

Rolle der Polycomb Faktoren
PCGF6 und E2F6 in undifferenzierten und differenzierenden embryonalen
Stammzellen der Maus

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

vorgelegt von

Stefanie Strack
aus Koblenz

Würzburg, September 2021

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Gessler

Gutachter: Prof. Dr. Christian Janzen

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Rolle von PCGF6 und E2F6 in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) und zu Beginn der Differenzierung Knockout-Zelllinien beider Proteine und in Kombination durch das CRISPR/Cas9n Systems erstellt. Die Charakterisierung dieser Knockout-Zelllinien erfolgte durch Wachstumsanalysen in mESCs und differenzierenden murinen Stammzellen (EBs). Es konnte festgestellt werden, dass Zellen des *Pcgf6* Knockout (KO) kleinere Ebs bildeten, die zudem nicht über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden konnten. Zur Klärung dieses spezifischen Phänotyps wurden weitere molekulare Analysen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Zellen des *Pcgf6* KO wiesen während der Differenzierung einen erhöhten Anteil an Zellen in der G1-Phase sowie eine erhöhte apoptotische Frequenz auf. Unterstützend zur Annahme eines Zellzyklusdefekts wurden RNASeq-Daten analysiert. Die Auswertung ergab, dass Zellen des *Pcgf6* KO zeitlich unkontrolliert differenzierten. Die Auswertung differenziell exprimierter Gene ergab zudem, dass die Expression von *E2f6*, ein Regulator des Zellzyklus und weitere Untereinheit des nicht-kanonischen PRC1.6, in mESC und EB-Kulturen herunter reguliert war, während Zellzyklus-spezifische Targets der E2F6-abhängigen Genregulation an Tag 2 der Differenzierung hochreguliert waren. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine Deletion von *Pcgf6* zu Beginn der Differenzierung Auswirkungen auf eine E2F6-abhängige Zellzyklusregulation haben muss. Auf Grund einer zu diesem Zeitpunkt aufgetretenen Mykoplasmenkontamination in der Zellkultur musste die *Pcgf6* KO-Zelllinie neu erstellt werden. Zusätzlich wurden KO-Zelllinien von *E2f6* in Wt und in *Pcgf6* KO mESCs erstellt. Die anschließende Wiederholung der zellulären Charakterisierung des Phänotyps ergab, dass EB-Kulturen des *Pcgf6* KO und des Doppelknockout von *Pcgf6* und *E2f6* (dKO^{*Pcgf6/E2f6*}) während der Differenzierung eine verringerte Zellzahl aufwiesen. Die molekularen Charakterisierungen des Phänotyps ergaben, dass der erhöhte Anteil an Zellen in der G1-Phase des *Pcgf6* KO, welche vor der Mykoplasmenkontamination detektiert wurde, nicht reproduziert werden konnte. Es wurde jedoch eine erhöhte Frequenz an Zellen in der G2-Phase des dKO^{*Pcgf6/E2f6*} in der mESC- und EB-Kultur ermittelt. Die Analyse der apoptotischen Frequenz in allen KO-Zelllinien zeigte einen Anstieg während der Differenzierung. Zur Unterstützung der bis dahin durchgeführte Analysen wurden RNASeq-Daten zweier Publikationen zu PCGF6 und E2F6 herangezogen (Qui et al., 2021; Dahlet et al, 2021). Gene Ontology Enrichment Analysen dieser Daten ergaben, dass in beiden KO-Zelllinien in mESCs unabhängig voneinander Keimbahngene hochreguliert waren. Beide KO-Zelllinien zeigten aber auch eine Schnittmenge gemeinsam hochregulierter

Keimbahngene. In Anlehnung an diese Veröffentlichungen, ergaben Genexpressionsanalysen einzelner Keimbahngene, dass ein Verlust von *E2f6* zu einer De-Repression von Genen führt, die eine Bindestelle für E2F6 besitzen. Der Verlust von *Pcgf6* hingegen hatte keine Auswirkung auf Expression dieser Targets. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass es unterschiedliche Subkomplexe gibt, die die Expression von Keimbahngenen in mESC- und EB-Kulturen regulieren.

Summary

To investigate the role of PCGF6 and E2F6 in murine embryonic stem cells (mESCs) and at the beginning of differentiation, knockout cell lines of both proteins and in combination were generated by the CRISPR/Cas9n system. Characterization of these knockout cell lines (KO) was performed by growth analysis in mESCs and differentiating murine stem cells (EBs). It was found that *Pcgf6* KO cells formed smaller EBs that also could not be maintained in culture for an extended period. To resolve this specific phenotype, further molecular analyses were performed by flow cytometry (FACS). Cells of the *Pcgf6* KO exhibited an increased proportion of cells in G1 phase during differentiation as well as an increased apoptotic frequency. Supporting the assumption of a cell cycle defect, RNASeq data were analysed. It could be shown that cells of the *Pcgf6* KO differentiated in a temporally uncontrolled manner. Evaluation of differentially expressed genes revealed that expression of *E2f6*, a regulator of the cell cycle and another component of the non-canonical PRC1.6, was downregulated in mESC and EB cultures, whereas cell cycle-specific targets of E2F6-dependent gene regulation were upregulated at day 2 of differentiation. These results indicated that deletion of *Pcgf6* at the beginning of differentiation must have effects on E2F6-dependent cell cycle regulation. Due to mycoplasma contamination in the cell culture at this time point, the *Pcgf6* KO cell line had to be re-established. In addition, KO cell lines of *E2f6* in Wt and in *Pcgf6* KO mESCs were established. The replication of cellular characterization of the phenotype revealed that EB cultures of the *Pcgf6* KO and the double knockout of *Pcgf6* and *E2f6* (dKO^{*Pcgf6/E2f6*}) exhibited reduced cell numbers during differentiation. Molecular characterizations of the phenotype revealed that the increased proportion of cells in the G1 phase of the *Pcgf6* KO, which was detected before mycoplasma contamination, could not be reproduced. However, an increased frequency of cells in the G2 phase of dKO^{*Pcgf6/E2f6*} was detected in mESC and EB culture. Analysis of apoptotic frequency in all KO cell lines indicated an increase during differentiation. RNASeq data from two publications of PCGF6 and E2F6 were used to support the analyses performed to this point (Qui et al, 2021; Dahlet et al, 2021). Gene Ontology Enrichment analyses of these data revealed that germline genes were independently upregulated in both KO cell lines in mESCs. However, both KO cell lines also showed an overlap of commonly upregulated germline genes. Following these publications, gene expression analysis of individual germline genes revealed that loss of *E2f6* leads to de-repression of genes that have a binding site for E2F6. In contrast, loss of *Pcgf6* had no effect on expression of these targets.

These results, as well as previously published data, support the assumption that there are distinct subcomplexes that regulate the expression of germline genes in mESC and EB cultures.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Summary	5
1. Einleitung	10
1.1 Embryonale Stammzellen (ESC)	10
1.2 Chromatinstruktur in ESCs und differenzierenden Zellen	12
1.3 Polycomb-Group (PcG) Faktoren	14
1.4 Polycomb-Repressive Complex 2 (PRC2) und seine Varianten	15
1.5 Kanonischer versus nicht-kanonischer Polycomb-Repressive Komplex 1	16
1.6 PRC1.6 Komplex – Funktion in ESCs und in der Embryonalentwicklung	17
1.7 Ziel der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Zelllinien	20
2.1.2 Zellkultur Medien.....	21
2.1.3 Bakterienstämme	22
2.1.4 Nährmedien für Bakterien	22
2.1.5 Puffer und Lösungen	22
2.1.6 Plasmide	23
2.1.7 Antikörper	24
2.1.8 Größenmarker, Enzyme, Kits, Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.9 Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.10 Primer	25
2.1.11 Geräte und Mikroskope.....	28
2.1.12 Software	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1.1 Passagieren von mESCs	30
2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	30
2.2.1.3 Beschichtung von Zellkulturplastik	30
2.2.1.4 Bestimmung der Kumulativen Zellverdopplung (CPD)	30
2.2.1.5 Embryoid Body (EB) Kultur	31

2.2.1.5.1	Suspensionskultur.....	31
2.2.1.5.2	Hanging Drop Kultur.....	31
2.2.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	32
2.2.2.1	Zellzyklus-Analysen asynchroner und synchronisierter Zellen.....	32
2.2.2.2	Analyse apoptotischer Zellen	33
2.2.2.3	Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	34
2.2.3	Generierung und Validierung von <i>Pcgf6</i> und <i>E2f6</i> Knock-Out (KO) mESCs	35
2.2.3.1	Off-target Analysen der CRISPR/Cas9n KO mESCs.....	37
2.2.4	Proteinexpressionsanalysen.....	37
2.2.4.1	Expressionsanalysen von PCGF und E2F6 Ziel-Genen	38
2.2.5	Mikrobiologische Methoden	39
2.2.5.1	Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen.....	39
2.2.5.2	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien (nach Hanahan et al., 1991).....	39
2.2.5.3	Transformation kompetenter Bakterien nach der Hitzeschockmethode	40
2.2.5.4	Isolation von Plasmid-DNA durch Mini- und Maxipräparation	40
2.2.5.5	Enzymatischer DNA-Restriktionsverdau	40
2.2.5.6	Agarosegelelektrophorese	41
2.2.5.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	41
2.2.5.8	Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Phenol-Chloroform Fällung.....	41
2.2.5.9	Ligation von Nukleinsäurefragmenten	42
2.2.5.10	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
2.2.6	Statistische Analysen.....	43
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	Veränderte zelluläre Morphologie des <i>Pcgf6</i> KO in mESC- und EB-Kultur....	44
3.2	Erhöhte Frequenz an Zellen in der G0/G1-Phase in <i>Pcgf6</i> KO mESC- und EB-Kulturen	46
3.3	Beschleunigte Zellzyklusprogression <i>Pcgf6</i> KO mESCs und EBs	48
3.4	Erhöhte Frequenz apoptotischer Zellen in differenzierenden <i>Pcgf6</i> KO-Kulturen	49
3.5	Kein Unterschied in der Phosphorylierung von H2AX in <i>Pcgf6</i> KO EB-Kulturen	50
3.6	Globale Genexpressionsanalysen der <i>Pcgf6</i> KO mESC- und EB-Kulturen	52
3.6.1	Unkontrollierter Start der Differenzierung von <i>Pcgf6</i> KO EB-Kulturen.....	52
3.6.3	Die <i>E2f6</i> Expression in <i>Pcgf6</i> KO EB-Kulturen ist an Tag 2 herunterreguliert.....	55
3.7	Kontamination der Zellkultur mit Mykoplasmen.....	56

3.8	Generierung neuer KO-Zelllinien in mESCs	58
3.8.1	CRISPR/Cas Strategie zur Deletion von <i>Pcgf6</i> und/oder <i>E2f6</i> in mESCs des Wt	58
3.9	Charakterisierung des Phänotyps von <i>Pcgf6</i> KO, <i>E2f6</i> KO und dKO^{<i>Pcgf6/E2f6</i>} mESC- und EB-Kulturen	60
3.9.1	Veränderte Morphologie des <i>Pcgf6</i> KO und dKO ^{<i>Pcgf6/E2f6</i>} in der EB-Kultur	60
3.10	mESC und EB-Kulturen des dKO^{<i>Pcgf6/E2f6</i>} zeigen G2 Arrest	67
3.11	Erhöhte Frequenz apoptotischer Zellen in EB-Kulturen des <i>Pcgf6</i> KO und dKO^{<i>Pcgf6/E2f6</i>}	68
3.12	Erhöhte mRNA-Expressionslevel von Keimbahngenen in <i>Pcgf6</i> KO, <i>E2f6</i> KO und dKO^{<i>Pcgf6/E2f6</i>} mESC und EB-Kulturen	69
4.	Diskussion	75
4.1	Auswirkungen einer Mykoplasmenkontamination auf murine embryonale Stammzellen (mESCs)	75
4.1.1	Einfluss einer Mykoplasmenkontamination auf das Wachstum von Zellkulturen	75
4.1.2	Nachweis von Mykoplasmen und Behandlungsmöglichkeiten	76
4.1.3	Auswirkungen einer Mykoplasmenkontamination auf ESCs	76
4.2	Auswirkungen des <i>Pcgf6</i> KO und <i>E2f6</i> KO auf den Phänotyp von mESCs	78
4.3	Die gesteigerte apoptotische Frequenz als und der Zellzahlverlust des dKO^{<i>Pcgf6/E2f6</i>} in der EB-Kultur als Konsequenz der verlängerten G2-Phase	82
4.4	Regulation von Keimbahngenen - PCGF6 versus E2F6	86
5.	Appendix	89
6.	Literaturverzeichnis	Error! Bookmark not defined.
7.	Abbildungsverzeichnis	122
8.	Tabellenverzeichnis	128
9.	Abkürzungsverzeichnis	128
10.	Danksagung	131
11.	Eidesstattliche Erklärung	132

1. Einleitung

1.1 Embryonale Stammzellen (ESC)

Die Gewinnung embryonaler Stammzellen erfolgt aus der frühe Blastozyste, die sich etwa 3,5 Tage nach der Befruchtung aus der Morula (2,5 Tagen) entwickelt. Zellen, die aus der inneren Zellmasse (ICM) der frühen Blastozyste gewonnen werden, bezeichnet man als naive, pluripotente Stammzellen oder auch als embryonale Stammzellen (ESC) (Evans und Kaufman 1981; Martin 1981). ESCs besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Differenzierung und können in Kultur überführt werden, ohne ihren pluripotenten Status zu verlieren. Sie können entweder auf Ammenzellen, sogenannten *Feeder*-Zellen, oder auf beschichteter Zellkulturplastik kultiviert werden (Robertson 1997; Şişli et al. 2021). Eine Kultivierung in speziellem Nährmedium sorgt dafür, dass die Zellen ihren pluripotenten Status nicht verlieren. Hauptbestandteil dieses Mediums ist LIF (Leukemia Inhibitory Factor). LIF steuert über die Bindung an den gp130/LIF Rezeptor und den dadurch aktivierten JAK-Signalweg den Transkriptionsfaktors *Stat3* an. STAT3 vermittelt die Expression Pluripotenz-assoziiierter Gene wie z.B. *Klf4*, *Sox2* oder *Nanog* (Boeuf et al. 1997; Cartwright et al. 2005; Hall et al. 2009). Eine spontane Differenzierung von ESCs *in vitro* wird unter anderem durch die Wegnahme von LIF und der damit verbundenen Inaktivierung und Reorganisation von Signaltransduktionswegen (siehe oben) initiiert. Diese führen durch epigenetische Modifikationen wie zum Beispiel die Methylierung von Promotoren zu einer Inaktivierung der Pluripotenzmarker (Feldman et al. 2006). Die Aufrechterhaltung der Pluripotenz wird über die Transkriptionsfaktoren OCT4, NANOG und SOX2 vermittelt. Diese Transkriptionsfaktoren bilden das Kernnetzwerk der Pluripotenz. OCT4 (kodiert durch das Gen *Pou5f1*, auch bekannt als OCT3 oder OCT3/4) wurde zuerst in der Maus als ein ESC- und Keimbahn-spezifischer Transkriptionsfaktor identifiziert (Schöler et al. 1990; Rosner et al. 1990; Okamoto et al. 1990). OCT4 besitzt drei Domänen: eine zentrale POU (Pit-Oc-Unc) Domäne für DNA-Bindung, eine N-terminale Transaktivierungsdomäne und eine C-terminale Domäne als zelltyp-spezifische Aktivierungsdomäne. Transkriptionsfaktoren der POU Familie kontrollieren die Expression ihrer Zielgene über die Bindung eines Sequenzmotivs mit der Konsensussequenz AGTCAAT (Herr und Cleary 1995). Die Expression von *Oct4* sinkt während der Differenzierung. *Oct4* Knockout (KO) Embryos sterben zum Zeitpunkt der Implantation, weil sie keine pluripotenten Zellen in der innere ICM besitzen (Nichols et al. 1998). *Oct4* ist nur in Blastomeren, pluripotenten frühen embryonalen Zellen und Keimzelllinien exprimiert (Rosner et al. 1990; Yeom et al. 1996; Pesce et al. 1998). Sowohl eine Aktivierung als auch

Reprimierung der Genexpression kann durch OCT4 beeinflusst werden (Lenardo et al. 1989; Schöler et al. 1990; Liu et al. 1997; Ben-Shushan et al. 1998; Botquin et al. 1998). SOX2 gehört zur Familie der SOX (Testis-specific factor Sry (Sex determining region Y)) Proteine. Genau wie *Oct4* ist *Sox2* in der ICM exprimiert (Avilion et al. 2003) und besitzt eine High-mobility Group (HMG)-box DNA Bindedomäne (Bowles et al. 2000). Blastozysten ohne SOX2 bilden eine normale ICM. Die Zellen der ICM können Epiblasten bilden, sind aber nicht dazu in der Lage diese aufrecht zu erhalten. Das bedeutet, dass diese nicht in exembryonale Gewebe differenzieren können (Avilion et al. 2003). Die Inaktivierung von *Sox2* durch *RNA-Interference* (RNAi) in ESCs führte zur Differenzierung dieser Zellen in viele Linien inklusive der trophektodermalen Linie. (Ivanova et al. 2006). Eine Überexpression von *Sox2* in ESCs wiederum führte zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen (Neuro-ektoderm und Mesoderm) (Kopp et al. 2008). Der dritte Transkriptionsfaktor NANOG besitzt eine Homeodomäne und ist in der ICM, in ESCs und in der sich entwickelnden Keimbahn exprimiert (Chambers et al. 2003; Laval et al. 2007; Mitsui et al. 2003; Yamaguchi et al. 2005). Embryos ohne *Nanog* entwickeln sich nicht über das Implantationsstadium hinaus (Mitsui et al. 2003). ESCs ohne *Nanog* neigen zur Differenzierung, können aber im pluripotenten Status kultiviert werden (Silva et al. 2009). Als Masterregulatoren regulieren die drei Transkriptionsfaktoren die Pluripotenz in den frühen Stadien der Embryogenese, indem sie stromabwärts Zielgene regulieren, die für die Selbsterneuerung und Differenzierung der Zellen wichtig sind. Die offene Chromatinstruktur von ESCs wird durch die drei Pluripotenzfaktoren SOX2, NANOG und OCT4 aufrechterhalten (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003; Nichols et al. 1998; Niwa et al. 2000). In embryonalen Stammzellen aktivieren die drei Faktoren über direkte Promotorbindung eine Gruppe von Genen, die für den Erhalt der Pluripotenz verantwortlich sind. Bei dieser Gruppe handelt es sich vorwiegend um Transkriptionsfaktoren (z.B. *Stat3*, *Zic3*) oder Gene des Tgf- β (z.B. *Tdgf1*, *Lefty2/Ebaf*) und Wnt-Signalwegs (z.B. *Dkk1*, *Frat2*) (James et al. 2005; Sato et al. 2004). Sie reprimieren aber auch ein Set an Genen, welche für Differenzierungsfaktoren kodieren (Boyer et al. 2005). OCT4 und NANOG können in der Regulation von Entwicklungsgenen mit Polycomb-Group (PcG) Proteinen in ESCs kooperieren. Dabei unterstützt der Polycomb Komplex 2 (PRC2) durch epigenetische Repression die Bindung der Regulatoren an Transkriptionsfaktoren der Differenzierung (Obier et al. 2015). Die Regulation der Pluripotenzfaktoren erfolgt über eine Coregulation untereinander (Feedback Loop). OCT4 und SOX2 binden als Heterodimer an SOX2-OCT4-cis regulatorische Elemente in Promoterregionen ihrer Zielgene. Zu diesen gehört unter anderem auch *Nanog*,

Sox2 und *Pou5fl* (Rodda et al. 2005; Yuan et al. 1995; Kuroda et al. 2005; Okumura-Nakanishi et al. 2005; Tomioka et al. 2002; Kim et al. 2008). Neben der autoregulatorischen Funktion der Pluripotenzfaktoren werden die Expressionslevel von *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* über long non-coding RNAs (lncRNAs) reguliert. (Guttman et al. 2011). NANOG und OCT4 sind des Weiteren dazu in der Lage, die Transkription zusätzlicher lncRNAs zu regulieren (Sheik Mohamed et al. 2010). Die Transkriptionsfaktoren können räumlich entfernte Bindestellen als intra- und interchromosomale Bereiche zu hoch-verdichteten Bindestellen zusammenzubringen (Wit et al. 2013). Als Transkriptionsfaktoren können SOX2, OCT4 und NANOG an Enhancer Elemente binden und den Mediator-Komplex rekrutieren, um das Genexpressionsprogramm pluripotenter ESCs zu aktivieren. Diese Bindung formiert an den meisten Genen, welche die Pluripotenz kontrollieren, Enhancer Domänen. Durch die hohe Dichte der Transkriptionsfaktoren, die Größe der Domänen und die Fähigkeit die Transkription zu aktivieren, werden diese Domänen auch als Super Enhancer bezeichnet (Whyte et al. 2013). Die Möglichkeit, ESC über einen längeren Zeitraum im pluripotenten Status in Kultur zu halten, ohne dass sie diesen Status verlieren, macht sie zu einem wichtigen und wertvollen Werkzeug der wissenschaftlichen Forschung. Ihre Fähigkeit, auf Differenzierungssignale zu reagieren eröffnet die Möglichkeit, entwicklungsbiologische Prozesse zu erforschen. So können ESCs durch Zugabe oder Wegnahme unterschiedlicher Mediensupplemente spontan in Keimblatt-ähnliche Strukturen differenzieren (Evans und Kaufman 1981).

1.2 Chromatinstruktur in ESCs und differenzierenden Zellen

Eine Genaktivität geht mit einer bestimmten Chromatinstruktur einher (Weintraub und Groudine 1976). Um Transkription zu ermöglichen, muss das Chromatin von einer hoch verdichteten (Heterochromatin) zu einer weniger verdichteten Struktur (Euchromatin) verändert werden. Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom es besteht aus 146 bp genomischer DNA, die ein Oktamer aus vier Kernnhistonen (H2A, H2B, H3 und H4) umwickelt (Simon et al. 2011). Die hydrophobe Domäne, die für die Faltung der Histone zuständig ist, führt zu einer Dimerisierung: es kommt zur Bildung von H2A-H2B und H3-H4 Dimeren. Freiliegende positive Ladungen stabilisieren die Histon-DNA Interaktionen (Malik und Henikoff 2003; Talbert et al. 2012). Histone können an acht Lysine-reichen N-terminalen Bereichen, die aus dem Nukleosom herausragen, chemisch modifiziert werden (Liu et al. 2011). Die Lysine dieser N-terminalen Bereiche können acetyliert, methyliert, phosphoryliert, ubiquitiniert, sumoyliert, glykosiliert, ADP-ribosyliert oder hydroxyisobutyryliert werden

(Weake und Workman 2008; Szulwach und Jin 2014; Shiio und Eisenman 2003; Sakabe et al. 2010; Rossetto et al. 2012; Messner et al. 2010; Dai et al. 2014). Die unterschiedlichen Modifikationen sind assoziiert mit verschiedenen biologischen Prozessen wie zum Beispiel Gernregulation, Zellzyklusprogression oder DNA-Reperaturprozessen (Bannister und Kouzarides 2011).

Die Chromatinstruktur von ESCs weist ein dekondensiertes Muster mit einem geringen Anteil an kompaktem Heterochromatin und einem hohen Anteil an Histonmarkierungen auf, die mit der Transkriptionsaktivität in Zusammenhang stehen, wie z. B. H3/H4-Acetylierung und H3K4 Trimethylierung (H3K4me3) (Ahmed et al. 2010; Efroni et al. 2008). Neben der H3K4me3 sind auch Acetylierungen von H3K9 (K3K9ac) und H3K12 (H3K12ac) besonders in Promotorregionen transkriptionell aktiver Gene angereichert, während eine H3K27me3 und eine H3K9me3 mit transkriptioneller Repression zusammenhängt (Araki und Mimura 2017). ESCs befinden sich in einem Zustand der Hypertranskription (Percharde et al. 2017). Dieser Zustand beinhaltet einen global hohen Level an Transkriptionsleistungen. Während der Differenzierung werden die Heterochromatinbereiche kleiner und zahlreicher (Efroni et al. 2008). Große gen-regulatorische Bereiche in ESCs sind bivalent durch repressive H3K27me3 markiert, können aber gleichzeitig Histonmarkierungen (H3K4me3) besitzen, die mit einer aktiven Transkription assoziiert sind. Diese bivalenten Modifizierungen sind häufig in der *Transcription Start Site* (TSS) von verschiedenen Differenzierungsgenen zu finden. Dabei werden diese in einem vorbereiteten Satus gehalten, um auf Differenzierungssignale reagieren zu können (Bernstein et al. 2006; Jørgensen et al. 2006). Eine Bindung der Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2 und NANOG an bivalent markierte Gene (an ca. 50%) unterstützt die Aufrechterhaltung des aktivierbaren Zustandes in mESCs (Bernstein et al. 2006). Während der Differenzierung kommt es zu einer Reorganisation des Chromatins. Heterochromatin-Foci nehmen zu, während die Mobilität und der Turnover von Chromatin-assoziierten Faktoren abnimmt. Histonmodifizierungen, die mit einer hohen transkriptionellen Aktivität verbunden sind, werden während der Differenzierung reduziert. In der weiteren Differenzierung in Keimbahn-spezifische Vorläuferzellen wandeln sich bivalent markierte Chromatindomänen in monovalente Bereiche um (entweder H2K27me3 oder H3K4me3 Markierungen). Sowohl eine H3K27me3 als auch eine H3K4me3 kann durch Multiproteinkomplexe katalysiert werden. Während der Trithorax (TrxG) Komplex mit einer Trimethylierung von H3K4 assoziiert ist, katalysiert der Polycomb Komplex 2 (PRC2) eine H3K27me3. Während der Zelldifferenzierung verdrängen TrxG-Proteine PcG-Proteine, die mit

linienspezifischen Genen assoziiert sind, sodass es zu einer aktiven Transkription dieser Gene kommt (Khan et al. 2015).

1.3 Polycomb-Group (PcG) Faktoren

PcG Faktoren wurden erstmals in *Drosophila melanogaster* als Regulatoren der segmentalen Entwicklung in der Embryogenese beschrieben. Die segmentale Entwicklung in Insekten erfolgt durch die transkriptionelle Aktivierung von Homeobox-(HOX) Domänen enthaltenden Genen (García-Bellido 1975; McGinnis und Krumlauf 1992). In *Drosophila* sind diese Gene in Gewebe-spezifischen Mustern durch zahlreiche Enhancer während der larvalen Entwicklung aktiviert (Beck et al. 2010). Der transkriptionelle Status dieser Gene wird durch epigenetische Mechanismen aufrechterhalten. Dafür verantwortlich sind Polycomb Group (PcG) und Trithorax Group (TrxG) -Komplexe (Lanzuolo et al. 2012; Pirrotta 1998; Ringrose und Paro 2004; Schuettengruber et al. 2017). Komponenten der PcG Komplexe sind die PcG Faktoren Polycomb-like (Pcl) und Sex comb on midleg (Scm), Enhancer of zeste (E(z)) oder Suppressor of zeste (Su(z)12). Sie wurden als Repressoren der HOX-Genexpression in genetischen Screens identifiziert (Jürgens 1985; Wu et al. 1989). PcG Gene, wie homöotische Gene, sind hoch konserviert. Ihre epigenetische Regulation in Säugetieren wird unter anderem von zwei unterschiedlichen Polycomb assoziierten Komplexen vermittelt. Polycomb-repressive Complex 1 (PRC1) und Polycomb-repressive Complex 2 (PRC2) (Shao et al. 1999; Wit et al. 2013; Tie et al. 2001). Neben der HOX-Genregulation werden weitere Prozesse wie Imprinting, X-Chromosomen-Inaktivierung und auch der Zellzyklus durch PcG Proteine reguliert (Lucchesi 2019). Klassischerweise erfolgt die PcG-vermittelte Regulation der Genexpression über die Trimethylierung von H3K27, welche durch die Kernuntereinheit EZH1/2 (E(z)) (identifiziert in *Drosophila*, siehe auch oben) des PRC2 vermittelt/katalysiert wird (Müller et al. 2002; Kuzmichev et al. 2002). Der PRC1 bindet durch eine Untereinheit (CBX) an die H3K27me3. Die Ring1A/B Untereinheit des PRC1 katalysiert die Ubiquitinierung des Histon 2A an Lysin 119. Insgesamt führt die sukzessive Bindung der PRC und die durch sie vermittelten Histonmodifikationen zu einer Inhibierung der RNA Polymerase II Aktivität und zu einer kondensierten Chromatinstruktur, deren Folge die Inaktivierung der Genexpression ist (Gaspar-Maia et al. 2011; Mattout und Meshorer 2010; Ahmed et al. 2010). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass es neben diesem klassischen Verlauf der PRC-vermittelten Gen-Repression Abweichungen in der Abfolge der Bindung sowie in der Zusammensetzung der einzelnen Komplexe gibt.

1.4 Polycomb-Repressive Complex 2 (PRC2) und seine Varianten

Der PRC2 ist in Säugetierzellen aus drei Kernkomponenten aufgebaut: EZH1/2 (enhancer of zeste homolog 1 oder 2), EED (embryonic ectodermal development) und SUZ12 (supressor of zeste 12) (Vizán et al. 2015; Thornton et al. 2014; Cholewa-Waclaw et al. 2016; Moritz und Trievel 2018). Deletionen der Kernkomponenten in Mäusen führt zu morphologischen Defekten und embryonaler Lethalität (Whitcomb et al. 2007; Comet et al. 2016). Weitere Komponenten des PRC2 sind RBBP4 und 7 (Retinoblastoma-binding Protein 4 und 7, auch bekannt als RbAp48 und RbAp46), AEBP2 (adipocyte enhancer-binding protein 2), JARID2 (Junonji and AT-rich interaction domain 2) und PLC (Polycomb-like) Proteine (Kouznetsova et al. 2019). Die Hauptfunktion des PRC2 ist, mit der Hilfe weiterer Proteine, die Katalyse der Mono-, Di- und Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 27 (H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3) (Hyun et al. 2017). Durch die Interaktion der Zink-Finger Domäne von SUZ12, der WD40 Repeat Domäne von EED und der SET Domäne von EZH1/2 wird die Aktivität des PRC2 kontrolliert (Aranda et al. 2015). Eine weitere wichtige Komponente erweitert den Kreis der Kerneinheiten: AEBP2 enthält eine Zink-Finger Domäne, die ein starkes DNA-Bindepotential besitzt. AEBP2 rekrutiert PRC2 zur Bindung des Komplexes von H3K27me3. Eine homozygote Deletion von *Aebp2* in Mäusen führte zu einer frühen embryonalen Letalität, während eine heterozygote Deletion von *Aebp2* zu Defekten in der Entwicklung der Neuralleiste führte. (Grijzenhout et al. 2016). JARID2 besitzt fünf Domänen (eine JmJC und JmjN Domäne, zwei DNA-Bindedomänen, eine AT-reiche Interaktionsdomäne und eine Zink-Finger Domäne) und ist eine der bestuntersuchten Untereinheiten des PRC2 (Kouznetsova et al. 2019). JARID2 interagiert über alle fünf Domänen mit anderen Komponenten des PRC2 ohne dabei direkt an der DNA-Bindung des Komplexes beteiligt zu sein (Vizán et al. 2015; Aranda et al. 2015). Über die Zink-Fingerdomäne kann JARID2 an Nukleosomen binden und den PRC2 stabilisieren (Sanulli et al. 2015). Die PLC Homologe PHF1, MTF2 und PHF19 sind ebenfalls mit der Aktivität des PRC2 assoziiert. Alle drei besitzen eine Tudor Domäne, die an H3K36me3 binden. Die Trimethylierung von H3K36 hat eine inhibierende Wirkung auf den PRC2 (Finogenova et al. 2020). Der PRC2 kann in der Zusammensetzung der PCL Homologe variieren: PCL Proteine können mit einem Subkomplex assoziieren, der kein JARID2 enthält und eine wichtige Rolle während der Differenzierung spielt (Aranda et al. 2015). Interessanterweise wurden nicht nur Subkomplexe mit unterschiedlichen PLC-Protein Zusammensetzungen identifiziert. Die verwandten, enzymatisch aktiven Untereinheiten EZH1 und EZH2 durchlaufen einen Austausch während der Entwicklung von Blutzellen. Ein

Erythroid-spezifischer Enhancer vermittelt die transkriptionelle Aktivierung von EZH1. Infolgedessen kommt es zu einer veränderten Zusammensetzung des PRC2. Es entsteht ein Subkomplex, der EZH1-SUZ12 aber nicht EED enthält. Dieser Komplex bindet transkriptionell aktive Chromatinbereiche und ist an der positiven Regulation der Genexpression beteiligt. Diese Funktion ist untypisch für den PRC2, deshalb wird dieser Subkomplex auch als nicht-kanonischer PRC2 bezeichnet (Xu et al. 2015).

1.5 Kanonischer versus nicht-kanonischer Polycomb-Repressive Komplex 1

Es gibt mehrere Varianten des PRC1, die sich in ihrer Zusammensetzung einzelner Komponenten unterscheiden. Kernkomponenten des PRC1 sind RING1A/B und jeweils ein PCGF-Homolog. Bis jetzt sind 6 PCGF-Homologe identifiziert worden (PCGF1-6). Eine Einteilung der PRC1 erfolgt auf Grund der PCGF-Homologe in PRC1.1-PRC1.6. Durch die CBX Untereinheit werden die Komplexe des Weiteren in kanonische und nicht-kanonische Komplexe einteilen. Kanonische PRC1 sind u.a. durch das Vorhandensein einer von fünf CBX Untereinheiten (CBX2, 4, 6, 7 und 8) gekennzeichnet (Gil und O'Loghlen 2014), während die CBX Untereinheit in nicht-kanonischen PRC1 fehlt. Je nachdem welche CBX Untereinheit im kanonischen PRC1 gebunden ist, bindet diese über eine Chromodomäne an H3K9me3 oder H3K27me3 (z.B. CBX2 und CBX7 binden an H3K9me3; CBX4 bindet an H3K37me) (Kaustov et al. 2010; Messmer et al. 1992; Cao et al. 2002; Kuzmichev et al. 2002). Einzige Ausnahme stellt CBX3 (oder auch HP1) dar: als Mitglied des nicht-kanonischen PRC1.6 bindet CBX3 nicht an H3K27me3, sondern interagiert wie alle HP-1 Proteine mit H3K9me3 (Kaustov et al. 2010). CBX Proteine werden Zelltyp-spezifisch exprimiert. So ist zum Beispiel CBX7 in Stammzellen und undifferenzierten Zellen präsent, während CBX8 hauptsächlich in differenzierten Zellen vertreten ist. (O'Loghlen et al. 2012; Morey et al. 2013). Weitere Untereinheiten des kanonischen PRC1 sind PHC1, PHC2 oder PHC3 (Polyhomeotic-like Proteine) sowie SCM1/2 (Sex comb on midleg homolog-1 und -2). Diese vermitteln hetero- oder homotypische Interaktionen mit anderen kanonischen PRC1 über ein steriles α -Motiv und bewirken so die Formierung kondensierten Chromatins (Peterson et al. 1997; Kim et al. 2002). Die PCGF Proteine 2 und 4 (MEL18 und BMI1) können Teil eines kanonischen aber auch eines nicht-kanonischen Komplexes sein (Piunti und Shilatifard 2021).

In nicht-kanonischen PRC1 Komplexen ersetzen die Untereinheiten RYBP und YAF die CBX und PHC Untereinheiten des kanonischen PRC1. RYBP/YAF verfügen über eine Zink-Finger Domäne, mit der sie an H2AK119ub binden können. Eine Carboxy-terminale RING1B

Interaktionsdomäne stellt die Verbindung zu RING1B her (García et al. 1999; Arrigoni et al. 2006). Diese Interaktion führt zu einer positiven Beeinflussung der E3 Ligase-Aktivität von RING1B (Morey et al. 2013; Rose et al. 2016). Die Katalyse von H2AK119ub nicht-kanonischer Komplexe kann unabhängig vom Vorhandensein der H3K27me3 stattfinden (Kloet et al. 2016). Zusätzlich zu RING1B, RYBP und YAF assoziieren nicht-kanonische PRC1 mit einem der PCGF-Homologe. Die Komplexe unterscheiden sich in ihrer weiteren Zusammensetzung je nach Bindung des PCGF-Proteins. (Gao et al. 2012). Der PRC1.1 Komplex zum Beispiel besitzt mit KDM2B eine Untereinheit, die die Chromatininteraktion des Komplexes vermittelt (van den Boom et al. 2016). Unterschiedliche PRC1 regulieren die Entwicklung in bestimmte Zelllinien während der Embryogenese. Eine Deletion von *Pcgf5* führte in mESCs zum Beispiel zu einer verzögerten Bildung der drei Keimblätter in *Embryoid Bodies* (EBs). In der weiteren Differenzierung dieser EBs beeinflusste der Verlust von *Pcgf5* die Transition von Epithel zu Mesenchym (Meng et al. 2020). Außerdem wurde berichtet, dass PCGF1 in der Embryogenese des Zebrafisches die Entwicklung des Neuralrohrs reguliert (Li et al. 2020).

1.6 PRC1.6 Komplex – Funktion in ESCs und in der Embryonalentwicklung

Wie der Name schon sagt, ist das PCGF-Homolog PCGF6 Teil des PRC1.6. Weitere Komponenten des PRC1.6 sind neben PCGF6 und RING1B, E2F6, L3MBTL2, MAX und MGA. Normalerweise werden nicht-kanonische Komplexe unter anderem darüber klassifiziert, dass sie keine CBX Untereinheit besitzen. Das Vorhandensein der CBX3 Untereinheit im PRC1.6 stellt jedoch eine Ausnahme dar. CBX3 interagiert mit H3K9me3 und den Histondeacetylasen HDAC1 und 2. Weitere Interaktionspartner im PRC1.6 sind der Transkriptionsfaktor DP1, die Methyltransferase G9A, die Demethylase JARID1C und WDR5, wobei deren Funktionen im Kontext des PRC1.6 weitestgehend ungeklärt sind (Aranda et al. 2015). PCGF6 (auch bekannt als MBLR6) und RYBP sind Teil des NANOG Protein-Interaktoms und stehen somit in Verbindung mit der Pluripotenz und Selbsterneuerung von ESCs (Gagliardi et al. 2013; Zdziebło et al. 2014). Weitere Publikationen untermauern, dass PCGF6 zur Erhaltung des pluripotenten Status benötigt wird (Zhao et al. 2017; Zdziebło et al. 2014; Endoh et al. 2017; Hu et al. 2009; Subramanian et al. 2009). Das Transkriptionsprofil von *Pcgf6* KO ESCs, welches mittels globalen Genexpressionsanalysen (Microarray-Analysen und RNASeq-Analysen) untersucht wurde, zeigte außerdem eine De-repression von Keimbahngenen (Zhao et al. 2017; Endoh et al. 2017). Auf Grund der Verbindung von PCGF6

im PRC1.6 mit G9A/GLP und HDAC1/2 wird vermutet, dass es zu der Regulation von Keimbahngenen auf epigenetische Ebene kommt (Qin et al. 2012; Trojer et al. 2011). L3MBTL2 als eine der Kernkomponente des PRC1.6 ist wichtig für die Rekrutierung des PRC1.6 und zur Stabilisierung des PRC1.6 durch die Interaktion von MAX/MGA an E- oder T-Box enthaltenden Promotoren (Stielow et al. 2018). *L3mbtl2* KO ESCs zeigten zwar eine typische ESC-Charakteristik waren aber stark beeinträchtigt in der Proliferation (Qin et al. 2012). Die Deletion der Komplex-definierenden Komponente *Pcgef6* führte in Mäusen zu einer teilweisen embryonalen Letalität. Nachkommen lagen unter der 25% Grenze des Mendel'schen Gesetzes und besaßen eine reduzierte Fertilität (Dahlet et al. 2021; Endoh et al. 2017). Dieser Befund ist konsistent mit der de-regulierten Expression meiotischer Gene, welche zur Unfruchtbarkeit führt (Matzuk und Lamb 2002). Weiterhin kam es in *Pcgef6*^{-/-} Mäusen zu Veränderungen des Axialskeletts. Dabei wird PCGF6 in Zusammenhang mit einer Beeinflussung der Entwicklung der hinteren und vorderen Achse durch die Regulation von HOX-Genen in Mäusen gebracht. (Endoh et al. 2017). Diese Beobachtungen sind konsistent mit der ursprünglichen Funktion von PcG Proteinen in der Regulation von HOX-Genen (siehe oben). E2F6, als weitere Untereinheit des PRC1.6, ist Mitglied der E2F-Familie. Mitglieder dieser Familie agieren als Transkriptionsfaktoren, welche die Proliferation und das Schicksal von Zellen kontrollieren (Morkel et al. 1997; Giangrande et al. 2004; Gaubatz et al. 1998). E2F6 bindet als transkriptioneller Repressor an spezifische DNA-Sequenzen/Motive (5'..CCCCGC..3'). Diese DNA Bindestellen liegen hochkonserviert in Promotorregionen unter anderem von meiotischen Genen vor (Kehoe et al. 2008). In somatischen Zellen ist E2F6 in der DNA-Methylierung involviert. Es wird angenommen, dass es zu einer direkten Rekrutierung der Methyltransferase DNMT3B durch E2F6 kommt (Velasco et al. 2010). Dahlet und Kollegen (2021) fanden in ihren Studien zu E2F6 heraus, dass E2F6 eine kritische Rolle in der Unterstützung von DNA-Methylierungen von Keimzellgenen spielt und lebenslange epigenetische Inaktivierung einer Reihe von Keimbahngenen während der Entwicklung der Maus initiiert. Dabei kooperiert E2F6 mit MGA. Die Repression Keimbahn-spezifischer Gene durch E2F6 ist abhängig von der „marked box domain“ (5'..CACGTG..3') dieser Gene (Dahlet et al. 2021). Mäuse, die ohne funktionalem *E2F6* geboren wurden, waren lebensfähig, zeigten aber axiale Skelettveränderungen, ähnlich wie *Pcgef6*^{-/-} Mäuse (Courel et al. 2008). Weitere publizierte Daten zeigen, dass die Untereinheit MGA/MAX unabdingbar für die Bindung des PRC1.6 an seine Zielregionen ist. Auf der einen Seite fungiert MAX/MGA als sequenzspezifischer DNA-Bindefaktor und auf der anderen Seite besitzt MAX/MGA eine

DNA-Bindekapazität-unabhängige Gerüstfunktion (Stielow et al. 2018). Weiterhin ist bekannt, dass einzelne Komponenten auch PRC1.6-unabhängige Funktionen besitzen. So ist E2F6 auch als Regulator des Zellzyklus aktiv. Hier beeinflusst E2F6 als negativer Regulator die Bindung anderer E2F-Proteine an Promotoren von Genen, die wichtig für eine Progression durch die G1/S-Phase des Zellzyklus sind (Giangrande et al. 2004; Pennycook et al. 2020). Außerdem wird vermutet, dass E2F6 eine PRC1.6 unabhängige Funktion in der Regulation von Keimbahngenen während der Embryogenese besitzt. Durch die Interaktion mit anderen Komponenten des PRC1 wie MAX oder G9A, aber nicht mit der Hauptkomponente RING1B wird über eine Regulation von Keimbahngenen durch einen Subkomplex spekuliert (Dahlet et al. 2021; Scelfo et al. 2019; Qin et al. 2012).

1.7 Ziel der Arbeit

Die Bedeutung einzelner Mitglieder in der Funktion des nicht-kanonischen *Polycomb-repressive complex 1.6* (PRC1.6) ist bis heute noch nicht hinreichend untersucht. 2014 wurde die erste Publikation von Zdzieblo et al., 2014 veröffentlicht, die PCGF6 in Zusammenhang mit der Pluripotenz von mESCs bringt. In den darauffolgenden Jahren folgten weitere Publikationen, die sich mit PCGF6 und der Pluripotenz von mESCs beschäftigen (Endoh et al. 2017; Zhao et al. 2017). Zudem werden PCGF6 und E2F6 auch mit der Regulation von Keimbahngenen in Verbindung gebracht (Liu et al. 2020; Dahlet et al. 2021). Ziel der Arbeit ist es, die Rolle der PRC1.6 Mitglieder PCGF6 und E2F6 in embryonalen Stammzellen und zu Beginn der Differenzierung zu analysieren. Als Mitglieder des nicht-kanonischen PRC1.6 ist weiterhin ungeklärt, ob beide Proteine zusammen im Komplex eine Rolle spielen oder ob diese unabhängig voneinander agieren. Um dieser Zielvorgabe nachzugehen, sollen mit Hilfe des CRISPR/Cas Systems *Pcgf6* und/oder *E2f6* KO in embryonalen Stammzellen etabliert werden. Die zelluläre und molekulare Analyse der Phänotypen soll in undifferenzierten und differenzierenden mESCs erfolgen. Die experimentelle Strategie dafür sieht vor, Analysen mittels Durchflusszytometrie und Real-Time PCR durchzuführen. Unterstützend zu den labortechnischen Arbeiten soll durch In-silico Analysen von RNASeq-Daten der *Pcgf6* KO-Zelllinie eine Übersicht differenziell exprimierten Genen in undifferenzierten und differenzierten mESC-Kulturen erstellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Stamm	Genetischer Hintergrund	Genotyp	Herkunft
R1 Wt	129/Sv X 129/Sv	Wildtyp	AG Müller, Würzburg
CCC2#24 (Pcgf6_KO#24)	129/Sv X 129/Sv	<i>Pcgf6</i> Deletion	AG Müller, Würzburg
CCC2#54 (Pcgf6_KO#54)	129/Sv X 129/Sv	<i>Pcgf6</i> Deletion	AG Müller, Würzburg
CCC2#24-HAPcgf6 (Pcgf6_KO#24-FL)	129/Sv X 129/Sv	Wildtyp	AG Müller, Würzburg
CCC19#41 (E2f6_KO#41)	129/Sv X 129/Sv	<i>E2f6</i> Deletion	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
CCC19#52 (E2f6_KO#52)	129/Sv X 129/Sv	<i>E2f6</i> Deletion	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
CCC21#24 (Pcgf6_KO#24)	129/Sv X 129/Sv	<i>Pcgf6</i> Deletion	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
CCC21#249 (Pcgf6_KO#24)	129/Sv X 129/Sv	<i>Pcgf6</i> Deletion	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
CCC22#A (dKO ^{Pcgf6/E2f6} #A)	129/Sv X 129/Sv	<i>Pcgf6</i> + <i>E2f6</i> Deletion	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
CCC22#C (dKO ^{Pcgf6/E2f6} #C)	129/Sv X 129/Sv	<i>Pcgf6</i> + <i>E2f6</i> Deletion	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

2.1.2 Zellkultur Medien

ESC-Medium:

Reagenz	Volumen	Konzentration	Katalog-Nr.	Hersteller
DMEM High Glucose	500 ml	-	D-5796	Sigma
FCS (für ESC-Kultur getestet)	93,75 ml	15 %		
L-Glutamat	6,25 ml	2 mM	G-7513	Sigma
Penicillin/Streptomycin	6,25 ml	10000 U/ml/ 10 mg/ml	P-4333	Sigma
LIF konditioniertes Medium	1,25 ml	-	-	Eigene Herstellung
Nicht-essenzielle Aminosäuren	6,25 ml	1 x	M-7145	Sigma
Natrium-Pyruvat	6,25 ml	1 mM	S8636	Sigma
β -Mercaptoethanol (14,3 M)	6,25 ml	0,1 mM	M-3148	Sigma
(7 μ l β -Merc. In 10 ml Hepes)	(filtriert)	10 mM	83234	Sigma

EB Medium:

Reagenz	Volumen	Konzentration	Katalog-Nr.	Hersteller
DMEM High Glucose	500 ml	-	D-5796	Sigma
FCS (für ESC-Kultur getestet)	58,8 ml	10 %		
L-Glutamat	5,88 ml	2 mM	G-7513	Sigma
Penicillin/Streptomycin	5,88 ml	10000 U/ml/ 10 mg/ml	P-4333	Sigma
Nicht-essenzielle Aminosäuren	5,88 ml	1 x	M-7145	Sigma
Natrium-Pyruvat	5,88 ml	1 mM	S8636	Sigma
β -Mercaptoethanol (14,3 M)	5,88 ml	0,1 mM	M-3148	Sigma
(7 μ l β -Merc. In 10 ml Hepes)	(filtriert)	10 mM	83234	Sigma

2.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> Stbl3	F-mcrB mrrhsdS20(rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str ^r) xyl-5 λ-leumtl-1	Thermo Scientific

2.1.4 Nährmedien für Bakterien

Medium	Rezept
LB-Medium	1,0% (w/v) Trypton (10 g/l); 1,0% (w/v) NaCl (10 g/l); 0,5% (w/v) Hefeextrakt (5 g/l)
SOB-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt (5 g/l); 2 % (w/v); Trypton (20 g/l); 10 mM NaCl (0,6 g/l), 2,5; mM KCl (0,2 g/l); 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄

Zur Herstellung von festen Nährmedien (Agarplatten) wurde das jeweilige Standardmedium mit 2 % (w/v) Agar versetzt, autoklaviert und anschließend zum Aushärten in Petrischalen gegossen. Zur klonalen Selektion bakterieller Kulturen wurde dem Medium nach Autoklavieren Antibiotika (Ampicillin 100 µg/ml) zugegeben.

2.1.5 Puffer und Lösungen

Name	Rezept
FACS-Puffer	2% (v/v) hitzeinaktiviertes, sterilfiltriertes FBS, 1 mM EDTA
Gelatine-Lösung zum Beschichten von Zellkulturplatten	0,1 % in PBS
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4

Lösungen für DNA-Präparation

Name	Rezept
Lösung I:	50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA
Lösung II:	0,2 NaOH, 1% (w/v) SDS
Lösung III:	3 mM Kaliumacetat, pH 5.2
Lysispuffer	10 mM Tris HCl, pH 8.5, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl

Lösungen für DNA-Gelelektrophorese

Name	Rezept
TBE-Puffer	89 mM Tris HCl, pH 8.3, 89 mM Borsäure, 2 mM Na ₂ EDTA
DNA Ladepuffer	30% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylene cyanol

Lösungen für Transformationsexperimente

Name	Rezept
CCMB80-Puffer	10 M KOAc, pH 7.0, 80 mM CaCl ₂ , 20 mM MnCl ₂ , 10 mM MgCl ₂ ; 10 % (v/v) Glycerol

Lösungen für Western-Blot

Name	Rezept
Lysis-Puffer 6xSS nach Lämmler	125 mM Tris HCl, pH 6.8, 20% (v/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 5% (w/v) β-Mercaptoethanol
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris HCl, 10 ml 20x SDS, gelöst in 500 ml ddH ₂ O, pH 8.8
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris HCl, 10 ml 20x SDS, gelöst in 500 ml ddH ₂ O, pH 6,8
Trenngel	10-14% Acrylamid, 375 mM Tris, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED, ddH ₂ O
Sammelgel	4,5% Acrylamid, 125 mM Tris, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED, ddH ₂ O
Elektrophoresepuffer	100 ml 10x Transferpuffer, 5 ml 10% SDS, 895 ml ddH ₂ O
Blot-Puffer	100 ml 10x Transferpuffer, 200 ml Methanol, 700 ml ddH ₂ O
Stripping-Lösung	0,2N NaOH

2.1.6 Plasmide

Plasmid	Antibiotika-Resistenz	Herkunft
pX335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n(D10A)	Ampicillin, Puromycin	Addgene, ID: #42335

2.1.7 Antikörper

Primär-Antikörper

Spezifität	Spezies	Hersteller
PCGF6	Rabbit, monoclonal	Abcam
E2F6	Rabbit, polyclonal	Abcam
GAPDH	Mouse, monoclonal	Merck
Phospho-Histone H2A.X	Rabbit, monoclonal	Cell Signaling

Sekundär-Antikörper

Spezifität	Spezies	Hersteller
Rabbit IgG	goat, anti-APC-Cy7-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology
Mouse IgG	Goat, Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific
Rabbit IgG	Goat; Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific

2.1.8 Größenmarker, Enzyme, Kits, Chemikalien und Reagenzien

Größenmarker, Enzyme und Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific
DNaseI	Fermentas
RNase	Fermentas
Proteinase K	Sigma Aldrich
Reverse Transkriptase M-MLV	Invitrogen
Taq-Polymerase	Bio&Cell
T4 DNA Ligase	NEB
div. Restriktionsenzyme	NEB/Fermentas
Ampicillin	Thermo Scientific
Kanamycin	Thermo Scientific
Puromycin	Thermo Scientific

Kits

Kit	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (K1622)
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific (K210007)
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Bioscience (559763)
SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (A9281)
Mouse ES Cell Nucleofector Kit	Lonza (VAPH-1001)

2.1.9 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von Merck, BD Bioscience, Sigma-Aldrich, Thermo Scientific oder Roth bezogen. Alle Verbrauchsmaterialien und Zellkulturplastik wurden über Hartenstein, Macherey Nagel, Eppendorf, Sarstedt, Satorius stedim oder Greiner erworben. Das verwendete Wasser wurde einer hausinternen TKA-Reinwasseraufbereitungsanlage entnommen und wird im folgenden ddH₂O genannt.

2.1.10 Primer

qRT-PCR Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
Pcgf6 fw	GGTTGGACCGGCAGTTACAA
Pcgf6 rv	CGAAACACTGACTCTAGGACCT
E2f6 fw	CTGAACAACCTTTGGGGCCGC
E2f6 rv	CTCCAACAGTTGCTGAGCACAA
Dazl fw	TCTGTGGACCGAAGCATACA
Dazl rv	TTAAGCACTGCCCGACTTCT
Tex13 fw	AGAGGGCAGAACCAGAGACA
Tex13 rv	TTCGCCTTCCTTCTACCTGA
Pcna qRT-PCR fw	TGAGATGCCAGCGTGTCCTG
Pcna qRT-PCR rv	AAGGCGGCACTGCTCTATGA
Cdc6 qRT-PCR fw	TCTCCACCAAAGCTGGGCAA
Cdc6 qRT-PCR rv	CCCATCTCCTGCTCTCTGGC
Ddx5 qRT-PCR fw	GTCCAGACTATAAAAGCGGCTG
Ddx5 qRT-PCR rv	ATCTACCTCTTGTGCGGTGC

Nanog fw	TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT
Nanog rv	GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA
Endo Sox2 fw	TCTGTGGTCAAGTCCGAGGC
Endo Sox2 rv	TTCTCCAGTTCGCAGTCCAG
Endo Oct4 fw	TCTCCCATGCATTCAAAGCTG
Endo Oct4 rv	GCTCCTGATCAACAGCATCA
Gata6 fw	TTGCCTCCGGTAACAGCAGTG
Gata6 rv	GTGGTTCGCTTGTGTAGAAGGA
Gata4 fw	ATGCCTGTGGCCTCTATCAC
Gata4 rv	ATTCAGGTTCTTGGGCTTCC
Nestin fw	CCCTGAAGTCGAGGAGCTG
Nestin rv	CTGCTGCACCTCTAAGCGA
Pax3 fw	TCGGCCTTGCGTCATTTCTC
Pax3 rv	GATGGCACCAAGGTCGGATG
Nodal fw	CCTGGAGCGCATTTGGATG
Nodal rv	ACTTTTCTGCTCGACTGGACA
T fw	CAGCCCACCTACTGGCTCTA
T rv	GAGCCTCGAAAGAACTGAGC
Tex11 fw	TCAGGTGATGACTGTGGGGTA
Tex11 rv	GCTCAGTGATGGATCATTTCGT
Tex12 fw	GTGAAAGAGCAGCAGTAGATGC
Tex12 rv	AGCTGGCATAGGCACATTAC
Gpat2 fw	AGCATCTGAGTGCAAAGCTG
Gpat2 rv	CCTGGCTCCTCAAAGTCATC
Slc25a31 fw	GGGTTTGGGTGACTGCATTA
Slc25a31 rv	AACGGTGTGCATAAGCTCCAAA
Tuba3a fw	GTTGAGGACCAGTGGTGAGG
Tuba3a rv	CATGCTGAACTCCGGAGAC
MaeI fw	CCATTTTGGGTGTCACACTG
MaeI rv	TCTGTTTGGAAATCCAGCTCA

Genotypisierung-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
718	ACTCTCCTGAACAGCACACTG
720	CCCAACAAGACAGCGAATGC
491	TCTCCTGAACAGCACACTGC
492	GTCCTGCAGGGCAGAGATAC
Pcgf6 Wt fw	CTCAGGTCGTCACACTTGGAG
Pcgf6 Wt rv	CAGACGCAGAGAGAAGTGGC
Pcgf6 KO rv	CTCTGCGGTTACCCACTGTC
gDNA E2f6 Ex 3 fw	GTGATGGATTGGTGTGCAGC
gDNA E2f6 Ex 3 rv N2	GACAGAACTGCCACACACT
gDNA E2f6 Ex 4 fw	GACAGAACTGCCACACACT
gDNA E2f6 Ex 4 rv	CTCCAACAGTTGCTGAGCACAA
gDNA E2f6 Ex 5 fw N2	AGCCAGTGCTAAACAGTGAGA
gDNA E2f6 Ex 5 rv	TGACCCTCCCATCTCCAAGG

Oligonukleotide zum Klonieren der E2f6-sgRNAs

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3'); PAM Sequenz dick
E2f6 5'A Target	CTGCCCTCATTACAGAAGCTGG
E2f6 5'A-fw	CACCGCTTCTGTAAATGAGGGCAG
E2f6 5'A-re	AAACCTGCCCTCATTACAGAAGC
E2f6 5'B Target	GCCCCGGTTTGATGTGTCACTGG
E2F6 5'B-fw	CACCGCCCCGGTTTGATGTGTAC
E2F6 5'B-re	AAACGTGACACATCAAACCGGGGC
E2f6 3'A Target	TAACCTATCAGGATATTCACGG
E2F6 3'A-fw	CACCGTAACCTATCAGGATATTCA
E2F6 3'A-re	AAACTGAATATCCTGATAGGTTAC
E2f6 3'B Target	GTAACCTATCAGGATATTCATGG
E2F6 3'B-fw	CACCGGTCAAGGATCTGACAAGA
E2F6 3'B-re	AAACATCTTGTCAGATCCTTGACC

Oligonukleotide zum Klonieren der Pcgf6 sgRNAs

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3'); PAM Sequenz dick
Pcgf6 5'A Target	CCCAGCGGCCTCTGCGGAGCGCC
Pcgf6 guide 5'A-fw	CACCGCCGAGCGGCCTCTGCGGAGC
Pcgf6 5'A-re	AAACGGCGCTCCGCAGAGGCCGCTC
Pcgf6 5'B Target	CGCCTGCGCACTGGTACGAAAGGGGG
Pcgf6 5'B-fw	CACCGCGCCTGCGCACTGGTACGAAAGG
Pcgf6 5'B-re	AAACCCCTTTCGTACCAGTGCGCAGGCCG
Pcgf6 3'G Target	ACTTGCCTCCCATAAACTATGG
Pcgf6 3'G-fw	CACCGACTTGCTCCCATAAACTA
Pcgf6 3'G-re	AAACTAGTGTTATGGGAGGCAAGTC
Pcgf6 3'H Target	CAGTTCTTCCTTCCACCATGCGG
Pcgf6 3'H-fw	CACCGCAGTTCTTCCTTCCACCATG
Pcgf6 3'H-re	AAACCATGGTGGAAGGAAGAACTGC

2.1.11 Geräte und Mikroskope

Gerät	Verwendung	Hersteller
FACS Canto I	FACS Analysen	BD
Attune NxT Flow Cytometer	FACS Analysen	Thermo Scientific
Light Cycler 480 II	qRT-PCR Analyse	Roche
Cell culture microscope EVOS	Phasenkontrast Mikroskopie	Life Technologies
Chemidoc XRS low light imager	Dokumentation Gel/WB	Biorad
Zellkultur Inkubator	Brutschrank Zellkultur S1	Thermo Scientific
Masterscycler Nexus 2	PCR	Eppendorf
BioPhotometer 6131	Photometrische Messung von RNA und DNA	Eppendorf

2.1.12 Software

Software	Verwendung	Hersteller
FlowJo	div. FACS Analysen	Tree Star, Inc.
ModFitLT	Zellzyklus Analysen	Verity Software House
SnapGene	InSilico Klonierungsdesign	GLS Biotech LLC
Integrative Genomic Viewer (IGV)	Promotorbinde-Analysen	Broad Institute
Microsoft Office	statistische Auswertung, elektronische Dokumentation	Microsoft

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) wurden in einem 37 °C Inkubator bei 5% CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.1.1 Passagieren von mESCs

Zum Passagieren wurden die adhären-wachsenden Zellen mit 1x PBS gewaschen und 5 min bei 37 °C mit 0,25%-igem Trypsin-EDTA von der Schalenoberfläche gelöst. Die Trypsin-Aktivität wurde durch FCS-haltiges Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Röhrchen überführt. Die Zellzahl wurde nach Trypanblau-Färbung zur Überprüfung der Zell-Vitalität in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden 0,25 x 10⁶ Zellen auf 6 cm Schale in Wachstumsmedium ausgesät.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden 10⁶ Zellen mit 1x PBS gewaschen. Nach Zentrifugation (90g, 5min) wurde das Zell-Pellet in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte zunächst bei -80 °C in einer Gefriereinheit. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen in kryokonservierten Röhrchen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt und nach Zentrifugation (90 g für 5 min) das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert. Die so aufgetauten Zellen wurden unter den oben angegebenen Bedingungen kultiviert.

2.2.1.3 Beschichtung von Zellkulturplastik

Zur Kultivierung von mESCs wurden Gewebekulturschalen mit 0,1 % Gelatine in 1x PBS beschichtet und bei 37 °C mindestens 20 min inkubiert. Die so beschichteten Zellkulturplatten konnten bis zu einer Woche im Inkubator gelagert werden.

2.2.1.4 Bestimmung der Kumulativen Zellverdopplung (CPD)

Zur Ermittlung der CPD wurden mESCs über einen Zeitraum von 4 Passagen auf gelatine-beschichteten 6 cm Schalen für 48 Stunden kultiviert, passagiert und die Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Mit jeder neuen Passage wurde jeweils die gleiche Zellzahl

($2,5 * 10^5$) ausgesät. Die CPD wurde nach folgender Gleichung bestimmt: $x = \log_{10}(\log_{10}(N1) - \log_{10}(NH))$. N1 steht für die ermittelte Zellzahl, NH für die ausgesäte Anzahl an Einzelzellen. Für die Bestimmung der kumulativen Zellzahl wurden die errechneten Werte jeweils mit den Werten der vorherigen Passage addiert. Die Bestimmung der Zellzahl in EB-Kulturen erfolgte über eine Vereinzlung der EB-Zellen und Berechnung der Zellzahl pro Kulturschale für den jeweiligen Tag der Kultur unter EB-Bedingungen.

2.2.1.5 Embryoid Body (EB) Kultur

2.2.1.5.1 Suspensionskultur

Für die EB-Kultur wurden mESC-Kolonien wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, von der Kultur-Schale gelöst und in Suspensionskultur überführt. Hierfür wurden $0,5 * 10^6$ Zellen auf 10 cm Petrischalen in EB-Kulturmedium (ohne LIF) ausgesät und für eine Experiment-abhängige Dauer in Suspensionskultur gehalten. Jeden zweiten Tag wurde die Hälfte des Mediums erneuert. Hierfür wurden die EBs in der Mitte der Schale zentriert und ein Teil des Mediums am Rand der Schale abgesaugt. Anschließend wurde 5ml frisches Medium in die Schale pipettiert und die EBs wieder gleichmäßig in der Kulturschale verteilt. Die Ernte der EB-Kulturen erfolgte, indem diese in der Mitte der Kulturschale zentriert und mit einer Pipette abgesaugt wurden. Die so erhaltenen EBs wurden in ein Röhrchen überführt. Nach Absinken der EBs wurden diese mit 1x PBS gewaschen, anschließend durch einen Trypsin-EDTA Verdau vereinzelt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.1.5.2 Hanging Drop Kultur

Zur Kultivierung von *Hanging Drop* Kulturen wurden jeweils 2000 Zellen in einem Tropfen ausgesät. Das Topfenvolumen entsprach 30 μ l. Mit einer Multikanalpipette wurden 120 Tropfen auf den Deckel einer 15 cm großen Schale pipettiert. Anschließend wurde die Schale mit 10 ml 1x PBS gefüllt, um ein Austrocknen der EB-Tropfen zu verhindern. Der Deckel mit den Tropfen wurde vorsichtig umgedreht und auf die Schale gesetzt, sodass die Tropfen nach unten hingen. Die Tropfen wurden nach 24 h Kultivierung vom Deckel mit EB-Medium abgespült und in einer 10 cm Schale in Suspensionskultur überführt. Mit dieser Methode konnte zum einen die Fähigkeit der mESCs zur Bildung eines EBs bei einer definierten Ausgangszellzahl untersucht werden und zum anderen die maximale Fläche in Pixel von Zellen mittels ImageJ (NIH) bestimmt und die daraus resultierende Fläche in μm^2 der einzelnen EBs zu bestimmten Zeitpunkten berechnet werden.

2.2.2 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS Analysen wurden mit einem Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD oder Attune Nxt, Thermo Fisher) mit der dafür zugehörigen Software (FACS Diva, BD oder Attune Nxt Software, Thermo Fisher) durchgeführt. Für die Analysen wurden die lebenden Zellen von Zelltrümmern und Zellclustern mittels Forward (FSC) und Sideward (SSC) Scatter-Einstellung (Gate) separiert (Abb. 1). Abhängig von den gewählten Fluorophoren wurden die Daten in den entsprechenden Kanälen aufgezeichnet. Eine Auswertung der Daten erfolgte über FlowJo (LLC) oder ModFit LT™ (Freeware, Verify Software House).

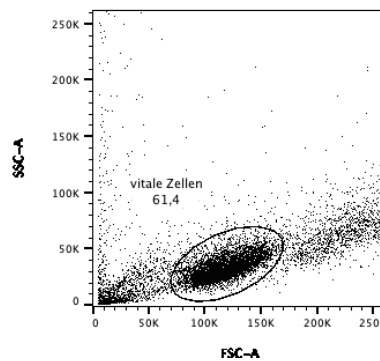


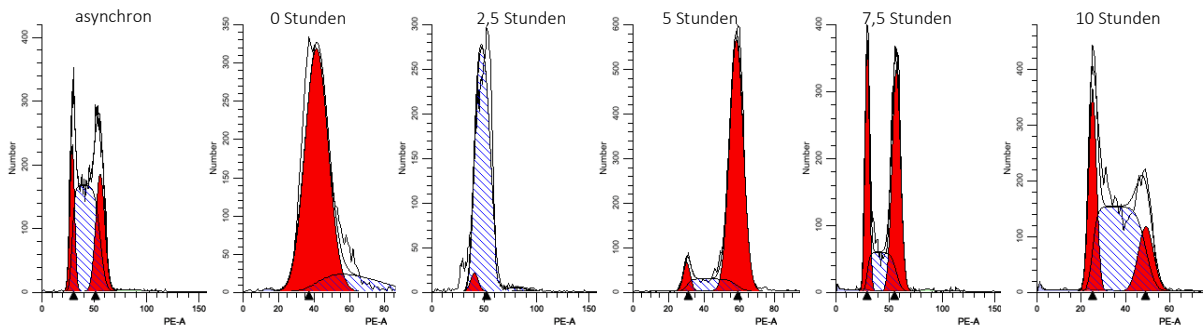
Abb. 1: Darstellung der FACS-Analyse in einem Dot-Plot Diagramm (SSC vs. FSC) zur Separierung der vitalen Zellen von Zelltrümmern und Zelldoubletten (Gate)

2.2.2.1 Zellzyklus-Analysen asynchroner und synchronisierter Zellen

Für die Analyse asynchron wachsender mESC- und EB-Kulturen wurden die Zellen wie oben beschrieben durch Trypsin-EDTA Verdau vereinzelt und jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen bei -20°C für 20 min in 1 ml 70 %-igen EtOH fixiert. Nach der Fixierung wurde die Zellsuspension zentrifugiert (160g; 3min; RT), der EtOH-Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 1x PBS gewaschen. Eine DNA-spezifische Färbung erfolgte mit Propidium-Iodid (PI) für 30 min bei RT im Dunklen. Während der Färbung wurden die Zellen ebenfalls mit RNase (100 $\mu\text{g/ml}$) behandelt (30 min; RT; im Dunkeln). Nach der Färbung wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet für die FACS-Analyse in 250 μl 1x PBS resuspendiert. Eine Analyse erfolgte entweder in den FACS Röhrchen (BD Canto) oder in 96 well Platten (Attune Nxt). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ModFit LT™ (Verify Software House). Für die Analyse synchronisierter mESC- und EB-Kulturen wurden die Zellen vor der PI-Färbung mit Hilfe eines zweifachen Thymidine Pulses behandelt. Hierfür wurden ausgesäte Zellen für 16 h mit Thymidine (2 mM) behandelt. Durch Wegnahme des Thymidins (Mediumwechsel) für weitere 8 h konnten sich die Zellen erholen bevor diese erneut mit

Thymidin (2 mM) für weitere 16 h behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut in frischem Wachstumsmedium kultiviert und zu definierten Zeitpunkten (0; 2,5; 5; 7,5; 10 h) Proben genommen (Abb. 2 A, exemplarisch für Wt mESC Zellen). Für EB-Kulturen wurden die Zellen nach dem zweiten Thymidin Puls durch Trypsinverdau vereinzelt und jeweils 1×10^6 Zellen in 6 cm Petrischalen in EB-Wachstumsmedium ausgesät. Die Probennahme erfolgte wie bei den mESC-Kulturen nach definierten Zeitpunkten (0; 2,5; 5; 7,5; 10h). Wie bereits für die asynchrone Zellkultur beschrieben, wurden die Zellen der einzelnen Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte vereinzelt und mit 70 %-igen EtOH mindestens 2 Stunden fixiert, mit PI gefärbt (inkl. RNase Behandlung) und im FACS analysiert. Auch hier erfolgte die Auswertung der Analyse über ModFit LT™ (Verify Software House) (Abb. 2 B, exemplarisch für Wt EB Zellen).

A Wt mESCs



B Wt EBs

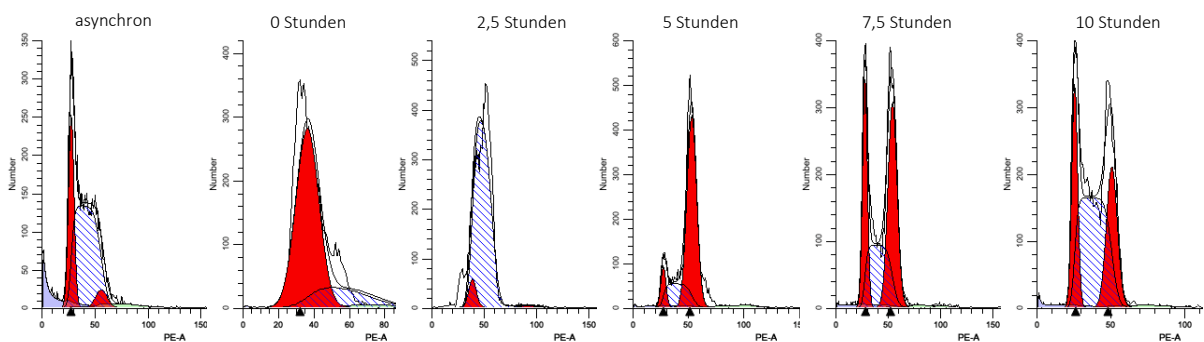


Abb. 2: Exemplarische Darstellung der FACS-Analysen synchronisierter mESC- (A) und EB-Kulturen (B) des Wt in einem Histogramm. Die Phasenverteilung des Zellzyklus wurde mit Hilfe des Programms ModFit LT™ über das Histogramm modelliert

2.2.2.2 Analyse apoptotischer Zellen

Die Detektion der Frequenz apoptotischer Zellen von mESC- und EB-Kulturen erfolgte durch die Anwendung eines Kits (BD Biosciences). Hierzu wurden die Zellen entsprechend den Herstellerangaben behandelt. In der FACS-Analyse konnten dabei drei Zellpopulationen

dargestellt werden: lebende Zellen (Annexin V neg./PI neg.), apoptotischen Zellen (früh apoptotisch: Annexin V pos./PI pos.; spät apoptotisch: Annexin V pos./Pi neg.) und nekrotische Zellen (Annexin V neg./PI pos.). Die Auswertung aller apoptotischen Zellen erfolgte mit FlowJo (LLC) (Abb. 3).

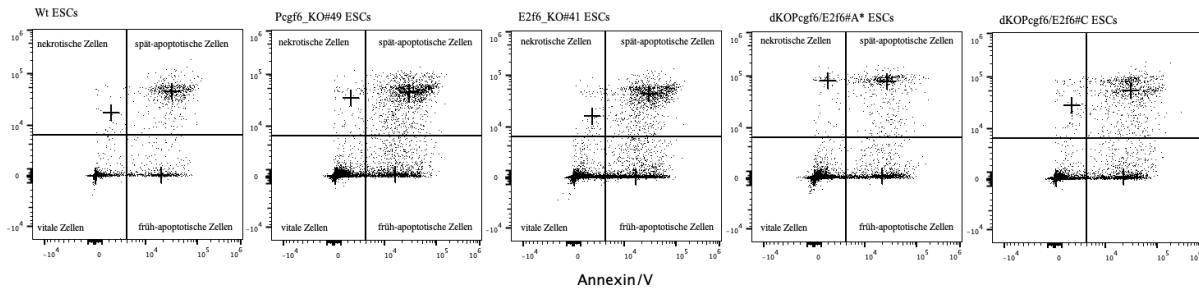


Abb. 3: Exemplarische Darstellung der FACS-Analysen in FlowJo (LCC). In mehreren Dot-Plots ist die Verteilung aller vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen von mESC-Kulturen des Wt, *Pcgf6_KO#49*, *E2f6_KO#41* sowie dKO^{*Pcgf6/E2f6#A**} und C dargestellt.

2.2.2.3 Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen

Für die Analyse von Doppelstrangbrüchen mit dem Antikörper Phospho-Histone H2A.X (Cell Signaling) wurden EB-Kulturen trypsinisiert und $0,5 \times 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert und das Pellet mit 1% BSA/PBS einmal gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen in 4% PFA aufgenommen und für 15 min bei RT fixiert. Nach Fixierung wurden die Zellen mit 1% BSA/PBS gewaschen (160g; 3min; RT) und zur Permeabilisierung mit 0,5 ml 0,5% Saponin/1% BSA/PBS für 15 min im Dunklen bei RT behandelt. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1% BSA/PBS (160g; 3min; RT), erfolgte die primäre Antikörperfärbung. Hierfür wurden die Zellen mit 0,1 ml Phospho-Histone H2A.X (γ H2A.X) Antikörperverdünnung (in 0,5% Saponin/1%BSA/PBS) für 2 Stunden im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (160g; 3min; RT) und das Pellet in der sekundären Antikörperverdünnung (APC-Cy7, 0,5% Saponin/1% BSA/PBS) aufgenommen und für 30 min bei RT im Dunklen gefärbt (Neg. Ctrl. nur Sekundärantikörper; γ H2AX neg./APC-Cy7 pos.). Nach der Färbung mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen zweimal mit 1% BSA/PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Zellen (bei 160g; 3min; RT) zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 250 μ l DAPI/PBS (1:500) 30 min bei RT im Dunklen gefärbt (Neg. Ctrl. ohne Dapi; γ H2AX pos./Dapi neg.). Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (160g; 3min; RT) und das Pellet in 0,25 ml 1x PBS aufgenommen. Die Analyse der Zellen (SSC, FCS) erfolgte im FACS in den Kanälen Pacific Blue (DAPI) versus APC-Cy7 (γ H2A.X) (Abb. 4).

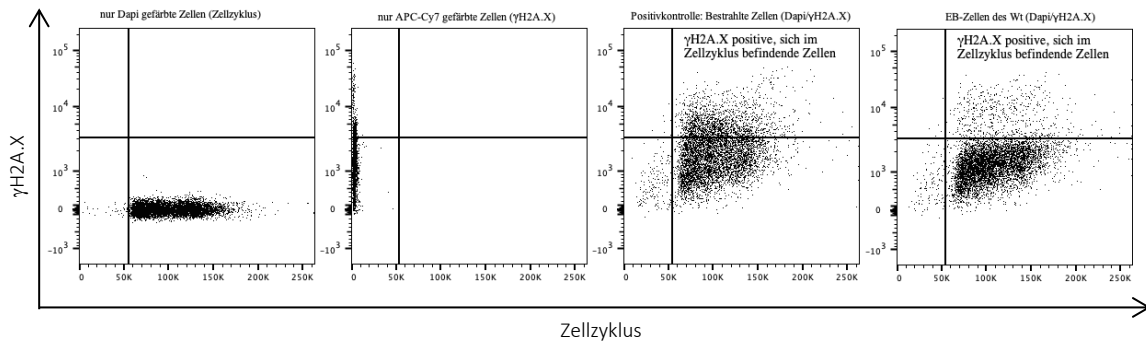


Abb. 4: Exemplarische Darstellung der FACS-Analysen in FlowJo (LCC) von Zellen, welche mit einem Phospho-Histone H2A.X und Dapi (Zellzyklus) gefärbt wurden. Zur Auswertung wurden Zellen verwendet, die jeweils einfach gefärbt wurden (APC-Cy7 oder Dapi) sowie eine Positivkontrolle (Zellen mit 20 Gray behandelt).

2.2.3 Generierung und Validierung von *Pcgf6* und *E2f6* Knock-Out (KO) mESCs

Das CRISPR/Cas9n single guide RNA (sgRNA)-Design zur Deletion von *E2f6* erfolgte mit Hilfe des Programmes ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no>). ChopChop sucht mögliche Bindestellen (*target sequences*) in der Ziel-DNA, an die sgRNAs binden können. Wichtig dabei ist, dass alle Bindestellen in der Nähe von PAMs (*proto-spacer adjacent motifs*) liegen. PAM Sequenzen bestehen aus zwei Guanin Basen und einer weiteren beliebigen Base (-NGG). Ohne diese PAM Sequenz kann keine Bindung des Cas9n Enzyms stattfinden. Neben den crRNAs und dem Cas9n Enzym besteht das CRISPR/Cas9n System aus einer weiteren tracrRNA. Diese bildet zusammen mit der crRNA eine Haarnadelstruktur zum Stabilisieren der Bindung aus und wird mit Hilfe des Vektorsystems (pX335_G2P) in die Zellen eingeführt. crRNAs zusammen mit der tracrRNA werden auch single Guide-RNAs (sgRNAs) genannt. Für *E2f6* wurden sgRNAs für Exon 3 (E2F6 guide-a 5': CTGCCCTCATTACAGAAGCTGG; E2F6 guide-a 3': GCCCCGGTTTGATGTGTCACTGG) und Exon 5 (E2F6 guide-b 5': GGTC AAGGATCTGACAAGATGGG; E2F6 guide-b 3':GGTC AAGGATCTGACAAGATGG) gewählt. Die komplementären sgRNA-Oligos wurden von der Firma Eurofins Genomics mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BbsI (5' CACCGNN...3'; 3' AAACNNN...5') synthetisiert, im Wasserbad bei maximal 95 °C für 2-3 h, abkühlend auf Raumtemperatur, annealed und über die BbsI-Schnittstelle in den Vektor pX335_G2P (addgene #42335, modifiziert) ligiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Stabl-3 Bakterien mit diesen Konstrukten transformiert und einzelne Kolonien mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf erfolgreiche Transformation selektioniert. Positive Klone wurden über Sequenzierung (Eurofins Genomics) verifiziert, das jeweilige Konstrukt in *E. coli* vervielfältigt und durch eine Maxipräparation

aufgereinigt. Die Transfektion der aufgereinigten Konstrukte (2 µg/µl) in murine embryonale Stammzellen (R1; *Pcgf6*_KO#24) erfolgte mit Hilfe des Amaxa Nukleofektion Kit nach Angaben des Herstellers. 24 Stunden post Transfektion wurden die Zellen unter Puromycin (2 mg/ml) kultiviert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Puromycinkonzentration im Kulturmedium halbiert. Nach weiteren 72 h Kultivierung wurden die Zellen in Kulturmedium ohne Puromycin überführt und einzelne Zell-Klone wurden gepickt. Die gepickten Klone wurden kurz in Trypsin-EDTA vereinzelt, in mESC-Medium aufgenommen und in eine Gelatine beschichtete 48-well Platte überführt. Die Einzelklone wurden zum Einfrieren und Genotypisieren expandiert. Zur Genotypisierung wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen, mit Proteinase K (1:1000) versetzt und über Nacht bei 56 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte durch einen 30-minütigen RNase-Verdau mit anschließender Phenol-Chloroform Präzipitation und Waschen der DNA mit 70% EtOH. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR (siehe auch 2.1.10 Genotypisierungsprimer). Für den Nachweis des KO's wurden Primer so entworfen, dass das entstehende Amplikon die deletierten Exone 3-5 überspannte. Folgende PCR Bedingungen für die Genotypisierung wurden dabei verwendet:

gDNA	1 µg
Puffer BD	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
Mit H ₂ O	auf 50 µl

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	94 °C	5 min.
35 Zyklen	94 °C	30 Sek.
	45-68°C	30 Sek.
	74 °C	1 min./kb
Finale Extension	74 °C	10 min.
	10 °C	∞

Die Amplifikate wurden nach erfolgreicher PCR auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Banden zur Selektion positiver KO Klone wurden aus dem Gel geschnitten und die DNA extrahiert. Diese positiven Klone wurden durch Sequenzieren (Eurofins Genomics) verifiziert. Das Design des *Pcgf6* KO erfolgte auf ähnliche Weise wie der *E2f6* KO mit Hilfe des CRISPR-Design Tools (Zhang Lab, MIT, <https://crispr.mit.edu>). Es wurden Guide-RNAs ausgewählt, die kurz vor Exon 1 (*Pcgf6* guide-a 3': GGGTCGCCGGAGACGCCTCGCGG; *Pcgf6* guide-b 5': GCCTGCGCACTGGTACGAAAGG) und kurz nach Exon 10 (*Pcgf6* guide-g 5': CAGTTCTTCCTTCCACCATGCGG; *Pcgf6* guide-h 3': GGTATCACAATACCCTCC GTTCA) lokalisiert sind. Alle anderen Schritte erfolgten wie oben bereits beschrieben.

2.2.3.1 Off-target Analysen der CRISPR/Cas9n KO mESCs

Die Spezifität der sgRNAs wurde durch Off-Target Analysen überprüft. Hierfür wurden die ersten vier Mismatches der jeweiligen sgRNAs analysiert (für *Pcgf6* KO mit Design Tool; Für *E2f6* KO mit Chop Chop erstellt). Es wurden Mismatch-spezifische Primer erstellt (Snap Gene) und synthetisiert (Eurofin Genomics). Die bereits vorher isolierte gDNA der KOs (siehe oben) wurde mit diesen Primern in einer PCR Reaktion auf evtl. vorhandene Off-Targets analysiert (siehe auch Appendix Abb. 19 und 20).

2.2.4 Proteinexpressionsanalysen

Die Auftrennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte mit Hilfe von 12 %-igen Gelen nach der Methode von Lämmli (vgl. Lämmli, 1970). Die Elektrophorese wurde mit einer Mighty Small S250 Gelapparatur (Fa. Hoefer) durchgeführt. Zur Analyse von *whole cell* Proteinextrakten wurden 2×10^6 Zellen in 0,24 ml Lämmli-Puffer aufgenommen und die DNA durch das Auf- und Abziehen durch eine 27G Nadel geschert. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 5 min erhitzt. Die so behandelten Proben wurden in die Taschen des vorbereiteten SDS-PAGE geladen. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ (Thermo Fisher) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA Probenlauf im Sammelgel; 60 mA Probenlauf im Trenngel. In dem nachfolgenden Blot-Verfahren wurden die Proteine bei konstanter Spannung (300 mA), 2h auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Nach Blocken der Membran in 5 %-iger Milchlösung, wurde die Membran mit unterschiedlichen Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten erfolgte ein Strippen der Membran. Die jeweiligen Banden der Proteine wurden über eine Entwicklerlösung

(Thermo Scientific) und mittels Bestrahlung durch UV-Licht (Chemidoc XRS low light imager; Biorad) sichtbar gemacht. Zur Auswertung der Proteinlevel wurde die Membran grafisch mit Hilfe des Programmes ImageJ (NIH) ausgewertet.

2.2.4.1 Expressionsanalysen von PCGF und E2F6 Ziel-Genen

Die Expression verschiedener Gene wurde mit Hilfe einer qRT-PCR bestimmt. Dazu wurden die Zellen in RNazol (Sigma Aldrich) gelöst und die RNA nach Anweisung des Herstellers isoliert. Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte nach folgendem Schema:

RNA	1 µg
10x DNase Puffer	1 µl
DNase	1 µl
H ₂ O	auf 10 µl

Der DNase Verdau erfolgte bei 37 °C für 30 min. Zum Abstoppen des DNase Verdau wurde dem Ansatz 1 µl 50 mM EDTA Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei 65 °C wurden 1 µl Hexamer Primer zum Ansatz pipettiert und dieser weitere 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde der Probe folgende Komponenten zum Erstellen des reversen Transkripts (cDNA) zugefügt:

dNTPs 10 mM	1 µl
5x FS Puffer	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
Reverse Transkriptase	0,6 µl
H ₂ O	0,4 µl

Die Synthese erfolgte dabei in einer PCR Maschine nach folgendem Temperaturprotokoll: 5 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 37 °C und anschließend 4 Minuten bei 70 °C. Die so entstandene cDNA wurde für Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR verwendet.

Die qRT-PCR wurde mit dem Light Cycler®480 der Firma Roche durchgeführt. Für den Ansatz wurden folgende Komponenten gemischt:

cDNA	1,0 µl
steriles H ₂ O	4,0 µl
10 µM Vorwärts-Primer	2,5 µl
10 µM Rückwärts-Primer	2,5 µl
2x SybrGreen Mix	10,0 µl

Folgende Standardeinstellungen des LightCycler®480 wurden verwendet:

15 min., 95°C 45 Zyklen (10 s, 95°C; 20 s, 60°C; 30 s, 72°C; 20 s, 80°C)

1 min., 50°C

65°C – 95°C mit einem Temperaturanstieg von 0,5°C/5 s.

Es wurden Duplikate oder Triplikate der Proben pipettiert. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode mit *mRPL6*, *mRSP9* oder *Gapdh* als Referenzgen.

2.2.5 Mikrobiologische Methoden

2.2.5.1 Anzucht und Kultivierung von *E. coli* Stämmen

Zur Anzucht und Kultivierung von *E. coli* Stämmen wurde entweder 5 ml LB-Medium (ggf. in Antibiotika-Selektionsmedium) mit einer Einzelkolonie in einem Grainerröhrchen oder 200 ml LB-Medium (ggf. in Antibiotika-Selektionsmedium) mit 10 µl einer Glycerinkultur in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane beimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht in einem Luftschüttler bei 180 rpm und 37 °C. Zur Cryokonservierung wurde 1 ml der Übernachtskultur pelletiert, in 1 ml LB-Medium und 200 µl Glycerin (87 %) resuspendiert und bei -20 °C eingefroren. Zur Vereinzelnung oder Reinheitskontrolle wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (ggf. mit Antibiotika) ausgestrichen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgt bei 37 °C über Nacht.

2.2.5.2 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien (nach Hanahan et al., 1991)

Exponentiell wachsende *E. coli* Zellen erhalten durch chemische Behandlung die Fähigkeit nach Hitzeschock, aus dem umgebenden Medium freie DNA aufzunehmen. Dazu wurden 250 ml SOB-Medium mit 1 ml einer Seed-Stock Lösung beimpft und bei RT bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 ohne Schütteln für ca. 16h angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 rpm und 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde langsam durch Pipettieren abgenommen und das Pellet vorsichtig in eiskaltem CCMB80 Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C, 3000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 10 ml eiskaltem CCMB80 resuspendiert. Zur Bestimmung der OD₆₀₀ wurden 200 µl SOB-Medium mit 50 µl der resuspendierten Zellen gemischt und die OD₆₀₀ im Photometer bestimmt. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 1 und 1,5 wurden 50 µl der Zelllösung in vorgekühlte (in Eiswasser) 1,5 ml Tubes pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Alle durchgeführten Schritte erfolgten auf Eis bzw. im Kühlraum.

2.2.5.3 Transformation kompetenter Bakterien nach der Hitzeschockmethode

Zur Transformation wurden 1-20 µl plasmid-haltige Lösung bzw. Ligationsansatz zu 50 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C mit anschließender Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation bei 37 °C für 20-60 min zur Regeneration der Zellen und Expression der Resistenzgene. Die Zellen wurden 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 µl LB-Medium aufgenommen. 20-80 µl dieser Suspension wurden auf entsprechenden Selektionsagarplatten verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.4 Isolation von Plasmid-DNA durch Mini- und Maxipräparation

1 ml einer Übernacht-Kultur wurden in einem Eppendorfgefäß pelletiert (1 min bei 13.000 rpm) und in 150 µl Lösung 1 (+ 5 µl RNaseA 10 mg/ml) resuspendiert. Durch die Zugabe von 150 µl Lösung II, Durchmischung durch Invertieren und 30-sekündiger Inkubation bei Raumtemperatur, erfolgt die Lyse der Zellen. Um anschließend die Gesamt-DNA und Proteine auszufällen, wurden 150 µl Lösung III zugeführt und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Vor Zentrifugation (13.000 rpm, 5min, RT) wurden zwei Tropfen Chloroform zur Probe gegeben und diese durch Invertieren gemischt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 ml 100%-igem Ethanol bei -20 °C 30 min gefällt. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min bei 13000 rpm, RT) und das Pellet einmal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend durch Zentrifugation (3 min bei 13000 rpm, RT) präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und in 30 µl H₂O_{deion.} aufgenommen. Zur Isolation von Plasmid-DNA durch Maxipräparation wurde eine 200 ml Übernacht-Kultur abzentrifugiert und mittels eines Kits der Firma Invitrogen auf gereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.5.5 Enzymatischer DNA-Restriktionsverdau

Für einen Verdau wurden 1-15 µl DNA (je nach Konzentration), 2 µl Restriktionspuffer und 1 µl (0,1 – 1 U) Restriktionsenzym eingesetzt und mit H₂O_{deion.} auf 20 µl aufgefüllt. Die enzymatische Spaltung erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. Beim vollständigen Verdau wurde der Restriktionsansatz ca. 2 h bei 37 °C inkubiert, so dass die Hydrolyse aller vorhandenen Schnittstellen erfolgte. Nach Beendigung des Verdaus wurden die

Enzyme, wenn nötig, durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C bzw. 80 °C inaktiviert. Die gespaltene DNA wurde für Klonierungsexperimente oder Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

2.2.5.6 Agarosegelelektrophorese

Für eine analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agaroseflachbettgele (15 x 7 cm) mit einer Agarosekonzentration von 1-2 % und Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) eingesetzt. TAE-Puffer (1x) diente als Gel- und Laufpuffer. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen zur mit 2 µl Bromphenolblau-Ladepuffer gemischt. Die Elektrophorese wurde bei konstant 60-80 V für 30-90 min, je nach erforderlicher Auftrennung, durchgeführt. Die DNA-Banden konnten durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte mit einer Geldokumentationsanlage der Fa. Biorad. Als Standard wurde der „GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder (plus) von Thermo Fisher“ verwendet.

2.2.5.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Aus einem Agarosegel wurden die DNA-Fragmente ausgeschnitten und als Agarblöckchen in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers. In Kürze: Nach Zugabe des Membrane-Binding-Puffers wurde der Ansatz bis zur Auflösung der Agarose bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch gevortext, auf eine Wizard® Säule übertragen und 1 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Säule bei 14.000 rpm, RT, für eine Minute zentrifugiert. Durch Zugabe von 500 µl Waschpuffer mit Ethanol (zweimal) und erneute Zentrifugation erfolgte die Reinigung der an die Silicamembran gebundenen DNA von Gelrückständen und Pufferlösungen. Zur Elution wurden 30 µl oder H₂O_{deion.} auf die Säule pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA durch einminütige Zentrifugation in einem sterilen Eppendorfgefäß aufgefangen.

2.2.5.8 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Phenol-Chloroform Fällung

DNA-Fragmente, die zum Beispiel enzymatisch verdaut wurden, wurden durch eine Phenol-Chloroform Fällung von Puffern und Rückständen des Verdaus gereinigt, die DNA präzipitiert und aufkonzentriert. Es wurden 1 Volumen Phenol-Chloroform zum Ansatz pipettiert und dieser kräftig für 15 Sekunden geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch bei RT für 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppli überführt und erneut 1 Volumen Phenol-Chloroform hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde der

Überstand wieder in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 Volumen EtOH und 0,1 Volumen Na-Acetat durch Invertieren vermischt. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 700 µl 75%-igem EtOH gewaschen (14000 rpm; 15 min; RT). Anschließend wurde der Überstand komplett entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Die DNA wurde dann in Nuklease-freiem H₂O gelöst und entweder direkt weiter verwertet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.5.9 Ligation von Nukleinsäurefragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt, 2 µl Ligasepuffer sowie 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und mit H₂O_{deion.} auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 16 °C über Nacht und wurde anschließend zur Transformation eingesetzt.

2.2.5.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986) werden DNA-Bereiche spezifisch amplifiziert. Dazu sind zwei Oligonukleotid-Primer nötig, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren und dort hybridisieren können.

Die Amplifizierung erfolgt in mehreren Schritten im Thermocycler. Das amplifizierte Fragment wird anschließend auf ein Agarosegel geladen, durch Gelelution isoliert oder über ein PCR-Aufreinigungs-Kit (NEB) gereinigt.

Für alle Reaktionen wurde ein 50 µl-Ansatz pipettiert:

PCR-Ansatz (50 µl):

- 5 µl Puffer B (blau)
- 5 µl MgCl₂
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Primer forward (1:10)
- 1 µl Primer reverse (1:10)
- 0,1-0,5 µg Template
- 0,25 µl Taq-Polymerase
- mit H₂O auf 50 µl

Sofern nicht anders angegeben, wurden die PCR-Experimente mit Hilfe des Mastercycler Nexus 2 (Eppendorf) nach dem folgenden Programm durchgeführt.

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	94 °C	5 min.
35 Zyklen	94 °C	30 Sek.
	45-68°C	30 Sek.
	74 °C	1 min./kb
Finale Extension	74 °C	10 min.
	10 °C	∞

2.2.6 Statistische Analysen

Jeder Versuch wurde, wenn nicht anders angegeben, mindestens dreimal wiederholt. Die Fehlerbalken in den Abbildungen stellen dabei die jeweilige Standardabweichung (SD) dar. Der Vergleich zweier Datensätze erfolgte über die Anwendung des Student'scher T-test. Dabei wurden folgende Konfidenzwerte festgelegt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit verwendeten *Pcgf6* Knockouts (KO) (#24 und #54) muriner embryonaler Stammzellen (mESC) wurden im Labor von Prof. Dr. Albrecht Müller (MSZ im ZEMM, Würzburg) in Vorarbeiten zu diesem Projekt mit Hilfe des CRISPR/Cas9n Systems erstellt (siehe Appendix Abb. 18). Zur Charakterisierung des zellulären und molekularen *Pcgf6* KO Phänotyps wurde Folgendes untersucht: (3.2) Die Morphologie von mESC-Kolonien im undifferenzierten Zustand und die Morphologie an Tag 2 (d2) und Tag 4 (d4) der *Embryoid Body* (EB)-Kultur; die Zellzahl in der mESC- und EB-Kultur; (3.3 und 3.4) die Zellzyklus-Phasen-Verteilung in nicht-synchronisierten und synchronisierten mESC- und EB-Kulturen; (1.4) die Frequenz apoptotischer Zellen in der mESC- und EB-Kultur sowie (3.5) das Ausmaß an DNA-Schäden durch Doppelstrangbrüche (DSB) in mESC- und EB-Kulturen.

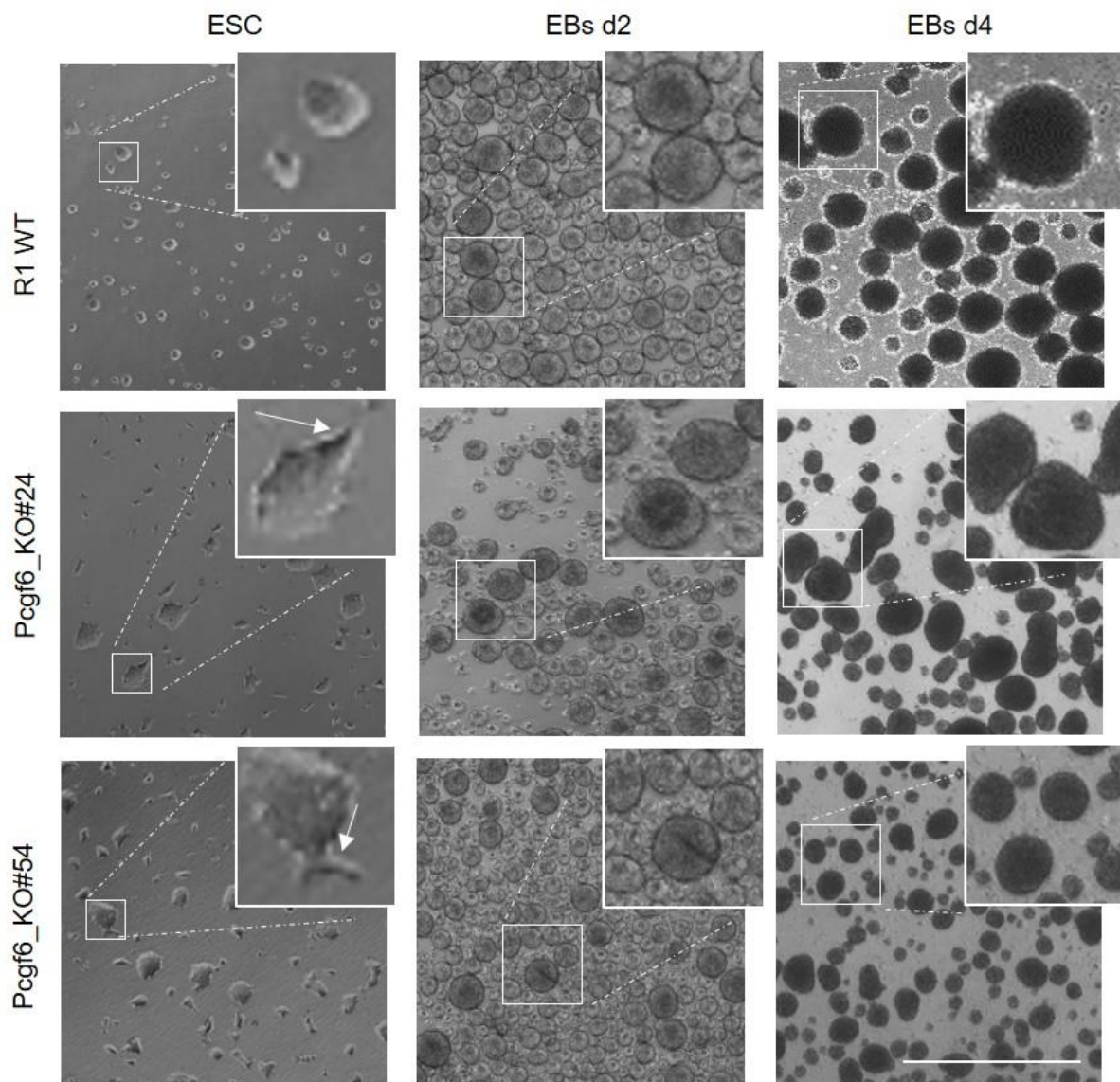
3.1 Veränderte zelluläre Morphologie des *Pcgf6* KO in mESC- und EB-Kultur

Im mikroskopischen Bild zeigte sich im Vergleich zu mESC-Kulturen des Wt, dass mESC-Kulturen der *Pcgf6*_KO-Zelllinien #24 und #54 eine ungleichmäßig erscheinende Oberfläche aufwiesen. Zudem wuchsen die mESC-Kolonien des *Pcgf6* KO flacher und bildeten an der Basis der Kolonie einzelne oder mehrere unregelmäßig geformte Zellen (Abb. 5 A, weiße Pfeile). Um die Konsequenzen des *Pcgf6* KO während der Differenzierung zu bewerten, wurden $0,75 \times 10^6$ Wt, *Pcgf6*_KO#24 und *Pcgf6*_KO#54 mESCs in EB-Suspensionskultur überführt und an Tag 2 (d2) und Tag 4 (d4) der Kultivierung im Mikroskop betrachtet (Abb. 5 A). Die Analyse im Durchlichtmikroskop zeigte, dass *Pcgf6* KO EBs an d2 und d4 der Kultivierung kleiner waren als Wt EBs. Der Vergleich der *Cumulated Population Doubling* (CPD) bestätigte eine verminderte CPD in *Pcgf6* KO (#24 und 54) mESCs. Zur Auswertung der EB-Kultur wurde die Bestimmung der absoluten Zellzahl gewählt. Hier konnte beobachtet werden, dass die Zellzahl der *Pcgf6*_KO#24 und #54 EB-Kulturen an Tag 2 etwas geringer waren als die des Wt. An Tag 4 war die Zellzahl des Wt mehr als doppelt so hoch wie die der *Pcgf6* KOs (Abb. 5 C). Um zu ermitteln, ob Wt und *Pcgf6* KO-Zellen durch die Kompression in einem Tropfen (20 μ l) sich zu einem EB bei einer definierten Ausgangszellzahl (2000 Zellen/Tropfen) zusammenlagerten, wurde die Kultivierung als *Hanging Drops* benutzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl Wt als auch *Pcgf6* KO-Zellen in allen untersuchten Tropfen vollständige EBs bildeten. Eine quantitative Auswertung dieser mikroskopischen Analyse erfolgte über die Bestimmung der maximalen Fläche in μm^2 an Tag 2 und 4 der EB-Kultur. Diese Auswertung ergab, dass sich die berechnete Fläche der *Pcgf6* KO EBs an Tag 2

der Kultur nicht von der Fläche von EBs des WT unterschied. An Tag 4 der Kultivierung ergab die Auswertung, dass die Fläche der *Pcgf6* KO EBs um mehr als ein Drittel geringer war als die der Wt EBs (Abb. 5 D.).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Auswertung der CPD von mESC-Kulturen der *Pcgf6* KO eine verringerte CPD aufwies, verglichen mit dem Wt. Die Kultivierung als EBs ergab, dass mit zunehmender EB-Kultivierungsdauer sowohl Zellzahl als auch Fläche der *Pcgf6* KO EBs sank.

A



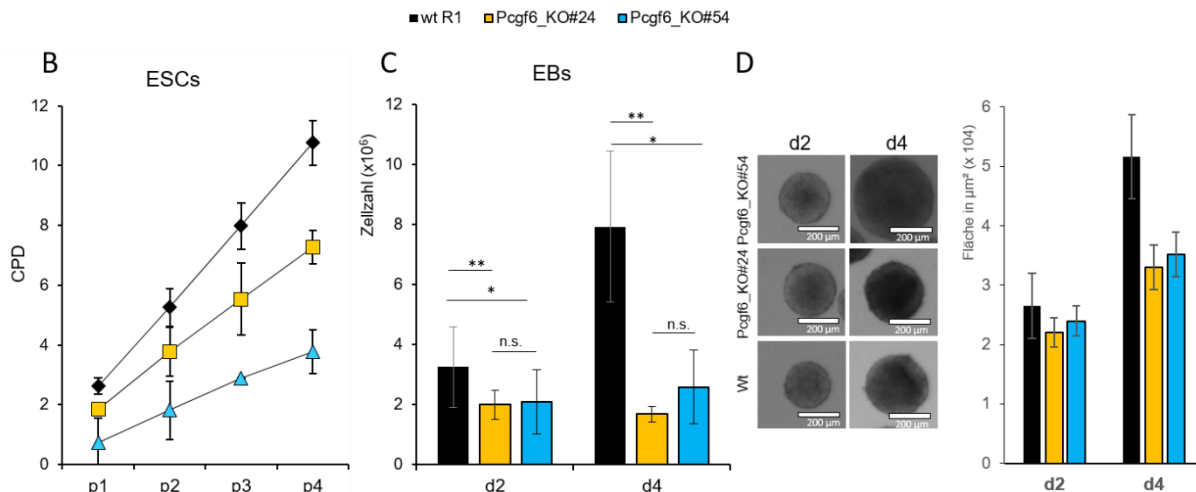


Abb. 5: mESC- und EB-Kulturen des *Pcgf6* KO unterscheiden sich, verglichen mit dem Wt in der mESC-Koloniebildung, einer geringeren CPD und kleineren EB-Strukturen. (A) Repräsentative Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen von mESC- und EB-Kulturen an Tag 2 (d2) und Tag 4 (d4) der Wt und der *Pcgf6*_KO#24 und #54 Zelllinien. Gezeigter Vergrößerungsausschnitt der mESC-Kulturen 4-fach, EB-Kulturen 2-fach. Weiße Pfeile zeigen einzelne, unregelmäßig geformte Kolonien an der Basis. **(B)** Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplung (CPD) von Wt und *Pcgf6*_KO#24 und #54 mESC-Kulturen (n=2). **(C)** Quantifizierung der Zellzahl von EB-Suspensionskulturen (d2 und d4) des Wt und der *Pcgf6*_KO#24 und #54 Zelllinien. Student'scher t-test (2-seitig): *; p ≤ 0,05; **; p ≤ 0,01; ***; p ≤ 0,005. **(D)** Bestimmung der Fläche der EBs d2 und d4 in Hanging Drop Kulturen (je 2000 Zellen/ 30 µl Medium) (n=1, Standardabweichung stammt von der Fläche der Anzahl ausgewerteter EBs).

3.2 Erhöhte Frequenz an Zellen in der G0/G1-Phase in *Pcgf6* KO mESC- und EB-Kulturen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde beschrieben, dass die Deletion von *Pcgf6* in mESC- und EB-Kulturen zu einem Rückgang der Zellzahl führte. Um zu überprüfen, ob die geringere Zellzahl mit einer veränderten Zellzyklusprogression assoziiert war, wurde die Frequenz der Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus von mESC- und EB-Kulturen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und die Frequenz der Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (G0/G1-; S-; G2/M-Phase) im *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) gemessen. Die quantitative Analyse der Zellzyklusphasenverteilung erfolgte mit Hilfe des Programms ModFit LT™ (Verify Software House). Es zeigte sich eine höhere Frequenz an Zellen in der G0/G1-Phase in *Pcgf6*_KO#24 mESC- und EB-Kulturen (d2/d4) im Vergleich zu Wt-Kulturen. Die Frequenz an Zellen in der G0/G1-Phase des *Pcgf6* KO stieg mit zunehmender Dauer der EB-Kultur (d4) an. Die Frequenz an Zellen in der S-Phase der *Pcgf6*_KO#24 Zelllinie war erst an Tag 4 der EB-Kultur signifikant geringer, wohingegen die Frequenz in der G2/M-Phase signifikant höher war. Eine mitgeführte *Pcgf6*_KO#24-FL (Rescue des *Pcgf6* KO-Phänotyps über ein PCGF6-exprimierendes Plasmid) Zelllinie zeigte in der mESC-Kultur ebenfalls eine erhöhte Frequenz

in der G1-Phase verglichen mit dem Wt. In der EB-Kultur an Tag 2 stieg die Frequenz von Zellen in der S-Phase an, während dieser Anstieg an Tag 4 der EB-Kultur zurückging. Der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase war an Tag 2 der EB- Kultur geringer verglichen mit dem Wt. An Tag 4 der EB-Kultur stieg die Frequenz in der G2/M-Phase der *Pcgf6_KO#24-FL* Zelllinie verglichen mit dem Wt leicht an (Abb. 6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit zunehmender Differenzierungsdauer die *Pcgf6_KO#24* mESC-Zellen eine verlängerte G0/G1-Phase aufwiesen oder in dieser arretierten.

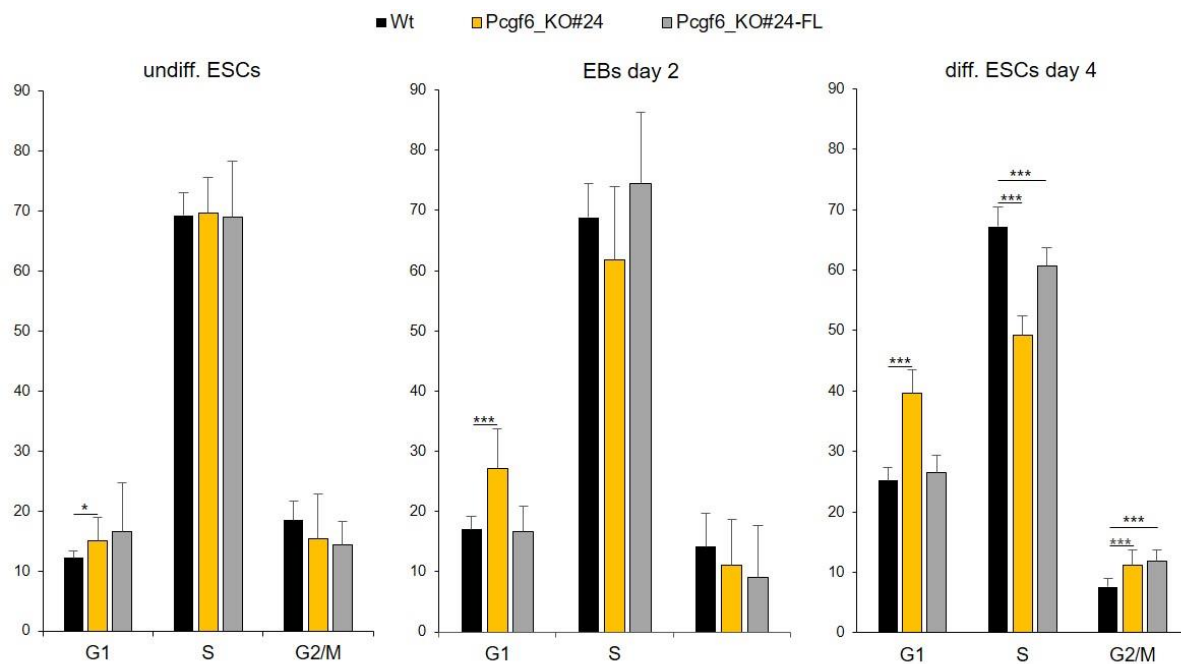


Abb. 6: *Pcgf6_KO#24* mESC und EB-Kulturen (d2 und d4) haben einen erhöhten Anteil an Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus. Gezeigt ist die Frequenz in % der Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus für mESC und EB-Kulturen (d2; d4) des *Pcgf6_KO#24* und Wt. Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. Die Auswertung erfolgte mittels ModFitLT™ (Verify Software House)

3.3 Beschleunigte Zellzyklusprogression *Pcgf6* KO mESCs und EBs

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass mESC- und EB-Kulturen des *Pcgf6* KO eine erhöhte Frequenz an Zellen in der G0/G1-Phase verglichen mit Wt Zellen aufwiesen. Um herauszufinden, ob es während der Kultivierung zu einem Defekt in der Regulation des Zellzyklus kam, wurden mESCs des *Pcgf6_KO#24* und Wt in undifferenziertem Zustand in der G0/G1-Phase synchronisiert (Chen und Deny, 2018; Davis und Dowly, 2001) und anschließend in mESC- oder EB-Medium für 10 Stunden kultiviert. Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen, diese mit PI gefärbt und im FACS analysiert (Abb. 7 A). Beim Vergleichen der Proben von mESC-Kulturen des *Pcgf6_KO#24* und Wt zeigten Zellen des *Pcgf6_KO#24* bereits nach 2,5 h eine geringere Frequenz in der G0/G1-Phase und eine leicht erhöhte Frequenz in der S-Phase. Nach 5 Stunden stieg die Frequenz von Zellen des *Pcgf6_KO#24* in der G0/G1- und S-Phase, während die Frequenz in der G2/M-Phase geringer war im Vergleich mit der Frequenz von Zellen des Wt. Nach 7,5 Stunden war die Frequenz von Zellen in der G2/M-Phase des *Pcgf6_KO#24* im Vergleich mit Zellen des Wt erhöht, während in den anderen Phasen kein Unterschied beobachtet werden konnte. Nach 10 Stunden akkumulierten ca. 10% mehr Zellen des *Pcgf6_KO#24* in der G0/G1-Phase, verglichen mit Zellen des Wt. Die Auswertung der EB-Kulturen ergab, dass *Pcgf6_KO#24* EB-Kulturen nach 5 Stunden mehr Zellen in der G2/M-Phase aufwiesen, während sich nach 7,5 Stunden Kultivierungsdauer mehr Zellen in der G0/G1-Phase und weniger Zellen in der S-Phase befanden. Nach 10 Stunden Kultivierung stieg die Frequenz der Zellen des *Pcgf6_KO#24* in der G0/G1-Phase auf mehr als 50% an, während die Frequenz der Wt Kulturen unter 30% lag. *Pcgf6_KO#24* EB-Kulturen zeigten im Vergleich zum Wt eine erheblich niedrigere Frequenz der S-Phase Zellen, während die Frequenz der G2/M-Phase Zellen vergleichbar zu der Frequenz in Wt Kulturen war (Abb. 7 B, unten).

Mit den Synchronisierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass Zellen des *Pcgf6_KO#24* schneller durch den Zellzyklus schreiten. Sowohl die Kultivierung in mESC- als auch EB-Medium zeigt bereits nach 5 Stunden eine beschleunigte Zellzyklusprogression der Zellen des *Pcgf6_KO#24*.

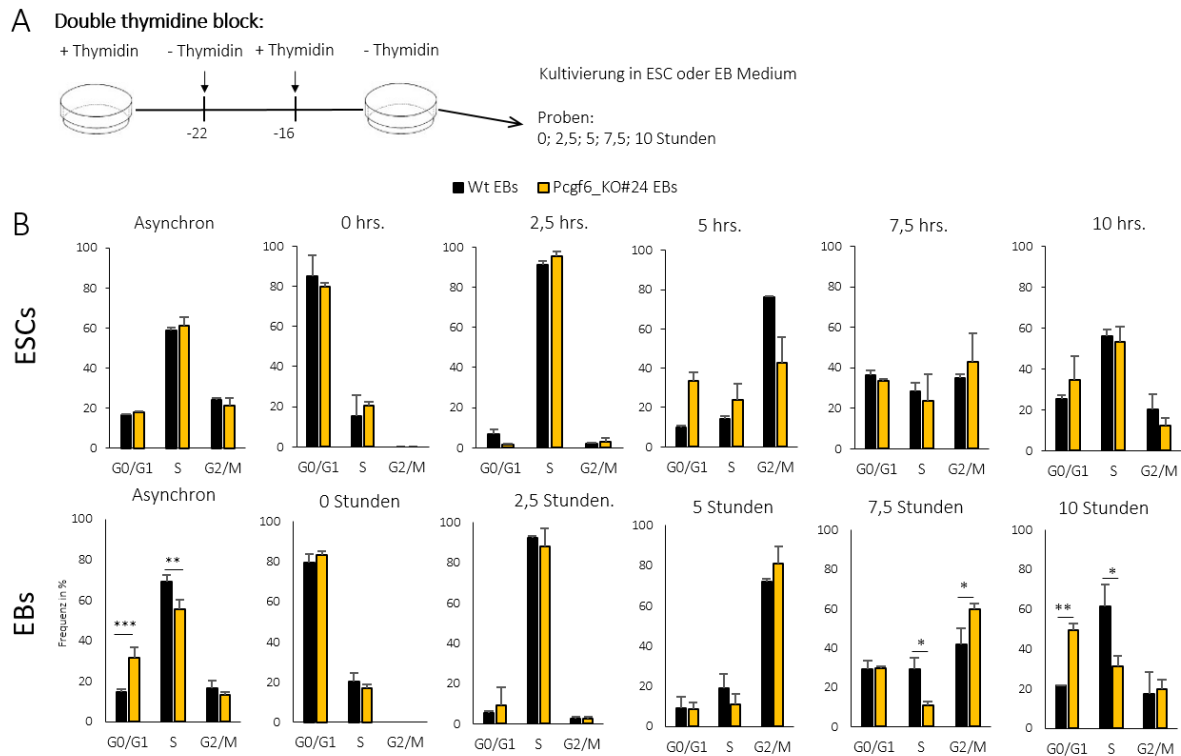


Abb. 7: mESC- und EB-Kulturen synchronisierter *Pcgf6_KO#24* zeigen einen regulatorischen Defekt im Übergang von G2/M- in die G0/G1-Phase. (A) Schematische Darstellung der Synchronisierung von mESCs; nach Synchronisierung wurden die Zellen entweder in mESC- oder EB-Medium kultiviert. (B) Grafische Darstellung der Frequenz der Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus in der mESC- und EB-Kultur von *Pcgf6_KO#24* und Wt nach Synchronisierung (ESCs: n=2); Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. Die Auswertung erfolgte mittels ModFitLT™ (Verify Software House).

3.4 Erhöhte Frequenz apoptotischer Zellen in differenzierenden *Pcgf6* KO-Kulturen

Zur weiteren molekularen Untersuchung des Phänotyps wurde die apoptotische Frequenz in undifferenzierten mESC- und EB-Kulturen (d2/d4) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mittels Annexin V/PI gefärbt und im FACS analysiert. Für die Analyse wurde die Frequenz aller apoptotischen Zellen (früh- und spätapoptotisch) berechnet (siehe auch Kapitel Methoden Abb. 3). Es konnte beobachtet werden, dass Zellen des *Pcgf6_KO#54* in mESC-Kultur eine leicht erhöhte Frequenz spät-apoptotischer Zellen (schwarzer Anteil der gestapelten Säule in Abb. 8, rechte Säule im rechten Säulendiagramm) aufwies, während sich die apoptotische Frequenz des *Pcgf6_KO#24* nicht von der des Wt unterschied. Die apoptotische Frequenz in Zellen des *Pcgf6_KO#24* und #54 stieg an Tag 2 der EB-Kultur im Vergleich zum Wt um mehr als 10 % an, während sich die apoptotische Frequenz der Zellen des mit analysierte *Pcgf6_#24-FL* ähnlich wie der Wt verhielt (Abb. 8 B, Säulendiagramm in der Mitte). An Tag 4 der EB-Kultur stied die Frequenz apoptotischer Zellen in *Pcgf6* KO-Kulturen um mehr als 10% verglichen mit dem Wt (Abb. 8 B, rechtes Säulendiagramm). Die mitgeführte Zelllinie *Pcgf6_KO#24-FL*

zeigte dabei eine leichte Erhöhung der Frequenz apoptotischer Zellen verglichen mit der apoptotischen Frequenz wildtypischer Zellen (Abb. 8 B, Mitte, rechtes Säulendiagramm).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die apoptotische Frequenz der *Pcgf6* KO-Zellen mit zunehmender Differenzierung anstieg.

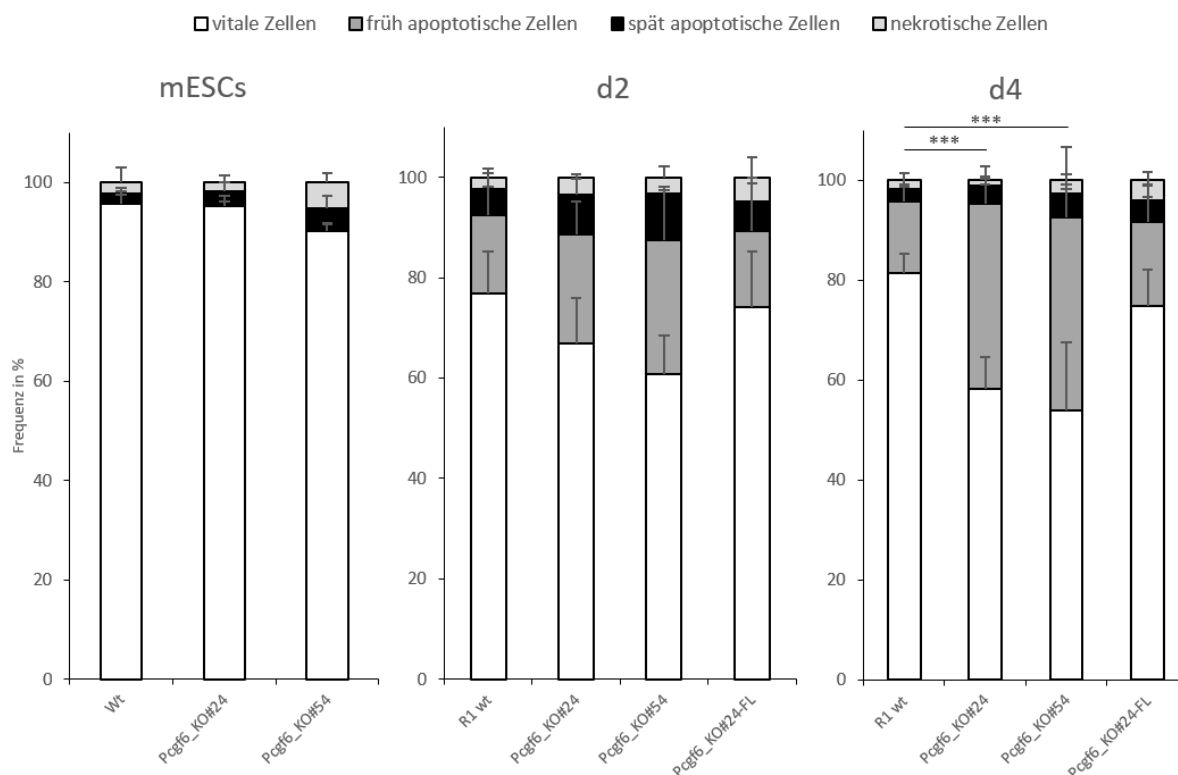


Abb. 8: Analyse der Apoptose in mESC- und EB-Kulturen des Wt, *Pcgf6* KO (#24 und #54). Darstellung der prozentualen Auswertung aller apoptotischen (früh- und spätapoptotisch) Zellen in einem Säulendiagramm-für mESC und EB-Kulturen (d2/d4) des *Pcgf6*_KO#24 und #54 und Wt, in der EB-Kultur zusätzlich noch *Pcgf6*_KO#24-FL.

3.5 Kein Unterschied in der Phosphorylierung von H2AX in *Pcgf6* KO EB-Kulturen

Die Phosphorylierung von H2AX (Ser139) ist eine schnelle zelluläre Antwort auf Schädigungen der DNA (Rogakou et al., 1999). Doppelstrangbrüche (DSB), hervorgerufen durch ionisierende Strahlung, führen zu Checkpoint vermitteltem Zellzyklusarrest (Yuan et al. 2010). Außerdem wird H2AX für die Fragmentierung von DNA während der Apoptose rekrutiert (Mukherjee et al. 2006). Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen vermehrtem, phosphoryliertem H2AX (γ H2AX) und der verringerten Zellzahl sowie der veränderten Zellzyklus-Progression differenzierender *Pcgf6* KO mESC-Kulturen gab, wurden EBs (d2) des Wt und *Pcgf6*_KO#24 mit einem Phospho-Histone H2A.X Antikörper (Cell Signaling Technology) gefärbt und die Frequenz γ H2AX positiver (+) Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Parallel wurden die Zellen für die Bestimmung der

Zellzyklusphasen mit einem weiteren Farbstoff (DAPI) gefärbt. Als Positivkontrolle wurden mit ionisierender Strahlung (20 Gray) behandelte Zellen in den Analysen mitgeführt (Abb. 9, orange Säulen). Untersucht wurden nur Zellen von EB-Kulturen, da in mESC-Kulturen eine erhöhte Frequenz an positiven γ H2AX-Foci nicht mit zellzyklus-abhängigen DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose assoziiert sind (Bañuelos et al. 2008).

Die Auswertung der FACS-Analysen ergab keinen Unterschied in der Frequenz positiver γ H2AX-Foci zwischen Wt und *Pcgf6*_KO#24 EB-Kulturen (Abb. 9, schwarze Säulen). Diese Analysen zeigten demnach keine verstärkten DNA-Schädigungen durch DSB in differenzierenden Kulturen des *Pcgf6*_KO#24. Sie sind keine Erklärung für den Rückgang der Zellzahl in der EB-Kultur von *Pcgf6* KO-Zellen.

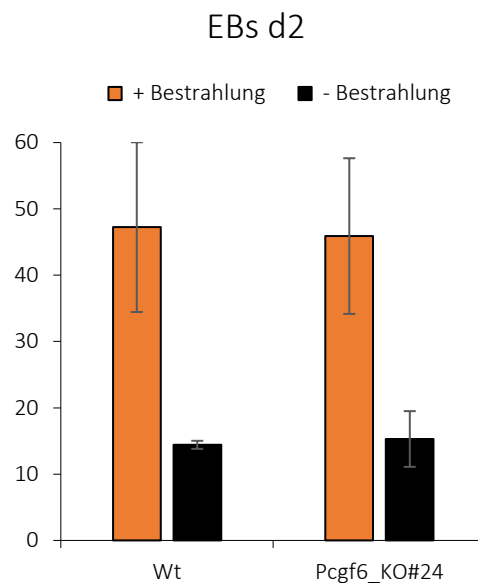


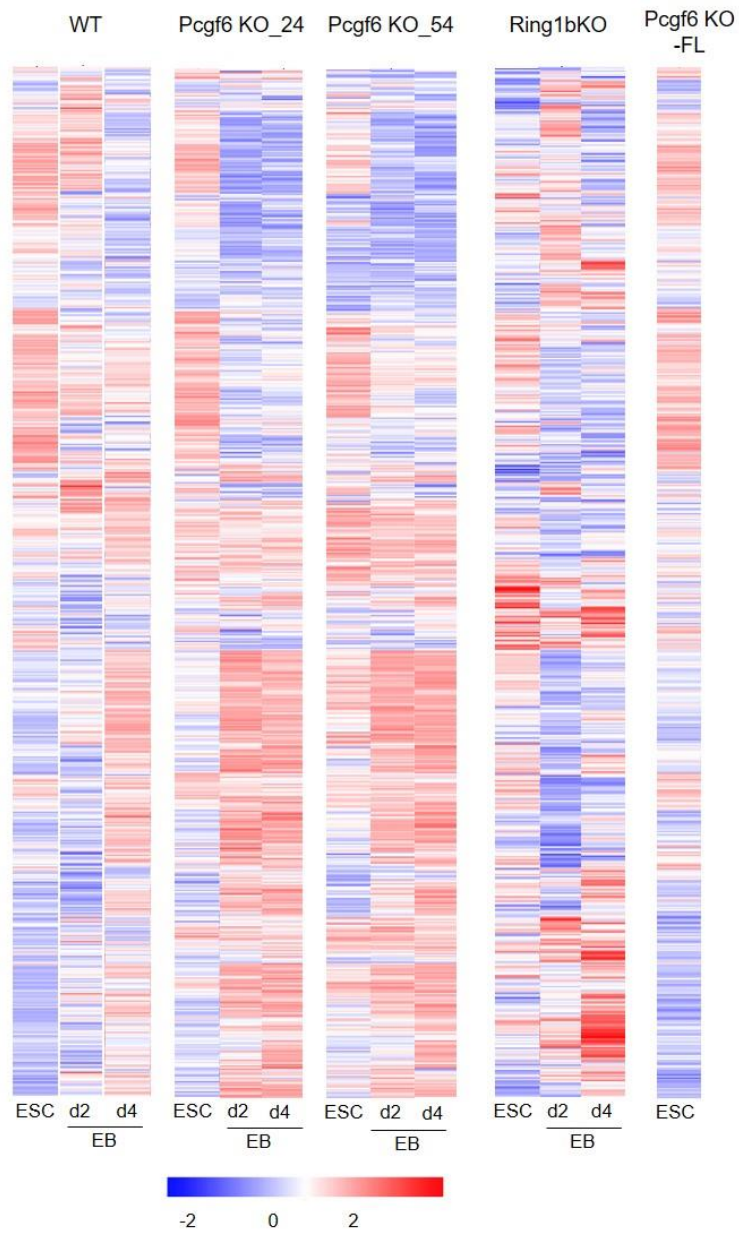
Abb. 9: Kein Unterschied in positiven γ H2A.X-Foci in *Pcgf6*_KO#24 verglichen mit dem Wt in EB-Kulturen (d2). Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit 20 Gray bestrahlt wurden (orangene Säule). Die Frequenz positiver γ H2A.X-Foci ist durch die schwarzen Säulen dargestellt (n=1). Standardabweichungen stammen von mehreren Proben der gleichen Behandlung.

3.6 Globale Genexpressionsanalysen der *Pcgf6* KO mESC- und EB-Kulturen

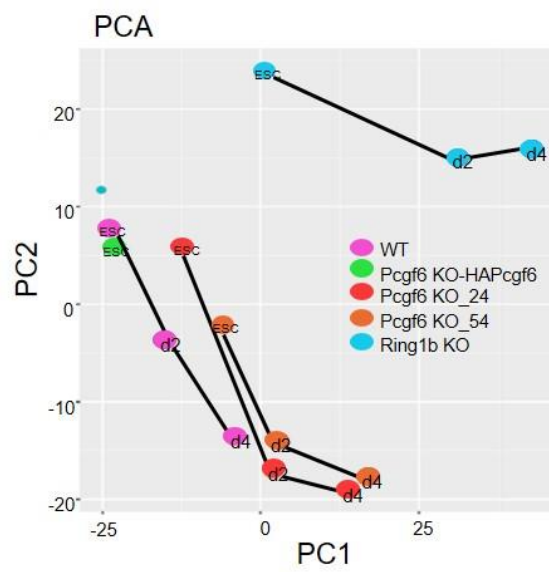
3.6.1 Unkontrollierter Start der Differenzierung von *Pcgf6* KO EB-Kulturen

Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurden globale Genexpressionsanalysen von Wt, *Pcgf6*_KO#24 und #54 sowie *Pcgf6*_KO#24-FL und *Ring1A/B* KO mESC- und EB-Kulturen (d2/d4) durchgeführt (Novogen Co. Ltd). Die Analyse dieser Daten erfolgte durch Novogen und in der Arbeitsgruppe von Dr. Förstner (IMIB, Universität Würzburg). Zur Auswertung der RNASeq-Daten wurde eine Heatmap der Genexpression in mESC- und EB-Kulturen (d2/d4) des Wt und der beiden *Pcgf6* KO-Zelllinien (#24 und #54) erstellt (Abb. 10 A). Die Auswertung wurde mit Daten von mESC- und EB-Kulturen einer *Ring1b*_KO-Zelllinie sowie Daten von mESC-Kulturen des *Pcgf6*_KO#24-FL erweitert (Abb. 6 A). Die Analyse der Heatmap zeigte, dass das Expressionsmuster von Wt mESC-Kulturen ähnlich wie das der *Pcgf6*_KO#24 und #54 mESC-Kulturen aussah, während das Expressionmuster von Wt EB-Kulturen d4 große Ähnlichkeiten mit dem Muster von EB-Kulturen der *Pcgf6* KO-Zelllinien an Tag 2 aufwies (Abb. 10 A). Zur weiteren Auswertung dieser Beobachtung wurden die Daten einer PCA Analyse herangezogen (Abb. 10 B). Diese ergab, dass die Datensätze des Wt an Tag 2 der EB-Kultur und die Datensätze des *Pcgf6*_KO#24 und #54 an Tag 4 der EB-Kultur eng beieinander lagen. Außerdem zeigte diese Analyse, dass die Datensätze des *Ring1A/B* KO nicht in der Nähe der Datensätze von Wt oder *Pcgf6*_KO#24 und 54 gruppierten (Abb. 10 B). Die Daten zu differenziell exprimierten Genen zwischen Wt und *Pcgf6*_KO (#24 und #54) von mESC- und EB-Kulturen wurden zur Erstellung von Gene Ontology (GO) Enrichment Analysen (erstellt mit DAVID) verwendet. Die Auswertung erfolgte auf Grund der gezeigten Heatmap und PCA Ergebnissen mit Fokus auf Daten der EB-Kultivierung. Die gemeinsam differenziell exprimierten Gene von *Pcgf6*_KO#24 und *Pcgf6*_KO#54 wurden ermittelt (Abb. 10 C) und die biologischen Prozesse ausgewertet. Die Analyse ergab, dass an Tag 2 der EB-Kultur besonders Gene herunterreguliert waren, die Zellzyklusprozesse wie zum Beispiel Zellteilung und Chromosomensegregation zugeordnet werden konnten (Abb. 10 D, linkes Diagramm mit roten Balken und roter Umrandung der Prozesse). Im Gegensatz dazu waren differenziell hochregulierte Gene besonders an Entwicklungsbiologischen Prozessen wie zum Beispiel die Zelldifferenzierung oder Herzmorphogenese beteiligt (Abb. 10 D, Diagramm mit grünen Balken und grüner Umrandung der Prozesse).

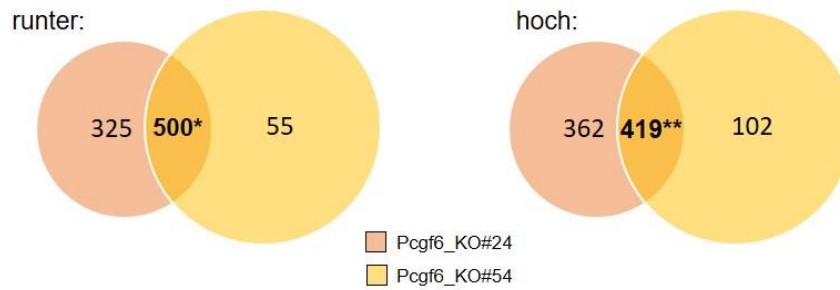
A



B



C



D

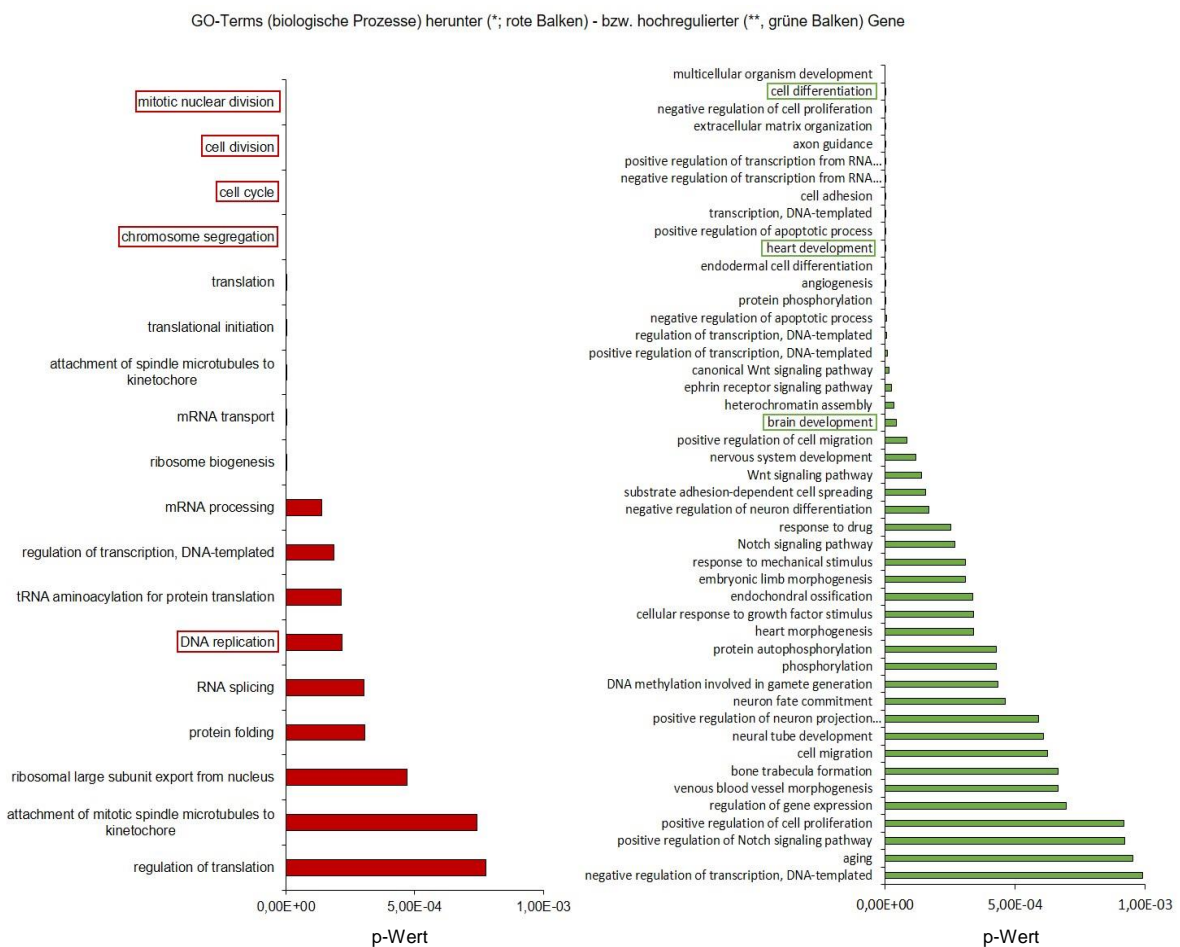
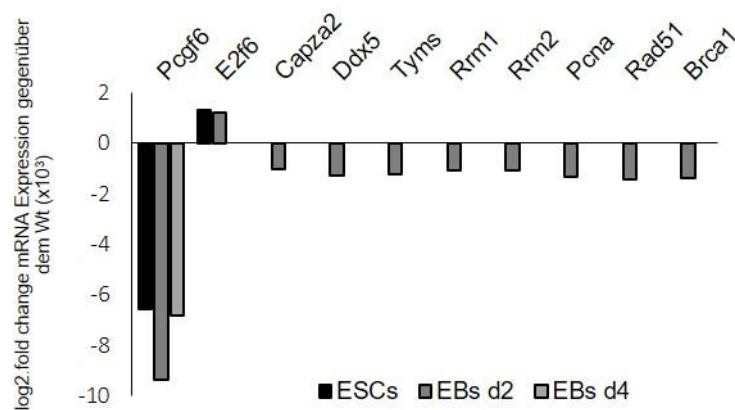


Abb. 10: Analyse der RNASeq-Daten. (A) Genexpressionsmuster von Wt, *Pcgf6*_KO#24 und #54, Ring1A/B_KO mESC- und EB-Kulturen sowie von *Pcgf6*_KO#24-FL mESC-Kulturen. (B) PCA von Wt, *Pcgf6*_KO#24 und 54, Ring1A/B KO sowie von *Pcgf6*_KO#24-FL mESC- und EB-Kulturen. (C) Venn Diagramm zur Darstellung der gemeinsamen differenziell herunter (500*) bzw. hoch (419**) regulierten Gene zwischen *Pcgf6*_KO#24 sowie #54 EB-Kulturen (d2) und Wt EB-Kulturen (d2). (D) Biologische Prozesse (GO Enrichment Analyses) der differenziell herunter (*) und hoch (**) regulierten Gene in *Pcgf6* KO EB-Kulturen (d2) und Wt EB-Kulturen (d2). Beispiele Zellzyklus-assoziiierter Prozesse sind rot umrandet (herunter regulierte) während Beispiele Differenzierungs-assoziiierter Prozesse (hoch reguliert) grün umrandet sind. (p-value $\leq 0,001$)

3.6.3 Die *E2f6* Expression in *Pcgf6* KO EB-Kulturen ist an Tag 2 herunterreguliert

Wie im Kapitel 2.1 beschrieben, deuten die GO Term Analysen darauf hin, dass *Pcgf6* KO-Zellen zu Beginn der Differenzierung in EB-Kulturen eine verlangsamte Zellzyklusprogression zeigten. E2F6, als weitere Komponente des PRC1.6, ist auch als negativer Regulator des Zellzyklus bekannt. Im Zellzyklus beeinflusst E2F6 die Bindung von E2F1-3 an die Promotoren von Genen, die wichtig für die Progression von Zellen durch G/S1-Phase sind (Giangrande et al. 2004; Bertoli et al. 2013). Die Analyse der hier vorgestellten globalen Genexpressionsdaten ergaben, dass die Expression von *E2f6* in mESC- und in EB-Kulturen an Tag 2 der Kultur hochreguliert war (Wt vs. *Pcgf6*KO#24). Interessanterweise waren auch E2F6 Zielgene an Tag 2 der EB-Kultur herunterreguliert (Abb. 11 A). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass der Verlust von *Pcgf6* zu Beginn der EB-Kultur zur Folge hat, dass Zielgene von E2F6 verstärkt reprimiert waren. In der in silico Analyse publizierter ChipSeq Daten (Scelfo et al., 2019) zeigte sich, dass PCGF6 an den Promoter von E2F6 bindet, nicht aber an Zielgene von E2F6 (Abb. 11 B). Diese Analysen lassen vermuten, dass PCGF6 die Transkription von E2F6 über die Bindung an dessen Promoter inhibieren könnte, was wiederum möglicherweise zur Folge hätte, dass E2F6 Zielgene, die für die G1/S-Phasen Progression verantwortlich sind, nicht reprimiert würden. Der Verlust von *Pcgf6* hat also unter Umständen zur Folge, dass es zu einer veränderten G1/S-Phasen Progression aufgrund der Repression E2F6-spezifischer Target Gene kommt.

A



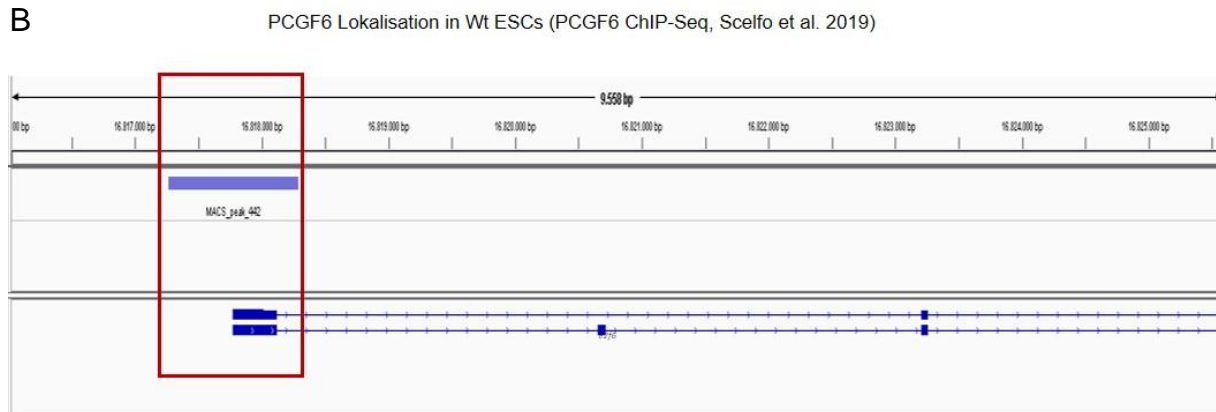


Abb. 11: E2f-abhängige Genregulation in mESC- und EB-Kulturen des Wt und *Pcgf6* KO (#24). (A) Grafische Darstellung der globalen Regulation von E2f6 und E2f-abhängigen Zielgenen in mESC- und EB-Kulturen an Tag 2 und 4 (RNASeq Daten; unpublished). (B) Promotorbindeanalysen von PCGF6 an E2f6 in mESCs (Daten aus Scelfo et al., 2019).

3.7 Kontamination der Zellkultur mit Mykoplasmen

Da es nicht mehr möglich war mESCs des Wt und der *Pcgf6* KO-Zelllinien zu EBs zu differenzieren, wurden die Zellen mit Hilfe einer spezifischen PCR auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass alle Zelllinien mit Mykoplasmen kontaminiert waren (Abb. 12). Es konnten keine Rückstellproben (früheste Rückstellprobe aus Juni 2016) ohne Mykoplasmen identifiziert werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass diese Arbeit mit bereits kontaminierten Zellen begonnen wurde.

Die bereits erstellten RNASeq Rohdaten wurden mit Hilfe des Comprehensive Cancer Center Mainfranken (Würzburg) auf das Vorhandensein von Mykoplasmengensequenzen untersucht. Die Analyse der RNASeq-Daten zeigte, dass in 50% aller untersuchten Proben Mykoplasmen-Reads gefunden werden konnten, dabei lag der maximale Anteil gefundener Reads bei 4 Reads pro Probe (Tab. 1). Aus der Literatur ist bekannt, dass RNA-Proben, die mittels PolyA-Verfahren sequenziert wurden, deutlich mehr als 100 Mykoplasmen-Reads/ enthalten können (Olarerin-George und Hogenesch 2015). Da der Anteil der Reads in den RNASeq-Daten zu dieser Arbeit so gering war, kann dieser als Background Signal eingestuft werden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Proben, welche für die RNASeq Datenermittlung erstellt wurden, mit Mykoplasmen kontaminiert waren.

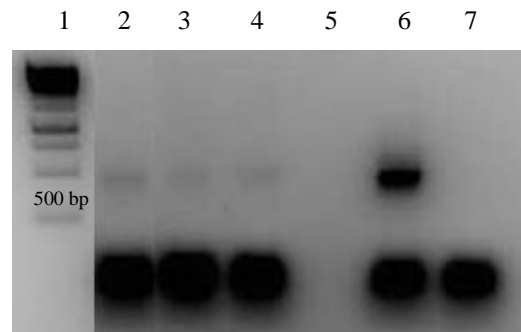


Abb. 12: Darstellung der Ergebnisse einer Mykoplasmen-PCR mit leichter Kontamination der mESC Kulturen. (2.-4. Reihe). 1. Reihe Marker (Gene Ruler 1kb DNA Ladder Thermo Scientific), 2. Reihe R1 WT mESCs, 3. Reihe: Pcgf6_KO#24 mESCs, 4. Reihe: Pcgf6_KO#54 mESCs, 5. Reihe: leer, 6. Reihe: Positivkontrolle, 7. Reihe: Negativkontrolle. Zellen mit einer Kontamination weisen eine Bande bei 500 bp auf (siehe Positivkontrolle)

ID	Mouse Genome				Mycoplasma Genome			
	Reads	Aligned 0 times	Aligned exactly 1 time	Aligned > 1 times	Reads	Aligned 0 times	Aligned exactly 1 time	Aligned > 1 times
C2_24_D4_2	24261175 (100.00%)	6410943 (26.42%)	11174703 (46.06%)	6675529 (27.52%)	24261175 (100.00%)	24261171 (100.00%)	1 (0.00%)	0 (0.00%)
C2_HA_2	23802727 (100.00%)	5758527 (24.19%)	10237873 (43.01%)	7806327 (32.80%)	23802727 (100.00%)	23802727 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
CCC2_24_1	24193001 (100.00%)	5618178 (23.22%)	10948279 (45.25%)	7626544 (31.52%)	24193001 (100.00%)	24193001 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
CCC2_24_2	24193001 (100.00%)	5897078 (24.38%)	10800223 (44.64%)	7495700 (30.98%)	24193001 (100.00%)	24192999 (100.00%)	2 (0.00%)	0 (0.00%)
WT_1	26867366 (100.00%)	5873205 (21.86%)	11824166 (44.01%)	9169995 (34.13%)	26867366 (100.00%)	26867363 (100.00%)	3 (0.00%)	0 (0.00%)
WT_D4_1	26798118 (100.00%)	6252945 (23.33%)	12735142 (47.52%)	7810031 (29.14%)	26798118 (100.00%)	26798117 (100.00%)	1 (0.00%)	0 (0.00%)
WT_D4_2	26798118 (100.00%)	6538550 (24.40%)	12579723 (46.94%)	7679845 (28.66%)	26798118 (100.00%)	26798118 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
C2_24_D4_1	24261175 (100.00%)	6125864 (25.25%)	11326874 (46.69%)	6808437 (28.06%)	24261175 (100.00%)	24261173 (100.00%)	2 (0.00%)	0 (0.00%)
C2_HA_1	23802727 (100.00%)	5443562 (22.87%)	10396581 (43.68%)	7962584 (33.45%)	23802727 (100.00%)	23802727 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
C2_HA_D4_2	24459601 (100.00%)	5393558 (22.05%)	8286287 (33.88%)	10779756 (44.07%)	24459601 (100.00%)	24459601 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
WT_2	26867366 (100.00%)	6175691 (22.99%)	11675220 (43.46%)	9016455 (33.56%)	26867366 (100.00%)	26867362 (100.00%)	4 (0.00%)	0 (0.00%)
C2_HA_D4_1	24459601 (100.00%)	5119448 (20.93%)	8381382 (34.27%)	10958771 (44.80%)	24459601 (100.00%)	24459601 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)

Tab. 1: Bioinformatische Analyse der RNASeq Daten auf das Vorhandensein von Gensequenzen von Mykoplasmen (CCC Mainfranken). Dargestellt sind die Sequenzalignments der Maus und diverser Mykoplasmen Genome mit den Daten der jeweiligen RNASeq Proben und die Anzahl der Mykoplasmen-Reads, die dem Mausgenom zugeordnet werden konnten (letzten beiden Spalten).

3.8 Generierung neuer KO-Zelllinien in mESCs

Da keine Rückstellproben ohne Mykoplasmen identifiziert werden konnten, wurden neue *Pcgf6* KO-Zelllinien mit CRISPR/Cas9n erstellt. Die Ergebnisse der RNASeq Daten zeigten, dass die Expression von *E2f6*, eine weitere Komponente des PRC1.6 Komplexes, in EB-Kulturen des *Pcgf6* KO herunterreguliert war (Kapitel 3.6.2). Auf Basis dieser Analyse wurden zusätzlich zu den *Pcgf6* KO mESCs weitere KO-Zelllinien von *E2f6* in Wt mESCs und *Pcgf6* KO mESCs erstellt. Im folgenden Kapitel sind die Strategien zur Erstellung der neuen KO-Zelllinien in mESC- und EB-Kulturen dargestellt.

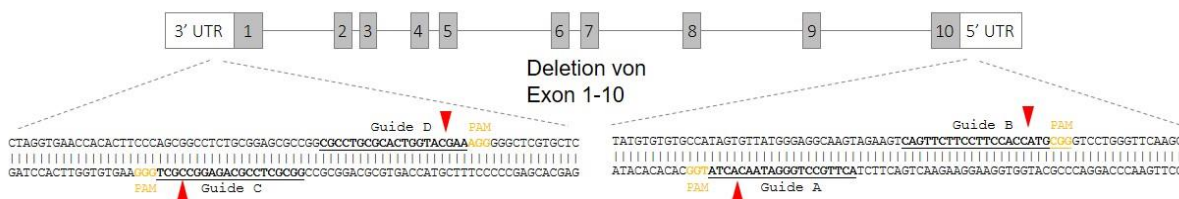
3.8.1 CRISPR/Cas Strategie zur Deletion von *Pcgf6* und/oder *E2f6* in mESCs des Wt

Die Deletion von *Pcgf6* beruhte auf der von Prof. Dr. Albrecht Müller (MSZ im ZEMM, Würzburg) erstellten Strategie. Dazu wurden sgRNAs gewählt die sowohl einen Schnitt vor Exon 1 und einen Schnitt hinter Exon 10 vermittelten (Abb. 13 A). Neben diesem *Pcgf6* KO wurde auch ein *E2f6* KO in Wt und auch in *Pcgf6* KO (#49) mESCs erstellt. Hierfür wurde mit Hilfe spezifischer sgRNAs eine Deletion der Exone 3-5 im *E2f6* Locus hergestellt (Abb. 13 B). Der Genotyp des *Pcgf6* KO konnte in einer PCR Reaktion mit 3 Primern, welche sowohl zwischen wildtypischen, homozygot und heterozygote Klonen unterscheidet, nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde dabei ein Gemisch aus genomischer DNA des *Pcgf6* KO und des Wt (im Verhältnis 1:1) verwendet. Eine erfolgreiche Deletion von *Pcgf6* konnte für die Klone #22 und #49 (*Pcgf6*_KO#22; *Pcgf6*_KO#49) nachgewiesen werden. Zum Nachweis des *E2f6* KO wurde eine Analyse durchgeführt, die in vier unterschiedlichen PCR Reaktionen mehrere Exone des *E2f6* Gens abdeckte. Hierfür wurde in einer Reaktion des Verlustes des Exon 3 (Abb. 13 A grüne Pfeile „Ex 3 fw“ und Ex 3 rv“), in einer anderen Reaktion der Verlust von Exon 5 untersucht (Abb. 13 B grüne Pfeile „Ex 5 fw“ und Ex 5 rv“). Zur weiteren Verifizierung der Deletion des Exon 3 und Exon 5, wurde eine PCR Reaktion verwendet, die eine mögliche Deletion des Exon 4 nachwies (Abb. 13 B, grüne Pfeile „Ex 4 fw“ und Ex 4 rv“). Durch den Einsatz einer PCR zum Nachweis der Exon-überspannenden Deletion sollte schließlich gezeigt werden, dass der komplette Locus von Exon 3 bis 5 deletiert wurde (Abb. 13 B, grüne Pfeile „Ex 3 fw“ und Ex 5 rv“). Eine erfolgreiche Deletion von *E2f6* in Wt mESCs konnte für die Klone #13 und #41 (*E2f6*_KO#13; *E2f6*_KO#41) nachgewiesen werden. Die Deletion von *E2f6* in *Pcgf6*_KO#49 mESCs konnte für einen Klon (*dKO*^{*Pcgf6/E2f6*}#C) ermittelt werden. Der Klon *dKO*^{*Pcgf6/E2f6*}#A* wurde in den PCR Reaktionen als heterozygot für das KO-Allel identifiziert, da sowohl das Vorhandensein von Exon 3,4 und 5 als auch ein Produkt der Exon-

überspannenden PCR Reaktion nachgewiesen wurde (Abb. 13 C). Die Ermittlung der Deletion von *Pcgf6* und *E2f6* in Wt mESCs und auch die Deletion von *E2f6* in *Pcgf6*_KO#49 mESCs konnte mittels einer Westernblot Analyse auf Proteinexpressionsebene bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass alle Klone, auch der heterozygote Klon $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$, kein E2F6 Protein exprimierten (Abb. 13 C). Zur Bestätigung der jeweiligen KO auf Genexpressionsebene wurden qRT-PCRs von *Pcgf6* und *E2f6* in mESC und EB-Kulturen durchgeführt. Die Auswertung der Daten zeigte, dass keine *Pcgf6* Expression in *Pcgf6* KO und $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und #C detektiert werden konnte. Das Gleiche gilt für die *E2f6* Expression in mESC und EB-Kulturen der *E2f6* KO Klone und des $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$. Der $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ zeigt eine Expression von *E2f6* und bestätigte damit die in der Genotypisierung bereits festgestellte Heterozygotie des Klons (Abb. 13 D).

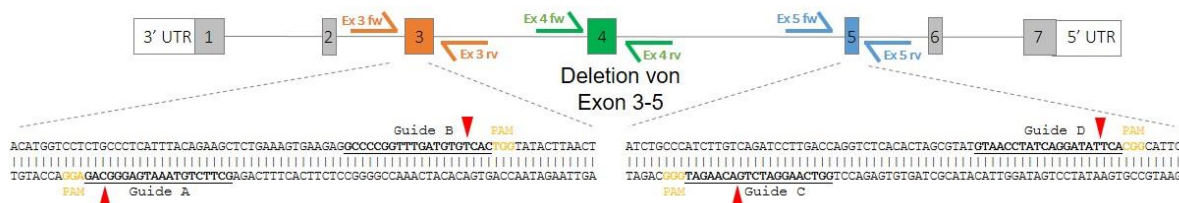
A

***Pcgf6* Locus** (Chr. 19: 47033617-47050906)

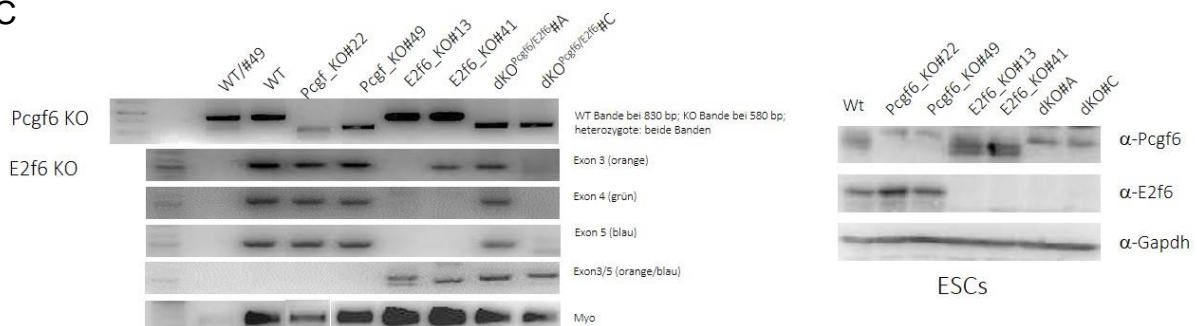


B

***E2f6* Locus** (Chr. 12: 16810963-16839742)



C



D

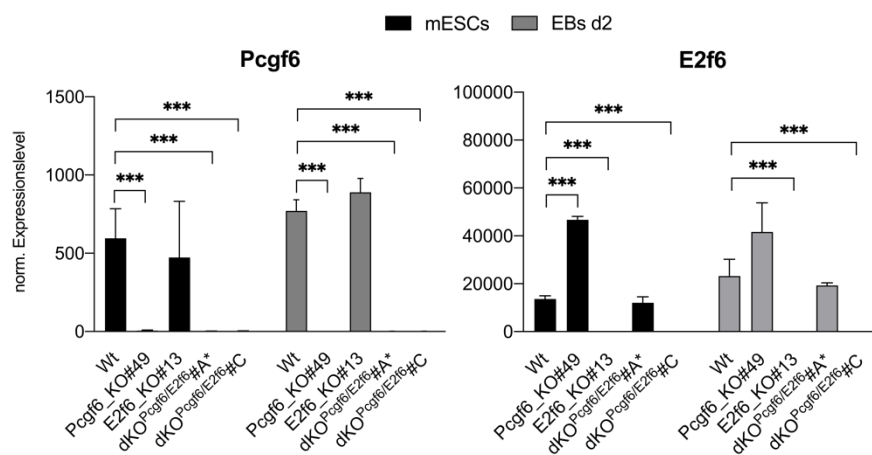


Abb. 13: Generierung des *E2f6* KO und *dKO^{Pcgf6/E2f6}* basierend auf dem Crispr/Cas9n System. (A) Schematische Darstellung der Intron/Exon-Struktur von *E2f6* mit den Bindestellen der guide-RNAs (fett und unterstrichen), Position der PAM-Sequenz (gelb) sowie der putativen Schnittstelle des Cas9n Enzyms (rote Pfeilspitze). **(B)** Ausgewählte Einzelklone wurden mittels Genotypisierung analysiert. Bandengrößen: Exon 3 Wt Bande bei 513 bp (orange); Exon 4 Wt Bande bei 320 bp (grün); Exon 5 Wt Bande bei 326 bp (blau); Exon3/5 KO Bande bei ca. 610 bp (orange/blau). **(C)** Die Ermittlung des KOs in mESC-Kulturen auf Proteinlevel bestimmt durch Westernblot Analysen. Zum Nachweis wurde ein PCGF6 und E2F6-spezifischer Antikörper verwendet. GAPDH diente als Ladekontrolle. **(D)** Nachweis der KOs in mESC- und EB-Kulturen auf Genexpressionslevel. Die Expression wurde durch zwei Standards (*Gapdh* und *mRps29*) normalisiert. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt; Student'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$

3.9 Charakterisierung des Phänotyps von *Pcgf6* KO, *E2f6* KO und *dKO^{Pcgf6/E2f6}* mESC- und EB-Kulturen

Wie bereits im 1. Kapitel für die initial verwendeten *Pcgf6* KO mESCs beschrieben, erfolgte auch mit den neuen, nun mykoplasmenfreien KO-Zelllinien eine erste Charakterisierung des Phänotyps. Hierzu wurde die Morphologie von mESC-Kolonien im undifferenzierten Zustand und in der EB-Kultur (d2/d4) analysiert, die Zellzahl der mESC- und EB-Kulturen bestimmt sowie die Expression der Pluripotenzmarker Sox2, Oct4 und Nanog, als auch die Expression unterschiedlicher Keimblattgene analysiert (3.9.1); die Zellzyklusanalysen wurden mit den neu generierten Zelllinien wiederholt (3.9.2) ebenso wurde die Frequenz apoptotischer Zellen in mESC- und in EB-Kulturen bestimmt (3.9.3). Des Weiteren wurde mit Hilfe von qRT-PCR Analysen die Genexpression unterschiedlicher Differenzierungsmarker analysiert (3.9.4). Zusätzlich zu der Analyse der Expression von Differenzierungsmarkern wurde, angestoßen durch neue publizierte Daten, die Expression ausgewählter Keimbahngene untersucht (3.9.5).

3.9.1 Veränderte Morphologie des *Pcgf6* KO und *dKO^{Pcgf6/E2f6}* in der EB-Kultur

Zur Charakterisierung der unterschiedliche KO mESC-Linien wurden jeweils zwei KO Klone verwendet. Die morphologische Charakterisierung erfolgte in mESC- und EB-Kulturen

(d2/d4). Alle KO-Kulturen wurden dabei mit Wt Kulturen verglichen. In Abbildung 14 A sind die repräsentativen Phasenkontrastaufnahmen für jeweils einen Einzelknockout (*Pcgf6*_KO#49; *E2f6*_KO#41) sowie für den heterozygoten Doppelknockout ($dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$) und den homozygoten Klon ($dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$) dargestellt (Abb. 14 A; Appendix Abb. 23). Wie schon in den Mykoplasmen-kontaminiert *Pcgf6* KO (*Pcgf6*_KO#24 und #54) Zelllinien beobachtet, wuchsen auch die neu generierten *Pcgf6* KO mESCs zu flacheren Kolonien heran, an deren Basis oft einzelne oder mehrere unregelmäßig geformte Zellen vorhanden waren. Diese Beobachtung konnte weder für den *E2f6* KO oder für den $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ und den Klon den $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ gemacht werden (Abb. 14 A). Sowohl mESC-Kulturen des *E2f6* KO als auch der $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und #C zeigten einen ähnlichen Anstieg der Zellzahl wie Wt Kulturen (Abb. 14 B). An Tag 2 der EB-Kultur bildeten Wt mESCs größere EBs als *Pcgf6* KO mESCs, während kein Größenunterschied zu *E2f6* KO EBs zu erkennen war (Abb. 14 A). Die heterozygoten $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ EBs unterschieden sich nicht in der Größe vom Wt EBs, wohin gegen homozygote $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ EBs im Vergleich zu Wt EBs kleiner und auch in ihrer Anzahl verringert waren (Abb. 14 C). An Tag 4 der EB-Kultivierung waren *Pcgf6* KO EBs im Vergleich zum Wt deutlich kleiner, während die *E2f6* KO mESCs deutlich größere EBs bildeten. Die EBs des $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ sowie des Klons $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ waren an Tag 4 der EB-Kultur kleiner als die des Wt (Abb. 14 A). Die beschriebenen Beobachtungen wurden durch die Auswertung der Zellzahl bestätigt. Die CPD der mESCs aller KO-Zelllinien unterschieden sich nicht von den CPD Werten, die von den Wt Kulturen erhalten wurden, nur der CPD Wert der homozygoten $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ mESC Kultur war gegenüber dem Wt um fast die Hälfte geringer (Abb. 14 B). Die Auswertung der absoluten Zellzahl der EB-Kulturen ergab an Tag 2 eine signifikant geringere Zellzahl für die heterozygote $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und die homozygote $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ Zelllinie. An Tag 4 der EB-Kultur zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wt und *Pcgf6*_KO#49 sowie *E2f6*_KO#41 als auch für die $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und die $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ Zellen. Außerdem ergab die Zellzahlauswertung, dass sich die Zellzahl des Doppelknockouts und des heterozygoten Klons an Tag 4 der EB Kultivierung nicht mehr erhöhte (Abb. 14 C). Eine weitere Analyse der Zellen erfolgte in hanging drop Kulturen. Dabei konnte ermittelt werden, dass Zellen aller Klone (2000 Zellen pro Tropfen) einen EB bildeten. Die Flächenberechnung zeigte, dass bereits an Tag 2 der EB-Kultur die Fläche des *Pcgf6* KO kleiner war als die des Wt. An Tag 4 war nicht nur die Fläche des *Pcgf6* KO, sondern auch die des *E2f6* KO verringert. Die Berechnung der Fläche des $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und des Klons $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ ergab eine ähnlich große Fläche

wie die der *Pcgf6* KO EBs (Abb. 14 D). Letztere Beobachtung steht im Gegensatz zur Zellzahlauswertung der EB-Kulturen an Tag 4 der Suspensionskultur.

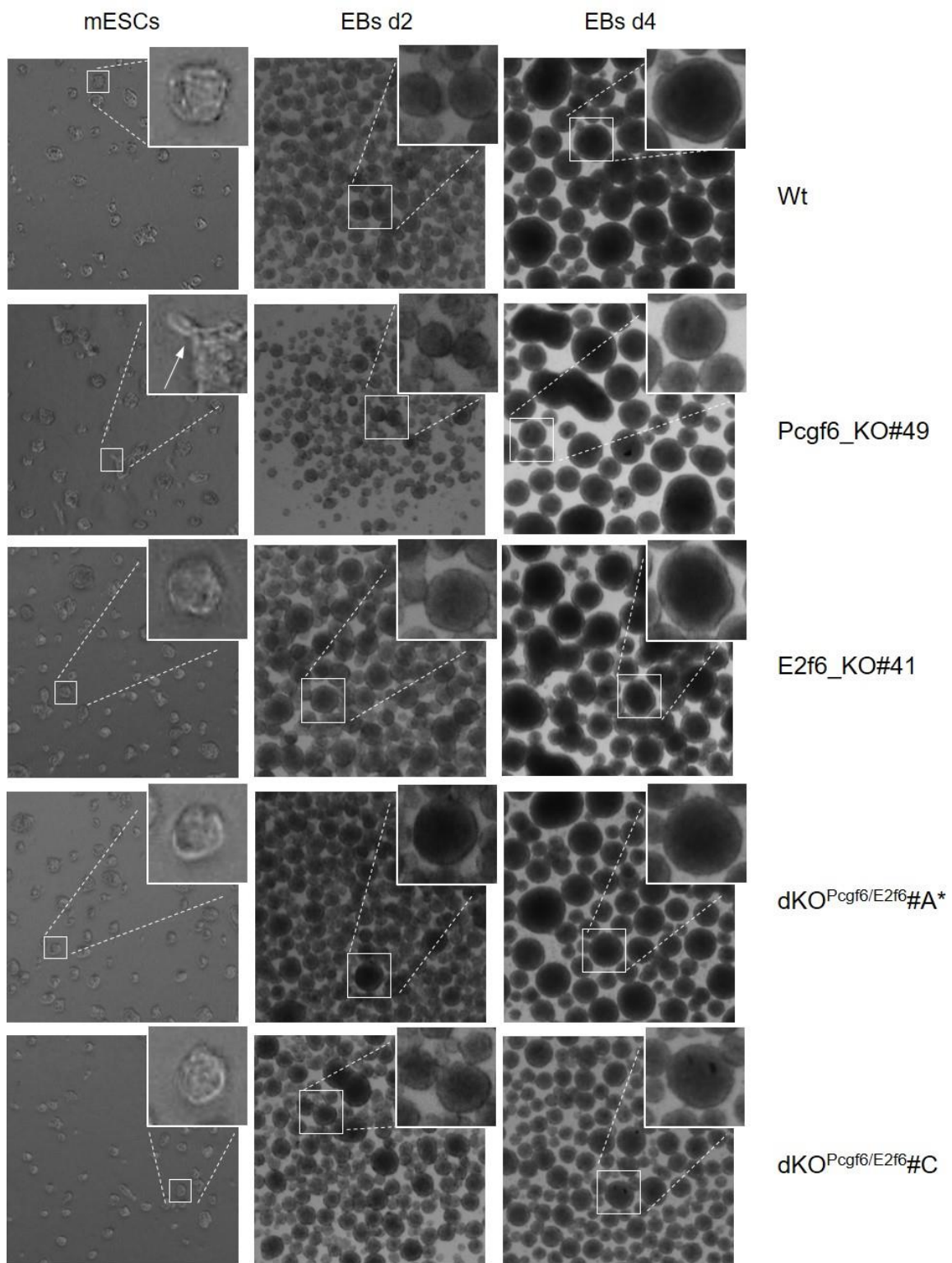
Zusammenfassend ergibt die morphologische Charakterisierung, dass der Verlust von *Pcgf6* eine stärkere Auswirkung auf die mESC-Morphologie hat als der Verlust von *E2f6*. Ein Verlust beider Faktoren führte zu einer verringerten Zellzahl in der EB-Suspensionskultur, während jedoch die Größe der EBs in der *Hanging Drop* Kultur einen Rescue des *Pcgf6* KO zeigt.

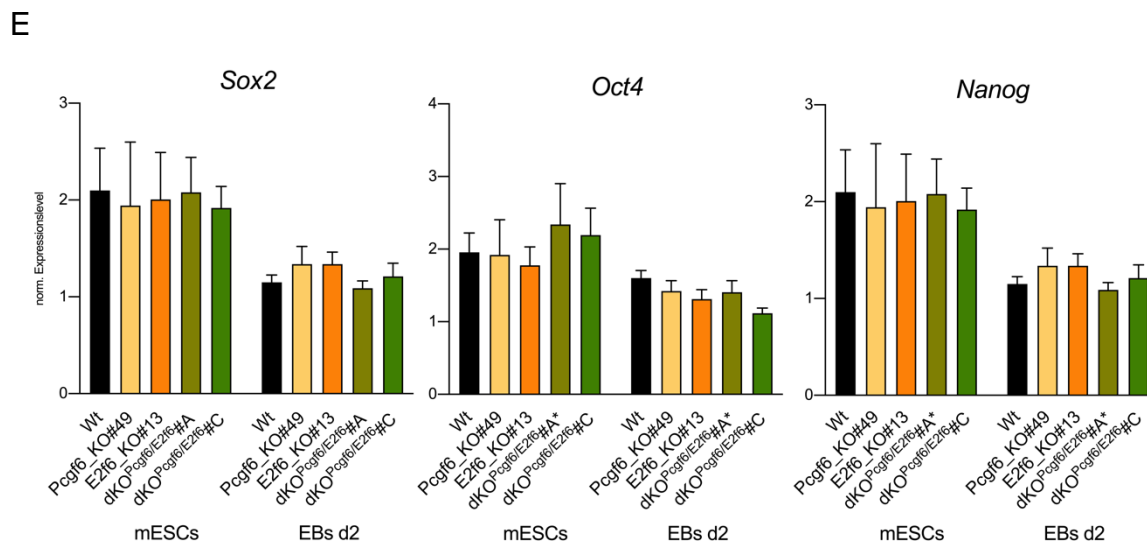
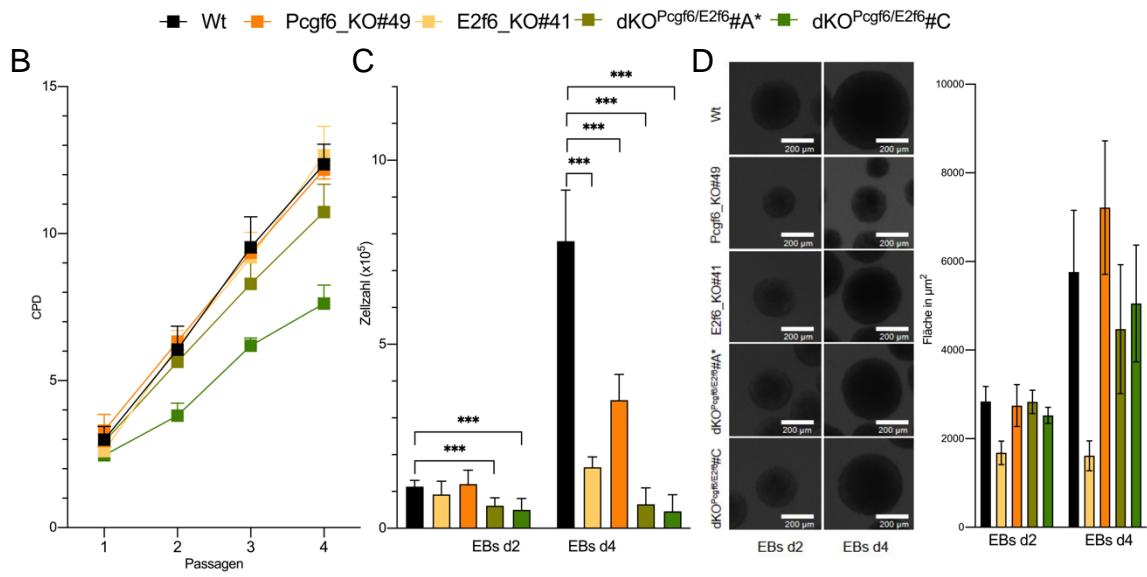
Neben den oben beschriebenen Analysen der zellulären und morphologieschen Eigenschaften wurde die Expression der Pluripotenzmarkergenen *Sox2*, *Oct4* und *Nanog* mittels qRT-PCR in den KO- und dKO-Kulturen analysiert. Die drei Gene werden als Mastertranskriptionsfaktoren der Pluripotenz beschrieben und sind zentral dafür verantwortlich, dass mESCs ihren pluripotenten Status erhalten. Bereits in vorherigen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Komponenten der Polycomb-Komplexe eine Reduzierung der Expression dieser Masterfaktoren zeigte. Diese Aussagen können mit denen in dieser Arbeit durchgeführten Analysen nicht bestätigt werden. Es ist auch zu erkennen, dass, wie für differenzierte Zellen zu erwarten, die Expression von *Sox2*, *Oct4* und *Nanog* während der EB-Kultur in Wt und allen KO-Zelllinien abnahm (Abb. 14 E).

Für eine basale Analyse der Differenzierung in Zelltypen der unterschiedlichen Keimblätter, wurde die Expression folgender Markergene analysiert: Trophektoderm: *Gata4* und *Gata6*; primitives Endoderm: *Nestin* und *Pax3*; frühes Mesoderm: *Nodal* und *T (Brachyury)*. Die Analysen zeigten, dass die Expression von *Gata4* in *Pcgf6* KO, in dKO^{*Pcgf6/E2f6*#A*} und C und in *E2f6* KO mESC- und EB-Kulturen (d2) niedriger war als in Wt Kulturen, während die Expression in *E2f6* KO-Kulturen sowohl in ESC- als auch in Wt-Kulturen vergleichbar war. *Gata6* war sowohl in *Pcgf6* KO, in *E2f6* KO und in dKO^{*Pcgf6/E2f6*#A*} und #C mESC-Kulturen verglichen mit mESC-Kulturen des Wt höher exprimiert. Verglichen zu mESC-Kulturen war die Expression in den EB-Kulturen aller Zelllinien niedriger. Gegenüber der Wt EB-Kultur zeigte sich nur für die dKO^{*Pcgf6/E2f6*#C} Kultur ein leicht erhöhter *Gata6* Expressionslevel. Die Expression des endodermalen Markers *Nestin* war in ESC-Kulturen des *Pcgf6* KO verglichen mit der Expression im Wt erhöht. Die Expression in Wt EB-Kulturen im Vergleich zu Wt mESC-Kulturen war fast 4-fach erhöht. Die Expression in *Pcgf6* KO und dKO^{*Pcgf6/E2f6*#A*} EB-Kulturen war auf einem ähnlich hohen Niveau wie die Expression in Wt EB-Kulturen. Nur die Expression in dKO^{*Pcgf6/E2f6*#C} EB-Kulturen war verglichen mit der Expression in Wt-Kulturen deutlich niedriger. Der zweite endodermale Marker, *Pax3*, war in allen mESC Kulturen niedrig exprimiert, während die Expression in allen EB-Kulturen stark anstieg und ein vergleichbares

Niveau erreichte. Als einziger nicht Transkriptionsfaktor zeigte der mesodermale Marker *Nodal* sowohl in mESC- als auch EB-Kulturen aller Zelllinien keinen deutlichen Unterschied zur Expression in Wt Kulturen. Die Expression von *T (Brachyury)* war in den *Pcgf6* KO- und in den dKO^{*Pcgf6/E2f6*#C}- mESC-Kulturen gegenüber dem Expressionslevel in Wt mESC-Kulturen erhöht. Die *T* Expression stieg in Wt- und in *E2f6* KO EB Kulturen im Vergleich zur Expression in mESC-Kulturen an. In *Pcgf6* KO EB-Kulturen lag der *T* Expressionslevel ungefähr auf dem Niveau der Expression in *Pcgf6* KO mESC-Kulturen. In dKO^{*Pcgf6/E2f6*#C} und in dKO^{*Pcgf6/E2f6*#A*} EB-Kulturen war der *T* Expressionslevel niedriger als in allen anderen EB-Kulturen (Abb. 14 F).

A





F

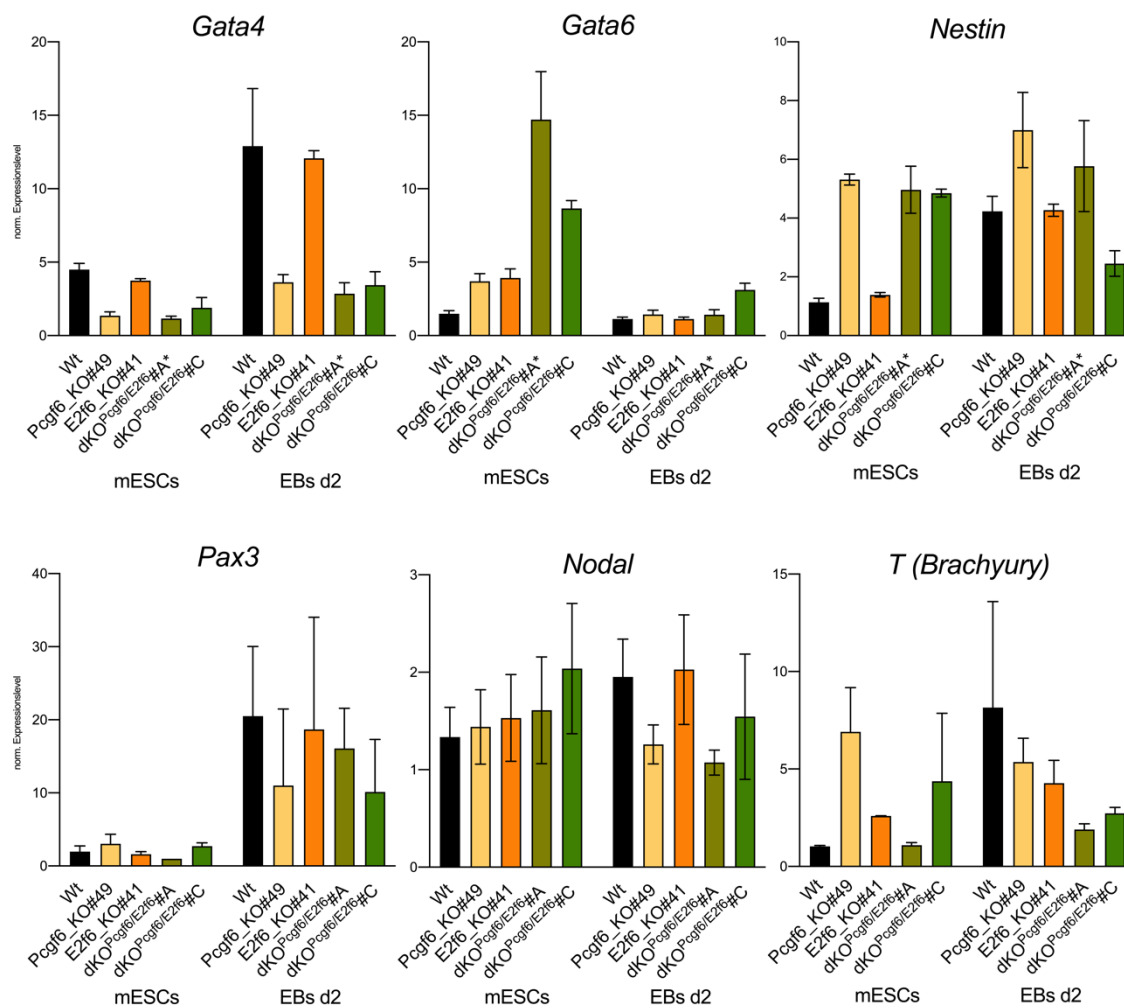


Abb. 14: Zelluläre und molekulare Analyse der *Pcgf6* und/oder *E2f6* KO Zellen in mESC- und EB-Kulturen (A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von mESCs und EBs d2 und d4 des Wt und der des *Pcgf6*_KO#49 und *E2f6*_KO#41 sowie der dKO^{*Pcgf6/E2f6*}#A* und #C. **(B)** Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplung (CPD) von Wt und der des *Pcgf6*_KO#49 und *E2f6*_KO#41 sowie der dKO^{*Pcgf6/E2f6*}#A* und #C ESCs (p=Passage) (n=2). **(C)** Quantifizierung der absoluten Zellzahlen in Wt und der des *Pcgf6*_KO#49 und *E2f6*_KO#41 EB sowie der dKO^{*Pcgf6/E2f6*}#A* und #C Suspensionskulturen an d2 und d4 der Differenzierung (n=3). Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$ **(D)** Bestimmung der Fläche der EBs d2 und d4 in Hanging Drop Kulturen (je 2000 Zellen/ 30 μ l Medium) (n=1, Standardabweichung stammt von der Fläche der Anzahl ausgewerteter EBs). **(E)** Genexpression der Pluripotenzmarker *Sox2*, *Oct4* und *Nanog*. Die Expression wurde durch zwei Standards (*Gapdh*; *mRps29*) normalisiert. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt; Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. **(F)** Genexpression der Keimblatt-spezifischen Marker *Gata4* und *Gata6* (Trophektoderm), *Nestin* und *Pax3* (primitives Endoderm), *Nodal* und *T* (frühes Mesoderm) (n=2, Standardabweichung stammt von der Anzahl der Proben eines Markes der jeweiligen qRT-PCR).

3.10 mESC und EB-Kulturen des dKO^{PcGF6/E2f6} zeigen G2 Arrest

Auch die Zellzyklus-Analysen wurden, für die Mykoplasmen-freien Zelllinien wiederholt. Analysiert wurde die Frequenz von Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus in mESC- und EB-Kulturen (d2, d4) des Wt's, beider *PcGF6* KO (#22; #49) und *E2f6* KO (#13; #41) Einzelklone, sowie beide dKO^{PcGF6/E2f6} Klone (#A; #C). Da sich die Analysen der jeweiligen Knockout Klone als vergleichbar herausstellten, ist jeweils ein KO und der heterozygote Klon dKO^{PcGF6/E2f6}#A* sowie der Doppelknockout dKO^{PcGF6/E2f6}#C (alle weiteren Daten im Appendix Abb. 24) in den Abbildungen gezeigt. Ein Vergleich der mESC-Kulturen von Wt und den KO-Zelllinien ergab, dass der heterozygote Klon dKO^{PcGF6/E2f6}#A* eine erhöhte Frequenz an Zellen in der G0/G1-Phase aufwies. dKO^{PcGF6/E2f6}#C Kulturen zeigten eine niedrigere Frequenz an S-Phase-Zellen, während die Frequenz der G2/M-Phase Zellen fast doppelt so hoch war wie die der Wt Zellen (Abb. 15, linkes Säulendiagramm). Die Analyse der EB-Kulturen an Tag 2 fiel ähnlich aus wie die der mESC-Kulturen. Auch hier hatte der heterozygote Klon dKO^{PcGF6/E2f6}#A* eine erhöhte Frequenz an Zellen in der G0/G1-Phase, während die der Zellen in der G2/M-Phase, verglichen mit Wt Kulturen, niedriger war (Abb. 15, Säulendiagramm in der Mitte). An Tag 4 der EB-Kultur war auffällig, dass die Frequenz der Zellen in der G0/G1-Phase bei allen untersuchten Zelllinien keine signifikanten Unterschiede aufwies. Die Frequenz der Doppelknockout dKO^{PcGF6/E2f6}#C S-Phase Zellen war niedriger, während die Frequenz der Doppelknockout Zellen und auch die des heterozygoten Klons dKO^{PcGF6/E2f6}#A* in der G2/M-Phase verglichen mit der Frequenz von Wt Zellen erhöht war (Abb. 15, rechtes Säulendiagramm). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen, die mit den Mykoplasmen-kontaminierten Zellen erhalten wurden, da die Zellen der neuen *PcGF6* KO und *E2f6* KO-Zelllinien keinen Zellzyklusdefekt in der G0/G1-Phase aufwiesen. Nur die Zellen des dKO^{PcGF6/E2f6}#C akkumulierten in der G2/M-Phase in der mESC und EB-Kultur (d4).

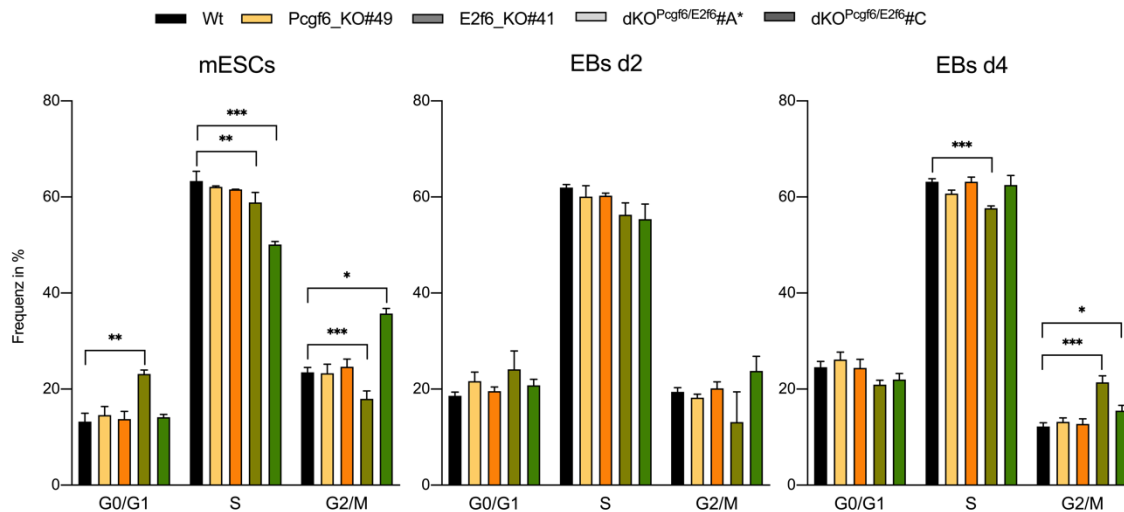


Abb. 15: mESC-Kulturen des $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ zeigen eine erhöhte Frequenz an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Statistische Auswertung der FACS Analysen: Der prozentuale Anteil der Zellen in G1, S und G2/M Phase des Zellzyklus zwischen undifferenzierten mESC- und EB-Kulturen (d2 und d4) der Differenzierung. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt; Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

3.11 Erhöhte Frequenz apoptotischer Zellen in EB-Kulturen des *Pcgf6* KO und $dKO^{Pcgf6/E2f6}$

Um zu analysieren, ob neben der veränderten Zellzyklusregulation in dKO mESCs auch das Zellüberleben in diesen Kulturen verändert war, wurde durchflusszytometrisch die Rate apoptotischer Zellen in undifferenzierten und differenzierenden Wt, *Pcgf6* KO, *E2f6* KO und dKO mESCs bestimmt. Es wurden bei dieser Analyse lebende, nekrotische und apoptotische (früh- und spätapoptotische) Zellen erfasst (Abb. 16 A, gezeigt für mESC Zellen). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in einem Säulendiagramm (Abb. 16 B) zusammengefasst. Es konnte festgestellt werden, dass die Frequenz apoptotischer Zellen bei allen Zelllinien während der Differenzierung zunahm. Besonders der heterozygote Klon $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und der homozygote Klon $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ zeigten bereits an Tag 2 der EB-Kultur eine erhöhte Frequenz an apoptotischen Zellen verglichen mit der Frequenz von Wt Zellen (Abb. 16 B, Mitte). An Tag 4 der EB-Kultur konnte auch eine erhöhte Frequenz apoptotischer *Pcgf6* KO-Zellen und *E2f6* KO-Zellen im Vergleich zur Frequenz von Wt Zellen festgestellt werden (Abb. 16 B, rechts). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust von *Pcgf6* und *E2f6* allein, aber auch in Kombination mit zunehmender Differenzierung, die Vitalität der Zellen beeinträchtigt.

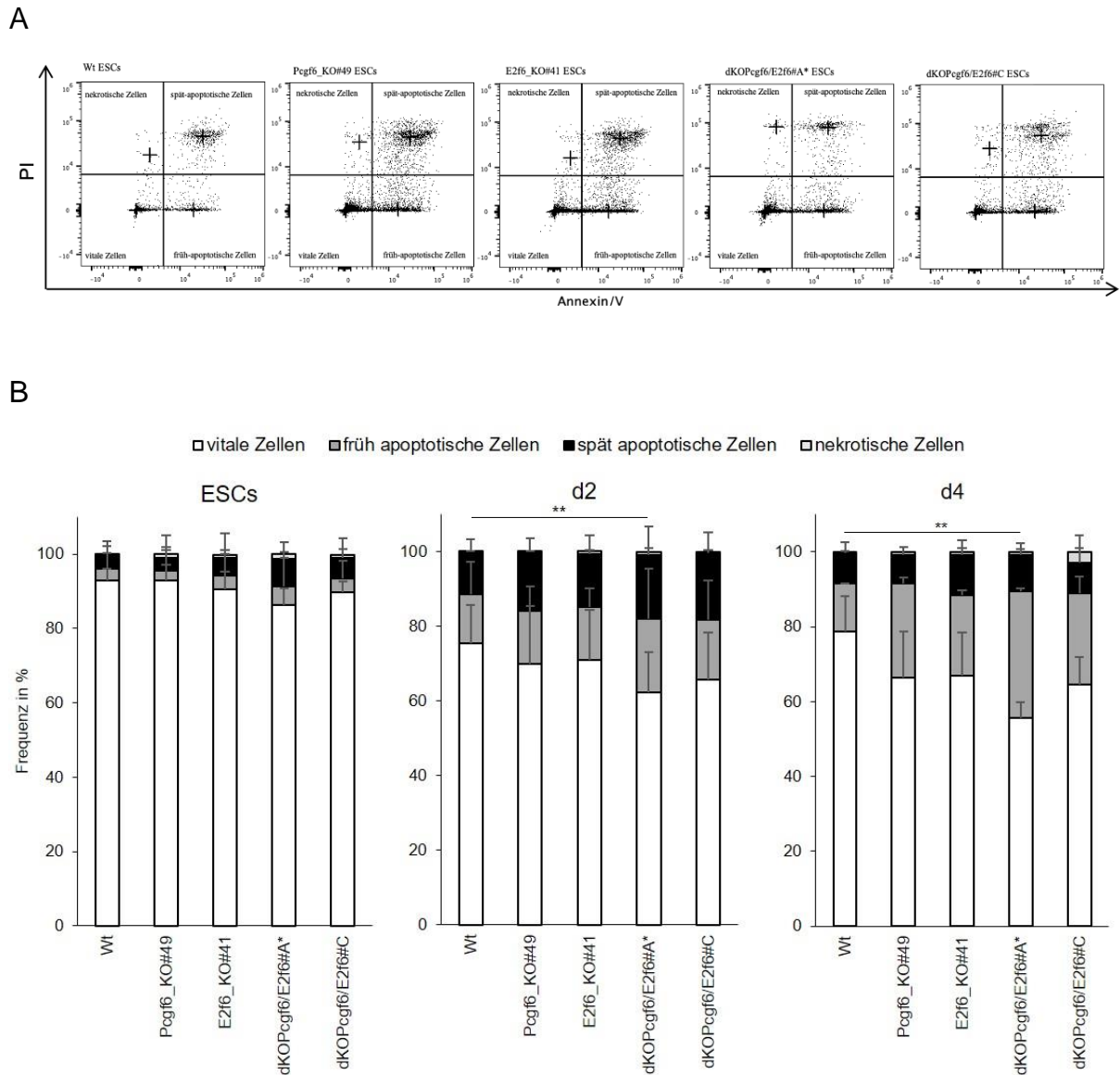


Abb. 16: Erhöhte apoptotische Rate der *Pcgf6*_KO#24 und 49 als auch des dKO#A während der EB-Kultivierung (d2/d4). (A) Repräsentative Auswertung der FACS Analysen mit FlowJo. (B) Prozentuale Auswertung aller apoptotischen (früh- und spätapoptotisch) in einem Box Plotdiagramm für die Tage 1-4 (d2, d4).

3.12 Erhöhte mRNA-Expressionslevel von Keimbahnengen in *Pcgf6* KO, *E2f6* KO und dKO^{*Pcgf6/E2f6*} mESC und EB-Kulturen

Wie bereits publiziert, weisen *Pcgf6* KO mESC-Kulturen eine differenzielle Expression Spermato- und Gametogenese-spezifischer Gene auf (Zdzienko et al. 2014). Die Erstellung von GO Enrichment Analysen (Biologische Prozesse) von differenziell regulierten Genen zwischen *Pcgf6* KO (#24 und #54,

Abb. 17 A) und Wt mESC-Kulturen zeigten, dass Prozesse hochreguliert waren, die in Bezug zur Regulation von Keimbahnengen gebracht werden konnten. So waren biologische Prozesse

involviert, die zum Beispiel den meiotischen Zellzyklus, Spermatogenese aber auch Oogenese betrafen (

Abb. 17 B, Diagramm rechts mit grünen Balken und grüner Umrandung der Prozesse). Die Regulation von Keimbahngenen konnte nicht Bezug zu biologischen Prozessen in differenziell herunterregulierten Genen gebracht werden (

Abb. 17 B, Diagramm links mit roten Balken). Um Herauszufinden, ob die Expression von Keimbahngenen in mESC und EB-Kulturen (d2) der neu erstellten KO-Zelllinien differenziell reguliert war, wurden qRT-PCR Analysen verschiedener Keimbahngene durchgeführt (

Abb. 17 C). Die Auswertung ergab, dass die bereits in der Zdziebło et al., 2014 publizierte Expressionserhöhung von *Dazl* und *Tex13* auch in den Einzelknockouts und den hetero- und homozygoten dKO-Zelllinien zu beobachten war. Dabei zeigte sich, dass die Expression von *Dazl* um das 40-fache in mESCs des dKO^{*PcGF6/E2f6*}#A* und C verglichen mit der Expression in Wt mESC-Kulturen erhöht war. Auch in EB-Kulturen zeigte sich eine erhöhte *Dazl* Expression in allen Knockoutzelllinien. Die Expression von *Tex13* hingegen wies nur für den *PcGF6* KO und den dKO^{*PcGF6/E2f6*}#C erhöhte Level sowohl in mESC als auch EB-Kulturen verglichen mit dem Wt auf. Dabei war die Expression um das 300-fache höher sowohl in der mESC als auch EB-Kultur des dKO^{*PcGF6/E2f6*}#C. Interessanterweise ist dieser enorme Anstieg des Expressionslevels nicht im heterozygoten Klon dKO^{*PcGF6/E2f6*}#A* zu erkennen (

Abb. 17 C). Aus den Publikationen Dahlet et al., 2021 und Qin et al., 2021 wurden weitere Keimbahnen-spezifische Targetgene von PCGF6 und E2F6 ausgewählt, um deren Expression in den jeweiligen KO-Zelllinien zu untersuchen. Die Auswertung ergab, dass die Targets *Tex11* und *Mael* sowohl in mESC als auch EB-Kulturen eine erhöhte Expression in dKO^{*PcGF6/E2f6*}#A* und #C verglichen mit dem Wt zeigten. In mESC- und EB-Kulturen des Wt konnte keine Expression detektiert werden. Ähnliches konnte für die Expression von *Tex12* und *Slc25a31* gezeigt werden. Die Expression in mESC und EB-Kulturen des *PcGF6* KO verglichen mit dem Wt war jedoch geringer und ähnlich wie in Kulturen des *E2f6* KO. Ein etwas anderes Ergebnis zeigte die Auswertung der Expressionslevel von *Gpat2* und *Tuba3a*. *Gpat2* und *Tuba3a* sind Targets einer E2F6-abhängigen Regulation, nicht aber einer PCGF6-abhängigen Regulation. Ein Anstieg der Expressionslevel konnte nur in mESC- und EB Kulturen des *E2f6* KO und dKO^{*PcGF6/E2f6*}#A* und #C ermittelt werden. Der Expressionslevel in mESC und EB-Kulturen des *PcGF6* KO war ähnlich wie der des Wt (

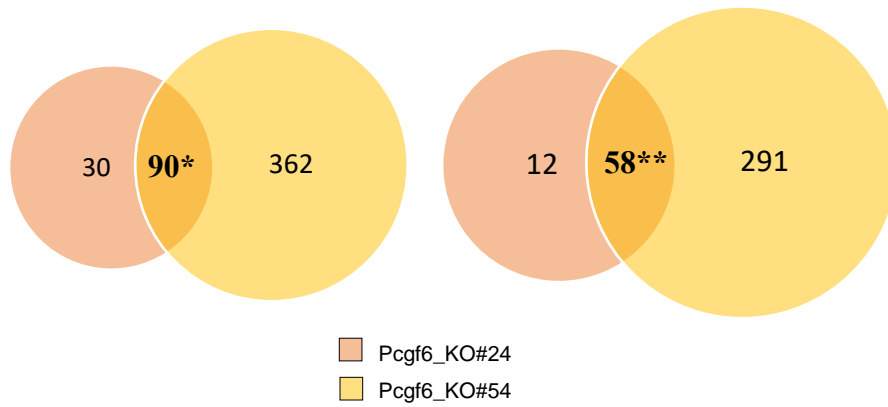
Abb. 17 D).

Aus der Literatur ist bekannt, dass E2F6 ein negativer Regulator des Zellzyklus ist (Giangrande et al. 2004). Die Untersuchung der Expression Zellzyklus-spezifischer Targets von E2F6 (*Cdc6*, *Pcna* und *Ddx5*) ergab eine erhöhte Expression in EB-Kulturen von *Pcna* und *Ddx5*. Einen Unterschied zwischen den jeweiligen KO-Zelllinien verglichen mit dem Wt in der mESC und EB-Kultur konnte jedoch nicht festgestellt werden (

Abb. 17 E). Es zeigte sich ebenso keine Veränderungen der *Cdc6* Expressionslevel in mESC-Kulturen im Vergleich zu EB-Kulturen.

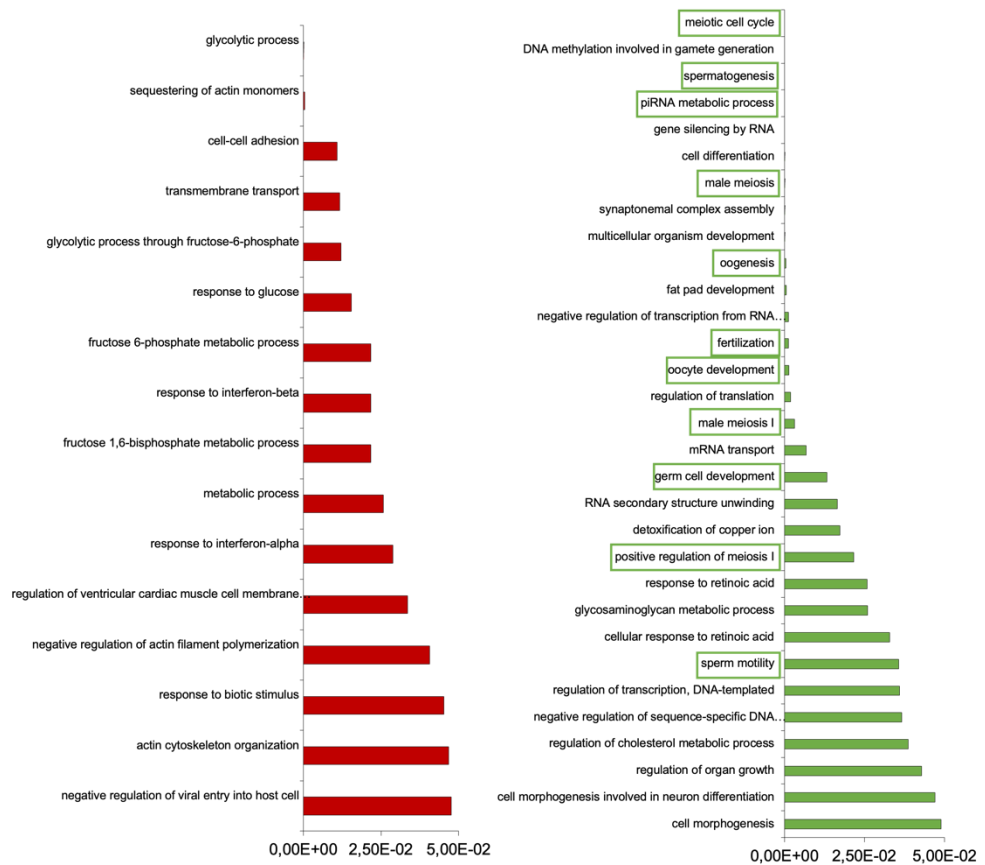
Sowohl die GO Term Analysen als auch die Genexpressionsanalysen ausgewählter Gene zeigten, dass es zu einer erhöhten Expression von Keimbahnengen sowohl in *Pcgf6* KO, *E2f6* KO als auch dKO^{*Pcgf6/E2f6*} mESC- und EB-Kulturen kam. Das lässt vermuten, dass beide PRC1.6 Faktoren eine Rolle in der Regulation von Keimbahnengen in pluripotenten aber auch differenzierenden Zellen spielen.

A

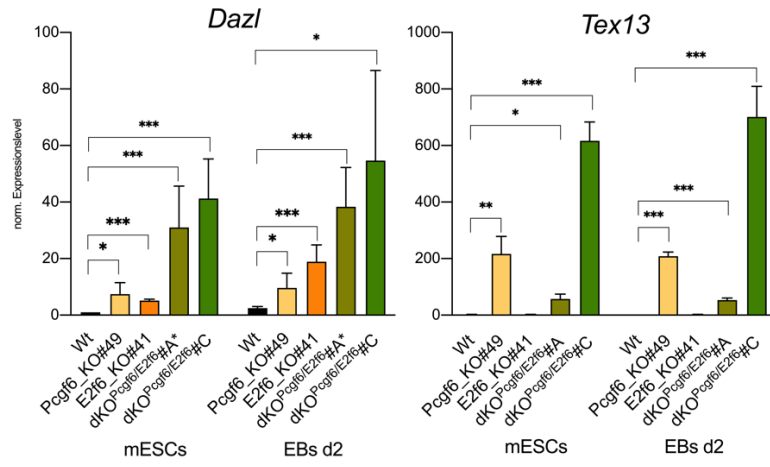


B

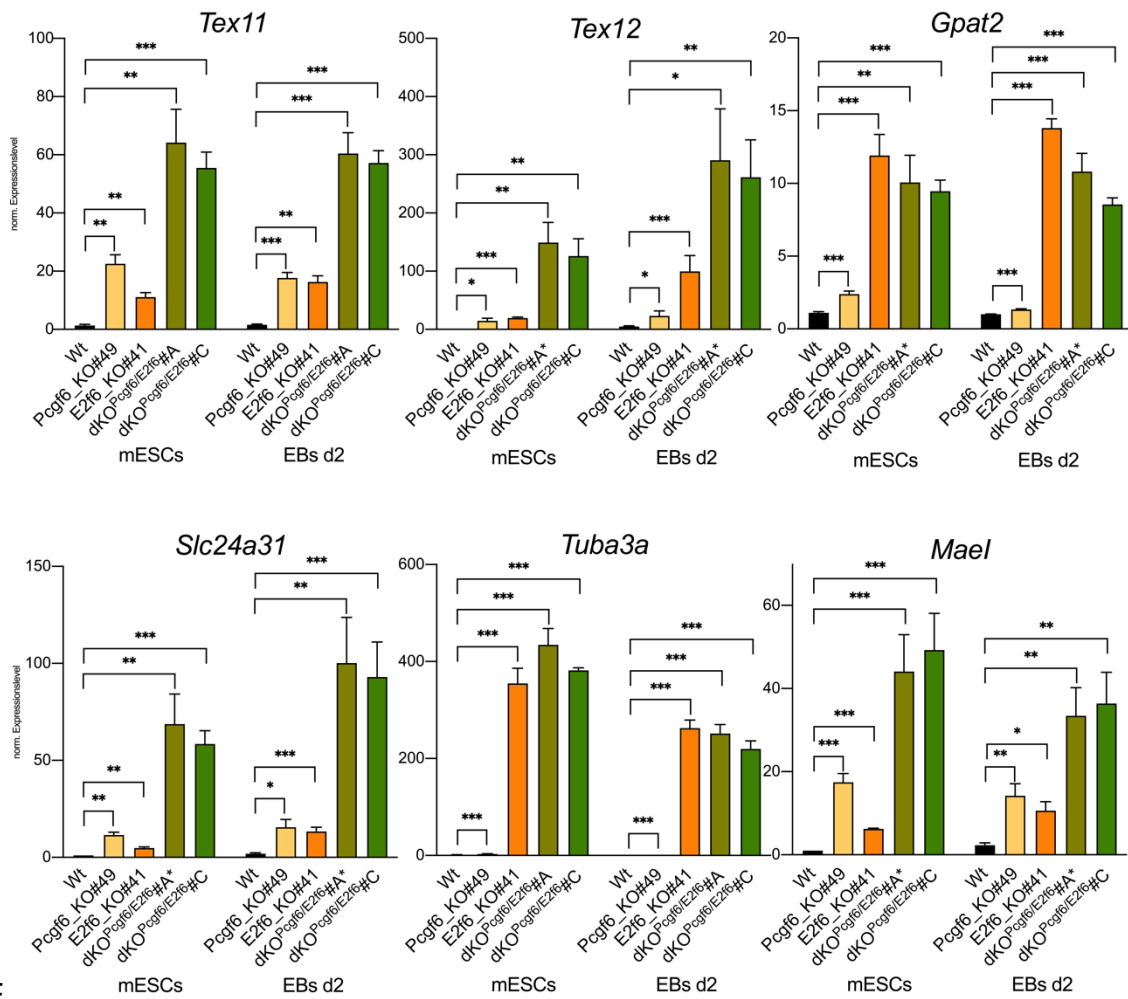
GO-Terms (biologische Prozesse) herunter (**) - bzw. hochregulierter (*) Gene



C



D



E

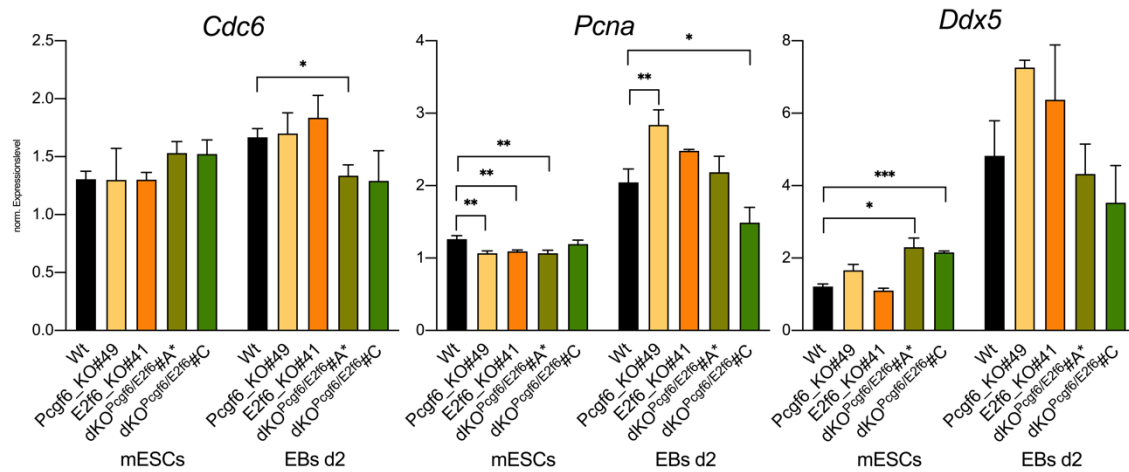


Abb. 17: Der Knockout von *Pcgf6* und/oder *E2f6* führt zu einer erhöhten Expression keimbahn-spezifischer Gene in mESC und EB-Kulturen. (A) Venn Diagramm zur Darstellung der gemeinsamen differenziell herunter (500*) bzw. hoch (419**) regulierten Gene zwischen *Pcgf6*_KO#24 sowie #54 und Wt mESC-Kulturen. (B) Biologische Prozesse (GO Enrichment Analyses) der differenziell herunter (*) und hoch (**) regulierten Gene in *Pcgf6* KO und Wt mESC-Kulturen. Beispiele Keimbahnen-assoziiierter Prozesse sind grün umrandet (hoch-reguliert) (p-value $\leq 0,005$). (C) Genexpression der Gene *Tex13* und *Dazl* in Anlehnung an die Zdzienicka et al., 2014 Publikation. (D) Genexpression von *Pcgf6* und *E2f6* Keimbahngenen ausgewählt aus Dahlet et al, 2021 und Qin et al, 2021. (E) Expressionslevel von E2F6-Zellzyklusgenen. Die Expression wurde durch zwei Standards (*Gapdh*; *mRps29*) normalisiert. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt; Student'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

4. Diskussion

4.1 Auswirkungen einer Mykoplasmenkontamination auf murine embryonale Stammzellen (mESCs)

Nach drei Jahre intensiver Forschung zu dem in dieser Arbeit beschriebenen Thema wurde auf Grund von schlecht reproduzierbaren Experimenten in der Zellkultur eine Kontamination mit Mykoplasmen in den verwendeten Zelllinien festgestellt. Von daher können alle bis dato durchgeführte Experimente nicht einwandfrei dem *Pcgfb* KO-Phänotyp zugeordnet werden, sondern sind immer unter Berücksichtigung der eingetretenen Kontamination zu betrachten. Darunter fallen die Ergebnisse der molekularen Charakterisierungen des *Pcgfb* KO-Phänotyps. Im Folgenden wird zum besseren Verständnis der gezeigten Ergebnisse der Einfluss von Mykoplasmen auf mESCs diskutiert.

Mykoplasmen gehören zum Phylum der Firmicutes (Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C Gehalt). Sie werden in die Klasse der Mollicutes und die Ordnung der Mycoplasmatales eingeteilt. Sie bilden die Familie der Mycoplasmaceae. Phylogenetisch am nächsten verwandt sind Mykoplasmen mit einigen Clostridien und mit evolutionär degenerierten Gram-positive Bakterien. Charakterisiert sind sie als die Kleinsten selbst-replizierenden Prokaryoten (Durchmesser zwischen 0,2 und 0,3 μm) mit dem kleinsten Genom (500-1000 Gene). Mykoplasmen besitzen keine Zellwand, ein Minimum an Organellen und sind spezialisiert auf Wachstum und Replikation (Razin 1996; Gautier-Bouchardon 2018). Als Konsequenz der limitierten genetischen Information fehlen Mykoplasmen viele enzymatische Aktivitäten und metabolische Stoffwechselwege. Ihre komplexen Anforderungen an Nährstoffe sind abhängig vom Nährstoffangebot des Wirts (Gautier-Bouchardon 2018; Razin et al. 1998).

4.1.1 Einfluss einer Mykoplasmenkontamination auf das Wachstum von Zellkulturen

Primäre und niederpassagige Zellkulturen sind seltener von Mykoplasmen befallen als Zelllinien, die sich über einen längeren Zeitraum in Kultur befinden. Hauptkontaminanten sind *M. orale*, *M. hyorhina*, *M. arginini*, *M. Fermentans* und *M. hominis*. Haupteintragung in die Zellkultur findet meist über Laborpersonal und den Austausch von Zelllinien unter verschiedenen Laboren statt. Eine Beeinflussung unterschiedlicher Parameter wie Wachstum und Differenzierungspotential ist abhängig von der Art und der Stärke der Kontamination (Drexler und Uphoff 2002). Eine Langzeit-Mykoplasmen-Kontamination in Zellkulturen ist assoziiert mit einer erhöhten Frequenz chromosomaler Instabilität und einer malignen Transformation der Zellen (Logunov et al. 2008).

4.1.2 Nachweis von Mykoplasmen und Behandlungsmöglichkeiten

Auf Grund der geringen Größe ist ein bildgebender Nachweis eine Mykoplasmenkontamination nur im Elektronenmikroskop möglich. Des Weiteren sind Mykoplasmen aufgrund der fehlenden Zellwand gegen die meisten Antibiotika resistent. Da Mykoplasmen häufig unerwünschte Begleiter in der Zellkultur sind, gehört es zur guten Zellkulturarbeit, diese regelmäßig auf Mykoplasmen zu testen. Dieses Testsystem soll dementsprechend einfach und kostengünstig anwendbar sein. Der Nachweis mittels PCR dient dabei als sensitive und spezifische Option zur direkten Detektion und wurde in dieser Arbeit (im Labor von AG Becker) als Standardverfahren eingesetzt. Der Vorteil der PCR ist die routinemäßige, einfache und schnelle Anwendung. Außerdem können viele Proben in einer Reaktion untersucht werden. Mit Hilfe einer passenden Kontrolle können kontaminierte Zellen von nicht-kontaminierten Zellen unterschieden werden und diese dementsprechend separiert oder gegebenenfalls weiter behandelt werden (Uphoff und Drexler 2011, 2014). Eine Behandlung ist mit diversen Reagenzien möglich (Ciprofloxacin, BM-Cyclin) (Schmitt et al. 1988). Nachteil einer Behandlung mit diesen Reagenzien ist die Toxizität für die Wirtszelle selbst. Als Konsequenz kann es zu einer Veränderung des Phänotyps der Wirtszelle kommen (Harlin und Gajewski 2008). Nach Aufnahme von Mykoplasmen in die Zelle, ist die Behandlung mit entsprechenden Reagenzien so gut wie unmöglich, da eine komplette Eliminierung vorhandener Mykoplasmen nicht gewährleistet werden kann (Winner et al. 2000; Nikfarjam und Farzaneh 2011).

4.1.3 Auswirkungen einer Mykoplasmenkontamination auf ESCs

Bisher ist wenig darüber bekannt, welche Auswirkungen eine Mykoplasmenkontamination auf murine ESCs hat. Markoullis und Kollegen (2009) beschrieben, dass mit *M. hominis*, *M. fermentans* und *M. orale* kontaminierte mESCs eine reduzierte Wachstumsrate und Viabilität zeigten, sowie nicht-klonale chromosomale Aberrationen, deren Frequenz mit zunehmender Länge der Infektion anstiegen. 46,3 % der kontaminierten mESCs exprimierten die Pluripotenzmarker POU5F1 und SSEA1, während 84,8 % der nicht kontaminierten Kontrollgruppe POU5F1 und SSEA1 exprimierten (Markoullis et al. 2009). Bei mESC-Kulturen, die für dieses Projekt verwendet wurden, konnte beobachtet werden, dass Zellen des *Pcgf6* KO in frühen Passagen kleinere Kolonien bildeten. mESCs höherer Passagen (30+) bildeten hingegen flachere Kolonien, sodass sich eine erhöhte Konfluenz zeigte. Markoullis und Kollegen beobachteten, dass Mykoplasmen-infizierte mESCs zu einem Wachstum von kleineren Kolonien in höheren Passagen führt (Markoullis et al. 2009). Beim Vergleich der in

dieser Arbeit zunächst verwendeten, kontaminierten mESCs der *Pcgf6* KO-Zelllinien CCC2#24 und #54 mit den später neu generierten *Pcgf6* KO-Zelllinien CCC21#22 und #49 ohne Kontamination zum selben Zeitpunkt der Kultur, war zu erkennen, dass die mESCs mit Kontamination kleiner waren und die Konfluenz weniger ausgeprägt war als bei den Zellen ohne Kontamination. Diese Beobachtung ist deckungsgleich mit denen von Markoullis und Kollegen. Jedoch zeigen die in dieser Arbeit verwendeten wildtypischen mESCs, für die ebenfalls eine Kontamination festgestellt wurde, keinen Wachstumsdefekt. Dies könnte auf eine unterschiedlich starke Kontamination der unterschiedlichen Zelllinien oder auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Kontamination des *Pcgf6* KO im Vergleich mit dem Wildtyp zurückzuführen sein. Bisher ist nichts darüber bekannt, ob es zu einer intrazellulären Persistenz von Mykoplasmen bei mESCs kommen kann.

Die Mykoplasmenkontamination der mESC Zelllinien ist in dieser Arbeit erst zu Beginn der Differenzierung in der *Embryoid Body* (EB) Kultur aufgefallen. Durch den mit der Differenzierung von ESCs einhergehenden Verlust der Pluripotenz und der Bildung neuer Oberflächenrezeptoren haben Mykoplasmen prinzipiell mehrere Möglichkeiten, sich an die Wirtsmembran zu heften und ggf. intrazelluläre zu werden. Durch die Aufnahme in intrazelluläre, nicht-phagosomale Vesikel profitieren Mykoplasmen von dem intrazellulären Umfeld, indem sie einer Immunantwort durch den Wirt entkommen. Hopfe und Kollegen beschrieben (2013) unter anderem, dass *M. hominis* zur Anhaftung an die Wirtszelle (HeLa) pathogene Faktoren benutzt (Hopfe et al. 2013). Bereits in einer früheren Publikation identifizierten sie OppA als ein zytoadhäsives Lipoprotein mit einer ecto-ATPase Aktivität, welches an HeLa Zellen anhaftet, die Freilassung von ATP induziert und dadurch Schäden in der Wirtszelle hervorruft (Hopfe und Henrich 2008; Hopfe et al. 2011). Des Weiteren untersuchten sie die Regulation von Wirts-Genen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion mit *M. hominis*. Hopfe und Kollegen (2013) beobachteten, dass in HeLa Zellen 48 Stunden post Infektion besonders Gene hochreguliert waren, die der Verteidigung der Wirtszelle gegen Pathogene zugeordnet werden konnten. Sie identifizierten Lysosomen-Marker wie z.B. LAMP1-3 und Cathepsin L (CTSD). Des Weiteren untersuchten Hopfe und Kollegen (2013) die Auswirkungen einer längerfristigen Mykoplasmeninfektion. Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist von Epithel -oder Endothelzellen bedeckt und daher nicht zugänglich für eine bakterielle Besiedlung. Eine Gewebeschädigung führt jedoch zur Freilegung der ECM, was eine bakterielle Besiedlung erleichtert. Die Autoren identifizierten in HeLa Zellen, welche chronisch mit Mykoplasmen infiziert waren, eine Beeinträchtigung der Expression von ECM

Rezeptoren. Nach 48 Stunden post Infektion waren Phagosomen-verwandte Integrine, welche als ECM-Rezeptoren fungieren, und Serpine (B3 und B4) hochreguliert. Serpine binden Heparin und führen zur Inhibierung von Cathepsin L (Hopfe et al. 2013).

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten eine Mykoplasmenkontamination zu behandeln. Romorini und Kollegen (2013) fanden heraus, dass eine Behandlung von humanen ESC mit PlasmocinTM und Ciprofloxacin keine Auswirkungen auf die Zellvitalität, Apoptose und Wachstum der Zellen hatte. Auch eine kurative Anwendung beider Reagenzien zeigte keine längerfristige Auswirkung auf hESCs (Romorini et al. 2013). Eine Behandlung der in dieser Arbeit verwendeten kontaminierten Zelllinien mit unterschiedlichen Reagenzien (z.B. Mynox[®] Gold, Minerva Biolabs) zur Eliminierung der Mykoplasma-Kontamination wäre nur unter gleichzeitiger Reduktion des FCS-Gehalts im mESC-Kulturmedium möglich gewesen, da eine hohe FCS Konzentration die Reaktivität einiger Reagenzien verringert. Eine Reduktion des FCS Gehalts führt jedoch zu einer schlechteren Versorgung der Zellen mit Substraten wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, sodass diese schneller differenzieren. Außerdem bestand auf Grund der erneuten Kultivierung kontaminierter Zellen die Gefahr weitere, Mykoplasmen-freie Zelllinien durch Verschleppung der Kontamination zu infizieren. Da zudem der zeitliche Aufwand einer Reinigung groß gewesen wäre und lange gedauert hätte, wurden die KO-Zelllinien neu hergestellt. Die nachfolgende Diskussion bezieht sich auf die Ergebnisse, die mit den neu generierten Mykoplasmen-freien mESC Zelllinien erstellt wurden (ausgenommen die Daten der RNASeq).

4.2 Auswirkungen des *Pcgf6* KO und *E2f6* KO auf den Phänotyp von mESCs

Aus der Literatur der letzten 10 Jahre ist bekannt, dass *Pcgf6* und *E2f6* unter anderem eine Rolle in der epigenetischen Regulation von Entwicklungsgenen spielen (Le Faou et al. 2011; Trojer et al. 2011; Zdzieblo et al. 2014; Sun et al. 2015; Yang et al. 2016; Endoh et al. 2017; Zhao et al. 2017; Stielow et al. 2018; Huang et al. 2019; Dahlet et al. 2021; Liu et al. 2020). Zur Untersuchung einer *Pcgf6*- und *E2f6*-abhängigen Regulation während der Differenzierung wurden mESC Kulturen eines *Pcgf6* KO und *E2f6* KO sowie der dKO^{*Pcgf6/E2f6*}#A* und #C zu *Embryoid Bodies* (EBs) differenziert. Vereinzelt mESCs können zu EBs agglomerieren und zeigen eine 3D-Organisation mit der Bildung von Strukturen die embryonalem und embryonalem Gewebe ähneln: Trophoektoderm, primitives Endoderm und frühes Mesoderm (Pekkanen-Mattila et al. 2010). Außerdem fassen die 3D-Aggregate Entwicklungsprozesse zusammen wie zum Beispiel Symmetriebruch, asymmetrische Genexpression und die

Achsenbildung und –verlängerung (Brickman und Serup 2017). Durch die Bildung von EBs entsteht der Vorteil, Entwicklungsprogramme durch zum Beispiel Zell-Zell Verbindungen und Wechselwirkungen zu untersuchen. Zur Charakterisierung der zellulären Morphologie (Quantifizierung der Zellzahl; Beobachtung der differenzierenden Zelllinien im Durchlichtmikroskop) wurde die Methode der EB-Suspensionskultur gewählt. Die EBs „schwimmen“ dabei im Medium und sind nicht adhärent als Monolayer mit der Zellkulturplastik verbunden. In der visuellen Analyse der EB-Suspensionskultur wurde beobachtet, dass im Vergleich zu Wt EBs Zellen des *PcGF6* KO und des $dKO^{PcGF6/E2f6}\#C$ bereits an Tag 2 der Kultur kleinere EBs bildeten. Diese EBs zeigten an Tag 4 einen geringen Größenzuwachs (Abb. 14 B). Aus der Literatur ist bekannt, dass kleinere EBs eine erhöhte Expression (troph)ektodermaler Marker zeigen (Park et al. 2007; Bauwens et al. 2008). Zur Analyse des Tophektoderms wurde die Expression der Marker *Gata4* und *Gata6* in qRT-PCR Analysen untersucht. Während die *Gata4* Expression in EB-Kulturen des *PcGF6* KO und $dKO^{PcGF6/E2f6}\#C$ (und A*) herunterreguliert war, konnte eine erhöhte *Gata6* Expression in mESC- und EB-Kulturen des *PcGF6* KO und $dKO^{PcGF6/E2f6}\#C$ nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden gestützt durch die Analyse der RNASeq-Daten. Diese zeigten, dass die Expression von *Gata6* zwischen Wt und *PcGF6* KO (#24 und #54) in EB-Kulturen (d2) erhöht war. Anders als in den qRT-PCR Analysen, war die *Gata4* Expression ebenfalls erhöht. Die Expression von *Dab2*, einem weiteren trophoctodermalen Marker, war ebenfalls in der RNASeq-Analyse erhöht. Des Weiteren ist bekannt, dass die Expression von *Gata4* und *Gata6* durch PcG Proteine reguliert wird (He et al. 2012; Laval et al. 2012). Dabei wird die *Gata6*-Expression über einen bivalenten Promotor kontrolliert (H3K27me3 und H3K4me3 Markierung) (Gao et al. 2018). Die Expression von *Gata6* wird in mESCs reprimiert, kann aber durch die bivalente Markierung während der Differenzierung schnell aktiviert werden. Ein Verlust von *PcGF6* und *E2f6* führt zum Verlust der Repression von *Gata6*. Dies ist bereits in der mESC-Kultur durch die Erhöhung der Expressionslevel von *Gata6* in *PcGF6* KO und $dKO^{PcGF6/E2f6}\#A^*$ und C aber auch in *E2f6* KO zu erkennen (Abb. 14 F). In der EB-Kultur ist die Erhöhung der Expression nur noch in Zellen des $dKO^{PcGF6/E2f6}\#C$ nachweisbar (Abb. 14 F). Das könnte bedeuten, dass ein Verlust der reprimierenden Wirkung von PCGF6 und E2F6 eine größere Auswirkung auf die Expression von *Gata6* in der mESC-Kultur als in der EB-Kultur hat.

Eines der größten Probleme der Suspensionskultur die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Der Kultivierung von EBs in Suspensionskultur liegt eine definierte Ausgangszellzahl zu Grunde.

Diese Zellzahl wird in einem ebenfalls definierten Volumen von differenzierungsspezifischem Medium in einer bakterientauglichen Petrischale oder einer *Ultra-Low-Attachment* Platte ausgesät (Zeevaert et al. 2020). Eine Bildung der EBs erfolgt durch eine zufällige Zusammenlagerung vereinzelter Zellen, dadurch kommt es zu einer nicht reproduzierbaren Heterogenität in Größe und Form der EBs. Vorteile der Suspensionskultur sind der geringe Zeit- und Kostenaufwand durch die Möglichkeit viele EBs anzusetzen. In bereits publizierten Daten zu PCGF6 konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Pcgf6*, während der EB-Kultur zurückgeht (Zdziebło et al. 2014). Auch die Ergebnisse der RNASeq Auswertung lassen vermuten, dass der Verlust von *Pcgf6* zu Beginn der Differenzierung in der EB-Kultur eine größere Auswirkung zeigt als in der mESC-Kultur. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Pcgf6* an Tag 2 der EB-Kultur die Expression von *E2f6* steigert, während E2F6-Targetgene herunterreguliert werden (Abb. 11 A). Auf Grund der Vermutung, dass PCGF6 und auch E2F6 eine entscheidende Rolle beim Übergang der Pluripotenz in die Differenzierung spielen, wurde die Differenzierung der mESC-Kulturen in den ersten vier Tagen untersucht. Die Auswertung der absoluten Zellzahl von EB-Kulturen erfolgte an Tag 2 (d2) und Tag 4 (d4). Es konnte kein Unterschied in den absoluten Zellzahlen an d2 der EB-Kultur beobachtet werden, während an d4 der EB-Kultur die absolute Zellzahl der EBs des *Pcgf6* KO und des dKO^{Pcgf6^{FE2f6}}#A* und #C deutlich zurückging (Abb. 14 B). Die Kultivierung der EBs mit Hilfe der *Hanging Drop* Methode wurde gewählt, um die Größe der EBs an d2 und d4 der EB-Kultur zu berechnen. Diese Methode verfügt auf Grund der definierten Ausgangsbedingungen über eine deutlich bessere Reproduzierbarkeit als die Suspensionskultur. Nachteil dieser Methode ist der hohe Zeit- und Kostenaufwand bei verhältnismäßig geringer Ausgangszellzahl. Das bedeutet, um aussagekräftige Ergebnisse zu produzieren, benötigt man im Verhältnis zur Zellzahl viel Zellkulturplastik und Raum zur Kultivierung der EBs. Die Bildung eines EBs wird in der *Hanging Drop* Methode durch die Kompression innerhalb eines Tropfens „erzwungen“. Hierfür wird eine definierte Ausgangszellzahl (2000 Zellen) in Differenzierungsmedium (pro 30 µl Tropfen) auf den Deckel einer Kulturschale pipettiert und dieser dann vorsichtig umgedreht, sodass die Tropfen, wie der Name der Methode sagt, herunterhängen. Ein Nachteil der Methode ist, dass man das Medium innerhalb eines Tropfens nicht wechseln kann und dass das Medium nach zwei Tagen kondensiert bzw. verbraucht ist. Dem versucht man entgegenzuwirken, indem die Tropfen nach 24 Stunden in Suspensionskultur überführt werden. Zu diesem Zeitpunkt haben sich bereits vollständige EBs gebildet. Auf Grund der mechanischen Kräfte innerhalb eines Tropfens, welche für alle Tropfen gleich sind, bilden sich in der *Hanging Drop* Methode in den

einzelnen Tropfen annähernd gleichgroße EBs mit einer ähnlichen, runden Form. Nach der Auswertung der absoluten Zellzahl der EBs in Suspensionskultur geht man davon aus, dass auch die Größe der EBs des *Pcgf6* KO und $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#C$ an Tag 4 der EB-Kultur deutlich geringer sein muss. Interessanterweise zeigte die Auswertung der maximalen Fläche der EBs jedoch, dass die Fläche der EBs von $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und $\#C$ fast genauso groß war wie die Fläche von Wt EBs zum selben Zeitpunkt. Diese Auswertungen deuten darauf hin, dass sich die Zellen des $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und $\#C$ in Suspensionskultur anders verhalten als in der *Hanging Drop* Kultur. Die Diskrepanz beider Methoden könnte mit unterschiedlichen Zell-Zell Interaktionen zu erklären sein. Eine Bildung von EBs wird unter anderem durch Cadherine vermittelt. Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige Transmembran-Adhäsions-Rezeptoren, die intrazelluläre Signalweiterleitung über zyttoplasmatische Cateninproteine triggern. Zum Beispiel ist β -Catenin mit dem Wnt (Wg für Wingless und Int-1) -Signalweg verbunden (Dang et al. 2004; Li et al. 2001; Larue et al. 1996). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz beider Methoden kann ein gestörter Wnt-Signalweg in mESC-Kulturen des *Pcgf6* KO und der $dKO^{Pcgf6/E2f6}\#A^*$ und $\#C$ durch eine veränderte Expression von Transmembran-Adhäsions-Rezeptoren sein. Eine veränderte Expression führt zu einer verminderten Interaktion von vereinzelt mESCs in der Suspensionskultur. Diese Interaktionen wird in der *Hanging Drop* Methode durch die Kompression in einem Tropfen umgangen, sodass die Zellen im Vergleich zur Suspensionskultur gleich große bzw. größere EBs bilden. Die RNASeq Analyse differenziell regulierter Gene zwischen Wt und *Pcgf6* mESC-Kulturen zeigte eine Herunterregulierung von Genen, die im biologischen Prozess „cell-cell adhesion“ involviert sind (

Abb. 17 B). Ein weiterer Grund für verringerte Zell-Zell Interaktionen könnte das unterschiedliche Verhältnis zwischen Ausgangszellzahl und eingesetztem Medienvolumen bei beiden Methoden sein. Vergleicht man das Verhältnis von Zellzahl zu Medium werden in der *Hanging Drop* Methode mehr Zellen pro Medienvolumen ausgesät als in der Suspensionskultur (2000 Zellen/30 μ l Medium in der *Hanging Drop* Methode vs. $0,5 \times 10^6$ Zellen in 10 ml Medium in der Suspensionskultur). Eine Erhöhung der eingesetzten Ausgangszellzahl in der Suspensionskultur führte jedoch zu einer Zusammenlagerung von bereits gebildeten EBs in wulstartigen, langen Strukturen. Zur Bildung normaler EB Strukturen musste eine Balance zwischen der Ausgangszellzahl und dem eingesetzten Volumen des Mediums gefunden werden, um die beschriebene Zusammenlagerung der EBs zu verhindern. Ein weiterer Ansatz zur Klärung der Diskrepanz beider Methoden zieht mechanische Stimuli in Betracht, die in unterschiedlichen Kultivierungsmethoden auf EBs wirken können. Die

Kavitation im Inneren der EBs sorgt für die Entstehung eines säulenförmigen Epithels als Vorstufe der drei Keimschichten (Liu et al. 2009; Fuchs et al. 2012). Epitheliale Strukturen reagieren jedoch sehr empfindlich auf mechanische Herausforderungen und können daher die Zellmechanik in EBs beeinflussen (Brückner und Janshoff 2015). Dabei beeinträchtigt mechanischer Druck die Bildung von embryonalem Gewebe (Campàs 2016). Es fehlen bis heute Standardverfahren zur Untersuchung der Zellmechanik und deren Einfluss auf die Selbstorganisation und Linienspezifikation von pluripotenten Stammzellen in der 3D-Kultur (Zeevaert et al. 2020). Auf Grund fehlender Expressionsdaten von EBs in der *Hanging Drop* Methode kann nicht geklärt werden, ob ein Verlust von *Pcgf6* und *E2f6* die Differenzierung in eine bestimmte Keimschicht triggert und die Kultivierung von mESCs als *Hanging Drops* diese Differenzierung unterstützt. Zusammengefasst zeigt sich eine deutliche Diskrepanz der beiden Methoden, die durch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen und den oben genannten Erklärungsansätzen nicht eindeutig geklärt werden kann. Es müssen weitere Analysen durchgeführt werden, wie zum Beispiel die Auswertung einer globalen Expression in dKO^{*Pcgf6/E2f6*} Zellen in mESC und EB-Kultur beider Methoden. Ebenso könnte darüber hinaus eine Immun-Fluoreszenz-Färbung von Zell-Zell Interaktionsproteinen wie zum Beispiel β -Catenin durchgeführt werden (Obara 2006; Flozak et al. 2016).

4.3 Die gesteigerte apoptotische Frequenz als und der Zellzahlverlust des dKO^{*Pcgf6/E2f6*} in der EB-Kultur als Konsequenz der verlängerten G2-Phase

Die Auswertung der Zellzyklus Analysen zeigte, dass Zellen des dKO^{*Pcgf6/E2f6*}#C im Vergleich zu Zellen des Wt eine erhöhte Frequenz der G2-Phase in der mESC- und EB-Kultur aufwiesen (Abb. 15). Anders als somatische Zellen, zeigen ESCs eine ungewöhnliche Zellzyklusverteilung. Auf Grund fehlender Checkpoints durchlaufen ESCs die Gap-Phasen G1 und G2 sehr schnell, sodass sich zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus nur wenige Zellen in den beiden Phasen befinden. ESCs verbringen den größten Teil der Zeit im Zellzyklus in der S-Phase (Savatier et al. 2002). Eine verkürzte G1-Phase ermöglicht es ESCs schnell zwischen Zellteilung und DNA-Synthese umzuschalten (Lange und Calegari 2010; Zaveri und Dhawan 2018; Fujii-Yamamoto et al. 2005). Dabei umgehen ESCs den für die G1-Phase charakteristischen *DNA Damage Response* (DDR) Weg und die Kontrolle durch den G1-Checkpoint. Letzterer fehlt in ESCs (Choi et al. 2020). Außerdem kommt hinzu, dass ESCs eine hohe Expression von Cyclinen und *Cycline dependent Kinases* (*Cdks*) aufweisen (Boward et al. 2016; Hindley und Philpott 2013). Die Hyperphosphorylierung und damit Inaktivierung von Retinoblastoma (RB) und eine erhöhte

Transkription von S-Phase Genen führt unter anderem dazu, dass ESCs schnell in die S-Phase übergehen können (Cappell et al. 2016; Stead et al. 2002; White et al. 2005; Savatier et al. 1994). Entstandene DNA-Schäden werden auf Grund der kurzen G1-Phase in der S/G2-Phase repariert. Dabei bevorzugen ESCs eine Reparatur durch homologe Rekombination (Choi et al. 2017). Zudem exprimieren ESCs verstärkt Reparaturproteinen (z.B. RAD51; RAD52 und BRCA1 und 2). Diese sorgen unter anderem für die Reduzierung der Geschwindigkeit der Replikationsgabel (Choi et al. 2020). Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch die Oszillation von Cyclin-Cdk Komplexen. Im Gegensatz zu spezialisierten Zellen findet man in mESCs kein typisches Cyclin-CDK Oszillationsmuster (Soufi und Dalton 2016; Bertoli et al. 2013). Das Expressionslevel von Cyclin D1 und D3/CDK6 in der G1-Phase ist gering (Faast et al. 2004; Huurne et al. 2017) und die Regulation von Cyclin E/CDK2 und Cyclin A/CDK2 Aktivität ist auf Grund der dauerhaft hohen Expression unabhängig vom Zellzyklus. Die Cyclin B Aktivität ist die einzige die zusammen mit CDK1 in der G2/M Phase hoch und in den anderen Phasen gering ist (Stead et al. 2002; Fujii-Yamamoto et al. 2005; Huurne et al. 2017). Der Übergang von einem ESC-Zellzyklus zum Zellzyklus differenzierender Zellen erfolgt durch Differenzierungssignale, die zu einer Aktivierung von Signalkaskaden innerhalb der Zelle führen. Das Chromatin wird remodelliert, sodass es zur Aktivierung der Expression von Linienspezifikations- und Entwicklungsgenen kommt, während die Expression der Pluripotenzmarker abnimmt. Gleichzeitig wird die Hyperphosphorylierung von RB aufgehoben, was sowohl zur Veränderung der Cyclin/CDK Expression als auch zu einer damit verbundenen Etablierung der Checkpoints und letztendlich zur Verlängerung der G1-Phase führt. (Fujii-Yamamoto et al. 2005; Boward et al. 2016; Ahuja et al. 2016; Li et al. 2012). Eine direkte Erklärung für den beobachtete Zellzyklusdefekt in der G2-Phase des dKO^{Pcgf6/E2f6}#C in mESC- und EB-Kulturen konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht gefunden werden. Der Verlust von *Pcgf6* und *E2f6* scheint demnach zu einer indirekten Beeinflussung des Zellzyklus in mESC-Kulturen und während der Differenzierung zu führen. Aus der Literatur geht nicht hervor, dass ein *Pcgf6* und/oder *E2f6* Verlust zu einem G2-Arrest führt. Stielow und Kollegen (2014) zeigten, dass der Verlust unterschiedlicher Mitglieder des PRC1.6 in HEK-Zellen Auswirkung auf die Expression unterschiedlicher Gene haben kann. Der Verlust von *L3mbt2* im PRC1.6 beeinflusste die Expression anderer Gene als der Verlust von *E2f6*. Dieser Verlust von *E2f6* führte zu einer Re-Expression von Zellzyklusgenen. In einer *Gene Ontology (GO) Enrichment* Analyse waren differenziell herunter regulierte Gene besonders im Prozess der Zellzykluskontrolle angereichert (Stielow et al. 2014). Die in dieser Arbeit durchgeführten GO

Enrichment Analysen differenziell hochregulierter Gene in mESCs des *Pcgf6* KO zeigten ebenfalls das Gene in Prozessen angereichert waren, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind („cell cycle“; „cell division“, „chromosomen segregation“) (Abb. 17 B, linkes Balkendiagramm). Ein Doppelknockout von *Pcgf6* und *E2f6* in mESCs lässt vermuten, dass in diesen Zellen ebenfalls Gene in *GO Enrichment* Analysen angereichert sind, die Zellzyklus-verwandten Prozessen zugeordnet werden können. Die Analysen dieser Arbeit können nicht klären, ob die Regulation der Expression von Zellzyklusgenen besonders in der G2-Phase durch eine PCGF6- und E2F6-abhängige Regulation im PRC1.6 Komplex gesteuert wird. Auch die Zellzyklusanalysen, die mit FACS erstellt wurden, geben keine Auskunft darüber, ob die Zellen des dKO^{*Pcgf6/E2f6*} einen Defekt in der Regulation des Zellzyklus oder in der Reparatur von DNA-Schäden besitzen. Um dies herauszufinden, müssen die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen durch weitere Experimente vertieft werden. Insbesondere müssen Methoden entwickelt werden, mit denen Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus analysiert werden können, beispielsweise durch Genexpressionmuster. Hierzu können zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden. Der erste Ansatz verfolgt die Strategie zur Separierung der Zellen durch die Anwendung der FACS Methode. Durch die Möglichkeit, Zellen mit Hilfe einer fluoreszenten Markierung zu sortieren, können asynchronisiert wachsende mESC-Kulturen in die verschiedenen Phasen separiert werden (Juan et al. 2002). Die Expression G2-Phasen spezifischer Gene kann mit Hilfe von qRT-PCR- oder RNASeq-Analysen ermittelt und mit der Expression in Wt Zellen verglichen werden. Eine solche Analyse würde Aufschluss darüber geben, welche Zellzyklus-assozierten Gene in der G2-Phase des Zellzyklus durch eine PCGF6- und E2F6-abhängige Regulation beeinflusst werden. Der andere Ansatz verfolgt die Sequenzierung von mESC- und EB-Kulturen durch *single cell RNA Sequencing* (scRNASeq). Verschiedene Publikationen zeigen, dass eine Sortierung der Zellzyklusphasen durch die Analyse von scRNASeq-Daten möglich ist (Barron und Li 2016; Moussa und Măndoiu 2020; Schwabe et al. 2020). Mit diesen scRNASeq-Daten kann zum einen ein für die G2-Phase spezifisches Genexpressionmuster in dKO^{*Pcgf6/E2f6*} Zellen erstellt werden und dieses mit dem des Wt verglichen werden; zum anderen würden *GO Enrichment* Analysen zeigen, welche Gene in unterschiedlichen biologischen Prozessen angereichert sind. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass man auf das Separieren durch die FACS-Methode verzichten kann. Mit dem ersten Ansatz könnte hingegen neben einer RNASeq auch die Analyse über eine ChIP-Seq durchgeführt werden. Die Analyse der ChIP Seq Daten könnte zur Aufklärung einer PRC1.6-spezifischen

Regulation von PCGF6 und E2F6 in der G2-Phase beitragen (Wu et al. 2021; Liu et al. 2017; Halsall et al. 2021).

Es ist bekannt, dass eine Proliferation von Zellen mit der Apoptose assoziiert ist (Alenzi 2004; He et al. 2016; Huurne et al. 2020; Liu et al. 2019; Padgett und Santos 2020). Sowohl Zellen der Einzelknockouts und auch des hetero- und homozygoten Doppelknockouts zeigten erhöhte apoptotische Frequenzen mit zunehmender Länge der EB-Kultivierung. In differenzierten Zellen aktiviert p53 den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21 (kodiert durch *Cdkn1a*) um Zellen mit DNA-Schäden am Eintritt in die S-Phase zu hindern. Außerdem werden durch den Arrest der Zellen proapoptische Proteine (zum Beispiel PUMA) aktiviert, die eine schnelle apoptotische Antwort auslösen, falls die Zellen irreparabel geschädigt sind (Aubrey et al. 2018; Levine und Berger 2017). Interessanterweise werden p53, p21 oder PUMA (*p53-Upregulated Modulator of Apoptosis*) in ESCs aber nicht benötigt, um den G2-Checkpoint zu aktivieren und eine effiziente und schnelle Apoptose geschädigter Zellen einzuleiten. Erst wenn ESC anfangen zu differenzieren, wird p53 zur Regulation der Zellteilung und Apoptose benötigt (Jaiswal et al. 2020; Jain und Barton 2018). Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren, dass die Zellen aller KO-Zelllinien im Verlaufe der Differenzierung einen Defekt in der Regulation der Apoptose entwickeln. Dabei kann die erhöhte apoptotische Frequenz des dKO^{PcGF6/E2f6} eine Folge der gesteigerten Frequenz von Zellen in der G2-Phase erklären. Wieso jedoch auch Zellen der Einzelknockouts eine gesteigerte apoptotische Frequenz ohne einen spezifischen Zellzyklusunterschied aufweisen, bleibt offen und muss weiterhin untersucht werden. Zuerst sollten jedoch weitere Experimente zur Klärung des Zusammenhangs der erhöhten Frequenz an Zellen in der G2-Phase und einer gesteigerten apoptotischen Frequenz in Zellen des dKO^{PcGF6/E2f6} durchgeführt werden. Hierzu wäre es sinnvoll die bereits oben beschriebenen Methoden zur Untersuchung der Expression verschiedener Gene in den einzelnen Zellzyklusphasen zu nutzen, um die Expression apoptotischer Gene zu analysieren. Dabei könnte unter anderem die Expression von *p53*, *p21* und *Puma* untersucht werden. Mit den Sequenzierungsdaten könnten auch differenziell exprimierte Gene identifiziert werden, die in *GO Enrichment* Analysen gegebenenfalls apoptotischen Prozesse zugeordnet werden könnten. Parallel dazu wäre es sinnvoll, analog dazu die Zellen der Einzelknockouts dementsprechend zu analysieren. Differenzen zu Zellen des dKO^{PcGF6/E2f6} können möglicherweise eine unterschiedliche Regulation in Bezug auf Zellzyklus und Apoptose aufdecken.

4.4 Regulation von Keimbahngenen - PCGF6 versus E2F6

Unabhängig voneinander weisen zwei neue Publikationen aus den Jahren 2020 und 2021 darauf hin, dass sowohl PCGF6 als auch E2F6 eine entscheidende Rolle in der Inaktivierung von Keimbahngenen in ESCs besitzen (Dahlet et al. 2021; Liu et al. 2020). Lui und Kollegen beschreiben, wie bereits durch andere Publikationen gezeigt (Zdzieblo et al. 2014), in ihrer Veröffentlichung PCGF6 als Repressor von Meiose- und Keimbahngenen in mESCs und somatischen Zellen. PCGF6 verhindert dabei eine abweichende Expression von Keimbahngenen in diesen Zellen. Zudem wird beschrieben, dass PCGF6 Teil eines Komplexes ist, der aus G9A/GLP, HDAC1/2 und PCGF6 besteht. In diesem Komplex ist PCGF6 für die direkte Bindung an die Zielpromotoren verantwortlich. Die Autoren fanden zudem heraus, dass es in *Pcgf6* KO ESCs zur Reduzierung von H3K9me1/2 Markierungen an Promotoren von Keimbahngenen kommt, was zu einer De-Repression dieser Gene führt. Neben *Pcgf6* führt auch der Verlust anderer Komponenten des PRC1.6 zu einer erhöhten Expression von Keimbahngenen (Liu et al. 2020). Dahlet und Kollegen (2021) zeigten, dass E2F6 Keimbahngene in mESCs und *in vivo* (in der Maus) reprimiert. Dabei kooperiert E2F6 mit MGA zur Inaktivierung dieser Gene. Die Funktion von E2F6 ist abhängig von seiner „*marked box*“ Domäne. Die Reprimierung in ESCs erfolgt durch Mechanismen, die unabhängig von einer direkten DNA-Methylierung stattfinden. Erst in der Embryonalentwicklung vermittelt E2F6 über eine DNA-Methylierungen die Reprimierung von Keimbahngenen. Zusammengefasst zeigte diese Publikation, dass E2F6 während eines kleinen Zeitfensters der Embryogenese Keimbahngene durch epigenetische Inaktivierung reguliert. In differenzierten Zellen kann eine Reprimierung von Keimbahngenen nicht mehr mit E2F6 assoziiert werden (Dahlet et al. 2021). Um Herauszufinden, ob es Keimbahngene gibt, die sowohl durch eine PCGF6- als auch E2F6-abhängige Regulation beeinflusst werden, wurden die RNASeq-Ergebnisse der beiden oben genannten Publikationen miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass es 51 gemeinsame Keimbahngene gibt, die sowohl in *Pcgf6* KO als auch *E2f6* KO mESCs differentiell reguliert waren (siehe Appendix Abb. 22). Die Regulation von Keimbahngenen durch E2F6 und PCGF6 ist unter anderem abhängig von spezifischen Bindestellen in den Promotorbereichen dieser Gene. Es gibt E2F6-spezifische Targets, die eine Bindestelle für die „*marked box*“ Domäne von E2F6 besitzen. Nicht alle Promotoren von Keimbahngenen enthalten diese Bindestelle. Es wurden Gene mit und ohne einer „*marked box*“ Domäne in Anlehnung an beide Publikationen für eine Genexpressionsanalyse in denen in dieser Arbeit vorgestellten *Pcgf6* KO, *E2f6* KO und dKO^{*Pcgf6/E2f6*} Zelllinien verwendet (siehe auch

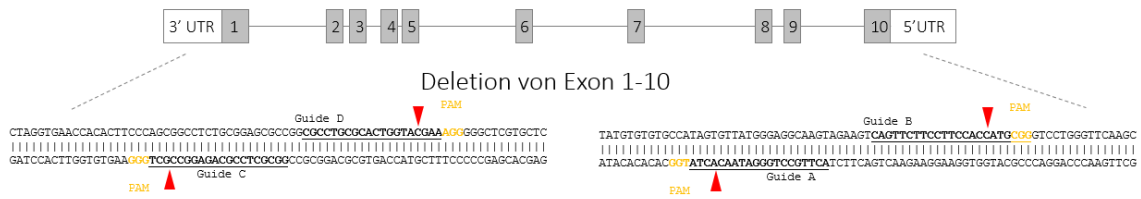
Abb. 17 D). Der Verlust von *E2f6* führt zu einer De-Repression der Gene mit einer Bindestelle für E2F6 (*Gpat2* und *Tuba3a*). Ein Verlust von *Pcgf6* hatte keine Auswirkung auf die Expression dieser Targets (

Abb. 17 D). Dieses Ergebnis deutet auf eine PRC1.6-unabhängige Regulation von E2F6 hin. Diese Überlegung wird durch weitere Untersuchungen in der Publikation von Dahlet und Kollegen unterstützt. Sie zeigten, dass eine Keimbahngenregulation durch E2F6 unabhängig von einer Interaktion mit G9A/GLP und HDACs (Histonmethyldeacetylasen) stattfand. Sowohl G9A/GLP als auch HDACs wurden bereits als PRC1.6 Komponenten identifiziert (Ogawa et al. 2002; Gao et al. 2012; Endoh et al. 2017; Qin et al. 2012). In der Publikation von Lui (2020) identifizierten die Autoren diese Faktoren als Koregulatoren von PCGF6 (Liu et al. 2020). Eine PRC1.6-unabhängige Regulation von Keimbahngenen durch PCGF6 ist unwahrscheinlich. Der Verlust von *Pcgf6* allein zeigte in den Genexpressionsanalysen dieser Arbeit nur eine bedingte Expressionsänderung der untersuchten Zielgene. Erst der zusätzliche Verlust von *E2f6* wies eine deutliche De-Repression der Keimbahngene auf. Auch mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine PCGF6-abhängige Regulation von Keimbahngenen von weiteren Komponenten des PRC1.6 Komplex (E2F6) abhängig ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust einer einzelnen Komponente im PRC1.6 nicht zu einem kompletten Regulationsverlust durch den PRC1.6 führt. Weiterhin bleibt zu klären, ob die PRC1.6 Bindung an Genpromotoren abhängig von einer bestimmten Histonmodifikation ist. Dahlet und Kollegen (2021) zeigten, dass der Verlust von *E2f6* zu einer Reduzierung der H3K9 Trimethylierung (H3K9me3) führt. Der Verlust von *Pcgf6* zeigte hingegen ein Rückgang von H3K9 Mono- und Dimethylierungsmarkierungen (H3K9me1/2) (Liu et al. 2020). Eine H3K9me erfolgt durch Histonmethyltransferasen (HMTs) wie zum Beispiel G9L/GLP oder SETDB1. 2018 beschrieben Tatsumi und Kollegen, dass MAX unabhängig vom PRC1.6 Komplex unter anderem mit SETDB1 interagiert. Die Autoren zeigten, dass die epigenetische Regulation von Keimbahngenen durch verschiedene Mechanismen bewerkstelligt wird. So kann die Regulation von Keimbahngenen auch ohne den Einfluss von PRC1.6 über DNA- oder Histonmethyltransferasen reguliert werden (Tatsumi et al. 2018). Zusätzlich zu den Ergebnissen der Tatsumi Publikation zeigen Dahlet et al. (2021), dass die Methyltransferase SETDB1 besonders häufig an Keimbahngenen zu finden ist, die durch E2F6 reprimiert werden (Dahlet et al. 2021). Diese Ergebnisse werden durch Befunde untermauert, die belegen, dass PCGF6 zusammen mit G9A/GLP zu Promotoren von Keimbahngenen rekrutiert wird (Liu et al. 2020). Interessanterweise vermitteln sowohl PCGF6 als auch E2F6 eine Methylierung von

H3K9 in Bezug auf die Regulation von Keimbahngenen. Auf Grund der unterschiedlichen Methyltransferasen und der Priorisierung unterschiedlicher Methylierungsstufen (H3K9me1/2 vs. H3K9me3) handelt es sich vermutlich um unterschiedliche (Sub-)Komplexe. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen im Einklang mit der Literatur darauf hin, dass es verschiedene Subkomplexe in der Regulation von Keimbahngenen gibt, die durch ihre diverse Zusammensetzung eine unterschiedliche Bindung dieser Subkomplexe an Zielgenen vermitteln. Um die Bildung möglicher Subkomplexe im Zusammenhang mit der Regulation von Keimbahngenen zu untersuchen, sind weitere Analysen notwendig. Dazu wäre es von besonderem Interesse zu sehen, mit welchen Histonmarkierungen der Verlust von PCGF6 und E2F6 an Promotoren von Keimbahngenen in mESCs einhergeht und ob sich diese während der Differenzierung verändern. Solche Beobachtungen können mit Hilfe von RNASeq- und ChIPSeq-Analysen untersucht werden. Mit Hilfe der RNASeq-Analysen können Keimbahntargets identifiziert werden, deren Expression durch den Verlust von *Pcgf6* und *E2f6* dereguliert ist. Die ChIPSeq-Analysen dienen zur Identifizierung von bestimmten Histonmodifikationen, die mit einer Interaktion von PCGF6 und E2F6 einhergehen können. Dazu werden die Datensätze des Wt mit denen des Doppelknockouts verglichen. Alternativ zu ChIPSeq-Analysen können in Immunpräzipitationsexperimenten mögliche Interaktionspartner analysiert werden. Dazu kann nach erfolgter Immunpräzipitation eine Analyse mittels Massenspektroskopie oder Western Blot eingesetzt werden.

A

Pcgf6 Lokus (Chr. 19: 47033617-47050906)



B

Off-target Analysen *Pcgf6*_KO

Exon 1	Predicted	Position	Sequence	Missmatches	Gene
Off-Targets					
Guide-A #1	Chr2,	115603334	3'..GGGGCTCAGCAGAGGCCGCCCGG..5'	3	NM_207264
Guide-A #2	Chr16,	22431257	3'..TGCCCTAGCCAGAGGCCCGCTGG..5'	4	None
Guide-A #3	ChrX,	88236349	3'..TGAGCCAGCAGAGGCCCGCTAGG..5'	4	None
Guide-A #4	Chr10,	79861801	3'..AGGCCGCCGACAGAGGCCGCTGGG..5'	4	NM_013595
Guide-B #1	Chr12,	3844233	5'..TCCCTGCCAGTGGTACGAACAG..3'	4	None
Guide-B #2	Chr6,	119726152	5'..CCCCAGCCACCGGTACGAAAAG..3'	4	None
Guide-B #3	Chr16,	3741220	5'..CTCGTGACACTGGTAGGAAAAG..3'	4	None
Guide-B #4	Chr12,	107530481	5'..TGCCGTGCACTGGAACACGAAG..3'	3	None
Exon 10					
Predicted	Position	Sequence	Missmatches	Gene	
Off-Targets					
Guide-G #1	Chr8:89216263	3'..TCATGTCCCTCCGAGAACACTATGGAGG..5'	4	None	
Guide-G #2	Chr12:16752465	5'..AATTGCATCCCATAACTCTTTGGCAGG..3'	4	NC_000078.6	
Guide-G #3	Chr3:34609244	5'..ACTTGCTACAGCCAACTGTGGAGG..3'	4	NC_000069.6	
Guide-G #4	chr7:83890592	5'..ACATGCCTCCAATCCAACACTTGGGAGG..3'	4	NC_000073.6	
Guide-H #1	chr8:88104152	3'..CTTAGTCTTCCTTACAGCATGgGAAGG..5'	4	None	
Guide-H #2	chr12:115349253	5'..CACTTCTTGGCCTTCCCCCATACTGAGG..3'	4	None	
Guide-H #3	chr3:101540759	5'..CAGCTGTTCTTCCAACATCCCGGGGG..3'	4	None	
Guide-H #4	chr7:19020994	5'..CAGTTCCTCTCTCCATGCTGTGGG..3'	4	NM_008260.2	

C

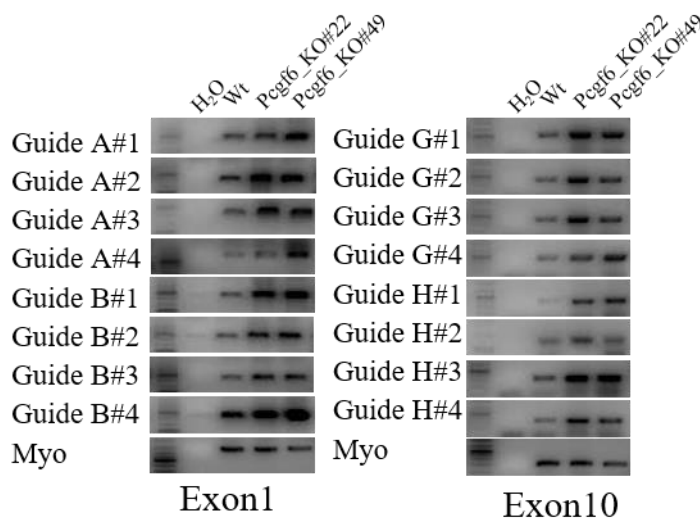
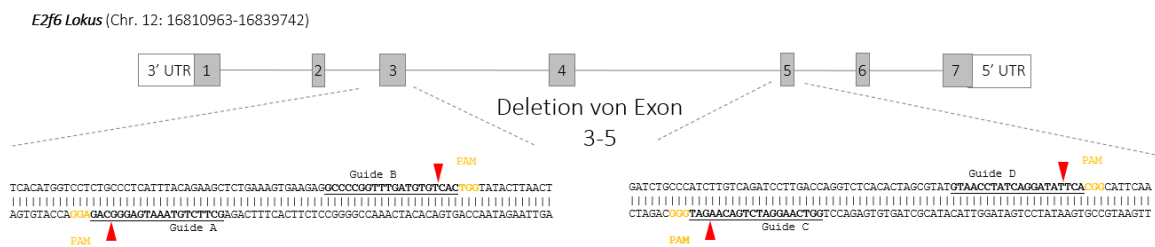


Abb. 19: Off-Target Analysen der *Pcgf6*_KO#22 und 49 Klone. (A) Schematische Darstellung des *Pcgf6* Lokus den sgRNA Sequenzen und den vorhergesagten Schnittstellen (rote Pfeile). (B) Sequenzen der ersten 4 Off-Targets der jeweiligen sgRNA (Cut-Off Wert: max. 4 Mismatches). (C) Analyse der Off-Target PRC in einem Agarosegel

A



B

Off-Target Analysen *E2f6*_KO

Exon 3	Position	Sequence	Missmatches	Gene
Predicted Off-Targets				
Guide-A #1	chr7:73681280,	5'..CCTCTGCCCTCATTtAtAGAccaTGG..3'	4	None
Guide-A #2	chr4:47357986,	3'..CaTCTGCCCTtAaTTtCAGAAGCAGG..5'	4	Tgfbfr1
Guide-A #3	chr5:5323105,	3'..tCTCTGCCCTCATTtAtGAAGCGGG..5'	4	Cdk14
Guide-A #4	chr6:38565388,	5'..CCTCTGCCtTCATTtAtAGAcacAGG..3'	4	Luc7112
Guide-B #1	chr2:17627555,	5'..GacCctGGTtGgGATGTGTCACTGtGGG..3'	4	Neb1
Guide-B #2	chr9:42434913,	3'..GctCctGTTTgATGTGTCACTGcTGG..5'	3	Tbcel
Exon 5				
Predicted Off-Targets				
Guide-C #1	chr1:56390815,	5'..CCCcTCTTGTaAGATCCTgGACC..3'	3	None
Guide-C #2	chr15:60256745,	5'..GGTCAtGaATtTGACAAGATGGG..3'	3	None
Guide-C #3	chr18:36707880,	5'..GGTCAAaGATCTGACTtGATtGG..3'	3	None
Guide-C #4	chr2:93575330,	5'..GGaCtAGGcTCTGACAAGATGGG..3'	3	None
Guide-D #1	chr11:56092260,	5'..GTAACCTATCAGtATATtTtTGG..3'	3	LOC105244170
Guide-D #2	chr4:17920307,	5'..CCCTGAAGATaCTGATAGGTTcC..3'	3	Mmp16
Guide-D #3	chr8:100801173;	5'..GTAACCTtAcTGGATATTCAAGG..3'	3	None
Guide-D #4	chr9:41360866,	5'..cTAACCTAcCAGGATATTcTGG..3'	3	None

C

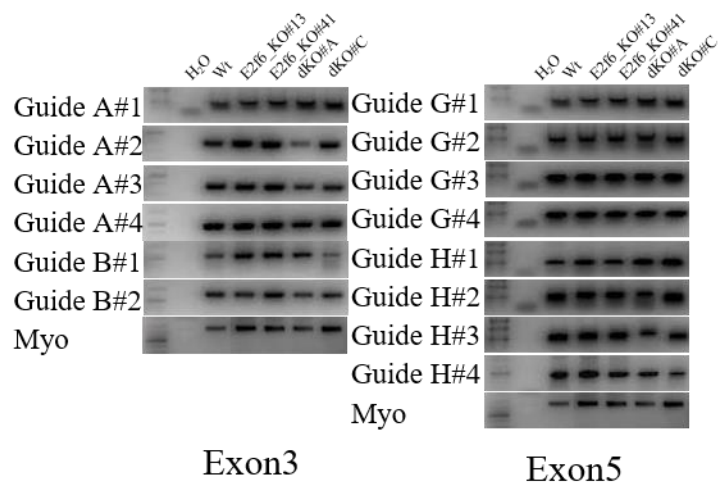
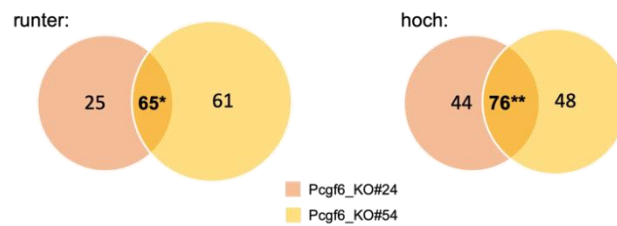


Abb. 20: Off-Target Analysen der *E2f6*_KO#13 und #41 Klone. (A) Schematische Darstellung des *Pcgf6* Locus den sgRNA Sequenzen und den vorhergesagten Schnittstellen (rote Pfeile). (B) Sequenzen der ersten 4 Off-Targets der jeweiligen sgRNA (Cut-Off Wert: max. 4 Mismatches). (C) Analyse der Off-Target PRC in einem Agarosegel

A



B

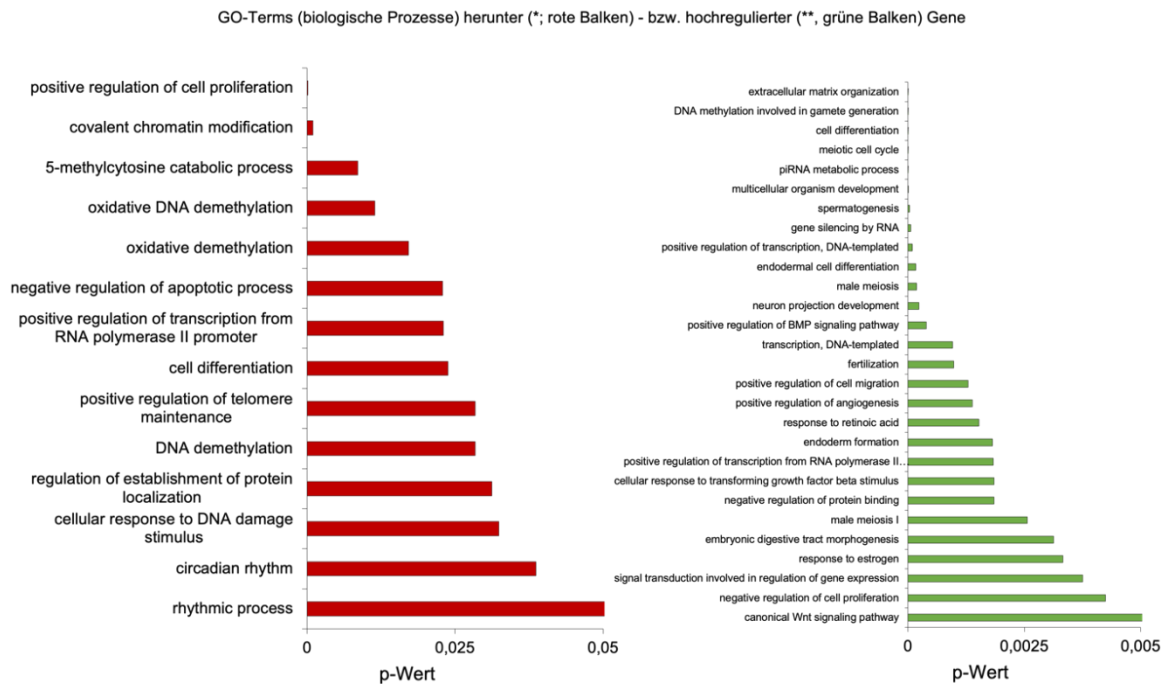
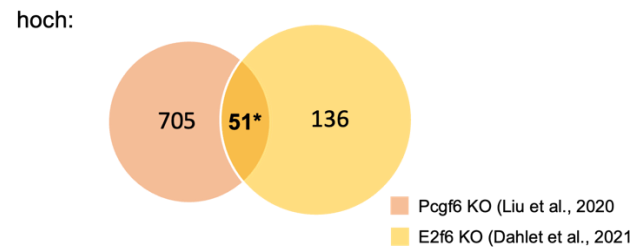


Abb. 21: GO-Enrichment Analysen differenziell regulierter Gene zwischen Wt und *Pcgf6* KO EB-Kulturen (d4). (A) Venn Diagramm zur Darstellung der gemeinsamen differenziell herunter (500*) bzw. hoch (419**) regulierten Gene zwischen *Pcgf6*_KO#24 sowie #54 und Wt EB-Kulturen (d2). (B) Biologische Prozesse (GO Enrichment Analyses) der differenziell herunter (*) und hoch (**) regulierten Gene in *Pcgf6* KO und Wt EB-Kulturen (d4). (hochreguliert: p-value $\leq 0,05$; runterreguliert: p-value $\leq 0,005$).

A



B

GO-Terms (biologische Prozesse) hochregulierter (*, grüne Balken) Gene

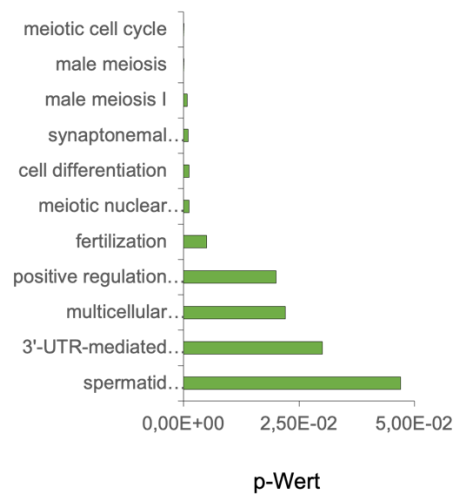
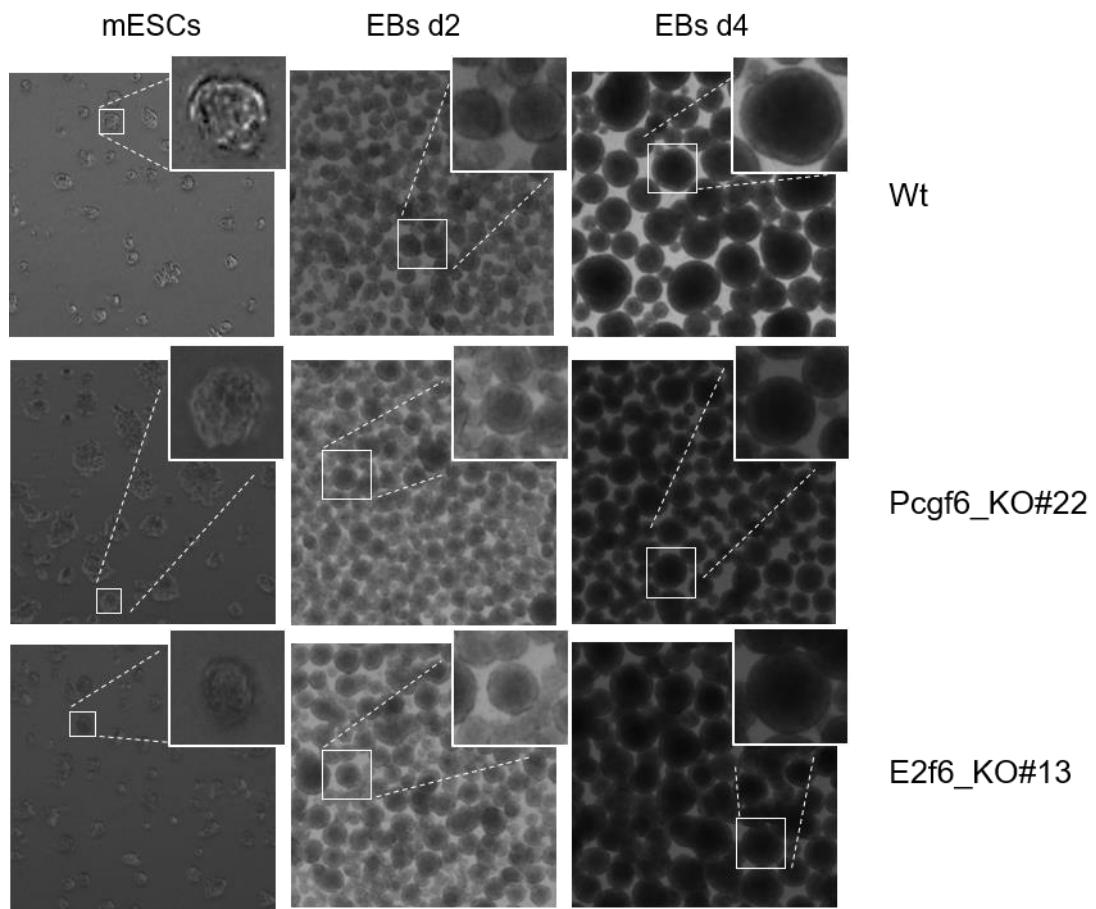
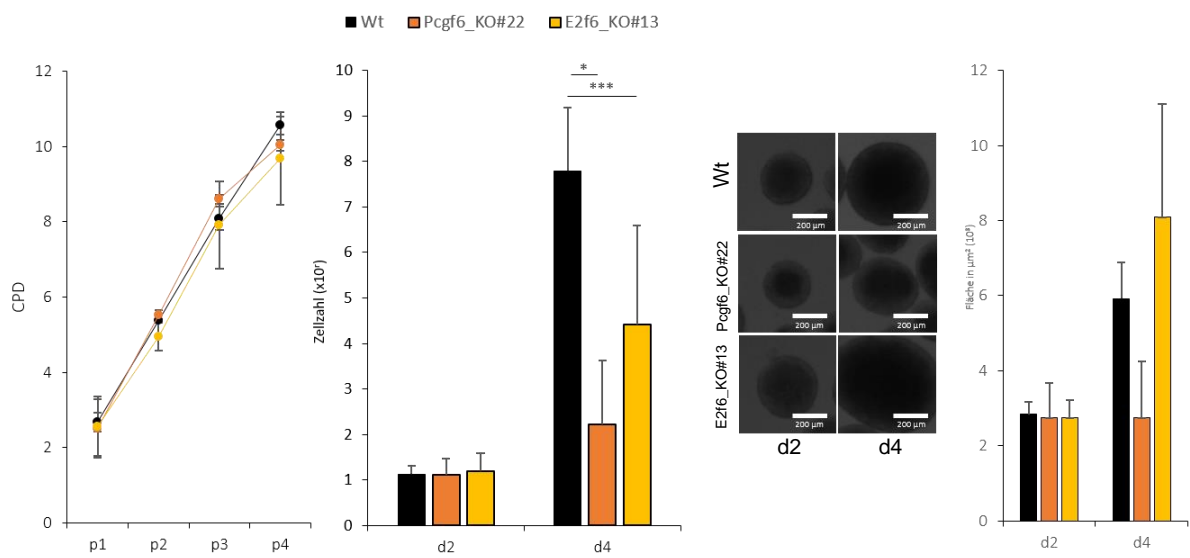


Abb. 22: GO-Enrichment Analysen differenziell regulierter Gene zwischen *Pcgf6* KO mESC-Kulturen aus Dahlet et al. 2021 und Liu et al. 2020. (A) Venn Diagramm zur Darstellung der gemeinsamen differenziell hochregulierten Gene (51*) beider Publikationen. (B) Biologische Prozesse (GO Enrichment Analyses) der differenziell hochreglierten Gene (*) beider *Pcgf6* KO mESCs (hochreguliert: p-value $\leq 0,05$).

C



D



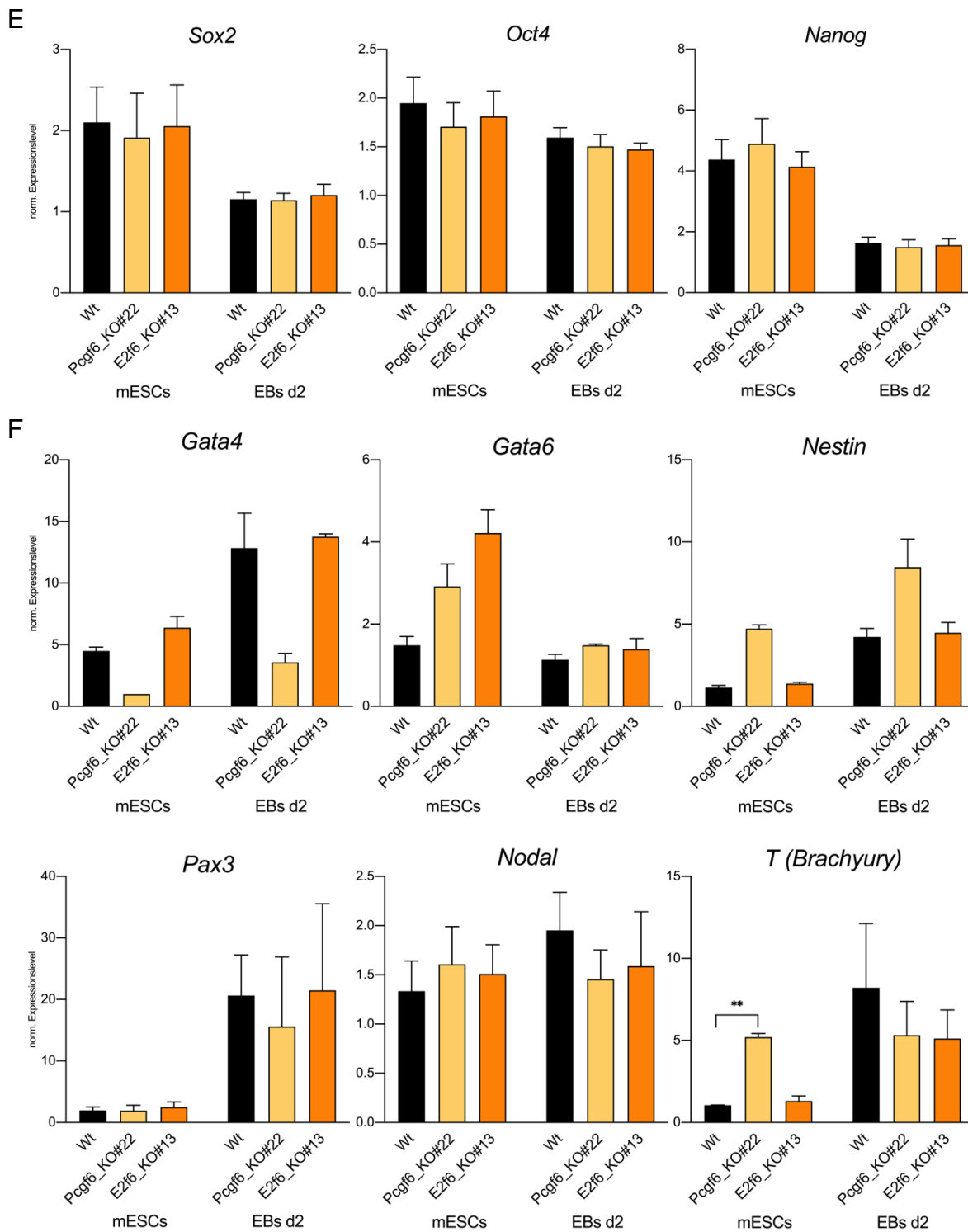


Abb. 23: Charakterisierung von Pcgf6_KO#22 und E2f6_KO#13 (A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von ESCs und EBs d2 und d4 des Wt und der des Pcgf6_KO#22 und E2f6_KO#13. (B) Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplung (CPD) von Wt und der des Pcgf6_KO#22 und E2f6_KO#13 mESCs (p=Passage) (n=2). (C) Quantifizierung der Zellzahlen in Wt und der des Pcgf6_KO#22 und E2f6_KO#13 EB-Suspensionskulturen an d2 und d4 der Differenzierung (n=3). Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$ (D) Bestimmung der Fläche der EBs d2 und d4 in Hanging Drop Kulturen (je 2000 Zellen/ 30 μ l Medium) (n=1, Standardabweichung stammt von der Fläche der Anzahl ausgewerteter EBs). (E) Genexpression der Pluripotenzmarker Sox2, Oct4 und Nanog. (F) Genexpression der Keimblatt-spezifischen Marker Gata4 und Gata6 (Trophektoderm), Nestin und Pax3 (primitives Endoderm), Nodal und T (frühes Mesoderm) (Standardabweichung stammt von der Anzahl der Proben eines Markes der jeweiligen qRT-PCR). Die Expression wurde durch zwei Standards (Gapdh nRps29) normalisiert. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt (n=2)

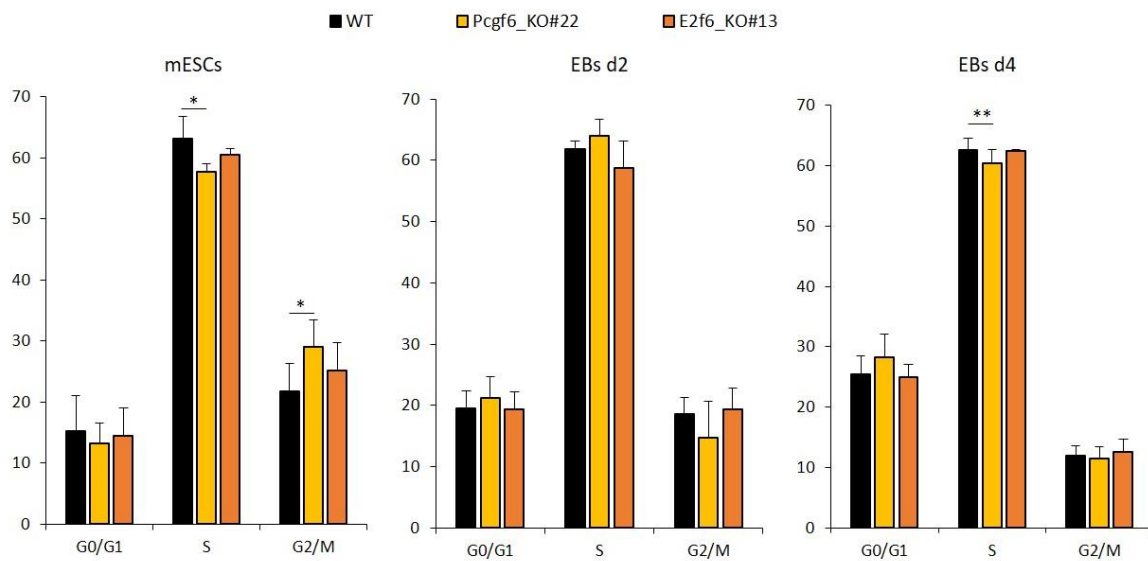


Abb. 24: Zellzyklusverteilung (Frequenz) von Pcgf6_KO#22 und E2f6_KO#13 in mESC- und EB-Kulturen. Statistische Auswertung der FACS Analysen: Der prozentuale Anteil der Zellen in G1, S und G2/M Phase des Zellzyklus zwischen undifferenzierten mESC- und EB-Kulturen (d2 und d4) der Differenzierung. Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. Student'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$

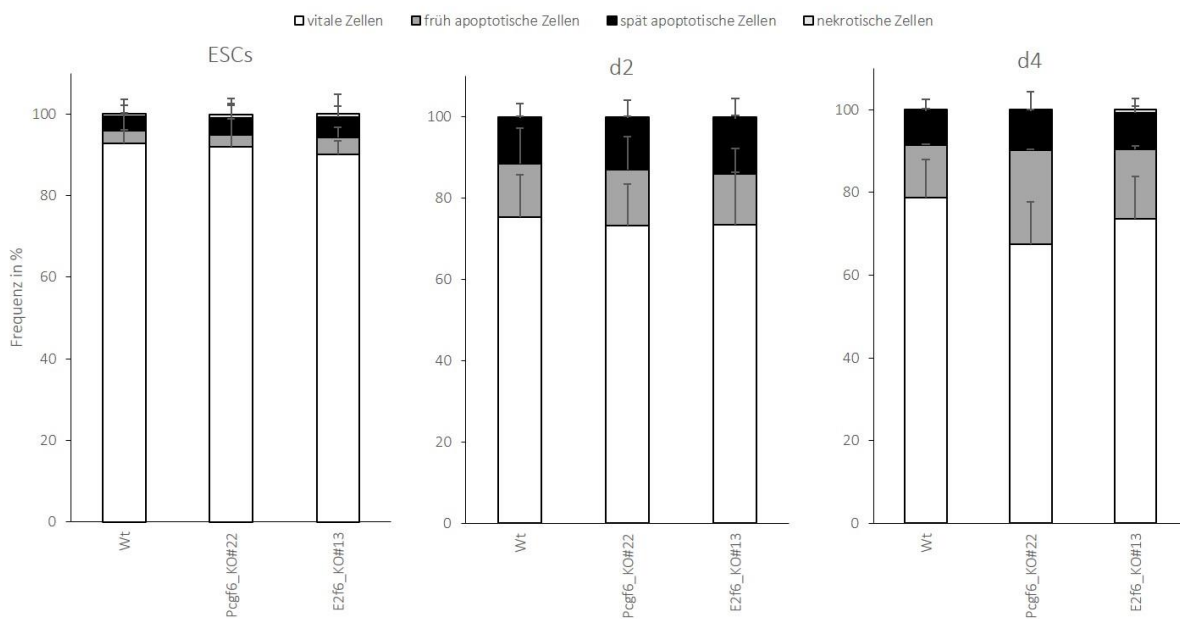
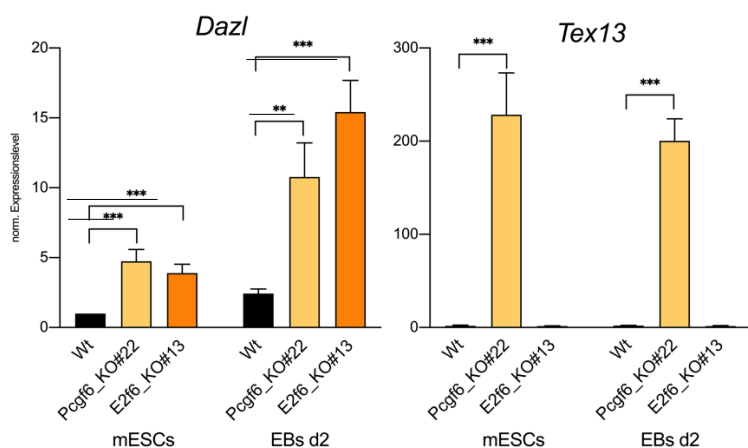
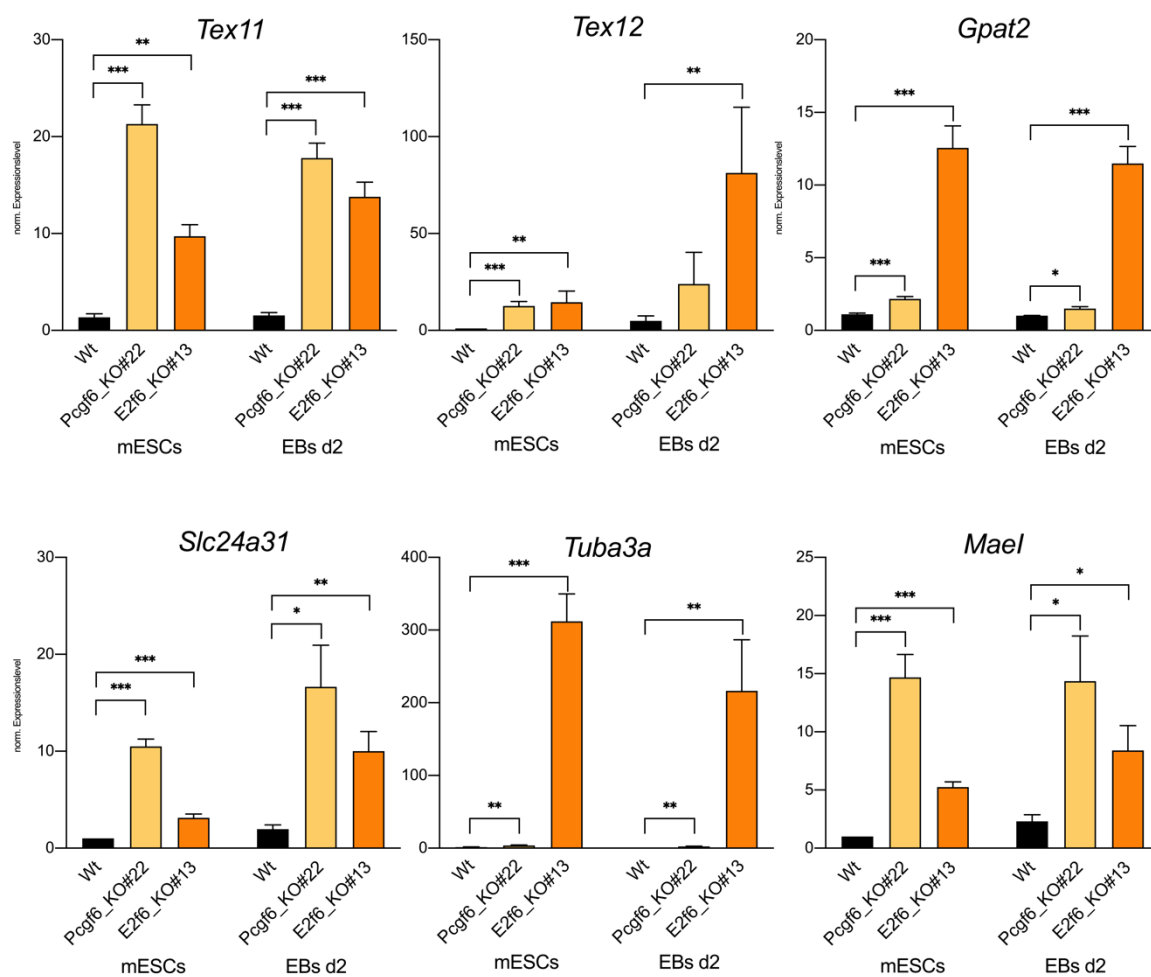


Abb. 25: Apoptotische Frequenz von Pcgf6#22 und E2f6#13 mESC- und EB-Kulturen (d2/d4). Prozentuale Auswertung aller apoptotischen (früh- und spätapoptotisch) in einem Box Plotdiagramm für die Tage 1-4 (d2, d4).

A



B



C

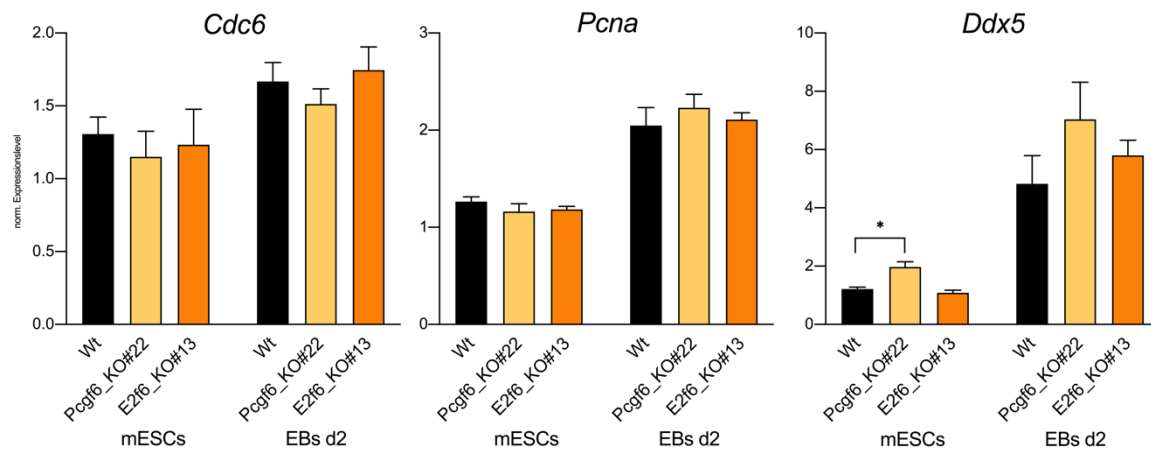


Abb. 26: Genexpressionsanalysen von Keimblattgenen und Zellzyklusgenen in Pcgf6_KO#22 und E2f6_KO#13 mESC- und EB-Kulturen (d2) (A) Genexpression der Gene *Tex13* und *Dazl* in Anlehnung an die Zdzienicka et al., 2014 Publikation. (B) Genexpression von PCGF6 und E2F6 Ziel-Keimbahn genen ausgewählt aus Dahlet et al, 2021 und Qin et al, 2021. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren ‚standard error of means (SEM)‘ bestimmt; Student’scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. (C) Expressionslevel von E2f6-Zellzyklusgenen. Die Expression wurde durch zwei Standards (Gapdh mRps29) normalisiert (n=2)

6. Literaturverzeichnis

- Ahmed, Kashif; Dehghani, Hesam; Rugg-Gunn, Peter; Fussner, Eden; Rossant, Janet; Bazett-Jones, David P. (2010): Global chromatin architecture reflects pluripotency and lineage commitment in the early mouse embryo. In: *PloS one* 5 (5), e10531. DOI: 10.1371/journal.pone.0010531.
- Ahuja, Akshay K.; Jodkowska, Karolina; Teloni, Federico; Bizard, Anna H.; Zellweger, Ralph; Herrador, Raquel et al. (2016): A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. In: *Nature communications* 7, S. 10660. DOI: 10.1038/ncomms10660.
- Alenzi, F. Q. B. (2004): Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. In: *British journal of biomedical science* 61 (2), S. 99–102. DOI: 10.1080/09674845.2004.11732652.
- Araki, Yasuto; Mimura, Toshihide (2017): The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. In: *Mediators of inflammation* 2017, S. 2608605. DOI: 10.1155/2017/2608605.
- Aranda, Sergi; Mas, Gloria; Di Croce, Luciano (2015): Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. In: *Science Advances* 1 (11), e1500737. DOI: 10.1126/sciadv.1500737.
- Arrigoni, Rachele; Alam, Steven L.; Wamstad, Joseph A.; Bardwell, Vivian J.; Sundquist, Wesley I.; Schreiber-Agus, Nicole (2006): The Polycomb-associated protein Rybp is a ubiquitin binding protein. In: *FEBS letters* 580 (26), S. 6233–6241. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.10.027.
- Aubrey, Brandon J.; Kelly, Gemma L.; Janic, Ana; Herold, Marco J.; Strasser, Andreas (2018): How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? In: *Cell death and differentiation* 25 (1), S. 104–113. DOI: 10.1038/cdd.2017.169.
- Avilion, Ariel A.; Nicolis, Silvia K.; Pevny, Larisa H.; Perez, Lidia; Vivian, Nigel; Lovell-Badge, Robin (2003): Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. In: *Genes & development* 17 (1), S. 126–140. DOI: 10.1101/gad.224503.
- Bannister, Andrew J.; Kouzarides, Tony (2011): Regulation of chromatin by histone modifications. In: *Cell research* 21 (3), S. 381–395. DOI: 10.1038/cr.2011.22.

- Bañuelos, C. A.; Banáth, J. P.; MacPhail, S. H.; Zhao, J.; Eaves, C. A.; O'Connor, M. D. et al. (2008): Mouse but not human embryonic stem cells are deficient in rejoining of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. In: *DNA repair* 7 (9), S. 1471–1483. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.05.005.
- Barron, Martin; Li, Jun (2016): Identifying and removing the cell-cycle effect from single-cell RNA-Sequencing data. In: *Scientific reports* 6, S. 33892. DOI: 10.1038/srep33892.
- Bauwens, Céline Liu; Peerani, Raheem; Niebruegge, Sylvia; Woodhouse, Kimberly A.; Kumacheva, Eugenia; Husain, Mansoor; Zandstra, Peter W. (2008): Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (9), S. 2300–2310. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0183.
- Beck, Samantha; Faradji, Floria; Brock, Hugh; Peronnet, Frédérique (2010): Maintenance of Hox gene expression patterns. In: *Advances in experimental medicine and biology* 689, S. 41–62. DOI: 10.1007/978-1-4419-6673-5_3.
- Ben-Shushan, E.; Thompson, J. R.; Gudas, L. J.; Bergman, Y. (1998): Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. In: *Molecular and Cellular Biology* 18 (4), S. 1866–1878. DOI: 10.1128/MCB.18.4.1866.
- Bernstein, Bradley E.; Mikkelsen, Tarjei S.; Xie, Xiaohui; Kamal, Michael; Huebert, Dana J.; Cuff, James et al. (2006): A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. In: *Cell* 125 (2), S. 315–326. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.041.
- Bertoli, Cosetta; Skotheim, Jan M.; Bruin, Robertus A. M. de (2013): Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (8), S. 518–528. DOI: 10.1038/nrm3629.
- Boeuf, Hélène; Hauss, Charlotte; Graeve, Fabienne de; Baran, Nathalie; Kedinger, Claude (1997): Leukemia Inhibitory Factor–dependent Transcriptional Activation in Embryonic Stem Cells. In: *The Journal of Cell Biology* 138 (6), S. 1207–1217.
- Botquin, V.; Hess, H.; Fuhrmann, G.; Anastassiadis, C.; Gross, M. K.; Vriend, G.; Schöler, H. R. (1998): New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. In: *Genes & development* 12 (13), S. 2073–2090. DOI: 10.1101/gad.12.13.2073.

- Boward, Ben; Wu, Tianming; Dalton, Stephen (2016): Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 34 (6), S. 1427–1436. DOI: 10.1002/stem.2345.
- Bowles, J.; Schepers, G.; Koopman, P. (2000): Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. In: *Developmental biology* 227 (2), S. 239–255. DOI: 10.1006/dbio.2000.9883.
- Boyer, Laurie A.; Lee, Tong Ihn; Cole, Megan F.; Johnstone, Sarah E.; Levine, Stuart S.; Zucker, Jacob P. et al. (2005): Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. In: *Cell* 122 (6), S. 947–956. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
- Brickman, Joshua M.; Serup, Palle (2017): Properties of embryoid bodies. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 6 (2). DOI: 10.1002/wdev.259.
- Brückner, Bastian R.; Janshoff, Andreas (2015): Elastic properties of epithelial cells probed by atomic force microscopy. In: *Biochimica et biophysica acta* 1853 (11 Pt B), S. 3075–3082. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.07.010.
- Campàs, Otger (2016): A toolbox to explore the mechanics of living embryonic tissues. In: *Seminars in cell & developmental biology* 55, S. 119–130. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.03.011.
- Cao, Ru; Wang, Liangjun; Wang, Hengbin; Xia, Li; Erdjument-Bromage, Hediye; Tempst, Paul et al. (2002): Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5595), S. 1039–1043. DOI: 10.1126/science.1076997.
- Cappell, Steven D.; Chung, Mingyu; Jaimovich, Ariel; Spencer, Sabrina L.; Meyer, Tobias (2016): Irreversible APC(Cdh1) Inactivation Underlies the Point of No Return for Cell-Cycle Entry. In: *Cell* 166 (1), S. 167–180. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.077.
- Cartwright, Peter; McLean, Cameron; Sheppard, Allan; Rivett, Duane; Jones, Karen; Dalton, Stephen (2005): LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. In: *Development (Cambridge, England)* 132 (5), S. 885–896. DOI: 10.1242/dev.01670.
- Chambers, Ian; Colby, Douglas; Robertson, Morag; Nichols, Jennifer; Lee, Sonia; Tweedie, Susan; Smith, Austin (2003): Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. In: *Cell* 113 (5), S. 643–655. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00392-1.

- Choi, Eui-Hwan; Yoon, Seobin; Koh, Young Eun; Seo, Young-Jin; Kim, Keun Pil (2020): Maintenance of genome integrity and active homologous recombination in embryonic stem cells. In: *Experimental & molecular medicine* 52 (8), S. 1220–1229. DOI: 10.1038/s12276-020-0481-2.
- Choi, Eui-Hwan; Yoon, Seobin; Park, Kyung-Soon; Kim, Keun P. (2017): The Homologous Recombination Machinery Orchestrates Post-replication DNA Repair During Self-renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 11610. DOI: 10.1038/s41598-017-11951-1.
- Cholewa-Waclaw, Justyna; Bird, Adrian; Schimmelfmann, Melanie von; Schaefer, Anne; Yu, Huimei; Song, Hongjun et al. (2016): The Role of Epigenetic Mechanisms in the Regulation of Gene Expression in the Nervous System. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36 (45), S. 11427–11434. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2492-16.2016.
- Comet, Itys; Riising, Eva M.; Leblanc, Benjamin; Helin, Kristian (2016): Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 16 (12), S. 803–810. DOI: 10.1038/nrc.2016.83.
- Courel, Maria; Friesenhahn, Laurie; Lees, Jacqueline A. (2008): E2f6 and Bmi1 cooperate in axial skeletal development. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237 (5), S. 1232–1242. DOI: 10.1002/dvdy.21516.
- Dahlet, Thomas; Truss, Matthias; Frede, Ute; Al Adhami, Hala; Bardet, Anaïs F.; Dumas, Michael et al. (2021): E2F6 initiates stable epigenetic silencing of germline genes during embryonic development. In: *Nature communications* 12 (1), S. 3582. DOI: 10.1038/s41467-021-23596-w.
- Dai, Lunzhi; Peng, Chao; Montellier, Emilie; Lu, Zhike; Chen, Yue; Ishii, Haruhiko et al. (2014): Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. In: *Nature chemical biology* 10 (5), S. 365–370. DOI: 10.1038/nchembio.1497.
- Dang, Stephen M.; Gerecht-Nir, Sharon; Chen, Jinny; Itskovitz-Eldor, Joseph; Zandstra, Peter W. (2004): Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22 (3), S. 275–282. DOI: 10.1634/stemcells.22-3-275.

- Drexler, Hans G.; Uphoff, Cord C. (2002): Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. In: *Cytotechnology* 39 (2), S. 75–90. DOI: 10.1023/A:1022913015916.
- Efroni, Sol; Duttagupta, Radharani; Cheng, Jill; Dehghani, Hesam; Hoeppner, Daniel J.; Dash, Chandravanu et al. (2008): Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. In: *Cell stem cell* 2 (5), S. 437–447. DOI: 10.1016/j.stem.2008.03.021.
- Endoh, Mitsuhiro; Endo, Takaho A.; Shinga, Jun; Hayashi, Katsuhiko; Farcas, Anca; Ma, Kit-Wan et al. (2017): PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.21064.
- Evans, M. J.; Kaufman, M. H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In: *Nature* 292 (5819), S. 154–156. DOI: 10.1038/292154a0.
- Faast, Renate; White, Josephine; Cartwright, Peter; Crocker, Lesley; Sarcevic, Boris; Dalton, Stephen (2004): Cdk6-cyclin D3 activity in murine ES cells is resistant to inhibition by p16(INK4a). In: *Oncogene* 23 (2), S. 491–502. DOI: 10.1038/sj.onc.1207133.
- Feldman, Nirit; Gerson, Ariela; Fang, Jia; Li, En; Zhang, Yi; Shinkai, Yoichi et al. (2006): G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. In: *Nature cell biology* 8 (2), S. 188–194. DOI: 10.1038/ncb1353.
- Finogenova, Ksenia; Bonnet, Jacques; Poepsel, Simon; Schäfer, Ingmar B.; Finkl, Katja; Schmid, Katharina et al. (2020): Structural basis for PRC2 decoding of active histone methylation marks H3K36me2/3. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.61964.
- Flozak, Annette S.; Lam, Anna P.; Gottardi, Cara J. (2016): A Simple Method to Assess Abundance of the β -Catenin Signaling Pool in Cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1481, S. 49–60. DOI: 10.1007/978-1-4939-6393-5_6.
- Fuchs, Christiane; Scheinast, Matthias; Pasteiner, Waltraud; Lagger, Sabine; Hofner, Manuela; Hoellrigl, Alexandra et al. (2012): Self-organization phenomena in embryonic stem cell-derived embryoid bodies: axis formation and breaking of symmetry during cardiomyogenesis. In: *Cells, tissues, organs* 195 (5), S. 377–391. DOI: 10.1159/000328712.
- Fujii-Yamamoto, Hiroko; Kim, Jung Min; Arai, Ken-ichi; Masai, Hisao (2005): Cell cycle and developmental regulations of replication factors in mouse embryonic stem cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (13), S. 12976–12987. DOI: 10.1074/jbc.M412224200.

- Gagliardi, Alessia; Mullin, Nicholas P.; Ying Tan, Zi; Colby, Douglas; Kousa, Anastasia I.; Halbritter, Florian et al. (2013): A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. In: *The EMBO journal* 32 (16), S. 2231–2247. DOI: 10.1038/emboj.2013.161.
- Gao, Yuan; Gan, Haiyun; Lou, Zhenkun; Zhang, Zhiguo (2018): Asf1a resolves bivalent chromatin domains for the induction of lineage-specific genes during mouse embryonic stem cell differentiation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (27), E6162-E6171. DOI: 10.1073/pnas.1801909115.
- Gao, Zhonghua; Zhang, Jin; Bonasio, Roberto; Strino, Francesco; Sawai, Ayana; Parisi, Fabio et al. (2012): PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. In: *Molecular cell* 45 (3), S. 344–356. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.01.002.
- García, E.; Marcos-Gutiérrez, C.; Del Mar Lorente, M.; Moreno, J. C.; Vidal, M. (1999): RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. In: *The EMBO journal* 18 (12), S. 3404–3418. DOI: 10.1093/emboj/18.12.3404.
- García-Bellido, A. (1975): Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. In: *Ciba Foundation symposium* 0 (29), S. 161–182. DOI: 10.1002/9780470720110.ch8.
- Gaspar-Maia, Alexandre; Alajem, Adi; Meshorer, Eran; Ramalho-Santos, Miguel (2011): Open chromatin in pluripotency and reprogramming. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (1), S. 36–47. DOI: 10.1038/nrm3036.
- Gaubatz, S.; Wood, J. G.; Livingston, D. M. (1998): Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (16), S. 9190–9195. DOI: 10.1073/pnas.95.16.9190.
- Gautier-Bouchardon, Anne V. (2018): Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. In: *Microbiology spectrum* 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018.
- Giangrande, Paloma H.; Zhu, Wencheng; Schlisio, Susanne; Sun, Xin; Mori, Seiichi; Gaubatz, Stefan; Nevins, Joseph R. (2004): A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription. In: *Genes & development* 18 (23), S. 2941–2951. DOI: 10.1101/gad.1239304.

- Gil, Jesús; O'Loghlen, Ana (2014): PRC1 complex diversity: where is it taking us? In: *Trends in cell biology* 24 (11), S. 632–641. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.06.005.
- Grijzenhout, Anne; Godwin, Jonathan; Koseki, Haruhiko; Gdula, Michal Ryszard; Szumska, Dorota; McGouran, Joanna F. et al. (2016): Functional analysis of AEBP2, a PRC2 Polycomb protein, reveals a Trithorax phenotype in embryonic development and in ESCs. In: *Development (Cambridge, England)* 143 (15), S. 2716–2723. DOI: 10.1242/dev.123935.
- Guttman, Mitchell; Donaghey, Julie; Carey, Bryce W.; Garber, Manuel; Grenier, Jennifer K.; Munson, Glen et al. (2011): lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. In: *Nature* 477 (7364), S. 295–300. DOI: 10.1038/nature10398.
- Hall, John; Guo, Ge; Wray, Jason; Eyres, Isobel; Nichols, Jennifer; Grotewold, Lars et al. (2009): Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. In: *Cell stem cell* 5 (6), S. 597–609. DOI: 10.1016/j.stem.2009.11.003.
- Halsall, John A.; Andrews, Simon; Krueger, Felix; Rutledge, Charlotte E.; Ficiz, Gabriella; Reik, Wolf; Turner, Bryan M. (2021): Histone modifications form a cell-type-specific chromosomal bar code that persists through the cell cycle. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 3009. DOI: 10.1038/s41598-021-82539-z.
- Harlin, Helena; Gajewski, Thomas F. (2008): Diagnosis and treatment of mycoplasma-contaminated cell cultures. In: *Current protocols in cytometry* Appendix 3, Appendix 3C. DOI: 10.1002/0471142956.cya03cs43.
- He, Aibin; Shen, Xiaohua; Ma, Qing; Cao, Jingjing; Gise, Alexander von; Zhou, Pingzhu et al. (2012): PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. In: *Genes & development* 26 (1), S. 37–42. DOI: 10.1101/gad.173930.111.
- He, Hanbing; Wang, Cheng; Dai, Qian; Li, Fengtian; Bergholz, Johann; Li, Zhonghan et al. (2016): p53 and p73 Regulate Apoptosis but Not Cell-Cycle Progression in Mouse Embryonic Stem Cells upon DNA Damage and Differentiation. In: *Stem cell reports* 7 (6), S. 1087–1098. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.10.008.
- Herr, W.; Cleary, M. A. (1995): The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. In: *Genes & development* 9 (14), S. 1679–1693. DOI: 10.1101/gad.9.14.1679.
- Hindley, Christopher; Philpott, Anna (2013): The cell cycle and pluripotency. In: *The Biochemical journal* 451 (2), S. 135–143. DOI: 10.1042/BJ20121627.

- Hopfe, Miriam; Dahlmanns, Theresa; Henrich, Birgit (2011): In *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. In: *BMC microbiology* 11, S. 185. DOI: 10.1186/1471-2180-11-185.
- Hopfe, Miriam; Deenen, René; Degrandi, Daniel; Köhrer, Karl; Henrich, Birgit (2013): Host Cell Responses to Persistent Mycoplasmas - Different Stages in Infection of HeLa Cells with *Mycoplasma hominis*. In: *PloS one* 8 (1). DOI: 10.1371/journal.pone.0054219.
- Hopfe, Miriam; Henrich, Birgit (2008): OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. In: *BMC microbiology* 8, S. 55. DOI: 10.1186/1471-2180-8-55.
- Hu, Guang; Kim, Jonghwan; Xu, Qikai; Leng, Yumei; Orkin, Stuart H.; Elledge, Stephen J. (2009): A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. In: *Genes & development* 23 (7), S. 837–848. DOI: 10.1101/gad.1769609.
- Huang, Xiaona; Wei, Chao; Li, Fenjie; Jia, Lumeng; Zeng, Pengguihang; Li, Jiahe et al. (2019): PCGF6 regulates stem cell pluripotency as a transcription activator via super-enhancer dependent chromatin interactions. In: *Protein & cell* 10 (10), S. 709–725. DOI: 10.1007/s13238-019-0629-9.
- Huurne, Menno ter; Chappell, James; Dalton, Stephen; Stunnenberg, Hendrik G. (2017): Distinct Cell-Cycle Control in Two Different States of Mouse Pluripotency. In: *Cell stem cell* 21 (4), 449-455.e4. DOI: 10.1016/j.stem.2017.09.004.
- Huurne, Menno ter; Peng, Tianran; Yi, Guoqiang; van Mierlo, Guido; Marks, Hendrik; Stunnenberg, Hendrik G. (2020): Critical Role for P53 in Regulating the Cell Cycle of Ground State Embryonic Stem Cells. In: *Stem cell reports* 14 (2), S. 175–183. DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.01.001.
- Hyun, Kwangbeom; Jeon, Jongcheol; Park, Kihyun; Kim, Jaehoon (2017): Writing, erasing and reading histone lysine methylations. In: *Experimental & molecular medicine* 49 (4), e324. DOI: 10.1038/emm.2017.11.
- Ivanova, Natalia; Dobrin, Radu; Lu, Rong; Kotenko, Iulia; Levorse, John; DeCoste, Christina et al. (2006): Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. In: *Nature* 442 (7102), S. 533–538. DOI: 10.1038/nature04915.

- Jain, Abhinav K.; Barton, Michelle Craig (2018): p53: emerging roles in stem cells, development and beyond. In: *Development (Cambridge, England)* 145 (8). DOI: 10.1242/dev.158360.
- Jaiswal, Sushil K.; Oh, John J.; DePamphilis, Melvin L. (2020): Cell cycle arrest and apoptosis are not dependent on p53 prior to p53-dependent embryonic stem cell differentiation. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 38 (9), S. 1091–1106. DOI: 10.1002/stem.3199.
- James, Daylon; Levine, Ariel J.; Besser, Daniel; Hemmati-Brivanlou, Ali (2005): TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. In: *Development (Cambridge, England)* 132 (6), S. 1273–1282. DOI: 10.1242/dev.01706.
- Jørgensen, Helle F.; Giadrossi, Sara; Casanova, Miguel; Endoh, Mitsuhiro; Koseki, Haruhiko; Brockdorff, Neil; Fisher, Amanda G. (2006): Stem cells primed for action: polycomb repressive complexes restrain the expression of lineage-specific regulators in embryonic stem cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (13), S. 1411–1414. DOI: 10.4161/cc.5.13.2927.
- Juan, Gloria; Hernando, Eva; Cordon-Cardo, Carlos (2002): Separation of live cells in different phases of the cell cycle for gene expression analysis. In: *Cytometry* 49 (4), S. 170–175. DOI: 10.1002/cyto.10173.
- Jürgens, Gerd (1985): A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. In: *Nature* 316 (6024), S. 153–155. DOI: 10.1038/316153a0.
- Kaustov, Lilia; Ouyang, Hui; Amaya, Maria; Lemak, Alexander; Nady, Nataliya; Duan, Shili et al. (2010): Recognition and Specificity Determinants of the Human Cbx Chromodomains*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 286 (1), S. 521–529. DOI: 10.1074/jbc.M110.191411.
- Kehoe, Sarah M.; Oka, Masahiro; Hankowski, Katherine E.; Reichert, Nina; Garcia, Sandra; McCarrey, John R. et al. (2008): A conserved E2F6-binding element in murine meiosis-specific gene promoters. In: *Biology of reproduction* 79 (5), S. 921–930. DOI: 10.1095/biolreprod.108.067645.
- Khan, Abdul Aziz; Lee, Andrew Jeoungun; Roh, Tae-Young (2015): Polycomb group protein-mediated histone modifications during cell differentiation. In: *Epigenomics* 7 (1), S. 75–84. DOI: 10.2217/epi.14.61.

- Kim, Chongwoo A.; Gingery, Mari; Pilpa, Rosemarie M.; Bowie, James U. (2002): The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. In: *Nature structural biology* 9 (6), S. 453–457. DOI: 10.1038/nsb802.
- Kim, Jonghwan; Chu, Jianlin; Shen, Xiaohua; Wang, Jianlong; Orkin, Stuart H. (2008): An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. In: *Cell* 132 (6), S. 1049–1061. DOI: 10.1016/j.cell.2008.02.039.
- Kloet, Susan L.; Makowski, Matthew M.; Baymaz, H. Irem; van Voorthuijsen, Lisa; Karemaker, Ino D.; Santanach, Alexandra et al. (2016): The dynamic interactome and genomic targets of Polycomb complexes during stem-cell differentiation. In: *Nature structural & molecular biology* 23 (7), S. 682–690. DOI: 10.1038/nsmb.3248.
- Kopp, Janel L.; Ormsbee, Briana D.; Desler, Michelle; Rizzino, Angie (2008): Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (4), S. 903–911. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0951.
- Kouznetsova, Valentina L.; Tchekanov, Alex; Li, Xiaoming; Yan, Xiaowen; Tsigelny, Igor F. (2019): Polycomb repressive 2 complex—Molecular mechanisms of function. In: *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 28 (8), S. 1387–1399. DOI: 10.1002/pro.3647.
- Kuroda, Takao; Tada, Masako; Kubota, Hiroshi; Kimura, Hironobu; Hatano, Shin-ya; Suemori, Hirofumi et al. (2005): Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. In: *Molecular and Cellular Biology* 25 (6), S. 2475–2485. DOI: 10.1128/MCB.25.6.2475-2485.2005.
- Kuzmichev, Andrei; Nishioka, Kenichi; Erdjument-Bromage, Hediye; Tempst, Paul; Reinberg, Danny (2002): Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. In: *Genes & development* 16 (22), S. 2893–2905. DOI: 10.1101/gad.1035902.
- Lange, Christian; Calegari, Federico (2010): Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (10), S. 1893–1900. DOI: 10.4161/cc.9.10.11598.
- Lanzuolo, Chiara; Lo Sardo, Federica; Orlando, Valerio (2012): Concerted epigenetic signatures inheritance at PcG targets through replication. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (7), S. 1296–1300. DOI: 10.4161/cc.19710.

- Larue, L.; Antos, C.; Butz, S.; Huber, O.; Delmas, V.; Dominis, M.; Kemler, R. (1996): A role for cadherins in tissue formation. In: *Development (Cambridge, England)* 122 (10), S. 3185–3194.
- Lavial, Fabrice; Acloque, Hervé; Bertocchini, Federica; Macleod, David J.; Boast, Sharon; Bachelard, Elodie et al. (2007): The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. In: *Development (Cambridge, England)* 134 (19), S. 3549–3563. DOI: 10.1242/dev.006569.
- Lavial, Fabrice; Bessonard, Sylvain; Ohnishi, Yusuke; Tsumura, Akiko; Chandrashekan, Anil; Fenwick, Mark A. et al. (2012): Bmi1 facilitates primitive endoderm formation by stabilizing Gata6 during early mouse development. In: *Genes & development* 26 (13), S. 1445–1458. DOI: 10.1101/gad.188193.112.
- Le Faou, Perrine; Völkel, Pamela; Angrand, Pierre-Olivier (2011): The zebrafish genes encoding the Polycomb repressive complex (PRC) 1. In: *Gene* 475 (1), S. 10–21. DOI: 10.1016/j.gene.2010.12.012.
- Lenardo, M. J.; Staudt, L.; Robbins, P.; Kuang, A.; Mulligan, R. C.; Baltimore, D. (1989): Repression of the IgH enhancer in teratocarcinoma cells associated with a novel octamer factor. In: *Science (New York, N.Y.)* 243 (4890), S. 544–546. DOI: 10.1126/science.2536195.
- Levine, Arnold J.; Berger, Shelley L. (2017): The interplay between epigenetic changes and the p53 protein in stem cells. In: *Genes & development* 31 (12), S. 1195–1201. DOI: 10.1101/gad.298984.117.
- Li, Victor C.; Ballabeni, Andrea; Kirschner, Marc W. (2012): Gap 1 phase length and mouse embryonic stem cell self-renewal. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31), S. 12550–12555. DOI: 10.1073/pnas.1206740109.
- Li, X.; Chen, Y.; Schéele, S.; Arman, E.; Haffner-Krausz, R.; Ekblom, P.; Lonai, P. (2001): Fibroblast growth factor signaling and basement membrane assembly are connected during epithelial morphogenesis of the embryoid body. In: *The Journal of Cell Biology* 153 (4), S. 811–822. DOI: 10.1083/jcb.153.4.811.
- Li, Xinyue; Ji, Guangyu; Zhou, Juan; Du, Jingyi; Li, Xian; Shi, Wei et al. (2020): Pcgfl1 Regulates Early Neural Tube Development Through Histone Methylation in Zebrafish. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 581636. DOI: 10.3389/fcell.2020.581636.

- Liu, Jie; He, Xiaowen; Corbett, Siobhan A.; Lowry, Stephen F.; Graham, Alan M.; Fässler, Reinhard; Li, Shaohua (2009): Integrins are required for the differentiation of visceral endoderm. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 2), S. 233–242. DOI: 10.1242/jcs.037663.
- Liu, L.; Leaman, D.; Villalta, M.; Roberts, R. M. (1997): Silencing of the gene for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (11), S. 1651–1658. DOI: 10.1210/mend.11.11.9971.
- Liu, Lijun; Michowski, Wojciech; Kolodziejczyk, Aleksandra; Sicinski, Piotr (2019): The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. In: *Nature cell biology* 21 (9), S. 1060–1067. DOI: 10.1038/s41556-019-0384-4.
- Liu, Mengjie; Zhu, Yaru; Xing, Fei; Liu, Shuang; Xia, Yin; Jiang, Qing; Qin, Jinzhong (2020): The polycomb group protein PCGF6 mediates germline gene silencing by recruiting histone-modifying proteins to target gene promoters. In: *The Journal of Biological Chemistry* 295 (28), S. 9712–9724. DOI: 10.1074/jbc.RA119.012121.
- Liu, Yin; Chen, Sujun; Wang, Su; Soares, Fraser; Fischer, Martin; Meng, Feilong et al. (2017): Transcriptional landscape of the human cell cycle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (13), S. 3473–3478. DOI: 10.1073/pnas.1617636114.
- Liu, Ying; Lu, Chenning; Yang, Ye; Fan, Yanping; Yang, Renliang; Liu, Chuan-Fa et al. (2011): Influence of histone tails and H4 tail acetylations on nucleosome-nucleosome interactions. In: *Journal of molecular biology* 414 (5), S. 749–764. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.10.031.
- Logunov, D. Y.; Scheblyakov, D. V.; Zubkova, O. V.; Shmarov, M. M.; Rakovskaya, I. V.; Gurova, K. V. et al. (2008): Mycoplasma infection suppresses p53, activates NF-kappaB and cooperates with oncogenic Ras in rodent fibroblast transformation. In: *Oncogene* 27 (33), S. 4521–4531. DOI: 10.1038/onc.2008.103.
- Lucchesi, John C. (2019): Epigenetics, Nuclear Organization & Gene Function: Oxford University Press.
- Malik, Harmit S.; Henikoff, Steven (2003): Phylogenomics of the nucleosome. In: *Nature structural biology* 10 (11), S. 882–891. DOI: 10.1038/nsb996.

- Markoullis, Kyriaki; Bulian, Diana; Hölzlwimmer, Gabriele; Quintanilla-Martinez, Leticia; Heiliger, Katrin-Janine; Zitzelsberger, Horst et al. (2009): Mycoplasma contamination of murine embryonic stem cells affects cell parameters, germline transmission and chimeric progeny. In: *Transgenic Res* 18 (1), S. 71–87. DOI: 10.1007/s11248-008-9218-z.
- Martin, G. R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12), S. 7634–7638. DOI: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Mattout, Anna; Meshorer, Eran (2010): Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells. In: *Current opinion in cell biology* 22 (3), S. 334–341. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.02.001.
- Matzuk, Martin M.; Lamb, Dolores J. (2002): Genetic dissection of mammalian fertility pathways. In: *Nature cell biology* 4 Suppl, s41-9. DOI: 10.1038/ncb-nm-fertilityS41.
- McGinnis, W.; Krumlauf, R. (1992): Homeobox genes and axial patterning. In: *Cell* 68 (2), S. 283–302. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90471-n.
- Meng, Ying; Liu, Yang; Dakou, Eleni; Gutierrez, Gustavo J.; Leyns, Luc (2020): Polycomb group RING finger protein 5 influences several developmental signaling pathways during the in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. In: *Development, growth & differentiation* 62 (4), S. 232–242. DOI: 10.1111/dgd.12659.
- Messmer, S.; Franke, A.; Paro, R. (1992): Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. In: *Genes & development* 6 (7), S. 1241–1254. DOI: 10.1101/gad.6.7.1241.
- Messner, Simon; Altmeyer, Matthias; Zhao, Hongtao; Pozivil, Andrea; Roschitzki, Bernd; Gehrig, Peter et al. (2010): PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. In: *Nucleic Acids Research* 38 (19), S. 6350–6362. DOI: 10.1093/nar/gkq463.
- Mitsui, Kaoru; Tokuzawa, Yoshimi; Itoh, Hiroaki; Segawa, Kohichi; Murakami, Mirei; Takahashi, Kazutoshi et al. (2003): The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. In: *Cell* 113 (5), S. 631–642. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00393-3.

- Morey, Lluís; Aloia, Luigi; Cozzuto, Luca; Benitah, Salvador Aznar; Di Croce, Luciano (2013): RYBP and Cbx7 define specific biological functions of polycomb complexes in mouse embryonic stem cells. In: *Cell reports* 3 (1), S. 60–69. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.11.026.
- Moritz, Lindsay E.; Trievel, Raymond C. (2018): Structure, mechanism, and regulation of polycomb-repressive complex 2. In: *The Journal of Biological Chemistry* 293 (36), S. 13805–13814. DOI: 10.1074/jbc.R117.800367.
- Morkel, M.; Wenkel, J.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T.; Hagemeyer, C. (1997): An E2F-like repressor of transcription. In: *Nature* 390 (6660), S. 567–568. DOI: 10.1038/37507.
- Moussa, Marmar; Măndoiu, Ion I. (2020): Computational cell cycle analysis of single cell RNA-Seq data.
- Mukherjee, Bipasha; Kessinger, Chase; Kobayashi, Junya; Chen, Benjamin P. C.; Chen, David J.; Chatterjee, Alok; Burma, Sandeep (2006): DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. In: *DNA repair* 5 (5), S. 575–590. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.01.011.
- Müller, Jürg; Hart, Craig M.; Francis, Nicole J.; Vargas, Marcus L.; Sengupta, Aditya; Wild, Brigitte et al. (2002): Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. In: *Cell* 111 (2), S. 197–208. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00976-5.
- Nichols, J.; Zevnik, B.; Anastassiadis, K.; Niwa, H.; Klewe-Nebenius, D.; Chambers, I. et al. (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. In: *Cell* 95 (3), S. 379–391. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81769-9.
- Nikfarjam, Laleh; Farzaneh, Parvaneh (2011): Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. In: *Cell journal* 13 (4), S. 203–212.
- Niwa, H.; Miyazaki, J.; Smith, A. G. (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. In: *Nature genetics* 24 (4), S. 372–376. DOI: 10.1038/74199.
- Obara, Nobuko (2006): Simultaneous immunofluorescence detection of cadherin and beta-catenin in mouse tissue sections. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 341, S. 197–204. DOI: 10.1385/1-59745-113-4:197.
- Obier, Nadine; Lin, Qiong; Cauchy, Pierre; Hornich, Vroni; Zenke, Martin; Becker, Matthias; Müller, Albrecht M. (2015): Polycomb protein EED is required for silencing of pluripotency

- genes upon ESC differentiation. In: *Stem cell reviews and reports* 11 (1), S. 50–61. DOI: 10.1007/s12015-014-9550-z.
- Ogawa, Hidesato; Ishiguro, Kei-Ichiro; Gaubatz, Stefan; Livingston, David M.; Nakatani, Yoshihiro (2002): A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5570), S. 1132–1136. DOI: 10.1126/science.1069861.
- Okamoto, K.; Okazawa, H.; Okuda, A.; Sakai, M.; Muramatsu, M.; Hamada, H. (1990): A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. In: *Cell* 60 (3), S. 461–472. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90597-8.
- Okumura-Nakanishi, Sayaka; Saito, Motoki; Niwa, Hitoshi; Ishikawa, Fuyuki (2005): Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (7), S. 5307–5317. DOI: 10.1074/jbc.M410015200.
- Olarerin-George, Anthony O.; Hogenesch, John B. (2015): Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. In: *Nucleic Acids Research* 43 (5), S. 2535–2542. DOI: 10.1093/nar/gkv136.
- O'Loughlen, Ana; Muñoz-Cabello, Ana M.; Gaspar-Maia, Alexandre; Wu, Hsan-Au; Banito, Ana; Kunowska, Natalia et al. (2012): MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation. In: *Cell stem cell* 10 (1), S. 33–46. DOI: 10.1016/j.stem.2011.12.004.
- Padgett, Joe; Santos, Silvia D. M. (2020): From clocks to dominoes: lessons on cell cycle remodelling from embryonic stem cells. In: *FEBS letters*. DOI: 10.1002/1873-3468.13862.
- Park, Jaesung; Cho, Cheul H.; Parashurama, Natesh; Li, Yawen; Berthiaume, François; Toner, Mehmet et al. (2007): Microfabrication-based modulation of embryonic stem cell differentiation. In: *Lab on a chip* 7 (8), S. 1018–1028. DOI: 10.1039/b704739h.
- Pekkanen-Mattila, Mari; Pelto-Huikko, Markku; Kujala, Ville; Suuronen, Riitta; Skottman, Heli; Aalto-Setälä, Katriina; Kerkelä, Erja (2010): Spatial and temporal expression pattern of germ layer markers during human embryonic stem cell differentiation in embryoid bodies. In: *Histochemistry and cell biology* 133 (5), S. 595–606. DOI: 10.1007/s00418-010-0689-7.
- Pennycook, Bethene R.; Vesela, Eva; Peripolli, Silvia; Singh, Tanya; Barr, Alexis R.; Bertoli, Cosetta; Bruin, Robertus A. M. de (2020): E2F-dependent transcription determines

- replication capacity and S phase length. In: *Nature communications* 11 (1), S. 3503. DOI: 10.1038/s41467-020-17146-z.
- Percharde, Michelle; Bulut-Karslioglu, Aydan; Ramalho-Santos, Miguel (2017): Hypertranscription in Development, Stem Cells, and Regeneration. In: *Developmental cell* 40 (1), S. 9–21. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.11.010.
- Pesce, M.; Wang, X.; Wolgemuth, D. J.; Schöler, H. (1998): Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. In: *Mechanisms of development* 71 (1-2), S. 89–98. DOI: 10.1016/s0925-4773(98)00002-1.
- Peterson, A. J.; Kyba, M.; Bornemann, D.; Morgan, K.; Brock, H. W.; Simon, J. (1997): A domain shared by the Polycomb group proteins Scm and ph mediates heterotypic and homotypic interactions. In: *Molecular and Cellular Biology* 17 (11), S. 6683–6692.
- Pirrotta, V. (1998): Polycombining the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. In: *Cell* 93 (3), S. 333–336. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81162-9.
- Piunti, Andrea; Shilatifard, Ali (2021): The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer. In: *Nature reviews. Molecular cell biology*. DOI: 10.1038/s41580-021-00341-1.
- Qin, Jinzhong; Whyte, Warren A.; Anderssen, Endre; Apostolou, Effie; Chen, Hsu-Hsin; Akbarian, Schahram et al. (2012): The polycomb group protein L3mbtl2 assembles an atypical PRC1-family complex that is essential in pluripotent stem cells and early development. In: *Cell stem cell* 11 (3), S. 319–332. DOI: 10.1016/j.stem.2012.06.002.
- Razin, Shmuel (1996): *Medical Microbiology. Mycoplasmas*. 4th. Hg. v. Samuel Baron. Galveston (TX).
- Razin, Shmuel; Yogev, David; Naot, Yehudith (1998): Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (4), S. 1094–1156.
- Ringrose, Leonie; Paro, Renato (2004): Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. In: *Annual review of genetics* 38, S. 413–443. DOI: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091907.
- Robertson, E. J. (1997): Derivation and maintenance of embryonic stem cell cultures. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 75, S. 173–184. DOI: 10.1385/0-89603-441-0:173.

- Rodda, David J.; Chew, Joon-Lin; Lim, Leng-Hiong; Loh, Yui-Han; Wang, Bei; Ng, Huck-Hui; Robson, Paul (2005): Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (26), S. 24731–24737. DOI: 10.1074/jbc.M502573200.
- Romorini, Leonardo; Riva, Diego Ariel; Blüguermann, Carolina; Videla Richardson, Guillermo Agustin; Scassa, Maria Elida; Sevlever, Gustavo Emilio; Miriuka, Santiago Gabriel (2013): Effect of antibiotics against Mycoplasma sp. on human embryonic stem cells undifferentiated status, pluripotency, cell viability and growth. In: *PloS one* 8 (7), e70267. DOI: 10.1371/journal.pone.0070267.
- Rose, Nathan R.; King, Hamish W.; Blackledge, Neil P.; Fursova, Nadezda A.; Ember, Katherine Ji; Fischer, Roman et al. (2016): RYBP stimulates PRC1 to shape chromatin-based communication between Polycomb repressive complexes. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.18591.
- Rosner, M. H.; Vigano, M. A.; Ozato, K.; Timmons, P. M.; Poirier, F.; Rigby, P. W.; Staudt, L. M. (1990): A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. In: *Nature* 345 (6277), S. 686–692. DOI: 10.1038/345686a0.
- Rossetto, Dorine; Avvakumov, Nikita; Côté, Jacques (2012): Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. In: *Epigenetics* 7 (10), S. 1098–1108. DOI: 10.4161/epi.21975.
- Sakabe, Kaoru; Wang, Zihao; Hart, Gerald W. (2010): β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (46), S. 19915–19920. DOI: 10.1073/pnas.1009023107.
- Sanulli, Serena; Justin, Neil; Teissandier, Aurélie; Ancelin, Katia; Portoso, Manuela; Caron, Matthieu et al. (2015): Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation. In: *Molecular cell* 57 (5), S. 769–783. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.020.
- Sato, Noboru; Meijer, Laurent; Skaltsounis, Leandros; Greengard, Paul; Brivanlou, Ali H. (2004): Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. In: *Nature medicine* 10 (1), S. 55–63. DOI: 10.1038/nm979.

- Savatier, P.; Huang, S.; Szekely, L.; Wiman, K. G.; Samarut, J. (1994): Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. In: *Oncogene* 9 (3), S. 809–818.
- Savatier, P.; Lapillonne, H.; Jirmanova, L.; Vitelli, L.; Samarut, J. (2002): Analysis of the cell cycle in mouse embryonic stem cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 185, S. 27–33.
- Scelfo, Andrea; Fernández-Pérez, Daniel; Tamburri, Simone; Zanotti, Marika; Lavarone, Elisa; Soldi, Monica et al. (2019): Functional Landscape of PCGF Proteins Reveals Both RING1A/B-Dependent-and RING1A/B-Independent-Specific Activities. In: *Molecular cell* 74 (5), 1037-1052.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.04.002.
- Schmitt, K.; Däubener, W.; Bitter-Suermann, D.; Hadding, U. (1988): A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. In: *Journal of Immunological Methods* 109 (1), S. 17–25. DOI: 10.1016/0022-1759(88)90437-1.
- Schöler, H. R.; Ruppert, S.; Suzuki, N.; Chowdhury, K.; Gruss, P. (1990): New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. In: *Nature* 344 (6265), S. 435–439. DOI: 10.1038/344435a0.
- Schuettengruber, Bernd; Bourbon, Henri-Marc; Di Croce, Luciano; Cavalli, Giacomo (2017): Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. In: *Cell* 171 (1), S. 34–57. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.002.
- Schwabe, Daniel; Formichetti, Sara; Junker, Jan Philipp; Falcke, Martin; Rajewsky, Nikolaus (2020): The transcriptome dynamics of single cells during the cell cycle. In: *Molecular systems biology* 16 (11), e9946. DOI: 10.15252/msb.20209946.
- Shao, Z.; Raible, F.; Mollaaghababa, R.; Guyon, J. R.; Wu, C. T.; Bender, W.; Kingston, R. E. (1999): Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. In: *Cell* 98 (1), S. 37–46. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80604-2.
- Sheik Mohamed, Jameelah; Gaughwin, Philip Michael; Lim, Bing; Robson, Paul; Lipovich, Leonard (2010): Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. In: *RNA* 16 (2), S. 324–337. DOI: 10.1261/rna.1441510.

- Shiio, Yuzuru; Eisenman, Robert N. (2003): Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23), S. 13225–13230. DOI: 10.1073/pnas.1735528100.
- Silva, Jose; Nichols, Jennifer; Theunissen, Thorold W.; Guo, Ge; van Oosten, Anouk L.; Barrandon, Ornella et al. (2009): Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. In: *Cell* 138 (4), S. 722–737. DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.039.
- Simon, Marek; North, Justin A.; Shimko, John C.; Forties, Robert A.; Ferdinand, Michelle B.; Manohar, Mridula et al. (2011): Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (31), S. 12711–12716. DOI: 10.1073/pnas.1106264108.
- Şişli, Hatice Burcu; Şenkal, Selinay; Sağraç, Derya; Hayal, Taha Bartu; Doğan, Ayşegül (2021): Feeder-Dependent/Independent Mouse Embryonic Stem Cell Culture Protocol. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. DOI: 10.1007/7651_2021_402.
- Soufi, Abdenour; Dalton, Stephen (2016): Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. In: *Development (Cambridge, England)* 143 (23), S. 4301–4311. DOI: 10.1242/dev.142075.
- Stead, Elaine; White, Josephine; Faast, Renate; Conn, Simon; Goldstone, Sherilyn; Rathjen, Joy et al. (2002): Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. In: *Oncogene* 21 (54), S. 8320–8333. DOI: 10.1038/sj.onc.1206015.
- Stielow, Bastian; Finkernagel, Florian; Stiewe, Thorsten; Nist, Andrea; Suske, Guntram (2018): MGA, L3MBTL2 and E2F6 determine genomic binding of the non-canonical Polycomb repressive complex PRC1.6. In: *PLoS genetics* 14 (1), e1007193. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007193.
- Stielow, Christina; Stielow, Bastian; Finkernagel, Florian; Scharfe, Maren; Jarek, Michael; Suske, Guntram (2014): SUMOylation of the polycomb group protein L3MBTL2 facilitates repression of its target genes. In: *Nucleic Acids Research* 42 (5), S. 3044–3058. DOI: 10.1093/nar/gkt1317.
- Subramanian, Vidya; Klattenhoff, Carla A.; Boyer, Laurie A. (2009): Screening for novel regulators of embryonic stem cell identity. In: *Cell stem cell* 4 (5), S. 377–378. DOI: 10.1016/j.stem.2009.04.006.

- Sun, Jin; Wang, Jian; He, Lin; Lin, Yi; Wu, Ji (2015): Knockdown of polycomb-group RING finger 6 modulates mouse male germ cell differentiation in vitro. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 35 (1), S. 339–352. DOI: 10.1159/000369700.
- Szulwach, Keith E.; Jin, Peng (2014): Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36 (1), S. 107–117. DOI: 10.1002/bies.201300090.
- Talbert, Paul B.; Ahmad, Kami; Almouzni, Geneviève; Ausió, Juan; Berger, Frederic; Bhalla, Prem L. et al. (2012): A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. In: *Epigenetics & chromatin* 5, S. 7. DOI: 10.1186/1756-8935-5-7.
- Tatsumi, Daiki; Hayashi, Yohei; Endo, Mai; Kobayashi, Hisato; Yoshioka, Takumi; Kiso, Kohei et al. (2018): DNMTs and SETDB1 function as co-repressors in MAX-mediated repression of germ cell-related genes in mouse embryonic stem cells. In: *PloS one* 13 (11), e0205969. DOI: 10.1371/journal.pone.0205969.
- Thornton, Seraphim R.; Butty, Vincent L.; Levine, Stuart S.; Boyer, Laurie A. (2014): Polycomb Repressive Complex 2 regulates lineage fidelity during embryonic stem cell differentiation. In: *PloS one* 9 (10), e110498. DOI: 10.1371/journal.pone.0110498.
- Tie, F.; Furuyama, T.; Prasad-Sinha, J.; Jane, E.; Harte, P. J. (2001): The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. In: *Development (Cambridge, England)* 128 (2), S. 275–286.
- Tomioka, Mizuho; Nishimoto, Masazumi; Miyagi, Satoru; Katayanagi, Tomoko; Fukui, Nobutaka; Niwa, Hitoshi et al. (2002): Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. In: *Nucleic Acids Research* 30 (14), S. 3202–3213. DOI: 10.1093/nar/gkf435.
- Trojer, Patrick; Cao, Alina R.; Gao, Zhonghua; Li, Yan; Zhang, Jin; Xu, Xiaoqin et al. (2011): L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. In: *Molecular cell* 42 (4), S. 438–450. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.04.004.

- Uphoff, Cord C.; Drexler, Hans G. (2011): Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 731, S. 93–103. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5_8.
- Uphoff, Cord C.; Drexler, Hans G. (2014): Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. In: *Current protocols in molecular biology* 106, 28.4.1-14. DOI: 10.1002/0471142727.mb2804s106.
- van den Boom, Vincent; Maat, Henny; Geugien, Marjan; Rodríguez López, Aida; Sotoca, Ana M.; Jaques, Jennifer et al. (2016): Non-canonical PRC1.1 Targets Active Genes Independent of H3K27me3 and Is Essential for Leukemogenesis. In: *Cell reports* 14 (2), S. 332–346. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.034.
- Velasco, Guillaume; Hubé, Florent; Rollin, Jérôme; Neuillet, Damien; Philippe, Cathy; Bouzinba-Segard, Haniaa et al. (2010): Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (20), S. 9281–9286. DOI: 10.1073/pnas.1000473107.
- Vizán, Pedro; Beringer, Malte; Ballaré, Cecilia; Di Croce, Luciano (2015): Role of PRC2-associated factors in stem cells and disease. In: *The FEBS journal* 282 (9), S. 1723–1735. DOI: 10.1111/febs.13083.
- Weake, Vikki M.; Workman, Jerry L. (2008): Histone ubiquitination: triggering gene activity. In: *Molecular cell* 29 (6), S. 653–663. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.02.014.
- Weintraub, H.; Groudine, M. (1976): Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. In: *Science (New York, N.Y.)* 193 (4256), S. 848–856. DOI: 10.1126/science.948749.
- Whitcomb, Sarah J.; Basu, Amrita; Allis, C. David; Bernstein, Emily (2007): Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. In: *Trends in genetics : TIG* 23 (10), S. 494–502. DOI: 10.1016/j.tig.2007.08.006.
- White, Josephine; Stead, Elaine; Faast, Renate; Conn, Simon; Cartwright, Peter; Dalton, Stephen (2005): Developmental Activation of the Rb–E2F Pathway and Establishment of Cell Cycle-regulated Cyclin-dependent Kinase Activity during Embryonic Stem Cell Differentiation. In: *Molecular Biology of the Cell* 16 (4), S. 2018–2027. DOI: 10.1091/mbc.E04-12-1056.

- Whyte, Warren A.; Orlando, David A.; Hnisz, Denes; Abraham, Brian J.; Lin, Charles Y.; Kagey, Michael H. et al. (2013): Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. In: *Cell* 153 (2), S. 307–319. DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.035.
- Winner, F.; Rosengarten, R.; Citti, C. (2000): In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. In: *Infection and immunity* 68 (7), S. 4238–4244. DOI: 10.1128/iai.68.7.4238-4244.2000.
- Wit, Elzo de; Bouwman, Britta A. M.; Zhu, Yun; Klous, Petra; Splinter, Erik; Verstegen, Marjon J. A. M. et al. (2013): The pluripotent genome in three dimensions is shaped around pluripotency factors. In: *Nature* 501 (7466), S. 227–231. DOI: 10.1038/nature12420.
- Wu, C. T.; Jones, R. S.; Lasko, P. F.; Gelbart, W. M. (1989): Homeosis and the interaction of zeste and white in *Drosophila*. In: *Molecular & general genetics : MGG* 218 (3), S. 559–564. DOI: 10.1007/BF00332424.
- Wu, Qianmei; Fujii, Takeru; Harada, Akihito; Tomimatsu, Kosuke; Miyawaki-Kuwakado, Atsuko; Fujita, Masatoshi et al. (2021): Genome-wide analysis of chromatin structure changes upon MyoD binding in proliferative myoblasts during the cell cycle. In: *Journal of biochemistry*. DOI: 10.1093/jb/mvab001.
- Xu, Jian; Shao, Zhen; Li, Dan; Xie, Huafeng; Kim, Woojin; Huang, Jialiang et al. (2015): Developmental control of polycomb subunit composition by GATA factors mediates a switch to non-canonical functions. In: *Molecular cell* 57 (2), S. 304–316. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.009.
- Yamaguchi, Shinpei; Kimura, Hironobu; Tada, Masako; Nakatsuji, Norio; Tada, Takashi (2005): Nanog expression in mouse germ cell development. In: *Gene expression patterns : GEP* 5 (5), S. 639–646. DOI: 10.1016/j.modgep.2005.03.001.
- Yang, Chao-Shun; Chang, Kung-Yen; Dang, Jason; Rana, Tariq M. (2016): Polycomb Group Protein Pcgf6 Acts as a Master Regulator to Maintain Embryonic Stem Cell Identity. In: *Scientific reports* 6, S. 26899. DOI: 10.1038/srep26899.
- Yeom, Y. I.; Fuhrmann, G.; Ovitt, C. E.; Brehm, A.; Ohbo, K.; Gross, M. et al. (1996): Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. In: *Development (Cambridge, England)* 122 (3), S. 881–894.

- Yuan, H.; Corbi, N.; Basilico, C.; Dailey, L. (1995): Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. In: *Genes & development* 9 (21), S. 2635–2645. DOI: 10.1101/gad.9.21.2635.
- Yuan, Jingsong; Adamski, Rachel; Chen, Junjie (2010): Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. In: *FEBS letters* 584 (17), S. 3717–3724. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.05.021.
- Zaveri, Lamuk; Dhawan, Jyotsna (2018): Cycling to Meet Fate: Connecting Pluripotency to the Cell Cycle. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 6, S. 57. DOI: 10.3389/fcell.2018.00057.
- Zdzieblo, D.; Li, X.; Lin, Q.; Zenke, M.; Illich, D. J.; Becker, M.; Müller, A. M. (2014): Pcgf6, a polycomb group protein, regulates mesodermal lineage differentiation in murine ESCs and functions in iPS reprogramming. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (12), S. 3112–3125. DOI: 10.1002/stem.1826.
- Zeevaert, Kira; Elsafi Mabrouk, Mohamed H.; Wagner, Wolfgang; Goetzke, Roman (2020): Cell Mechanics in Embryoid Bodies. In: *Cells* 9 (10). DOI: 10.3390/cells9102270.
- Zhao, Wukui; Tong, Huan; Huang, Yikai; Yan, Yun; Teng, Huajian; Xia, Yin et al. (2017): Essential Role for Polycomb Group Protein Pcgf6 in Embryonic Stem Cell Maintenance and a Noncanonical Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) Integrity. In: *The Journal of Biological Chemistry* 292 (7), S. 2773–2784. DOI: 10.1074/jbc.M116.763961.

7. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Darstellung der FACS-Analyse in einem Dot-Plot Diagramm (SSC vs. FSC) zur Separierung der vitalen Zellen von Zelltrümmern und Zelldubletten (Gate)..... 32
- Abb. 2: Exemplarische Darstellung der FACS-Analysen synchronisierter mESC- (A) und EB-Kulturen (B) des Wt in einem Histogramm. Die Phasenverteilung des Zellzyklus wurde mit Hilfe des Programms ModFit LT™ über das Histogramm modelliert 33
- Abb. 3: Exemplarische Darstellung der FACS-Analysen in FlowJo (LCC). In mehreren Dot-Plots ist die Verteilung aller vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen von mESC-Kulturen des Wt, Pcgf6_KO#49, E2f6_KO#41 sowie dKO^{Pcgf6/E2f6}#A* und C dargestellt.34
- Abb. 4: Exemplarische Darstellung der FACS-Analysen in FlowJo (LCC) von Zellen, welche mit einem Phospho-Histone H2A.X und Dapi (Zellzyklus) gefärbt wurden. Zur Auswertung wurden Zellen verwendet, die jeweils einfach gefärbt wurden (APC-Cy7 oder Dapi) sowie eine Positivkontrolle (Zellen mit 20 Gray behandelt). 35
- Abb. 5: mESC- und EB-Kulturen des Pcgf6 KO unterscheiden sich, verglichen mit dem Wt in der mESC-Koloniebildung, einer geringeren CPD und kleineren EB-Strukturen. (A) Repräsentative Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen von mESC- und EB-Kulturen an Tag 2 (d2) und Tag 4 (d4) der Wt und der Pcgf6_KO#24 und #54 Zelllinien. Gezeigter Vergrößerungsausschnitt der mESC-Kulturen 4-fach, EB-Kulturen 2-fach. Weiße Pfeile zeigen einzelne, unregelmäßig geformte Kolonien an der Basis. (B) Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplung (CPD) von Wt und Pcgf6_KO#24 und #54 mESC-Kulturen (n=2). (C) Quantifizierung der Zellzahl von EB-Suspensionskulturen (d2 und d4) des Wt und der Pcgf6_KO#24 und #54 Zelllinien. Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. (D) Bestimmung der Fläche der EBs d2 und d4 in Hanging Drop Kulturen (je 2000 Zellen/ 30 μ l Medium) (n=1, Standardabweichung stammt von der Fläche der Anzahl ausgewerteter EBs)..... 46
- Abb. 6: Pcgf6_KO#24 mESC und EB-Kulturen (d2 und d4) haben einen erhöhten Anteil an Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus. Gezeigt ist die Frequenz in % der Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus für mESC und EB-Kulturen (d2; d4) des Pcgf6_KO#24 und Wt. Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. Die Auswertung erfolgte mittels ModFitLT™ (Verify Software House)..... 47
- Abb. 7: mESC- und EB-Kulturen synchronisierter Pcgf6_KO#24 zeigen einen regulatorischen Defekt im Übergang von G2/M- in die G0/G1-Phase. (A) Schematische Darstellung der Synchronisierung von mESCs; nach Synchronisierung wurden die Zellen entweder in

- mESC- oder EB-Medium kultiviert. (B) Grafische Darstellung der Frequenz der Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus in der mESC- und EB-Kultur von Pcgf6_KO#24 und Wt nach Synchronisierung (ESCs: n=2); Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. Die Auswertung erfolgte mittels ModFitLT™ (Verify Software House). 49
- Abb. 8: Analyse der Apoptose in mESC- und EB-Kulturen des Wt, Pcgf6 KO (#24 und #54). Darstellung der prozentualen Auswertung aller apoptotischen (früh- und spätapoptotisch) Zellen in einem Säulendiagramm-für mESC und EB-Kulturen (d2/d4) des Pcgf6_KO#24 und #54 und Wt, in der EB-Kultur zusätzlich noch Pcgf6_KO#24-FL. 50
- Abb. 9: Kein Unterschied in positiven γ H2A.X-Foci in Pcgf6_KO#24 verglichen mit dem Wt in EB-Kulturen (d2). Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit 20 Gray bestrahlt wurden (orangene Säule). Die Frequenz positiver γ H2A.X-Foci ist durch die schwarzen Säulen dargestellt (n=1). Standardabweichungen stammt von mehreren Proben der gleichen Behandlung. 51
- Abb. 10: Analyse der RNASeq-Daten. (A) Genexpressionsmuster von Wt, Pcgf6_KO#24 und #54, Ring1A/B_KO mESC- und EB-Kulturen sowie von Pcgf6_KO#24-FL mESC-Kulturen. (B) PCA von Wt, Pcgf6_KO#24 und 54, Ring1A/B KO sowie von Pcgf6_KO#24-FL mESC- und EB-Kulturen. (C) Venn Diagramm zur Darstellung der gemeinsamen differenziell herunter (500*) bzw. hoch (419**) regulierten Gene zwischen Pcgf6_KO#24 sowie #54 EB-Kulturen (d2) und Wt EB-Kulturen (d2). (D) Biologische Prozesse (GO Enrichment Analyses) der differenziell herunter (*) und hoch (**) regulierten Gene in Pcgf6 KO EB-Kulturen (d2) und Wt EB-Kulturen (d2). Beispiele Zellzyklus-assoziierter Prozesse sind rot umrandet (herunter regulierte) während Beispiele Differenzierungs-assoziierter Prozesse (hoch reguliert) grün umrandet sind. ($p\text{-value} \leq 0,001$) 54
- Abb. 11: E2f-abhängige Genregulation in mESC- und EB-Kulturen des Wt und Pcgf6 KO (#24). (A) Grafische Darstellung der globalen Regulation von E2f6 und E2f-abhängigen Zielgene in mESC- und EB-Kulturen an Tag 2 und 4 (RNASeq Daten; unpublished). (B) Promotorbindeanalysen von Pcgf6 an E2f6 in mESCs (Daten aus Scelfo et al., 2019)..... 56
- Abb. 12: Darstellung der Ergebnisse einer Mykoplasmen-PCR mit leichter Kontamination der mESC Kulturen. (2.-4. Reihe). 1. Reihe Marker (Gene Ruler 1kb DNA Ladder Thermo Scientific), 2. Reihe R1 WT mESCs, 3. Reihe: Pcgf6_KO#24 mESCs, 4. Reihe: Pcgf6_KO#54 mESCs, 5. Reihe: leer, 6. Reihe: Positivkontrolle, 7. Reihe: Negativkontrolle.

Zellen mit einer Kontamination weisen eine Bande bei 500 bp auf (siehe Positivkontrolle)
 57

Abb. 13: Generierung des E2f6_KO und dKO^{PcGF6/E2f6} basierend auf dem Crispr/Cas9n System.
 (A) Schematische Darstellung der Intron/Exon-Struktur von *E2f6* mit den Bindestellen der guide-RNAs (fett und unterstrichen), Position der PAM-Sequenz (gelb) sowie der putativen Schnittstelle des Cas9n Enzyms (rote Pfeilspitze). (B) Ausgewählte Einzelklone wurden mittels Genotypisierung analysiert. Bandengrößen: Exon 3 Wt Bande bei 513 bp (orange); Exon 4 Wt Bande bei 320 bp (grün); Exon 5 Wt Bande bei 326 bp (blau); Exon3/5 KO Bande bei ca. 610 bp (orange/blau). (C) Die Ermittlung des KO in mESC-Kulturen auf Proteinlevel bestimmt durch Westernblot Analysen. Zum Nachweis wurde ein PCGF6 und E2F6-spezifischer Antikörper verwendet. GAPDH diene als Ladekontrolle. (D) Nachweis der KO in mESC- und EB-Kulturen auf Genexpressionslevel. Die Expression wurde durch zwei Standards (*Gapdh* und *mRps29*) normalisiert. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt; Student'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$ 60

Abb. 14: Zelluläre und molekulare Analyse der PcGF6 und/oder E2f6 KO Zellen in mESC- und EB-Kulturen (A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von mESCs und EBs d2 und d4 des Wt und der des PcGF6_KO#49 und E2f6_KO#41 sowie der dKO^{PcGF6/E2f6}#A* und #C. (B) Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplung (CPD) von Wt und der des PcGF6_KO#49 und E2f6_KO#41 sowie der dKO^{PcGF6/E2f6}#A* und #C ESCs (p=Passage) (n=2). (C) Quantifizierung der absoluten Zellzahlen in Wt und der des PcGF6_KO#49 und E2f6_KO#41 EB sowie der dKO^{PcGF6/E2f6}#A* und #C Suspensionskulturen an d2 und d4 der Differenzierung (n=3). Student'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$ (D) Bestimmung der Fläche der EBs d2 und d4 in Hanging Drop Kulturen (je 2000 Zellen/ 30 μ l Medium) (n=1, Standardabweichung stammt von der Fläche der Anzahl ausgewerteter EBs). (E) Genexpression der Pluripotenzmarker *Sox2*, *Oct4* und *Nanog*. Die Expression wurde durch zwei Standards (*Gapdh*; *mRps29*) normalisiert. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt; Student'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. (F) Genexpression der Keimblatt-spezifischen Marker *Gata4* und *Gata6* (Trophektoderm), *Nestin* und *Pax3* (primitives Endoderm), *Nodal* und *T* (frühes Mesoderm) (n=2, Standardabweichung stammt von der Anzahl der Proben eines Markes der jeweiligen qRT-PCR)..... 66

- Abb. 15: mESC-Kulturen des dKO^{PcGF6/E2f6}#C zeigen eine erhöhte Frequenz an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Statistische Auswertung der FACS Analysen: Der prozentuale Anteil der Zellen in G1, S und G2/M Phase des Zellzyklus zwischen undifferenzierten mESC- und EB-Kulturen (d2 und d4) der Differenzierung. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren ‚standard error of means (SEM)‘ bestimmt; Student ‚scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$ 68
- Abb. 16: Erhöhte apoptotische Rate der PcGF6_KO#24 und 49 als auch des dKO#A während der EB-Kultivierung (d2/d4). (A) Repräsentative Auswertung der FACS Analysen mit FlowJo. (B) Prozentuale Auswertung aller apoptotischen (früh- und spätapoptotisch) in einem Box Plotdiagramm für die Tage 1-4 (d2, d4)..... 69
- Abb. 17: Der Knockout von PcGF6 und/oder E2f6 führt zu einer erhöhten Expression keimbahn-spezifischer Gene in mESC und EB-Kulturen. (A) Venn Diagramm zur Darstellung der gemeinsamen differenziell herunter (500*) bzw. hoch (419**) regulierten Gene zwischen PcGF6_KO#24 sowie #54 und Wt mESC-Kulturen. (B) Biologische Prozesse (GO Enrichment Analyses) der differenziell herunter (*) und hoch (**) regulierten Gene in PcGF6 KO und Wt mESC-Kulturen. Beispiele Keimbahngen-assoziiierter Prozesse sind grün umrandet (hoch-regulierte) (p -value $\leq 0,005$). (C) Genexpression der Gene *Tex13* und *Dazl* in Anlehnung an die Zdzieblo et al., 2014 Publikation. (D) Genexpression von *PcGF6* und *E2f6* Keimbahngene ausgewählt aus Dahlet et al, 2021 und Qin et al, 2021. (E) Expressionslevel von E2F6-Zellzyklusgenen. Die Expression wurde durch zwei Standards (*Gapdh*; *mRps29*) normalisiert. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren ‚standard error of means (SEM)‘ bestimmt; Student ‚scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$ 74
- Abb. 18: Generierung des PcGF6_KO basierend auf dem CRISPR/Cas9n Systems (Daten erstellt durch AG Müller). (A) Schematische Darstellung der Intron/Exon-Struktur von PcGF6 mit den Bindestellen der guide-RNAs (fett und unterstrichen), Position der PAM-Sequenz (gelb) sowie der putativen Schnittstelle des Cas9n-Enzyms (rote Pfeilspitze) (B) Genotypisierung der PcGF6_KO#24 und #54 Einzelklone, sowie eines Klons, indem die PcGF6-Proteinexpression durch ein PcGF6-tragendes Plasmid wiederhergestellt wurde (PcGF6-KO#24 HAPCGF6) als auch ein Ring1b KO Klon in mESC und EB-Kulturen. (C) Quantifizierung der Proteinexpressionslevel (ImageJ) von PcGF6 in mESC und EB Kulturen von PcGF6_KO#24 HAPCGF6 und Ring1b KO..... 89

- Abb. 19: Off-Target Analysen der *Pcgf6*_KO#22 und 49 Klone. (A) Schematische Darstellung des *Pcgf6* Lokus den sgRNA Sequenzen und den vorhergesagten Schnittstellen (rote Pfeile). (B) Sequenzen der ersten 4 Off-Targets der jeweiligen sgRNA (Cut-Off Wert: max. 4 Mismatches). (C) Analyse der Off-Target PRC in einem Agarosegel 90
- Abb. 20: Off-Target Analysen der *E2f6*_KO#13 und #41 Klone. (A) Schematische Darstellung des *Pcgf6* Lokus den sgRNA Sequenzen und den vorhergesagten Schnittstellen (rote Pfeile). (B) Sequenzen der ersten 4 Off-Targets der jeweiligen sgRNA (Cut-Off Wert: max. 4 Mismatches). (C) Analyse der Off-Target PRC in einem Agarosegel 91
- Abb. 21: GO-Enrichment Analysen differenziell regulierter Gene zwischen Wt und *Pcgf6* KO EB-Kulturen (d4). (A) Venn Diagramm zur Darstellung der gemeinsamen differenziell herunter (500*) bzw. hoch (419**) regulierten Gene zwischen *Pcgf6*_KO#24 sowie #54 und Wt EB-Kulturen (d2). (B) Biologische Prozesse (GO Enrichment Analyses) der differenziell herunter (*) und hoch (**) regulierten Gene in *Pcgf6* KO und Wt EB-Kulturen (d4). (hochreguliert: $p\text{-value} \leq 0,05$; runterreguliert: $p\text{-value} \leq 0,005$)..... 92
- Abb. 22: GO-Enrichment Analysen differenziell regulierter Gene zwischen *Pcgf6* KO mESC-Kulturen aus Dahlet et al. 2021 und Liu et al. 2020. (A) Venn Diagramm zur Darstellung der gemeinsamen differenziell hochregulierten Gene (51*) beider Publikationen. (B) Biologische Prozesse (GO Enrichment Analyses) der differenziell hochregulierten Gene (*) beider *Pcgf6* KO mESCs (hochreguliert: $p\text{-value} \leq 0,05$)..... 93
- Abb. 23: Charakterisierung von *Pcgf6*_KO#22 und *E2f6*_KO#13 (A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von ESCs und EBs d2 und d4 des Wt und der des *Pcgf6*_KO#22 und *E2f6*_KO#13. (B) Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplung (CPD) von Wt und der des *Pcgf6*_KO#22 und *E2f6*_KO#13 mESCs (p =Passage) ($n=2$). (C) Quantifizierung der Zellzahlen in Wt und der des *Pcgf6*_KO#22 und *E2f6*_KO#13 EB-Suspensionskulturen an d2 und d4 der Differenzierung ($n=3$). Student 'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$ (D) Bestimmung der Fläche der EBs d2 und d4 in Hanging Drop Kulturen (je 2000 Zellen/ 30 μ l Medium) ($n=1$, Standardabweichung stammt von der Fläche der Anzahl ausgewerteter EBs). (E) Genexpression der Pluripotenzmarker Sox2, Oct4 und Nanog. (F) Genexpression der Keimblatt-spezifischen Marker Gata4 und Gata6 (Trophektoderm), Nestin und Pax3 (primitives Endoderm), Nodal und T (frühes Mesoderm) (Standardabweichung stammt von der Anzahl der Proben eines Markes der jeweiligen qRT-PCR). Die Expression wurde durch zwei Standards (Gapdh mRps29)

normalisiert. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt (n=2).....	95
Abb. 24: Zellzyklusverteilung (Frequenz) von Pcgf6_KO#22 und E2f6_KO#13 in mESC- und EB-Kulturen. Statistische Auswertung der FACS Analysen: Der prozentuale Anteil der Zellen in G1, S und G2/M Phase des Zellzyklus zwischen undifferenzierten mESC- und EB-Kulturen (d2 und d4) der Differenzierung. Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. Student'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$	96
Abb. 25: Apoptotische Frequenz von Pcgf6#22 und E2f6#13 mESC- und EB-Kulturen (d2/d4). Prozentuale Auswertung aller apoptotischen (früh- und spätapoptotisch) in einem Box Plotdiagramm für die Tage 1-4 (d2, d4).	96
Abb. 26: Genexpressionsanalysen von Keimblattgenen und Zellzyklusgenen in Pcgf6_KO#22 und E2f6_KO#13 mESC- und EB-Kulturen (d2) (A) Genexpression der Gene Tex13 und Dazl in Anlehnung an die Zdzieblo et al., 2014 Publikation. (B) Genexpression von Pcgf6 und E2f6 Keimbahngene ausgewählt aus Dahlet et al, 2021 und Qin et al, 2021. Der Standardfehler wurde durch das Verfahren „standard error of means (SEM)“ bestimmt; Student'scher t-test (2-seitig) *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. (C) Expressionslevel von E2f6-Zellzyklusgenen. Die Expression wurde durch zwei Standards (Gapdh mRps29) normalisiert (n=2).....	98

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bioinformatische Analyse der RNASeq Daten auf das Vorhandensein von Gensequenzen von Mykoplasmen. Dargestellt ist die Anzahl der Reads, die dem Mausgenom zugeordnet werden konnten.	57
---	----

9. Abkürzungsverzeichnis

ADP.....	Adenosindiphosphat
AEBP.....	Adipocyte Enhancer-Binding Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CBX.....	Chromobox
CCC	CRISPR Cas Clone
Cdc	Cell Division Cycle
CDK	Cycline Dependent Kinase
ChIP.....	Chromatin-Immunpräzipitation
CPD.....	Cumulated Population Doubling - Kumulative Populationsverdopplung
CRISPR.....	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Dazl	Deleted in Azoospermia Like
DDR	DNA Damage Response
Ddx	DEAD-Box Helicase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT.....	DNA Methyltransferase
DSB.....	Doppelstrangbrüche
E(z).....	Enhancer of zeste
EB.....	Embryoid Body - Embryonische Körperchen
ECM	Extra Cellular Matrix - Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EED.....	Embryonic Endodermal Development
ESC.....	Embryonic Stem Cells - Embryonale Stammzellen
EZH1/2.....	Enhancer of Zeste Homolog 1/2
FACS.....	Fluorescence-Activated Cell Sorting - Durchflusszytometrie
FCS.....	Fetal Calf Serum

GAPDH.....	Glycerin-Dealdehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GO.....	Gene Ontology
Gpat.....	Glycerin-3-phosphate acyltransferase, Glycerin-3-phosphate acyltransferase
HDAC.....	Histone Deacetylase
hESCs.....	humane ESCs
ICM.....	Inner Cell Mass - Innere Zellmasse
JAK.....	Janus Kinase
JARID.....	Jumonji and AT-rich Interaction Domain
KDM2B.....	Lysine Demethylase 2B
Kf14.....	Kruppel-like factor 4
KO.....	Knock Out
L3MBTL2.....	L(§)Mbt-Like Protein 2
LB.....	Lysogeny Broth
Lefty2.....	Left-right determination factor 2
LIF.....	Leukemia Inhibitory Factor
lncRNA.....	long non-coding RNA
MaeI.....	Mitochondrial malic enzyme 1
MAX.....	Myc Associated Factor X
mESC.....	murine ESC
MGA.....	MAX Gene Associated Protein
MTF2.....	Metal Response Element Binding Transcription Factor 2
PAM.....	Proto-spacer Adjacent Motif
Pax.....	Paired box
PBS.....	Phosphate Buffered Saline - Phosphatgepufferte Salzlösung
PcG.....	Polycomb Group
PCGF.....	Polycomb Group Factor
Pcl.....	Polycomb-like
Pcna.....	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR.....	Polymerase Chain Reaction - Polymerasekettenreaktion
PHC.....	Polyhomeotic-Like Protein
PHF1.....	PHD Finger Protein 1
PHF19.....	PHD Finger Protein 19
PI.....	Propodiumiodid

POU	Pit-Oc-Unc
Pou5f1	POU class 5 homeobox 1 pseudogene 5
PRC1	Polycomb-Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb-Repressive Complex 2
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RBBP	Retinoblastoma-Binding Protein
Ring1A/B	Ring finger protein 1A/B
RNA	Ribonucleinacid - Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
RYBP	Ring1 and YY1 Binding Protein
Scm	Sex comb on midleg
SCMH1/2	Sex Comb on Midleg Homolog 1/2
scRNA	single cell RNA
sgRNA	single-guide RNA
Slc25a31	Salute carrier family 25 member 31
SOB	Super Optimal Broth
Sox2	Sex determining region Y (SRY)- box 2
SSEA1	Stage-Specific Embryonic Antigen-1
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
Su(z)12	Supressor of zeste 12
SUZ12	Supressor of Zeste 12
TBE	TRIS-Borat EDTA-Puffer
Tdgf1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
Tex	Testis Expressed
Tgf- β	Transforming growth factor beta
TrxG	Trithorax Group
TSS	Transcriptional Start Site
Tuba3a	Tubuline alpha 3a
Wt	Wildtyp
YAF	YY1 Associated Factor

10. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Albrecht Müller, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe zu beginnen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler und Herrn Prof. Dr. Christian Janzen für die Übernahme der Begutachtung und Betreuung.

Mein besonderer Dank geht an PD. Dr. Matthias Becker für die direkte Betreuung im Labor und die stets gute und hilfreiche Diskussion dieses Projektes.

Des Weiteren danke ich Olga Frank, ohne die ich viele der entstandenen Ergebnisse nicht hätte erstellen können.

Mein herzlicher Dank geht zu dem an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Becker (ex. Müller), die mich auf meinem Weg begleitet haben.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie, die niemals daran gezweifelt hat, dass ich diese Arbeit zu Ende bringe und mir immer den Rücken freigehalten hat.

11. Eidesstattliche Erklärung

nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation “Rolle der Polycomb Faktoren PCGF6 und E2F6 in undifferenzierten und differenzierenden embryonalen Stammzellen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.