

**Das *Polycomb group* Protein PCGF6
ist ein neuer und essentieller Faktor der iPS Reprogrammierung
und kann in Kombination mit Oct4, Klf4 und c-Myc
den Transkriptionsfaktor Sox2 ersetzen**



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

Master of Science in Molecular Biosciences

Daniela Zdzieblo

aus Haßfurt

Würzburg, Oktober 2014



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter: Prof. Dr. Albrecht M. Müller

Zweitgutachter: PD Dr. Robert Hock

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für meine Familie

Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.

Marie Curie, 1867 - 1934

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	11
2. Summary	13
3. Einleitung	15
3.1 Definition und Klassifizierung von Stammzellen	15
3.2 Embryonale Stammzellen	16
3.2.1 Regulation der Pluripotenz muriner ESCs durch Oct4, Sox2 und Nanog	17
3.2.2 Chromatin in murinen ESCs und epigenetische Regulation der Pluripotenz	18
3.3 <i>Polycomb group</i> (PcG) Proteine	19
3.3.1 Proteinzusammensetzung und molekularer Mechanismus kanonischer und nicht-kanonischer PRC1 und PRC2 Komplexe	20
3.3.2 Mechanismen kanonischer und nicht-kanonischer PRC Komplexe	23
3.3.3 PcG Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Pluripotenz muriner ESCs und während der Entwicklung	23
3.3.4 Stammzell-spezifische Funktionen einzelner Pcgf Paraloge	24
3.4 Induzierte Pluripotenz	25
3.4.1 Die Phasen der iPS Reprogrammierung und Funktionen der OSKM Faktoren	26
3.4.2 Epigenetische Veränderungen und Chromatin-modifizierende Faktoren in der iPS Reprogrammierung: ein Überblick	28
3.4.3 Die „Yamanaka“ Faktoren OSKM können durch Pluripotenz- und Differenzierungs-spezifische als auch epigenetische Faktoren ersetzt werden	29
3.5 Ziel dieser Arbeit	31
4. Materialien und Methoden	32
4.1 Materialien	32
4.1.1 Generelle Reagenzien und Chemikalien	32
4.1.2 Puffer und Lösungen	33
4.1.3 Zelllinien	34
4.1.4 Zellkulturmedien	35
4.1.5 Zellkulturplastik	36
4.1.6 Plasmide	37
4.1.7 Pcgf6-spezifische shRNA Sequenz	37
4.1.8 Enzyme	37

4.1.9 Primer	38
4.1.10 Kommerzielle Kits	39
4.1.11 Erstantikörper.....	39
4.1.12 Zweitantikörper	39
4.1.13 Mauslinien.....	39
4.1.14 Geräte und Mikroskope.....	40
4.1.15 Software.....	40
4.2 Methoden	41
4.2.1 Zellkulturbedingungen.....	41
4.2.1.2 Passagieren von Zellen.....	41
4.2.1.3 Einfrieren von Zellen	42
4.2.1.4 Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten (MEF).....	42
4.2.1.5 Isolation von MEFs.....	42
4.2.1.6 MEF-Inaktivierung zur Herstellung von <i>Feeder</i> -layer-Kulturen	43
4.2.1.7 ESC- und iPS Zell-Kultur.....	43
4.2.1.8 Herstellung <i>Feeder</i> -freier ESC- und iPS Zell-Lösungen	43
4.1.2.9 <i>Embryoid body</i> (EB) Differenzierung von ESCs und iPS Zellen	44
4.2.1.10 iPS Reprogrammierung.....	44
4.2.1.10.1 Phoenix-eco Zell-Kultur.....	44
4.2.1.10.2 Herstellung retroviraler Überstände	44
4.2.1.10.3 Retrovirale Transduktion von OG2 MEFs	45
4.2.1.11 Herstellung lentiviraler Überstände	46
4.2.1.11.1 HEK293T Zellkultur	46
4.2.1.11.2 Transfektion der HEK293T Zellen.....	46
4.2.1.11.3 Lentivirale Transduktion von OG2 MEFs	47
4.2.2. Molekularbiologische Methoden	48
4.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Hitzeschocktransformation	48
4.2.2.2 Hitzeschocktransformation der kompetenten Bakterien.....	48
4.2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA im Mini- und Maxi-Präparations-Format.....	48
4.2.2.4 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	49
4.2.2.5 Agarosegelelektrophorese	49
4.2.2.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
4.2.2.7 Generierung von <i>Blunt-ends</i> und De-Phosphorylierung von Vektor-DNA	49
4.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	50
4.2.2.9 Klonierung des pMXs-mPcgf6 Plasmid-DNA Vektors.....	50
4.2.2.10 RNA Isolation	50
4.2.2.11 cDNA Synthese.....	51

4.2.2.12	Quantitative <i>Real-time</i> (qRT)-PCR.....	52
4.2.2.13	Isolation genomischer DNA aus Mausohr-Biopsien.....	52
4.2.2.14	Genotypisierung von Mäusen	53
4.2.2.15	RT-PCR Analyse der Scr und <i>Pcgf6</i> KD iPS Kolonien	54
4.2.3.	Alkaline Phosphatase Färbung	54
4.2.4	Immunologische Methoden.....	55
4.2.4.1	Immunofluoreszenz Färbungen	55
4.2.4.2	FACS Analysen.....	55
4.2.4.2.1	Zelloberflächen Färbungen	55
4.2.4.2.2	FACS Analyse der <i>Oct4-eGFP</i> Transgenexpression.....	56
4.2.4.2.3	Zellzyklusanalyse	56
4.2.5	Histologische Methoden.....	56
4.2.5.1	Herstellung von Kryoschnitten	56
4.2.5.2	Hämatoxylin – Eosin (H&E) Färbung	56
4.2.6	Mausarbeiten	57
4.2.6.1	Induktion von Teratomen	57
4.2.6.2	Injektion von iPS Zellen in Blastozysten	57
4.2.7	Statistische Analysen.....	57
5.	Ergebnisse	58
5.1	<i>Pcgf6</i> zeigt eine erhöhte Genexpression in induzierten pluripotenten Stammzellen	58
5.2	Die <i>Pcgf6</i> Expression wird im Verlauf der iPS Reprogrammierung re-aktiviert	60
5.3	<i>Pcgf6</i> kann Sox2 in der iPS Reprogrammierung ersetzen	63
5.4	Die OSKM und OPKM Reprogrammierung führt gleichermaßen zur Aktivierung der Pluripotenzgene <i>Oct4</i> , <i>Sox2</i> und <i>Nanog</i>	66
5.5	OPKM iPS Zelllinien sind pluripotent	67
5.6	<i>Pcgf6</i> ist kein <i>Enhancer</i> -Faktor der iPS Reprogrammierung	77
5.7	<i>Pcgf6</i> ist ein essentieller Faktor der OSKM Reprogrammierung	78
5.8	Die OSKM Reprogrammierung von <i>Pcgf6</i> KD MEFs resultiert in mehr partiell- als voll-reprogrammierten iPS Kolonien.....	81
6.	Diskussion	83
6.1	<i>Pcgf6</i> Expression in ESCs und iPS Zellen.....	83
6.2	<i>Pcgf6</i> Expression im Verlauf der iPS Reprogrammierung	84

6.3 Pcgf6 ist ein neuer Faktor der murinen iPS Reprogrammierung, der spezifisch Sox2 ersetzen kann	87
6.4 Pcgf6 und Pcgf4 haben vermutlich unterschiedliche Funktionen	87
6.5 Pcgf6 ist ein essentieller Faktor der murinen iPS Reprogrammierung	88
6.6 Pcgf6 ist wichtig für den Aufbau und die Stabilisierung der Pluripotenz	89
6.7 Gemeinsamkeiten der Pcgf6 und Sox2 Funktion.....	90
6.8 Zusammenfassung	91
7. Abkürzungsverzeichnis	94
8. Literaturverzeichnis	99
9. Danksagung.....	110
10. Eidesstattliche Erklärung	111
11. Publikationsliste.....	112

1. Zusammenfassung

Embryonale Stammzellen (ESCs) sind durch zwei charakteristische Eigenschaften definiert. Neben einer kontinuierlichen Selbsterneuerungskapazität weisen ESCs die Fähigkeit auf, in alle Zelltypen der drei Keimblätter differenzieren zu können. Diese Eigenschaften werden unter anderem durch ein Netzwerk wichtiger Pluripotenzfaktoren als auch durch epigenetische Mechanismen reguliert, welche die Transkription von Pluripotenz- und Differenzierungsgenen kontrollieren.

In murinen ESCs sind an der Repression von Differenzierungsgenen auch *Polycomb group* (PcG) Proteine beteiligt. Diese Proteine bauen zwei Chromatin-modifizierende Komplexe auf, die als *Polycomb repressive complex 1* bzw. *2* (PRC1 bzw. PRC2) bezeichnet werden. Nach dem klassischen Modell der Polycombfunktion, katalysieren PRC1 und PRC2 gemeinsam zwei charakteristische Histonmodifikationen, die zur Repression PRC-spezifischer Zielgene beitragen. Zahlreiche Studien in den letzten Jahren belegen, dass der Proteinaufbau der PRC1 Komplexe stark variieren kann, wobei die Familie der *Polycomb group RING finger* (Pcgf) Proteine eine wichtige Rolle spielt. In diesem Zusammenhang definieren einzelne Pcgf Paraloge (Pcgf1 – 6) verschiedene PRC1 Varianten (PRC1.1 – 1.6), die komplex-spezifische Bindestellen im Genom aufweisen. Diese Erkenntnisse lassen auf unterschiedliche Mechanismen der PRC1 Varianten und Pcgf Paralog-spezifische Funktionen schließen, die zum jetzigen Zeitpunkt nur wenig erforscht sind.

Für manche Pcgf Paraloge sind wichtige Rollen in verschiedenen Stammzelltypen und während der iPS Reprogrammierung bekannt. Pcgf1 (Nspc1), Pcgf2 (Mel18) und Pcgf4 (Bmi1) zeigen eine Funktion in verschiedenen adulten Stammzellen. Pcgf4 spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der murinen iPS Reprogrammierung. Für Pcgf6 (Mblr) wird eine Pluripotenz-assoziierte Funktion angenommen, denn Pcgf6 ist das einzige Pcgf Paralog, das eine erhöhte Expression in murinen ESCs aufweist, die jedoch im Verlauf der ESC-Differenzierung absinkt. Außerdem zeigen murine *Pcgf6* KD ESCs eine verminderte Expression der Pluripotenzgene *Oct4*, *Sox2* und *Nanog*, eine De-Repression mesodermaler und Testes-spezifischer Gene als auch eine erhöhte Tendenz zur hämatopoetischen Differenzierung. Wie genau Pcgf6 an der Regulation dieser Prozesse in murinen ESCs beteiligt ist, ist nicht bekannt.

In der hier vorliegenden Dissertation wurde die Funktion von Pcgf6 in der murinen iPS Reprogrammierung untersucht. Da bereits für Pcgf4 eine Rolle in der Reprogrammierung somatischer Zellen gezeigt wurde und *Pcgf6* eine erhöhte Expression in ESCs aufweist, wurde auch für Pcgf6 eine Funktion in der iPS Reprogrammierung angenommen. Zunächst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Pcgf6* während der iPS Reprogrammierung verstärkt exprimiert wird und in iPS Zellen eine ESC-ähnliche Expression aufweist. Darüber

hinaus konnte *Pcgf6* in Kombination mit Oct4, Klf4 und c-Myc spezifisch den Transkriptionsfaktor Sox2 in der iPS Reprogrammierung ersetzen. Zudem wurden für OPKM-induzierte iPS Zellen charakteristische Eigenschaften pluripotenter Zellen nachgewiesen. Außerdem konnte eine Rolle von *Pcgf6* als *Enhancer*-Faktor für die iPS Reprogrammierung ausgeschlossen werden, da die Überexpression von *Pcgf6* zusammen mit den *OSKM* Faktoren keine additiven Effekte auf die Reprogrammierungseffizienz erzielte. Im Gegensatz dazu führte der *Knockdown* (KD) von *Pcgf6* in embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) zu verminderten Effizienzen nach *OSKM* Reprogrammierung. Darüber hinaus handelte es sich bei der Mehrheit der AP⁺ Kolonien, die unter *Pcgf6* KD Konditionen entstanden, um partiell-reprogrammierte iPS Zellen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit, dass *Pcgf6* ein neuer und essentieller Faktor der iPS Reprogrammierung ist, der in Kombination mit Oct4, Klf4 und c-Myc spezifisch den Transkriptionsfaktor Sox2 ersetzen kann.

2. Summary

Embryonic stem cells (ESCs) are characterized by their ability for continuous self-renewal maintaining the undifferentiated cell state and their capacity to generate all differentiated cell types of the three germ layers. Regulators of these characteristics include a protein interaction network of pluripotency-specific factors and epigenetic mechanisms that together control the transcription of pluripotency- and differentiation-associated genes.

Among the interaction partners of the pluripotency-specific protein network in murine ESCs are Polycomb group (PcG) proteins. These proteins assemble in two complexes termed Polycomb group repressive complex 1 and 2 (PRC1 and PRC2). In the classical model, PRC1 and PRC2 act hierarchically together in catalyzing two characteristic histone modifications thereby contributing to the repression of PRC-specific target genes like differentiation-associated genes in ESCs. Recently, it has been shown that there are numerous PRC1 variants that differ in their protein composition. In this context, the family of Polycomb group RING finger (PcGf) proteins (PcGf1 – 6) defines distinct PRC1 variants (PRC1.1 – 1.6) that exhibit complex-specific genomic binding sites. Together, this indicates diverse mechanisms of PRC1 variants and PcGf Paralog-specific functions that are not well understood.

PcGf Paralogs are known to play essential roles in various stem cell types and during iPS reprogramming. PcGf1 (Nspc1), PcGf2 (Mel18) and PcGf4 (Bmi1) function in diverse adult stem cells. Further, PcGf4 plays a role in murine iPS Reprogramming. For PcGf6 (Mblr), a pluripotency-associated function is assumed. PcGf6 is the only PcGf paralog with an elevated expression in murine ESCs and when ESCs differentiate *PcGf6* expression decreases. In addition, following *PcGf6* KD in ESCs the expression of *Oct4*, *Sox2* and *Nanog* declines while mesodermal and testes-specific genes become de-repressed. Furthermore, *PcGf6* KD ESCs are more prone for hematopoietic lineage differentiation. The precise mechanisms by which PcGf6 controls these processes in murine ESCs are not known.

In this work, I investigated the function of PcGf6 in murine iPS reprogramming. I assumed a role for PcGf6 in iPS reprogramming because it is highly expressed in ESCs and it was recently shown that PcGf4 plays a role in the reprogramming of somatic cells. The data of my work show that *PcGf6* expression is increased in iPS reprogramming and that *PcGf6* exhibits an ESC-like gene expression pattern in iPS cells. Furthermore, PcGf6 was able to replace the transcription factor Sox2 in combination with Oct4, Klf4 and c-Myc. In addition, OPKM-induced iPS cells showed pluripotency-specific characteristics. The overexpression of *PcGf6* together with the *OSKM* factors did not result in significantly increased reprogramming efficiencies indicating that PcGf6 does not function as an enhancer-factor. However, *PcGf6* knockdown (KD) in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) resulted in decreased efficiencies

after iPS reprogramming. Additionally, the majority of AP⁺ colonies formed after OSKM reprogramming of *Pcgf6* KD MEFs represented partially reprogrammed iPS cells, as they did not exhibit ESC-like morphologies and reduced expression levels of *Oct4*, *Sox2* and *Nanog*. Together, the data of my work show that *Pcgf6* is a new and essential factor in iPS reprogramming that can specifically replace the transcription factor *Sox2* in combination with *Oct4*, *Klf4* and *c-Myc*.

3. Einleitung

3.1 Definition und Klassifizierung von Stammzellen

Stammzellen sind funktional definiert als ein nicht-spezialisierter Zelltyp, der die Fähigkeit zur kontinuierlichen Selbsterneuerung besitzt und spezialisierte Zelltypen generieren kann. Klassifiziert werden Stammzellen entweder nach ihrem Ursprung oder anhand ihrer Funktion (Abb. 1). Nach Ursprung unterscheidet man embryonale und Gewebe-spezifische, fetale oder adulte Stammzellen und funktional unterteilt man Stammzellen anhand ihrer Differenzierungskapazität (Stammzellpotenz) [1-3]. Während die Differenzierungskapazität mit fortschreitender Entwicklung abnimmt, nimmt die Spezialisierung einzelner Zelltypen zu. Am Anfang der Entwicklung entstehen nach Befruchtung der Eizelle totipotente Stammzellen. Kennzeichnend für diesen Stammzelltyp ist die Fähigkeit embryonale und extra-embryonale Strukturen und somit einen vollständig lebensfähigen Organismus ausbilden zu können [1-5]. Nach mehreren Zellteilungen und ersten Differenzierungen entsteht die Blastozyste [2, 6]. Sie besteht aus einer inneren und äußeren Zellschicht. Während sich die äußere Zellschicht zu extra-embryonalen Strukturen, wie dem Trophoblast und später der Plazenta entwickelt, entstehen aus den Zellen der inneren Zellmasse (ICM) alle extra-embryonalen Gewebe [2-6]. Ein wesentlicher Bestandteil der ICM sind pluripotente Stammzellen, die kontinuierlich proliferieren und alle embryonalen Zelltypen der drei Keimblätter Meso-, Ento- und Ektoderm bilden können (Multilinien-Differenzierungskapazität) [5-8]. Im weiteren Verlauf der Entwicklung entsteht der Embryo und spätere Fötus mit spezialisierten Geweben, die multipotente, Gewebe-spezifische Stammzellen aufweisen. Multipotente Stammzellen können im Vergleich zu pluripotenten Stammzellen nur Zelltypen einer Keimbahnlinie generieren [1-3]. Diese multipotenten Stammzellen findet man auch im adulten Organismus, wo sie in so genannten Stammzellnischen, lokalisiert sind und Gewebe-spezifische Zelltypen generieren können [9, 10].

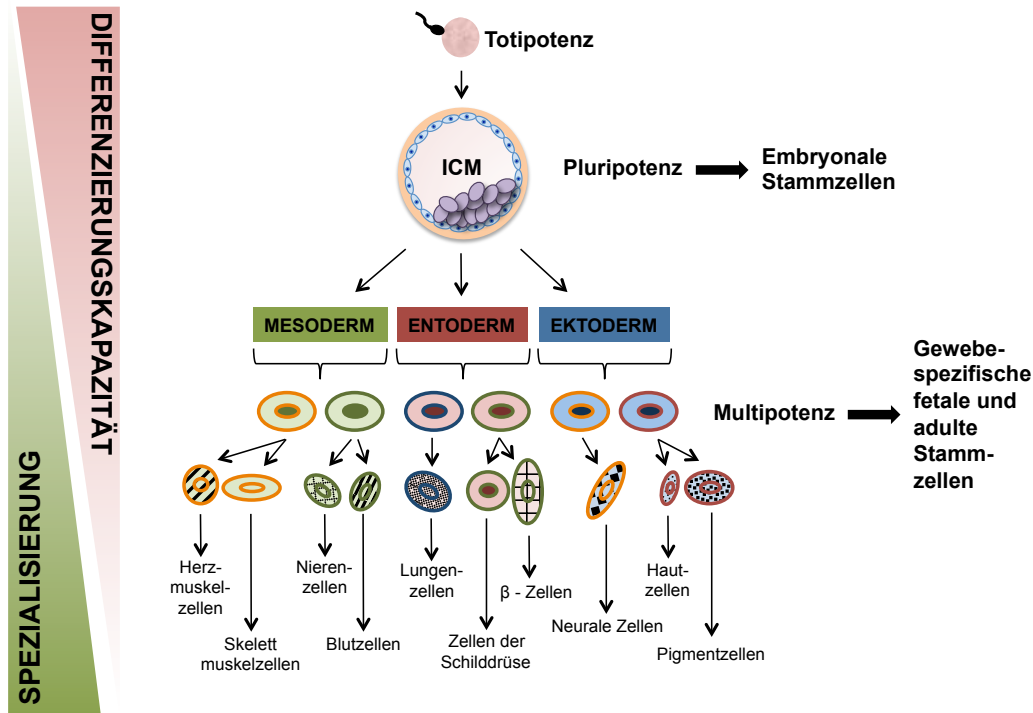


Abb. 1: Klassifizierung von Stammzellen. Gezeigt ist die Unterteilung verschiedener Stammzelltypen und deren Differenzierungskapazität im Verlauf der Entwicklung. Nach Befruchtung der Eizelle entstehen totipotente Stammzellen. Mit fortschreitender Entwicklung bildet sich die Blastozyste, deren innere Zellmasse (ICM) pluripotente Stammzellen aufweist. Aus den pluripotenten Stammzellen der ICM entwickeln sich alle Gewebe und Zelltypen der drei Keimbältern (Meso-, Ento- und Ektoderm). Die pluripotenten Stammzellen der ICM können isoliert werden und werden *in vitro* als embryonale Stammzellen bezeichnet. Multipotente, Gewebe-spezifische Stammzellen dienen dabei der Spezialisierung einzelner Gewebe und Zelltypen. Multipotente Stammzellen treten auch im adulten Organismus auf [1-10].

3.2 Embryonale Stammzellen

Die pluripotenten Zellen der ICM von Blastozysten können isoliert und *in vitro* unter speziellen Bedingungen als embryonale Stammzellen (ESCs) kultiviert werden, wobei sie ihre Fähigkeit zur kontinuierlichen Selbsterneuerung und ihre Multiliniendifferenzierungskapazität aufrechterhalten [11, 12]. Generell werden murine ESCs als Kolonien auf so genannten *Feeder*-Zellen in einem LIF (*Leukemia inhibitory factor*)-enthaltenden Wachstumsmedium kultiviert. LIF ist ein Ligand für den gp130/LIF Rezeptor, der nach Bindung über den Jak (Janus Kinase)/Stat (*Signal transducer and activator of transcription*) Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) führt, der die Expression Pluripotenz-spezifischer Gene wie z.B. *Nanog* oder *Klf4* (*Kruppel-like factor 4*) positiv beeinflusst [13-19].

Aufgrund der charakteristischen Eigenschaften von ESCs, sind diese Zellen besonders interessant für die Grundlagenforschung und regenerative Medizin. Im Rahmen der Grundlagenforschung dienen ESCs als *in vitro* Modell, das zu einem besseren Verständnis wichtiger Prozesse während der Entwicklung beitragen soll. Im Kontext der regenerativen Medizin ist vor allem die Anwendung von ESCs in therapeutischen Gewebeersatz-Strategien oder Toxizitäts-Studien interessant. Daher gilt es zu verstehen welche Mechanismen und Faktoren die Pluripotenz von ESCs regulieren.

3.2.1 Regulation der Pluripotenz muriner ESCs durch Oct4, Sox2 und Nanog

Der pluripotente Status von ESCs wird unter anderem von einem Transkriptions-regulierenden Protein-Netzwerk aufrechterhalten, das aus den Faktoren Oct4 (*Octamer binding transcription factor 4*), Sox2 (*SRY-related HMG-box 2*) und Nanog aufgebaut wird [20-25].

Oct4 gilt als essentieller Regulator der Pluripotenz, der zur Familie der POU (Pit, Oct, Unc) Transkriptionsfaktoren gehört und vom Gen *Pou5f1* codiert wird [25, 26]. Ursprünglich wurde Oct4 als Keimbahn-spezifischer Faktor beschrieben, der zudem stark in totipotenten Blastomeren, der ICM und in ESCs exprimiert ist [26-29]. *Knockout* (KO) Studien zeigen, dass Oct4 eine wichtige Rolle für die Entwicklung spielt. *Pou5f1* KO Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung und die Zellen der ICM zeigen keine Eigenschaften pluripotenter Zellen [26]. *In vitro* resultiert sowohl die Repression als auch die Überexpression von *Oct4* in einem Zusammenbruch des pluripotenten Zellstatus. Während die Repression von *Oct4* in ESCs zur Differenzierung in die troph-ektodermale Richtung führt, induziert die Überexpression von *Oct4* die Differenzierung in die mesodermale und entodermale Richtung [30].

Ähnlich wie Oct4 wird auch der zweite, wichtige Transkriptionsfaktor Sox2 stark in der ICM exprimiert [31]. Sox2 gehört zur Familie der SOX Proteine. Der Name Sox leitet sich vom Testes-spezifischen Faktor Sry (*Sex determining region Y*) und dessen *High mobility group* (HMG)-*box* DNA Bindungsdomäne ab [25, 31, 32]. Sox2 KO Blastozysten weisen ähnlich wie *Oct4* KO Blastozysten keine Zellen in ihrer ICM auf, die Eigenschaften pluripotenter Stammzellen zeigen [31]. Wie im Falle von Oct4 führt die Repression von Sox2 in ESCs zur troph-ektodermalen Differenzierung [33]. Die Überexpression von Sox2 hingegen induziert die Differenzierung von ESCs in verschiedene Zelltypen, die Gene der neuro-ektodermalen aber auch mesodermalen Richtung exprimieren [34].

Der dritte wichtige Pluripotenzfaktor ist Nanog. *Nanog* ist ein Transkriptionsfaktor der Nkx Familie, der wie Oct4 und Sox2 in der ICM exprimiert ist [20]. Ähnlich wie im Falle von Oct4

und Sox2 ist auch Nanog ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz [35-39]. Außerdem kann Nanog die Selbsterneuerungskapazität von ESCs unabhängig von LIF unterstützen [35, 38-40].

Der funktionale Mechanismus von Oct4, Sox2 und Nanog basiert auf Transkriptions-regulierenden Protein-Netzwerken. Oct4 und Sox2 können miteinander Heterodimere ausbilden und Promotorregionen binden, die Oct4- und Sox2-spezifische Bindungsstellen aufweisen, wodurch die Transkription gemeinsamer Zielgene reguliert wird [41-50]. Auf diese Weise bilden Oct4 und Sox2 einen so genannten *feedback loop* wodurch sie autoregulatorisch auch ihre eigene Expression positiv regulieren [43, 45, 47]. Ein weiteres Zielgen des Oct4-Sox2 Heterodimers ist *Nanog* [44, 46]. Zusammen bilden Oct4, Sox2 und Nanog das so genannte Kern-Pluripotenznetzwerk, das die Aktivierung von Pluripotenzgenen als auch die Repression Differenzierungs-spezifischer Gene kontrolliert [23, 33, 41-50].

3.2.2 Chromatin in murinen ESCs und epigenetische Regulation der Pluripotenz

Im Zusammenhang mit der Regulation der Pluripotenz von ESCs ist vor allem die charakteristische Chromatinstruktur von ESCs von Bedeutung [51, 52]. Im Allgemeinen kann man das Chromatin anhand seiner Struktur in Eu- und Heterochromatin unterteilen. Euchromatin bezeichnet eine weniger dicht gepackte Variante des Chromatins, das den Zugang regulatorischer Proteine an die DNA erlaubt und somit eine aktive Genexpression ermöglicht [53]. Vom Heterochromatin spricht man hingegen, wenn das Chromatin dichtgepackt ist und keinen Zugang Transkriptions-regulierender Faktoren an die DNA erlaubt, was letztendlich die Expression von Genen verhindert [53]. Während ESCs vorwiegend eine euchromatische Struktur aufweisen, zeigen differenzierte Zelltypen vermehrt heterochromatische Regionen [51, 53, 54]. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist, dass das ESC-Chromatin über eine hyperdynamische und lockere Bindung von Chromatin-Proteinen verfügt [51, 55-57]. Zusammen mit der euchromatischen Organisation des ESC-Chromatins trägt diese hyperdynamische Anordnung Chromatinstruktur-regulierender Proteine gleichzeitig zur Aufrechterhaltung des undifferenzierten ESC-Status aber auch der Differenzierungsfähigkeit von ESCs bei [51, 52, 55, 56].

Der pluripotente Zellstatus und die Differenzierungskapazität von ESCs wird zudem durch epigenetische Mechanismen reguliert, die das Chromatin mitotisch vererbbar verändern ohne dabei die Sequenzabfolge der DNA zu beeinflussen [58-60]. Wichtige epigenetische

Mechanismen und Charakteristiken in diesem Zusammenhang sind die Methylierung von DNA, Histonmodifikationen und bivalente Chromatindomänen.

Die Methylierung der DNA wird von Dnmt (DNA Methyltransferase) Enzymen katalysiert, die eine Methylgruppe auf das 5. Kohlenstoffatom im Cytosinring übertragen (5mC) [60, 61]. Diese Methylierungen finden hauptsächlich an Cytosinen von CpG Dinukleotiden statt und sind mit der Repression der Genexpression assoziiert [62-65]. Während die DNA der meisten Differenzierungs-spezifischen Gene in ESCs methyliert ist, weisen die genomischen Bereiche wichtiger Pluripotenzgene wie z.B. *Nanog* nahezu keine DNA Methylierung auf [66, 67].

Im Gegensatz zur DNA Methylierung können Histonmodifikationen die Genexpression sowohl negativ als auch positiv beeinflussen [68, 69]. Histone sind Proteine, deren Funktion es ist, die DNA in strukturierte Einheiten aufzubauen [70-72]. Insgesamt kennt man die fünf Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4. Die Histone H3 und H4 bilden zusammen mit H2A und H2B ein oktamer Nukleosom auf, um das sich DNA einer Länge von 146 Basenpaaren wickeln kann [70-72]. Das N-terminale Ende der Histone kann durch Enzyme modifiziert werden, wobei man zwischen der Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung oder Ubiquitylierung einzelner Aminosäuren unterscheidet [68, 69, 73, 74]. Sowohl die Art als auch die Menge (z.B. Mono-, Di- oder Trimethylierung) und Position (z.B. Lysin 4 oder Lysin 27) der Modifizierung bestimmen dabei, ob die Genexpression direkt oder indirekt, positiv oder negativ beeinflusst wird. Während die Modifikationen H3ac, H4ac und H3K4me mit einer aktiven Genexpression assoziiert sind, beeinflussen die Veränderungen H3K9me und H3K27me die Transkription negativ [75-79].

Die Modifikationen H3K4me3 und H3K27me3 spielen eine wichtige Rolle in ESCs, denn sie definieren so genannte bivalente Chromatindomänen, die man in genomischen Bereichen findet, die Differenzierungs-assoziierte Gene kodieren [80, 81]. Diese Gene sind in undifferenzierten ESCs nur schwach exprimiert, da die repressive Modifikation H3K27me3 gegenüber der aktiven H3K4me-Modifikation dominierend ist [80]. Beide Veränderungen werden von Multi-Protein Komplexen katalysiert. Während der Trithorax (TrxG) Komplex mit der Trimethylierung von H3K4 assoziiert ist, katalysiert PRC2 die Trimethylierung von H3K27 [82-85]. Funktional dienen die bivalenten Chromatindomänen entweder der schnellen Aktivierung oder Repression bestimmter Gene, wenn ESCs differenzieren [81].

3.3 Polycomb group (PcG) Proteine

PcG Proteine reprimieren homeotische (*Hox*) Gene in *Drosophila melanogaster* und sind dadurch maßgeblich an der Regulation der anterioren-posterioren Körpersegmentation im

Verlauf der Entwicklung beteiligt [86-93]. TrxG Proteine, die mit der Aktivierung von Genen assoziiert sind, sind bekannte Gegenspieler der PcG-induzierten transkriptionellen Repression [91, 94-96]. Zusammen repräsentieren PcG- und TrxG-Proteine essentielle Bestandteile des zellulären Gedächtnissystems, um bestimmte Genexpressionsmuster im Verlauf der Differenzierung und Entwicklung kontrolliert während der Zellteilung weitergeben zu können [96].

PcG Proteine findet man auch in Säugetieren, in denen sie ebenfalls die Expression von *Hox* Genen regulieren [90, 97-99]. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle im Kontext der Krebsentstehung, für das genomische Imprinting und die X Chromosom-Inaktivierung aber auch für die Regulation des Zellzykluses und diverser mitochondrialer Funktionen [90, 92, 100-109]. Zusätzlich haben PcG Proteine auch in Stammzellen eine wichtige Funktion, denn sie sind grundlegend an der Differenzierungsfähigkeit von ESCs und auch Aufrechterhaltung der Pluripotenz beteiligt [92, 110].

3.3.1 Proteinzusammensetzung und molekularer Mechanismus kanonischer und nicht-kanonischer PRC1 und PRC2 Komplexe

Funktional sind PcG Proteine keine klassischen DNA Bindeproteine wie die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 oder Nanog. Sie bilden große Multiproteinkomplexe aus, die als PRC1 bzw. PRC2 bezeichnet werden und charakteristische Histonmodifikationen katalysieren [99, 111-119].

In Säugetieren setzt sich der kanonische PRC2 Komplex grundlegend aus den fünf Proteinkomponenten EZH1 oder EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 1 or 2*), EED (*Embryonic ectoderm development*), SUZ12 (*Suppressor of zeste homolog 12*), RBBP4 oder RBBP7 (*Retinoblastoma binding protein 4 or 7*) und AEBP2 (*Adipocyte-enhancer binding protein*) zusammen (Abb. 2A; nach Schwartz und Pirrotta 2013, 2014) [82, 83, 116, 119]. Die Zusammensetzung des kanonischen PRC1 Komplexes basiert auf den vier Proteinfamilien RING1 (*Really interesting new gene 1*), PCGF (*Polycomb group RING finger*), CBX (*Chromobox homolog*) und PHC (*Polyhomeotic homolog*) (Abb. 2B nach Schwartz und Pirrotta 2013, 2014) [116, 118, 119].

Neben den kanonischen PRC1 und PRC2 Komplexen belegen neue Studien die Existenz verschiedener PRC Varianten, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden [116, 119-122]. Für PRC2 kennt man zwei nicht-kanonische Komplexe, die neben ihren Kernkomponenten, zusätzlich entweder Jarid2 (JUMONJI, *AT-rich interactive domain 2*) oder PHF (PHF1, PHF19, MTF2; PHD (*Plant homeodomain*) *finger*) Paraloge aufweisen (Abb. 2A; nach Schwartz und Pirrotta 2013, 2014) [116, 119]. Sowohl die PHF Proteine als

auch Jarid2 beeinflussen die Methyltransferaseaktivität des PRC2 Komplexes [123-128]. Jarid2 ist darüber hinaus auch an der Rekrutierung des PRC1 Komplexes beteiligt [129]. Während die Komplexität verschiedener PRC2 Varianten überschaubar ist, sind im Falle von PRC1 theoretisch zahlreiche PRC1 Varianten denkbar. Dies resultiert unter anderem aus der Anzahl der Paraloge einzelner PRC1 Proteinkomponenten. Neben RING1A und RING1B kennt man insgesamt fünf verschiedene CBX Paraloge (CBX2, 4, 6, 7, 8), sechs PCGF Paraloge (PCGF1 – 6) und drei verschiedene PHC (PHC1 – 3) Paraloge [116, 119]. Hinzu kommen weitere assoziierte Faktoren [116, 119].

In Bezug auf die Zusammensetzung unterschiedlicher PRC1 Komplexe spielt vor allem die Familie der PCGF Proteine eine entscheidende Rolle. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Pcgf Paraloge sechs verschiedene PRC1 Komplexe (PRC1.1 – 1.6) definieren, die zudem unterschiedliche genomische Bindungsmuster aufweisen [120]. Während Pcgf2 und Pcgf4 die kanonischen Komplexe PRC1.2 und PRC1.4 charakterisieren, unterscheidet man anhand der Paraloge Pcgf1, Pcgf3, Pcgf5 und Pcgf6 die vier nicht-kanonischen PRC1 Varianten PRC1.1, PRC1.3, PRC1.5, PRC1.6, wobei PRC1.3 und PRC1.5 auf Basis ihrer Proteinzusammensetzung identisch sind [116, 120].

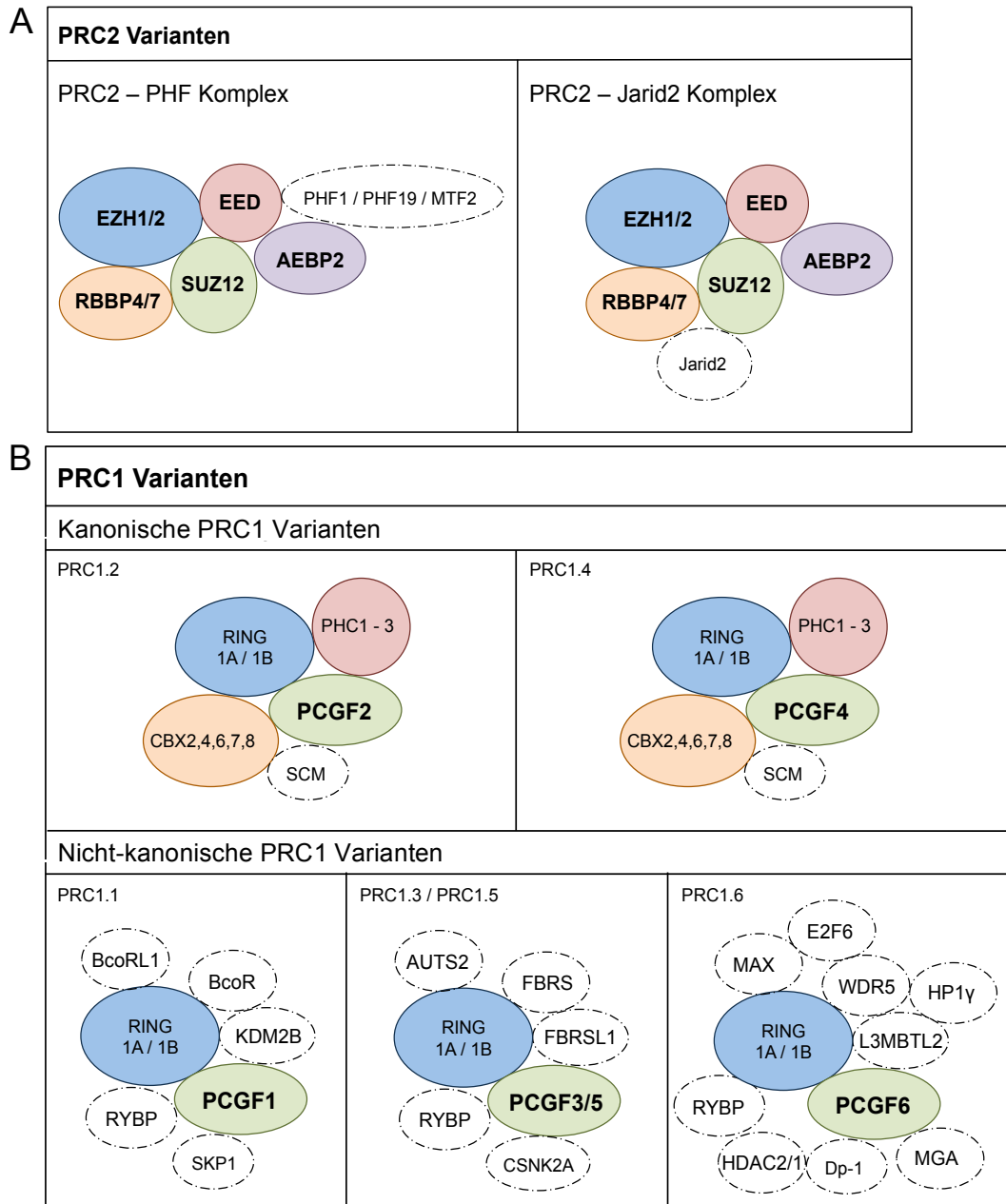


Abb. 2: Proteinzusammensetzung der kanonischen und nicht-kanonischen PRC Komplexe. A) Der kanonische PRC2 Komplex setzt sich aus den Kernkomponenten EZH1 oder EZH2 (EZH1/2), EED, SUZ12, RBBP4 oder RBBP7 (RBBP4/7) und AEBP2 zusammen. PRC2 Varianten verfügen zusätzlich über assoziierte Proteine, die mit unterbrochenen Linien markiert sind. Während der PRC2-PHF Komplex zusätzlich über ein Paralog der PHF Proteinfamilie (PHF1 oder PHF19 oder MTF2) verfügt, beinhaltet der PRC2-Jarid2 Komplex zusätzlich Jarid2. **B)** Die kanonischen PRC1 Komplexe setzen sich aus RING1A oder RING1B (Ring1A/B), PHC, CBX und PCGF Paralogen zusammen. PRC1 Varianten können anhand ihres Pcgf Paralogen klassifiziert werden. Die Pcgf Paraloge Pcgf2 und Pcgf4 definieren zwei kanonische PRC1 Komplexe (PRC1.2 und PRC1.4), die neben den Kernkomponenten RING1A/Ring1B, PHC1-3 und CBX 2,4,6,7,8 zusätzlich das assoziierte Protein SCM (unterbrochene Linie) aufweisen. Pcgf1, Pcgf3, Pcgf5 und Pcgf6 definieren nicht-kanonische PRC1 Varianten, die sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher, assoziierter Proteine voneinander unterscheiden. *Nach Schwartz and Pirrotta 2013, 2014 [116, 119, 120].*

3.3.2 Mechanismen kanonischer und nicht-kanonischer PRC Komplexe

Der molekulare Mechanismus der klassischen Polycombfunktion basiert auf einer hierarchischen Abfolge. Die Ezh1/2 Komponente des kanonischen PRC2 Komplexes katalysiert zunächst die Trimethylierung von Lysin 27 am Histon H3 (H3K27me3) [82, 83, 130]. Diese Histonmodifizierung dient als Erkennungssignal für die CBX Komponente der kanonischen PRC1 Komplexe PRC1.2 und PRC1.4 [82, 83, 120, 130]. Nach Bindung katalysiert die E3 Ubiquitinligase Ring1 die Ubiquitylierung von Lysin 119 am Histon H2A (H2AK119ub) [131]. Funktional trägt die H2AK119ub Markierung dazu bei, die RNA Polymerase II an der Elongation zu hindern, was letztendlich die Transkription negativ beeinflusst [132, 133]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die PRC1-vermittelte Repression von Genen auch damit assoziiert ist, dass die RNA Polymerase II daran gehindert wird, den Transkriptions-Initiationskomplex zu formieren [134].

Neue Studien zeigen, dass vor allem die Existenz unterschiedlicher PRC1 Varianten dazu beiträgt, dass dieses Modell der Polycombfunktion nicht immer gilt [120, 135-138]. Demnach kann die Bindung von PRC1 unabhängig von PRC2 stattfinden oder auch umgekehrt zur Rekrutierung von PRC2 führen [135, 137]. Die Existenz unterschiedlicher PRC1 Varianten lässt zudem auf Komplex-spezifische Funktionen schließen [120, 136, 139]. Außerdem zeigen einzelne PRC1 Komponenten Zelltyp- oder Gewebe-spezifische Expressionsmuster. So wird z.B. *Pcgf4* nicht in ESCs, aber in differenzierten Zelltypen exprimiert, während *Pcgf6* eine erhöhte Expression in ESCs aufweist [140]. Die Paraloge der CBX Proteinfamilie zeigen ebenfalls ein Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster. Während *Cbx7* in ESCs exprimiert ist, werden *Cbx2*, *Cbx4* und *Cbx8* im Verlauf der ESC-Differenzierung exprimiert [141, 142]. Zusammen deuten diese Daten auf Zell- und Gewebe-spezifische Funktionen unterschiedlicher PRC Varianten und deren Komplexbestandteile hin.

3.3.3 PcG Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Pluripotenz muriner ESCs und während der Entwicklung

PcG Proteine sind Interaktionspartner von Pluripotenz-spezifischen Faktoren wie z.B. Nanog und spielen eine wichtige Rolle für die murine Embryonalentwicklung und die Differenzierungsfähigkeit muriner ESCs [143-149]. So resultiert z.B. der KO der PRC1-Kernkomponente *Ring1B* im Absterben von Mausembryonen während der Gastrulationsphase [150]. In ESCs führt der Doppel-Knockout (dKO) von *Ring1A* und *Ring1B* und damit der Verlust der PRC1 Funktion nicht nur zur De-repression von Differenzierungs-spezifischen Genen sondern auch zum Zusammenbruch des pluripotenten Status der ESCs [144]. Auch der KO von *Pcgf2* und *Pcgf4* führt zu schweren

Entwicklungsfehlern, allerdings sterben die KO Tiere erst nach der Geburt [151-153]. Im Gegensatz zu den Pcgf Paralogen führt der KO von *Rybp* (*RING1 and YY1 binding protein*), einer assoziierten Komponente des PRC1.1 Komplexes, bereits früh in der Entwicklung zum Absterben der Mausembryonen [154]. KO Studien für *L3mbtl2* (*L(3)Mbt-like 2*) und *Kdm2b* (*Lysine (K)-specific demethylase 2B*), zwei Komponenten der PRC1.1 und PRC1.6 Komplexe, zeigen, dass beide wichtig für die frühe embryonale Entwicklung sind [155, 156]. *Rybp* und *L3mbtl2* KO ESCs zeigen zudem Differenzierungs-spezifische Defekte [156, 157]. Wie im Falle von PRC1 führt auch der KO diverser PRC2 Komponenten wie z.B. *Suz12*, *Ezh2* und *Eed* zu schweren Defekten während der Embryonalentwicklung [158-160]. *Suz12* und *Eed* KO ESCs erhalten zwar ihren undifferenzierten Zellstatus aufrecht, zeigen aber ebenfalls eine De-Repression von Differenzierungsgenen [161, 162]. *Suz12* KO ESCs weisen zusätzlich Defekte hinsichtlich ihrer Differenzierungskapazität auf, indem sie z.B. nicht mehr in die neuronale Richtung differenzieren können [161]. Zusammen zeigen diese Daten, dass PcG Proteine während der Entwicklung und in ESCs eine wichtige Funktion haben, indem Sie grundlegend an der Regulation der Differenzierungsfähigkeit beteiligt sind. Im Gegensatz zu PRC2 ist der PRC1 Komplex zudem auch für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zellstatus von Bedeutung.

3.3.4 Stammzell-spezifische Funktionen einzelner Pcgf Paraloge

Wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben definieren die sechs Pcgf Paraloge PRC1 Varianten mit unterschiedlichen genomischen Bindestellen, was verschiedene Mechanismen einzelner PRC Varianten als auch Pcgf-spezifische Funktionen vermuten lässt [120]. In Bezug auf die Regulation charakteristischer Eigenschaften von Stammzellen, sind für Pcgf1, Pcgf2, Pcgf4 und Pcgf6 wichtige Rollen bekannt [107, 140, 163-168]. Pcgf4 ist nicht in pluripotenten Stammzellen exprimiert, ist aber für die Proliferation hämatopoetischer und leukämischer Stammzellen wichtig und spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Charakterisierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen [107, 140, 165, 168]. Des Weiteren belegen Studien eine Funktion von Pcgf4 in der murinen iPS Reprogrammierung, indem Pcgf4 fähig ist, Sox2, Klf4 und c-Myc zu ersetzen [169]. Pcgf2 ist ebenfalls nicht in pluripotenten Stammzellen exprimiert [140]. Pcgf2 reprimiert die Expression von Pcgf4 und zeigt eine gegensätzliche Funktion zu Pcgf4 in Bezug auf die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen [163, 164]. Neben Pcgf2 und Pcgf4 konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch Pcgf1 eine Rolle in der Regulation der Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Stammzellen spielt [166]. Die Ergebnisse einer siRNA-screening Studie, zur Identifikation neuer Pluripotenzfaktoren in murinen ESCs lassen für Pcgf6 eine Funktion in ESCs

vermuten. Der KD von *Pcgf6* in ESCs führt demnach zu einer verminderten Expression Pluripotenz-spezifischer Gene und zu einer erhöhten Rate an Zellen mit einer Differenzierungs-assoziierten Morphologie [167]. Diese Ergebnisse konnten kürzlich durch eine zweite *Pcgf6* KD Studie in murinen ESCs bestätigt werden [140]. Auch in dieser Studie resultierte der KD von *Pcgf6* in ESCs in reduzierten *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* Expressionsniveaus. Darüber hinaus zeigt diese Studie, dass *Pcgf6* das einzige Pcgf Paralog ist, das eine erhöhte Genexpression in pluripotenten Zellen aufweist. *Pcgf6* KD ESCs zeigen weiterhin eine reduzierte ESC-Koloniegröße und eine verminderte Kapazität zur Bildung charakteristischer ESC-Kolonien. Zudem konnte unter *Pcgf6* KD Bedingungen eine De-Repression mesodermaler und Testes-spezifischer Gene nachgewiesen werden und *Pcgf6* KD ESCs weisen eine erhöhte Tendenz zur hämatopoetischen Differenzierung auf. In der Summe zeigt dies, dass *Pcgf6* ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status und die Differenzierung muriner ESCs ist.

3.4 Induzierte Pluripotenz

Lange galt die Abfolge der Entwicklung als ein unidirektionaler Prozess. Seit einigen Jahrzehnten ist es jedoch möglich somatische Zellen reprogrammieren zu können, so dass Zellen entstehen, die Charakteristiken pluripotenter Zellen aufweisen [170]. Die erste vollständige Reprogrammierung somatischer Zellen gelang mittels der Methode des somatischen Zellkerntransfers. Dabei wurde der Zellkern differenzierter Zellen des Frosches in entkernte Frosch-Eizellen transferiert was zur Entwicklung lebensfähiger Frösche führte [171-173]. Das erste Säugetier, das durch diese Methode generiert wurde, war das Schaf Dolly [174]. Eine weitere Möglichkeit um somatische Zellen reprogrammieren zu können stellt die Fusion zweier Zelltypen dar. So konnte gezeigt werden, dass Thymozyten nach Fusion mit ESCs aus der Maus zur Ausbildung von so genannten Zellhybriden führt, die zwei Zellkerne enthalten, wobei die genetische Information der Thymozytenzelle reprogrammiert wurde [175].

Einen revolutionären Durchbruch im Zusammenhang mit der Reprogrammierung somatischer Zellen lieferten Shinya Yamanaka und Kazutoshi Takahashi. Sie entwickelten ein Protokoll, das nach der Überexpression der Faktoren *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* und *c-Myc* (*OSKM*) in MEFs innerhalb von 2 – 4 Wochen zur Bildung von induzierten pluripotenten Stamm- (iPS) Zellen führt [176]. Ein wesentlicher ethischer Vorteil dieses Protokolles ist, dass keine Ei- oder ES Zellen verwendet werden müssen. iPS Zellen aus Maus und Mensch weisen ähnliche molekulare und funktionale Eigenschaften wie ESCs auf und stellen daher für die Grundlagenforschung und die regenerative Medizin eine hervorragende Alternative

zu ESCs dar [176-187]. Nachteile der OSKM-vermittelten iPS Reprogrammierung sind die Dauer und die Ineffizienz des Prozesses, denn im Allgemeinen entsteht nur aus einer Minderheit aller transduzierten MEFs voll-pluripotente iPS Zellen [176, 188]. Die zugrundeliegenden, biologischen Mechanismen des iPS Reprogrammierungsprozesses sind und waren in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Studien. Zwar konnten grundlegende molekulare und epigenetische Mechanismen als auch wichtige Faktoren identifiziert werden, doch in vollem Umfang ist die iPS Reprogrammierung bisher nicht verstanden.

3.4.1 Die Phasen der iPS Reprogrammierung und Funktionen der OSKM

Faktoren

Die iPS Reprogrammierung ist ein komplexer Prozess, der in die drei Phasen Initiation, Aufbau oder Reifung und Stabilisierung unterteilt wird [189, 190]. Während frühe Phasen durch stochastische Prozesse geprägt sind, werden Reprogrammierungs-spezifische Mechanismen in der letzten Phase hierarchisch reguliert [191].

Hauptmerkmale der Initiationsphase sind eine erhöhte Expression von Proliferations- und Zellzyklus-spezifischen Genen, eine gesteigerte Zellteilungsrate und die vermehrte Transkription metabolischer Gene [181, 190, 192, 193]. Zusätzlich kommt es zur Repression somatischer Gene und zu einer Mesenchymalen-Epithelialen Transition (MET) [181, 189, 190, 193-195]. Auch die Repression Apoptose-assoziiierter Prozesse zu frühen Phasen der Reprogrammierung ist wichtig für die Entstehung von iPS Zellen [190, 196-198].

Nur wenige Zellen erreichen nach der Initiationsphase die zweite Phase der iPS Reprogrammierung, die durch den Aufbau oder die Reifung der Pluripotenz gekennzeichnet ist [189, 190, 199]. Hauptmerkmal dieser Phase ist die Expression früher ESC-Marker wie z.B. *AP* (*Alkaline Phosphatase*), *SSEA1* (*stage-specific embryonic antigen 1*) und *Fbx15* (*F-box Protein 15*) in so genannten intermediären iPS Zellen, die nur partiell-reprogrammiert sind [190, 193, 195, 200, 201]. Außerdem ist zu diesem Zeitpunkt noch die Expression der OSKM Transgene wichtig, damit voll-pluripotente iPS Zellen entstehen können [176, 181, 183, 188, 200].

In der letzten Phase der Reprogrammierung kommt es zur Stabilisierung der Pluripotenz, wobei vor allem die kontrollierte Aktivierung des endogenen Pluripotenznetzwerkes charakteristisch für diese Phase ist [179, 182, 188, 190, 195, 200, 202]. Dies basiert auf einer Sox2-regulierten, hierarchischen Abfolge an transkriptionellen Aktivierungen verschiedener Pluripotenzgene, wie z.B. *Esrrb* (*Estrogen-related receptor beta*), *Sall4* (*Spalt-like transcription factor 4*) oder *Lin28* [191]. Um den pluripotenten Zellstatus

stabilisieren zu können, beginnt in der letzten Phase auch das *Silencing* der *OSKM* Transgene [190, 200, 203]. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung des inaktivierten X Chromosoms, zur Verlängerung der Telomere und zur Immortalisierung der Zellen [179, 181, 190, 195, 204].

Die zugrundeliegenden Funktionen der *OSKM* Faktoren zu unterschiedlichen Phasen der *iPS* Reprogrammierung sind nicht vollständig verstanden. Grundsätzlich jedoch binden alle vier Faktoren an *Enhancer*- und Promotor-Regionen verschiedener aktiver oder reprimierter Gene und beeinflussen so deren Transkription positiv als auch negativ [205]. Funktional kann man die einzelnen Faktoren in zwei Gruppen einteilen. Oct4, Sox2 und Klf4 sind Faktoren, die Pionierarbeiten leisten und maßgeblich zum Aufbau und zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz beitragen [205, 206]. C-Myc repräsentiert einen Faktor, der diese Prozesse unterstützt und die Effizienz der Reprogrammierung beeinflusst [205, 206]. Demnach bezeichnet man Oct4, Sox2 und Klf4 als Kern-Faktoren der *iPS* Reprogrammierung und c-Myc als *Enhancer*-Faktor [205, 206].

C-Myc ist ein Protoonkogen und spielt eine wichtige Rolle in ESCs [14, 23, 207]. C-Myc ist hauptsächlich in frühen Phasen der Reprogrammierung aktiv und ist vor allem an der Repression MEF-spezifischer Gene wie z.B. *Thy1* (*Thymocyte antigen 1*) oder *Periostin* beteiligt [183, 205]. Darüber hinaus agiert c-Myc grundsätzlich als Verstärker der Expression aktiver Gene, indem es an E-Box Regionen im Genom bindet, was letztendlich die transkriptionelle Elongation unterstützt [190, 205, 208-210]. In diesem Zusammenhang trägt c-Myc dazu bei die Expression von z.B. Proliferations-spezifischen Genen positiv zu beeinflussen [183, 205]. Weiterhin ist bekannt, dass c-Myc an der Ausbildung aktiver Histonmodifikationen in ESCs beteiligt ist und demnach auch während der *iPS* Reprogrammierung zu wichtigen epigenetischen Modifikationen beitragen könnte [205, 211, 212].

Klf4 agiert sowohl in frühen als auch in späten Phasen der *iPS* Reprogrammierung [193, 205, 213]. Ähnlich wie c-Myc ist Klf4 zu frühen Phasen der Reprogrammierung mit der Repression von Fibroblasten-Genen als auch der Aktivierung von z.B. Proliferations-spezifischen Genen beteiligt [183, 193, 205]. In den späten Phasen der Reprogrammierung ist Klf4 hauptsächlich mit der Aktivierung Pluripotenz-spezifischer Gene assoziiert [193, 205].

Zusammen mit Klf4 binden die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 zu späten Phasen der Reprogrammierung wichtige Gene des endogenen Pluripotenznetzwerkes um deren Transkription zu aktivieren [183, 205]. Gemeinsam mit c-Myc und Klf4 binden Oct4 und Sox2 zu frühen Phasen der Reprogrammierung atypische Regionen im Fibroblasten-Genom, die keine klassischen Bindestellen dieser Faktoren im ESC-Genom sind [205, 206]. Diese atypische Bindung der *OSKM* Faktoren trägt unter anderem dazu bei, die Aktivierung

reprimierter Gene, die in dicht-gepackten, heterochromatischen Bereichen des Chromatins angesiedelt sind zu unterstützen [205].

3.4.2 Epigenetische Veränderungen und Chromatin-modifizierende Faktoren in der iPS Reprogrammierung: ein Überblick

Neben den zellulären und transkriptionellen Prozessen ist bekannt, dass eine massive Veränderung der Chromatinstruktur während der iPS Reprogrammierung stattfindet, die das epigenetische Muster somatischer Zellen in einen charakteristischen ESC-Status umwandeln [179, 181, 205, 214-218]. Diese Veränderungen beinhalten die Reorganisation des Chromatins, De-Methylierungen der Promotoren Pluripotenz-spezifischer Gene wie z.B. *Oct4*, *Sox2* und *Nanog*, die Reaktivierung des inaktivierten X Chromosoms und Genomweite Veränderungen post-transkriptionaler Histonmodifikationen [179-181, 214, 215, 219, 220].

Zahlreiche KO und KD Experimente oder auch Überexpressionsstudien führten in den letzten Jahren zur Identifizierung einer Vielzahl an Chromatin-modifizierenden Faktoren, die eine Rolle für die iPS Reprogrammierung spielen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass *Wdr5* (*WD repeat domain 5*) essentiell für die iPS Reprogrammierung ist [221]. *Wdr5* ist Bestandteil des Trithorax Komplexes und trägt in ESCs zur Ausbildung der aktiven Histonmodifikation H3K4me3 bei [96, 221, 222]. Zusätzlich wurde *Wdr5* auch als Bestandteil des nicht-kanonischen PRC1.6 Komplexes identifiziert, dessen Funktion jedoch bisher nicht bekannt ist [120]. Ein weiteres Beispiel ist *Utx* (*Ubiquitously transcribed chromosome tetratricopeptide repeat protein*; auch *Kdm6A* (*Lysine (K)-specific demethylase 6A*)), eine H3K27-spezifische De-Methylase, die mit *Oct4*, *Sox2* und *Klf4* interagieren kann [223]. Der Verlust von *Utx* hat negative Auswirkungen auf die iPS Reprogrammierung [223]. So führt der Verlust von *Utx* zu einer unvollständigen De-Methylierung Reprogrammierungsspezifischer Gene wie z.B. *Fgf4* (*Fibroblast growth factor 4*), *Sall4*, *Sall1* (*Spalt-like transcription factor 1*) oder *Utf1* (*Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1*) und resultiert damit in einer Beeinträchtigung der Re-Aktivierung dieser Gene [223]. Neben *Utx* spielen auch die Chromatin-modifizierenden Faktoren *Kdm2A* und *2B* (*Lysine (K)-specific demethylase 2A und 2B*), *Ehmt1* (*Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1*), *Setdb1* (*SET-domain, bifurcated 1*), *Suv39H* (*Suppressor of variegation 3-9 homolog*) und *Dot1L* (*DOT1-like histone H3K79 methyltransferase*) eine Rolle während der iPS Reprogrammierung [224-226]. Auch Proteine, die mit der Methylierung bzw. De-Methylierung der DNA assoziiert sind wie z.B. TET1, TET2 oder PARP sind wichtig für die iPS Reprogrammierung [227-229]. In die Liste der Chromatin-modifizierenden Faktoren, die

für die Reprogrammierung somatischer Zellen eine Rolle spielen, reihen sich auch PcG Proteine ein [169, 225, 230]. So führt der KD von *Pcgf4*, *Ring1*, *Ezh2*, *Eed* und *Suz12* zu verminderten iPS Reprogrammierungseffizienzen [225]. Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass die Repression PcG-spezifischer Zielgene essentiell für iPS Reprogrammierung ist [231]. Für *Pcgf4* und *Ezh2* konnte zudem der zugrundeliegende Mechanismus ihrer Reprogrammierungs-spezifischen Funktion identifiziert werden [169, 230]. Demnach agieren beide Faktoren über die Repression des *Ink4A/Arf* Genlokus, der eine bekannte epigenetische Blockade der iPS Reprogrammierung darstellt [169, 230, 232]. Zusammen zeigen diese Daten, dass Chromatin-modifizierende Faktoren wie z.B. PcG Proteine eine wichtige Rolle in der iPS Reprogrammierung spielen.

3.4.3 Die „Yamanaka“ Faktoren OSKM können durch Pluripotenz- und Differenzierungs-spezifische als auch epigenetische Faktoren ersetzt werden

Die klassischen „Yamanaka“ OSKM Faktoren können durch eine Vielzahl an Pluripotenz- und Differenzierungs-spezifische Faktoren oder epigenetische Regulatoren ersetzt werden [233]. So können *Klf4*, *Sox2* und *c-Myc* durch Proteinhomologe ausgetauscht werden [233, 234]. Außerdem können *Klf4* und *c-Myc* durch *Esrrb*, ein direktes transkriptionelles Zielgen von *Nanog*, ersetzt werden [233, 235, 236]. *Oct4* kann durch den *orphan nuclear receptor* *Nr5a2* (und auch *Nr5a1*; *Nuclear receptor subfamily 5 group a member 1 and 2*) ersetzt werden [233, 237]. Die Funktion von *Nr5a2* basiert darauf, dass wichtige Pluripotenz-assoziierte Gene wie z.B. *Oct4* oder *Nanog* transkriptionelle Zielgene von *Nr5a2* sind, was den Ersatz von *Oct4* erklären könnte [233, 237]. 2011 wurde berichtet, dass auch E-cadherin *Oct4* ersetzen kann [233, 238]. Der Mechanismus ist hier unklar. Allerdings ist bekannt, dass E-cadherin die Akkumulation von β -Catenin im Zellkern und damit die Aktivität des Wnt Signalweges negativ beeinflusst [233, 238, 239]. Der negative Effekt auf den Wnt Signalweg zu frühen Phasen der iPS Reprogrammierung unterstützt wiederum die Bildung von iPS Zellen [233, 240]. Neben einzelnen Faktoren können auch alle vier OSKM Faktoren durch einen Cocktail bestehend aus *Sall4*, *Esrrb* und *Lin28* in Kombination mit *Dppa2* (*Developmental pluripotency associated 2*) oder *Nanog* ersetzt werden [191].

Zusätzlich zu den Pluripotenz-assoziierten Faktoren können auch Keimbahnlinien-spezifische Gene einzelne OSKM Faktoren ersetzen [241-243]. *Sox2* gilt als negativer Regulator mes-entodermaler (ME) Gene und kann durch weitere negative Regulatoren von ME-Genen wie z.B. *Sox1* (*SRY-related HMG-box 1*), *Sox3* (*SRY-related HMG-box 3*), *Rcor2* (*REST corepressor 2*) und *Gmnn* (*Geminin*) ersetzen werden [241-246]. *Oct4* hingegen ist als Repressor ektodermaler (ECT) Gene bekannt und kann durch die negativen ECT-

Regulatoren Gata3 (*GATA binding protein 3*), Gata6 (*GATA binding protein 6*), Sox7 (*SRY-related HMG-box 7*) und Pax1 (*Paired box 1*) ersetzt werden [30, 241-245].

Neben Rcor2 können einzelne OSKM Faktoren auch durch andere epigenetische Faktoren ausgetauscht werden. So kann Oct4 auch durch die 5-Methylcytosin Hydroxylase Tet1 (*Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1*) ersetzt werden [229]. Aus der Gruppe der PcG Proteine kann Pcgf4 die Faktoren Sox2, Klf4 und c-Myc ersetzen [169]. Diese Ergebnisse, dass einzelne OSKM Faktoren durch Pluripotenz- oder Differenzierungsspezifische als auch epigenetische Faktoren ausgetauscht werden können, tragen letztendlich dazu bei, Reprogrammierungs-assoziierte Mechanismen besser verstehen zu können.

3.5 Ziel dieser Arbeit

Pcgf6 ist das einzige *Pcgf* Paralog, das eine erhöhte Genexpression in murinen ESCs aufweist. *Pcgf6* KD Studien in murinen ESCs lassen zudem eine wichtige Funktion von *Pcgf6* in ESCs vermuten. Der Mechanismus der *Pcgf6* Funktion ist jedoch nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Funktion von *Pcgf6* in der murinen iPS Reprogrammierung untersucht. Für *Pcgf4* konnte bereits eine Rolle in der Reprogrammierung somatischer Zellen nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Daten und der erhöhten Expression von *Pcgf6* in murinen ESCs, wurde auch für *Pcgf6* eine Funktion in der iPS Reprogrammierung angenommen. Um dies zu bestätigen, wurde die *Pcgf6* Expression in iPS Zellen und im Verlauf der iPS Reprogrammierung analysiert. Zusätzlich wurden die Faktoren Sox2, Klf4 und c-Myc einzeln durch *Pcgf6* ersetzt und die Auswirkungen auf die Reprogrammierungseffizienz ermittelt. Die generierten iPS Zellen wurden anschließend auf charakteristische Eigenschaften pluripotenter Zellen hin überprüft. Im weiteren Verlauf wurde die Funktion von *Pcgf6* während der iPS Reprogrammierung untersucht. Die Überexpression von *Pcgf6* zusammen mit den vier *OSKM* Faktoren sollte Aufschluss darüber geben, ob *Pcgf6* als möglicher *Enhancer*-Faktor der iPS Reprogrammierung agiert. Um zu überprüfen, ob *Pcgf6* einen essentiellen Faktor für die Reprogrammierung darstellt, wurden *Pcgf6* KD MEFs generiert und die Effizienzen nach *OSKM* Reprogrammierung dieser Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen analysiert.

Zusammengefasst sollte diese Arbeit dazu beitragen, eine Rolle für *Pcgf6* während der iPS Reprogrammierung nachzuweisen und *Pcgf6* als neuen und essentiellen Faktor der murinen iPS Reprogrammierung zu etablieren.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Generelle Reagenzien und Chemikalien

Reagenz / Chemikalie	Firma
1kb DNA <i>ladder plus</i>	Fermentas
6x DNA <i>loading dye</i>	Fermentas
0,25% Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen
0,05% Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
<i>ABsolute SybrGreen Mix</i>	Thermofisher
Ampicillin	Roth
Agarose	Sigma Aldrich
Borsäure	Sigma Aldrich
BSA	Sigma Aldrich
CaCl ₂	Sigma Aldrich
Chloroquin	Sigma Aldrich
DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindol)	Sigma Aldrich
EDTA	Roth
Eosin	Sigma Aldrich
Ethanol	Scheller
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
FuGENE® HD	Promega
Gelatine	Sigma Aldrich
Glukose	AppliChem
Hämatoxylin	Sigma Aldrich
Hepes	Sigma Aldrich
Hygromycin B	Sigma Aldrich
Isopropanol	AppliChem
KAc (Kaliumacetat)	J.T.Baker
KCl	AppliChem
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
LB Agar	AppliChem
LB Medium	AppliChem
MgSO ₄ (Magnesiumsulphat)	Merck/AppliChem
Mitomycin C	Sigma Aldrich
MnCl ₂ (Mangan(II)chlorid)	Roth
MOPS	AppliChem/Sigma Aldrich
Mowiol	CalBiochem
NaCl	AppliChem
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck
PFA (Paraformaldehyd)	AppliChem

Puromycin	Invitrogen
Propidiumjodid	Sigma Aldrich
Proteinase K	AppliChem
RbCl (Rubidiumchlorid)	Sigma Aldrich
SDS	AppliChem
<i>Tissue Tek</i>	OCT
Tris	AppliChem
Xylol	AppliChem

4.1.2 Puffer und Lösungen

EB Puffer: 10 mM Tris-HCL, pH 8.5

FACS Puffer: 0.3% BSA in PBS, pH 7.4

HBS Puffer (2x): 0.14 mM NaCl
5.1 mM KCl
0.7 mM Na₂HPO₄
0.02 mM Hepes
5.55 mM Glukose
pH 7.05

PBS: 137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1.76 mM KH₂PO₄
pH 7.4

TBE Puffer: 108 g Tris
55 g Borsäure
0.5 M EDTA 20 ml
H₂O auf 1 L

TE Puffer: 10 mM Tris-HCL, pH 8.0; 0.1 mM EDTA

TESS Puffer: 50 mM Tris, pH 8.0
100 mM EDTA
100 mM NaCl
1% SDS

TFB1 Puffer: 100 mM RbCl
30 mM KAc
50 mM MnCl₂
10 mM CaCl₂
15% Glycerin
pH 5.8

TFB2 Puffer: 10 mM MOPS
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15% Glycerin
pH 7.0

4.1.3 Zelllinien

HEK 293T: *Human embryonic kidney* (HEK) Zelllinie (ATCC, Wesel D)

NIH3T3: Murine Fibroblasten Zelllinie

Phoenix eco: Retrovirale-Verpackungszelllinie (transgene Zelllinie, die auf 293T Zellen basiert und die Gene *gag*, *pol* und *env* exprimiert, die notwendig für die Herstellung von Retroviren sind)

OG2 ESCs: Murine, *Oct4-eGFP* transgene ES Zelllinie (Expression von *eGFP* unter der Kontrolle des *Oct4* Promoters; genetischer Hintergrund CBA x C57BL/6; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hans Schöler)

4.1.4 Zellkulturmedien

MEF Medium:

Medium und Mediumzusätze	Konzentration	Volumen	Firma
DMEM (<i>low glucose</i>)		500 ml	PAA/Sigma
FCS	10%	50 ml	Gibco Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	1mM	5 ml	PAA
Natrium-Pyruvat	0.1 mg/ml	5 ml	PAA
L-Glutamin	2 mM	5 ml	PAA

Phoenix Medium:

Medium und Mediumzusätze	Konzentration	Volumen	Firma
DMEM (<i>low glucose</i>)		500 ml	PAA/Sigma
FCS	10%	50 ml	Gibco Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	1mM	5 ml	PAA
L-Glutamin	2 mM	5 ml	PAA

ESC Medium:

Medium und Mediumzusätze	Konzentration	Volumen	Firma
DMEM (<i>high glucose</i>)		500 ml	PAA/Sigma
FCS (getestet für ESCs)	10%	50 ml	Gibco Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	1mM	5 ml	PAA
Natrium-Pyruvat	0.1 mg/ml	5 ml	PAA
L-Glutamin	2 mM	5 ml	PAA
Nicht-essentielle Aminosäuren	1x	5 ml	PAA
β-Mercaptoethanol	0.1 mM	3.5 µl in 5 ml Hepes	PAA
LIF-konditioniertes Medium		500 µl	eigene Herstellung

EB Medium:

Medium und Mediumzusätze	Konzentration	Volumen	Firma
DMEM (<i>high glucose</i>)		500 ml	PAA/Sigma
FCS (getestet für ESCs)	10%	50 ml	Gibco Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	1mM	5 ml	PAA
Natrium-Pyruvat	0.1 mg/ml	5 ml	PAA
L-Glutamin	2 mM	5 ml	PAA
Nicht-essentielle Aminosäuren	1x	5 ml	PAA
β-Mercaptoethanol	0.1 mM	3.5 µl in 5 ml Hepes	PAA

Einfriermedium:

Medium und Mediumzusätze	Konzentration	Volumen	Firma
FCS	90%	45 ml	Gibco Invitrogen
DMSO	10%	5 ml	Sigma

4.1.5 Zellkulturplastik

Format	Firma
3 cm TC Schalen	Greiner
6 cm TC Schalen	Greiner
10 cm TC Schalen	Greiner
15 cm TC Schalen	Greiner
10 cm Suspensionsschalen	Greiner
24 <i>Well</i> Platten	Greiner
12 <i>Well</i> Platten	Greiner
6 <i>Well</i> Platten	Greiner
15 ml Röhrchen	Greiner
50 ml Röhrchen	Greiner
1.8 ml Kryoröhrchen	Thermo Scientific
75 cm ² Flaschen (red cap)	Sarstedt
175 cm ² Flaschen (red cap)	Sarstedt
70 µm Zellsieb	Becton Dickinson
45 µm Zelluloseacetat-Filter	Greiner
96 <i>Well</i> Platten für qRT-PCR	4titude

4.1.6 Plasmide

Plasmid	Antibiotika-Resistenz	Firma
pMXs-mOct4	Ampicillin	Addgene
pMXs-mSox2	Ampicillin	Addgene
pMXs-mKlf4	Ampicillin	Addgene
pMXs-mc-Myc	Ampicillin	Addgene
pMXs-mPcgf6	Ampicillin	selbst hergestellt
MISSION® pLKO.1-Puro	Ampicillin	Sigma Aldrich
MISSION® pLKO.1-Pcgf6shRNA-Puro	Ampicillin	Sigma Aldrich
pMDLg/p RRE	Ampicillin	Addgene
pRSV-Rev	Ampicillin	Addgene
pMD2.G	Ampicillin	Addgene
pReceiver-M62(a,x,y)	Ampicillin	GeneCopoeia

4.1.7 Pcgf6-spezifische shRNA Sequenz

Plasmid	Sequenz
MISSION® pLKO.1-Pcgf6shRNA-Puro	5'-CCGGCTGATAGATGCAACCACCATTCTCGAGAATGGTGGTTGCATCTATCAGTTTTTG-3'

4.1.8 Enzyme

Enzym	Firma
Super Taq Polymerase	ht biotechnology
KAPAHifi™ Polymerase	PeqLab
Restriktionsenzyme	NEB/Fermentas
T4 DNA Ligase	NEB
DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment	NEB
Antarktische Phosphatase	NEB
Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen

4.1.9 Primer

Primer	Sequenz
<i>Pcgf1</i> FW	5'-AGA TGG ACC CAC TAC GGA AC-3'
<i>Pcgf1</i> REV	5'-GCT GCG TCT CGT GGA TCT T-3'
<i>Pcgf2</i> FW	5'-CGG ACC ACA CGG ATT AAA ATCA-3'
<i>Pcgf2</i> REV	5'-CGA TGC AGG TTT TGC AGA AGG -3'
<i>Pcgf3</i> FW	5'-CAG GTA AGC ATC TGT CTG GAA TG-3'
<i>Pcgf3</i> REV	5'-GTA ACA ACC ACG AAC TTG AGA GT -3'
<i>Pcgf4</i> FW	5'-AAT TAG TCC CAG GGC TTT TCA A-3'
<i>Pcgf4</i> REV	5'-TCT TCT CCT CAT CTG CAA CTT CTC-3'
<i>Pcgf5</i> FW	5'-GTA AGA CCT GTA TTG TCC AGC AC-3'
<i>Pcgf5</i> REV	5'-TCT CGT AGT CCA GGC ACT AAT TT-3'
<i>Pcgf6</i> FW	5'-GGT TGG ACC GGC AGT TAC AA-3'
<i>Pcgf6</i> REV	5'-CGA AAC ACT GAC TCT AGG ACC T-3'
<i>Endo Pcgf6</i> FW	5'-GGA CGG TCT GCT TGT TCT TC-3'
<i>Endo Pcgf6</i> REV	5'-ATA TGC AGA TGC CTC CGA CT-3'
<i>Exo Transgen</i> FW	5'-CCC TCA AAG TAG ACG GCA TC-3'
<i>Exo Transgen</i> REV	5'-GAA GCG ACA GAT GGT GGT CT-3'
<i>Endo Oct4</i> FW	5'-TCT CCC ATG CAT TCA AAC TG-3'
<i>Endo Oct4</i> REV	5'-GCT CCT GAT CAA CAG CAT CA-3'
<i>Endo Sox2</i> FW	5'-TCT GTG GTC AAG TCC GAG GC-3'
<i>Endo Sox2</i> REV	5'-TTC TCC AGT TCG CAG TCC AG-3'
<i>Nanog</i> FW	5'-TCT TCC TGG TCC CCA CAG TTT-3'
<i>Nanog</i> REV	5'-GCA AGA ATA GTT CTC GGG ATG AA-3'
<i>Thy1</i> FW	5'-GCC TGA CCC GAG AGA AGA G-3'
<i>Thy1</i> REV	5'-GGA CCT TGA TAT AGG GCT GGT-3'
<i>Periostin</i> FW	5'-CTG GTA TCA AGG TGC TAT CTG C-3'
<i>Periostin</i> REV	5'-AAT GCC CAG CGT GCC ATA A-3'
<i>mRPL6</i> FW	5'-CGG GAG TAC CTG CCA ATT CC-3'
<i>mRPL6</i> REV	5'-GGT GAA AAA GCG CCT GAT ACA-3'
<i>Hprt</i> FW	5'-GCT GGT GAA AAG GAC CTC T-3'
<i>Hprt</i> REV	5'-CAC AGG ACT AGA ACA CCT-3'
<i>T</i> FW	5'-CAG CCC ACC TAC TGG CTC TA-3'
<i>T</i> REV	5'-GAG CCT CGA AAG AAC TGA GC-3'
<i>Flk1</i> FW	5'-TTT GGC AAA TAC AAC CCT TCA GA-3'
<i>Flk1</i> REV	5'-GCA GAA GAT ACT GTC ACC ACC-3'
<i>Gata4</i> FW	5'-CCC TAC CCA GCC TAC ATG G -3'
<i>Gata4</i> REV	5'-ACA TAT CGA GAT TGG GGT GTC T-3'
<i>Gata6</i> FW	5'-TTG CCT CCG GTA ACA GCA GTG-3'
<i>Gata6</i> REV	5'-GTG GTC GCT TGT GTA GAA GGA-3'
<i>FoxA2</i> FW	5'-TAG CGG AGG CAA GAA GAC C -3'
<i>FoxA2</i> REV	5'-CTT AGG CCA CCT CGC TTG T-3'
<i>Nestin</i> FW	5'-CAG AGA GGC GCT GGA ACA GAG ATT-3'
<i>Nestin</i> REV	5'-AGA CAT AGG TGG GAT GGG AGT GCT-3'
<i>Pax3</i> FW	5'-TCG GCC TTG CGT CAT TTC TC-3'
<i>Pax3</i> REV	5'-GAT GGC ACC AGG TCG GAT G -3'

4.1.10 Kommerzielle Kits

Kit	Firma
<i>Alkaline Phosphatase Staining kit</i>	Sigma Aldrich
<i>M-MLV Reverse Transkriptase kit</i>	Invitrogen
<i>PeqGOLD plasmid mini kit</i>	PeqLab
<i>PeqGOLD RNA Pure</i>	PeqLab
<i>PeqGOLD Total RNA kit</i>	PeqLab
<i>PureLink™ HiPure plasmid DNA Purification kit</i>	Invitrogen
<i>Wizard® SV Gel und PCR Clean Up System kit</i>	Promega

4.1.11 Erstantikörper

Antikörper	Firma
Biotin anti-Maus/Human SSEA-1	BioLegend
Anti-Maus Sox2	R&D Systems

4.1.12 Zweitantikörper

Antikörper	Firma
anti-Maus Cy5	Life Technologies
Anti-Maus-Streptavidin PE-Cy5	Becton Dickinson
Anti-Maus-Streptavidin PE-Cy7	Becton Dickinson

4.1.13 Mauslinien

Mauslinie	Eigenschaft	Herkunft
CrI:CD-1	Wild-typ	Charles River
C57BL/6	Wild-typ	Charles River
B6;CBA-Tg(Pou5f-eGFP)2Mnn/j	<i>Oct4</i> Promoter-gesteuerte <i>eGFP</i> Expression	Prof. Dr. Hans Schöler

4.1.14 Geräte und Mikroskope

Gerät / Mikroskop	Firma
<i>Axio Imager Z1.M</i> Mikroskop	Zeiss
FACS Canto I	Becton Dickinson
Gel Doc® XR+ System	BioRad
Kryostat CM1950	Leica
<i>Laser Scanning</i> Mikroskop LSM780	Zeiss
Inkubator Heracell 150	Thermo
Qubit Fluorometer	Invitrogen
Roche <i>Light Cycler</i> 480	Roche
Zellkulturmikroskop EVOS	AMG
B6;CBA-Tg(Pou5f-eGFP)2Mnn/j	Prof. Dr. Hans Schöler

4.1.15 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS4	Adobe
FACS DIVA	Becton Dickinson
ImageJ	NIH
Micron	EVOS AMG
Microsoft® Office 2011	Microsoft
ModFit™	Verity Software House
Roche Light Cycler Software	Roche
ZEN Software	Zeiss

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten Zelltypen in dieser Arbeit wurden in einem 37°C Inkubator, 5% CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

4.2.1.1 Auftauen von Zellen

Ein kryokonserviertes Röhrchen mit Zellen wurde in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zelllösung wurde anschließend in sterile 15 ml Röhrchen mit Zelltyp-spezifischem Wachstumsmedium überführt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in Zelltyp-spezifischem Wachstumsmedium re-suspendiert und die Zellen unter den in Abschnitt 4.2.1 angegebenen Bedingungen kultiviert.

4.2.1.2 Passagieren von Zellen

Alle Zelltypen wurden mit 1x PBS gewaschen und 3 – 5 min. bei 37°C mit 0,25%igem Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in sterile 15 ml Röhrchen mit Zelltyp-spezifischem Wachstumsmedium überführt und zentrifugiert. Die Pellets wurden in Zelltyp-spezifischem Wachstumsmedium re-suspendiert und nach Verdünnung passagiert. Zelltyp-spezifische Zentrifugationsbedingungen und Verdünnungen sind in Tabelle 1 beschrieben.

Tabelle 1: Zentrifugationsbedingungen und Verdünnungen für das Passagieren von Zellen.

Zelltyp	Zentrifugationsbedingungen	Format der verwendeten Gewebekulturplastik	Verdünnung	Medium
MEFs	5 min, 90g	T175 cm ² Flaschen	1:3	MEF
ESCs und iPS Zellen	5 min, 90g	6-Well Platten	1:10 – 1:20	ESC
293T Zellen	5 min, 90g	T75 cm ² Flaschen	1:10	MEF
Phoenix-eco Zellen	3 min, 1200rpm	T75 cm ² Flaschen	1:10	Phoenix

4.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Alle Zelltypen wurden wie unter Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben trypsinisiert und zentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend in eiskaltem Einfriermedium re-suspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Die Langzeit-Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

4.2.1.4 Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten (MEF)

MEFs wurden aus Crl:CD-1, C57BL/6 und B6;CBA-Tg(Pou5f-eGFP)2Mnn/j [247] Mäusen an den Tagen 12 – 14 der Embryonalentwicklung isoliert. MEFs aus Crl:CD-1 und C57BL/6 Mäusen wurden zur Herstellung von MEF *Feeder-layer*-Kulturen verwendet. MEFs aus B6;CBA-Tg(Pou5f-eGFP)2Mnn/j Mäusen wurden als Ausgangszellen in der iPS Reprogrammierung eingesetzt. Nach dem Auftauen wurden MEFs wie unter Abschnitt 4.2.1.2 kultiviert.

4.2.1.5 Isolation von MEFs

Zur Gewinnung von MEFs wurden die Embryos von allen extra-embryonalen Geweben getrennt und in 1x PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten unter einer Sterilbank. Zuerst wurden die Köpfe, die blutbildenden Organe und die Herzen der Mausembryonen entfernt. Anschließend wurde das restliche Gewebe mit einem Skalpell und einer Pinzette zerkleinert. Die Gewebestücke von drei Embryonen wurden vereinigt und über Nacht in 5 ml 0,05%igem Trypsin/EDTA bei 4°C inkubiert. Um die enzymatische Verdauung des Gewebes am nächsten Tag zu starten wurde die Gewebe-Trypsin Lösung für 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von MEF Medium wurde das Gewebe durch Pipettieren aufgeschlossen. Anschließend wurde die Gewebe-Trypsin Lösung für 5 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, damit sich große und unverdaute Gewebestücke absetzen konnten. Der Überstand wurde in ein neues steriles Röhrchen überführt und 5 min. bei 200g zentrifugiert. Die Pellets wurden in MEF Medium re-suspendiert und in 10 cm Gewebekulturschalen für 1 – 2 Tage kultiviert (1 Embryo in 10 ml Medium pro 10 cm Schale). Nachdem die MEFs eine Zelldichte von 90% erreicht hatten, wurden die Zellen mit der Passagenummer 0 (p0) kryokonserviert.

4.2.1.6 MEF-Inaktivierung zur Herstellung von *Feeder-layer*-Kulturen

MEFs der Passage p2 – p3 wurden 2 – 2,5h bei 37°C mit einer Mitomycin C Lösung (10 µg/ml Mitomycin C verdünnt in MEF Medium) inkubiert. Anschließend wurde die Mitomycin C Lösung abgenommen, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in MEF Medium re-suspendiert und die Lebend-Zellzahlen wurden mit Trypan Blau bestimmt. Für die Herstellung der MEF *Feeder-layer*-Kulturen wurden definierte Zellzahlen auf Gewebekulturplastik ausgesät (Tabelle 2).

Tabelle 2: Format der Gewebekulturplastik und Zellzahlen der MEF *Feeder-layer*-Kulturen.

Experiment	Format der Gewebekulturplastik	Zellzahl
Kultur der ESCs und iPS Zellen	6 cm Platte	3 – 4x10 ⁵ Zellen (5 ml Medium/Platte)
	oder 6-Well-Platte	2x10 ⁵ Zellen (2 ml Medium/Well)
iPS Reprogrammierung	6-Well-Platte	2x10 ⁵ Zellen (2 ml Medium/Well)

4.2.1.7 ESC- und iPS Zell-Kultur

OG2 ESCs und iPS Zellen wurden auf MEF *Feeder-layer*-Kulturen in ESC Medium kultiviert. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben passagiert. Für die Kryokonservierung wurden 1x10⁶ ESCs pro Röhrchen verwendet.

4.2.1.8 Herstellung *Feeder*-freier ESC- und iPS Zell-Lösungen

ESCs und iPS Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7 ml ESC Medium re-suspendiert und die Zellsuspension wurde 45 min. bei 37°C auf Gelatine-beschichteten (0,1% Gelatine), 10 cm Gewebekulturschalen inkubiert. In dieser Zeit setzten sich die Zellen am Plattenboden ab. Während die MEFs am Boden der Gelatine-beschichteten Schale festklebten, konnten die ESCs und iPS Zellen nach der Inkubationszeit mit einer Pipette und ESC Medium abgespült werden. Um Einzel-Zellsuspensionen herzustellen, wurde die Zelllösung zentrifugiert und das Zellpellet anschließend trypsinisiert, durch einen 70µm Zellsieb pipettiert, erneut zentrifugiert und das Pellet anschließend in Medium re-suspendiert.

4.1.2.9 Embryoid body (EB) Differenzierung von ESCs und iPS Zellen

Für die EB Differenzierung wurden *Feeder*-freie Einzel-Zellsuspensionen von ESCs und iPS Zellen wie unter Abschnitt 4.1.2.8 beschrieben hergestellt und zwei Tage als *Hanging-drops* differenziert. Hierzu wurde die Zellsuspension ($1,2 \times 10^4$ Zellen/ml verdünnt in EB Medium) tropfenweise auf die Innenseite des Deckels einer 15 cm Gewebekulturschale pipettiert (1000 Zellen/30 μ l/Tropfen; 3,6 ml Zellsuspension im Ganzen). Der Boden der Schale wurde mit 7 ml 1x PBS gefüllt um die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Schale aufrechtzuerhalten. Nach zwei Tagen wurden die Tropfen mit Medium abgespült und in 10 cm Suspensionsschalen (10 ml EB Medium/10 cm Schale) überführt. Die EBs wurden wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben kultiviert und alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Für die qRT-PCR Analyse wurden Tag 3, Tag 6 und Tag 9 EBs mit der Pipette gesammelt und in sterile 15 ml Röhrchen überführt. Nach Absinken der EBs wurde das Medium abgesaugt und die EBs zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die EBs trypsinisiert, zentrifugiert und Einzel-Zellsuspensionen hergestellt.

4.2.1.10 iPS Reprogrammierung

iPS Zellen wurden mittels retroviraler Transduktion von OG2 MEFs (p1) unter Verwendung publizierter Protokolle hergestellt [176, 184, 248]. Die Protokolle wurden jedoch leicht modifiziert.

4.2.1.10.1 Phoenix-eco Zell-Kultur

Phoenix-eco Zellen wurden wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben in Phoenix Medium mit 50 μ g/ml Hygromycin B kultiviert. Die Zellen wurden dreimal in der Woche im Verhältnis 1:4 verdünnt und passagiert. Für die Kryokonservierung wurden 2×10^6 Phoenix-eco Zellen pro Einfrier-Röhrchen verwendet.

4.2.1.10.2 Herstellung retroviraler Überstände

Die retroviralen Überstände für die iPS Reprogrammierung wurden mittels der Virus-verpackenden Zelllinie Phoenix-eco generiert. Hierzu wurden 1×10^6 Phoenix-eco Zellen pro *Well* einer 6-*Well* Platte in Phoenix Medium + 50 μ g/ml Hygromycin B ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium gegen 2 ml Phoenix Medium ohne Hygromycin B ausgetauscht und die Phoenix-eco Zellen wurden einzeln mit den Vektoren pMXs-mOct4, pMXs-mSox2,

pMXs-mKlf4, pMXs-mc-Myc und pMXs-mPcgf6 transfiziert. Die Transfektion erfolgte unter Verwendung des FuGENE® HD Transfektionsreagenz nach Herstellerprotokoll. Die retroviralen Überstände für die erste Runde der MEF-Transduktion wurden 48 Stunden später geerntet. Anschließend wurden die bereits transfizierten Zellen mit 2 ml frischen Phoenix Medium für weitere 24 Stunden kultiviert. Einen Tag später erfolgte die Ernte des retroviralen Überstandes für die zweite Runde der MEF-Transduktion.

4.2.1.10.3 Retrovirale Transduktion von OG2 MEFs

OG2 MEFs wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit den retroviralen Überständen in 6-Well Gewebekulturplatten transduziert. 24 Stunden vor der ersten Transduktion wurden 1×10^5 OG2 MEFs pro Well ausgesät. Die viralen Überstände wurden geerntet und durch einen Zelluloseacetat Filter der Porengröße 0,45 μm filtriert. Nach Zugabe von 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren wurden die Reprogrammierungs-Cocktails OSKM, OKM, OPKM, OSM, OSPM, OSK, OSKP und OSKMP aus jeweils gleichen Teilen der viralen Oct4-, Sox2-, Klf4-, c-Myc- und Pcgf6-Überstände hergestellt. Die am Vortag ausgesäten 1×10^5 MEFs/Well wurden mit 2 ml der jeweiligen Reprogrammierungs-Cocktails für 30 min. bei 2500rpm und 32°C zentrifugiert. Nach 15 min. wurden die 6-Well Gewebekulturplatten horizontal im Winkel von 180°C gedreht und für weitere 15 min. zentrifugiert. Nach 24h Inkubation wurde die Virussuspension abgenommen, die Zellen wurden dreimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend über Nacht mit MEF Medium unter Standardbedingungen kultiviert. 24h später wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 auf MEF *Feeder-layer*-Kulturen (2×10^5 Zellen/Well einer 6-Well Gewebekulturplatte) passagiert und in MEF Medium kultiviert. Einen Tag später wurde das MEF Medium gegen ESC Medium ausgetauscht. Dieser Zeitpunkt entsprach Tag 0 der iPS Reprogrammierung. Das ESC Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Nach einer ca. zwei-wöchigen Reprogrammierungsphase entstanden iPS Kolonien, die ESC-Morphologie zeigten. Diese Kolonien wurden mit einer Nadel gepickt und mit 0,25%igem Trypsin verdaut. Die Zellen einer iPS Kolonie wurden anschließend in ein Well einer 24-Well MEF-*Feeder-layer* Gewebekulturplatte überführt und in ESC Medium unter Standardbedingungen und der Passage p0 kultiviert. Nachdem die iPS Zellen neue Kolonien gebildet hatten, wurde ein 24-Well auf ein Well einer 12-Well MEF-*Feeder-layer* Gewebekulturplatte passagiert (p1). Anschließend wurden die iPS Kolonien im 6-Well Format kultiviert.

4.2.1.11 Herstellung lentiviraler Überstände

Die lentiviralen Überstände für die Herstellung von Scrambled (Scr) und *Pcgf6* KD MEFs wurden mittels HEK293T Zellen generiert.

4.2.1.11.1 HEK293T Zellkultur

Die HEK293T Zellen wurden auf einer 10 cm Gewebekulturschale in 10 ml MEF Medium kultiviert. Nachdem die Zellen eine Dichte von 80 – 90% erreichten, wurden die HEK293T Zellen trypsinisiert, zentrifugiert und im Verhältnis 1:10 verdünnt und passagiert. Für die Kryokonservierung wurde eine Schale mit einer 80 – 90%igen Zelldichte pro Einfrier-Röhrchen verwendet.

4.2.1.11.2 Transfektion der HEK293T Zellen

Für die Herstellung der lentiviralen Überstände wurden $1,4 \times 10^6$ HEK293T Zellen pro 10 cm Gewebekulturschale in MEF Medium ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium gegen 10 ml MEF Medium, das 25 μ M Chloroquin enthielt, ausgetauscht. Die Transfektion erfolgte mittels der Calcium-Phosphat Präzipitationsmethode. Die HEK293T Zellen wurden mit einem Cocktail bestehend aus den Verpackungsplasmiden pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, pMD2.G und den pLKO.1 Vektoren der Scr Kontrolle oder der *Pcgf6*-spezifischen shRNA (pLKO.1-empty-puro; pLKO.1-Pcgf6shRNA-puro) transfiziert. Die Zusammensetzung der einzelnen Plasmid-Cocktails ist in Tabelle 3 beschrieben. 6 – 8h nach der Transfektion wurde das Medium gegen MEF Medium ohne Zusätze ausgetauscht. 48h nach der Transfektion wurden die lentiviralen Überstände geerntet.

Tabelle 3. Plasmid-Zusammensetzung zur Herstellung lentiviraler Überstände.

	pLKO.1-Scr	pLKO.1-Pcgf6
Scr-Kontrolle oder shRNA-spezifischer pLKO.1 Vektor	20 µg	20 µg
pMDLg/pRRE	10 µg	10 µg
pRSV-Rev	5 µg	5 µg
pMD2.G	6 µg	6 µg
H₂O	→ 500 µl Endvolumen	→ 500 µl Endvolumen
2x HBS Puffer	500 µl	500 µl
2.5 mM CaCl₂	50 µl	50 µl

4.2.1.11.3 Lentivirale Transduktion von OG2 MEFs

Die lentivirale Transduktion von OG2 MEFs erfolgte nach einem Protokoll der LentiWeb.com Internetseite. Hierzu wurden 1×10^4 OG2 MEFs (p1) einen Tag vor der Transduktion pro *Well* einer 6-*Well* Gewebekulturplatte in MEF Medium ausgesät. Nach dem Ernten der lentiviralen Überstände wurden diese durch einen Zelluloseacetat Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert und 8 µg/ml Polybren zugegeben. Ein *Well* MEF Zellen wurde mit 2 ml des lentiviralen Überstandes versehen. Anschließend wurden die Platten für 1h bei 2500 rpm, 32°C zentrifugiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde der lentivirale Überstand abgenommen, die Zellen wurden dreimal mit 1x PBS gewaschen und in MEF Medium kultiviert. 24h später begann die Selektion der Zellen mit 1 µg/ml Puromycin. Das Medium wurde täglich gewechselt. 5 Tage nach der lentiviralen Transduktion wurden die Zellen für die iPS Reprogrammierung ausgesät.

4.2.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Hitzeschocktransformation

5 ml LB Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 180 rpm, 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernacht-Kultur im Verhältnis 1:100 in 200 ml LB Medium mit 2% 1M MgSO₄ und 1% 1M KCl verdünnt und bei 180 rpm, 37°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 kultiviert. Anschließend wurde die Bakterienkultur in vorgekühlte 50 ml Röhrchen überführt, 10 min. auf Eis heruntergekühlt und für 10 min. bei 4000 rpm, 4°C zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in eiskaltem TFB1 Puffer (15 ml pro 50 ml Bakterienkultur) re-suspendiert und erneut für 10 min. bei 400 rpm, 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Pellets in TFB2 Puffer (2 ml pro 50 ml Bakterienkultur) re-suspendiert. Die Bakterien wurden als 150 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Alle Schritte erfolgten auf Eis.

4.2.2.2 Hitzeschocktransformation der kompetenten Bakterien

Ein gefrorenes Aliquot kompetenter Bakterien wurde langsam auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurden 1 – 10 ng Plasmid-DNA oder 150 – 200 ng DNA pro 10 µl Ligationsansatz zu den Bakterien pipettiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien 90 sec. lang einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Anschließend wurden die Transformationsansätze 2 min. auf Eis inkubiert, 750 µl LB Medium pro Ansatz hinzu pipettiert und für 1h bei 180 rpm, 37°C kultiviert. Nach ein-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde das Bakterienpellet in 100 µl LB Medium re-suspendiert und auf antibiotikahaltigen LB Agarplatten ausgestrichen, welche über Nacht bei 37°C kultiviert wurden.

4.2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA im Mini- und Maxi-Präparations-Format

Für die Mini- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA wurden 5 ml antibiotikahaltiges LB Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 180 rpm, 37°C kultiviert. Die Mini-Präparation erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Mini Kit der Firma Peqlab nach Herstellerprotokoll. Für die Maxi-Präparation von Plasmid-DNA wurde die bakterielle Übernacht-Kultur 1:1000 in 200 – 500 ml antibiotikahaltigem LB Medium verdünnt und über Nacht bei 180 rpm, 37°C kultiviert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem PureLink™HiPure Plasmid DNA Purification Kit der Firma Invitrogen nach

Herstellerprotokoll. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in Wasser oder TE-Puffer re-suspendiert und bei -20°C gelagert.

4.2.2.4 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Kontrollverdaue wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl und präparative Verdaue, zur Gewinnung von DNA-Fragmenten für die Klonierung, in einem Gesamtvolumen von 20 – 50 µl durchgeführt. Der Verdau von Plasmid-DNA erfolgte mit 1 Unit Enzym pro 1 µg Plasmid-DNA, Wasser und Enzym-spezifischem Puffer nach Herstellerangaben.

4.2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Enzymatisch-verdaute Plasmid-DNA als auch PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch nach ihrer DNA Basen-Größe aufgetrennt. Hierzu wurden 0,7 – 1,5%ige Agarosegele (hergestellt in 1x TBE-Puffer) mit 0,7 µg/µl Ethidiumbromid verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 8 – 10 V/cm für 30 – 60 min. Zur Analyse wurden die Agarosegele mit dem BioRad Gel Doc® XR+ System fotografiert. Zur Ermittlung der Basen-Größe der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Größen Standard verwendet.

4.2.2.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente für die Klonierung wurden anhand Ihrer DNA Basen-Größe identifiziert und unter UV Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit der Firma Promega nach Herstellerprotokoll.

4.2.2.7 Generierung von *Blunt-ends* und De-Phosphorylierung von Vektor-DNA

Die Generierung von *Blunt-ends* erfolgte mit DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment. Für die De-Phosphorylierung von *Blunt-end*-Vektoren wurde Antarktische Phosphatase verwendet. In beiden Fällen wurde nach Herstellerprotokoll gearbeitet.

4.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Sticky- und *Blunt-end* Ligationen wurden mit einer T4 DNA Ligase der Firma NEB nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor- zu *Insert*-DNA betrug für *Sticky-end* Ligationen 1:3 und für *Blunt-end* Ligationen 1:5. Die Menge der benötigten *Insert*-DNA errechnete sich wie folgt:

Sticky-end Ligation

ng *Insert*-DNA = (bp *Insert*-DNA/bp Vektor-DNA) * ng Vektor-DNA *3

Blunt-end Ligation

ng *Insert*-DNA = (bp *Insert*-DNA/bp Vektor-DNA) * ng Vektor-DNA *5

4.2.2.9 Klonierung des pMXs-mPcgf6 Plasmid-DNA Vektors

Für die Klonierung des pMXs-mPcgf6 Plasmid-DNA Vektors wurden der pReceiver-M62(a,x,y) und pMXs-mSox2 Plasmid-DNA Vektor verwendet. Zur Gewinnung der kodierenden Region der murinen *Pcgf6* Sequenz (mPcgf6 cds) wurde der pReceiver-M62(a,x,y) Plasmid-DNA Vektor mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI wie in Abschnitt 4.2.2.4 beschrieben verdaut. Zur Gewinnung des pMXs-Vektor Gerüsts wurde der pMXs-mSox2 Plasmid-DNA Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und Sall verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten Plasmid-DNA wurden sowohl das pMXs-Vektor Gerüst als auch die mPcgf6 cds aus dem Agarosegel extrahiert und nach Aufreinigung, *Blunt-end*-Generierung und De-Phosphorylierung des pMXs-Vektor Gerüsts wie in Abschnitt 4.2.2.8 ligiert.

Zur Überprüfung der Klonierung wurden diverse Kontrollverdaue durchgeführt. Außerdem wurde der pMXs-mPcgf6 Vektor bei der Firma Eurofins MWG Operon sequenziert. Zudem wurde eine RT-PCR mit pMXs-mSox2 und Pcgf6-spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

4.2.2.10 RNA Isolation

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen wurde entweder das peqGOLD RNA Pure Reagenz oder das peqGOLD Total RNA Kit der Firma Peqlab verwendet. In beiden Fällen wurde nach Herstellprotokoll gearbeitet. Die RNA Konzentration wurde anschließend fluorimetrisch mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer der Firma Invitrogen bestimmt.

4.2.2.11 cDNA Synthese

Zur Herstellung von cDNA wurde die isolierte Gesamt-RNA aus Zellen revers transkribiert. Hierzu wurden Oligo_(dT)Primer und die M-MLV Reverse Transkriptase der Firma Invitrogen verwendet. Die reverse Transkription erfolgte nach folgendem Protokoll:

Schritt I: Verdau der genomischen DNA

- 1 – 2 µg RNA
- 10X DNaseI Puffer 1,3 µl
- 200 U/µl DNaseI 1,0 µl
- DEPC H₂O 13,0 µl Gesamtvolumen
- Inkubation für 30min., 37°C

Schritt II: Abstoppen der Verdaureaktion

- 7% v/v 25 mM EDTA 1,0 µl
- Hitze-Inaktivierung für 10 min., 65°C

Schritt III: *Annealing* der Oligo_(dT)Primer

- 100 µM Oligo_(dT)primer 1,0 µl
(5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 3')
- DEPC H₂O 4,5 µl
- Inkubation für 5 min., 65°C

Schritt IV: cDNA Synthese

- 5x First-Strand Puffer 4,0 µl
- 0.1µM DTT 2,0 µl
- 10 mM dNTPs 1,0 µl
- 200U/µl M-MLV Reverse Transkriptase 0,6 µl
- Synthese für 1h, 37°C

4.2.2.12 Quantitative *Real-time* (qRT)-PCR

Die quantitative *Real-time* (qRT)-PCR wurde mit dem *LightCycler*®480 System der Firma Roche durchgeführt. Die qRT-PCR Proben wurden nach folgendem Schema pipettiert:

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 <i>SybrGreen</i> Mix	10,0 µl

Standard-Einstellungen des *LightCycler*®480:

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.

Im Falle der Gene *Pcgf1*, 2, 3, 4 und 5 wurden folgende Einstellungen verwendet:

15 min., 95°C
 45 Zyklen (10 s, 95°C; 20 s, 67°C minus 1°C in jedem Zyklus bis 60°C erreicht sind;
 30 s, 72°C; 20 s, 80°C)
 65°C – 95°C mit einem Temperaturanstieg von 0,5°C/5 s.

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

4.2.2.13 Isolation genomischer DNA aus Mausohr-Biopsien

Ohrbiopsien wurden im Tierstall des ZEMM der Universität Würzburg genommen und sofort bei -20°C gelagert. Zur Isolierung genomischer DNA wurden die Ohrbiopsien über Nacht in 750 µl TESS Puffer und 25 µl Proteinase K rotierend bei 56°C verdaut. Am nächsten Tag wurden 250 µl einer gesättigten NaCl (5M) Lösung zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 10 min. bei 200 rpm, RT inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-*Tube* mit 500 µl Isopropanol überführt. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT wurden die Proben erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA Pellet in 500 µl TESS Puffer re-suspendiert. Anschließend wurden 250 µl Isopropanol zugegeben, die Proben wurden gemischt und zentrifugiert. Danach wurde das DNA Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, für

30 – 60 min. bei 37°C getrocknet und in 150 µl EB Puffer gelöst. Nach langsamer Rotation für 1 – 2h bei 37°C wurden die DNA Proben bei -20°C gelagert.

4.2.2.14 Genotypisierung von Mäusen

OPKM-induzierte Mauschimären und Keimbahn-Nachkommen wurden anhand einer Reversen Transkriptase (RT)-PCR unter Verwendung genomischer DNA und Transgen-spezifischer *Primer* genotypisiert. Als Kontrolle wurde ein *Primer*-Paar verwendet, das spezifisch das endogene *Pcgf6* Transkript bindet. Als Referenz wurde ein *mHprt*-spezifisches *Primer*-Paar verwendet. Die RT-PCR Proben wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Reagenz	Volumen
Genomische DNA	3,00 µl
5x KAPAHifi™ GC Puffer mit MgCl ₂	5,00 µl
10mM dNTPs	0,75 µl
10 µM Vorwärts- <i>Primer</i>	0,75 µl
10 µM Rückwärts- <i>Primer</i>	0,75 µl
1U/µL KAPAHifi™ DNA Polymerase	0,50 µl
H ₂ O	25,00 µl Gesamtvolumen

PCR Einstellungen:

Schritt 1: 5 min., 95 °C

Schritt 2: 20 sec., 98 °C

Schritt 3: 15 sec., 60 °C

Schritt 4: 30 sec., 72 °C

Schritt 5: 35 x Schritt 2 – 4

Schritt 6: 5 min., 72 °C

Schritt 7: 4 °C

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die DNA Basen-Größe für das Transgen sollte 710 bp betragen, für endogenes *Pcgf6* 108 bp und für *Hprt* 1087 bp.

4.2.2.15 RT-PCR Analyse der *Scr* und *Pcgf6* KD iPS Kolonien

Für die Analyse der *Oct4*, *Sox2* und *Nanog*-spezifischen Genexpression in *Scr* und *Pcgf6* KD iPS Kolonien wurden einzelne Kolonien mit einer Nadel aus den Reprogrammierungskulturen gepickt und für die RNA Isolation vereinigt. Nach der cDNA Synthese wurde eine RT-PCR mit *Oct4*-, *Sox2*- und *Nanog*-spezifischen *Primer*-Paaren durchgeführt. Die DNA Basen-Größe für *Oct4* betrug 184 bp, für *Sox2* 254 bp und für *Nanog* 100 bp. Als Referenz wurde ein *mRPL6*-spezifisches *Primer*-Paar (191 bp) verwendet. Die PCR Proben wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Reagenz	Volumen
cDNA	1,00 µl
10x SuperTaq Puffer mit MgCl ₂	5,00 µl
2.5mM dNTPs	1,00 µl
10 µM Vorwärts- <i>Primer</i>	1,00 µl
10 µM Rückwärts- <i>Primer</i>	1,00 µl
5U/µL SuperTaq DNA Polymerase	0,15 µl
H ₂ O	50,00 µl Gesamtvolumen

PCR Bedingungen:

Schritt 1: 5 min., 95 °C

Schritt 2: 20 sec, 94 °C

Schritt 3: 15 sec, 60 °C

Schritt 4: 90 sec, 72 °C

Schritt 5: 35 x Schritt 2 – 4

Schritt 6: 10 min., 72 °C

Schritt 7: 4 °C

4.2.3. Alkaline Phosphatase Färbung

ESCs und iPS Zellen wurden für 15 min. mit 3,5% PFA bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit einem Alkaline Phosphatase Staining Kit der Firma Sigma nach Herstellerangaben gefärbt. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Phasen-Kontrast Mikroskop gemacht.

4.2.4 Immunologische Methoden

4.2.4.1 Immunofluoreszenz Färbungen

Für Immunofluoreszenz Färbungen von ESCs und iPS Zellen wurden zunächst Mitomycin C-behandelte MEFs auf runde Glasplättchen in einer 24-Well Gewebekulturplatte ausgesät. 24h später wurden ESCs oder iPS Zellen auf die MEF-Glasplättchen ausgesät. Nach 1 – 2 Tagen wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 15 min. bei RT mit 3,5% PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS (jeweils für 5 min.) gewaschen und 1h mit Blocklösung (0,1% TritonX-100, 0,2% Gelatine, 5% Ziegen Serum verdünnt in 1x PBS) inkubiert. Dies diente der Permeabilisierung der Zellen und dem Blockieren unspezifischer Antikörperbindestellen. Danach wurden die Zellen 2 – 3 mal für jeweils 5 min. in Waschpuffer (0,1% TritonX-100 verdünnt in 1x PBS) gewaschen und mit dem Erstantikörper (anti-Maus Sox2 1:500 in Waschpuffer verdünnt; Biotin anti-Maus/Human SSEA-1 1:500 in Waschpuffer verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut zweimal in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 250 µl der Zweitantikörper-Verdünnung (anti-Maus-Cy5 1:200 verdünnt in Waschpuffer für anti-Maus Sox2 und anti-Maus-Streptavidin-PE-Cy5 1:200 verdünnt in Waschpuffer für anti-Maus/Human SSEA-1) im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal in Waschpuffer gewaschen und für 5 min. mit einer DAPI-Lösung (0,1 µg/ml verdünnt in 1x PBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Glasplättchen in Mowiol eingebettet und getrocknet. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axio Imager Z1.M Mikroskop gemacht.

4.2.4.2 FACS Analysen

FACS Analysen wurden an einem BD FACS Canto I und mittels der FACS Diva *Software* der Firma BectonDickinson durchgeführt.

4.2.4.2.1 Zelloberflächen Färbungen

Für die SSEA-1 Färbungen wurden 2×10^5 Zellen in 100 µl FACS Puffer und 0,25 µl Biotin anti-Maus/Human SSEA-1 für 20 min., 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml FACS Puffer gewaschen und anschließend für 20 min. bei 4°C mit anti-Maus-Streptavidin-PE-Cy7 (1:1000 verdünnt in FACS Puffer) inkubiert. Nach einmaligem Waschen in 1 ml

FACS Puffer wurde das Pellet in 100 – 200 µl FACS Puffer re-suspendiert und für die Analyse verwendet.

4.2.4.2.2 FACS Analyse der *Oct4-eGFP* Transgenexpression

Für die Analyse der *Oct4-eGFP* Transgenexpression wurden ESCs und iPS Zellen in 100 µl FACS Puffer gelöst. Das GFP Signal wurde im FITC Kanal des FACS Canto I gemessen.

4.2.4.2.3 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse wurden 2×10^5 Zellen in 70%igem, eiskalten Ethanol für 30 min., 20°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS wurden die Zellen in 200 µl 1x PBS re-suspendiert und mit 100 µg/ml RNase und 50 µg/ml Propidiumjodid (PI) für 30 min., 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss sofort für die FACS Analyse verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der *ModFit* Software.

4.2.5 Histologische Methoden

4.2.5.1 Herstellung von Kryoschnitten

PFA-fixierte Teratome wurden in *TissueTek* eingebettet und bei -80°C gelagert. Für die histologischen Analysen wurden mit einem Kryostaten 8 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Glas und bei -20°C gelagert.

4.2.5.2 Hämatoxylin – Eosin (H&E) Färbung

Die Kryoschnitte wurden bei RT aufgetaut und für 10 min. luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 8 min. in 100%igem Aceton inkubiert. Nach 10-minütiger Lufttrocknung wurden die Schnitte für 5 min. in Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation in Hämatoxylin für 8 min., zwei Waschschrte und eine 10-minütige Inkubation in Eosin. Nach kurzem Waschen in Wasser erfolgte eine Inkubation in 70%igem Ethanol und anschließend in 100%igem Xylol. Nach Lufttrocknung erfolgte die Analyse mit einem Leica DM IRBE *Laser-Dissection* Mikroskop.

4.2.6 Mausexperimente

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden nach den Vorgaben der Tierschutzrichtlinien der Regierung von Unterfranken, Würzburg, Deutschland durchgeführt.

4.2.6.1 Induktion von Teratomen

Für die Induktion von Teratomen wurden 100 μ l einer Einzel-Zellsuspension von ESCs und iPS Zellen (1×10^7 Zellen verdünnt in 1 ml 1x PBS) subkutan in die dorsale Flanke drei Monate alter NOD-scid IL2Rg^{null} (NSG) Mäuse injiziert, die vorher mit Isofluran anästhesiert wurden. Das Tumorstadium und das Wohlergehen der Tiere wurde alle 1 – 2 Tage kontrolliert. Bevor die Tumore eine durchschnittliche Größe von 2 cm erreichten, wurde der Versuch beendet. Die Teratome wurden isoliert und in 3.5%igem PFA fixiert.

4.2.6.2 Injektion von iPS Zellen in Blastozysten

Für die Injektion von iPS Zellen in Blastozysten wurden Einzel-Zellsuspensionen *Feeder*-freier, OPKM-induzierter iPS Zellen hergestellt. Die Injektion erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Albrecht M. Müller am MSZ im ZEMM durch die Technische Assistentin Frau Veronika Hornich. Insgesamt wurden zwei OPKM-induzierte iPS Zelllinien mit einem genetischen C57BL/6 Hintergrund (schwarze Fellfarbe) in E3.5 Blastozysten von C57BL/6 Albino Mäusen (weiße Fellfarbe) injiziert.

4.2.7 Statistische Analysen

Für die quantitative Analyse wurde entweder der Standardfehler (standard error of the mean; SEM) oder die Standardabweichung (STABW) von 2 – 3 Experimenten berechnet. Die Signifikanz wurde mittels der Student'schen t-Verteilung (t-Test) und der Software *Microsoft Excel* berechnet. Die Signifikanz wurde in folgende Gruppen unterteilt:

- *, $p \leq 0.05$: signifikant,
- **, $p \leq 0.01$: sehr signifikant,
- ***, $p \leq 0.001$: hoch signifikant.

5. Ergebnisse

5.1 *Pcgf6* zeigt eine erhöhte Genexpression in induzierten pluripotenten Stammzellen

Pcgf6 ist das einzige Pcgf Paralog, das eine erhöhte Expression in murinen ESCs aufweist [140]. Basierend auf diesem charakteristischen Genexpressionsmuster, sollte in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob *Pcgf6* auch in murinen iPS Zellen das einzige Pcgf Paralog mit erhöhter Transkription ist. Hierzu wurden MEFs unter Verwendung des „Yamanaka“ OSKM Cocktails reprogrammiert. Anschließend wurden die Genexpressionsmuster von *Pcgf1* – 6 in klonalen iPS Zellen mittels qRT-PCR analysiert und mit der Expression in ESCs und MEFs verglichen.

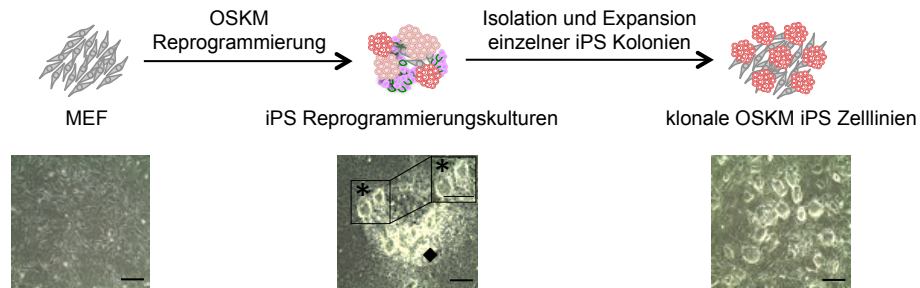
Die experimentelle Strategie zur Etablierung klonaler iPS Zelllinien ist schematisch in Abbildung 3A dargestellt. Zudem sind mikroskopische Übersichtsaufnahmen der Kulturen zu Beginn, nach Reprogrammierung und nach Etablierung klonaler Zelllinien gezeigt. Für die Reprogrammierung wurde ein Cocktail, bestehend aus jeweils gleichen Teilen der Faktoren *Oct4* (O), *Sox2* (S), *Klf4* (K) und *c-Myc* (M) (OSKM) in *Oct4-eGFP* transgenen (OG2) MEFs exprimiert. Die Verwendung von OG2 MEFs erlaubt die Charakterisierung und Identifikation pluripotenter Zellen, da das Transgen im Zuge einer Aktivierung des endogenen Pluripotenznetzwerkes zu einer *Oct4*-Promoter gesteuerten *eGFP* Expression führt. Nach einer zweiwöchigen Reprogrammierungsphase entwickelten sich aus den OSKM-transfizierten MEFs iPS Reprogrammierungskulturen. Diese bestanden aus einem Gemisch an *Feeder*-Zellen, nicht reprogrammierten MEFs, teils-reprogrammierten Einzelzelltypen und intermediären iPS Formationen als auch voll-reprogrammierten iPS Kolonien. Letztere weisen eine ESC-spezifische Morphologie auf und sind hinsichtlich ihrer zellulären Eigenschaften ähnlich den ESCs [176-187].

Um homogene Kulturen zu generieren, die ausschließlich voll-reprogrammierte OSKM iPS Zellen enthalten, wurden einzelne Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie aus den iPS Reprogrammierungskulturen isoliert und als klonale OSKM iPS Zelllinien etabliert (Abb. 3A). Die individuellen Genexpressionsmuster von *Pcgf1* – 6 in MEFs, ESCs und in drei repräsentativen OSKM iPS Zelllinien sind in Abbildung 3B dargestellt. Die Expression von *Pcgf1* – 6 ist in allen drei getesteten OSKM iPS Zelllinien vergleichbar zur Expression in ESCs. Im Vergleich zu MEFs zeigte nur *Pcgf6* eine erhöhte Expression in iPS Zellen und ESCs. *Pcgf2* wurde in iPS Zellen, ESCs und MEFs vergleichbar stark exprimiert und *Pcgf1*,

3, 4 und 5 zeigten im Vergleich zu MEFs eine überwiegend verminderte Expression in iPS Zellen und ESCs.

Zusammenfassend belegen diese Daten ein ESC-ähnliches, Paralog-spezifisches Genexpressionsmuster von *Pcgf1 – 6* in induzierten pluripotenten Stammzellen, wobei *Pcgf6* auch in iPS Zellen das einzige *Pcgf* Paralog mit einer erhöhten Genexpression ist.

A



B

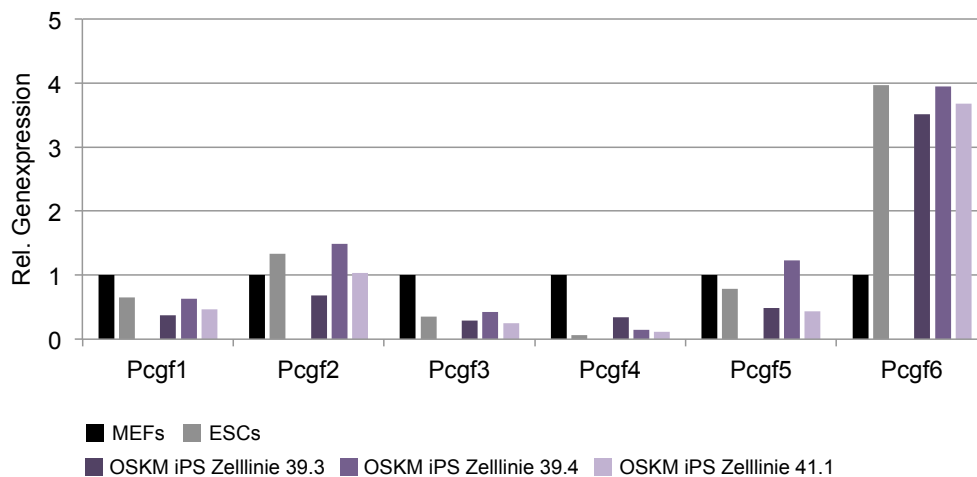


Abb. 3: *Pcgf1 – 6* Genexpression in OSKM-induzierten iPS Zellen. A) Schematische Darstellung der OSKM iPS Reprogrammierung und Etablierung klonaler OSKM iPS Zelllinien. Die OSKM Faktoren wurden mittels retroviraler Transduktion in OG2 MEFs exprimiert. Nach einer zweiwöchigen Reprogrammierungsphase entstanden iPS Reprogrammierungskulturen, die sich aus nicht reprogrammierten MEFs (grau), teils-reprogrammierten Einzelzelltypen (pink), prä-iPS Formationen (◆, rosa) und voll-reprogrammierten iPS Kolonien (*, rot-weiß) mit eindeutiger ES Zellmorphologie zusammensetzten. Nach Isolation einzelner, voll-reprogrammierter iPS Kolonien wurden diese als klonale OSKM iPS Zelllinien (rot-weiß) auf Feederzellen (grau) expandiert. Mikroskopische Übersichtsaufnahmen zeigen MEF-Kulturen, iPS Reprogrammierungskulturen und Kulturen klonaler OSKM iPS Zelllinien. Maßstab: 200 μ m. **B)** Das Diagramm zeigt die relative Genexpression von *Pcgf1 – 6* in drei repräsentativen OSKM iPS Zelllinien im Vergleich zu ESCs und MEFs. Die Genexpression wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode unter der Verwendung von *mRPL6* als Referenzgen berechnet. Der Genexpressionswert in MEFs wurde auf 1 gesetzt. Insgesamt wurden vier OSKM iPS Zelllinien aus drei unterschiedlichen Reprogrammierungsansätzen analysiert.

5.2 Die *Pcgf6* Expression wird im Verlauf der iPS

Reprogrammierung re-aktiviert

Bisher wurde eine ESC-ähnliche, erhöhte Genexpression von *Pcgf6* in iPS Zellen nachgewiesen. Bereits veröffentlichte Daten zeigen neben einer erhöhten Expression von *Pcgf6* in ESCs auch, dass die Expression von *Pcgf6* im Verlauf der EB Differenzierung abnimmt [140]. Dies lässt vermuten, dass *Pcgf6* spezifisch in pluripotenten Zellen exprimiert ist. Um zu bestätigen, dass die erhöhte *Pcgf6* Expression mit dem pluripotenten Zellstatus assoziiert ist, wurde untersucht, ob und wie sich das Genexpressionsmuster von *Pcgf6* während der ES Zelldifferenzierung und im Verlauf der iPS Reprogrammierung verändert. Hierzu wurden zunächst ESCs *in vitro* als *embryoid bodies* (EBs) differenziert. Die Genexpression von *Pcgf6* wurde an Tag 3, 6 und 9 der ES Zelldifferenzierung mittels qRT-PCR analysiert und der *Pcgf6* Expression in undifferenzierten ESCs (Tag 0) gegenübergestellt. Wie Abbildung 4A zeigt, verändert sich die *Pcgf6* Genexpression an Tag 3 im Vergleich zu undifferenzierten ESCs (Tag 0) nicht. An Tag 6 und Tag 9 der Differenzierung konnte jedoch eine 40 – 50%ige Reduktion der *Pcgf6* Expression festgestellt werden. In Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Daten zeigen diese Ergebnisse, dass die *Pcgf6* Expression mit einhergehendem Verlust der Pluripotenz abnimmt.

Da *Pcgf6* in iPS Zellen exprimiert ist, wurde weiterhin angenommen, dass die *Pcgf6* Expression im Verlauf der iPS Reprogrammierung re-aktiviert wird. Um dies zu bestätigen, wurde die *Pcgf6* Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkt der OSKM Reprogrammierung untersucht. Wie in den Abbildungen 4B und 4C gezeigt, wurde die *Pcgf6* Expression in nicht-transduzierten MEFs (Tag -5) und in Tag 0, 6, 10 und 15 iPS Reprogrammierungskulturen analysiert. Der Zeitpunkt Tag 0 repräsentiert einen frühen Zeitpunkt der iPS Reprogrammierung. Diese Phase der Reprogrammierung ist vor allem durch die Repression somatischer Gene gekennzeichnet [181, 189, 192-195]. Tag 6 und Tag 10 repräsentieren intermediäre Phasen. In dieser Phase der Reprogrammierung kommt es zur Ausbildung intermediärer iPS Kolonien, die nur partiell-reprogrammiert sind, in denen aber frühe Pluripotenzmarker exprimiert werden [193, 195, 200]. Tag 15 stellt einen späten Zeitpunkt der Reprogrammierung dar, an dem voll-reprogrammierte iPS Kolonien endogene Pluripotenzmarker exprimieren und eine ESC-ähnliche Morphologie aufweisen [179, 181, 191, 193, 195, 203]. Wie in Abb. 4C gezeigt, konnte bereits an Tag 0 der OSKM Reprogrammierung im Vergleich zu nicht-transduzierten MEFs eine um 92.9% erhöhte *Pcgf6* Expression festgestellt werden. An Tag 6 der Reprogrammierung sank die *Pcgf6* Expression leicht ab. Im Vergleich zu nicht-transduzierten MEFs konnte an den Tagen 10

und 15 wieder eine erhöhte *Pcgf6* Expression um 99.2% bzw. 102,05% nachgewiesen werden (Abb. 4C).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass *Pcgf6* im Laufe der OSKM Reprogrammierung re-aktiviert wird. Die individuellen Muster der *Pcgf6* Genexpression im Verlauf der ES Zelldifferenzierung und im Zuge der iPS Reprogrammierung lassen eine spezifisch erhöhte *Pcgf6* Expression in pluripotenten Zellen vermuten.

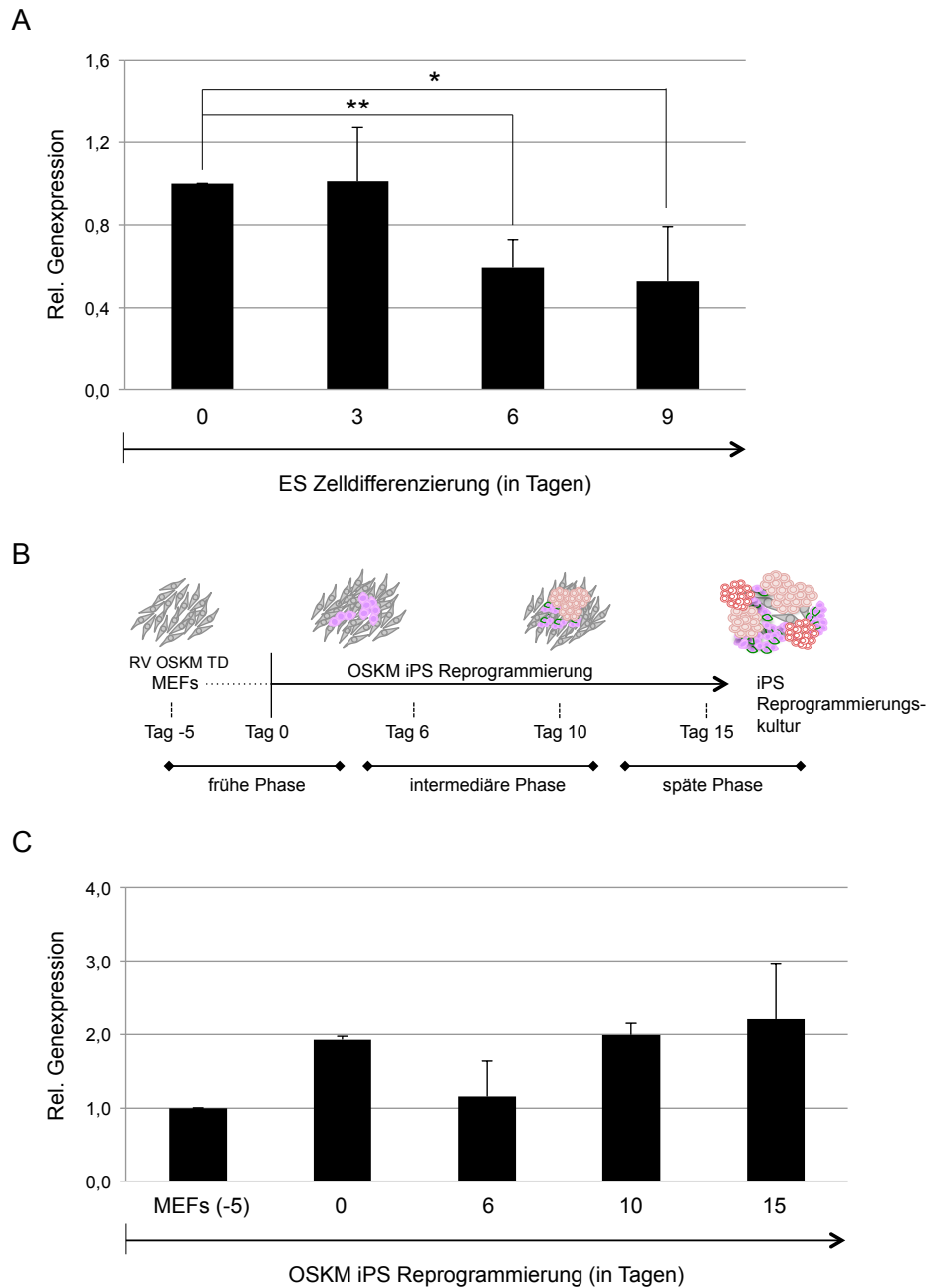


Abb. 4. *Pcgf6* Genexpression im Verlauf der ESC-Differenzierung und OSKM iPS Reprogrammierung. **A)** qRT-PCR Analyse der *Pcgf6* Genexpression an Tag 3, 6 und 9 der ESC-Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten ESCs (Tag 0). Die Genexpression wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet. *mRPL6* wurde als Referenzgen verwendet. Der Expressionswert in undifferenzierten ESCs (Tag 0) wurde auf 1 gesetzt. Fehlerbalken repräsentieren STABW. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$. $n=3$. **B)** Schematische Darstellung der OSKM iPS Reprogrammierung zur Veranschaulichung der einzelnen Reprogrammierungsphasen und der Zeitpunkte, welche für die qRT-PCR Analyse der *Pcgf6* Genexpression gewählt wurden. Auf die Transduktion der MEFs mit den Faktoren OSKM (RV OSKM TD), folgte eine zweiwöchige iPS Reprogrammierungsphase, die sich in eine frühe, intermediäre und späten Phase aufteilt. **C)** Das Diagramm zeigt die relative Genexpression von *Pcgf6* in nicht-transduzierten MEFs (Tag -5) und an Tag 0, 6, 10 und 15 der OSKM iPS Reprogrammierung. Die Genexpression wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode unter der Verwendung von *mRPL6* als Referenzgen berechnet. Der Genexpressionswert in nicht-transduzierten MEFs wurde auf 1 gesetzt. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler (SEM). $n=2$.

5.3 Pcgf6 kann Sox2 in der iPS Reprogrammierung ersetzen

Zahlreiche Studien in den letzten Jahren belegen eine Funktion diverser Chromatin-modifizierender Faktoren in der Reprogrammierung somatischer Zellen. In diesem Zusammenhang wurde 2011 eine Rolle für das Pcgf6 Paralog Pcgf4 in der iPS Reprogrammierung gezeigt [169]. Basierend auf diesen Ergebnissen und auf den Expressionsanalysen aus 5.1 und 5.2, die neben einer ESC-ähnlichen, erhöhten *Pcgf6* Expression in iPS Zellen auch eine Re-Aktivierung von *Pcgf6* im Laufe der iPS Reprogrammierung zeigen, wurde im Folgenden die Rolle von Pcgf6 in der iPS Reprogrammierung untersucht. Hierzu wurden die Transkriptionsfaktoren Sox2 (S), Klf4 (K), oder c-Myc (M) individuell im Reprogrammierungscocktail OSKM durch Pcgf6 (P) ersetzt. Die Reprogrammierung mit den daraus resultierenden Faktorkombinationen plus Kontrollen (OSKM, OSK, OSKP, OSM, OSPM, OKM, OPKM) erfolgte nach Standardprotokoll. Der Einfluss von Pcgf6 auf die iPS Reprogrammierung wurde anhand der Kombinations-spezifischen Reprogrammierungseffizienzen im Vergleich zur OSKM Effizienz ermittelt. Die Effizienzen errechneten sich aus der Summe der voll-reprogrammierten iPS Kolonien in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl. iPS Kolonien wurden als voll-reprogrammiert definiert, wenn sie positiv für Alkaline Phosphatase (AP) waren und eine ESC-ähnliche Morphologie aufwiesen. Wie in den Übersichtsfotografien in Abbildung 5A gezeigt, erzielte nur die OPKM Reprogrammierung OSKM-ähnliche Ergebnisse nach AP Färbung. Alle anderen Faktorkombinationen resultierten in einer deutlich verminderten Anzahl an AP⁺ Kolonien (Abb. 5A). Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in den errechneten Reprogrammierungseffizienzen wieder (Abb. 5B). Eine OSKM-ähnliche Reprogrammierungseffizienz wurde nur nach OPKM Reprogrammierung erzielt. Dies zeigt, dass Pcgf6 in Kombination mit OKM spezifisch den Transkriptionsfaktor Sox2 ersetzen kann. Im Gegensatz dazu ist Pcgf6 nicht fähig, c-Myc in Kombination mit OSK oder Klf4 in Kombination mit OSM zu ersetzen. Des Weiteren wurden unter OSK, OSM oder OKM Bedingungen keine OSKM-ähnlichen Effizienzen nachgewiesen. Die verminderten Effizienzen unter den 3-Faktor-vermittelten Reprogrammierungen (OSK, OSM, OKM) stimmen allerdings mit bereits veröffentlichten Daten überein [176].

Zusätzlich zur Effizienz wurde die Morphologie der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Reprogrammierung beobachtet (Abb. 6). Nur während der Reprogrammierung mit OSKM, OSK, OSKP, OKM und OPKM bildeten sich ähnliche Zellformationen zu vergleichbaren Zeitpunkten der Reprogrammierung aus. Darüber hinaus entstanden nur unter diesen Bedingungen iPS Zellkolonien mit einer ESC-ähnlichen Morphologie. Im Vergleich dazu bildeten sich nach Reprogrammierung mit OSM und OSPM keine iPS Zellen.

Außerdem wurden in diesen Kulturen auch keine Reprogrammierungs-spezifischen zellulären Formationen in den frühen Phasen der iPS Reprogrammierung beobachtet. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Pcgf6 in Kombination mit Oct4, Klf4 und c-Myc spezifisch den Transkriptionsfaktor Sox2 während der iPS Reprogrammierung ersetzen kann.

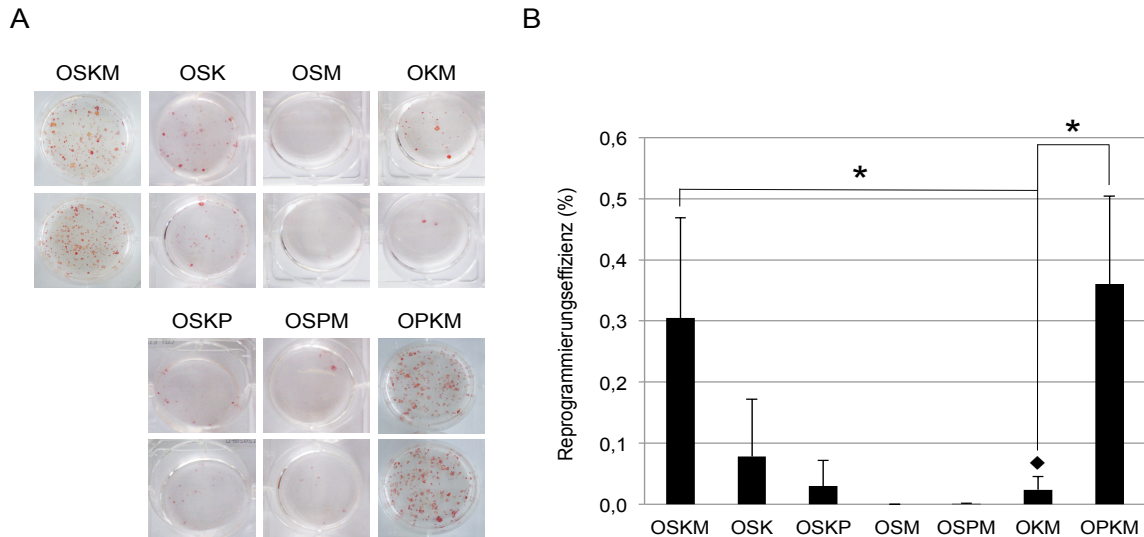


Abb. 5: Reprogrammierungseffizienzen nach Ersatz von Sox2, Klf4 oder c-Myc durch Pcgf6. A) Übersichtsfotografien von AP Färbungen nach iPS Reprogrammierung mit den Faktorkombinationen OSKM, OSK, OSKP, OSM, OSPM, OKM und OPKM. Gezeigt sind jeweils zwei repräsentative AP Färbungen. n=3. **B)** Das Diagramm zeigt die Effizienzen nach OSKM, OSK, OSKP, OSM, OSPM, OKM und OPKM Reprogrammierung. Die Effizienzen errechneten sich aus den Frequenzen an AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie in Bezug auf die eingesetzten Zellzahlen. Fehlerbalken repräsentieren STABW. *, p < 0.05. n=3. ♦, OKM-induzierte iPS Kolonien konnten nicht als OKM iPS Zelllinien expandiert werden.

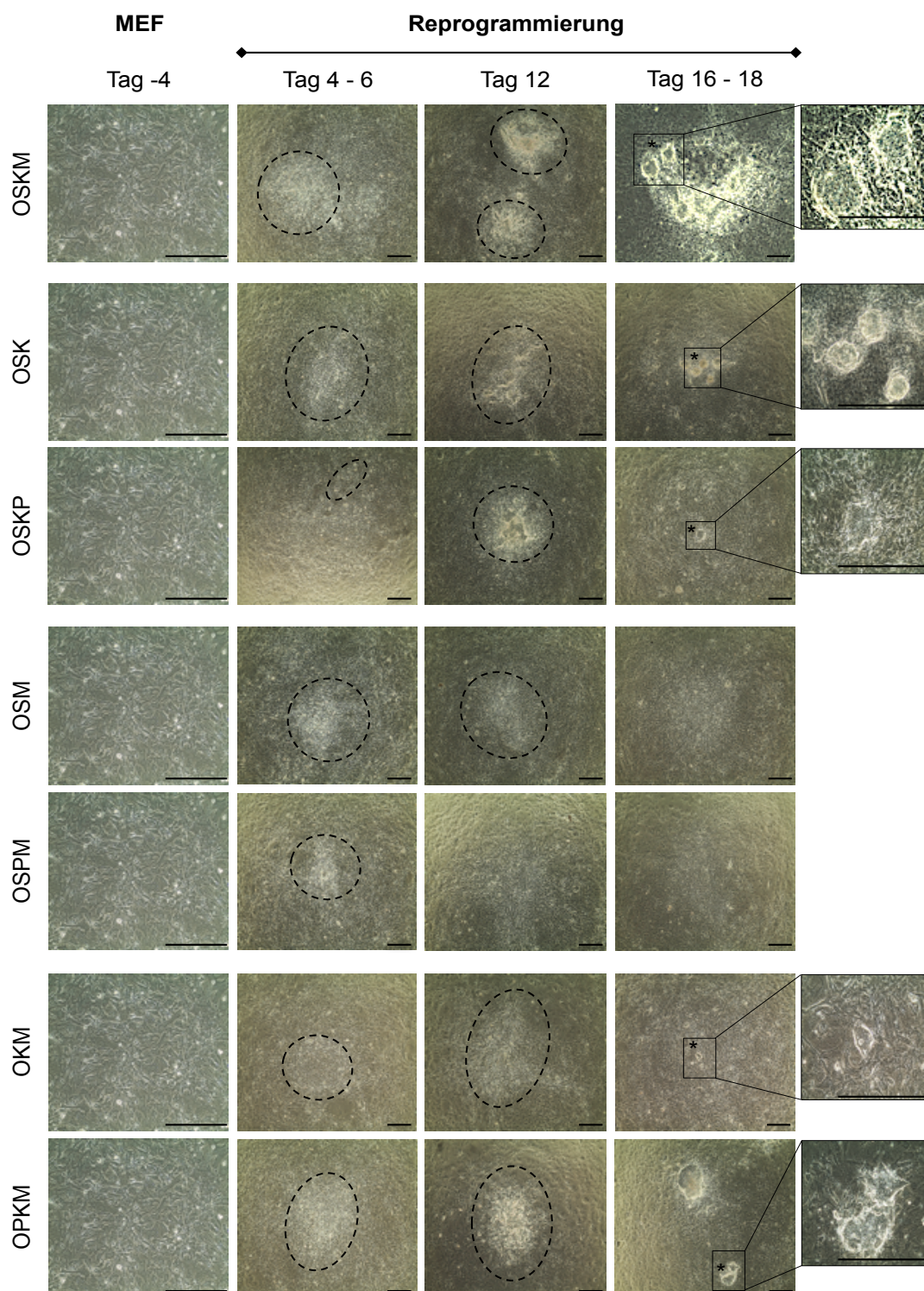


Abb. 6: Kolonieformationen während der iPS Reprogrammierung. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen während der iPS Reprogrammierung unter den Faktorkombinationen OSKM, OSK, OSKP, OSM, OSPM, OKM und OPKM. Nur nach OSKM, OSK, OSKP, OKM und OPKM Reprogrammierung wurden ESC-ähnliche Kolonien (*) nachgewiesen. Die markierten Bereiche zeigen charakteristische Reprogrammierungs-spezifische Formationen. Maßstab: 400 μ m. n=3.

5.4 Die OSKM und OPKM Reprogrammierung führt gleichermaßen zur Aktivierung der Pluripotenzgene *Oct4*, *Sox2* und *Nanog*

Nachdem gezeigt wurde, dass *Pcgf6* in Kombination mit OKM den Faktor *Sox2* ersetzen kann, sollte im nächsten Schritt sowohl die OPKM Reprogrammierung als auch OPKM-induzierte iPS Zellen auf charakteristische Eigenschaften pluripotenter Zellen hin untersucht werden. Diese Experimente sollten dazu beitragen *Pcgf6* als neuen iPS Reprogrammierungsfaktor zu bestätigen.

Zunächst wurden MEFs unter OSKM oder OPKM Bedingungen reprogrammiert und das Genexpressionsmuster der ESC-Marker *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* mittels qRT-PCR im Verlauf der iPS Reprogrammierung analysiert. Zusätzlich zu den endogenen Transkripten von *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* wurde auch das Genexpressionsmuster von endogenem *Pcgf6* untersucht. Im Vergleich zur OSKM Reprogrammierung zeigte auch die OPKM Reprogrammierung einen Anstieg der endogenen *Pcgf6* Expression (Abb. 7A). An Tag 6, 10 und 15 war die endogene *Pcgf6* Expression unter OSKM oder OPKM Konditionen zudem vergleichbar hoch. Nur an Tag 0 der OPKM Reprogrammierung war die endogene *Pcgf6* Expression niedriger als im Zuge der OSKM Reprogrammierung. Zusätzlich zur Aktivierung endogener *Pcgf6* Transkripte zeigte sowohl die OSKM als auch die OPKM Reprogrammierung einen Anstieg der endogenen *Oct4* (B), *Sox2* (C) und *Nanog* (D) Genexpression, wobei alle Gene in der späten Phase der Reprogrammierung am höchsten exprimiert wurden (Abb. 7B – C). Die hier dargestellten Ergebnisse wiesen zu jedem Zeitpunkt hohe Standardabweichungen auf. Dies liegt vermutlich an der Heterogenität der Testproben, denn die iPS Reprogrammierung ist ein ineffizienter Prozess mit einem hohen Anteil an nicht- oder nur teils-reprogrammierten Zellen und nur einer Minderheit an voll-pluripotenten iPS Zellen [176, 188].

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Aktivierung der endogenen Transkripte von *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* während der OSKM und OPKM Reprogrammierung vergleichbar ist. Zudem zeigte sowohl die OSKM als auch die OPKM Reprogrammierung eine Aktivierung der endogenen *Pcgf6* Expression.

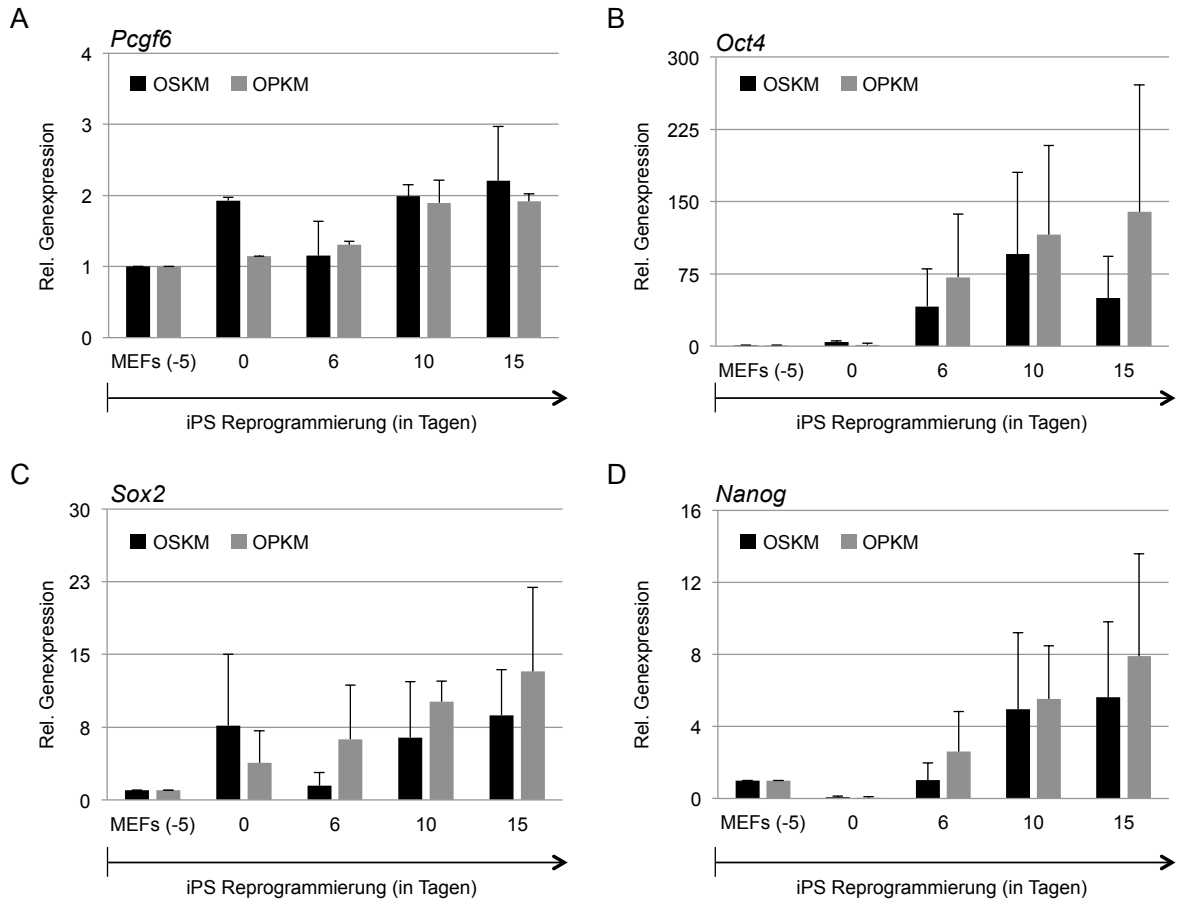


Abb. 7: OSKM und OPKM Reprogrammierungs-spezifische Genexpressionsmuster von *Pcgef6*, *Oct4*, *Sox2* und *Nanog*. qRT-PCR Analyse in nicht-transduzierten MEFs (Tag -5), sowie am Tag 0, 6, 10 und 15 der iPS Reprogrammierung. Die Genexpression wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet. *mRPL6* wurde als Referenzgen verwendet. Der Genexpressionswert in MEFs (Tag -5) wurde auf 1 gesetzt. Fehlerbalken repräsentieren SEM. n=2.

5.5 OPKM iPS Zelllinien sind pluripotent

Bisher wurde gezeigt, dass die OPKM Reprogrammierung hinsichtlich der Re-Aktivierung Pluripotenz-spezifischer Faktoren ähnlich der OSKM Reprogrammierung ist. Im nächsten Schritt wurden klonale OPKM iPS Zelllinien etabliert und im Vergleich zu OSKM iPS Zelllinien und ESCs auf charakteristische Eigenschaften pluripotenter Zellen hin untersucht. Die Etablierung der OPKM iPS Zelllinien erfolgte wie bereits für die OSKM iPS Zelllinien in Abschnitt 5.2 beschrieben. Da OSKM-induzierte iPS Kolonien nicht in Langzeit-Kulturen expandiert werden konnten, konnten diese nicht als Kontrollen für die nachfolgenden Analysen dienen.

Um sicherzustellen, dass die untersuchten Eigenschaften auf einer Re-Aktivierung des endogenen Pluripotenznetzwerkes und nicht auf der Expression der Transgene basieren,

wurde zunächst analysiert ob und wann die Transgenexpression im Laufe der iPS Reprogrammierung reprimiert wurde. Die Expression der exogenen Transkripte wurde anhand einer RT-PCR Analyse unter Verwendung spezifischer *Primer* ermittelt, welche die transgene *Oct4* Sequenz im pMXs-Vektor erkennen. Die Expressionsanalyse wurde in nicht-transduzierten MEFs (Tag -5) und in Tag 0, 6, 10 und 15 Proben der OSKM und OPKM Reprogrammierung als auch in etablierten klonalen iPS Zelllinien durchgeführt (Abb. 8). Fünf Tage nach der Transduktion der MEFs mit OSKM oder OPKM konnte in beiden untersuchten Fällen im Vergleich zu unbehandelten MEFs eine erhöhte Transgenexpression festgestellt werden, welche im Zuge der fortschreitenden Reprogrammierung nochmals anstieg und ihren Höhepunkt zwischen den Tagen 6 und 10 fand. In der späten Phase der iPS Reprogrammierung, an Tag 15, konnte gegenüber den Tagen 6 und 10 eine verminderte Transgenexpression nachgewiesen werden, was auf ein beginnendes Abschalten der retroviralen Transgene im Zuge der Reprogrammierung hinweist (Abb. 8A – C). In den etablierten klonalen iPS Zelllinien, die über mehrere Passagen (p16) kultiviert wurden, konnte schließlich keine Transgenexpression mehr nachgewiesen werden (Abb. 8D).

Folglich basieren alle analysierten Eigenschaften pluripotenter Zellen ausschließlich auf einer Re-Aktivierung des endogenen Pluripotenznetzwerkes.

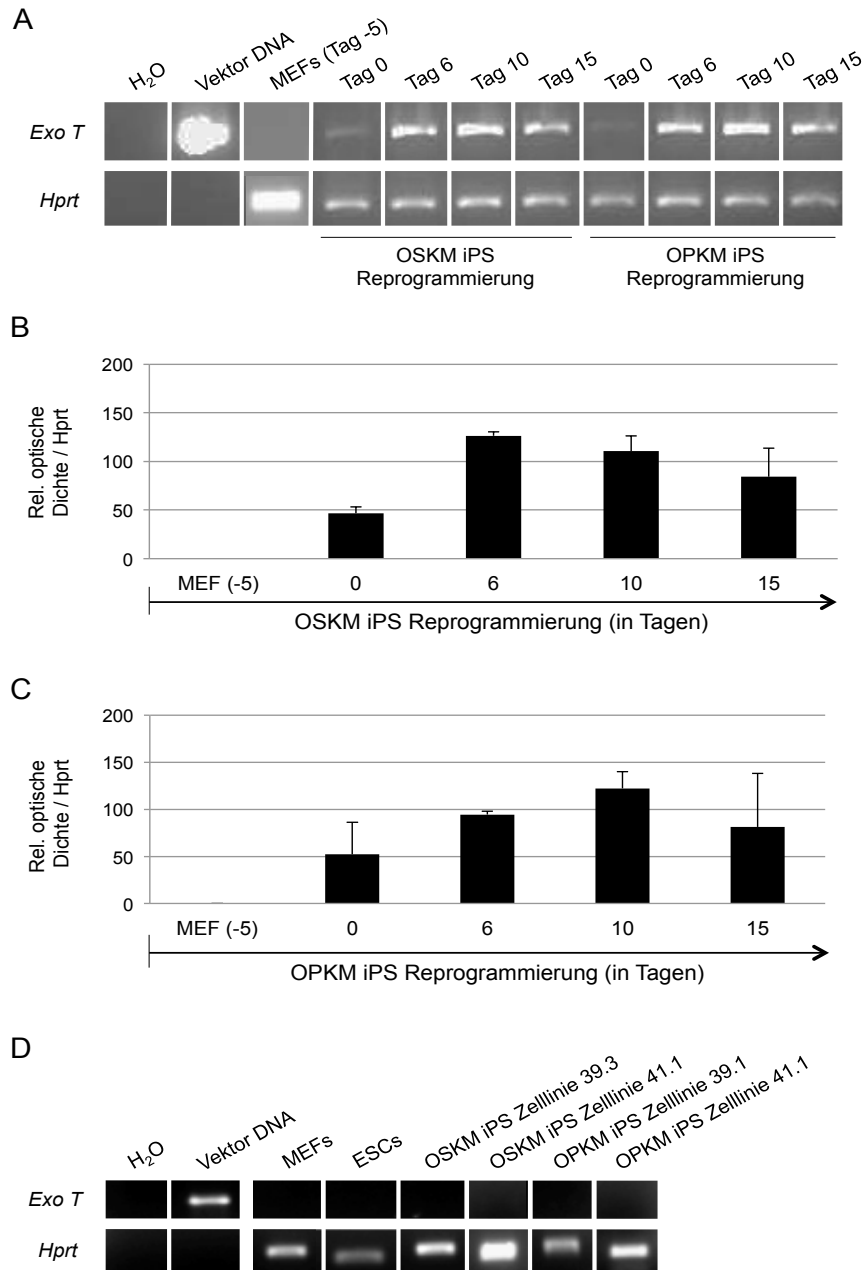


Abb. 8: Transgenexpression während der iPS Reprogrammierung und in etablierten iPS Zelllinien. **A**) Repräsentative Agarose-Gel Bilder der *Transgen* (*exo T*) und *Hprt* Expression in MEFs, an Tag 0, 6, 10 und 15 der OSKM oder OPKM iPS Reprogrammierung. Die Expression wurde anhand einer RT-PCR unter Verwendung eines Transgen-spezifischen *Primer*-Paares analysiert. Als Kontrollen wurden Wasser und Vektor DNA verwendet. n=2. **B – C**) Graphische Darstellung des Expressionsniveaus an Tag 0, 6, 10, und 15 der OSKM (**B**) oder OPKM (**C**) iPS Reprogrammierung im Vergleich zu unbehandelten MEFs. Das Expressionsniveau wurde densitometrisch unter Verwendung der ImageJ Software ermittelt und ist als optische Dichte der exogenen *Transgen*-spezifischen DNA Bande in Bezug auf die optische Dichte der zugehörigen *Hprt*-spezifischen DNA Bande dargestellt. n=2. Fehlerbalken repräsentieren SEM. **D**) Repräsentative Agarose-Gel Bilder der *Transgen* (*exo T*) und *Hprt* Expression in MEFs, ESCs, und in den OSKM iPS Zelllinien 39.3 und 41.1 als auch in den OPKM iPS Zelllinien 39.1 und 41.1. Die Expression wurde anhand einer RT-PCR unter Verwendung des Transgen-spezifischen *Primer*-Paares aus (**A**) analysiert. Als Kontrollen wurden Wasser und Vektor DNA verwendet. n=2.

Nachdem gezeigt wurde, dass die OSKM Transgenexpression in den klonalen iPS Zelllinien reprimiert ist, wurden OPKM iPS Zellen im Vergleich zu OSKM iPS Zellen und ESCs auf Eigenschaften pluripotenter Zellen hin untersucht. Wie in Abbildung 9 gezeigt, wiesen OPKM und OSKM iPS Zelllinien eine ESC-artige Morphologie auf und waren positiv für die ESC-Marker AP, SOX2 und SSEA1. Außerdem re-aktivierten OPKM und OSKM iPS Zelllinien die *Oct4*-Promoter gesteuerte *eGFP* Expression und zeigten eine ESC-ähnliche Zellzyklusphasenverteilung (Abb. 9A – D).

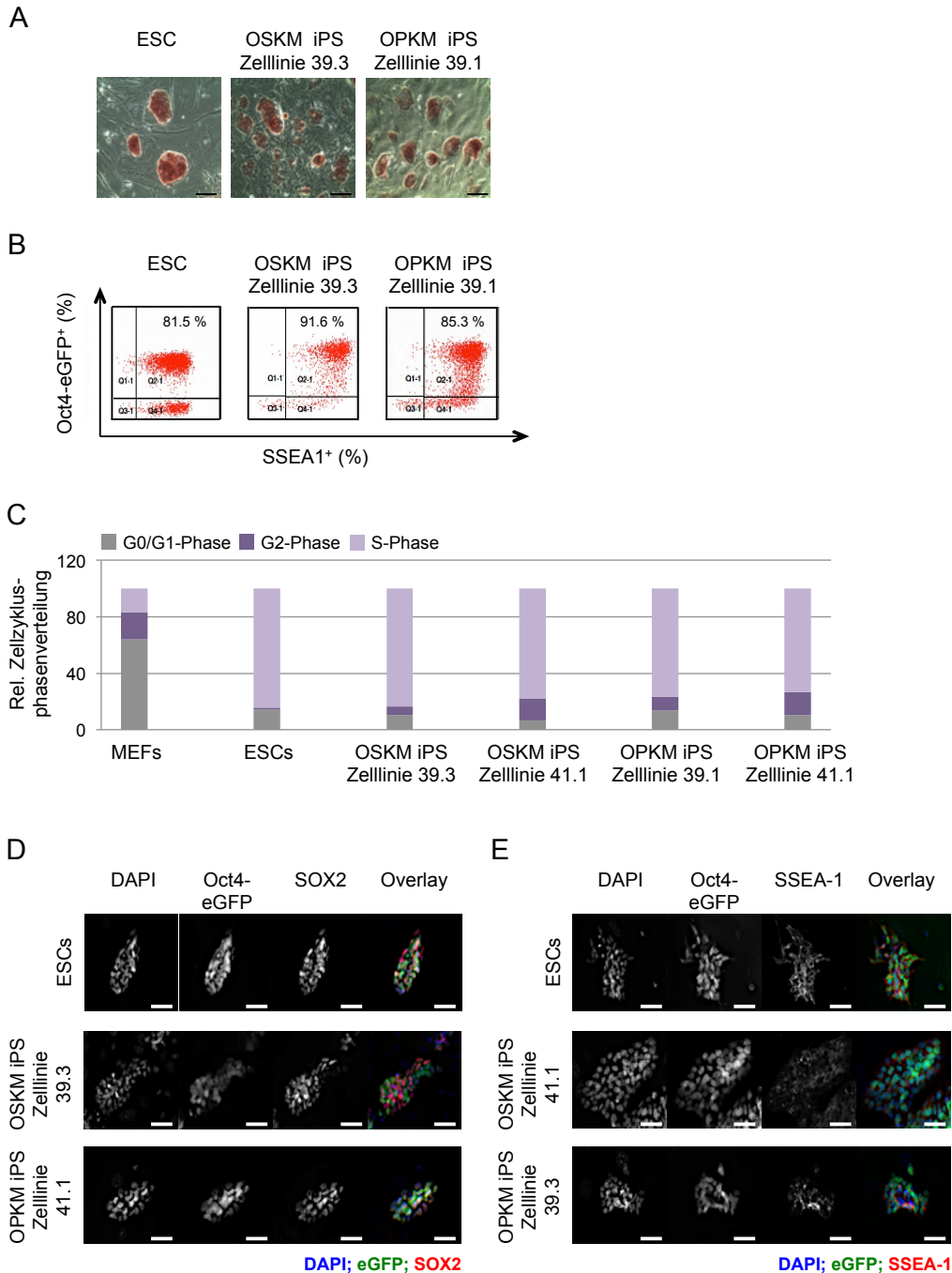


Abb. 9: Pluripotenz-assoziierte Zellcharakteristika OPKM-induzierter iPS Zelllinien. **A)** Mikroskopische Übersichtsaufnahmen repräsentativer AP Färbungen von ESCs und von klonalen OSKM oder OPKM iPS Zelllinien. Maßstab: 100 μ m. **B)** Repräsentative FACS *Dot Plots*, welche die Re-Aktivierung des *Oct4-eGFP* Transgens und die Expression des ESC-Markers *Ssea1* in OPKM iPS Zellen im Vergleich zu ESCs und OSKM iPS Zellen zeigen. Insgesamt wurden 12 OSKM und 10 OPKM iPS Zelllinien aus unabhängigen Reprogrammierungsansätzen untersucht. **C)** Analyse des Zellzyklus in OPKM und OSKM iPS Zelllinien im Vergleich zu MEFs und ESCs. Diagramm zeigt die relative Zellzyklusphasenverteilung, die Anhand einer Propidium-Jodid-Färbung und anschließender FACS Analyse ermittelt wurde. Die Auswertung erfolgte mit der *ModFit* Software. n=3. **D)** Mikroskopische Aufnahmen von SOX2- und SSEA1-spezifischen Immunfärbungen von OPKM und OSKM iPS Zellen im Vergleich zu ESCs. DAPI Signale und die *Oct4-eGFP* Transgenexpression sind ebenfalls abgebildet. Maßstab: 50 μ m. Insgesamt wurden zwei klonale OSKM und zwei klonale OPKM iPS Zelllinien aus unabhängigen Reprogrammierungsansätzen untersucht.

Zusätzlich wurden die OPKM und OSKM iPS Zellen auch auf ESC-charakteristische Genexpressionsmuster hin untersucht. Hierzu wurden die Zelllinien ausgewählt, welche die höchste Fraktion *Oct4-eGFP*⁺ Zellen in der FACS Analyse aufwiesen (Abb. 9B). Im Vergleich zu MEFs zeigten die OPKM und OSKM iPS Zelllinien ähnliche ESC-spezifische Genexpressionsmuster der Pluripotenzmarker *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Utf1*, *Dppa2* und *Sall4* als auch der Reprogrammierungsfaktoren *Klf4* und *c-Myc* (Abb. 10A, B). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Expression der MEF-Marker *Periostin* und *Vimentin* in OSKM und OPKM iPS Zelllinien auf ESC-Niveau reprimiert wurde (Abb. 10C).

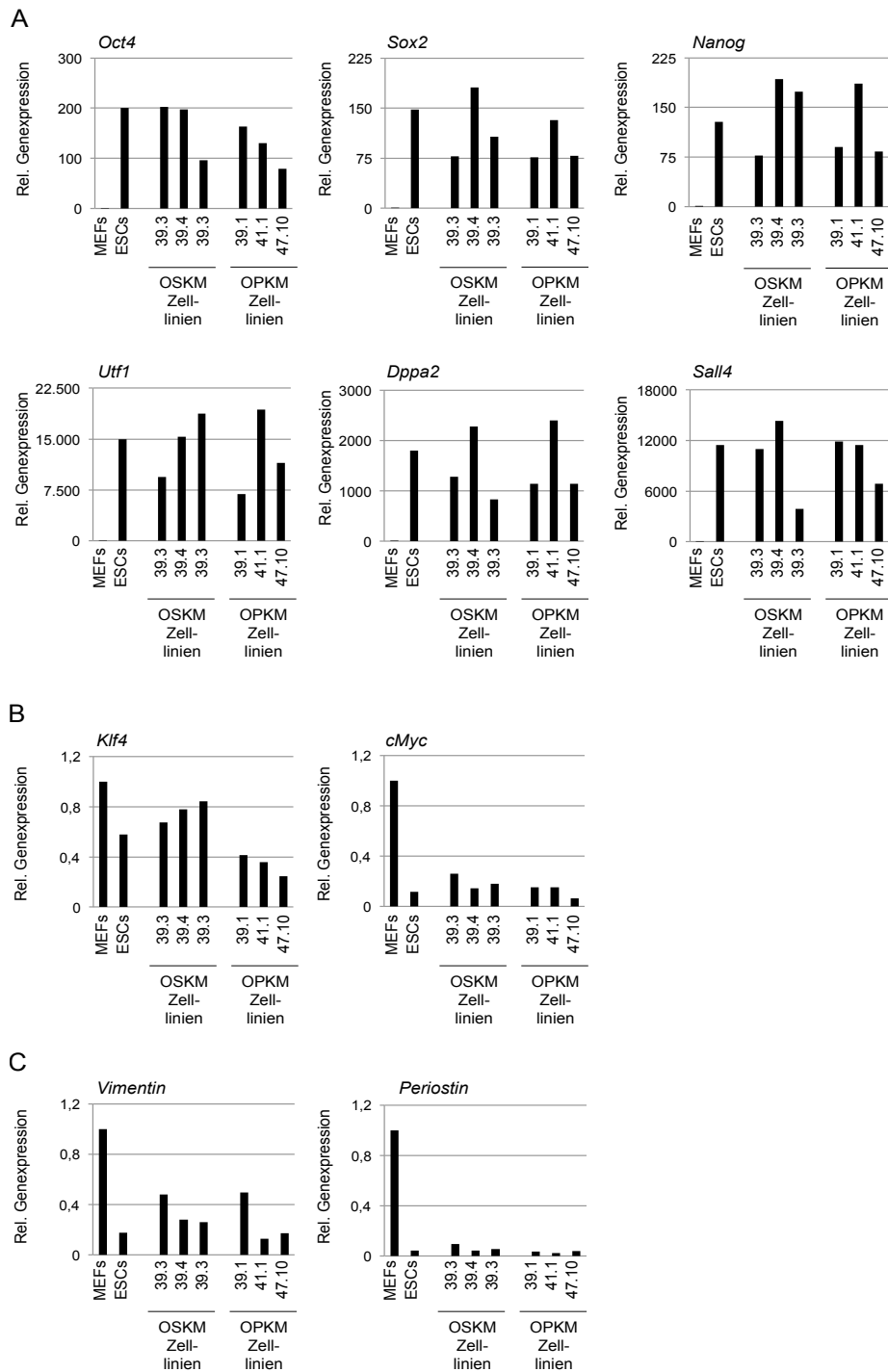


Abb. 10: OPKM und OSKM iPS Zell-spezifische Genexpressionsmuster. qRT-PCR Analyse der Expressionsniveaus von ESC-Markern (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Utf1*, *Dppa2*, *Sall4*) (**A**), der Reprogrammierungsfaktoren *Klf4* und *c-Myc* (**B**) als auch der MEF-spezifischen Gene *Periostin* und *Vimentin* (**C**) in jeweils drei repräsentativen OPKM und OSKM iPS Zelllinien im Vergleich zu ESCs und MEFs. Im Falle von *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* und *c-Myc* wurde die Expression der endogenen Transkripte analysiert. Die Genexpression wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet. *mRPL6* wurde als Referenzgen verwendet. Der Genexpressionswert in MEFs wurde auf 1 gesetzt. Insgesamt wurden 4 OSKM und 5 OPKM iPS Zelllinien aus drei unabhängigen Reprogrammierungsansätzen analysiert.

Neben zellulären Eigenschaften und Genexpressionsmustern wurde auch das Multilinen-Differenzierungsverhalten der OPKM iPS Zelllinien *in vitro* und *in vivo* untersucht und mit dem von OSKM iPS Zellen und ESCs verglichen.

Abbildung 11A zeigt, dass OPKM iPS Zellen, ähnlich wie ESCs und OSKM iPS Zellen, fähig waren *in vitro* zu differenzieren und charakteristische EB Strukturen ausbildeten. OSKM und OPKM EBs waren hinsichtlich ihrer zellulären Struktur weitestgehend vergleichbar mit EBs, die aus ESCs entstanden sind. An Tag 6 und 9 der Differenzierung wurden jedoch leichte Größenunterschiede zwischen EBs aus iPS Zellen und EBs aus ESCs beobachtet. Neben der zellulären Struktur wurden die EBs auf die Expression charakteristischer Differenzierungsgene hin untersucht. Diese Analysen fanden an Tag 6 der EB Differenzierung statt, da zu diesem Zeitpunkt Gene aller drei Keimblätter (Meso-, Endo-, Ectoderm) nachweisbar waren. Wie in Abbildung 11B gezeigt, exprimierten EBs aus ESCs, OPKM oder OSKM iPS Zellen repräsentative Gene aller drei Keimblätter (Mesoderm: *Flk1*, *Nodal*, *T*; Endoderm: *Gata4*, *Gata6*, *FoxA2*; Ectoderm: *Nestin*, *Pax3*).

Zusätzlich zur *in vitro* Untersuchung wurde das Multilinen-Differenzierungsverhalten der OPKM und OSKM iPS Zelllinien auch *in vivo* anhand von Teratom Experimenten analysiert (Abb. 11C, D, E). Hierzu wurden ESCs, OSKM oder OPKM iPS Zellen subkutan in NOD-scid IL2Rg^{null} (NSG) Mäuse injiziert. Die Tumorbildung wurde über einen Zeitraum von 4 – 8 Wochen beobachtet. Mäuse, die OSKM oder OPKM iPS Zellen injiziert bekamen, bildeten innerhalb von sechs Wochen Teratome aus, die eine vergleichbare Größe wie ESC-induzierte Tumore hatten (Abb. 11C). Anhand histologischer Analysen konnten sowohl in OSKM- (Abb. 11D) als auch in OPKM-induzierten Teratomen (Abb. 11E) differenzierte Strukturen aller drei Keimblätter nachgewiesen werden.

Als einer der stringentesten Nachweise des pluripotenten Zellstatus wurde das Potential der OPKM iPS Zelllinien zur Generierung keimbahnfähiger Chimären getestet. Hierzu wurden OPKM iPS Zellen mit einem genetischen Hintergrund von C57BL/6 Tieren (schwarze Fellfarbe) in E3.5 Blastozysten von C57BL/6 Albino Mäusen (weiße Fellfarbe) injiziert. Basierend auf einer schwarz-weißen Fellfarbe wurde nachgewiesen, dass OPKM iPS Zellen chimäre Tiere hervorbringen können (Abb. 11F). Insgesamt wurden zwei OPKM iPS Zelllinien (39.1 und 47.10) in Blastozysten injiziert. In beiden Fällen entstanden daraus chimäre Tiere. Zusätzlich zeigten die Chimären der OPKM 39.1 iPS Zelllinie Keimbahnfähigkeit. Aus Verpaarungen mit C57BL/6 Albino Tieren entstanden Nachkommen mit einem genetischen C57BL/6 Hintergrund und schwarzer Fellfarbe (Abb. 11F). Tumorbildung oder Fehlentwicklungen wurden nicht beobachtet. Zusätzlich zur Fellfarbe wurde in der genomischen DNA der Chimären und deren Nachkommen (F1-Generation) anhand einer RT-PCR das retrovirale Transgen nachgewiesen (Abb. 11G).

Diese Daten zeigen, dass OPKM-induzierte iPS Zellen einen voll-reprogrammierten pluripotenten Charakter aufweisen. Zusammen mit den Erkenntnissen, dass Pcgf6 spezifisch Sox2 ersetzen kann und dass die OPKM Reprogrammierung ähnlich wie die OSKM Reprogrammierung zur Re-Aktivierung endogener Pluripotenzmarker führt, bestätigt dies Pcgf6 als einen neuen iPS Reprogrammierungsfaktor.

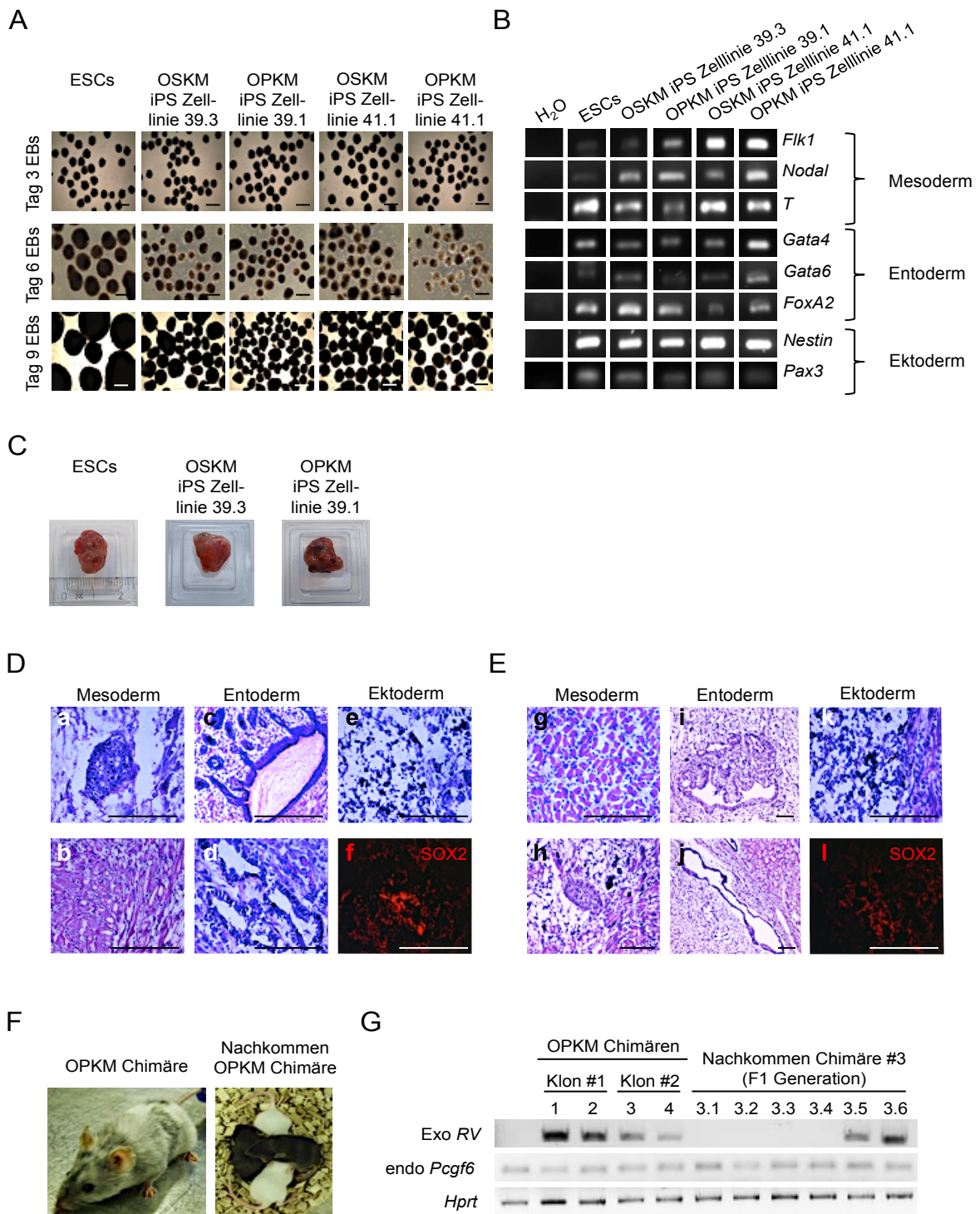


Abb. 11: *In vitro* und *in vivo* Multilinen-Differenzierungskapazität von OPKM iPS Zellen. A) Mikroskopische Übersichtsaufnahmen repräsentativer Tag 3, 6 und 9 EBs nach *in vitro* Differenzierung von ESCs, OSKM und OPKM iPS Zellen. Maßstab: 500 µm. **B)** Agarose-Gel Bilder repräsentativer qRT-PCR Analysen zur Expression Keimbahn-spezifischer Markergene (Mesoderm: *Flk1*, *Nodal*, *T*; Entoderm: *Gata4*, *Gata6*, *FoxA2*; Ektoderm: *Nestin*, *Pax3*) in Tag 6 EBs von ESCs, OSKM und OPKM iPSCs.

C) Repräsentative Übersichts-Fotografien von Teratomen, 6 Wochen nach subkutaner Injektion von ESCs, OSKM oder OPKM iPS Zelllinien in NOD-scid IL2Rg^{null} (NSG) Mäuse. Mikroskopische Aufnahmen repräsentativer HE Färbungen OSKM-induzierter (**D**) oder OPKM-induzierter (**E**) Teratome zeigen Strukturen der drei Keimblätter Meso-, Ento- und Ektoderm (a,h: Knorpel, b,g: Muskel, c,d,i,j: endodermale Epithelien, e,k: neuronale Strukturen f,l: Sox2 Immunfärbung zur weiteren Identifikation des neuralen Charakters). Maßstab: 100 µm. Insgesamt wurden in **A) – D)** 2 OSKM und 2 OPKM iPS Zelllinien aus zwei unabhängigen Reprogrammierungsansätzen untersucht. **F)** Repräsentative Fotografie einer chimären Maus (schwarz-weiße Fellfarbe) nach Injektion von C57BL/6 OPKM iPSCs (schwarze Fellfarbe) in C57BL/6 Albino Blastozysten (weiße Fellfarbe) und deren Keimbahn-Nachkommen. **G)** Agarose-Gel Bilder repräsentativer RT-PCR Analysen zum Nachweis des Transgens in der genomischen DNA chimärer Tiere und deren Nachkommen. Als Kontrollen wurden endogene *Pcgf6* und *Hprt* Primer verwendet.

5.6 *Pcgf6* ist kein *Enhancer*-Faktor der iPS Reprogrammierung

Nachdem eine Rolle für *Pcgf6* in der iPS Reprogrammierung gezeigt wurde, sollte im Folgenden die Funktion von *Pcgf6* näher untersucht werden. Grundsätzlich können die OSKM Faktoren anhand ihrer Funktion in zwei Kategorien gruppiert werden [206]. Während Oct4, Sox2 und Klf4 als Pionierfaktoren betrachtet werden, die maßgeblich am Aufbau und der Stabilisierung der Pluripotenz beteiligt sind, repräsentiert c-Myc einen *Enhancer*-Faktor, der die Effizienz der iPS Reprogrammierung beeinflusst [205, 206].

Die bisherigen Daten zeigen, dass *Pcgf6* nur Sox2 aber nicht Klf4 oder c-Myc ersetzen kann. Da Sox2 einer der Kern-Pluripotenzfaktoren ist, lässt dies vermuten, dass *Pcgf6* ein essentieller Faktor für die iPS Reprogrammierung ist. Gleichmaßen schließt dies eine Funktion als *Enhancer*-Faktor aus, was zunächst im Folgenden Abschnitt bestätigt werden sollte. Hierzu wurde *Pcgf6* gemeinsam mit den Faktoren OSKM in MEFs überexprimiert und die Reprogrammierungseffizienz nach OSKMP Reprogrammierung mit den Effizienzen nach OKM, OSKM und OPKM Reprogrammierung verglichen. Falls *Pcgf6* eine Funktion als *Enhancer*-Faktor während der iPS Reprogrammierung erfüllt, wäre im Vergleich zu OSKM oder OPKM eine erhöhte Effizienz nach OSKMP Reprogrammierung anzunehmen. Wie in den repräsentativen Übersichtsphotografien in Abb. 12 gezeigt, sind die Ergebnisse der AP Färbungen nach OSKM, OPKM und OSKMP Reprogrammierung ähnlich. In den Kulturen der OKM Kontrolle waren keine AP⁺ Kolonien enthalten. In Übereinstimmung mit den AP Färbungen resultierte die OSKMP Reprogrammierung nicht in signifikant erhöhten Effizienzen im Vergleich zur OSKM oder OPKM Reprogrammierung (Abb. 12).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die gemeinsame Überexpression von *Pcgf6* und der OSKM Faktoren keine signifikant erhöhte Effizienz im Vergleich zur OSKM oder OPKM Reprogrammierung erzielt und bestätigt damit, dass *Pcgf6* funktional kein *Enhancer*-Faktor der iPS Reprogrammierung ist.

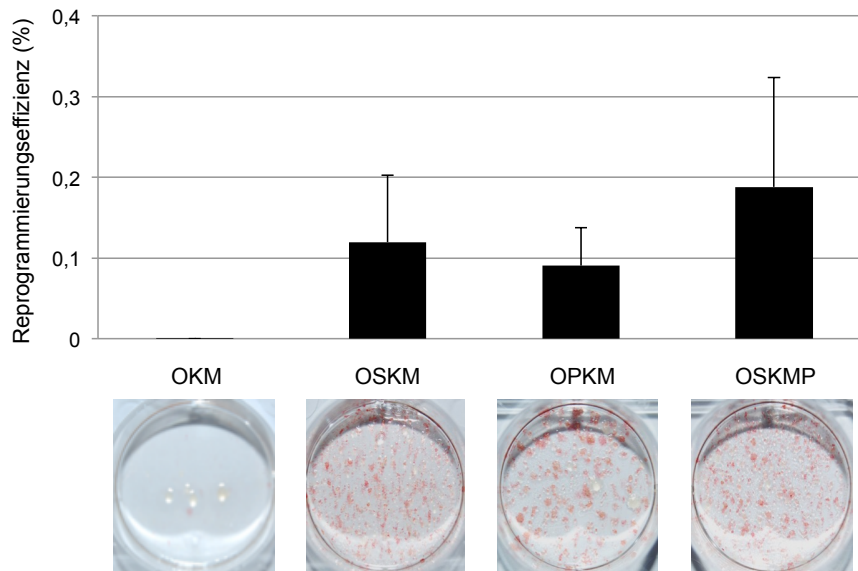


Abb. 12: iPS Reprogrammierung unter OSKMP Bedingungen. Das Diagramm zeigt die Effizienzen nach Reprogrammierung unter den Bedingungen OKM, OSKM, OPKM und OSKMP. Die Effizienzen errechneten sich aus den Frequenzen AP-positiver Zellkolonien mit ES Zellmorphologie in Bezug auf die eingesetzten Zellzahlen. Fehlerbalken repräsentieren SEM. n=4. Die Übersichtsfotografien unterhalb des Diagrammes zeigen repräsentative AP Färbungen nach OKM, OSKM, OPKM und OSKMP Reprogrammierung.

5.7 *Pcgf6* ist ein essentieller Faktor der OSKM Reprogrammierung

Nachdem die Funktion von *Pcgf6* als *Enhancer*-Faktor ausgeschlossen werden konnte, lässt der spezifische Ersatz von *Sox2* darauf schließen, dass *Pcgf6* ein essentieller Faktor der iPS Reprogrammierung ist.

Um zu untersuchen ob *Pcgf6* eine essentielle Rolle während der iPS Reprogrammierung spielt, wurden die Auswirkungen eines *Pcgf6* KDs in MEFs auf die OSKM Reprogrammierung untersucht. Hierzu wurde eine *Pcgf6*-spezifische shRNA mittels lentiviraler Transduktion in MEFs exprimiert. Die daraus resultierenden *Pcgf6* KD MEFs wurden anschließend für die OSKM Reprogrammierung verwendet (Abb. 13A, B). Als Kontrolle wurden MEF Kulturen generiert, in denen ein Leervektor exprimiert wurde (Scrambled MEF; Scr MEF). Diese Scr MEFs wurden ebenfalls unter OSKM Bedingungen reprogrammiert (Abb. 13B). Die Effizienz des *Pcgf6* KDs wurde fünf Tage nach lentiviraler Transduktion mittels qRT-PCR und unter Verwendung *Pcgf6*-spezifischer *Primer* analysiert. Im Vergleich zu Scr MEFs konnte im Durchschnitt eine 60%ige Reduktion der *Pcgf6* Expression in KD MEFs festgestellt werden (Abb. 13C).

Die Auswirkungen des *Pcgf6* KDs auf die OSKM Reprogrammierung wurden anhand von AP-Färbungen und Reprogrammierungseffizienzen ermittelt. Wie in den

Übersichtsfotografien in Abb. 13D gezeigt, entstanden im Vergleich zu Scr OSKM Reprogrammierungskulturen weniger AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie nach OSKM Reprogrammierung der *Pcgf6* KD MEFs. In Übereinstimmung zeigten die *Pcgf6* KD Reprogrammierungskulturen im Vergleich zu Scr Reprogrammierungskulturen eine geringere Effizienz nach OSKM Reprogrammierung (Abb. 13D).

Die mikroskopischen Übersichtsaufnahmen aus Abb. 13E zeigen, dass sich bereits zu frühen Phasen der Reprogrammierung (Tag 6 – 8) weniger zelluläre Formationen nach OSKM Reprogrammierung der *Pcgf6* KD MEFs bildeten, die charakteristisch für entstehende iPS Kolonien sind. Zudem konnten erste zelluläre Unterschiede zwischen Scr und *Pcgf6* KD MEFs bereits nach lentiviraler Transduktion (entspricht Tag -5 der iPS Reprogrammierung) ausgemacht werden. Diesbezüglich zeigten *Pcgf6* KD MEFs, neben einer verminderten Zelldichte, erste Anzeichen einer Seneszenz-assoziierten Morphologie (Abb. 13E).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *Pcgf6* ein essentieller Faktor der OSKM Reprogrammierung ist.

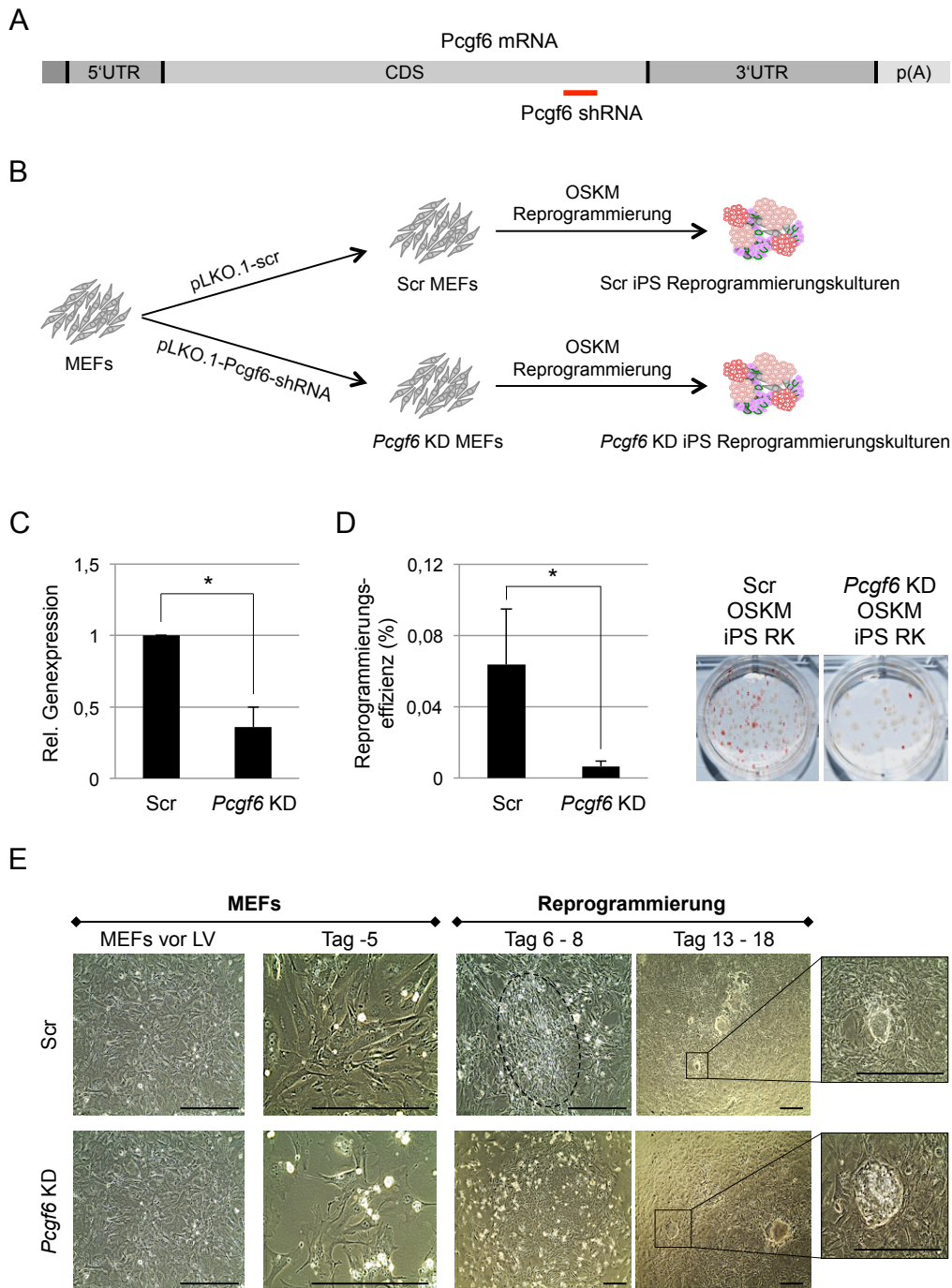


Abb. 13: OSKM Reprogrammierung unter *Pcgf6* KD Bedingungen. (A) Übersichtszeichnung der *Pcgf6* mRNA mit Kennzeichnung der shRNA-spezifischen Bindestelle. (5'UTR: 5' un-translatierte Region; cds: kodierende Sequenz; p(A): poly-(A)-Schwanz. (B) Schematische Übersicht der OSKM Reprogrammierung von Scr und *Pcgf6* KD MEFs. (C) Diagramm zeigt die relative *Pcgf6* Genexpression in Scr und *Pcgf6* KD MEFs. Fehlerbalken repräsentieren STABW. *, $p < 0.05$. $n=3$. (D) Diagramm zeigt die Reprogrammierungseffizienz in Scr und *Pcgf6* KD Kulturen nach OSKM Reprogrammierung. Fehlerbalken repräsentieren STABW. *, $p < 0.05$. Die Übersichtsfotografien neben dem Diagramm zeigen repräsentative AP Färbungen nach OSKM Reprogrammierung in Scr Reprogrammierungskulturen (RK) im Vergleich zu *Pcgf6* KD RK. $n=3$. (E) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Scr und *Pcgf6* KD MEFs vor und nach lentiviraler Transduktion als auch während der OSKM Reprogrammierung. Die markierten Bereiche in den Bildern der Tage 6 – 8 zeigen charakteristische Reprogrammierung-spezifische zelluläre Formationen. Maßstab: 400 μm . $n=3$.

5.8 Die OSKM Reprogrammierung von *Pcgf6* KD MEFs resultiert in mehr partiell- als voll-reprogrammierten iPS Kolonien

Im Zuge der OSKM Reprogrammierung der *Pcgf6* KD MEFs wurden zusätzlich zu den voll-reprogrammierten AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie auch AP⁺ Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie entdeckt, die vermutlich partiell-reprogrammierte iPS Zellen darstellen (Abb. 14A). Allerdings entstanden diese Kolonien auch nach OSKM Reprogrammierung der Scr MEFs.

Die Anzahl der AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie war in Übereinstimmung mit der verminderten Reprogrammierungseffizienz in den *Pcgf6* KD Kulturen im Vergleich zur Scr Kontrolle reduziert (Abb. 14B). Während in Scr OSKM Reprogrammierungskulturen durchschnittlich 98 AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie entstanden, lag der Wert in den *Pcgf6* KD Kulturen nur bei durchschnittlich zehn AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie.

Auch die Anzahl der AP⁺ Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie war in den *Pcgf6* KD Kulturen im Vergleich zu den Scr Reprogrammierungskulturen geringer. Während in Scr OSKM Kulturen im Durchschnitt 67 AP⁺ Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie entstanden, waren es in den *Pcgf6* KD Kulturen durchschnittlich 43 AP⁺ Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie (Abb. 14C).

Im direkten Vergleich entstanden demnach in den Scr Kulturen mehr AP⁺ Kolonien mit als ohne ESC-Morphologie. In den *Pcgf6* KD Kulturen hingegen entstanden mehr AP⁺ Kolonien ohne als mit ESC-Morphologie.

Zur Bestätigung, dass es sich bei den AP⁺ Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie um partiell-reprogrammierte Kolonien handelt, wurde im nächsten Schritt die Expression der Pluripotenzmarker *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* in diesen Zellen ermittelt. Hierzu wurden ca. 30 Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie aus *Pcgf6* KD Reprogrammierungskulturen isoliert und für eine RT-PCR Analyse vereinigt. Da die voll-reprogrammierten Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie kleiner als die Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie waren, wurden hiervon ca. 60 Kolonien aus den Scr OSKM Reprogrammierungskulturen isoliert, vereinigt und als Kontrolle verwendet. Wie Abbildung 14D zeigt, war die Expression von *Oct4* (oben), *Sox2* (mitte) und *Nanog* (unten) in den AP⁺ Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie deutlich geringer als in AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *Pcgf6* KD Kulturen, im Vergleich zu Scr Kulturen, sowohl weniger voll-reprogrammierte als auch weniger partiell-reprogrammierte iPS Kolonien aufweisen. Die Auswirkungen des *Pcgf6* KDs waren jedoch in Bezug auf die Anzahl an voll-reprogrammierten iPS Kolonien erheblich größer als auf die Anzahl an partiell-reprogrammierten Kolonien.

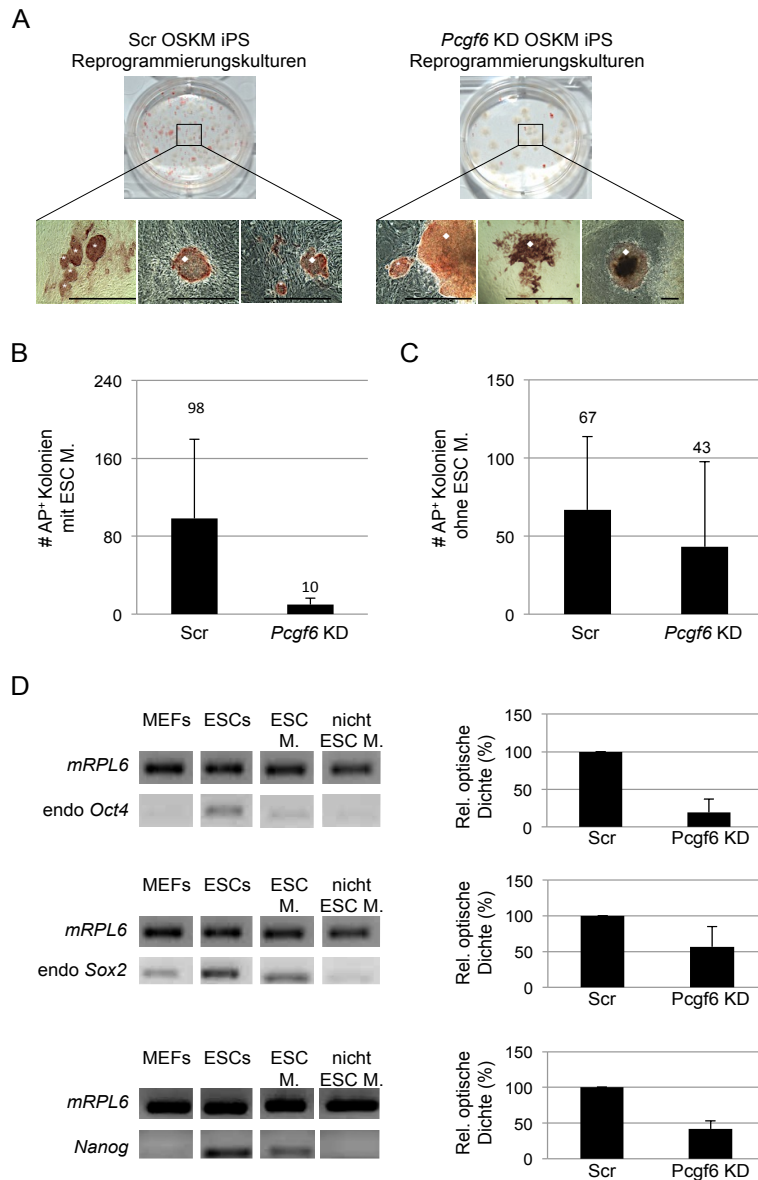


Abb. 14: Morphologie, Frequenzen und Pluripotenz-spezifische Genexpressionsmuster AP⁺ Kolonien nach OSKM Reprogrammierung von *Pcgf6* KD MEFs. (A) Mikroskopische Übersichtsaufnahmen AP⁺ Kolonien in Scr und *Pcgf6* KD OSKM Reprogrammierungskulturen. (*): Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie, (◆): Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie. Maßstab: 400 μ m. n=2. **(B)** Diagramm zeigt die Anzahl AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie in Scr und *Pcgf6* KD OSKM Reprogrammierungskulturen. Fehlerbalken repräsentieren STABW. n=3. **(C)** Diagramm zeigt die Anzahl AP⁺ Kolonien ohne ESC-ähnliche Morphologie in Scr und *Pcgf6* KD OSKM Reprogrammierungskulturen. n=3. **(D)** Repräsentative Agarose-Gel Bilder der *Oct4*- (oben), *Sox2*- (mitte) und *Nanog*-spezifischen (unten) Expression in AP⁺ Kolonien mit und ohne ESC-ähnliche Morphologie. Als Kontrollen wurden MEFs und ESCs verwendet. Die *Oct4* und *Sox2* Primer detektierten die endogenen Transkripte. *mRPL6* wurde als Referenz verwendet. Die Expressionsniveaus von *Oct4* (oben), *Sox2* (mitte) und *Nanog* (unten) wurden densitometrisch unter Verwendung der *ImageJ* Software ermittelt und sind als optische Dichte der *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* DNA Bande in Bezug auf die optische Dichte der zugehörigen *mRPL6*-spezifischen DNA Bande dargestellt.

6. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die *Pcgf6* Expression in induzierten pluripotenten Stammzellen und im Verlauf der iPS Reprogrammierung untersucht. Des Weiteren wurde überprüft, ob *Pcgf6* eine Rolle für die iPS Reprogrammierung spielt.

Anhand von qRT-PCR Analysen konnte zunächst eine ESC-ähnliche Genexpression von *Pcgf1 – 6* in iPS Zellen nachgewiesen werden, wobei im Vergleich zu MEFs nur *Pcgf6* eine erhöhte Genexpression zeigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *Pcgf6* Expression im Verlauf der ES Zelldifferenzierung absinkt, während es im Zuge der iPS Reprogrammierung zur Re-Aktivierung von endogenem *Pcgf6* kommt. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten, lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass *Pcgf6* spezifisch in pluripotenten Stammzellen exprimiert ist [140]. Zudem wurde nachgewiesen, dass *Pcgf6* in Kombination mit Oct4, Klf4 und c-Myc den Transkriptionsfaktor Sox2 in der iPS Reprogrammierung ersetzen kann. Dies lässt vermuten, dass *Pcgf6* und Sox2 ähnliche oder identische Funktionen während der iPS Reprogrammierung haben. Außerdem wurden OPKM-induzierte iPS Zellen als voll-pluripotent charakterisiert.

In Bezug auf die Funktion von *Pcgf6* während der iPS Reprogrammierung konnte eine Rolle als *Enhancer*-Faktor ausgeschlossen werden, denn die Überexpression von *Pcgf6* zusammen mit *OSKM* erzielte keine additiven Effekte auf die Reprogrammierungseffizienz. Allerdings belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *Pcgf6* ein essentieller Faktor für die *OSKM* Reprogrammierung ist, denn der KD von *Pcgf6* in MEFs führte zu einer verminderten Reprogrammierungseffizienz. Außerdem handelte es sich bei der Mehrheit, der unter *Pcgf6* KD Konditionen entstandenen AP⁺ Kolonien um partiell-reprogrammierte iPS Kolonien. Diese zeigten keine ESC-ähnliche Morphologie und eine verminderte Expression von *Oct4*, *Sox2* und *Nanog*.

6.1 *Pcgf6* Expression in ESCs und iPS Zellen

PcG Proteine sind sowohl für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten ESC-Status als auch für die Differenzierung von ESCs notwendig [143-149, 156, 158-162]. In diesem Zusammenhang beeinträchtigt der Verlust unterschiedlicher PRC1 oder PRC2 Komponenten die Differenzierungskapazität von ESCs [144, 158-162]. Im Gegensatz zum PRC2 Komplex ist der PRC1 Komplex zusätzlich mit der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zellstatus assoziiert. So führt z.B. der gemeinsame KO der PRC1 Kernkomponenten *Ring1A* und *Ring1B* und damit der Verlust der gesamten PRC1 Funktion zu einem Zusammenbruch des undifferenzierten ESC-Status [144]. Die Daten zweier *Pcgf6* KD Studien in murinen ESCs

lassen vermuten, dass auch die PRC1.6 Komponente *Pcgf6* eine Rolle in ESCs spielt. Diese Annahme basiert darauf, dass *Pcgf6* das einzige *Pcgf* Paralog ist, das eine erhöhte Expression in ESCs zeigt und der Verlust von *Pcgf6* in ESCs zu einer Beeinträchtigung des pluripotenten Zellstatus führt [140, 167]. Zusätzlich zur einer erhöhten Expression von *Pcgf6* in ESCs zeigen bereits veröffentlichte Daten auch, dass die *Pcgf6* Expression mit zunehmender Differenzierung absinkt und in ausdifferenzierten Zelltypen wie z.B. MEFs nahezu nicht mehr nachweisbar ist [140]. Dies konnte im Rahmen von EB Differenzierungsexperimenten in dieser Arbeit bestätigt werden. So zeigten z.B. 6 Tage differenzierte Zellen eine um 41% reduzierte *Pcgf6* Genexpression im Vergleich zu undifferenzierten ESCs. Des Weiteren ist bekannt, dass Epiblast-Stammzellen (Epi-SCs), die ein späteres Entwicklungsstadium als ESCs repräsentieren, im Vergleich zu ESCs eine verminderte *Pcgf6* Expression zeigen [140]. Im Gegensatz dazu weisen ESCs, die unter 2i Bedingungen kultiviert wurden und demnach den *ground-state* des pluripotenten Zellstatus verkörpern, eine höhere *Pcgf6* Expression als Epi-SCs und ESCs auf, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden [140]. Zusammen lassen diese Daten vermuten, dass *Pcgf6* ein wichtiger Faktor in murinen ESCs ist. Zusätzlich zu den Funktionen von PcG Proteinen hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und Differenzierungsfähigkeit von ESCs, zeigen PcG Proteine auch eine Funktion in der iPS Reprogrammierung. So konnten z.B. für das PRC2 Protein EZH2 und die PRC1.4 Komponente *Pcgf4* wichtige Rollen in der murinen iPS Reprogrammierung nachgewiesen werden [169, 230]. Basierend auf diesen Daten und der Annahme einer Funktion von *Pcgf6* in ESCs, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch *Pcgf6* eine Rolle in der murinen iPS Reprogrammierung spielt. In Übereinstimmung mit der Expression in murinen ESCs konnte in der hier vorliegenden Arbeit zunächst gezeigt werden, dass *Pcgf6* auch in murinen iPS Zellen das einzige *Pcgf* Paralog mit erhöhter Expression ist. Zusammen mit den bereits veröffentlichten Daten lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die erhöhte *Pcgf6* Expression spezifisch mit dem pluripotenten Stammzellstatus assoziiert ist und lassen darauf schließen, dass *Pcgf6* nicht nur in ESCs sondern auch in iPS Zellen eine wichtige Funktion hat.

6.2 *Pcgf6* Expression im Verlauf der iPS Reprogrammierung

Die Umstrukturierung der Chromatinstruktur stellt einen wichtigen Prozess während der iPS Reprogrammierung dar [179, 181, 205, 214-218]. Demnach ist auch die Expression verschiedener Chromatin-modifizierender Faktoren und epigenetischer Regulatoren entscheidend für die Reprogrammierung somatischer Zellen. In diesem Zusammenhang konnte z.B. gezeigt werden, dass die Expression des Trithorax Komplexbestandteils *Wdr5*

oder auch der PRC2 Komponente *Ezh2* während der iPS Reprogrammierung verstärkt wird [221, 230]. Da *Pcgf6* in MEFs zwar nur verschwindend gering, in iPS Zellen aber dafür erhöht exprimiert wird, ist anzunehmen, dass die *Pcgf6* Expression im Zuge der iPS Reprogrammierung verstärkt wird, was in dieser Arbeit auch bestätigt werden konnte [140]. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten lässt dieses Ergebnis vermuten, dass die Expression der PRC1.6 Komponente *Pcgf6* wichtig für die iPS Reprogrammierung ist.

Insgesamt wurde die *Pcgf6* Expression zu vier Zeitpunkten der Reprogrammierung analysiert. Die erste Analyse fand in einer frühen Phase, kurz nach der Überexpression der OSKM Faktoren statt und bereits zu diesem Zeitpunkt zeigte *Pcgf6* eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu MEFs. Zusätzlich zu Chromatinveränderungen ist vor allem die Repression somatischer Gene ein Hauptmerkmal dieser Reprogrammierungsphase [181, 190, 193, 195, 205, 214, 215, 217]. Da *Pcgf6* als Bestandteil des PRC1.6 Komplexes beschrieben ist, könnte *Pcgf6* zu dieser frühen Phase demnach mit Reprogrammierungsspezifischen Chromatinveränderungen in Verbindung stehen und darüber hinaus an der Repression somatischer Gene beteiligt sein [120]. Diese Annahme wird vor allem durch die klassische Polycombfunktion unterstützt, die mittels repressiver Histonmodifikationen zur transkriptionellen Repression PcG-spezifischer Zielgene beiträgt [99, 115, 116]. Allerdings ist nicht bekannt, ob der PRC1.6 Komplex die klassische Polycombfunktion erfüllt.

Die mögliche Rolle von *Pcgf6* im Kontext Reprogrammierungs-assoziiierter Chromatinveränderungen wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass kürzlich auch *Wdr5* als Bestandteil des nicht-kanonischen PRC1.6 Komplexes identifiziert wurde [120]. *Wdr5* repräsentiert ebenfalls einen essentiellen Faktor für die iPS Reprogrammierung, der bisher nur als Bestandteil des Chromatin-modifizierenden Trithorax Komplexes bekannt war [96, 221, 222]. In murinen ESCs ist *Wdr5* als Bestandteil des Trithorax Komplexes an der Katalyse der aktiven Histonmodifikation H3K4me3 beteiligt, die man häufig an Proliferations-spezifischen Genen findet [96, 221, 222]. Weiterhin wird angenommen, dass die Funktion von *Wdr5* auf der Interaktion mit Oct4 basiert [221]. Bereits 2010 wurde *Wdr5* als Bestandteil des OCT4 Protein-Interaktoms in ESCs identifiziert [249]. Im Rahmen der iPS Reprogrammierung wird vermutet, dass die Interaktion von Oct4 und *Wdr5* zu wichtigen epigenetischen Veränderungen beiträgt und so die Bildung von iPS Zellen unterstützt [221]. Die Funktionen von *Wdr5* und *Pcgf6* im Kontext des PRC1.6 Komplexes sind nicht bekannt. Da aber PRC Komplexe generell mit der Repression von Genen assoziiert sind, ist anzunehmen, dass *Wdr5* und *Pcgf6* zu frühen Phasen der Reprogrammierung an Prozessen beteiligt sind, welche die Transkription Reprogrammierungs-assoziiierter Gene negativ beeinflussen [99, 115, 116]. Da auch für Sox2 eine Funktion als Repressor bestimmter Gene in ESCs bekannt ist, könnte dies eine mögliche gemeinsame Funktion von *Pcgf6* und Sox2 zu dieser Reprogrammierungsphase sein [244, 245].

Die erhöhte Genexpression von *Pcgf6* zu frühen Phasen der iPS Reprogrammierung lässt zudem vermuten, dass die *Pcgf6* Transkription direkt oder indirekt durch die Überexpression der OSKM Faktoren initiiert ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass PcG Proteine bekannte Interaktionspartner Pluripotenz-spezifischer Gene wie z.B. *Oct4* oder *Nanog* sind, die funktional *downstream* der Pluripotenzfaktoren agieren [143-148, 249]. *Oct4*-, *Sox2*- und auch *Nanog*-spezifische Bindungsstudien in murinen ESCs zeigen jedoch nur ein schwaches Bindungsmuster dieser Transkriptionsfaktoren in der *Pcgf6* Genregion [250]. Dies lässt vermuten, dass die alleinige Bindung von *Oct4* und *Sox2* während der iPS Reprogrammierung nicht ausreichend ist, um *Pcgf6* zu re-aktivieren und zusätzliche Faktoren nötig sind. Allerdings werden *Oct4* und *Sox2* im Rahmen der iPS Reprogrammierung zusammen mit *Klf4* und *c-Myc* in MEFs überexprimiert, wobei vor allem die Interaktion mit *c-Myc* zur Verstärkung der Transkription von *Pcgf6* beitragen könnte [176, 190, 205, 208-210]. Im Widerspruch zu einer direkten Aktivierung von *Pcgf6* durch OSKM stehen jedoch *Oct4*-, *Sox2*- und *Klf4*-spezifische ChIP Daten zu frühen Phasen der iPS Reprogrammierung, die keine Bindung von *Oct4*, *Sox2* und *Klf4* in der *Pcgf6* Region zeigen [206]. Allerdings basieren diese ChIP Daten auf humanen Zellproben. Zusammengefasst, ist jedoch anzunehmen, dass die Aktivierung von *Pcgf6* indirekt durch die Überexpression der OSKM Faktoren reguliert ist. Ob OSKM einen Aktivator oder Repressor der *Pcgf6* Expression kontrollieren bleibt im Rahmen dieser Arbeit unbeantwortet.

Zusätzlich zur erhöhten Expression von *Pcgf6* zur frühen Phase der iPS Reprogrammierung war in dieser Arbeit auch eine erhöhte *Pcgf6* Expression zu einem intermediären und einem späten Zeitpunkt der iPS Reprogrammierung nachweisbar. Diese Phasen der Reprogrammierung sind vor allem mit dem Aufbau und der Stabilisierung der Pluripotenz assoziiert [179, 182, 188, 190, 193, 195, 200, 202]. Da für *Pcgf6* eine Pluripotenz-assoziierte Funktion vermutet wird und *Pcgf6* KD ESCs verminderte *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* Expressionsniveaus zeigen, könnte *Pcgf6* zu diesen Reprogrammierungsphasen funktional an der Re-Aktivierung endogener Pluripotenzmarker beteiligt sein [140, 167].

An Tag 6 der Reprogrammierung, dem ersten intermediären Zeitpunkt, konnte ein Absinken der *Pcgf6* Expression beobachtet werden. Da der errechnete Fehlerwert zu diesem Zeitpunkt hoch ist, stellt dieses Absinken der Expression vermutlich nur eine biologische Schwankung dar. Weiterhin auffällig war jedoch, dass die relativen Genexpressionswerte von *Pcgf6* während der iPS Reprogrammierung geringer waren als die Werte, die in iPS Zellen oder ES Zellkulturen nachgewiesen wurden. Dies liegt vermutlich daran, dass die qRT-PCR Analysen in iPS Zellen und ESCs in homogenen Kulturen pluripotenter Zellen durchgeführt wurden. Im Rahmen der iPS Reprogrammierung hingegen wurden heterogene Zellgemische analysiert, die einen hohen Anteil an nicht- oder nur teils-reprogrammierten Zellen aufweisen, da nur eine Minderheit aller somatischen Zellen zu iPS Zellen

reprogrammiert und nur in diesen Zellen eine erhöhte *Pcgf6* Expression nachweisbar ist [176, 188]. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass die transkriptionelle Aktivierung von *Pcgf6* ein wichtiger Prozess in der murinen iPS Reprogrammierung ist, der vermutlich indirekt durch die Überexpression von *OSKM* reguliert ist. Zudem lassen die Ergebnisse vermuten, dass *Pcgf6* zu Reprogrammierungsspezifischen Prozessen der frühen als auch späten Phasen beitragen kann. Die Funktion von *Pcgf6* in frühen Phasen ist vermutlich mit der Repression von Genen als auch Chromatinveränderungen assoziiert. In den späten Phasen der iPS Reprogrammierung könnte *Pcgf6* wichtig für den Aufbau oder die Stabilisierung der Pluripotenz sein.

6.3 *Pcgf6* ist ein neuer Faktor der murinen iPS Reprogrammierung, der spezifisch *Sox2* ersetzen kann

Chromatin-modifizierende Faktoren sind bekannte Regulatoren der iPS Reprogrammierung, deren Funktionen sowohl negative als auch positive Auswirkungen auf die Reprogrammierung haben können [169, 221, 223-231, 251]. PcG Proteine, wie z.B. EZH2, RING1, EED, SUZ12 oder PCGF4 sind positive Regulatoren der iPS Reprogrammierung, da die Inhibierung ihrer Funktion zu verminderten Effizienzen führt [225]. Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass die Repression PcG-spezifischer Zielgene essentiell für die Generierung von iPS Zellen ist [231]. Darüber hinaus können verschiedene Chromatin-modifizierende Faktoren, wie z.B. *Pcgf4* einzelne Faktoren der klassischen „Yamanaka“ Kombination ersetzen [169]. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit, dass sich *Pcgf6* in die Liste wichtiger Chromatin-modifizierenden Faktoren für die iPS Reprogrammierung einreicht und spezifisch *Sox2* in Kombination mit *Oct4*, *Klf4* und *c-Myc* ersetzen kann. Zusammen mit dem Nachweis, dass OPKM-induzierte iPS Zellen charakteristische Eigenschaften pluripotenter Zellen zeigen, etabliert dies *Pcgf6* als neuen Faktor der murinen iPS Reprogrammierung.

6.4 *Pcgf6* und *Pcgf4* haben vermutlich unterschiedliche Funktionen

Da *Pcgf4* die Faktoren *Sox2*, *Klf4* und *c-Myc* ersetzen kann, *Pcgf6* aber nur *Sox2*, werden unterschiedliche Funktionen von *Pcgf4* und *Pcgf6* während der iPS Reprogrammierung vermutet [169]. Die Annahme *Pcgf* Paralog-spezifischer Funktionen wird vor allem durch die Existenz verschiedener PRC1 Varianten unterstützt, die unterschiedliche Bindungsstellen im Genom aufweisen und sich anhand ihres *Pcgf* Paralogen unterscheiden [120]. Auf Basis der Daten von *Gao et al.* definiert *Pcgf4* den kanonischen PRC1.4 Komplex [120]. Grundsätzlich

katalysiert der kanonische PRC1.4 Komplex im Zusammenspiel mit PRC2 repressive Histonmodifikationen und beeinflusst so die Expression seiner Zielgene negativ [99, 115, 116]. In Übereinstimmung mit dieser klassischen Funktion, konnte *Moon et al.* zeigen, dass der *Pcgf4*-spezifische Mechanismus während der iPS Reprogrammierung mit der Repression des *Ink4A/Arf* Genlokus in Zusammenhang steht [169]. Die Überexpression von *Pcgf4* in MEFs führt demnach zu reduzierten p16 und p19 Proteinmengen, was die Reprogrammierung somatischer Zellen positiv beeinflusst [169, 232]. Im Gegensatz zu *Pcgf4* ist *Pcgf6* Bestandteil des nicht-kanonischen PRC1.6 Komplexes, dessen Mechanismus bis jetzt nicht beschrieben ist [120]. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit zusammen mit den Daten von *Hu et al.* und *Zdzieblo et al.* wird jedoch eine Funktion von *Pcgf6* in pluripotenten Stammzellen angenommen [140, 167]. Wie in Abschnitt 6.2 beschrieben könnte *Pcgf6* sowohl zu frühen als auch späten Phasen unterschiedliche Prozesse der Reprogrammierung beeinflussen und so zur Bildung voll-pluripotenter iPS Zellen beitragen.

Weiterhin ist nicht bekannt, ob *Pcgf6* oder auch *Pcgf4* während der iPS Reprogrammierung generell als Bestandteil eines PRC1 Komplexes agieren. Beide Faktoren könnten demnach auch in PRC1-unabhängigen Proteinkomplexen oder als alleinstehende Proteine in einem Reprogrammierungs-assoziierten transkriptionellen Protein-Netzwerk agieren. Analysen zur Bestimmung von Protein-Protein Interaktionen oder auch Immunopräzipitationen mit verschiedenen PRC1 Komponenten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der iPS Reprogrammierung könnten daher über die molekularen Funktionen von *Pcgf6* vermehrt Aufschluss geben.

6.5 *Pcgf6* ist ein essentieller Faktor der murinen iPS Reprogrammierung

Die molekularen Funktionen der OSKM Faktoren im Bezug auf die iPS Reprogrammierung sind nicht vollständig verstanden. Grundsätzlich sind Oct4, Sox2 und Klf4 essentielle Kern-Faktoren der iPS Reprogrammierung und c-Myc ein *Enhancer*-Faktor, der die Effizienz steigert [205, 206]. Die Daten der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass *Pcgf6* ein neuer iPS Reprogrammierungsfaktor ist, der spezifisch Sox2 ersetzen kann. Zusätzlich lassen die qRT-PCR Analysen während der OSKM aber auch OPKM Reprogrammierung darauf schließen, dass die Re-Aktivierung der endogenen *Pcgf6* Expression wichtig für die iPS Reprogrammierung ist. Zusammen mit den drastisch reduzierten Reprogrammierungseffizienzen nach OSKM Reprogrammierung von *Pcgf6* KD MEFs zeigt dies, dass *Pcgf6* ein essentieller Faktor der iPS Reprogrammierung ist. Eine Effizienz-

steigernde Funktion von *Pcgf6* als *Enhancer*-Faktor konnte zudem ausgeschlossen werden, da die gemeinsame Überexpression von *Pcgf6* und der *OSKM* Faktoren keine signifikant gesteigerten Reprogrammierungseffizienzen erzielte. Letzteres wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass die Reprogrammierung unter OSK und OSKP Bedingungen in ähnlichen Effizienzen resultiert.

6.6 *Pcgf6* ist wichtig für den Aufbau und die Stabilisierung der Pluripotenz

Die Mehrheit der AP⁺ Kolonien, die nach OSKM Reprogrammierung von *Pcgf6* KD MEFs entstanden sind, zeigten keine ESC-ähnliche Morphologie. Diese Kolonien wiesen im Vergleich zu AP⁺ Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie eine verminderte *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* Expression auf, was darauf schließen lässt, dass unter *Pcgf6* KD Bedingungen hauptsächlich partiell-reprogrammierte Zellen entstehen, die endogene Pluripotenzgene nicht in vollem Umfang re-aktivieren [36, 181, 183, 252].

Die partiell-reprogrammierten Kolonien konnten allerdings nicht nur nach OSKM Reprogrammierung der *Pcgf6* KD MEFs nachgewiesen werden, sondern entwickelten sich auch in Scr Reprogrammierungskulturen. Im direkten Vergleich entstanden in den Scr Kulturen jedoch mehr AP⁺ Kolonien mit als ohne ESC-ähnliche Morphologie, während in den *Pcgf6* KD Kulturen mehr AP⁺ Kolonien ohne als mit ESC-ähnlicher Morphologie entstanden. Dies deutet darauf hin, dass die OSKM Reprogrammierung von *Pcgf6* KD MEFs zwar zu partiell-reprogrammierten AP⁺ Kolonien führt, diese aber vermutlich eine geringere Tendenz aufweisen, das endogene Pluripotenznetzwerk in vollem Umfang zu re-aktivieren.

Zusätzlich zeigte sich, dass neben den voll-reprogrammierten AP⁺ Kolonien auch die partiell-reprogrammierten AP⁺ Kolonien in *Pcgf6* KD Reprogrammierungskulturen im Vergleich zur Scr Kontrolle reduziert waren. Dies deutet darauf hin, dass die OSKM Reprogrammierung generell durch einen *Pcgf6* KD in MEFs negativ beeinflusst ist. Ein Grund hierfür könnten die physiologischen Eigenschaften der Ausgangszellen sein. In diesem Zusammenhang zeigten die *Pcgf6* KD MEFs im Vergleich zu Scr MEFs kurz nach lentiviraler Transduktion eine verminderte Zellrate und eine Seneszenz-assoziierte Morphologie. In welchem Umfang *Pcgf6* an diesen Prozessen in MEFs beteiligt ist, ist nicht bekannt.

Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse, dass *Pcgf6* sowohl zu frühen als auch späten Phasen der Reprogrammierung eine Rolle spielt. Die Auswirkungen des *Pcgf6* KDs waren jedoch in Bezug auf die Anzahl an voll-reprogrammierten iPS Kolonien erheblich größer als im Falle der partiell-reprogrammierten Kolonien. Demnach hat der Verlust der

Pcgf6 Funktion während der iPS Reprogrammierung vermutlich eine vorwiegend negative Auswirkung auf die Stabilisierung der Pluripotenz zu späten Phasen der iPS Reprogrammierung.

6.7 Gemeinsamkeiten der Pcgf6 und Sox2 Funktion

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der KD von *Pcgf6* in MEFs massiv die Stabilisierung der endogenen Pluripotenz beeinträchtigt und *Pcgf6* demnach besonders in späten Phasen der Reprogrammierung notwendig ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass *Pcgf6* spezifisch *Sox2* in der iPS Reprogrammierung ersetzen kann, denn auch *Sox2* gilt als ein Faktor, dessen Funktion vor allem in späten Phasen der Reprogrammierung von Bedeutung ist [191, 253]. In diesem Zusammenhang zeigte *Buganim et al.*, dass die stochastischen Prozesse der frühen Phasen im Verlauf der Reprogrammierung in eine *Sox2*-regulierte hierarchische Abfolge transkriptioneller Aktivierungen des endogenen Pluripotenznetzwerkes übergeht [191]. Nach diesem Modell erfolgt in reprogrammierenden Zellen zunächst die transkriptionelle Aktivierung von endogenem *Sox2*. Im Anschluss daran findet die Aktivierung weiterer Pluripotenzmarker wie z.B. *Esrrb*, *Sall4* und *Lin28* statt [191]. Nach diesem Modell, kann *Esrrb* aber nicht nur die Expression von *downstream* Zielgenen beeinflussen, sondern auch die Expression des *upstream* gelegenen *Sox2* regulieren. *Esrrb* gilt zudem als direktes transkriptionelles Zielgen von *Nanog* [236]. Nach dem Modell von *Buganim et al.* agiert *Nanog* jedoch unabhängig von dem durch *Sox2* initiierten Netzwerk. 2009 konnte aber gezeigt werden, dass *Nanog* ebenfalls essentiell dafür ist, dass aus partiell-reprogrammierten Zellen voll-pluripotente iPSCs entstehen [36]. Basierend auf diesen Daten, stellt *Nanog* eine mögliche molekulare Schnittstelle zwischen *Pcgf6* und *Sox2* dar, denn *Gagliardi et al.* zeigten kürzlich, dass sowohl *Pcgf6* als auch *Sox2* direkte Interaktionspartner von *Nanog* sind [146]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass *Pcgf6* und *Sox2* in partiell-reprogrammierten Kolonien über Ihre Interaktion mit *Nanog* an der Regulation des endogenen Pluripotenznetzwerkes beteiligt sind. Für *Nanog* als mögliche molekulare Schnittstelle sprechen auch die Ergebnisse von *Ichida et al.* [254]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass *Sox2* durch ein kleines chemisches Molekül ersetzt werden kann. Funktional trägt dieses Molekül zur Inhibierung des TGF β Signalweges in partiell-reprogrammierten Zellen bei, was letztendlich die Aktivierung von *Nanog* in diesen Zellen positiv beeinflusst und somit die Bildung voll-reprogrammierter iPS Zellen unterstützt. Ob die Interaktion von *Pcgf6* und *Sox2* mit *Nanog* gleiche, ähnliche oder individuelle Gene und Reprogrammierungs-spezifische Mechanismen kontrolliert bleibt im Rahmen dieser Arbeit unbeantwortet.

Sowohl während der OSKM als auch OPKM Reprogrammierung kommt es zur Re-Aktivierung der endogenen Transkripte von *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* und *Pcgf6*. Dies lässt vermuten, dass *Pcgf6* ähnlich wie *Sox2*, mit den Faktoren *Oct4*, *Klf4* und *c-Myc* interagieren kann und zur Aktivierung wichtiger Reprogrammierungs-spezifischer Gene beiträgt. Gegen eine direkte Interaktion von *Pcgf6* mit *Oct4* sprechen jedoch die Daten einer OCT4-spezifischen Protein-Interaktionsstudie, die *Pcgf6* nicht als Bestandteil des OCT4 Protein-Interaktoms auflistet [249]. Allerdings wurden *Pcgf2* und *Pcgf4* als auch der PRC1.6 Bestandteil *Wdr5* als Interaktionspartner von OCT4 identifiziert. Demnach könnte *Pcgf6* indirekt über die Paraloge *Pcgf2* oder *Pcgf4* als auch den PRC1.6 Komplexpartner *Wdr5* mit *Oct4* interagieren um wichtige Prozesse der Reprogrammierung kontrollieren zu können [249]. In Übereinstimmung damit, dass *Pcgf6* Bestandteil des NANOG Protein-Interaktoms ist, lassen diese Daten vermuten, dass *Pcgf6* über die direkte oder indirekte Interaktion mit Pluripotenz-assoziierten Proteinen wichtige Prozesse im Verlauf der Reprogrammierung somatischer Zellen beeinflusst [146].

Eine weitere mögliche Schnittstelle zwischen der Funktion von *Pcgf6* und *Sox2* stellt die Repression Differenzierungs-spezifischer Gene während der iPS Reprogrammierung dar. *Shu et al.* demonstrierten, dass *Oct4* und *Sox2* durch verschiedene Repressoren unterschiedlicher Keimbahnlinien-spezifischer Gene in der iPS Reprogrammierung ausgetauscht werden können [243]. In diesem Zusammenhang konnte *Sox2* durch die Faktoren *Sox1*, *Sox3*, *Rcor2* und *Gmnn* ersetzt werden. Wie *Sox2* können *Sox1*, *Sox2*, *Rcor2* und *Gmnn* in Kombination mit *Oct4*, *Klf4* und *c-Myc* mes-entodermale Gene wie z.B. *Brachyury* reprimieren [243-245]. Da der KD von *Pcgf6* in ESCs zu einer erhöhten Expression von mesodermalen Genen führt, wird eine Funktion von *Pcgf6* als Repressor dieser Keimbahnlinien Gene in ESCs angenommen [140]. Basierend auf diesen Daten, könnte die Repression mesodermaler Gene während der Reprogrammierung eine weitere gemeinsame funktionale Schnittstelle von *Pcgf6* und *Sox2* sein.

6.8 Zusammenfassung

Die Daten der hier vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass das PRC1.6 Komplexprotein PCGF6 ein neuer Faktor der murinen iPS Reprogrammierung ist. *Pcgf6* ist in murinen iPS Zellen ebenfalls wie in murinen ESCs exprimiert und kann in Kombination mit *Oct4*, *Klf4* und *c-Myc* den Transkriptionsfaktor *Sox2* während der iPS Reprogrammierung ersetzen (Abb. 15). OPKM-induzierte iPS Zellen sind pluripotent und zeigen als stringentesten Nachweis in dieser Arbeit die Kapazität, keimbahnfähige, chimäre Tiere nach Blastozysteninjektion generieren zu können.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Pcgf6* keine *Enhancer*-Funktion im Verlauf der iPS Reprogrammierung erfüllt. Allerdings ist *Pcgf6* ein essentieller Faktor für die OSKM-induzierte Reprogrammierung, dessen Transkription bereits zu frühen Phasen reaktiviert wird. Zusätzlich lassen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass *Pcgf6* und *Sox2* ähnliche Funktionen während der iPS Reprogrammierung haben (Abb. 15). In diesem Zusammenhang könnte *Pcgf6* sowohl zu frühen als auch späten Reprogrammierungsphasen eine Rolle spielen (Abb. 15). Da der KD von *Pcgf6* im Verlauf der iPS Reprogrammierung vorwiegend negativ auf die Ausbildung voll-reprogrammierter iPS Kolonien und weniger auf die Ausbildung partiell-reprogrammierter Kolonien wirkt, wird vermutet, dass die Funktion von *Pcgf6* hauptsächlich mit den späten Phasen assoziiert ist (Abb. 15). Die Funktion von *Pcgf6* zu frühen Phasen der Reprogrammierung ist vermutlich mit Chromatin-modifizierenden Mechanismen assoziiert [99, 115, 116, 120] (Abb. 15). Des Weiteren könnte *Pcgf6* und *Sox2* zu frühen Phasen der Reprogrammierung auch mit der Repression wichtiger Genen in Verbindung stehen [140, 244, 245] (Abb. 15). Eine weitere gemeinsame Funktion von *Pcgf6* und *Sox2* könnte auch die Repression von z.B. mesentodermalen Genen zu späteren Zeitpunkten der Reprogrammierung sein [140, 214, 244, 245] (Abb. 15). Wie für *Sox2* wird die Hauptfunktion von *Pcgf6* in den späten Phasen der Reprogrammierung angenommen und mit der Stabilisierung der Pluripotenz in Verbindung gebracht [191, 253]. Als gemeinsame Schnittstelle der *Pcgf6* und *Sox2* Funktion wird *Nanog* vermutet [146].

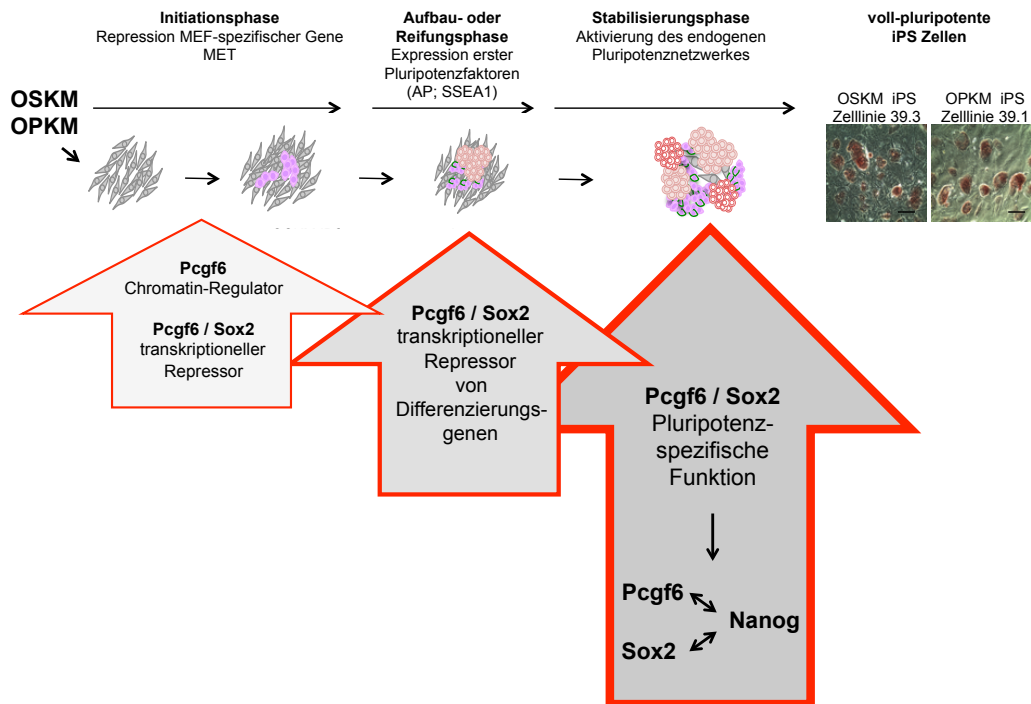


Abb. 15. Mögliche gemeinsame Funktionen von Pcgf6 und Sox2 im Verlauf der iPS Reprogrammierung. Gezeigt sind mögliche gemeinsame Funktionen von Pcgf6 und Sox2 im Verlauf der iPS Reprogrammierung. Die Reprogrammierungs-spezifischen Funktionen von Pcgf6 sind vermutlich besonders für die späten Phasen der iPS Reprogrammierung wichtig. Zu frühen Phasen könnte Pcgf6 als Chromatin-Regulator dienen. Pcgf6 und Sox2 könnten zudem als transkriptioneller Repressor von Genen dienen, deren Repression wichtig für die iPS Reprogrammierung ist. Diese Funktion ist vermutlich in späteren Phasen der Reprogrammierung von Bedeutung. Hier könnten Pcgf6 und Sox2 zur Repression von Differenzierungs-spezifischen Gene wie z.B. mes-entodermaler Gene beitragen. In den späten Phasen der Reprogrammierung repräsentiert Nanog eine mögliche funktionale Schnittstelle der Pcgf6 und Sox2 Funktion, welche vermutlich die Stabilisierung der endogenen Pluripotenz fördert [99, 115, 116, 120, 140, 146, 214, 244, 245].

7. Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikro-Liter
µM	Mikro-Mol
µm	Mikro-Meter
AEBP2	<i>adipocyte-enhancer binding protein</i>
AP	Alkaline Phosphatase
AUTS2	<i>Autism susceptibility candidate 2</i>
BcoR	<i>BCL6 corepressor</i>
BcoRL1	<i>BCL6 corepressor-like1</i>
Bmi1	<i>B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1 Homolog</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBX	<i>Chromobox homolog</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
c-Myc	<i>Cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CSNK2A	<i>Casein kinase II subunit alpha</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
dKO	Doppel-Knockout
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
Dnmt	DNA Methyltransferase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dp-1	<i>Dodeca-satellite binding protein 1</i>
Dppa2	<i>developmental pluripotency associated 2</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOT1L	<i>DOT-like histone H3K79 Methyltransferase</i>
E2F6	E2F Transkriptionsfaktor 6
EB	<i>Embryoid body</i>
ECT	Ektodermal
EED	<i>Embryonic ectoderm development</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EHMT1	<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase1</i>

Epi-SC	Epiblast Stammzellen
ESCs	Embryonale Stammzellen
Esrrb	<i>Estrogen-related receptor beta</i>
EZH1/2	<i>Enhancer of zeste 1 or 2</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBRS	Fibrosin
FBRSL1	Fibrosin-like 1
FBX15	F-box Protein 15
FCS	fetales Kälberserum; <i>fetal calf serum</i>
Fgf4	<i>Fibroblast growth factor 4</i>
Flk1	<i>Fetal-Liver Kinase 1</i>
FoxA2	<i>Forkhead box A2</i>
Gata4/6	GATA Bindeprotein 4 oder 6
Gmnn	Geminin
H ₂ O	Wasser
h	Stunde/Stunden
HDAC2/1	Histondeacetylase 2 oder 1
HMG	<i>High-mobility group</i>
HP1 γ	Heterochromatinprotein 1 γ
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HOX	<i>Homeobox</i>
ICM	innere Zellmasse (<i>inner cell mass</i>)
iPS Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
JAK	Januskinase
KAc	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
KD	<i>Knockdown</i>
KDM	<i>Lysine (K)-specific De-Methylase</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Klf4	<i>Kruppel-like Faktor 4</i>
KO	<i>Knockout</i>
Jarid2	<i>JUMONJI, AT-rich interactive domain 2</i>
L3MBTL2	<i>Lethal(3)Malignant Brain Tumor-Like Protein 2</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>

M	Mol
MAX	MYC assoziierter Faktor X
Mblr	<i>Mel18 And Bmi1-Like RING Finger Protein</i>
ME	Mes-entodermal
MEFs	embryonale Mausfibroblasten; <i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
MGA	<i>MAX Gene Associated</i>
MgSO ₄	Magnesiumsulphat
min.	Minute/Minuten
ml	Milliliter
MnCl ₂	Mangan(II)chlorid
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
mRPL6	Maus-ribosomales Protein L6
MTF2	<i>Metal response element binding transcription factor 2</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Nr5a1/2	<i>Nuclear receptor subfamily 5 group a member 1 or 2</i>
Nspc1	<i>Nervous System Polycomb-1</i>
Oct4	<i>Octamer-Binding Protein 4</i>
OD	Optische Dichte
PARP	<i>Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family</i>
Pax3	<i>Paired box 3</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PcG	<i>Polycomb group</i>
Pcgf	<i>Polycomb group RING finger</i>
PHC	<i>polyhomeotic homolog</i>
PHF1/19	<i>plant homeodomain finger 1 or 19</i>
PFA	Paraformaldehyd
Puro	Puromycin
POU	<i>Pit, Oct, Unc</i>
PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real-time</i> Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RBBP4/7	<i>Retinoblastoma binding protein 4 or 7</i>

RbCl	Rubidiumchlorid
Rcor2	REST Korepressor 2
Rex1	<i>Reduced expression 1</i>
RING1	<i>Really interesting new gene 1</i>
RK	Reprogrammierungskultur(en)
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RYBP	<i>RING1 and YY1 binding protein</i>
Sall4	<i>spalt-like transcription factor 4</i>
SCM	<i>sex comb on midleg</i>
Scr	<i>Scrambled</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat; <i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec.	Sekunde/Sekunden
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SETDB1	<i>SET-domain, bifurcated 1</i>
SKP1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
Sox1/2/3	<i>SRY-box 1 or 2 or 3</i>
SSEA1	<i>Stage-specific embryonic antigen 1</i>
Sry	<i>Sex determining region Y</i>
STABW	Standardabweichung
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SUV39H	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog</i>
Suz12	<i>Suppressor Of Zeste 12 Protein Homolog</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose NonFermentable</i>
T	Brachyury
TBE	Tris-Borat-EDTA
TET	<i>Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
Thy1	<i>Thymocyte antigen 1</i>
TrxG	Trithorax Komplex
Utf1	<i>Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1</i>
UTX	<i>Ubiquitously transcribed chromosome tetratricopeptide repeat protein</i>

WDR5

WD repeat domain 5

8. Literaturverzeichnis

1. Wagers, A.J. and I.L. Weissman, *Plasticity of adult stem cells*. Cell, 2004. **116**(5): p. 639-48.
2. Chaudry, A., *Stem Cell Bioengineering*. The Science Creative Quarterly, 2004.
3. Lee, A.B.a.E.H., *Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources*, in *Stem Cells - From Bench to Bedside*, A.B.a.E.H. Lee, Editor. 2005, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
4. Edwards, R.G. and H.K. Beard, *Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(10): p. 863-905.
5. Mitalipov, S. and D. Wolf, *Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 185-99.
6. Wang, E.B.a.G., *Molecular Mechanisms Underlying Pluripotency*, in *Pluripotent Stem Cells*, D.B.a.N. Lenka, Editor. 2013, InTech.
7. Dejosez, M. and T.P. Zwaka, *Pluripotency and nuclear reprogramming*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 737-65.
8. Pauklin, S., R.A. Pedersen, and L. Vallier, *Mouse pluripotent stem cells at a glance*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 22): p. 3727-32.
9. Mitsiadis, T.A., et al., *Stem cell niches in mammals*. Exp Cell Res, 2007. **313**(16): p. 3377-85.
10. Voog, J. and D.L. Jones, *Stem cells and the niche: a dynamic duo*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(2): p. 103-15.
11. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
12. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
13. Boeuf, H., et al., *Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells*. J Cell Biol, 1997. **138**(6): p. 1207-17.
14. Cartwright, P., et al., *LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism*. Development, 2005. **132**(5): p. 885-96.
15. Hall, J., et al., *Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(6): p. 597-609.
16. Suzuki, A., et al., *Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10294-9.
17. Davis, S., et al., *LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor*. Science, 1993. **260**(5115): p. 1805-8.
18. Matsuda, T., et al., *STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells*. EMBO J, 1999. **18**(15): p. 4261-9.
19. Niwa, H., et al., *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3*. Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 2048-60.
20. Niwa, H., *How is pluripotency determined and maintained?* Development, 2007. **134**(4): p. 635-46.
21. Silva, J. and A. Smith, *Capturing pluripotency*. Cell, 2008. **132**(4): p. 532-6.
22. Boiani, M. and H.R. Scholer, *Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(11): p. 872-84.
23. Young, R.A., *Control of the embryonic stem cell state*. Cell, 2011. **144**(6): p. 940-54.
24. Orkin, S.H., et al., *The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008. **73**: p. 195-202.
25. Chambers, I. and S.R. Tomlinson, *The transcriptional foundation of pluripotency*. Development, 2009. **136**(14): p. 2311-22.
26. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.

27. Scholer, H.R., et al., *New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4*. Nature, 1990. **344**(6265): p. 435-9.
28. Pesce, M. and H.R. Scholer, *Oct-4: control of totipotency and germline determination*. Mol Reprod Dev, 2000. **55**(4): p. 452-7.
29. Rosner, M.H., et al., *A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo*. Nature, 1990. **345**(6277): p. 686-92.
30. Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith, *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 372-6.
31. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 126-40.
32. Bowles, J., G. Schepers, and P. Koopman, *Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 239-55.
33. Masui, S., et al., *Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 625-35.
34. Kopp, J.L., et al., *Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 903-11.
35. Mitsui, K., et al., *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 631-42.
36. Silva, J., et al., *Nanog is the gateway to the pluripotent ground state*. Cell, 2009. **138**(4): p. 722-37.
37. Hough, S.R., et al., *Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog*. Stem Cells, 2006. **24**(6): p. 1467-75.
38. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
39. Chambers, I., et al., *Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development*. Nature, 2007. **450**(7173): p. 1230-4.
40. Torres, J. and F.M. Watt, *Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(2): p. 194-201.
41. Ambrosetti, D.C., C. Basilico, and L. Dailey, *Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6321-9.
42. Yuan, H., et al., *Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3*. Genes Dev, 1995. **9**(21): p. 2635-45.
43. Chew, J.L., et al., *Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(14): p. 6031-46.
44. Kuroda, T., et al., *Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): p. 2475-85.
45. Okumura-Nakanishi, S., et al., *Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5307-17.
46. Rodda, D.J., et al., *Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 24731-7.
47. Tomioka, M., et al., *Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): p. 3202-13.
48. Kim, J., et al., *An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells*. Cell, 2008. **132**(6): p. 1049-61.
49. Loh, Y.H., et al., *The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 431-40.
50. Wang, J., et al., *A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 364-8.

51. Meshorer, E. and T. Misteli, *Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 540-6.
52. Mattout, A. and E. Meshorer, *Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(3): p. 334-41.
53. Arney, K.L. and A.G. Fisher, *Epigenetic aspects of differentiation*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 19): p. 4355-63.
54. Franc Castel, C., et al., *Nuclear compartmentalization and gene activity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 137-43.
55. Meshorer, E., et al., *Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells*. Dev Cell, 2006. **10**(1): p. 105-16.
56. Jorgensen, H.F., et al., *The impact of chromatin modifiers on the timing of locus replication in mouse embryonic stem cells*. Genome Biol, 2007. **8**(8): p. R169.
57. Bhattacharya, D., et al., *Spatio-temporal plasticity in chromatin organization in mouse cell differentiation and during Drosophila embryogenesis*. Biophys J, 2009. **96**(9): p. 3832-9.
58. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
59. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33** Suppl: p. 245-54.
60. Boland, M.J., K.L. Nazor, and J.F. Loring, *Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation*. Circ Res, 2014. **115**(2): p. 311-24.
61. Christman, J.K., *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5483-95.
62. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 89-97.
63. Bird, A.P. and A.P. Wolffe, *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin*. Cell, 1999. **99**(5): p. 451-4.
64. Razin, A. and H. Cedar, *DNA methylation and gene expression*. Microbiol Rev, 1991. **55**(3): p. 451-8.
65. Stein, R., et al., *Clonal inheritance of the pattern of DNA methylation in mouse cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(1): p. 61-5.
66. Farthing, C.R., et al., *Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes*. PLoS Genet, 2008. **4**(6): p. e1000116.
67. Fouse, S.D., et al., *Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 160-9.
68. Mellor, J., P. Dudek, and D. Clynes, *A glimpse into the epigenetic landscape of gene regulation*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(2): p. 116-22.
69. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
70. Campos, E.I. and D. Reinberg, *Histones: annotating chromatin*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 559-99.
71. Davey, C.A., et al., *Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution*. J Mol Biol, 2002. **319**(5): p. 1097-113.
72. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
73. Berger, S.L., *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 407-12.
74. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
75. Koyanagi, M., et al., *EZH2 and histone 3 trimethyl lysine 27 associated with Il4 and Il13 gene silencing in Th1 cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31470-7.

76. Nakayama, J., et al., *Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly*. Science, 2001. **292**(5514): p. 110-3.
77. Plath, K., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation*. Science, 2003. **300**(5616): p. 131-5.
78. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 407-11.
79. Struhl, K., *Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms*. Genes Dev, 1998. **12**(5): p. 599-606.
80. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
81. Azuara, V., et al., *Chromatin signatures of pluripotent cell lines*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(5): p. 532-8.
82. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
83. Kuzmichev, A., et al., *Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein*. Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2893-905.
84. Schuettengruber, B., et al., *Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(12): p. 799-814.
85. Wu, M., et al., *Molecular regulation of H3K4 trimethylation by Wdr82, a component of human Set1/COMPASS*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(24): p. 7337-44.
86. Bienz, M. and J. Muller, *Transcriptional silencing of homeotic genes in Drosophila*. Bioessays, 1995. **17**(9): p. 775-84.
87. Duncan, I.M., *Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of Drosophila melanogaster*. Genetics, 1982. **102**(1): p. 49-70.
88. Jürgens, G., *A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in Drosophila*. Nature, 1985. **316**: p. 3.
89. Lewis, E.B., *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. Nature, 1978. **276**(5688): p. 565-70.
90. Schuettengruber, B., et al., *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins*. Cell, 2007. **128**(4): p. 735-45.
91. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 9-22.
92. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, *Polycomb silencers control cell fate, development and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 846-56.
93. Struhl, G., *A gene product required for correct initiation of segmental determination in Drosophila*. Nature, 1981. **293**(5827): p. 36-41.
94. Klymenko, T. and J. Muller, *The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins*. EMBO Rep, 2004. **5**(4): p. 373-7.
95. Poux, S., et al., *The Drosophila trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing*. Development, 2002. **129**(10): p. 2483-93.
96. Ringrose, L. and R. Paro, *Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 413-43.
97. Levine, S.S., et al., *The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6070-8.
98. Morey, L. and K. Helin, *Polycomb group protein-mediated repression of transcription*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(6): p. 323-32.
99. Satijn, D.P. and A.P. Otte, *Polycomb group protein complexes: do different complexes regulate distinct target genes?* Biochim Biophys Acta, 1999. **1447**(1): p. 1-16.
100. Delaval, K. and R. Feil, *Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(2): p. 188-95.

101. Guitton, A.E. and F. Berger, *Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants*. Int J Dev Biol, 2005. **49**(5-6): p. 707-16.
102. Heard, E., *Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(5): p. 482-9.
103. Liu, J., et al., *Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 387-92.
104. Martinez, A.M. and G. Cavalli, *The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development*. Cell Cycle, 2006. **5**(11): p. 1189-97.
105. Mohd-Sarip, A., et al., *Transcription-independent function of Polycomb group protein PSC in cell cycle control*. Science, 2012. **336**(6082): p. 744-7.
106. de Napoles, M., et al., *Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 663-76.
107. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 255-60.
108. Leung, C., et al., *Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas*. Nature, 2004. **428**(6980): p. 337-41.
109. Wang, J., et al., *Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene*. Nat Genet, 2001. **28**(4): p. 371-5.
110. Christophersen, N.S. and K. Helin, *Epigenetic control of embryonic stem cell fate*. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2287-95.
111. Alkema, M.J., et al., *Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex*. Genes Dev, 1997. **11**(2): p. 226-40.
112. Franke, A., et al., *Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of Drosophila melanogaster*. EMBO J, 1992. **11**(8): p. 2941-50.
113. Jones, C.A., et al., *The Drosophila esc and E(z) proteins are direct partners in polycomb group-mediated repression*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2825-34.
114. Kyba, M. and H.W. Brock, *The Drosophila polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2712-20.
115. Margueron, R. and D. Reinberg, *The Polycomb complex PRC2 and its mark in life*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 343-9.
116. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Ruled by Ubiquitylation: A New Order for Polycomb Recruitment*. Cell Rep, 2014. **8**(2): p. 321-325.
117. Strutt, H. and R. Paro, *The polycomb group protein complex of Drosophila melanogaster has different compositions at different target genes*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(12): p. 6773-83.
118. Francis, N.J., et al., *Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 545-56.
119. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(12): p. 853-64.
120. Gao, Z., et al., *PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes*. Mol Cell, 2012. **45**(3): p. 344-56.
121. Vandamme, J., et al., *Interaction proteomics analysis of polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(4): p. M110 002642.
122. Wang, R., et al., *Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain*. Structure, 2010. **18**(8): p. 966-75.
123. Nekrasov, M., et al., *Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes*. EMBO J, 2007. **26**(18): p. 4078-88.
124. Peng, J.C., et al., *Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1290-302.
125. Sarma, K., et al., *Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze H3 lysine 27 trimethylation in vivo*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(8): p. 2718-31.

126. Shen, X., et al., *Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1303-14.
127. Li, G., et al., *Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression*. Genes Dev, 2010. **24**(4): p. 368-80.
128. Pasini, D., et al., *JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 306-10.
129. Landeira, D., et al., *Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(6): p. 618-24.
130. Min, J., Y. Zhang, and R.M. Xu, *Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1823-8.
131. Cao, R., Y. Tsukada, and Y. Zhang, *Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 845-54.
132. Stock, J.K., et al., *Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(12): p. 1428-35.
133. Zhou, W., et al., *Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation*. Mol Cell, 2008. **29**(1): p. 69-80.
134. Dellino, G.I., et al., *Polycomb silencing blocks transcription initiation*. Mol Cell, 2004. **13**(6): p. 887-93.
135. Blackledge, N.P., et al., *Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation*. Cell, 2014. **157**(6): p. 1445-59.
136. Morey, L., et al., *Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(1): p. 47-62.
137. Tavares, L., et al., *RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3*. Cell, 2012. **148**(4): p. 664-78.
138. Turner, S.A. and A.P. Bracken, *A "complex" issue: deciphering the role of variant PRC1 in ESCs*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(2): p. 145-6.
139. Kerppola, T.K., *Polycomb group complexes--many combinations, many functions*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(12): p. 692-704.
140. Zdzienbło, D., et al., *Pcgf6, a polycomb group protein, regulates mesodermal lineage differentiation in murine ES cells and functions in IPS reprogramming*. Stem Cells, 2014.
141. Morey, L., et al., *RYBP and Cbx7 define specific biological functions of polycomb complexes in mouse embryonic stem cells*. Cell Rep, 2013. **3**(1): p. 60-9.
142. O'Loghlen, A., et al., *MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(1): p. 33-46.
143. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. Nature, 2006. **441**(7091): p. 349-53.
144. Endoh, M., et al., *Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity*. Development, 2008. **135**(8): p. 1513-24.
145. Ding, J., et al., *Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network*. Cell Res, 2012. **22**(1): p. 155-67.
146. Gagliardi, A., et al., *A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal*. EMBO J, 2013. **32**(16): p. 2231-47.
147. Aloia, L., B. Di Stefano, and L. Di Croce, *Polycomb complexes in stem cells and embryonic development*. Development, 2013. **140**(12): p. 2525-34.
148. Pietersen, A.M. and M. van Lohuizen, *Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(2): p. 201-7.
149. Surface, L.E., S.R. Thornton, and L.A. Boyer, *Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(3): p. 288-98.
150. Voncken, J.W., et al., *Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2468-73.

151. Akasaka, T., et al., *A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theanteriorposterior specification of the axial skeleton*. *Development*, 1996. **122**(5): p. 1513-22.
152. Alkema, M.J., et al., *Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice*. *Nature*, 1995. **374**(6524): p. 724-7.
153. van der Lugt, N.M., et al., *Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene*. *Genes Dev*, 1994. **8**(7): p. 757-69.
154. Pirity, M.K., J. Locker, and N. Schreiber-Agus, *Rybp/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(16): p. 7193-202.
155. Fukuda, T., et al., *Fbxl10/Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly*. *Mol Cell Neurosci*, 2011. **46**(3): p. 614-24.
156. Qin, J., et al., *The polycomb group protein L3mbtl2 assembles an atypical PRC1-family complex that is essential in pluripotent stem cells and early development*. *Cell Stem Cell*, 2012. **11**(3): p. 319-32.
157. Hisada, K., et al., *RYBP represses endogenous retroviruses and preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells*. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(6): p. 1139-49.
158. Faust, C., et al., *The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice*. *Development*, 1995. **121**(2): p. 273-85.
159. O'Carroll, D., et al., *The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(13): p. 4330-6.
160. Pasini, D., et al., *Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity*. *EMBO J*, 2004. **23**(20): p. 4061-71.
161. Pasini, D., et al., *The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(10): p. 3769-79.
162. Chamberlain, S.J., D. Yee, and T. Magnuson, *Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency*. *Stem Cells*, 2008. **26**(6): p. 1496-505.
163. Guo, W.J., et al., *Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(2): p. 536-46.
164. Kajjume, T., et al., *Regulation of hematopoietic stem cells using protein transduction domain-fused Polycomb*. *Exp Hematol*, 2012. **40**(9): p. 751-760 e1.
165. Park, I.K., et al., *Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 302-5.
166. Ross, K., et al., *Polycomb group ring finger 1 cooperates with Runx1 in regulating differentiation and self-renewal of hematopoietic cells*. *Blood*, 2012. **119**(18): p. 4152-61.
167. Hu, G., et al., *A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal*. *Genes Dev*, 2009. **23**(7): p. 837-48.
168. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation*. *Nature*, 2003. **425**(6961): p. 962-7.
169. Moon, J.H., et al., *Reprogramming fibroblasts into induced pluripotent stem cells with Bmi1*. *Cell Res*, 2011. **21**(9): p. 1305-15.
170. Yamanaka, S. and H.M. Blau, *Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches*. *Nature*, 2010. **465**(7299): p. 704-12.
171. Gurdon, J.B., T.R. Elsdale, and M. Fischberg, *Sexually mature individuals of Xenopus laevis from the transplantation of single somatic nuclei*. *Nature*, 1958. **182**(4627): p. 64-5.
172. Gurdon, J.B., *The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, 1960. **8**: p. 505-26.
173. Gurdon, J., *Nuclear reprogramming in eggs*. *Nat Med*, 2009. **15**(10): p. 1141-4.

174. Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature, 1997. **385**(6619): p. 810-3.
175. Tada, M., et al., *Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1553-8.
176. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
177. Boland, M.J., et al., *Adult mice generated from induced pluripotent stem cells*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 91-4.
178. Kang, L., et al., *iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(2): p. 135-8.
179. Maherali, N., et al., *Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(1): p. 55-70.
180. Wernig, M., et al., *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 318-24.
181. Mikkelsen, T.S., et al., *Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 49-55.
182. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
183. Sridharan, R., et al., *Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency*. Cell, 2009. **136**(2): p. 364-77.
184. Yamanaka, S. and K. Takahashi, *[Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2006. **51**(15): p. 2346-51.
185. Zhao, X.Y., et al., *iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 86-90.
186. Hanna, J., et al., *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1920-3.
187. Wernig, M., et al., *Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5856-61.
188. Stadtfeld, M. and K. Hochedlinger, *Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications*. Genes Dev, 2010. **24**(20): p. 2239-63.
189. Samavarchi-Tehrani, P., et al., *Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(1): p. 64-77.
190. David, L. and J.M. Polo, *Phases of reprogramming*. Stem Cell Res, 2014. **12**(3): p. 754-61.
191. Buganim, Y., et al., *Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1209-22.
192. Smith, Z.D., et al., *Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(5): p. 521-6.
193. Polo, J.M., et al., *A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells*. Cell, 2012. **151**(7): p. 1617-32.
194. Li, R., et al., *A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(1): p. 51-63.
195. Stadtfeld, M., et al., *Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 230-40.
196. Hong, H., et al., *Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1132-5.
197. Marion, R.M., et al., *A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1149-53.
198. Utikal, J., et al., *Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1145-8.

199. Tanabe, K., et al., *Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(30): p. 12172-9.
200. Brambrink, T., et al., *Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 151-9.
201. Hansson, J., et al., *Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency*. Cell Rep, 2012. **2**(6): p. 1579-92.
202. Ho, R., C. Chronis, and K. Plath, *Mechanistic insights into reprogramming to induced pluripotency*. J Cell Physiol, 2011. **226**(4): p. 868-78.
203. Golipour, A., et al., *A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network*. Cell Stem Cell, 2012. **11**(6): p. 769-82.
204. Marion, R.M., et al., *Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(2): p. 141-54.
205. Buganim, Y., D.A. Faddah, and R. Jaenisch, *Mechanisms and models of somatic cell reprogramming*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(6): p. 427-39.
206. Soufi, A., G. Donahue, and K.S. Zaret, *Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome*. Cell, 2012. **151**(5): p. 994-1004.
207. Yeo, J.C. and H.H. Ng, *The transcriptional regulation of pluripotency*. Cell Res, 2013. **23**(1): p. 20-32.
208. Rahl, P.B., et al., *c-Myc regulates transcriptional pause release*. Cell, 2010. **141**(3): p. 432-45.
209. Lin, C.Y., et al., *Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc*. Cell, 2012. **151**(1): p. 56-67.
210. Nie, Z., et al., *c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells*. Cell, 2012. **151**(1): p. 68-79.
211. Knoepfler, P.S., *Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(1): p. 18-21.
212. Lin, C.H., et al., *Gene regulation and epigenetic remodeling in murine embryonic stem cells by c-Myc*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7839.
213. Chen, J., et al., *BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 205-12.
214. Apostolou, E. and K. Hochedlinger, *Chromatin dynamics during cellular reprogramming*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 462-71.
215. Hochedlinger, K. and K. Plath, *Epigenetic reprogramming and induced pluripotency*. Development, 2009. **136**(4): p. 509-23.
216. Huangfu, D., et al., *Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(7): p. 795-7.
217. Meissner, A., *Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1079-88.
218. Koche, R.P., et al., *Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(1): p. 96-105.
219. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
220. Fussner, E., et al., *Constitutive heterochromatin reorganization during somatic cell reprogramming*. EMBO J, 2011. **30**(9): p. 1778-89.
221. Ang, Y.S., et al., *Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network*. Cell, 2011. **145**(2): p. 183-97.
222. Dou, Y., et al., *Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(8): p. 713-9.
223. Mansour, A.A., et al., *The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming*. Nature, 2012. **488**(7411): p. 409-13.
224. Liang, G., J. He, and Y. Zhang, *Kdm2b promotes induced pluripotent stem cell generation by facilitating gene activation early in reprogramming*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(5): p. 457-66.

225. Onder, T.T., et al., *Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming*. Nature, 2012. **483**(7391): p. 598-602.
226. Wang, T., et al., *The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(6): p. 575-87.
227. Costa, Y., et al., *NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 370-4.
228. Doege, C.A., et al., *Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2*. Nature, 2012. **488**(7413): p. 652-5.
229. Gao, Y., et al., *Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(4): p. 453-69.
230. Ding, X., et al., *The polycomb protein Ezh2 impacts on induced pluripotent stem cell generation*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(9): p. 931-40.
231. Fragola, G., et al., *Cell reprogramming requires silencing of a core subset of polycomb targets*. PLoS Genet, 2013. **9**(2): p. e1003292.
232. Li, H., et al., *The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1136-9.
233. Theunissen, T.W. and R. Jaenisch, *Molecular control of induced pluripotency*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(6): p. 720-34.
234. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
235. Feng, B., et al., *Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 197-203.
236. Festuccia, N., et al., *Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells*. Cell Stem Cell, 2012. **11**(4): p. 477-90.
237. Heng, J.C., et al., *The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(2): p. 167-74.
238. Redmer, T., et al., *E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming*. EMBO Rep, 2011. **12**(7): p. 720-6.
239. Heuberger, J. and W. Birchmeier, *Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a002915.
240. Ho, R., et al., *Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins*. Cell Rep, 2013. **3**(6): p. 2113-26.
241. Ben-David, U., J. Nissenbaum, and N. Benvenisty, *New balance in pluripotency: reprogramming with lineage specifiers*. Cell, 2013. **153**(5): p. 939-40.
242. Shu, J. and H. Deng, *Lineage specifiers: new players in the induction of pluripotency*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2013. **11**(5): p. 259-63.
243. Shu, J., et al., *Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers*. Cell, 2013. **153**(5): p. 963-75.
244. Thomson, M., et al., *Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers*. Cell, 2011. **145**(6): p. 875-89.
245. Wang, Z., et al., *Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 440-54.
246. Yang, P., et al., *RCOR2 is a subunit of the LSD1 complex that regulates ESC property and substitutes for SOX2 in reprogramming somatic cells to pluripotency*. Stem Cells, 2011. **29**(5): p. 791-801.
247. Szabo, P.E., et al., *Allele-specific expression of imprinted genes in mouse migratory primordial germ cells*. Mech Dev, 2002. **115**(1-2): p. 157-60.
248. Hussein, S.M., et al., *Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 58-62.
249. van den Berg, D.L., et al., *An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(4): p. 369-81.

250. Chen, X., et al., *Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1106-17.
251. Singhal, N., et al., *Chromatin-Remodeling Components of the BAF Complex Facilitate Reprogramming*. Cell, 2010. **141**(6): p. 943-55.
252. Theunissen, T.W., et al., *Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions*. Curr Biol, 2011. **21**(1): p. 65-71.
253. Liu, X., et al., *Sequential introduction of reprogramming factors reveals a time-sensitive requirement for individual factors and a sequential EMT-MET mechanism for optimal reprogramming*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(7): p. 829-38.
254. Ichida, J.K., et al., *A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(5): p. 491-503.

9. Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Albrecht Müller, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Herrn PD Dr. Robert Hock danke ich für die Bereitschaft, sich als Zweitprüfer seitens der Julius-Maximilians-Universität Würzburg zur Verfügung zu stellen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Matthias Becker für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Müller danke ich für die nette und lustige Arbeitsatmosphäre. Frau Christine Hofstetter gilt dabei mein besonderer Dank.

Als nächstes möchte ich Frau Simone Reimer, Frau Simone Röhling, Frau Jessica Gabler und Frau Tanja Herbstsommer danken. Vielen Dank für Alles!!!

Christopher Düsel danke ich für die Unterstützung und all die aufmunternden Worte in den letzten Jahren.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Renate und Günter Zdzieblo, für die moralische und vor allem finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit und Doktorarbeit bedanken. Ohne Euch wäre das Alles nicht möglich gewesen. An dieser Stelle gilt auch meinen Geschwistern, Jennifer und André, mein Dank.

10. Eidesstattliche Erklärung

Daniela Zdzieblo
Stauferstraße 14
97076 Würzburg

Eidesstattliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:

„Das *Polycomb group* Protein PCGF6 ist ein neuer und essentieller Faktor der iPS Reprogrammierung und kann in Kombination mit Oct4, Klf4 und c-Myc den Transkriptionsfaktor Sox2 ersetzen“

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Ort, Datum

Unterschrift

11. Publikationsliste

2014: Forschungsartikel:

Zdzieblo D*, Li X*, Qiong L, Zenke M, Illich DJ, Becker M, Müller AM. *Pcgf6, a polycomb group protein, regulates mesodermal lineage differentiation in murine ES cells and functions in iPS reprogramming.* Stem Cells, 2014. doi: 10.1002/stem.

Buchkapitel:

Becker M, Mah N, **Zdzieblo D**, Li X, Mer A, Andrade-Navarro MA, Müller A. *PRC1-mediated gene silencing in pluripotent ES cells: function and evolution.* Epigenetic Mechanisms in Cellular Reprogramming. ISBN 978-3-642-31973-0. Springer Verlag. 2014. Book in press.

2010: Forschungsartikel:

Monzon-Casanova E, Steiniger B, Schweigle S, Clemen H, **Zdzieblo D**, Starick L, Müller I, Wang CR, Rhost S, Cardell S, Pyz E, Herrmann T. *CD1d expression in paneth cells and rat exocrine pancreas revealed by novel monoclonal antibodies which differentially affect NKT cell activation.* PLoS One. 5(9), e13089. 2010

