedliche Typen von Teratomen untersucht. Diese entstanden aus Wildtyp-ES-Zellen (WT-ESC) bzw. aus ES-Zellen, in denen die Expression des *Kdm6a*-Gens mittels 1.) Einbringung eines UTX F-loxP Konstrukts (das auch als *Kdm6a* F-loxP Konstrukt oder SA- $\beta$ gal-neo-pA-Kassette bezeichnet wird: siehe Abb. 2.1), 2.) durch „sh-RNA-Knockdown“ oder 3.) durch einen vollständigen Knockout unterdrückt wurde. Bei allen Mäusen, denen diese manipulierten ES-Zellen injiziert wurden, entwickelten sich Teratome.

Abgesehen von Gewichtsunterschieden zwischen den Teratomen, die aus Wildtyp-ES-Zellen entstanden und aus den Teratomen manipulierter ES-Zellen (die Wildtyp-Teratome waren deutlich leichter als die der manipulierten ES-Zellen), wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Teratom-Bildung festgestellt. Befunde dieser histochemischen HE-

Färbungen sind in Abb. 3.1 dargestellt. Sie zeigen, dass sich sowohl nach Injektion von Wildtyp-ES-Zellen als auch von ES-Zellen mit verminderter *Kdm6a*-Expression in den Teratomen Gewebe des Endoderms (Drüsen), Ektoderms (Neurone) und Mesoderms (Muskel und Knorpel) bildeten.

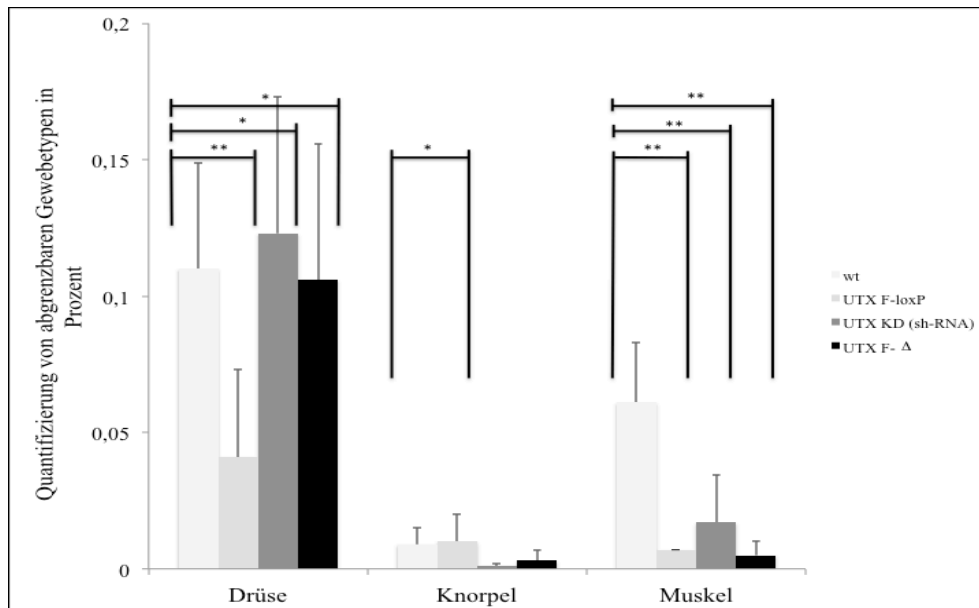


**Abb. 3.1** Beispiel von Gewebetypen in Teratomen aus ES V6.5-Zellen unter "Knockdown"- bzw. "Knockout"-Bedingungen des *Kdm6a*-Gens. (Teratomalter 14 Tage, Schnittdicke 20 μm, N gesamt: 6 Wildtyp (wt), 2 Knockout-first (UTX F-loxP), 3 Knockdown (UTX KD), 8 Knockout (UTX F-Δ)).

Gezeigt sind HE-Färbungen histologischer Schnitte von Teratomen, die nach Injektion von ES-Zellen in murinen Rezipienten entstanden.

Eine Quantifizierung der Frequenzen der unterschiedlichen Gewebetypen in Prozent pro Fläche ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Sie zeigen auf der Ebene der Gewebsbildung z. T. deutliche Unterschiede zwischen WT und *Kdm6a* Verlustmutanten. Diese wurden besonders deutlich zwischen Teratomen, die nach Injektion von Wildtyp-ES-Zellen bzw. nach Injektion von *KDM6a*-KO-ESC festgestellt wurden (siehe Abb. 3.2). Die beobachteten Unterschiede sind zwischen Wildtyp (WT) und KO signifikant. Es wurden 6

Wildtyp (wt), jeweils 3 „Knockdown“-Teratome (UTX-F-loxP bzw. UTX KD) und 8 „Knockout“- Teratome (UTX F-Δ) untersucht.



**Abb. 3.2 Gewebetypen in Prozent pro Fläche in Teratomen, in denen die Expression des *Kdm6a*-Gens durch Einbringung der SA-βgal-neo-pA-Kassette (UTX F-loxP) oder einer sh-RNA (UTX KD) deutlich reduziert bzw. durch einen kompletten „Knockout“ (UTX F-Δ) inaktiviert wurde.**

**Experimente mit drei Teratomlinien sind dargestellt.**

WT (N=6): Gewebetypen in Teratomen, in denen das *Kdm6a*-Gen als Wildtyp vorlag.

UTX F-loxP (N=3): Gewebe in Teratomen, in denen die SA-βgal-neo-pA-Kassette (siehe Abb. 2.1) eingeführt wurde und dadurch die *Kdm6a*-Expression supprimiert wurde.

UTX KD (sh-RNA) (N=3): Gewebe in Teratomen in denen mittels einer sh-RNA die *Kdm6a*-Expression deutlich reduziert wurde.

UTX F-Δ (N=8): Gewebe in Teratomen, in denen durch ein Knockout die Expression des *Kdm6a*-Gens vollständig unterdrückt wurde.

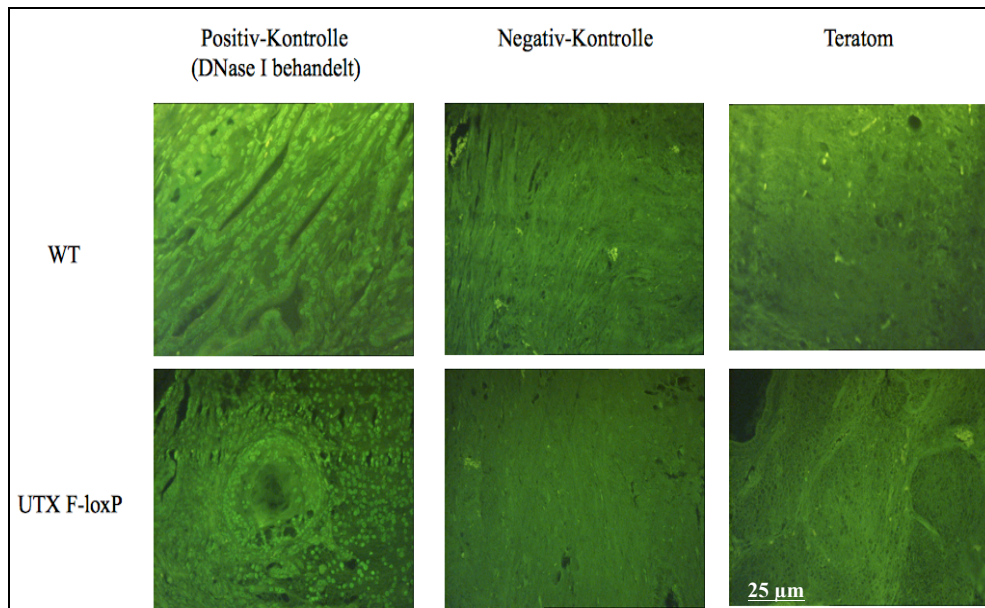
(p-value: \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ )

Die deutlichsten Unterschiede in der Gewebsbildung von Teratomen, die nach Injektion von WT-ESC bzw. KO-ESC entstanden, zeigten sich in der Bildung von mesodermalem Gewebe. Im Vergleich zu Wildtyp-ES-Zellen wurde Muskelgewebe signifikant geringer in „Knockout“-ES-Zellen gebildet .

Justyna Kampka stellte fest, dass „Knockout“-Teratome wesentlich größer waren als vergleichbare Wildtyp-Teratome (Justyna Kampka, Dissertation: „Funktionelle Analyse der Histon-Demethylase UTX in hämatopoetisch differenzierenden murinen ES-Zellen“). Aus diesem Grund untersuchte ich das Apoptose- und Proliferationsverhalten auf zellulärer Ebene mittels Immunfluoreszenz-Färbungen sowie die Expression von Pluripotenzmarkern, die auf das Vorhandensein pluripotenter Zellen in Teratomen schließen lassen. Die funktionelle Relevanz der Manipulation der *Kdm6a* Expression in ES-Zellen wurde auf molekularer Ebene mittels Quantitative Real-Time (RT) PCR Assays bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den Abschnitten 3.2-3.5 dargestellt.

### 3.2 Frequenz apoptotischer Zellen innerhalb der Teratome

Um den Einfluss der Hemmung der *Kdm6a*-Expression auf das Apoptoseverhalten von Teratomzellen zu untersuchen, wurden diese mittels der TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) – Methodik analysiert. Als Positiv-Kontrolle dienten Paraffin-Schnitte von Teratomen, die mit DNase I behandelt wurden (siehe Färbungen in Abb. 3.3, links). Dadurch entstehen „nicks“ in der Kern - DNA, die ein Merkmal apoptotischer Zellen sind. Als Negativ – Kontrolle dienten Präparate, die nicht mit dem Enzym rTdT inkubiert wurden. Unsere Analysen zeigen, dass weder in den Wildtyp - Teratomen noch in den Teratomen mit hypomorpher *Kdm6a*-Expression apoptotische Zellen nachweisbar waren (siehe Abb. 3.3). Dies zeigt, dass sowohl nach Inaktivierung als auch nach partieller Suppression des *Kdm6a*-Gens in ES-Zellen keine Zunahme, aber auch keine Abnahme der Apoptoserate in Embryonen eintritt. Das stimmt gut mit publizierten Daten anderer Autoren überein (S. Lee et al., 2012).



**Abb. 3.3 TUNEL-Färbung von Wildtyp-Teratomen und von Teratomen mit hypomorpher *Kdm6a* – Expression (UTX F-loxP).**

Links sind Färbungen von Positiv – Kontrollen dargestellt, die nach DNase I-Behandlung von Paraffinschnitten und nachfolgender TUNEL-Färbung erhalten wurden. Bei den Negativ – Kontrollen wurde das rTdT Enzym weggelassen.

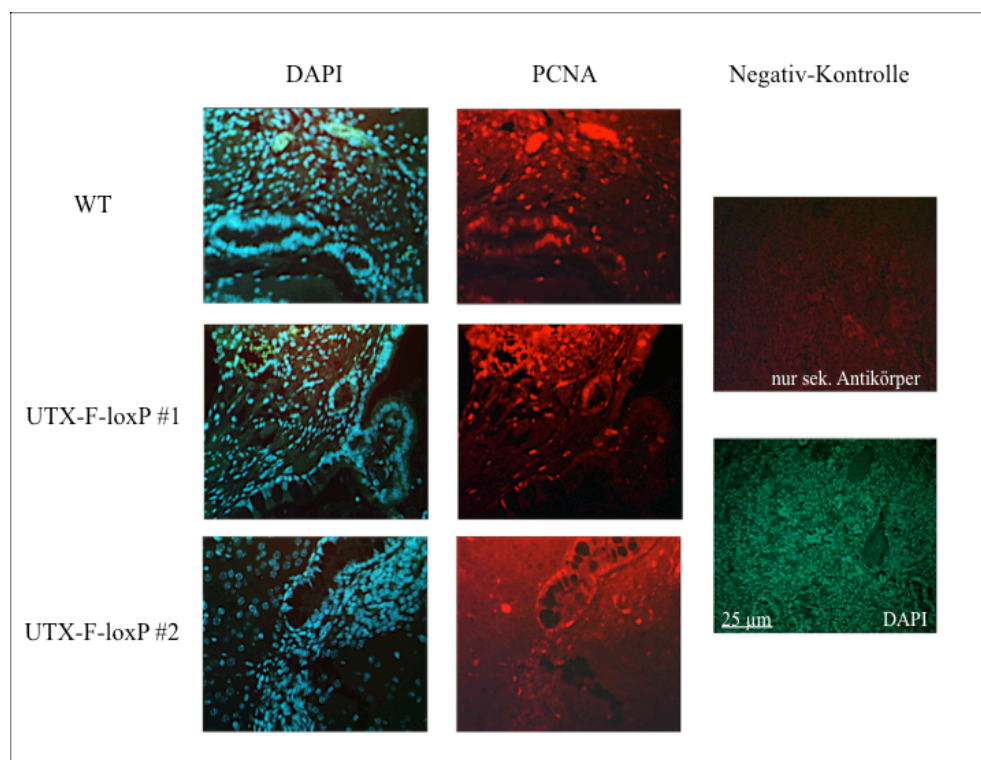
### 3.3 Proliferation von ES-Zellen innerhalb der Teratome

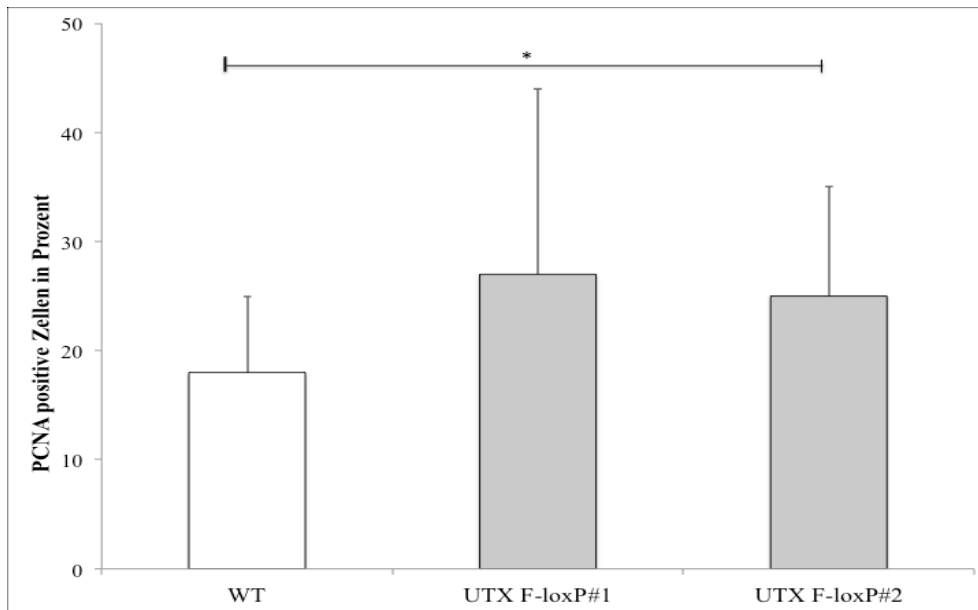
Zur Bestimmung der Proliferation der ES-Zellen innerhalb der Teratome wurden immun-histochemische PCNA-Färbungen durchgeführt. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ist ein Protein, das verstärkt in der S (Synthese)-Phase des Zellzyklus gebildet wird. PCNA ist daher ein Marker für Zellproliferation. Immun-histochemische PCNA-Färbungen wurden mit allen drei Teratom-Chargen durchgeführt. Typische Resultate dieser Untersuchungen werden in den Abbildungen 3.4 und 3.5 in Form von mikroskopischen Färbungen und Säulendiagrammen gezeigt.

Unsere Ergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme der Frequenz PCNA positiver Zellen nach Verminderung der *Kdm6a*-Expression. Sowohl in den Zellen mit reduzierter UTX-Allel-Expression (in denen die *Kdm6a*-Expression vermindert ist) (Abb. 3.4) als auch in den UTX F- $\Delta$  Zellen, in denen die *Kdm6a*-Expression durch den Knockout fehlt (Abb. 3.5), wurde eine statistisch signifikante Zunahme der Frequenz PCNA- positiver Zellen,

verglichen mit Wildtyp-ES-Zellen, beobachtet. Dies lässt auf eine stärkere Zellproliferation schließen. Offensichtlich ist die Suppression der Teratom-Zell-Proliferation auf die Demethylase-Wirkung des Kdm6a-Enzyms zurückzuführen (siehe Diskussion).

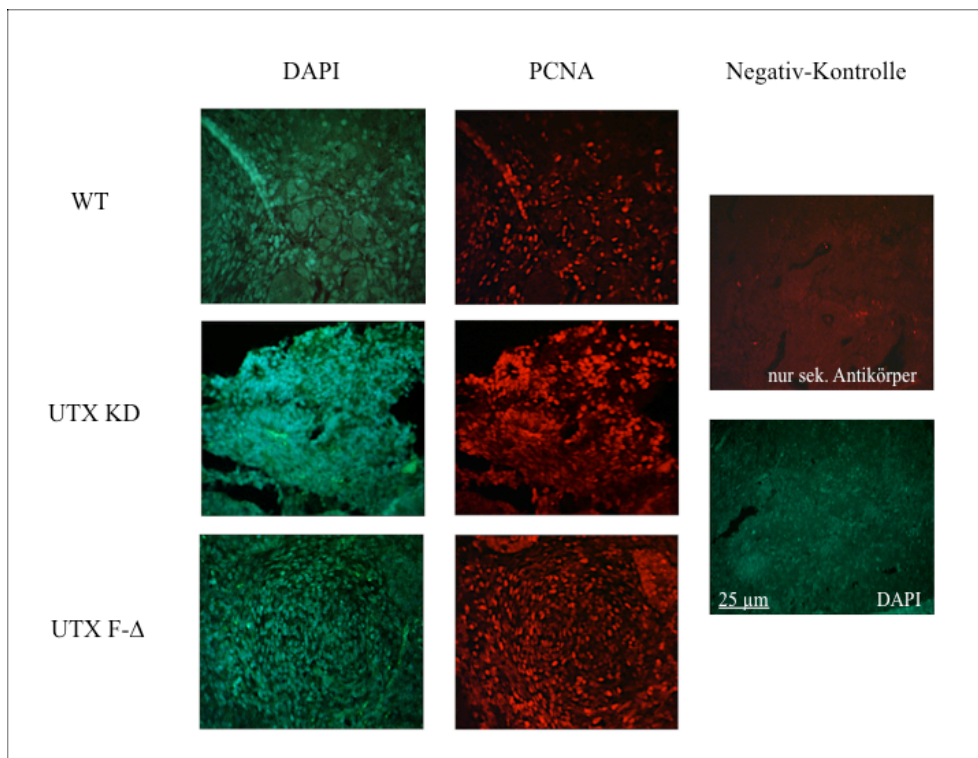
Die H3K27me3 Modifikation ist - wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde – mit einer Repression der Transkription assoziiert. Die Verstärkung durch die Manipulation von Kdm6a, eine Histon-Demethylase, sollte deshalb zur Veränderung der Expression vieler Gene führen, die den Zellzyklus modulieren. Welche Gene daran beteiligt sind werden wir später diskutieren (siehe Kapitel 4).

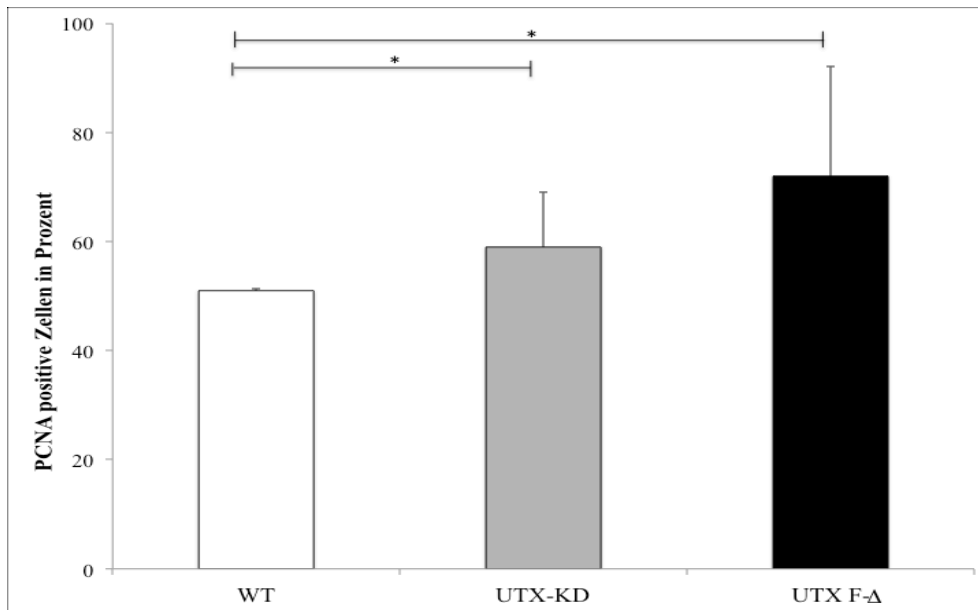




**Abb. 3.4 Histochemische PCNA-Färbungen von Wildtyp-Teratomen und von zwei hypomorphen Teratomen, die das UTX F-loxP Allel tragen.**

Die Teratome wurden mit einem PCNA-spezifischen Antikörper und einem zweiten, Cy3-markierten Antikörper gefärbt und mit DAPI - zur Kerndarstellung - gegengefärbt. Als Negativ-Kontrolle (rechte Abbildung oben) wurden die Präparate nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt (p-value: \*  $p \leq 0,05$ ).





**Abb. 3.5 Quantifizierung der PCNA pos. Zellen von Wildtyp-Teratomen und Teratomen, in denen die Expression des *Kdm6a*-Gens entweder durch Knockdown (UTX KD) gehemmt oder durch Cre-vermittelte Inaktivierung (UTX F-Δ) vollständig ablatiert wurde.**

Wie in der Legende zu Abb. 3.4 wurden die Teratom-Schnitte zuerst mit einem PCNA-spezifischen Antikörper und danach mit einem Cy3-markierten sekundären Antikörper gefärbt. Zur Kerndarstellung wurden die Präparate mit DAPI gegengefärbt. Als Negativkontrolle (siehe Färbung rechts oben) wurden Präparate wiederum nur mit dem Sekundär-Antikörper gefärbt (p-value: \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ ).

### 3.4 Expression von Pluripotenzmarkern

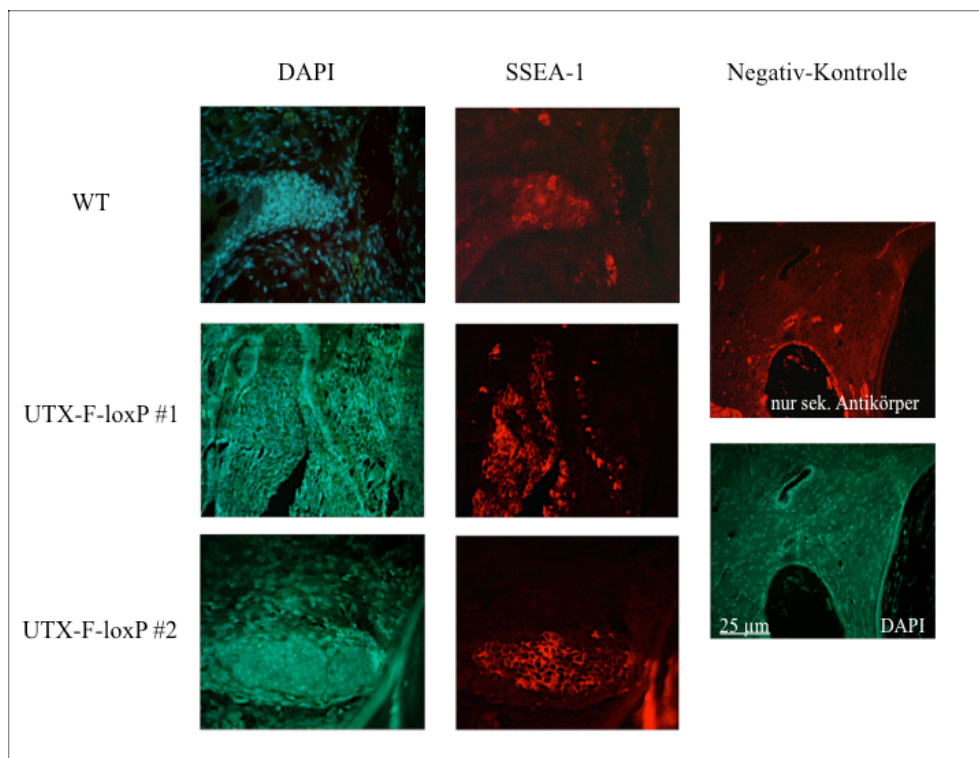
Um die Expression von Pluripotenzmarkern und somit auf das Vorhandensein von pluripotenten Zellen in Teratomen zu schließen, ist es von großer Bedeutung, undifferenzierte Zellen zu untersuchen. Nur diese Zelltypen sind in der Lage alle Gewebe eines Organismus zu entwickeln.

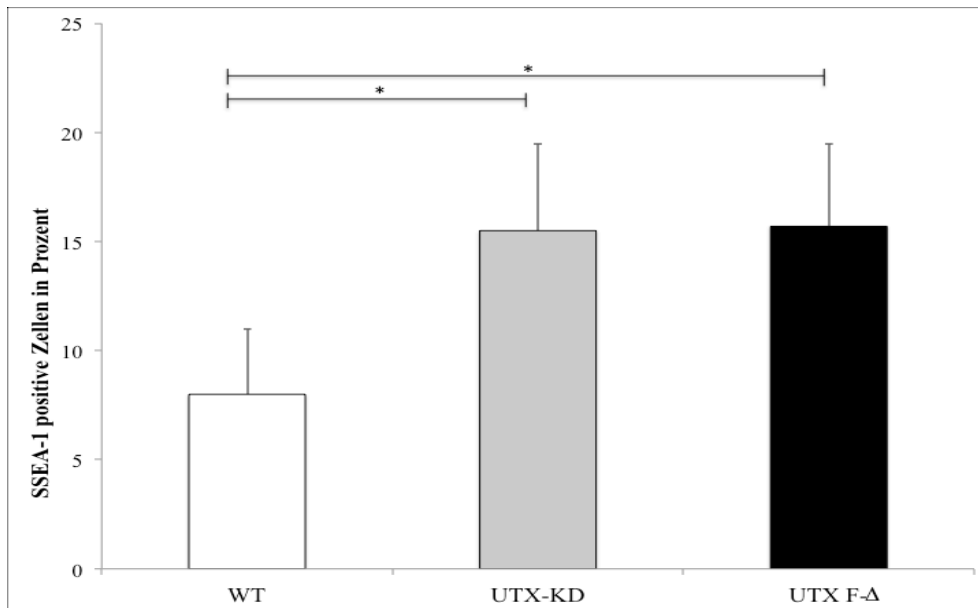
Zur Bestimmung des Anteils undifferenzierter, pluripotenter Zellen in Teratomen wurde in histo-chemischen Färbungen der SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen-1; CD 15) Oberflächenmarker, der u.a. auf pluripotenten Zellen exprimiert ist, eingesetzt. Ein alternativer Oberflächenmarker zur Darstellung von pluripotenten Zellen ist der Oct4-Antikörper, der jedoch in dieser Arbeit, aufgrund nicht zufriedenstellenden Ergebnissen in der Immunfluoreszenzfärbung, verwendet wurde. Hierzu wurden sowohl Paraffin- als auch Gefrier-Schnitte von Teratom-Material



angefertigt und mit einem SSEA-1-spezifischen mAK gefärbt. SSEA-1 ist u.a. ein Stadien - spezifisches Protein pluripotenter Stammzellen, das eine wichtige Rolle bei der Wanderung und Adhäsion von Zellen im frühen Präimplantations - Embryo spielt (Fox, Damjanov, Martinez-Hernandez, Knowles, & Solter, 1981). Des weiteren spielt SSEA-1 in der Lymphomdiagnostik eine große Rolle (Leong, Cooper, & Leong, 2010).

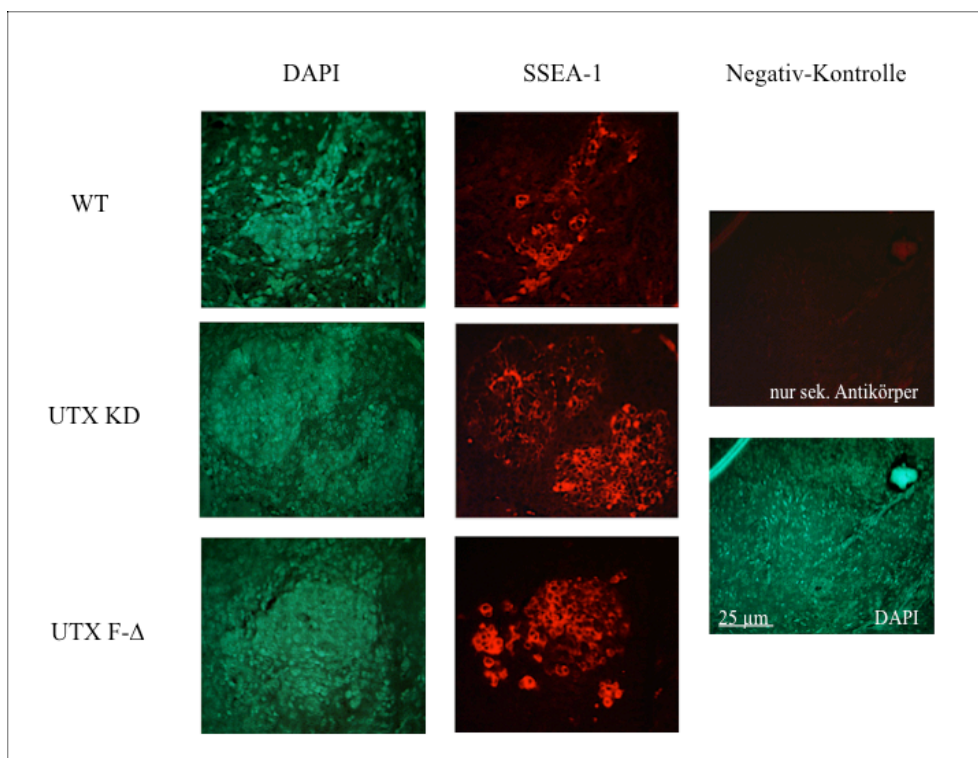
Wiederum wurden drei Chargen von Teratomen (Kdm6a - hypomorphe-, Knockdown- und Knockout-Linien) untersucht. In Teratomen konnte nach Beeinträchtigung der UTX-Expression eine deutliche Zunahme der SSEA-1-Färbung festgestellt werden. Wie in den Abbildungen 3.6 und 3.7 zu sehen ist, führte die Abnahme der Expression in ES-Zellen mit hypomorphem UTX-Allel, nach UTX-Knockdown oder UTX-Inaktivierung zu einer statistisch signifikanten Zunahme SSEA-1 positiver Zellen.

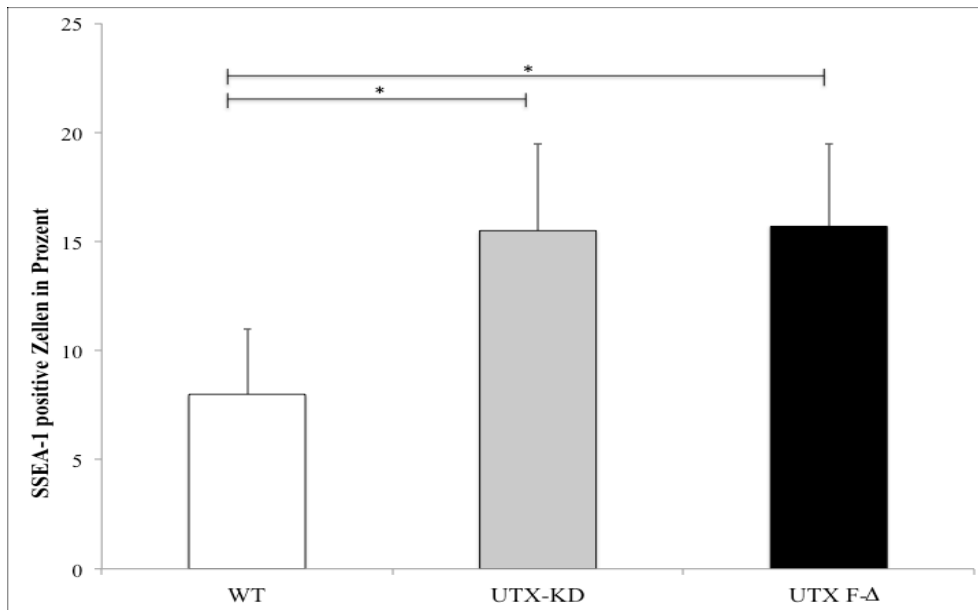




**Abb. 3.6 Histochemische SSEA-1 Färbungen von Teratomen mit hypomorpher *Kdm6a* Expression.**

In Paraffin eingebettete 20 µm Schnitte (2x wt, 2x UTX F-loxP#1, 3x UTX F-loxP#2) von Teratomen wurden ent – paraffiniert, mit einem SSEA-1 spezifischen AK gefärbt und dieser mit einem Cy 3 markierten Sekundär-AK detektiert (rot). Schließlich wurden die Schnitte zur Kerndarstellung mit DAPI gegengefärbt. Als Negativ-Kontrolle (rechte Färbung oben) wurden Schnitte nur mit dem Sekundär-AK gefärbt (p-value: \*  $p \leq 0,05$ ).





**Abb. 3.7 Histochemische SSEA-1 Färbung von Wildtyp-Teratomen und von Teratomen, in denen die Expression des *Kdm6a*-Gens mittels Knockdown bzw. mittels Cre-vermittelter Inaktivierung vollständig inaktiviert wurde.**

20 µm Gefrierschnitte von Teratommaterial (3x wt, 3x UTX-KD, 3x UTX F-Δ) wurden mit einem SSEA-1 - spezifischen mAK gefärbt, der mittels eines Cy3 - markierten AK detektiert wurde. Schließlich wurden die Präparate mit DAPI zur Kerndarstellung gegengefärbt. Als Negativ-Kontrolle (Färbung rechts oben) wurden wiederum Präparate nur mit dem zweiten AK gefärbt (p-value: \*  $p \leq 0,05$ ).

### 3.5 Expressionsanalyse entwicklungspezifischer Indikatorgene mittels quantitativer Real-Time-PCR Assays

Histon-Methylierung bzw. -Demethylierung kann - in Gen-spezifischer Weise - die Aktivität an Genen entweder erhöhen oder herabsetzen (Shpargel et al., 2012). Um die Expression individueller Gene in unterschiedlichen Teratomen miteinander zu vergleichen, wurden quantitative Real-Time-PCR-Assays unter Verwendung Gen-spezifischer Primer durchgeführt.

Zudem wurde durch den Einsatz des Oberflächenmarkers SSEA-1 beobachtet (Kapitel 3.4), dass im Vergleich zum Wildtyp in Zellen in denen UTX vollständig inaktiviert ist, eine signifikant erhöhte Anzahl von pluripotenten Zellen zu finden ist. Um dieses Ergebnis weiter zu untersuchen ist die Durchführung von Real-Time-PCR-Assays von

besonderer Bedeutung.

Das molekulare Pluripotenz-Netzwerk von ES-Zellen wird maßgeblich durch die Expression weniger Schlüssel-Gene bestimmt (Morey, Santanach, & Di Croce, 2015). Im Zentrum der Regulation dieses Pluripotenz-Netzwerks befinden sich die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog. Für die Bestimmung der Teratom-Differenzierung in ektodermales, endodermales und mesodermales Gewebe untersuchten wir die Expression der *Pax5* und *Nes* – Gene (Ektoderm), *Gata4*, *Gata6*, *Foxa2* und *Sox17* – Gene (Endoderm), und der *Fgf5*, *T* (brachyury) und *Flk1* – Gene (Mesoderm).

*Pax5* ist ein Transkriptionsfaktor, der in zahlreichen B-Zell Neoplasien, wie im Hodgkin Lymphom, in lymphoblastischen B-Zell Leukämien und B-Zell Lymphomen stark exprimiert wird (Desouki, Post, Cherry, & Lazarchick, 2010).

*Nes* ist ein Intermediärfilament-Protein, welches vor allem in den frühen Entwicklungsstadien des CNS, PNS und in der Muskelentwicklung exprimiert wird. Zudem ist es ein Marker für Zellproliferation und Zellmigration. (Michalczyk & Ziman, 2005).

*Gata4* gehört zu einer Genfamilie von Zink Finger Proteinen. Mutationen in diesem Gen gehen einher mit schweren kardialen Septumdefekten, Pulmonalklappenstenosen und embryonalen Mißbildungen (Orjuela Quintero, Nunez, Caicedo, Pachon, & Salazar Salazar, 2014).

*Gata6*, welches, wie *Gata4* zu einer Gen-Familie von Zink Finger Proteinen gehört, ist ebenfalls in die Herzentwicklung involviert. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesem Gen kongenitale Herzdefekte auslösen (Teil des DiGeorge-Syndroms) (X. Wang et al., 2014).

*Foxa2* Protein ist ein Transkriptionsfaktor, welcher einen großen Einfluss auf die Entwicklung verschiedenster Gewebe/Organe endodermalen Ursprungs hat, wie Lunge Leber, Pankreas und Intestinum (Besnard, Wert, Hull, & Whitsett, 2004; Gao et al., 2008).

*Sox17* gehört zur SOX-Genfamilie. Es ist ein HMG-box Transkriptionsfaktor und ein Wnt Signalantagonist. Es ist in der embryonalen Entwicklung ein Schlüsselbestandteil für die Gastrulation in Wirbeltieren, sowie in der Entwicklung des menschlichen Urintrakts und

der Nierenentwicklung (Sinner, Rankin, Lee, & Zorn, 2004).

*T (Brachyury)* spielt besonders in der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle. Es ist für die Ausbildung der anterior-posterior Achse zuständig (Lartillot, Lespinet, Vervoort, & Adoutte, 2002).

*Flk1* gehört zur Familie der "vascular endothelial growth factors" (VEGF). Es ist ein Mesodermmarker (Yamaguchi, Dumont, Conlon, Breitman, & Rossant, 1993) und für die Entwicklung des vaskulären System verantwortlich. Zudem ist *Flk1* der früheste Differenzierungsmarker für Endothel und Blutzellen (Eichmann et al., 1997; Shalaby et al., 1995).

*Fgf5* ist ein Protein der "fibroblast growth factor"-Familie. Es spielt ebenfalls in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle.

*Oct4*, *Nanog* und *Sox2* sind neben Myc und KLF4 Proteine, welche eine herausragende Rolle bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen in pluripotente Stammzellen spielen. Mit Hilfe von Retroviren wurden diese Gene in das Genom von somatischen Zellen eingeschleust. Durch dieses Experiment entstanden erstmals induzierte pluripotente Stammzellen (Takahashi & Yamanaka, 2006). *Oct4* gezeigt werden, dass in Mausembryos, welche eine niedrige *Oct4*-Expression aufwiesen, die Bildung der inneren Zellmasse ausblieb und ihre Pluripotenzfähigkeit verloren ging (Zaehres et al., 2005). Zudem wird *Oct4* auch als Stammzellmarker eingesetzt. Differenzierte Zellen zeigen eine deutlich reduzierte *Oct4*-Expression.

*Nanog* ist ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der in die Steuerung der Selbsterneuerungsprozess von Stammzellen involviert ist (Chambers et al., 2003). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass durch einen Knockout des *Nanog* Gens die Differenzierung von Maus-Stammzellen in endodermale Maus-Stammzellen angeregt wird. Eine Überexpression von *Nanog* bewirkt hingegen eine Selbsterneuerung der embryonalen Maus-Stammzellen (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003).

Später konnte jedoch gezeigt werden, dass *Nanog* für die Erzeugung von Stammzellen aus Fibroblasten entbehrlich ist (Yamanaka & Takahashi, 2006).

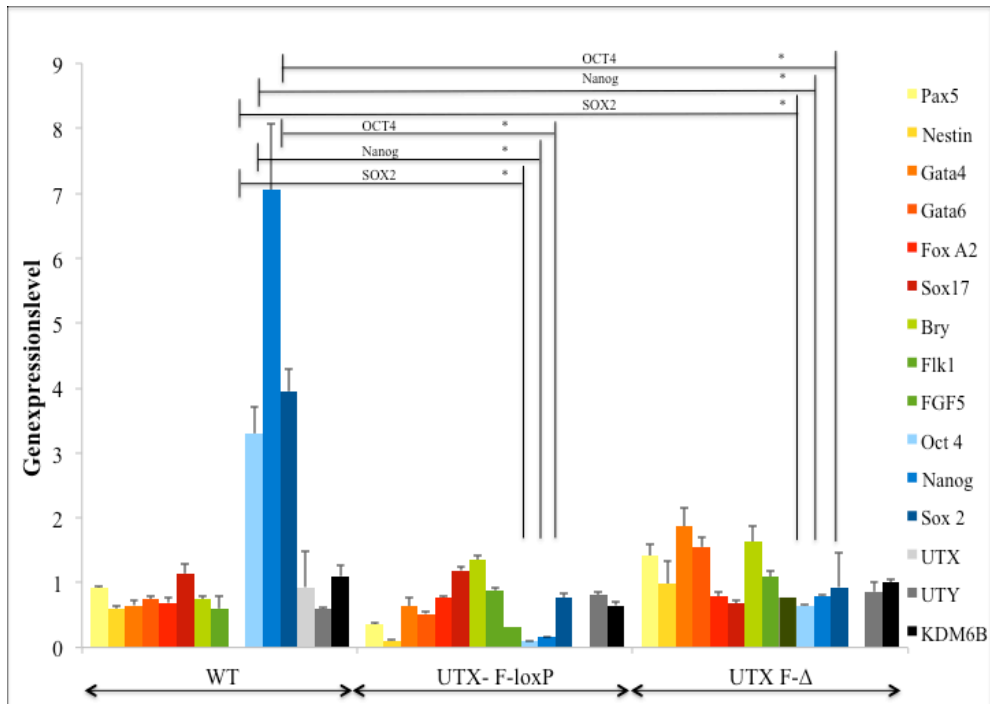
*Sox2* ist ein Transkriptionsfaktor, der für den Erhalt der Selbsterneuerung von Stammzellen essentiell ist. Er ist nicht nur für den Erhalt der

Pluripotenz von Stammzellen verantwortlich sondern auch für die Neurogenese (Graham, Khudyakov, Ellis, & Pevny, 2003).

Als Kontrollen wurden PCR – Assays durchgeführt, die die Expression der *Kdm6a*, *Uty* und *Kdm6b* Gene (siehe Kapitel 1.4) anzeigen sollten. Mittels genspezifischer RT PCR Primer wurden je zwei Teratom-Linien untersucht, und zwar eine Linie mit hypomorpher *Kdm6a*-Expression (UTX F-loxP) und eine Linie mit Cre-vermittelter Inaktivierung des *Kdm6a* – Gens (UTX F-Δ). Zur Analyse der ersten Linie wurden zwei individuelle Teratomklone, zur Analyse der zweiten Linie wurden vier Klone herangezogen. Die Ergebnisse der PCR – Assays sind in Abb. 3.8 dargestellt.

Wie man in Abb. 3.8 sehr gut sehen kann wurde lediglich in den Wildtyp-Teratomen das *Kdm6a*-Gen exprimiert. Die *Kdm6a*-Expression ist in UTX FloxP und in UTX F-Δ sehr stark reduziert. Es handelt sich damit um einen sehr selektiven Knockout.

Aufgrund der vorherigen SSEA-1 Ergebnisse zeigte die Auswertung der Genexpressionsanalysen in den Zellen mit vollständiger Inaktivierung des *Kdm6a*-Gens unerwartet eine markante Abnahme der Genexpression der Pluripotenz-Gene, die für Oct4, Nanog und Sox2 kodieren. Wie in Abb. 3.8 dargestellt ist beobachteten wir eine 3-4 fache Abnahme der Expression dieser Gene in UTX F-Δ Zellen, verglichen mit Wildtyp-Zellen. In den Zellen mit *Kdm6a*-Knockdown wurde sogar eine noch deutlichere Abnahme der Pluripotenz-Gene festgestellt. Diese Befunde zeigen, dass das Fehlen von *Kdm6a* mit einer Abnahme der Expression spezifischer Gene – vor allem solcher, die die Pluripotenz kontrollieren - in Verbindung steht.



**Abb. 3.8** Quantitative Real-Time-PCR Assays zur Bestimmung der RNA Expression entwicklungsspezifischer Gene in Teratomen.

Rechts sind die Gene dargestellt, für die spezifische Primer in den RT PCR-Analysen eingesetzt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchung von zwei (Wildtyp- und UTX F-loxP) Teratomen bzw. vier (UTX F-Δ) individuellen Teratomklonen.

(p-value: \*  $p \leq 0,05$ )

### 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wir beobachteten, dass in allen entstandenen Teratomen, ob aus Wildtyp-, Knockdown- oder Knockout-ES-Zellen, alle drei Keimblätter ausgebildet wurden. In der histologischen Gewebsquantifizierung konnten zum Teil deutliche Unterschiede in den Gewebsformationen festgestellt werden. Im Wildtyp wurde signifikant mehr Muskelgewebe gebildet wie im Vergleich zu den Knockout. In TUNEL-Färbungen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von apoptotischen Zellen in verschiedenen Teratomarten, jedoch im Proliferations- und Pluripotenzverhalten der Wildtyp-, Knockdown- und Knockout-Zellen. Vor allem in Zellen, in denen Kdm6a vollständig inaktiviert wurde, gab es im Vergleich zum Wildtyp ein signifikant höheres Proliferations- und Pluripotenzverhalten.

In den anschließend durchgeführten Real-Time-PCR-Assays, waren die Gene, welche die Marker für die Pluripotenz einer Zellen sind - *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* in Teratomen, die aus Wildtyp-ES-Zellen entstanden, stark exprimiert, jedoch wurden in Teratomen, die aus *Kdm6a*-Knockout- bzw. Knockdown-ES-Zellen entstanden, eine 3-10 fache Abnahme der Expression dieser Gene festgestellt. Das zeigt, dass die Aktivität von *Kdm6a* an der Erhaltung der Pluripotenz in Teratomen maßgeblich beteiligt ist.

#### **4. Diskussion**

Aufgabenstellung dieser Arbeit war, die funktionellen Auswirkungen des „Knockdown“ bzw. „Knockout“ der Histon-Demethylase *Kdm6a* (UTX) in ES-Zellen auf die Bildung von Keimbahntumoren (Teratomen) der Maus auf zellulärer und molekularer Ebenen zu untersuchen.

Im Detail sollte in diesen experimentellen Arbeiten analysiert werden, wie sich als Folge des „Knockdown“ bzw. „Knockout“ des *Kdm6a*-Gens die Histologie, das immun-histochemische Färbeverhalten und die Genexpression in den ES-Zellen während der Teratom-Bildung veränderten. Anhand von HE-Färbungen der Paraffinschnitte von Teratomen wurde die Differenzierung der Teratome in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm charakterisiert. Immunhistochemische Färbungen von PCNA und SSEA-1, d.h. von Proliferations- und Pluripotenz-Markern, sowie TUNEL-,staining‘, als Apoptose-Assay, dienten dazu, die Proliferation, Pluripotenz und Apoptose der hinsichtlich *Kdm6a* manipulierten ES-Zellen zu untersuchen. Schließlich wurde mittels RT-PCR-Assays die RNA-Konzentrationen und damit die Expression ausgewählter Gene, die eine wichtige Rolle bei der Teratombildung spielen, analysiert.

Als wichtigstes Resultat der experimentellen Arbeiten sollen die mittels der RT-PCR-Assays erhaltenen Resultate herausgestellt und im Detail diskutiert



werden. Diese Assays erlauben eine genaue Quantifizierung der in den manipulierten ES-Zellen gebildeten RNA. Dabei wurde durch den Einsatz Gen-spezifischer Primer die Expression von 15 Genen bestimmt. Dazu gehören die Pluripotenz-Gene *Oct4*, *Nanog* und *Sox2*, sowie für einzelne Keimblätter spezifische Gene. Das sind die *Fgf5* („fibroblast growth factor 5“), *T (brachyury)* und *Kdr (Flk1)* Gene für das Mesoderm, die *Gata4*, *Gata6*, *Foxa2* und *Sox17* Gene für Endoderm, und die *Pax5* und *Nes* (Nestin) Gene für Ektoderm. Des Weiteren wurden als Kontrollen Primer für die Expression der *Kdm6a*, *Kdm6b* und *Uty* Gene verwendet.

Wie erwartet fand man in den *Kdm6a*-Knockout-ES-Zellen (UTX F- $\Delta$  Zellen) keinerlei *Kdm6a* RNA. Eine ähnliche *Kdm6a* RNA-Defizienz stellten wir auch für ES-Zellen (UTX F-loxP Zellen) fest, die eine hypomorphe *Kdm6a*-Expression zeigen (Abb. 3.8). Des Weiteren wurden kaum Veränderungen in der Expression der „Kontroll-Gene“ *Kdm6b* und *Uty* festgestellt, deren Expression somit durch Veränderungen in der *Kdm6a*-Expression nicht betroffen wird. Ähnliches gilt auch für die oben angeführten Keimblatt-spezifischen Gene, deren Expression gleichfalls in Abb. 3.8 dargestellt ist.

Lediglich im Falle der Endoderm-spezifischen *Gata4* und *Gata6* Gene wurde eine leichte 2-3 fache Zunahme der Transkripte in UTX F- $\Delta$  „Knockout“ Zellen beobachtet. Das trifft auch für das Mesoderm-spezifische *T (brachyury)* Gen zu, dessen RNA sowohl in den UTX F- $\Delta$  „Knockout“ als auch in den UTX F-loxP „Knockdown“ Zellen etwa 2 mal stärker als in Wildtyp-ES-Zellen exprimiert wurde. Es ist z. Z. unklar, worauf dieser -allerdings statistisch nicht signifikante Unterschied - zurückzuführen ist.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist die *Kdm6a* Demethylase für die ES-Zell-Differenzierung von großer Bedeutung. Eine Ausschaltung/Reprimierung der *Kdm6a* Demethylase in „Knockout/Knockdown“-Zellen hat zur Folge, dass die manipulierten ES-Zellen ihre Pluripotenz verlieren. Wie erwartet gab es eine starke Repression der Genexpression bei den Pluripotenz-Genen *Oct4*, *Sox2* und

*Nanog*. Wie in Abb. 3.8 durch die relativ hohen RNA-Konzentrationen dokumentiert, werden diese Gene in Wildtyp- ES-Zellen stark exprimiert, während in den manipulierten ES-Zellen nur geringe Mengen ihrer Transkripte festgestellt wurden. Dem gegenüber stehen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von der „Knockout“- bzw. „Knockdown“-Zellen, in denen eine höhere Anzahl an SSEA-1 positiven Zellen festgestellt wurde. In den „Knockout“- und „Knockdown“-ES-Zellen wurde unerwartet ein signifikant höherer prozentualer Anteil an SSEA-1 - positiven Zellen beobachtet. Dem steht gegenüber, dass in den Wildtyp-ES-Zellen die Expression der Pluripotenzmarker deutlich vermehrt, in den „Knockout“-Zellen jedoch deutlich vermindert exprimiert wurden. SSEA-1 ist jedoch nicht nur ein Marker für das Pluripotenzverhalten in ES-Zellen, sondern wird auch in fötalen und adulten Gewebe (Yamamoto, Boyer, & Schwarting, 1985) sowie in Lymphomen (über-)exprimiert (Leong et al., 2010). Die Ergebnisse der SSEA-1-Färbungen sind in Abb. 3.6 und 3.7 dargestellt. Zudem kann man in den „Knockout“-Zellen einen moderaten Anstieg der Pax5-Expression sehen. Pax5 ist nicht nur ein ektodermaler Marker, sondern auch ein Marker von B-Zell Neoplasien (Ambrosio et al., 2015). Des weiteren ist bekannt, dass UTX als ALL-Tumorsuppressorgen fungiert (Van der Meulen et al., 2015), wodurch *KDM6a*-Knockout-ES-Zellen eine höhere Wahrscheinlichkeit haben als Tumore zu „entarten“.

Obwohl durch die experimentellen Arbeiten nicht direkt bewiesen, so darf man jedoch annehmen, dass durch den Verlust bzw. die Abnahme der Kdm6a-Aktivität die Expression der Pluripotenz-Gene durch H3K27-Methylierungen abgeschaltet wird (Morales Torres et al., 2013). Andere Autoren haben eine direkte Bindung von Kdm6a an die proximale *Pou5f1*/Oct4-Promoterregion nachgewiesen (C. Wang et al., 2012). Weitere Arbeiten zeigen, dass Oct4, Sox2, Nanog während der Differenzierung K27 methyliert werden (Varagnolo et al., 2015). Somit ist wahrscheinlich, dass Kdm6a in ES-Zellen durch Demethylierung von Histon 3 am K27-Rest eine starke Oct4-Expression erlaubt. Fehlt nun die Kdm6a-Expression, so wird H3K27 in der Oct4-Promoterregion methyliert und das *Pou5f1*-Gen wird – z.B. durch die Bindung repressiv wirkender Polycomb-Komplexe (Pietersen & van Lohuizen, 2008) – abgeschaltet. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist

das bisher nicht direkt gezeigt worden. Entsprechende ChIP (Chromatin Immun-Präzipitations-) Assays unter Verwendung H3K27me2/3-spezifischer AK wären die methodische Herangehensweise, dies experimentell zu beweisen.

Interessanterweise binden die Pluripotenz-Faktoren Oct4, Sox2 und Nanog in ES-Zellen zusammen mit repressiv wirkenden Polycomb-Proteinen an eine Vielzahl (von 500 und mehr) Gene, die bei der Gewebsdifferenzierung eine wichtige Rolle spielen (Boyer et al., 2006). Beispiele dafür sind nicht nur die Hox-Gene, sondern auch viele andere Gene, deren Expression in ES-Zellen zwar durch repressive Polycomb-Komplexe unterdrückt wird, die jedoch in einem ‚poised state‘ anzutreffen und somit stark für spätere Aktivierung sind.

In weiteren Untersuchungen wurde beobachtet, dass in den Teratomen alle drei Keimblätter – Endoderm, Ektoderm und Mesoderm - ausgebildet wurden. Der ‚Knockdown‘ bzw. der ‚Knockout‘ hatte bei der Ausbildung der Keimblätter keinen bzw. nur einen marginalen Effekt, d.h. die Gewebe aller drei Keimblätter wurden auch bei verminderter *Kdm6a*-Expression gebildet. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen zeigten vor allem die Bildung von Geweben zweier Keimblätter, d.h. von Drüsen- (Endoderm) sowie von Knorpel- und Muskelgewebe (Mesoderm). Demgegenüber wurde die Ausbildung von ektodermalem Gewebe, wie von Neuronen, nur in wenigen Fällen beobachtet, so dass auf eine Quantifizierung verzichtet wurde.

Die Ergebnisse der „Knockdown“-Experimente zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Bildung endodermalen und mesodermalen Gewebes (Abb. 3.1 und 3.2). Im Gegensatz dazu wurden signifikante Unterschiede bei der Bildung von endodermalen und mesodermalen Gewebes nach vollständiger Inaktivierung des *Kdm6a*-Gens (in UTX F-D) festgestellt. Wie in Abb. 3.2 dargestellt ist führte das Fehlen der *Kdm6a*-Expression zu einer deutlichen Abnahme des Knorpel- und Muskelgewebes. Diese Befunde stimmen gut mit publizierten Daten überein, die zeigen, dass die Inaktivierung des *Kdm6a*-Genes zu einer verminderten Bildung

mesodermaler Gewebe nach Differenzierung von ES-Zellen führte (C. Wang et al., 2012).

Des Weiteren wurden die bei verminderter Kdm6a-Expression in den Teratomen gebildeten Gewebe histochemisch hinsichtlich Proliferation (PCNA-Färbung), Pluripotenz (SSEA1-Färbung) und Apoptose (TUNEL-Färbung) untersucht.

Während mittels TUNEL-Assays keine Zunahme in der Apoptose-Induktion beobachtet wurde (Abb. 3.8), stellte sich mittels PCNA-Färbungen eine deutliche Zunahme der Proliferation von ES-Zellen dar, in denen die Kdm6a-Expression gehemmt wurde (siehe Abb. 3.4 und 3.5). Es ist z. Z. unklar, welche Gene in den ES-Zellen durch die Abnahme der Demethylase-Aktivität betroffen sind. So ist vorstellbar, dass die Aktivität von Zell-Zyklus-Inhibitoren, wie p21, p27 und anderen, durch die Zunahme der H3K27-Methylierung gehemmt und dadurch die Proliferation unterstützt wird. Direkt gezeigt worden ist das für dem INK4b-ARF-INK4a locus, der für die Zellzyklusinhibitoren p16<sup>INK4A</sup> und p19<sup>ARF</sup> kodiert (Mu, Starmer, Fedoriw, Yee, & Magnuson, 2014).

Zusammenfassend lässt sich auch anhand unserer Daten konstatieren, dass die Demethylaseaktivität von Kdm6a die Aktivität wichtiger Pluripotenzgene in ES-Zellen aufrecht erhält. Somit ist Kdm6a ein wichtiger Schalter für die Differenzierung der Embryonalstammzellen.

## **5. Zusammenfassung**

Pluripotente Zellen sind sowohl in der Stammzellforschung als auch für regenerative Therapieansätze von großer Bedeutung. Erste Stammzelltherapien sind bereits erfolgreich am Menschen durchgeführt worden. Besonders wichtig ist die Sicherheit der Therapie, um Risiken, wie die „Entartung“ von Stammzellen zu Tumorzellen, zu minimieren. Als Ansatzpunkt für einheitliche Therapie-Standards, sind z.B. genaue Angaben zur Anzahl injizierter Zellen, dem Injektionsort und Biomarker (wie Pluripotenz- und Differenzierungs-Marker) zur Kategorisierung der Stammzellen zu nennen. Während der Embryonalentwicklung spielen die Polycomb-Proteinkomplexe PCR1 und PCR2 eine maßgebliche Rolle beim

Aufrechterhalten der Pluripotenz, weil sie Chromatin-Modifikationen, wie z.B. Histonmethylierungen vermitteln und so die Genexpression kontrollieren können. Lange Zeit wurde angenommen, dass Histon-Methylierungen irreversibel sind, doch mit Entdeckung der Lysin-spezifischen Demethylase 1 (LSD1) wurde diese Sichtweise revidiert. Ein Mitglied der derzeit bekannten 32 Histon-Demethylasen ist Kdm6a (UTX), die die Histon-Demethylierung des Lysins an der Aminosäure-Position 27 von Histon H3 (H3K27me<sub>2/3</sub>) katalysiert. Kdm6a spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und wurde in der hier vorgestellten Arbeit am Teratommodell, einem benignen Keimzelltumor, untersucht.

In dieser Arbeit wurden Teratome von Mäusen untersucht, die aus embryonalen Stammzellen (ESC) mit Wildtyp- und shRNA vermittelter reduzierter Expression oder durch genetisch kontrollierten Knockdown sowie Knockout entstanden sind. Diese wurden anschließend nach histologischen (H&E-Färbungen), histochemischen (PCNA-, SSEA-1- und TUNEL-Färbungen) sowie Analyse der Genexpressionsmuster aller drei Keimblätter mittels RT-PCR untersucht und ausgewertet.

Sowohl Wildtyp als auch Kdm6a-Knockdown und Knockout-Teratome bildeten Gewebe der drei Keimblätter aus. In Teratomen mit supprimierter *Kdm6a*-Expression gab es jedoch Unterschiede in der Bildung mesodermaler und endodermaler Gewebe mit einer signifikanten Abnahme von Knorpel- und Muskelgewebe. Da sich Kdm6a-defiziente Teratome zu wesentlich größeren Tumoren als Wildtyp-Teratome entwickelten, wurde deren Proliferations-, Pluripotenz- und Apoptose-Verhalten mittels PCNA und SSEA-1 und TUNEL histochemischen Färbungen untersucht. Wir beobachteten in Knockout-Teratomen eine höhere Anzahl von PCNA- und SSEA-1-positiven Zellen. Daraus folgt, dass Kdm6a-defiziente ESCs - im Gegensatz zu Wildtyp ESCs - zur Bildung von Teratomen mit einer höheren Anzahl von proliferierenden und pluripotenten Zellen neigen. In der Fraktion apoptotischer Zellen (TUNEL positiver Zellen) der Kdm6a-defizienten Teratome gab es keinen signifikanten Unterschied zu Teratomen, die aus Wildtyp-ESCs entstanden.

Nach Analyse der Genexpressionsmuster fanden wir in Zellen, in denen Kdm6a reprimiert bzw. deaktiviert wurde, einen Verlust der Pluripotenz und folglich eine starke Reduzierung der Pluripotenzmarker Oct4, Sox2 und

Nanog. Die Analyse des Genexpressionsmusters läßt vermuten, dass der Verlust bzw. die Abnahme der Kdm6a-Aktivität in direkten Zusammenhang mit einer Abnahme der Pluripotenz durch Methylierung von H3K27 steht. Weitere Analysen, z.B. durch ChIP (Chromatin Immun-Präzipitations-) Assays mit H3K27me2/3 spezifischen Antikörpern, sind nötig, um dies endgültig zu beweisen. Unsere Arbeiten zeigten, dass die Kdm6-Demethylase-Aktivität essentiell für den Erhalt der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen ist.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ambrosio, M. R., De Falco, G., Rocca, B. J., Barone, A., Amato, T., Bellan, C., . . . Leoncini, L. (2015). Langerhans cell sarcoma following marginal zone lymphoma: expanding the knowledge on mature B cell plasticity. *Virchows Arch*. doi: 10.1007/s00428-015-1814-8
- Aziz, A., Liu, Q. C., & Dilworth, F. J. (2010). Regulating a master regulator: establishing tissue-specific gene expression in skeletal muscle. *Epigenetics*, 5(8), 691-695. doi: 10.4161/epi.5.8.13045
- Bartova, E., Krejci, J., Harnicarova, A., Galiova, G., & Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem*, 56(8), 711-721. doi: 10.1369/jhc.2008.951251
- Besnard, V., Wert, S. E., Hull, W. M., & Whitsett, J. A. (2004). Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues. *Gene Expr Patterns*, 5(2), 193-208. doi: 10.1016/j.modgep.2004.08.006
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., . . . Jaenisch, R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 441(7091), 349-353. doi: 10.1038/nature04733
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A., & Macdonald-Bravo, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326(6112), 515-517. doi: 10.1038/326515a0
- Bustamante-Marin, X., Garness, J. A., & Capel, B. (2013). Testicular teratomas: an intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology. *Int J Dev Biol*, 57(2-4), 201-210. doi: 10.1387/ijdb.130136bc
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643-655.
- Chung, P. H., & Yao, M. C. (2012). Tetrahymena thermophila JMJD3 homolog regulates H3K27 methylation and nuclear differentiation. *Eukaryot Cell*, 11(5), 601-614. doi: 10.1128/EC.05290-11
- Croft, J. A., Bridger, J. M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., & Bickmore, W. A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*, 145(6), 1119-1131.
- Dalgliesh, G. L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., . . . Futreal, P. A. (2010). Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*, 463(7279), 360-363. doi: 10.1038/nature08672
- Desouki, M. M., Post, G. R., Cherry, D., & Lazarchick, J. (2010). PAX-5: a valuable immunohistochemical marker in the differential diagnosis of lymphoid neoplasms. *Clin Med Res*, 8(2), 84-88. doi: 10.3121/cmr.2010.891
- Eichmann, A., Corbel, C., Nataf, V., Vaigot, P., Breant, C., & Le Douarin, N. M. (1997). Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad*

*Sci U S A*, 94(10), 5141-5146.

- Fox, N., Damjanov, I., Martinez-Hernandez, A., Knowles, B. B., & Solter, D. (1981). Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal and adult tissues. *Dev Biol*, 83(2), 391-398.
- Gao, N., LeLay, J., Vatamaniuk, M. Z., Rieck, S., Friedman, J. R., & Kaestner, K. H. (2008). Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev*, 22(24), 3435-3448. doi: 10.1101/gad.1752608
- Goldring, C. E., Duffy, P. A., Benvenisty, N., Andrews, P. W., Ben-David, U., Eakins, R., . . . Park, B. K. (2011). Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell*, 8(6), 618-628. doi: 10.1016/j.stem.2011.05.012
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., & Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39(5), 749-765.
- Grant, P. A. (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biol*, 2(4), REVIEWS0003.
- Herz, H. M., Mohan, M., Garruss, A. S., Liang, K., Takahashi, Y. H., Mickey, K., . . . Shilatifard, A. (2012). Enhancer-associated H3K4 monomethylation by Trithorax-related, the Drosophila homolog of mammalian Mll3/Mll4. *Genes Dev*, 26(23), 2604-2620. doi: 10.1101/gad.201327.112
- Issaeva, I., Zonis, Y., Rozovskaia, T., Orlovsky, K., Croce, C. M., Nakamura, T., . . . Canaani, E. (2007). Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. *Mol Cell Biol*, 27(5), 1889-1903. doi: 10.1128/MCB.01506-06
- Jankowska, A. M., Makishima, H., Tiu, R. V., Szpurka, H., Huang, Y., Traina, F., . . . Maciejewski, J. P. (2011). Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*, 118(14), 3932-3941. doi: 10.1182/blood-2010-10-311019
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., . . . Muller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev*, 20(9), 1110-1122. doi: 10.1101/gad.377406
- Kondo, Y., Shen, L., Cheng, A. S., Ahmed, S., Boumber, Y., Charo, C., . . . Issa, J. P. (2008). Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*, 40(6), 741-750. doi: 10.1038/ng.159
- Kooistra, S. M., & Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(5), 297-311. doi: 10.1038/nrm3327
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005
- Ku, M., Koche, R. P., Rheinbay, E., Mendenhall, E. M., Endoh, M., Mikkelsen, T. S., . . . Bernstein, B. E. (2008). Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet*, 4(10), e1000242. doi: 10.1371/journal.pgen.1000242
- Landeira, D., Sauer, S., Poot, R., Dvorkina, M., Mazzarella, L., Jorgensen, H. F., . . . Fisher, A. G. (2010). Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. *Nat Cell Biol*, 12(6), 618-624. doi: 10.1038/ncb2065
- Lartillot, N., Lespinet, O., Vervoort, M., & Adoutte, A. (2002). Expression pattern of Brachyury in



- the mollusc *Patella vulgata* suggests a conserved role in the establishment of the AP axis in Bilateria. *Development*, *129*(6), 1411-1421.
- Lee, M. G., Villa, R., Trojer, P., Norman, J., Yan, K. P., Reinberg, D., . . . Shiekhhattar, R. (2007). Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science*, *318*(5849), 447-450. doi: 10.1126/science.1149042
- Lee, S., Lee, J. W., & Lee, S. K. (2012). UTX, a histone H3-lysine 27 demethylase, acts as a critical switch to activate the cardiac developmental program. *Dev Cell*, *22*(1), 25-37. doi: 10.1016/j.devcel.2011.11.009
- Leong, T. Y., Cooper, K., & Leong, A. S. (2010). Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol*, *17*(6), 404-418. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181f8957c
- Li, G., Margueron, R., Ku, M., Chambon, P., Bernstein, B. E., & Reinberg, D. (2010). Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev*, *24*(4), 368-380. doi: 10.1101/gad.1886410
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, *389*(6648), 251-260. doi: 10.1038/38444
- Mansour, A. A., Gafni, O., Weinberger, L., Zviran, A., Ayyash, M., Rais, Y., . . . Hanna, J. H. (2012). The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature*, *488*(7411), 409-413. doi: 10.1038/nature11272
- Mar, B. G., Bullinger, L., Basu, E., Schlis, K., Silverman, L. B., Dohner, K., & Armstrong, S. A. (2012). Sequencing histone-modifying enzymes identifies UTX mutations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *26*(8), 1881-1883. doi: 10.1038/leu.2012.56
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, *469*(7330), 343-349. doi: 10.1038/nature09784
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(11), 838-849. doi: 10.1038/nrm1761
- Michalczyk, K., & Ziman, M. (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*, *20*(2), 665-671.
- Miller, S. A., Mohn, S. E., & Weinmann, A. S. (2010). Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol Cell*, *40*(4), 594-605. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.028
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, *113*(5), 631-642.
- Morales Torres, C., Laugesen, A., & Helin, K. (2013). Utx is required for proper induction of ectoderm and mesoderm during differentiation of embryonic stem cells. *PLoS One*, *8*(4), e60020. doi: 10.1371/journal.pone.0060020
- Morey, L., Santanach, A., & Di Croce, L. (2015). Pluripotency and Epigenetic Factors in Mouse Embryonic Stem Cell Fate Regulation. *Mol Cell Biol*, *35*(16), 2716-2728. doi: 10.1128/MCB.00266-15
- Mu, W., Starmer, J., Fedoriw, A. M., Yee, D., & Magnuson, T. (2014). Repression of the soma-specific transcriptome by Polycomb-repressive complex 2 promotes male germ cell

- development. *Genes Dev*, 28(18), 2056-2069. doi: 10.1101/gad.246124.114
- Obier, N., Lin, Q., Cauchy, P., Hornich, V., Zenke, M., Becker, M., & Muller, A. M. (2015). Polycomb protein EED is required for silencing of pluripotency genes upon ESC differentiation. *Stem Cell Rev*, 11(1), 50-61. doi: 10.1007/s12015-014-9550-z
- Orjuela Quintero, D. C., Nunez, F., Caicedo, V., Pachon, S., & Salazar Salazar, M. (2014). [Mutations in the GATA4 gen in patients with non-syndromic congenital heart disease]. *Invest Clin*, 55(3), 207-216.
- Pasini, D., Bracken, A. P., Hansen, J. B., Capillo, M., & Helin, K. (2007). The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol*, 27(10), 3769-3779. doi: 10.1128/mcb.01432-06
- Pietersen, A. M., & van Lohuizen, M. (2008). Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol*, 20(2), 201-207. doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.004
- Priolo, M., Micale, L., Augello, B., Fusco, C., Zucchetti, F., Prontera, P., . . . Merla, G. (2012). Absence of deletion and duplication of MLL2 and KDM6A genes in a large cohort of patients with Kabuki syndrome. *Mol Genet Metab*, 107(3), 627-629. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.06.019
- Scheuermann, J. C., Gutierrez, L., & Muller, J. (2012). Histone H2A monoubiquitination and Polycomb repression: the missing pieces of the puzzle. *Fly (Austin)*, 6(3), 162-168. doi: 10.4161/fly.20986
- Schuettengruber, B., & Cavalli, G. (2009). Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development*, 136(21), 3531-3542. doi: 10.1242/dev.033902
- Seenundun, S., Rampalli, S., Liu, Q. C., Aziz, A., Palii, C., Hong, S., . . . Dilworth, F. J. (2010). UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *EMBO J*, 29(8), 1401-1411. doi: 10.1038/emboj.2010.37
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., & Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62-66. doi: 10.1038/376062a0
- Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y. J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., . . . Orkin, S. H. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell*, 32(4), 491-502. doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.016
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Cole, P. A., . . . Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119(7), 941-953. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.012
- Shpargel, K. B., Sengoku, T., Yokoyama, S., & Magnuson, T. (2012). UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. *PLoS Genet*, 8(9), e1002964. doi: 10.1371/journal.pgen.1002964
- Simon, J. A., & Kingston, R. E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(10), 697-708. doi: 10.1038/nrm2763
- Sinner, D., Rankin, S., Lee, M., & Zorn, A. M. (2004). Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate

- the transcription of endodermal genes. *Development*, *131*(13), 3069-3080. doi: 10.1242/dev.01176
- Stock, J. K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., . . . Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol*, *9*(12), 1428-1435. doi: 10.1038/ncb1663
- Sugita, S., Kamao, H., Iwasaki, Y., Okamoto, S., Hashiguchi, T., Iseki, K., . . . Takahashi, M. (2015). Inhibition of T-Cell Activation by Retinal Pigment Epithelial Cells Derived From Induced Pluripotent Stem Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *56*(2), 1051-1062. doi: 10.1167/iovs.14-15619
- Takahashi, Kazutoshi, & Yamanaka, Shinya. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Terashima, M., Ishimura, A., Yoshida, M., Suzuki, Y., Sugano, S., & Suzuki, T. (2010). The tumor suppressor Rb and its related Rbl2 genes are regulated by Utx histone demethylase. *Biochem Biophys Res Commun*, *399*(2), 238-244. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.061
- Terenziani, M., D'Angelo, P., Inserra, A., Boldrini, R., Bisogno, G., Babbo, G. L., . . . Cecchetto, G. (2015). Mature and immature teratoma: A report from the second Italian pediatric study. *Pediatr Blood Cancer*. doi: 10.1002/pbc.25423
- Thieme, S., Gyarfás, T., Richter, C., Ozhan, G., Fu, J., Alexopoulou, D., . . . Brenner, S. (2013). The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. *Blood*, *121*(13), 2462-2473. doi: 10.1182/blood-2012-08-452003
- Tie, F., Banerjee, R., Conrad, P. A., Scacheri, P. C., & 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*(12), 2323-2334. doi: 10.1128/MCB.06392-11
- Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C. A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., . . . Harte, P. J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development*, *136*(18), 3131-3141. doi: 10.1242/dev.037127
- Trounson. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med*. doi: 10.1186/1741-7015-9-52
- Uemura, M., Yamamoto, H., Takemasa, I., Mimori, K., Hemmi, H., Mizushima, T., . . . Mori, M. (2010). Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic marker for colorectal cancer: in vivo identification from hypoxic tumor cells. *Clin Cancer Res*, *16*(18), 4636-4646. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-10-0407
- Van der Meulen, J., Sanghvi, V., Mavrakis, K., Durinck, K., Fang, F., Matthijssens, F., . . . Van Vlierberghe, P. (2015). The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *125*(1), 13-21. doi: 10.1182/blood-2014-05-577270
- van Haften, G., Dalgliesh, G. L., Davies, H., Chen, L., Bignell, G., Greenman, C., . . . Futreal, P. A. (2009). Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet*, *41*(5), 521-523. doi: 10.1038/ng.349
- Varagnolo, L., Lin, Q., Obier, N., Plass, C., Dietl, J., Zenke, M., . . . Muller, A. M. (2015). PRC2 inhibition counteracts the culture-associated loss of engraftment potential of human cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells. *Sci Rep*, *5*, 12319. doi:

- Walker, E., Chang, W. Y., Hunkapiller, J., Cagney, G., Garcha, K., Torchia, J., . . . Stanford, W. L. (2010). Polycomb-like 2 associates with PRC2 and regulates transcriptional networks during mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*, 6(2), 153-166. doi: 10.1016/j.stem.2009.12.014
- Wang, C., Lee, J. E., Cho, Y. W., Xiao, Y., Jin, Q., Liu, C., & Ge, K. (2012). UTX regulates mesoderm differentiation of embryonic stem cells independent of H3K27 demethylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(38), 15324-15329. doi: 10.1073/pnas.1204166109
- Wang, X., Ji, W., Wang, J., Zhao, P., Guo, Y., Xu, R., . . . Sun, K. (2014). Identification of two novel GATA6 mutations in patients with nonsyndromic conotruncal heart defects. *Mol Med Rep*, 10(2), 743-748. doi: 10.3892/mmr.2014.2247
- Welstead, G. G., Creighton, M. P., Bilodeau, S., Cheng, A. W., Markoulaki, S., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2012). X-linked H3K27me3 demethylase Utx is required for embryonic development in a sex-specific manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(32), 13004-13009. doi: 10.1073/pnas.1210787109
- Whitcomb, S. J., Basu, A., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet*, 23(10), 494-502. doi: 10.1016/j.tig.2007.08.006
- Yamaguchi, T. P., Dumont, D. J., Conlon, R. A., Breitman, M. L., & Rossant, J. (1993). flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*, 118(2), 489-498.
- Yamamoto, M., Boyer, A. M., & Schwarting, G. A. (1985). Fucose-containing glycolipids are stage- and region-specific antigens in developing embryonic brain of rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(9), 3045-3049.
- Yamanaka, S., & Takahashi, K. (2006). [Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 51(15), 2346-2351.
- Zaehres, H., Lensch, M. W., Daheron, L., Stewart, S. A., Itskovitz-Eldor, J., & Daley, G. Q. (2005). High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23(3), 299-305. doi: 10.1634/stemcells.2004-0252
- Zhao, X. D., Han, X., Chew, J. L., Liu, J., Chiu, K. P., Choo, A., . . . Wei, C. L. (2007). Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 1(3), 286-298. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.004
- Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K. A., Lozach, J., . . . Rosenfeld, M. G. (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol Cell*, 29(1), 69-80. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.002