

Aus dem Bereich Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Nachweis von Genamplifikationen und „unter-replikation“
mittels FISH und qPCR während der Differenzierung von
humanen
mesenchymalen Stammzellen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017*

vorgelegt von: Nora Corinna Altmayer
geb. am: 09.11.1990 in Zweibrücken

Inhaltsverzeichnis

i.	Abbildungsverzeichnis	III
ii.	Tabellenverzeichnis	VI
iii.	Abkürzungsverzeichnis	VI
1.	Zusammenfassung - deutsch und englisch	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Stammzellen	3
2.2.	Genamplifikationen	7
2.3.	Polyploidie	10
2.4.	Aufgabenstellung	11
3.	Material und Methoden	12
3.1.	Methoden	12
3.1.1.	Herstellen der BAC-Sonden für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen	12
3.1.1.1.	Kultivierung und Isolierung der BACs enthaltenden Bakterien	12
3.1.1.2.	Konzentrationsmessung der DNA mittels NanoDrop	13
3.1.1.3.	Nicktranslation	14
3.1.1.4.	Gelelektrophorese zur Größenbestimmung der DNA-BAC-Sonden	16
3.1.1.5.	Fällung der BAC-Sonden	17
3.1.1.6.	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	18
3.1.1.7.	Medienwechsel, Stammzellisolierung und Objektträgeranfertigung zu verschiedenen Zeitpunkten	21
3.1.1.8.	DNA-Isolation	22
3.1.1.9.	qPCR	23
3.2.	Material	25
3.2.1.	Verwendete Reaktionskits	25
3.2.2.	Verwendete Medien	25
3.2.3.	Kulturmedien für Bakterien, angesetzte Lösungen und Puffer	26
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Kultivierung der osteogenen und adipogenen Stammzellen	28
4.1.1.	Differenzierungsinduktion und ihre Verifizierung	28
4.2.	Beschreibung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen	33
4.3.	Beschreibung der PCR-Ergebnisse	56
4.3.1.	Beschreibung der PCR-Ergebnisse der adipogenen Reihe	57
4.3.2.	Beschreibung der PCR-Ergebnisse der osteogenen Reihe	58
5.	Diskussion	60
5.1.	Übersicht über die Ergebnisse	60
5.2.	Diskussion der Unterreplikation	62
5.3.	Diskussion der Hypothese der DNA-Fragmentation	63
5.4.	Diskussion des Ausschleusens von amplifizierter DNA	64

5.5.	Diskussion der BAC-Sonden, die die Aussage der Array-CGH nicht bestätigten	65
5.6.	Diskussion der humanen mesenchymalen Stammzellen im Maintenancemedium	66
5.7.	Diskussion der PCR-Ergebnisse	66
5.7.1.	Diskussion der PCR-Ergebnisse der adipogenen Reihe	66
5.7.2.	Diskussion der PCR-Ergebnisse der osteogenen Reihe	68
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	72
7.	<i>Publikationen/Dank</i>	74

i. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Differenzierungswege von Stammzellen	4
Abbildung 2:	Das Krebsstammzellmodell	6
Abbildung 3:	Bildung von extrachromosomalen (DM) und intrachromosomalen (HSR) Amplifikationen	7
Abbildung 4:	„Onion-Skin“-Modell	8
Abbildung 5:	Der Verlust des Telomeres führt zu Genamplifikationen durch einen Mechanismus, der als „Breakage-Fusion-Bridge“-Zyklus bezeichnet wird	9
Abbildung 6:	verschiedene Endoreplikationszyklen	10
Abbildung 7:	Work-Flow einer FISH	14
Abbildung 8:	Auftrennung zweier verschiedener BAC-Sonden mittels Gelelektrophorese	16
Abbildung 9:	DNA-Isolation: Die obere Phase wurde abpipettiert.	21
Abbildung 10:	qPCR mit einer TaqMan-Polymerase, einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher	23
Abbildung 11:	humane mesenchymale Stammzellen vor der Differenzierungsinduktion	28
Abbildung 12:	humane mesenchymale Stammzellen 3 Tage nach osteogenem Induktionsbeginn (Bild a) und 7 Tage nach osteogenem Induktionsbeginn (Bild b)	28
Abbildung 13:	humane mesenchymale Stammzellen 3 Tage nach adipogenem Induktionsbeginn (Bild a) und 7 Tage nach adipogenem Induktionsbeginn (Bild b)	29
Abbildung 14:	Anfärben der Vakuolen der 3 Tage lang in Richtung Adipozyten differenzierten mesenchymalen Stammzellen mittels AdipoRedAssay	30
Abbildung 15:	Lokalisation der BAC-Sonde 53C21	33
Abbildung 16:	Lokalisation der BAC-Sonde 118F19	33
Abbildung 17:	Hybridisierung der BAC-Sonde 53C21 und der BAC-Sonde 118F19 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser beiden BAC-Sonden mit hMSC	34
Abbildung 18:	Hybridisierung der BAC-Sonde 53C21 und der BAC-Sonde 118F19 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden	35

Abbildung 19:	Hybridisierung der BAC-Sonde 297B9 und der BAC-Sonde 81J11 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser beiden BAC-Sonden mit hMSC	36
Abbildung 20:	Die BAC-Sonde 81J11 bindet an eine Region des Chromosoms 15, die BAC-Sonde 297B9 bindet an eine Region des Chromosoms 22.	37
Abbildung 21:	Hybridisierung der BAC-Sonde 297B9 und der BAC-Sonde 81J11 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden	38
Abbildung 22:	Hybridisierung der BAC-Sonde 297B9 und der BAC-Sonde 81J11 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden	39
Abbildung 23:	Hybridisierung der BAC-Sonde 1142B4 und der BAC-Sonde 162F20 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser beiden BAC-Sonden mit hMSC	40
Abbildung 24:	Lokalisation der BAC-Sonde 1142B4	41
Abbildung 25:	Lokalisation der BAC-Sonde 162F20	41
Abbildung 26:	Hybridisierung der BAC-Sonde 1142B4 und der BAC-Sonde 162F20 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden	42
Abbildung 27:	Lokalisation der BAC-Sonde 728G2	43
Abbildung 28:	Hybridisierung der BAC-Sonde 728G2 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser BAC-Sonde mit hMSC	44
Abbildung 29:	Hybridisierung der BAC-Sonde 728G2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden (siehe a und b) und die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden (siehe c und d)	45
Abbildung 30:	Hybridisierung der BAC-Sonde 571M6 und der BAC-Sonde 661O2 mit hMSC	46
Abbildung 31:	Lokalisation der BAC-Sonde 571M6	46
Abbildung 32:	Lokalisation der BAC-Sonde 611O2	46
Abbildung 33:	Hybridisierung der BAC-Sonde 571M6 und der BAC-Sonde 661O2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in	48

	Richtung Adipozyten differenziert wurden (siehe a und b) und die 7 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden (siehe c und d)	
Abbildung 34:	Hybridisierung der BAC-Sonde 571M6 und der BAC-Sonde 661O2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 4 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden	49
Abbildung 35:	Hybridisierung der BAC-Sonde 571M6 und der BAC-Sonde 661O2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden	50
Abbildung 36:	Hybridisierung der BAC-Sonde 47G1 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser BAC-Sonde mit hMSC	51
Abbildung 37:	Lokalisation der BAC-Sonde 47G1	51
Abbildung 38:	Hybridisierung der BAC-Sonde 47G1 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden	52
Abbildung 39:	Hybridisierung der BAC-Sonde 47G1 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden	53
Abbildung 40:	Lokalisation des Genes <i>TP53TG3B</i>	55
Abbildung 41:	Lokalisation der BAC-Sonde 53C21	55
Abbildung 42:	Lokalisation des Genes <i>PRSS1</i>	55
Abbildung 43:	Lokalisation der BAC-Sonde 47G1	55
Abbildung 44:	qPCR der adipogenen Reihe	56
Abbildung 45:	qPCR der osteogenen Reihe	57
Abbildung 46:	Zellkerne, die möglicherweise amplifizierte DNA ausschleusen	64
Abbildung 47:	qPCR der adipogenen Reihe	66
Abbildung 48:	qPCR der osteogenen Reihe	68

ii. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Reaktionskits	24
Tabelle 2:	Medien	25
Tabelle 3:	Kulturmedien, Lösungen und Puffer	26
Tabelle 4:	Induktionsschema der Stammzellen, die in Richtung Adipozyten differenziert wurden und der Stammzellen, die in Richtung Osteozyten differenziert wurden	27
Tabelle 5:	Gene	53
Tabelle 6:	Gene, die für die qPCR verwendet wurden	54
Tabelle 7:	Übersicht	59

iii. Abkürzungsverzeichnis

BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CDK4	Cyclin dependent kinase 4
CGH	comparative genomic hybridization
d	Tag oder Tage
DM	double minutes
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et alii/ et aliae (und andere)
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
g	gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure

HSR	homogeneous staining regions
H ₂ O	Wasser
l	Liter
LB	lysogeny broth
m	milli
M	molar
MDM2	MDM2 p53 binding protein homolog
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μ	mikro-
n	nano-
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	phosphat buffered saline
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSPE	Saline Sodium Phosphat/EDTA buffer
TAE	Trisacetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
V	Volt

1. Zusammenfassung

Genamplifikationen kommen während der Entwicklung in bestimmten Zellen in Amphibien und Fliegen vor. Beim Menschen stellen Genamplifikationen ein charakteristisches Merkmal in Tumorzellen dar, wohingegen Genamplifikationen in normalen menschlichen Zellen lange unentdeckt blieben. Seit kurzem ist bekannt, dass Genamplifikationen auch in neuronalen Progenitorzellen der Maus und des Menschen, sowie in Myoblasten der Maus und des Menschen vorkommen. Dies wirft die Frage auf, ob in Vorläuferzellen von Adipozyten und Osteozyten ebenfalls Genamplifikationen zu finden sind.

In dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen entweder in Richtung Adipozyten oder in Richtung Osteozyten differenziert. Zellen beider Versuchsreihen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf Amplifikationen hin untersucht. Dies erfolgte zunächst mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf Einzelzellniveau und anschließend mittels qPCR.

Aufbauend auf vorhergehenden Array-CGHs (array comparative genomic hybridisation) von Stammzellen, die sowohl in Richtung Adipozyten als auch in Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnten verschiedene amplifizierte und/oder unter-replizierte DNA-Regionen nachgewiesen werden, die in dieser Arbeit mittels fluoreszenzmarkierter Bacterial Artificial Chromosoms (BACs) bestätigt wurden. Um Amplifikationen und „unter-replizierte“ Regionen detektieren zu können, wurden diese BAC-Sonden mit Hilfe der Nicktranslation fluoreszenzmarkiert. Mesenchymale Stammzellen wurden unterschiedlich lang differenziert und mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung untersucht. Für einzelne ausgewählte amplifizierte Chromosomenregionen wurden Gene ausgesucht und eine Verifikation der Amplifikationen und/oder „unter-replikation“ mittels qPCR durchgeführt. Diese Gene liegen zum Teil in den DNA-Regionen, die mit den entsprechenden BAC-Sonden hybridisieren oder sie befinden sich in chromosomaler Nähe zu diesen DNA-Regionen, die mit den entsprechenden BAC-Sonden hybridisieren.

Es konnten erstmals Amplifikationen und „unter-replizierte“ Regionen in humanen mesenchymalen Stammzellen detektiert werden, die nicht differenziert wurden, in humanen mesenchymalen Stammzellen, die unterschiedlich lange in Richtung Adipozyten differenziert wurden und in humanen mesenchymalen Stammzellen, die unterschiedlich lange in Richtung Osteozyten differenziert wurden.

Damit wurde ein weiterer Beleg dafür geliefert, dass Genamplifikationen in unterschiedlichen Stammzellen des Menschen während ihrer Differenzierung vorkommen. Innerhalb der amplifizierten chromosomalen Regionen befinden sich auch DNA-Regionen, die für

bestimmte Proteine kodieren wie z.B. CDK4 oder MDM2. Diese Gene liegen in einer Reihe von Tumoren amplifiziert vor.

Abstract

Gene amplifications occur in certain cells of amphibians and flies during development. In humans gene amplifications are an attribute of tumor cells whereas gene amplifications in normal human cells remained undetected for a long time. As of late there is evidence that gene amplifications appear in human and mouse neural progenitor cells as well as in human myoblasts and in mouse myoblasts. This raises the question if one can find gene amplifications in progenitor cells of adipocytes and of osteocytes.

This study describes the amplification analysis of human mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells differentiated towards adipocytes and osteocytes at different time points. Amplification analysis was performed using two techniques, first fluorescence *in situ* hybridization and second qPCR.

Starting point were results from a previous array CGH that analyzed human mesenchymal stem cells and differentiation of human mesenchymal stem cells towards adipocytes and osteocytes. Several DNA regions were detected amplified and/or under-replicated in array-CGH analysis. Bacterial artificial Chromosomes (BAC) for selected amplified and under-replicated chromosome regions were fluorescence labeled using nick translation and used in FISH experiments against mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells differentiated towards adipocytes and osteocytes. In a second approach several genes were analyzed for amplification using qPCR. Genes were selected according to their location within chromosome regions that correspond to BAC probes used in FISH experiments or their location next to the BAC specific chromosome region.

Gene amplifications were detected in undifferentiated human mesenchymal stem cells and in mesenchymal stem cells differentiated towards adipocytes and osteocytes at several selected time points.

In conclusion this study has shown for the first time that gene amplification occur in human mesenchymal stem cells and in human mesenchymal stem cells differentiated towards adipocytes and osteocytes. This study has provided further evidence that gene amplification can be found in various human stem cells during differentiation. Amplified chromosomal regions included several genes for example *CDK4* or *MDM2* that are also amplified in multiple different tumors.

2 Einleitung

2.1. Stammzellen

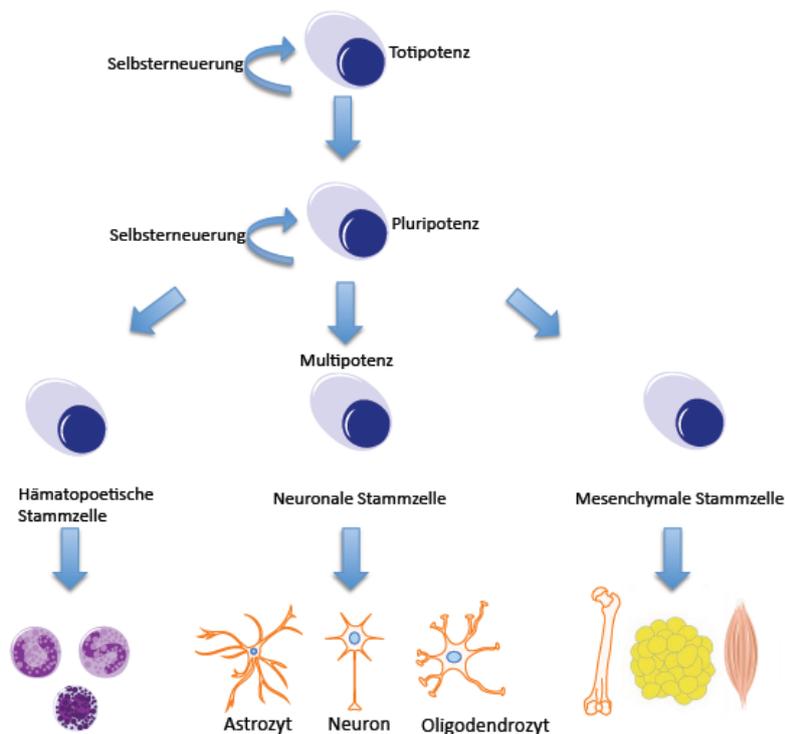


Abbildung 1: Differenzierungswege von Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern. Dieser Prozess wird als „Self-Renewal“ bezeichnet und dient dem Aufrechterhalten eines Stammzellpools während des gesamten Lebens eines Organismus. Wichtig für einen normalen Selbsterneuerungsprozess ist ein Gleichgewicht aus Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und sogenannten „care-taking tumor suppressors“. Die Protoonkogene haben die Aufgabe den Selbsterneuerungsprozess voranzutreiben, während die Tumorsuppressorgene den Selbsterneuerungsprozess in Grenzen halten sollen. Die „care-taking suppressors“ dienen dem Aufrechterhalten der genomischen Integrität [1]. Um einen differenzierten Zellstatus zu erlangen, durchläuft eine Stammzelle verschiedene Differenzierungsstadien. Zu Beginn befindet sie sich in einem Stadium der Totipotenz, in dem sie die Fähigkeit besitzt sich zu einem ganzen Individuum zu entwickeln. Ist die Blastozyste gebildet, beginnt das Stadium der Pluripotenz. Im Stadium der Pluripotenz kann

die entsprechende Zelle nicht mehr zu einem ganzen Organismus differenzieren. Sie kann sich in verschiedene Gewebetypen des entsprechenden Organismus entwickeln. Zum Schluss ist das Stadium der Multipotenz erreicht. Man geht davon aus, dass diese pluripotenten Stammzellen durch exogene Signale dazu stimuliert werden, sich in multipotente Stammzellen weiter zu entwickeln[2]. Eine multipotente Stammzelle zeichnet sich dadurch aus, dass sich die Zelle nur noch in verschiedene Zellen eines Zelltypes, zum Beispiel hämatopoetische Zellen oder neuronale Zellen, differenzieren kann. Seit 2011 ist bekannt, dass auch eine Rückentwicklung von der differenzierten Stammzelle zur pluripotenten Stammzelle möglich ist [3]. Dieser Prozess wird als Dedifferenzierung bezeichnet und dient dem Vermehren der rückdifferenzierten Stammzelle, sodass bei der erneuten Differenzierung Zellen in der entsprechenden Zelllinie, die verloren gingen, ersetzt werden können. Im Vergleich dazu findet bei der sogenannten Reprogrammierung ebenfalls eine Rückentwicklung zur pluripotenten Zelle statt, allerdings kann sich die Zelle von dort in fast jeden Zelltypus differenzieren. Die Transdifferenzierung ist eine Mischung aus den beiden oben genannten Mechanismen. Es kommt zur Dedifferenzierung, die Zellen können aber nun die „Zellreihe“ wechseln und jetzt zum Beispiel zur hämatopoetischen Stammzelle, anstatt zur neuronalen Stammzelle differenzieren.

Stammzellen befinden sich in sogenannten Stammzellnischen. Diese Nischen stellen eine geeignete zelluläre Umgebung für Stammzellen dar, in der sie verschiedenen Faktoren unterliegen, die einen Einfluss auf Selbsterneuerung und Differenzierung ausüben. Allan Spradling konnte 2000 zeigen[4], dass Stammzellen nicht autonom arbeiten, sondern „abhängig sind von den Signalen anderer Zellen“. Wichtig für Stammzellen sind zum einen die Stromazellen, die dafür sorgen, dass auf Grund von Adhäsionskräften die Stammzellen in der Nähe der entsprechenden Signalmoleküle innerhalb der Stammzellnische bleiben. Man geht davon aus, dass unterschiedliche externe Signale innerhalb der Stammzellnische dafür verantwortlich sind, dass sich Stammzellen entweder symmetrisch oder asymmetrisch teilen[5]. Eine symmetrische Zellteilung findet statt, wenn schnell eine große Anzahl an Zellen bereitgestellt werden muss, wie zum Beispiel in Entwicklungsphasen oder nach Verletzungen. Liegen jedoch normale Bedingungen vor, teilen sich Stammzellen asymmetrisch, um ein Gleichgewicht zwischen Stammzellpool und differenzierten Zellen aufrecht zu erhalten[1]. Zweitens besitzen Oberflächenmoleküle wie Integrine, Cadherine und Catenine einen Einfluss auf Stammzellen. Die zwei wichtigsten Stammzellnischen des Menschen sind die Substantia spongiosa des Knochens, in der sich Stammzellen zu verschiedenen Blutzellen differenzieren. Die zweite wichtige Stammzellnische stellt das Gehirn, insbesondere die subventrikuläre Zone des Hippocampus und der Riechkolben, dar. Hier findet man neuronale Stammzellen.

Die Forschung an embryonalen Stammzellen stellt ein ethisches Dilemma dar. Zum einen soll versucht werden Erkrankungen und ihre Ursachen zu verstehen und zu beseitigen. Auf der anderen Seite ist die Einfuhr und Verwendung embryonaler Stammzellen grundsätzlich verboten (§ 1 StZG und § 4 Abs 1 StZG). Ein weiteres Gesetz, § 5 StZG, besagt, dass humane embryonale Stammzellen verwendet werden dürfen, wenn dargelegt werden konnte, dass andere Zellarten wie tierische embryonale Stammzellen oder humane adulte Stammzellen nicht in der Weise für die entsprechenden Forschungsziele geeignet sind, wie es humane embryonale Stammzellen sind. Aus diesem Grund benutzt man oft in der Forschung adulte Stammzellen. Man unterscheidet zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Das Proliferationspotential der adulten Stammzellen ist im Vergleich zum Proliferationspotential der embryonalen Stammzellen vermindert. Es wird oft ein schon oben beschriebenes Verfahren angewandt, das sich Reprogrammierung nennt. Es beruht darauf, dass somatische Zellen rückprogrammiert werden, sodass sie wieder Eigenschaften von embryonalen Stammzellen besitzen[6]. Diese entstandenen embryonalen Stammzellen werden induzierte pluripotente Stammzellen genannt. Diese Methode bringt jedoch Nachteile mit sich. Da zur Reprogrammierung verschiedene Gene mit Hilfe von Viren in die entsprechende Zelle eingeschleust werden müssen, kann es zu genomischen Anomalien und in deren Folge zu Krebs kommen [7].

Eine neuere Unterscheidung teilt Stammzellen in drei Untergruppen ein: 1.EC-Zellen (embryonic carcinoma cells) aus embryonalen Tumorzellen, 2.EG-Zellen (embryonic germ cells) aus den fötalen Vorläuferzellen der Geschlechtszellen und 3.ES-Zellen (embryonic stem cells) aus frühen Embryonalstadien (Blastozysten) (www.drze.de). Gründe, warum Stammzellen im Mittelpunkt aktueller Forschung stehen, sind zum einen ihre Fähigkeit der Geweberegeneration und –reparatur. Zweitens besteht ein großes Interesse, den Zusammenhang zwischen Stammzellen und Krebs (Krebsstammzellen-Theorie) im Detail aufzudecken.

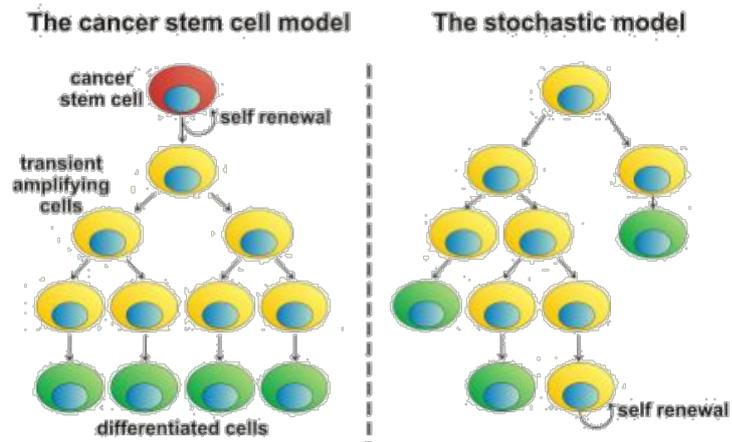


Abbildung 2: Das Krebsstammzellmodell

Man unterscheidet zwischen zwei Modellen, die beide die Entstehung von Krebs zu erklären versuchen. Das Krebsstammzellmodell beschreibt ein organisiertes Tumorsystem, welches eine Stammzelle als Ausgangspunkt besitzt. Das stochastische Modell besagt, dass jede einzelne Zelle das gleiche intrinsische Potential hat, eine Tumorzelle zu werden.

2.2. Genamplifikationen

Bostock definierte Genamplifikationen wie folgt: Die Anzahl an Genkopien muss bei Genamplifikationen über der Anzahl an Genkopien liegen, die normalerweise charakteristisch für den entsprechenden Organismus sind.[8] Die Folge kann die Überexpression des entsprechenden Genes sein. Diese Überexpression findet bei Organismen wie *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Sciara coprophila* und *Tetrahymena thermophila* statt. In definierten Entwicklungsstadien können bestimmte Proteine in großen Mengen produziert werden, sodass ein möglicher kurzzeitiger Proteinbedarf gedeckt werden kann. Außerdem sind Genamplifikationen eine Eigenschaft von humanen Tumorzellen[9]. Man vermutet, dass die Prognose von Tumoren mit ihrem Level an Amplifikationen korreliert. Des Weiteren konnten Genamplifikationen in chemostatikaresistenten Zellen nachgewiesen werden.

Man unterscheidet zwischen intrachromosomalen und extrachromosomalen Amplifikationen. Bei den extrachromosomalen Amplifikationen handelt es sich um ringförmige DNA-Moleküle, die meistens wie eine Doppel-Ring-Form aussehen, weshalb man sie als „double minutes“ (DM) bezeichnet [10]. Diese „double minutes“ können wieder in das Genom integriert werden, sodass intrachromosomale Amplifikationen, sogenannte „homogeneous staining regions“ (HSR) entstehen.

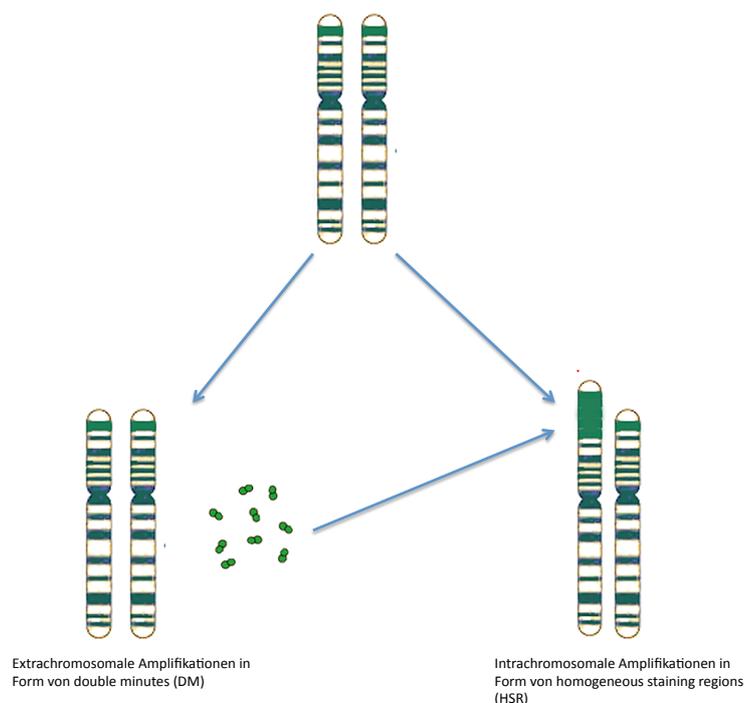


Abbildung 3: Bildung von extrachromosomalen (DM) und intrachromosomalen (HSR) Amplifikationen

Es existieren zwei verschiedene Modelle, die die Entstehung von Genamplifikationen zu erklären versuchen: Das „Onion-Skin“-Modell beschreibt einen Prozess, bei dem aus einer ersten Replikationsgabel mehrere weitere Replikationsgabeln hervorgehen[11].

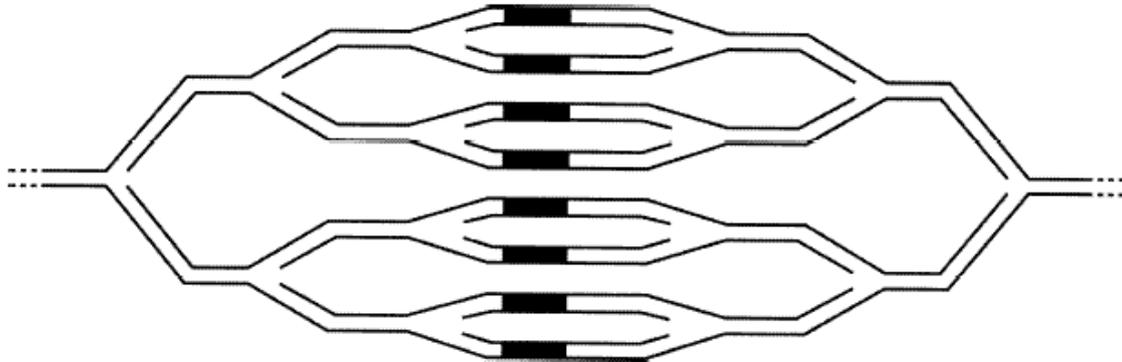


Abbildung 4: „Onion-Skin“-Modell (biology-online.de)

Das zweite Modell ist das „Breakage-Fusion-Bridge“-Modell, das einen anderen Mechanismus zur Entstehung von Genamplifikationen beschreibt. Normalerweise werden Chromosomen durch die Telomere geschützt. Kommt es jedoch auf Grund eines Doppelstrangbruchs zu einem verkürzten Chromosomenarm, an dem das Telomer fehlt, kann nach der Anaphase der ursprünglich telomerlose Chromosomenarm mit dem neu replizierten Chromosomenarm, dem ebenfalls das Telomer fehlt, fusionieren. Es bildet sich eine DNA-Brücke aus. Findet nun die nächste Anaphase statt, teilt sich die DNA nicht zu gleichen Mengen, sondern es gibt einen Doppelstrangbruch zum Beispiel oberhalb des markierten Gens. Somit besitzt eine Tochterzelle mehr genetisches Material, das sich nun wiederholt, als die andere Tochterzelle. Da auch diese zwei unterschiedlichen Chromatiden keine Telomere besitzen, setzt sich der „Breakage-Fusion-Bridge“-Zyklus weiter fort, was dazu führt, dass sich die Anzahl an sich wiederholenden Genen weiter erhöht.

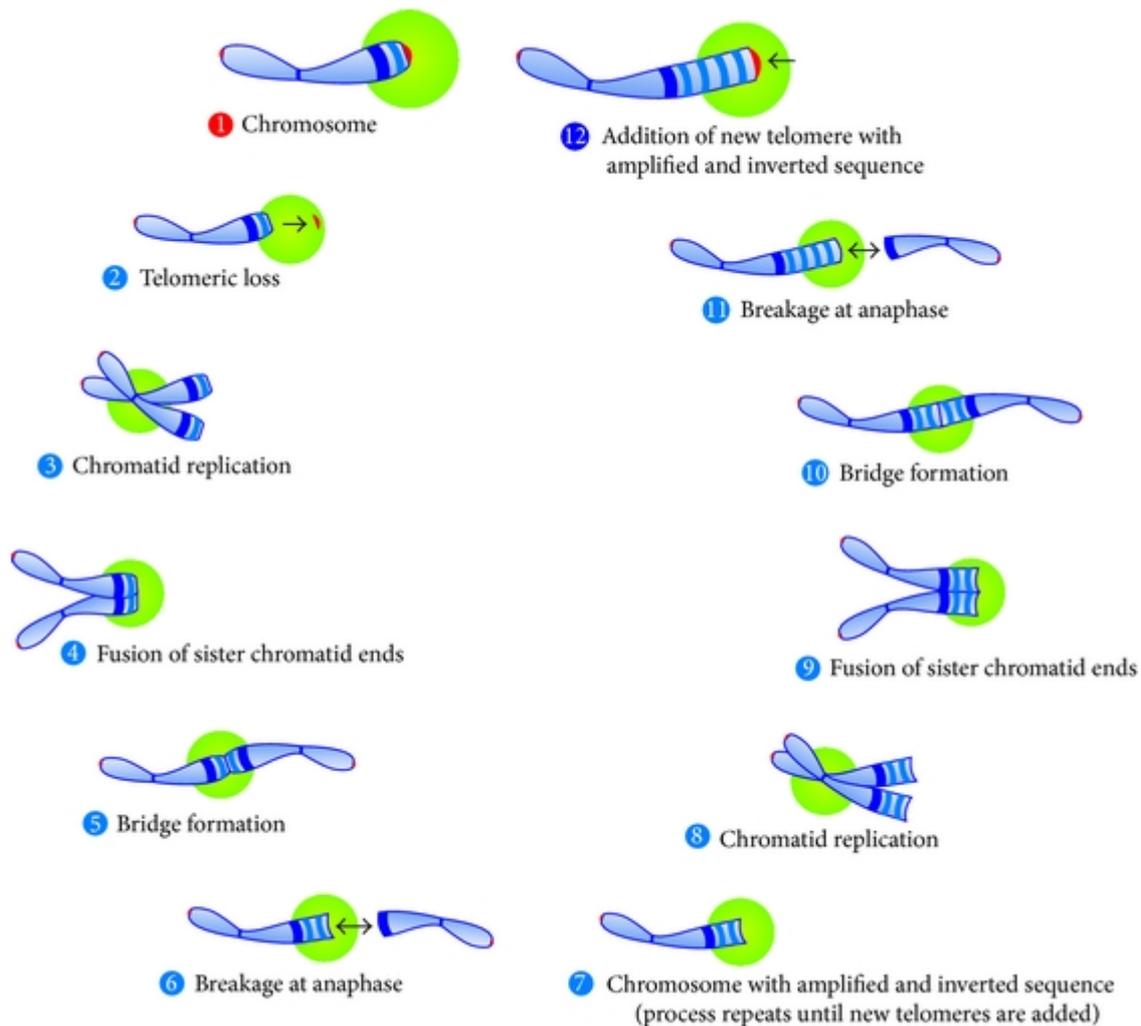


Abbildung 5: Der Verlust des Telomeres führt zu Genamplifikationen durch einen Mechanismus, der als „Breakage-Fusion-Bridge“-Zyklus bezeichnet wird[12]

Fischer *et al.* konnten vor kurzem Genamplifikationen in menschlichen neuronalen Progenitorzellen und in neuralen Mausprogenitorzellen während ihrer Differenzierung nachweisen [13]. Des Weiteren zeigten Fischer *et al.*[14], dass auch in differenzierten Mausmyoblasten und in Myoblasten des Menschen Genamplifikationen zu finden sind. Diese Arbeiten werfen die Frage auf, ob Genamplifikationen einen grundlegenden Mechanismus während des menschlichen Differenzierungsprozesses darstellen und ob Genamplifikationen deshalb in weiteren differenzierten Stammzellen zu finden sind.

In *Drosophila melanogaster* wurden neben Amplifikationen auch unterreplizierte Regionen beschrieben[15]. Unter unterreplizierten Regionen versteht man eine chromosomale Region, die sich im Verhältnis zu einer amplifizierten chromosomalen Region durch eine geringere Replikation auszeichnet. Windle und Draper beschrieben 1991 [16] einen Zusammenhang zwischen Amplifikationen und Deletionen in Ovarzellen von chinesischen Hamstern. Des

Weiteren konnten 2015 Fischer *et al.* [13] mehrere amplifizierte und unterreplizierte Regionen in Mausembryozellen nachweisen.

2.3. Polyploidie

Eng verbunden mit dem Begriff der Amplifikation ist der Begriff „Polyploidie“. Unter Polyploidie versteht man das Vorhandensein von mehr als zwei Chromosomensätzen. Die entsprechende Zelle ist also nicht mehr diploid, sondern polyploid. Lee, Davidson und Duronio (2009) [17] bezeichnen Polyploidie oder Endopolyploidie als das Resultat eines Prozesses namens Endoreplikation, der alle Zellzyklusarten beschreibt, die zur Polyploidie führen. Diese Zellzyklen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht die gewohnte G1-S-G2-M-Zellzyklus-Reihenfolge befolgen, sondern von diesem Algorithmus abweichen. Drei Beispiele werden in Abbildung 4 veranschaulicht:

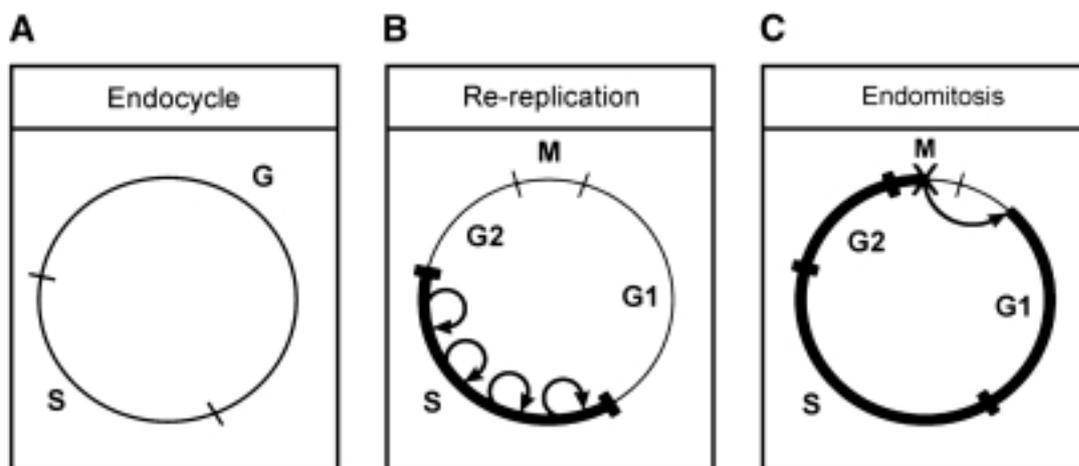


Abbildung 6: verschiedene Endoreplikationszyklen [17]

Der Endozyklus setzt sich aus vielen S-G-Perioden zusammen. Die Rereplikation zeichnet sich dadurch aus, dass die Zelle nicht nur einmal ihr genetisches Material repliziert, sondern dass mehrere Replikationsvorgänge zwischen beiden G-Phasen stattfinden. Die Endomitose ähnelt dem normalen Zellzyklus am meisten, allerdings befindet sich die Zelle nur kurz in der M-Phase ohne diese zu beenden. Interessant ist, dass Megakaryozyten genau diesen Mechanismus benutzen, um Thrombozyten zu produzieren. Sie enthalten bis zu 64 vollständige Chromosomensätze. Sind sie diploid, liegen schwere Hämopathien vor, veröffentlichten Undritz und Nusselt-Bohaumilitzky 1968 [18]. Des Weiteren betitelten sie die beim Menschen und höheren Wirbeltieren auftretende Megakaryozytenpolyploidie als „biologische Weiterentwicklung“, da Megakaryozyten bei niederen Wirbeltieren diploid sind.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen Polyploidie und Genamplifikationen in *Drosophila melanogaster*. Follikelzellen von *Drosophila* amplifizieren nach erfolgreicher Endoreplikation

bestimmte Genomabschnitte, die für Proteine kodieren, die für die Eizellproduktion vonnöten sind [19]. Des Weiteren gibt es eine Assoziation zwischen Tumorzellen, Amplifikationen und Polyploidie [20].

2.4. Aufgabenstellung

Das Ziel der Arbeit war es, Genamplifikationen in undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen und in differenzierenden humanen mesenchymalen Stammzellen nachzuweisen. Diese Stammzellen wurden zum einen in Richtung Adipozyten differenziert und zum anderen in Richtung Osteozyten differenziert. Die DNA der verschiedenen Zellen wurde hinsichtlich Genamplifikationen mit zwei Methoden analysiert, erstens fluoreszenzmikroskopisch (FISH) und zweitens molekulargenetisch (qPCR).

3 Material und Methoden

3.1. Methoden

3.1.1. Herstellen der BAC-Sonden für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen

3.1.1.1. Kultivierung und Isolierung der BACs enthaltenden Bakterien

Bacterial Artificial Chromosoms (BACs) sind künstliche Chromosomen mit der Aufgabe, DNA- oder RNA-Sonden zu generieren und sie eignen sich vor allem zur Einschleusung von Genomabschnitten in *E. coli*. BACs dienen als Vektoren und erlauben im Gegensatz zu den Plasmiden die Klonierung von größeren Genomabschnitten. Die Bakterien, die ein BAC enthielten, wiesen eine Chloramphenicol-Resistenz auf. Das bedeutet, dass bei Kultivierung mit Chloramphenicol nur die Bakterien überleben konnten, die ein BAC mit dem darin enthaltenen Gen für die Chloramphenicol-Resistenz besaßen. Die Bakterien wurden ausplattiert und es wurde eine Kolonie isoliert, die in 1ml LB-Medium über vier Stunden bei 37°C kultiviert wurde. Es wurden Kolben mit 250 ml LB-Medium mit 250 µl Chloramphenicol mit einer Ausgangskonzentration von 20 mg/ml versehen und anschließend mit 500 µl Bakterien beimpft. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 155 RPM über Nacht kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde in Falkons gegeben, 10 Minuten abzentrifugiert (Hermle, Z323K) und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit S1-Puffer des „Plasmid Purification Midi Kits“ resuspendiert. Der S1-Puffer enthielt RNase und hatte die Aufgabe, die Zellen zu lysieren. Es wurde der S2-Puffer hinzugegeben. Er enthielt SDS, sodass Proteine denaturiert werden konnten. Es folgte die Zugabe des S3-Puffers, der die Aufgabe hatte, das SDS zu binden, was in Form von weißen Präzipitaten zu sehen war. Anschließend wurde die Suspension 30 Minuten auf Eis gestellt und danach abzentrifugiert. Es schloss sich eine Filtration an, um die präzipitierten Proteine und den Zellmüll zu eliminieren, sodass die anschließend verwendete Säule nicht verstopft. Nach der Equilibration der Säulen konnte nun das aufgereinigte Lysat auf die Säulen gegeben werden. Es folgte die Zugabe des Waschpuffers N3. Die Elution erfolgte mit Hilfe des Elutionspuffers N5, der auf 50°C vorgewärmt wurde, da somit die Ausbeute für hochmolekulare DNA-Konstrukte wie BACs erhöht wird. Es wurde Isopropanol hinzugegeben, damit eine Ausfällung der DNA stattfinden konnte. Nach einer Stunde Kühlung bei -20°C wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen, 400 µl TE über das DNA-Pellet laufen gelassen bis sich die DNA komplett von der Falconoberfläche gelöst hat. Zum Schluss wurden 40 µl 3 M Natriumacetat und 800 µl 100%igen Alkohol zugegeben. Die ausgefällte DNA konnte entnommen werden und in 70%igem Alkohol aufbewahrt werden. Nach einer letzten Zentrifugation wurde der Überstand

abpipettiert und das Pellet wurde in 30 µl TE gelöst. Die BAC-Sonde wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.1.1.2. Konzentrationsmessung der DNA mittels NanoDrop

Nach dem Lösen der DNA im TE-Puffer wurde die Konzentration der DNA mit Hilfe des Spektrometers NanoDrop2000 gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird über die Absorption die DNA-Konzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet:

$$E_{\lambda} = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = c \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot l$$

Dies bedeutet, dass die Konzentration der DNA in µg/ml oder in ng/µl berechnet wird, indem die Absorption des Lichtes bei einer Wellenlänge von 260 nm nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz mit dem Faktor 50 multipliziert wird. Wichtig war zunächst, einen Leerwert zu ermitteln, in dem man den TE-Puffer maß. Anschließend konnten die BAC-Sonden gemessen werden.

3.1.1.3. Nicktranslation

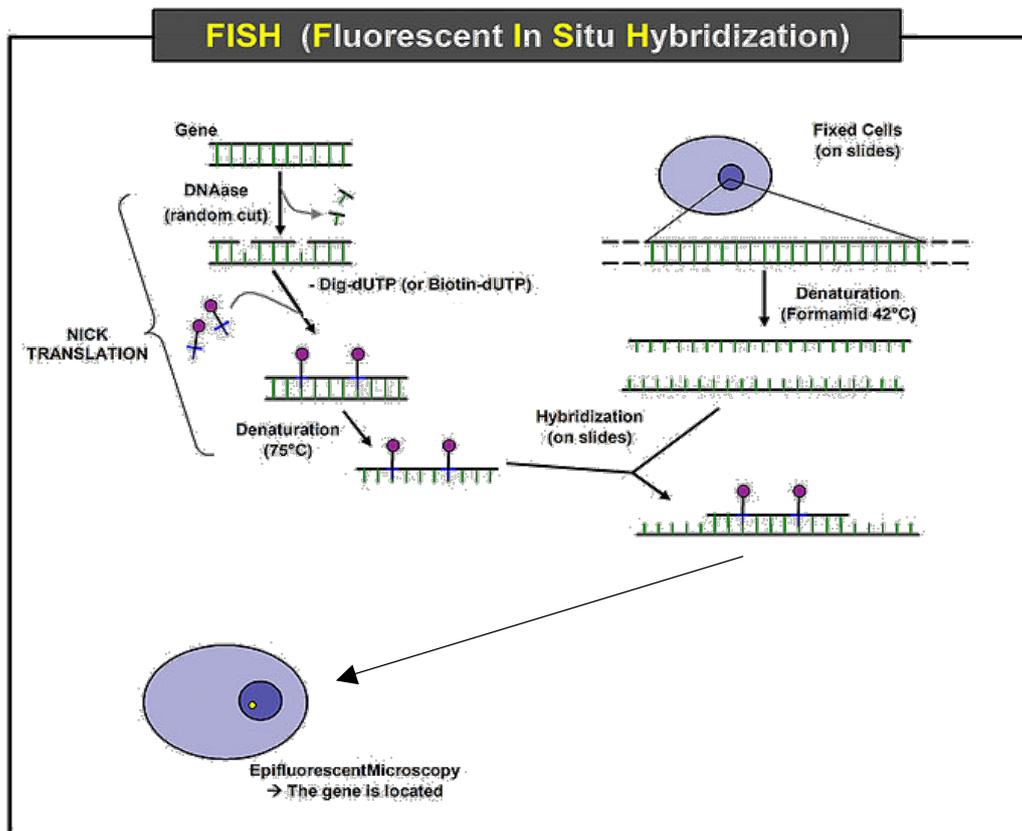


Abbildung 7: Work-Flow einer FISH

Nun konnte mit der Markierung der entsprechenden BAC-Sonden begonnen werden. Das angewendete Verfahren nennt sich Nicktranslation, übersetzt Einzelstrangbruchtranslation. Ein wichtiger Schritt ist die Zugabe der DNase zur BAC-Sonden-DNA. Nur so können einzelne Nukleotide ausgeschnitten werden und es können Lücken innerhalb des DNA-Stranges entstehen. Diese Lücken wurden in unserem Falle mit dUTP aufgefüllt, einem farbstoffmarkiertem Nukleotid. Durch Denaturieren erhielt man nun die BAC-Sonde als Einzelstrangmolekül.

Im Detail: Zunächst wurde eine DNase working solution hergestellt, in dem zu 89 µl nukleasefreiem Wasser 10 µl 10× Nicktranslation Puffer hinzugegeben wurde. Das ganze wurde 10 Minuten auf Eis gekühlt, um anschließend 1µl DNase dazu zu pipettieren. Diese working solution wurde mit folgenden anderen Komponenten zusammengebracht, um die Nicktranslation zu beginnen:

Nukleasefreies Wasser	berechnet sich wie folgt:
	50- (10×Nicktranslationspuffer+0,1 M DTT+10× DNA-Nukleotidmix+ DNA+ DNA-Polymerase I+ DNase working solution)
10×Nicktranslationspuffer	5 µl
0,1 M DTT	5 µl
10× DNA-Nukleotidmix	5 µl
DNA	individuell unterschiedlich
DNA-Polymerase I	1,7 µl
DNase working solution	5 µl

Es erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei 15°C im Wasserbad. Der Reaktion wurde anschließend 50 µl nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Das Eppendorfgefäß wurde gevortext, um die DNase zu inaktivieren. 400 µl Bindungspuffer wurden hinzugefügt und alles wurde auf eine Säule aufgetragen. Nach einer einminütigen Zentrifugation (Sigma, 7924), wurde der Überstand weggekippt und es wurde 650 µl Waschpuffer hinzugegeben. Nach zwei weiteren einminütigen Zentrifugationen, wurde die Säule in ein Eppendorfgefäß gestellt, um mit Hilfe des Elutionspuffers die DNA von der Membran zu lösen und mit der Flüssigkeit in das Eppendorfgefäß zu ziehen. Nach einer weiteren Zentrifugation enthielt das Eppendorfgefäß die aminmodifizierte DNA. Damit die DNA ausfällen konnte, wurde folgendes zu der DNA hinzugegeben:

10 µl 3M Natriumacetat

1 µl Glykogen

39 µl nuklease-freies Wasser

250 µl 100%igen Ethanol

Die DNA mit den hinzugegebenen Komponenten wurde über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde zentrifugiert, abpipettiert, 400 µl 70%igen Alkohol hinzugefügt, erneut abzentrifugiert, abpipettiert, 400 µl 70%igen Alkohol hinzugefügt, 10 Minuten abzentrifugiert, abpipettiert und das Pellet an der Luft trocknen gelassen. Nach dem Zugeben von 5 µl nuklease-freiem Wasser wurde die BAC-Sonde bei 37°C für 5 Minuten inkubiert, gevortext und anschließend bei 96°C denaturiert. Die BAC-Sonde wurde danach für 3 Minuten auf Eis gelagert und 3 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurden 2 µl DMSO zum

entsprechenden Farbstoff hinzugegeben. Zur BAC-Sonde wurden 3 μ l Natriumbikarbonat hinzugegeben und anschließend wurden 2 μ l des DMSO-Farbe-Gemisches zur DNA-Natriumbikarbonat-BAC-Sonde hinzugegeben. Nach einmal vortexen und einer Zentrifugation wurde das Gemisch bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 1 Stunde gelagert. Es folgte die Zugabe von 90 μ l nukleasefreiem Wasser und 400 μ l Bindungspuffer. 500 μ l wurden auf eine Säule pipettiert, Waschpuffer wurde hinzugefügt. Nach zweimaligem Zentrifugieren wurde der Elutionspuffer angewendet. Die BAC-Sonde wurde eine Minute stehen gelassen und anschließend zentrifugiert, sodass das Tube schlussendlich die aufgereinigte, gefärbte DNA enthielt.

3.1.1.4. Gelelektrophorese zur Größenbestimmung der BAC-Sonden

Die aufgereinigte und gefärbte DNA wurde entweder bei -20°C aufbewahrt oder direkt gelelektrophoretisch getestet. Dazu wurde ein Gel vorbereitet. Es wurden 0,5g Agarose abgewogen und mit 50 ml $1\times\text{TE}$ in einen 250 ml Kolben gegeben. In einer Mikrowelle wurde die Agarose gelöst. Mit einer Einfachpipette wurde anschließend ein wenig Agarose an die Wände des Gelschlittens pipettiert, um diese abzudichten. Es wurden 2 μ l Ethidiumbromid in die Agaroselösung pipettiert. Die Agaroselösung wurde gemischt und in den abgedichteten Gelschlitten gegeben. War das Gel erstarrt, konnte es in die Gelelektrophoresekammer, die mit $1\times\text{TAE}$ aufgefüllt wurde, gelegt werden. In die erste Tasche wurde ein Marker pipettiert, der benutzt wurde, um die Länge der DNA-Fragmente abschätzen zu können. In die dahinter befindlichen Taschen wurden die entsprechenden mit Ladepuffer versehenen BAC-Sonden pipettiert. Die Gelelektrophorese fand mit 90V statt. Ein beispielhaftes Bild einer Gelelektrophorese ist folgendes:

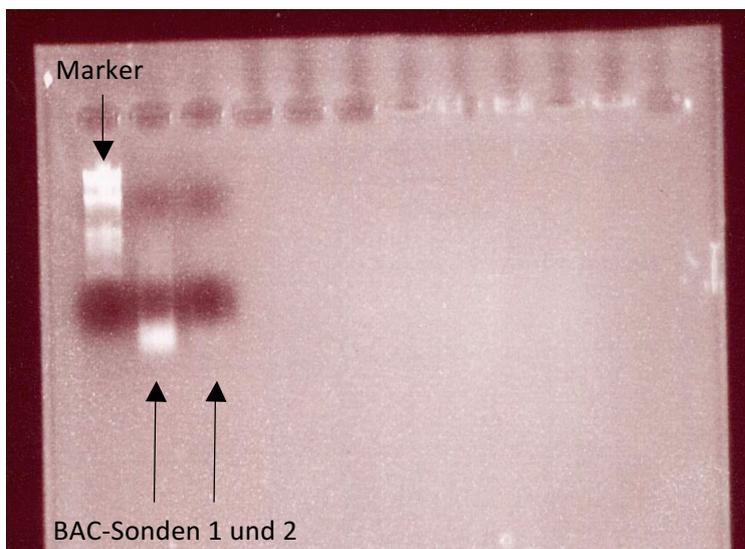


Abbildung 8: Auftrennung zweier verschiedener BAC-Sonden mittels Gelelektrophorese

Die BAC-Sonden mussten eine bestimmte Länge besitzen, um spezifisch binden zu können. War eine BAC-Sonde zu groß, was einmal der Fall war, wurde die Markierung wiederholt und 1 µl mehr DNase verwendet.

3.1.1.5. Fällung der BAC-Sonden

Lag die Größe der BAC-Sonde im Bereich von 200 bis 500 bp, konnten die entsprechenden BAC-Sonden gefällt werden. Dazu wurde folgendes in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert:

DNA	individuell unterschiedlich
Cot1	1,5 µl pro BAC-Sonde
Nukleasefreies Wasser	berechnet sich wie folgt: $30 - (DNA + Cot1)$
3 M Natriumacetat	3 µl
100%igen Ethanol	75 µl

Die DNA wurde über Nacht gefällt.

3.1.1.6. Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Zu Beginn wurde ein Wärmeschrank auf 37°C vorgewärmt. Eine Kiste wurde mit Zellstoff ausgelegt und mit destilliertem Wasser befeuchtet. Diese wurde in den 37°C-Wärmeschrank gestellt. Eine Küvette wurde ebenfalls in den 37°C-Wärmeschrank gestellt. Außerdem wurde eine 0,01 M HCl-Lösung hergestellt. 100 ml davon wurden in einem 80ml-Gefäß ebenfalls in den 37°C-Wärmeschrank gestellt.

Wurden gefrorene Objektträger benutzt, mussten diese erst einmal bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Anschließend sah man sich unter dem Lichtmikroskop die Objektträger an, um die Stelle mit den meisten Zellen zu finden und sie daraufhin mit einem Gravierstift einzukreisen. Es folgte eine 5-minütige Behandlung des entsprechenden Objektträgers mit DPBS (=Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline von Thermo Fisher Scientific). Danach wurde eine 5-minütige Behandlung mit 0,02% Tween Twenty und daraufhin eine 5-minütige Behandlung des Objektträgers mit PBS durchgeführt. Wurden getropfte Objektträger verwendet, konnte direkt bei dem folgenden nächsten Schritt begonnen werden: In ein Eppendorfgefäß wurden 90 µl 1,9×SSPE und 10 µl RNase pipettiert, anschließend gemischt und die draus resultierenden 100 µl wurden auf einen Glasträger pipettiert, auf den der Objektträger aufgelegt wurde. Es folgte der 1-stündige RNase-Verdau (100 µg/ml RNaseA in 1,9×SSC) bei 37 °C. Während dieser Zeit wurden die DNA-BAC-Sonden 30 Minuten lang bei 14.000 RPM und bei 4°C abzentrifugiert (Eppendorf, 5417R). Der Überstand wurde abpipettiert und 100 µl 70%iger Ethanol wurde hinzugefügt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsgang für 30 Minuten bei 14.000 RPM und bei 4 °C. Danach wurde der Überstand wieder abpipettiert und die BAC-Sonde wurde in Dunkelheit trocknen gelassen. Mit den zu untersuchenden Zellen auf dem Objektträger ging es wie folgt weiter: Nach der einen Stunde RNase-Verdau wurde das Trägerglas abgeworfen und der Objektträger wurde in eine mit PBS gefüllte Glasküvette gestellt, die anschließend für 3 × 5 Minuten auf einen Schüttler gestellt wurde. Zwischen diesen 3 Waschsritten wurde das PBS gewechselt. Es folgte ein Pepsin-Verdau, in dem die 100ml vorbereitete HCl-Lösung aus dem Wärmeschrank mit 100 µl Pepsin (0,005% in 0,01 M HCl) angereichert wurden, in die warme Küvette gegeben wurden, sodass anschließend der Objektträger für 10 Minuten hineingestellt werden konnte. Um die Temperatur konstant zu halten, wurde die Küvette wieder in den Wärmeschrank gestellt. Nach den 10 Minuten Pepsin-Verdau, wurde die Pepsinlösung ausgekippt, die Küvette wurde mit PBS aufgefüllt, die Flüssigkeit wurde um den Objektträger „geschwenkt“, weggekippt und die Küvette wurde wieder mit PBS aufgefüllt. Die Küvette wurde wieder für 5 Minuten auf den Schüttler gestellt. Der Objektträger wurde anschließend für 10 Minuten in die Postfixierungslösung gestellt. Diese Postfixierungslösung wurde wie folgt hergestellt:

3,75 ml 1 M MgCl₂ in einen 100 ml-Meßzylinder geben, 2 ml Formaldehyd dazu pipettieren, anschließend mit PBS auf 75 ml auffüllen, zum Schluss wurde ein Stück Parafilm über das Gefäß gelegt und die Flüssigkeit geschüttelt. Der Objektträger wurde 10 Minuten auf dem Schüttler in der Postfixierungslösung stehen gelassen. Gleichzeitig wurde der Hybridisierungsmix für die DNA-BAC-Sonde angefertigt:

50 µl Dextransulfat/SSPE

25 µl deionisiertes Formamid

10 µl 20×SSPE steril

15 µl 27% SDS

Von diesem Hybridisierungsmix wurden 12,5 µl auf das Pellet gegeben und alles wurde gemischt.

Nach den 10 Minuten Postfixierung wurde die Postfixierungslösung ausgekippt, PBS wurde in die Küvette gefüllt, die Flüssigkeit wurde „geschwenkt“, das PBS wurde ausgekippt, neues wurde eingefüllt und die Küvette wurde 5 Minuten auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurde das PBS ausgekippt, 70%iger Alkohol eingefüllt und die Küvette wieder für 5 Minuten auf den Schüttler gestellt. Dieser Vorgang wurde danach zwei Mal (also 2× 5 min) wiederholt: nach dem Auskippen wurde einmal mit 80%igem Alkohol gewaschen und einmal mit 96%igem Alkohol. Anschließend wurde der Objektträger auf Zellstoff getrocknet. Im Lichtmikroskop wurde anschließend überprüft, ob die Zellkerne der entsprechenden Zellen zu sehen waren und ob ihr Umriss gleichmäßig war. Außerdem konnte auch gesehen werden, ob der Objektträger sauber war. War dies der Fall, konnte mit der BAC-Sonde fortgefahren werden: Die BAC-Sonde wurde 5 Minuten mit Schutzkappe in einem 75 °C warmen Wasserbad denaturiert, abzentrifugiert und 12,5 µl wurden auf das markierte Feld auf dem Objektträger pipettiert. Ein kleines Deckglas wurde aufgelegt und mit Kleber abgedichtet. Es folgte eine Denaturierung der Zell-DNA für 2 Minuten auf einer 80°C warmen Heizplatte. Anschließend wurde der Objektträger zurück in die Kiste mit feuchtem Zellstoff gelegt und diese wurde über Nacht im 37°C-Wärmeschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde folgendes vorbereitet: Ein Wasserbad wurde auf 60 °C vorgeheizt, ein anderes auf 45 °C. Es wurden zwei 500 ml-Flaschen, eine Glasküvette, ein 100 ml-Messzylinder, ein 500 ml-Messzylinder und ein 600 ml-Messbecher geholt. Für die erste Waschlösung wurden 2 ml nicht steriles 20×SSPE in den 500 ml-Messzylinder gegeben und der Meßzylinder wurde auf 400 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde in die erste Flasche gegeben und diese wurde in das 60 °C-warme Wasserbad gestellt. Für die zweite Waschlösung wurde 150 ml Formamid von Roth abgemessen. Anschließend wurden 30 ml 20×SSPE abgemessen und diese 30 ml SSPE wurden zu den 150 ml Formamid gegeben. Es wurde

auf 300 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese 300 ml wurden in den 600 ml-Becher umgefüllt, um eine pH-Wert-Einstellung vorzunehmen. Es wurde mit Hilfe von HCl ein pH-Wert von 7,00 eingestellt. Die Lösung wurde in die zweite Flasche gegeben und für eine Stunde in das 45°C-warme Wasserbad gegeben. Nach dem Erwärmen der Formamidlösung wurde diese in die Glasküvette gegeben. Die Kiste mit dem Objektträger wurde geholt, der Klebstoff wurde mit einer Pinzette vom Objektträger entfernt und der Objektträger wurde in die Formamidlösung gestellt, sodass sich das Deckgläschen von alleine lösen konnte. War dies nicht der Fall, musste an dem Objektträger ein wenig gewackelt werden. Anschließend wurde die Küvette für 5 Minuten unter einem lichtundurchlässigen Becher auf einen Schüttler gestellt. Es folgten 3 weitere 5-minütige Waschschriffe, in dem die Formamidlösung ausgekippt wurde und neue warme Formamidlösung nachgekippt wurde. Es schlossen sich 3 5-minütige Waschschriffe mit der 0,1%-SSPE-Lösung an. Auch hier wurde die Küvette nach jedem Waschschriff zurück unter den lichtundurchlässigen Becher auf den Schüttler gestellt. Während dieser Waschschriffe wurden das DAPI und das Antifade aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl DAPI mit 1 ml PBS in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nachdem die Lösung gemischt war, konnten 100 µl auf ein großes Deckglas pipettiert werden, auf welches der Objektträger aufgelegt wurde. Das DAPI ließ man 5 Minuten lang in Dunkelheit, wie zum Beispiel in der zuvor verwendeten Kiste, wirken. Danach wurde das Deckglas unter fließendem Wasser abgewaschen und es wurde mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Der Objektträger wurde vor einem Ventilator getrocknet. Es wurde ein Tropfen Antifade auf den Objektträger getropft, ein großes Deckglas wurde aufgelegt, der Objektträger wurde mit Trockenpapier getrocknet und das Deckglas mit Hilfe von Nagellack fixiert. Der Objektträger konnte nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus AX70) betrachtet werden.

3.1.1.7. Medienwechsel, Stammzellisolierung und Objektträgeranfertigung zu verschiedenen Zeitpunkten

Wurde die Differenzierung zum Beispiel noch zwei weitere Tage durchgeführt, wurde lediglich ein Medienwechsel durchgeführt. Dazu wurde das Medium innerhalb der Petrischalen abgesaugt und anschließend wurden 9 ml des entsprechenden Mediums hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37°C für weitere 48 h inkubiert. Das Medium in den Zellkulturflaschen, die Zellen enthielten, die weiter differenziert werden sollten, wurde ebenfalls abgesaugt. Anschließend wurden 5 ml des entsprechenden Mediums hinzugefügt und die Zellen wurden erneut bei 37°C inkubiert.

Beim Beenden der Differenzierung der Zellen auf den Objektträgern, wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt. Es wurden danach 10 ml PBS hinzugefügt. Nach 15 Minuten wurde erneut abgesaugt und es wurde -20°C-kaltes Methanol in die Petrischale gegossen. Die Fixierung fand 15 Minuten lang in einem -20°C-Eisschrank statt. Der Objektträger wurde danach mit einer Pinzette aus der Petrischale genommen, trocknen gelassen und bei -20°C gelagert. Auch in den Zellkulturflaschen, die Zellen enthielten, die nicht mehr weiter differenziert werden sollten, wurde das ältere Medium abgesaugt, 5 ml PBS wurden hinzugefügt und es wurde erneut abgesaugt. Es wurden 2 ml Trypsin hinzugefügt und die Zellen wurden für 2 bis 3 Minuten erneut bei 37°C inkubiert. Es fand eine visuelle Inspektion der Zellen statt. Anschließend wurde abpipettiert, die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falkon pipettiert, es wurde mit 5 ml PBS nachgespült und diese 5 ml wurden ebenfalls in das 15 ml-Falkon pipettiert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten lang mit 12.000 RPM abzentrifugiert. Es wurde abgesaugt bis nur noch etwa 500 µl vorhanden waren. Diese wurden bei -20°C eingefroren.

3.1.1.8. DNA-Isolation

Zu der zu isolierenden DNA wurde folgendes hinzu gegeben:

5 ml SE

500 µl SDS

1 Spatelspitze Proteinase K

Alles wurde vorsichtig gemischt, in dem man die Flüssigkeit innerhalb des Falkons „schwenkte“. Das Falkon wurde anschließend in ein 55°C-warmes Wasserbad gestellt und jede Stunde „geschwenkt“. Die Falkons wurden über Nacht im Wasserbad gelassen.

Am nächsten Tag wurde 6 M NaCl ebenfalls auf 55°C vorgewärmt. Anschließend wurden 2 ml warmes NaCl zu der DNA hinzugegeben. Danach wurde die Flüssigkeit 8 Mal „geschwenkt“. Das Falkon wurde mit Chloroform auf 14 ml aufgefüllt und für eine Stunde in einen Rotator gestellt. Die DNA wurde anschließend 30 Minuten lang bei 4000 RPM abzentrifugiert. Währenddessen wurde ein großes Falkon mit Isopropanol aufgefüllt und auf -20°C vorgekühlt. Nach der Zentrifugation wurde bis kurz über die Interphase abpipettiert. Die oberste Phase, die wässrige Phase enthielt die DNA. Diese Phase wurde in ein neues Falkon pipettiert und das Falkon wurde mit Isopropanol bis 14 ml aufgefüllt. Das Isopropanol besitzt die Aufgabe, die DNA durch Verändern der Hydrathülle und Verändern der Löslichkeit auszufällen.

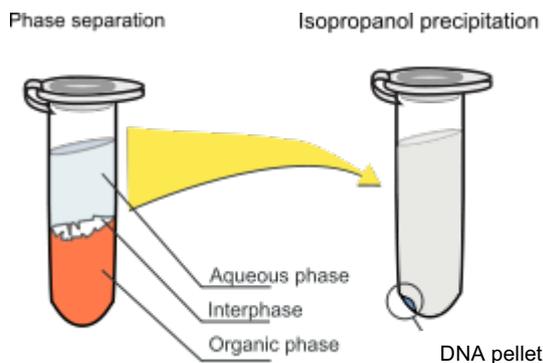


Abbildung 9: DNA-Isolation: Die obere Phase wurde abpipettiert (Abbildung verändert nach wikipedia.de).

Die Flüssigkeit wurde anschließend „geschwenkt“ bis DNA sichtbar ausgefallen ist. Die Falkons wurden danach für eine Stunde bei -20°C gekühlt und anschließend 30 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und es wurden 400 µl 1×TE über das Pellet laufen gelassen, sodass sich das Pellet lösen konnte. Die Flüssigkeit wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, es wurden 40 µl Natriumacetat dazu gegeben, gemischt und 800 µl 100%igen Ethanol hinzugefügt. Die Flüssigkeit wurde einige Male „geschwenkt“, bis ein

Ausfällen der DNA zu sehen war. Konnte kein DNA-Konglomerat gesehen werden, wurde für 30 Minuten bei 4°C und 14.000 RPM abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und über das Pellet wurden 500 µl 70%igen Ethanol gegeben. Zum Ausfällen wurde die DNA über Nacht in einen Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde 1 Stunde lang bei 4°C und 14.000 RPM abzentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet wurde getrocknet. Zum Schluss wurden 20 µl 1×TE auf das Pellet gegeben.

3.1.1.9. qPCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode, um die DNA künstlich zu vervielfältigen. Dazu wird das Enzym DNA-Polymerase verwendet. Die Polymerase-Ketten-Reaktion gliedert sich in drei Teile: Zunächst findet eine Phase der Denaturierung bei etwa 96°C statt. Dies gewährleistet, dass DNA-Einzelstränge vorliegen. Erst dann kann der zweite Teil beginnen, in dem die Primer an die entsprechenden DNA-Regionen binden. Es handelt sich um die Primerhybridisierungsphase, die bei etwa 68°C stattfindet. Der dritte Teil wird Polymerisations- oder Elongationsphase genannt und stellt einen Zeitabschnitt dar, in dem die DNA-Polymerase die entsprechenden fehlenden Einzelstränge synthetisiert. Wir nutzten die real-time-PCR oder quantitative PCR (qPCR). Die qPCR besitzt auch drei Teile. Was sie jedoch hervorhebt, ist das Vorhandensein eines Fluoreszenzfarbstoffes. Dieser leuchtet jedoch noch nicht in den ersten zwei Phasen, da ein sogenannter Quencher (siehe Abbildung 10: Der Quencher ist mit einem „Q“ beschriftet.) vorhanden ist, der die Aufgabe hat, die Fluoreszenz zu dämpfen. Wird in der Polymerisationsphase nun der Quencher abgeschnitten, kann der Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden. Je mehr amplifizierte DNA vorhanden ist, desto mehr Fluoreszenz wird detektiert. Dies bedeutet, dass von Zyklus zu Zyklus mehr DNA und somit mehr Fluoreszenz vorhanden ist. Die Stärke der Fluoreszenz korreliert also „in Echtzeit“ mit der Menge der polymerisierten DNA.

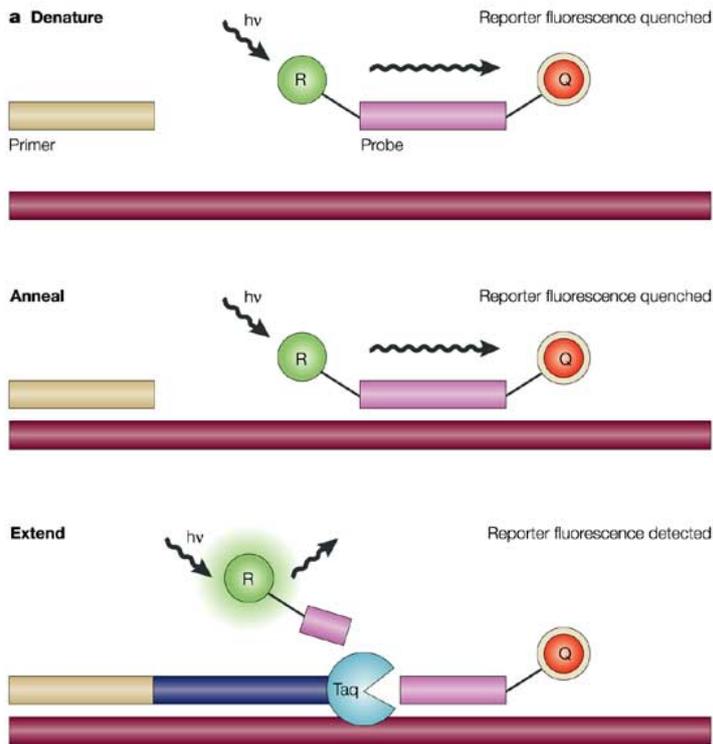


Abbildung 10: qPCR mit einer TaqMan-Polymerase, einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher (Koch, 2004)

Um die verschiedenen Gene mit einem Kontrollgen, welches nicht amplifiziert vorliegt, vergleichen zu können, wurde zu jedem PCR-Ansatz RNaseP hinzugefügt. Der MasterMix enthielt die DNA-Polymerase.

In einem PCR-Ansatz für 20 Reaktionen war folgendes enthalten:

200 µl MasterMix

20 µl RNaseP

20 µl des entsprechenden Genes wie z.B. *CDK4* oder *MDM2*

80 µl H₂O

Von diesem Gemisch wurden 16 µl in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden nach einem bestimmten Pipettierschema 4 µl der entsprechenden DNA in einer Konzentration von 5 ng/µl zu den 16 µl MasterMix dazupipettiert. Außerdem wurde in ein Well zu den 16 µl 4 µl Wasser pipettiert, um eine Nullkontrolle zu haben. Die Well-Platte wurde mit einer Folie abgeklebt, gevortext und anschließend abzentrifugiert (2 min, 2000 RPM, 20°C). Die Well-Platte wurde nun in das PCR-Gerät von Applied Biosystem (272004504) gestellt.

3.2. Material

3.2.1. Verwendete Reaktionskits

In Tabelle 1 sieht man die Reaktionskits mit zugehörigen Herstellern, die für die Aufreinigung der BAC-DNA (erste Zeile), die Nicktranslation (zweite Zeile), die Färbung der Vakuolen der differenzierenden adipogenen Stammzellen (dritte Zeile) und die für die qPCR (vierte Zeile), verwendet wurden:

Tabelle 1 :Reaktionskits

Reaktionskit	Hersteller
Plasmid Purification Midi Kit	QIAGEN Deutschland
FISH Tag DNA Kit	invitrogen
AdipoRedAssay	Lonza
MasterMix	Applied Biosystems

3.2.2. Verwendete Medien

Die Medien, die für die Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen benötigt wurden, sind folgende:

Tabelle 2: Medien

Name des Mediums	Inhaltsstoffe	Hersteller
Mesenchymal Stem Cell Growth Medium	<ul style="list-style-type: none">- Mesenchymal cell growth supplement- L-glutamine- GA-100	Lonza
Adipogenic Induction Medium	<ul style="list-style-type: none">- H-insulin- L-glutamine- MCGS- Dexamethasone- Indomethacin- IBMX- GA-1000	Lonza
Adipogenic Maintenance Medium	<ul style="list-style-type: none">- H-insulin- L-glutamine- MCGS- GA-1000	Lonza

Osteogenic Induction Medium	<ul style="list-style-type: none"> - Dexamethasone - L-glutamine - Ascorbate - Penicillin/Streptomycin - MCGS - B-glycerophosphate 	Lonza
-----------------------------	--	-------

3.2.3. Kulturmedien für Bakterien, angesetzte Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Kulturmedien, Lösungen und Puffer

LB-Medium	<p>10 g NaCl 10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextract auf 1 l destilliertes Wasser Nachdem die Komponenten gelöst waren, wurde die Flüssigkeit autoklaviert.</p>
LB-Agar	<p>10 g NaCl 10g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 15 g Agar Auf 1 l destilliertes Wasser Die Komponenten wurden im Wasser gelöst und die Flüssigkeit wurde anschließend autoklaviert.</p>
Chloramphenicol-Lösung	<p>400 mg Chloramphenicol 10 ml 100%igen Ethanol 10 ml H₂O dest.</p>
TE-Puffer	<p>1 ml einer 1 M Tris-Stammlösung 200 µl einer 0,5 M EDTA-NA₂-Lösung Die Komponenten wurden in H₂O dest. gelöst, mit 1 M HCl ein pH-Wert von 8,0 eingestellt und die Flüssigkeit wurde autoklaviert.</p>
SE-Puffer	<p>75 mM NaCl=4,38 g 25 mM EDTA=9,3 g</p>
3 M Natriumacetat	<p>40,82 g Natriumacetat-Trihydrat</p>

	In 80 ml H ₂ O dest. lösen und mit Essigsäure pH-Wert auf 5,5 einstellen, anschließend mit H ₂ O dest. auf 100ml auffüllen
50×TAE-Puffer	2 M Tris=242,2 g/l 1 M Essigsäure= 60 ml/l 50 mM EDTA-Na=18,6 g/l Auf 1 l H ₂ O dest. und mit HCl auf einen pH-Wert von 8,0 einstellen
Ladepuffer 10×	1×TAE 70% Glycerin 0,04 EDTA 1 Spartelspitze Bromphenolblau 1 Spartelspitze Xylencyanol
20×SSPE	3 M NaCl=175,3g 0,2 M NaH ₂ PO ₄ =31,2g 0,02 M EDTA=40ml Auf 1 l destilliertes Wasser Mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 einstellen Anschließend filtrieren
20% Dextransulfat/SSPE	1 g Dextransulfat 2,5 ml deionisiertes Formamid 500 µl 20×SSPE steril 2 ml H ₂ O dest. Die Komponenten werden bei 70°C 3 Stunden lang gelöst.
1 M MgCl ₂	40,6 g Magnesiumchlorid auf 200 ml H ₂ O dest. und je 50 ml steril in ein Falcon filtrieren
27% SDS	13,5 g SDS in 50 ml warmem H ₂ O dest. lösen

4. Ergebnisse

4.1. Kultivierung der osteogenen und adipogenen Stammzellen

4.1.1. Differenzierungsinduktion und ihre Verifizierung

Die humanen mesenchymalen Stammzellen wurden mit Hilfe zweier verschiedener Induktionsmedien (siehe Tabelle 4) zum einen in Vorläuferzellen der Osteozyten und zum anderen in Vorläuferzellen der Adipozyten differenziert. Die humanen mesenchymalen Stammzellen wurden in 25 cm² großen Zellkulturflaschen kultiviert. Gleichzeitig wurden humane mesenchymale Stammzellen auf Objektträgern in Petrischalen kultiviert. Ein gewünschter Differenzierungsprozess wurde abgebrochen, in dem zum einen die differenzierenden Stammzellen isoliert wurden, um später ihre DNA zu extrahieren. Zum anderen wurden die differenzierenden Stammzellen auf den Objektträgern mit Hilfe von Methanol fixiert und bei -20 ° C gelagert, bis sie für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen benutzt wurden.

Tabelle 4: Induktionsschema der Stammzellen, die in Richtung Adipozyten differenziert wurden und der Stammzellen, die in Richtung Osteozyten differenziert wurden (OT=Objekträger)

	Freitag	Samstag	Sonntag	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
Adipogene Reihe	<u>Adipogene Induktion</u> Start	1.Tag des 1.Zyklus	2.Tag des 1.Zyklus	3.Tag des 1.Zyklus	1 Tag Maint.	1.Tag des 2.Zyklus	2.Tag des 2.Zyklus	3.Tag des 2.Zyklus
				Isolation der DNA und Anfertigen von OT	Isolation der DNA und Anfertigen von OT	Isolation der DNA	Isolation der DNA	Isolation der DNA und Anfertigen von OT
Osteogene Reihe	<u>Osteogene Induktion</u> Start	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag
				Isolation der DNA und Anfertigen von OT				Isolation der DNA und Anfertigen von OT

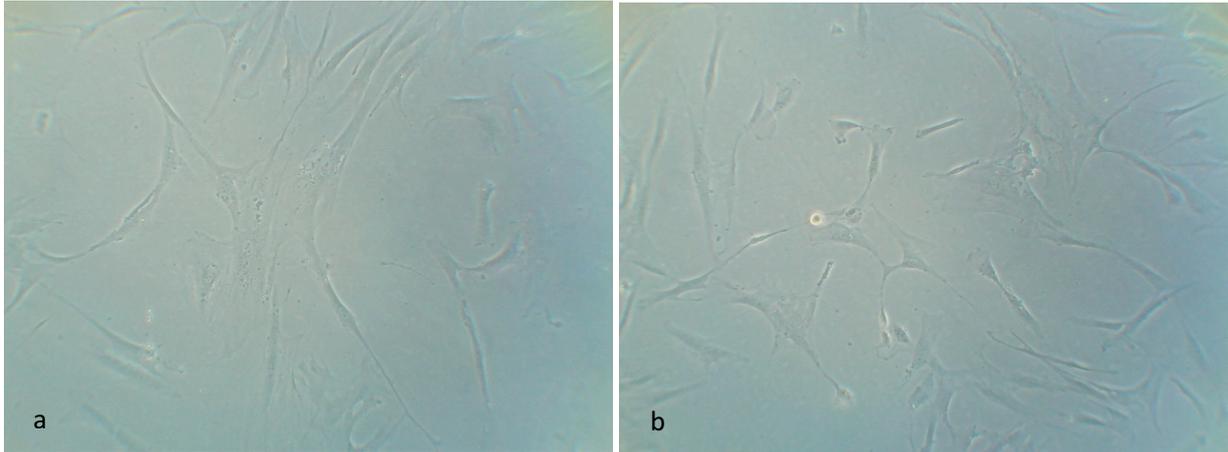


Abbildung 11: humane mesenchymale Stammzellen vor der Differenzierungsinduktion

Bevor die humanen mesenchymalen Stammzellen entweder in Richtung Adipozyten oder in Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnten sie im Lichtmikroskop an ihrer spindelförmigen Form erkannt werden (Abbildung 11 a und b). Nach 3 Tagen Differenzierung in Richtung Osteozyten ist die Zellzahl erhöht und die Zellen weisen eine veränderte Zellform auf (siehe Abbildung 12 a). Die Zellkörper nehmen eine kubische Form an, was nach 7 Tagen Differenzierung in Richtung Osteozyten noch besser zu sehen ist (siehe Abbildung 12 b).

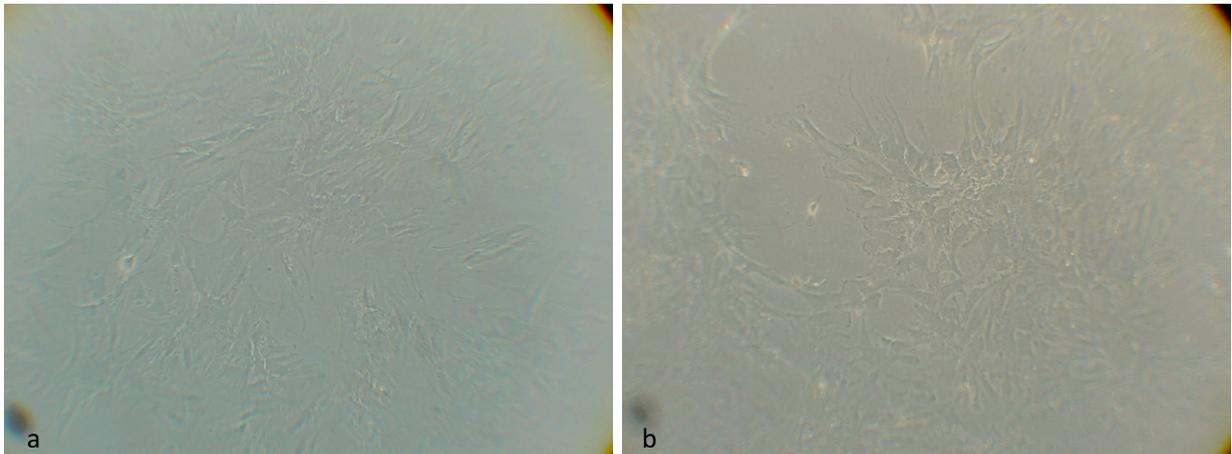


Abbildung 12: humane mesenchymale Stammzellen 3 Tage nach osteogenem Induktionsbeginn (Bild a) und 7 Tage nach osteogenem Induktionsbeginn (Bild b)

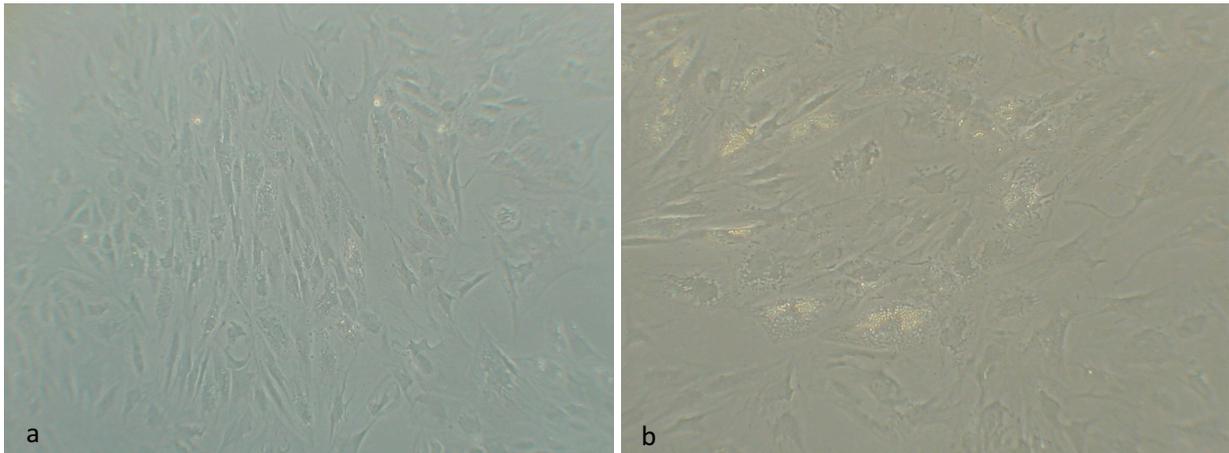


Abbildung 13: humane mesenchymale Stammzellen 3 Tage nach adipogenem Induktionsbeginn (Bild a) und 7 Tage nach adipogenem Induktionsbeginn (Bild b)

Die humanen mesenchymalen Stammzellen, die in Richtung Adipozyten differenziert wurden, verdichteten sich ebenfalls. Außerdem begannen sie Fettvakuolen zu produzieren. Je länger diese humanen mesenchymalen Stammzellen mit Hilfe des adipogenen Differenzierungsmediums kultiviert wurden, desto mehr nahm die Anzahl an Fettvakuolen zu (siehe Abbildung 13b). Die Größe der Fettvakuolen nahm ebenfalls zu.

Die Differenzierung zu Adipozyten wurde neben dem lichtmikroskopischen Nachweis auch fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des AdipoRedAssays nachgewiesen. Es handelt sich um ein lipophiles Reagenz, welches sich spezifisch in den Fettvakuolen von Adipozyten oder Zellen, die zu Adipozyten differenziert werden, anreichert. Da das Emissionsmaximum dieses Reagenzes bei 572 nm liegt, ist die Fluoreszenzfarbe, die vom Fluoreszenzmikroskop detektiert wurde, grün (siehe Abbildung 14).

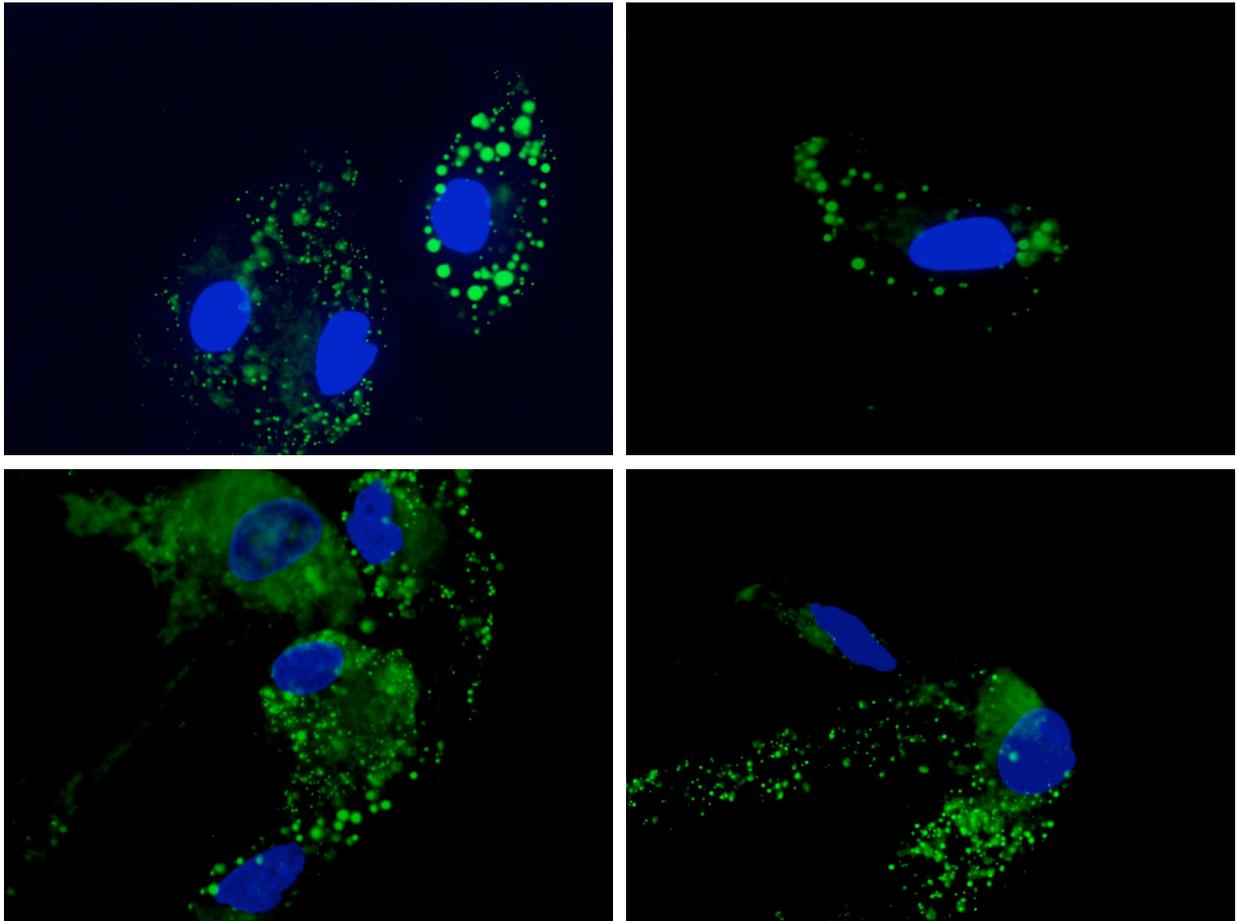


Abbildung 14: Anfärben der Vakuolen der 3 Tage lang in Richtung Adipozyten differenzierten mesenchymalen Stammzellen mittels AdipoRedAssay

4.2. *Beschreibung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen*

Bevor die verschiedenen BAC-Sonden auf die Stammzellen bzw. deren DNA hybridisiert wurden, wurden die Spezifität und die Signalstärke der verschiedenen BAC-Sonden getestet. Dazu wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut einer gesunden Testperson verwendet. Auf den Metaphasechromosomen dieser Lymphozyten konnte man eine geeignete BAC-Sonde daran erkennen, dass man zwei Signale pro Chromosom detektieren konnte. Dies ist die normale Kopiezahl des entsprechenden Genes. Lagen die zwei Chromatiden übereinander oder in enger Nähe zueinander, konnte es sein, dass die zwei einzelnen Signale der Chromatiden zu einem einzigen größeren Signal verschwammen. Gab es zwischen den zwei Chromatiden einen größeren Abstand, konnten die zwei Einzelsignale besser voneinander unterschieden werden. Außerdem sind in den Interphasekernen ebenfalls entweder zwei größere Signale oder vier kleinere Signale zu sehen. War dies der Fall, konnte die entsprechende BAC-Sonden-DNA auf die Stammzellen bzw. deren DNA hybridisiert werden.

Da Genamplifikationen im Prozess der Differenzierung von der Stammzelle hin zur differenzierten Zelle detektiert werden sollen, wurden die jeweiligen BAC-Sonden systematisch, zum Beispiel nach 3 Tagen und 7 Tagen Differenzierung (siehe Tabelle 4), an Zellkernen der entsprechenden „Differenzierungsstufe“ der Stammzellen getestet. Die Kopiezahl eines Genes einer zu untersuchenden Stammzelle wurde als normal bezeichnet, wenn zwei Kriterien erfüllt wurden: Erstens musste die detektierte Signalanzahl mit der Ploidiezahl übereinstimmen, die charakteristisch für die entsprechenden Zellen sind. Wir gingen von einem diploiden Chromosomensatz der Stammzellen aus. Aus diesem Grund wurden zwei größere oder vier kleinere Signale für eine BAC-Sonde pro Zellkern erwartet. Da wir uns bei der Auswertung einer BAC-Sonde nicht sicher waren, ob die entsprechenden humanen mesenchymalen Stammzellen tatsächlich diploid waren, wurde eine Zentromersonde eingesetzt. Eine Zentromersonde bindet spezifisch an die Zentromerregion eines bestimmten Chromosoms, in unserem Falle an die Zentromerregion des Chromosoms 12. Liegt das entsprechende Chromosom nun zwei Mal vor, was einem diploiden Chromosomensatz entspräche, würde man zwei Zentromere, also zwei Signale detektieren. Bei einem triploiden Chromosomensatz würde man drei Zentromere, also drei Signale und bei einem tetraploiden Chromosomensatz würde man vier Zentromere, also vier Signale pro Zellkern detektieren. Zweitens musste die Fluoreszenzpunktgröße der BAC-Sonde des zu untersuchenden Zellkernes der Fluoreszenzpunktgröße der gleichen BAC-Sonde der Referenzzelle, in unserem Falle Lymphozyten aus dem peripheren Blut einer gesunden Testperson, entsprechen.

Die BAC-Sonde 53C21 und die BAC-Sonde 118F19 hybridisieren wie in Abbildung 15 und 16 gezeigt, mit unterschiedlichen Regionen des Chromosoms 16.



Abbildung 15: Lokalisation der BAC-Sonde 53C21



Abbildung 16: Lokalisation der BAC-Sonde 118F19

Die BAC-Sonde 53C21 wurde so markiert, dass sie eine rote Farbe emittiert und die BAC-Sonde 118F19 wurde so markiert, dass sie eine grüne Farbe emittiert. Die mit der BAC-Sonde 53C21 hybridisierende DNA-Region kodiert für kein Protein. Die mit der BAC-Sonde 118F19 hybridisierende DNA-Region kodiert für zwei Proteine. Bei dem einen vermutet man eine histon-actetylase-ähnliche Funktion, das zweite Protein besitzt seine Funktion in einem Komplex aus weiteren Proteinen, die für die Initiation der DNA-Replikation benötigt werden. In der Array-CGH (array comparative genomic hybridisation) von humanen mesenchymalen Stammzellen, die nicht differenziert wurden, konnten Amplifikationen in der chromosomalen Region gesehen werden, mit der die BAC-Sonde 53C21 hybridisiert. Die BAC-Sonde 118F19 sollte als Kontroll-BAC-Sonde dienen, da wir anfänglich davon ausgingen, dass sich in der mit der BAC-Sonde 118F19 hybridisierenden DNA-Region keine Amplifikationen befänden. Auf den Metaphasechromosomen eines Lymphozyten sieht man für jede zu testender BAC-Sonde zwei kleinere oder ein größeres Signal pro Chromosom, was die normale Kopiezahl der entsprechenden Chromosomenregion anzeigt (siehe Abbildung 17 a). In dem Interphasekern des Lymphozyten sind zwei grüne und zwei rote Signale zu sehen (siehe Abbildung 17 b), was ebenfalls eine normale Kopiezahl darstellt und als Referenz dient. Die humanen mesenchymalen Stammzellen (siehe Abbildung 17 c und d) weisen Amplifikationen für die BAC-Sonde 53C21 auf, was daran zu sehen ist, dass sowohl die Anzahl an roten Signalen, als auch die Signalpunktgröße im Vergleich zu den Signalen des Interphasekernes deutlich angestiegen ist.

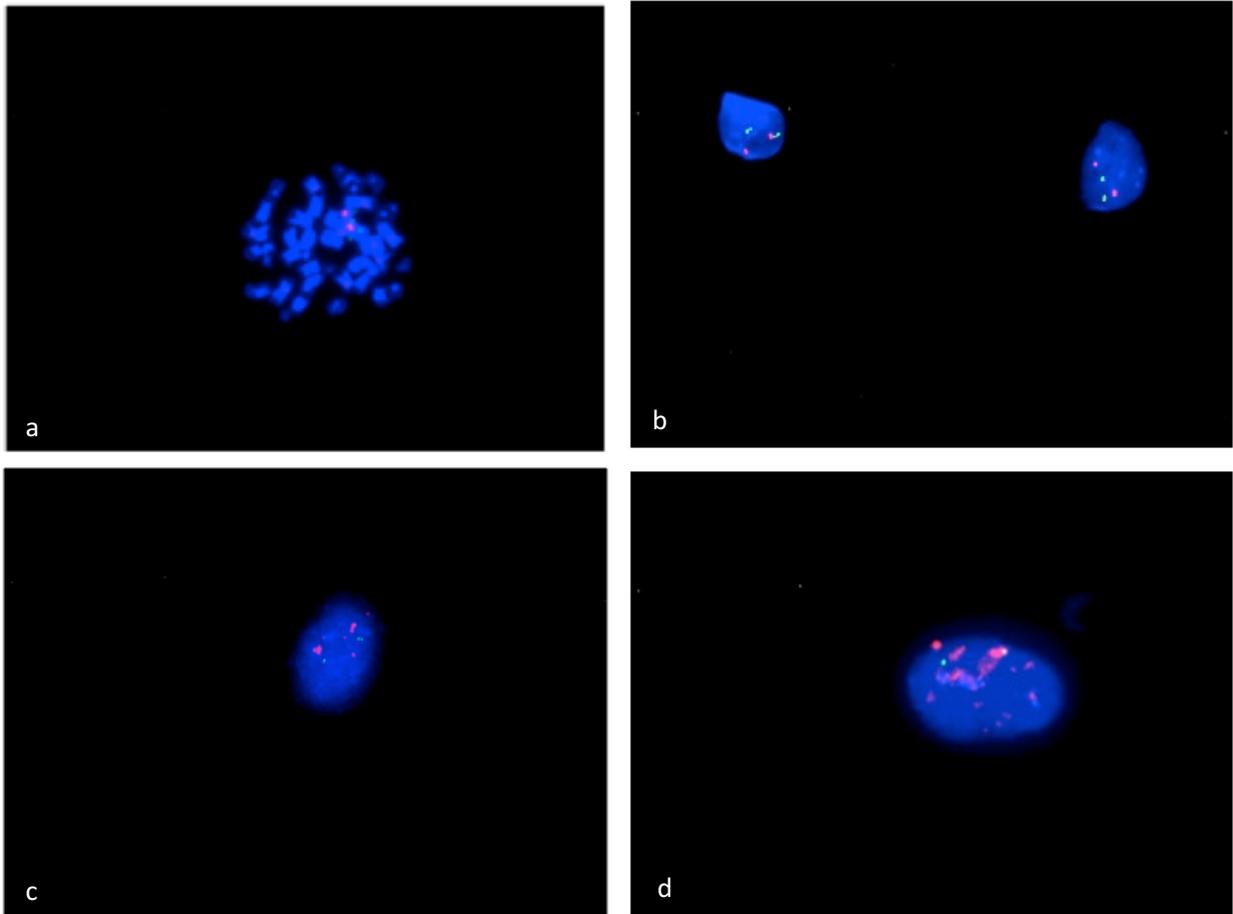


Abbildung 17: Hybridisierung der BAC-Sonde 53C21 und der BAC-Sonde 118F19 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser beiden BAC-Sonden mit undifferenzierten hMSC: Zwei BAC-Sonden wurden verwendet: BAC-Sonde 53C21 alexa 594 (rot) und BAC-Sonde 118F19 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Das Bild a zeigt eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasechromosomen eines Lymphozyten, das Bild b zeigt eine FISH auf einem Interphasekern eines Lymphozyten, die Bilder c und d zeigen jeweils eine FISH mit undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen. Die chromosomale Region, die mit der BAC-Sonde 53C21 hybridisiert, ist in den humanen mesenchymalen Stammzellen amplifiziert.

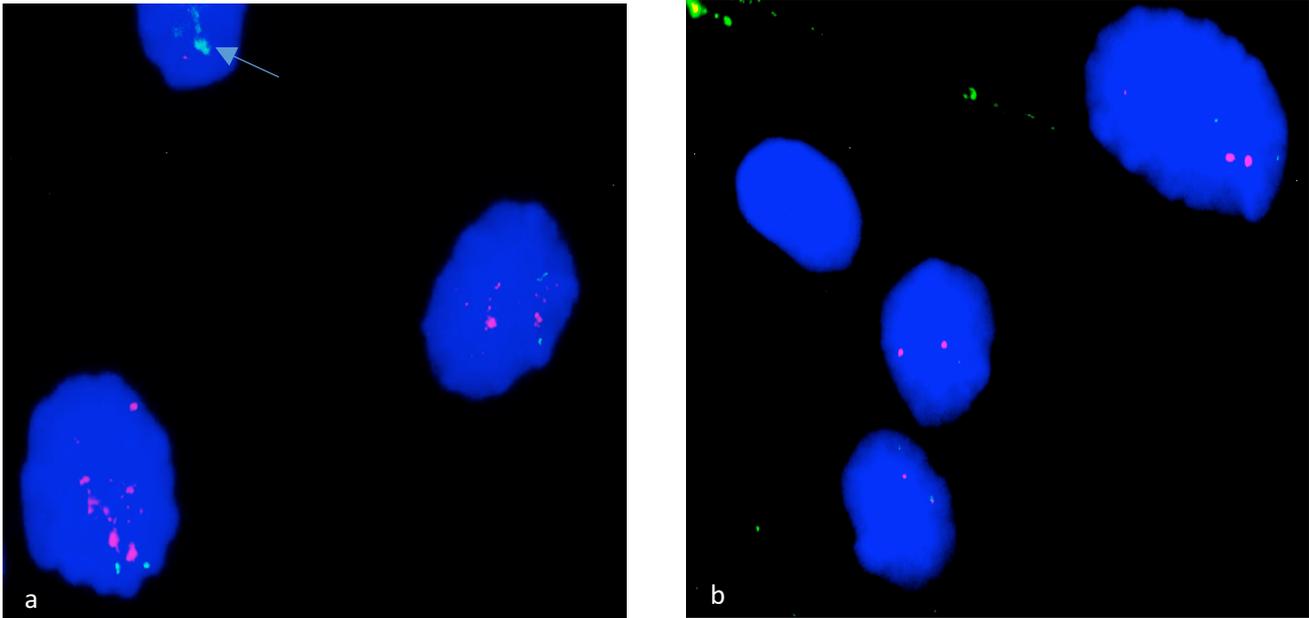


Abbildung 18: Hybridisierung der BAC-Sonde 53C21 und der BAC-Sonde 118F19 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden: BAC-Sonde 53C21 alexa 594 (rot) und BAC-Sonde 118F19 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Die Bilder a und b zeigen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen auf humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Zu sehen sind unterschiedlich starke rote Signale, was bedeutet, dass der BAC-Sonden-53C21-Genlocus im Vergleich zu den undifferenzierten Stammzellen unterrepliziert sein könnte. Der BAC-Sonden-118F19-Genlocus weist zum Großteil keine Genamplifikationen auf. Die BAC-Sonde 118F19 detektiert jedoch vereinzelte Amplifikationen (Pfeil).

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung der BAC-Sonde 53C21 und der BAC-Sonde 118F19 mit Stammzellen, die drei Tage lang in Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnte folgendes zeigen: In der Abbildung 18 b fällt auf, dass die roten Signale in ihrer Anzahl gleich sind, jedoch in ihrer Signalgröße große Unterschiede aufweisen. Die roten Signale des Zellkernes in der Mitte am linken Bildrand der Abbildung 18 b entsprechen am ehesten den roten Signalen des Interphasekernes. Die roten Signale des Zellkernes darüber sind größer, die roten Signale des Zellkernes darunter sind kleiner. Bei den roten Signalen, die größer sind als die Signale des Zellkernes in der Mitte, könnte es sich um noch vorhandene Amplifikationen handeln. Die kleineren Signale des Zellkernes unten links innerhalb der Abbildung 18 b könnten eine unterreplizierte DNA-Region aufzeigen. Dies bedeutet, dass hier eine chromosomale Region vorliegt, die sich im Verhältnis zu einer amplifizierten chromosomalen Region durch eine geringere Replikation auszeichnet. Die Abbildung 18 a zeigt ähnliches: Man sieht zwei Zellkerne, deren rote Signale weder in ihrer Anzahl, noch in ihrer Signalgröße gleich sind. Auch hier könnten die roten Signale im rechten Zellkern der Abbildung 18 a eine beginnende Unterreplikation darstellen, während die BAC-Sonde 53C21 im Zellkern daneben eine noch vorhandene Amplifikation detektiert. Gleichzeitig sieht man

auf Abbildung 18 a (Pfeil) eine Amplifikation der DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 118F19 hybridisiert. Anscheinend kann es in dieser Chromosomenregion ebenfalls zu Amplifikationen kommen.

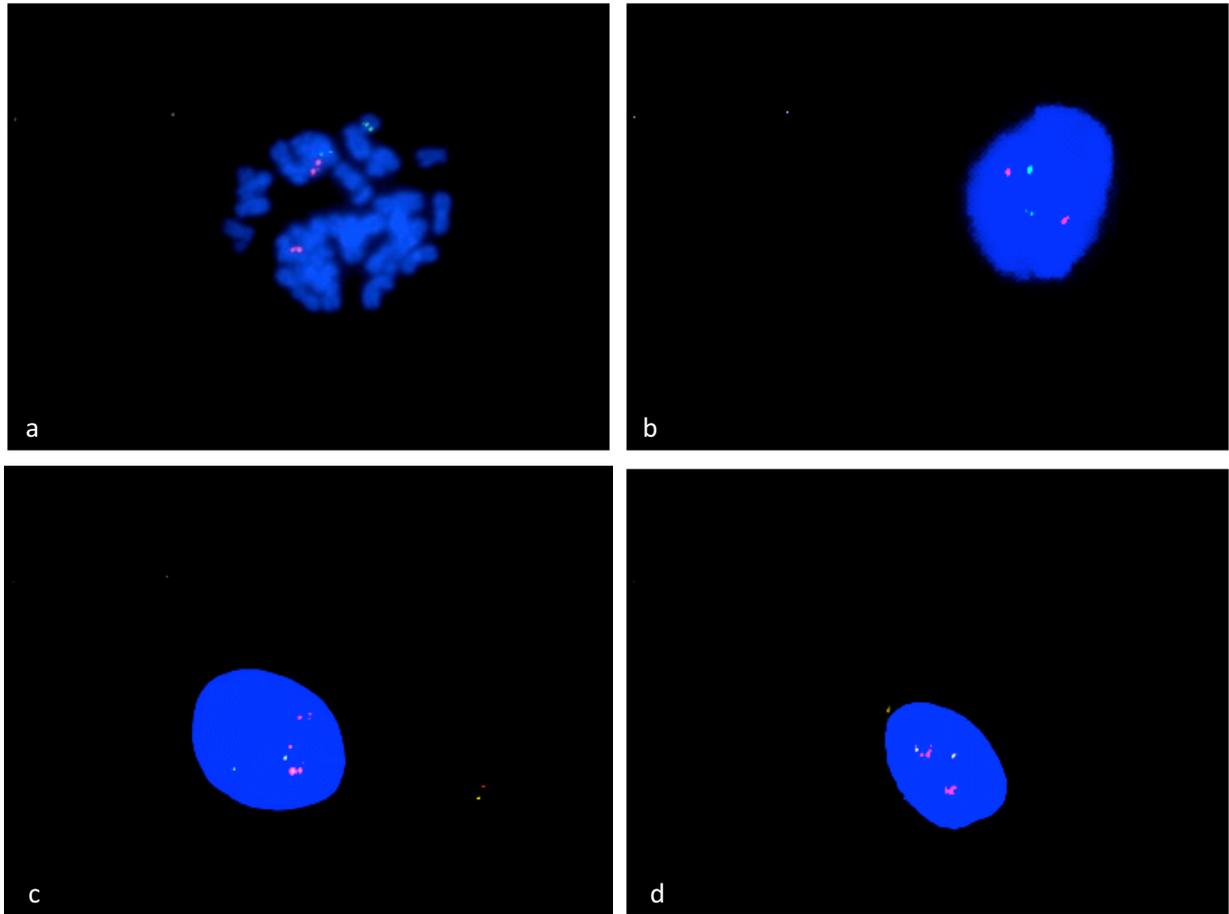


Abbildung 19: Hybridisierung der BAC-Sonde 297B9 und der BAC-Sonde 81J11 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser beiden BAC-Sonden mit undifferenzierten hMSC: Zwei BAC-Sonden wurden verwendet: BAC-Sonde 297B9 alexa 594 (rot) und BAC-Sonde 81J11 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Das Bild a zeigt eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasechromosomen eines Lymphozyten, das Bild b zeigt eine FISH auf einem Interphasekern eines Lymphozyten, die Bilder c und d zeigen jeweils eine FISH mit undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen. Die chromosomale Region, mit der die BAC-Sonde 297B9 hybridisiert, ist in den humanen mesenchymalen Stammzellen amplifiziert.

Die BAC-Sonde 297B9 hybridisiert mit einer Region auf Chromosom 22 und die BAC-Sonde 81J11 hybridisiert mit einer Region des Chromosoms 15 (siehe Abbildung 20).

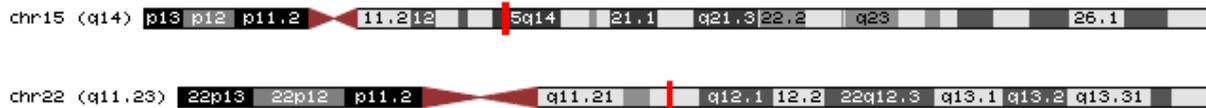


Abbildung 20: Die BAC-Sonde 81J11 bindet an eine Region des Chromosoms 15, die BAC-Sonde 297B9 bindet an eine Region des Chromosoms 22.

Die BAC-Sonde 297B9 wurde so markiert, dass sie eine rote Farbe emittiert und die BAC-Sonde 81J11 wurde so markiert, dass sie eine grüne Farbe emittiert. Die mit der BAC-Sonde 297B9 hybridisierende DNA beinhaltet viele Gene, unter anderem ein Gen für ein Calcineurinbindungsprotein und ein Gen für eine Glutathion-S-transferase. Die mit der BAC-Sonde 81J11 hybridisierende DNA kodiert für ein Protein des Golgi-Apparates. In der Array-CGH von humanen mesenchymalen Stammzellen, die nicht differenziert wurden, konnten Amplifikationen in der chromosomalen Region gesehen werden, die mit der BAC-Sonde 297B9 hybridisiert. Auf den Metaphasechromosomen eines Lymphozyten (siehe Abbildung 19 a) sieht man für jede zu testende BAC-Sonde zwei Signale pro Chromosom, was die normale Kopiezahl der entsprechenden Chromosomenregion darstellt. In dem Interphasekern des Lymphozyten (siehe Abbildung 19 b) sind je zwei grüne und je zwei rote Signale zu sehen, was ebenfalls eine normale Kopiezahl darstellt und als Referenz dient. Die humanen mesenchymalen Stammzellen weisen Amplifikationen für die BAC-Sonde 297B9 auf (siehe Abbildung 19 c und d), was daran zu sehen ist, dass sowohl die Anzahl an roten Signalen, als auch die Fluoreszenzpunktgröße im Vergleich zu den Signalen des Interphasekerns angestiegen sind. Im Gegensatz zu den roten Signalen entsprechen die grünen Signale in Anzahl, je zwei Signale pro Zellkern und in Signalgröße den entsprechenden Signalen des Referenzkerns des Lymphozyten. Die BAC-Sonde 81J11 konnte in den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen also keine Amplifikationen detektieren (siehe Abbildung 19 c und d).

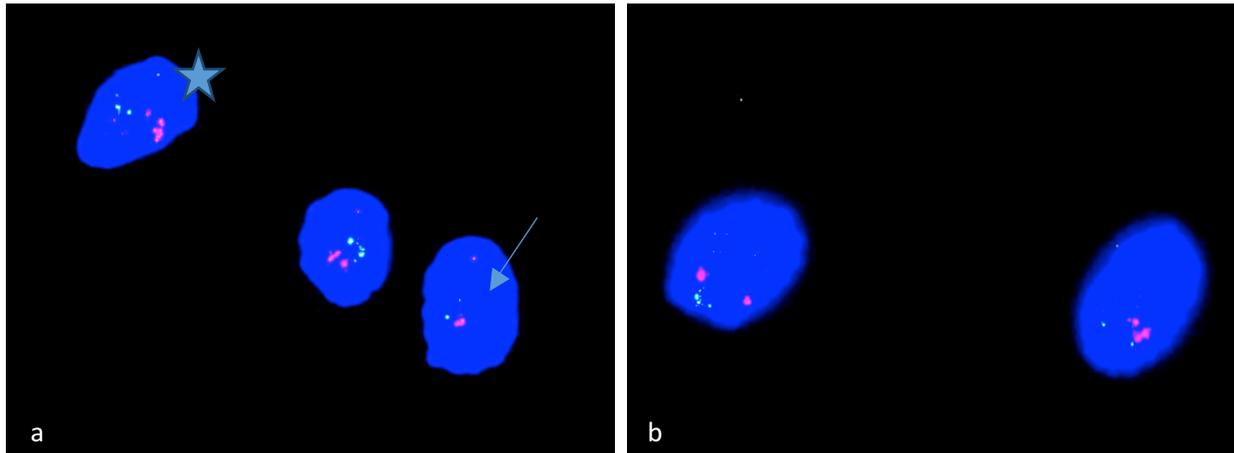


Abbildung 21: Hybridisierung der BAC-Sonde 297B9 und der BAC-Sonde 81J11 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden: BAC-Sonde 297B9 alexa 594 (rot) und BAC-Sonde 81J11 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Die Bilder a und b zeigen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen (FISH) mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Zu sehen sind unterschiedlich große grüne Signale, was bedeutet, dass der BAC-Sonde-81J11-Genlocus im Vergleich zu den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen amplifiziert sein könnte. Der BAC 297B9-Genlocus weist teils Genamplifikationen auf, die in ihrer Anzahl und Signalgröße den Genamplifikationen der undifferenzierten Stammzellen entsprechen (Stern). Man sieht jedoch auch Zellkerne ohne Amplifikationen (Pfeil).

Anschließend wurde die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung der BAC-Sonde 297B9 und der BAC-Sonde 81J11 mit Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, durchgeführt. In der Abbildung 21 a fällt auf, dass die grünen Signale des in der Mitte befindlichen Zellkernes größer geworden sind als die Signale in den Zellkernen darum. Auch in der Abbildung 21 b kann ein Unterschied in der Anzahl und in der Größe der grünen Signale gesehen werden. Die mit der BAC-Sonde 81J11 hybridisierende chromosomale Region scheint in einem kleinen Prozentsatz der differenzierten Stammzellen amplifiziert zu sein.

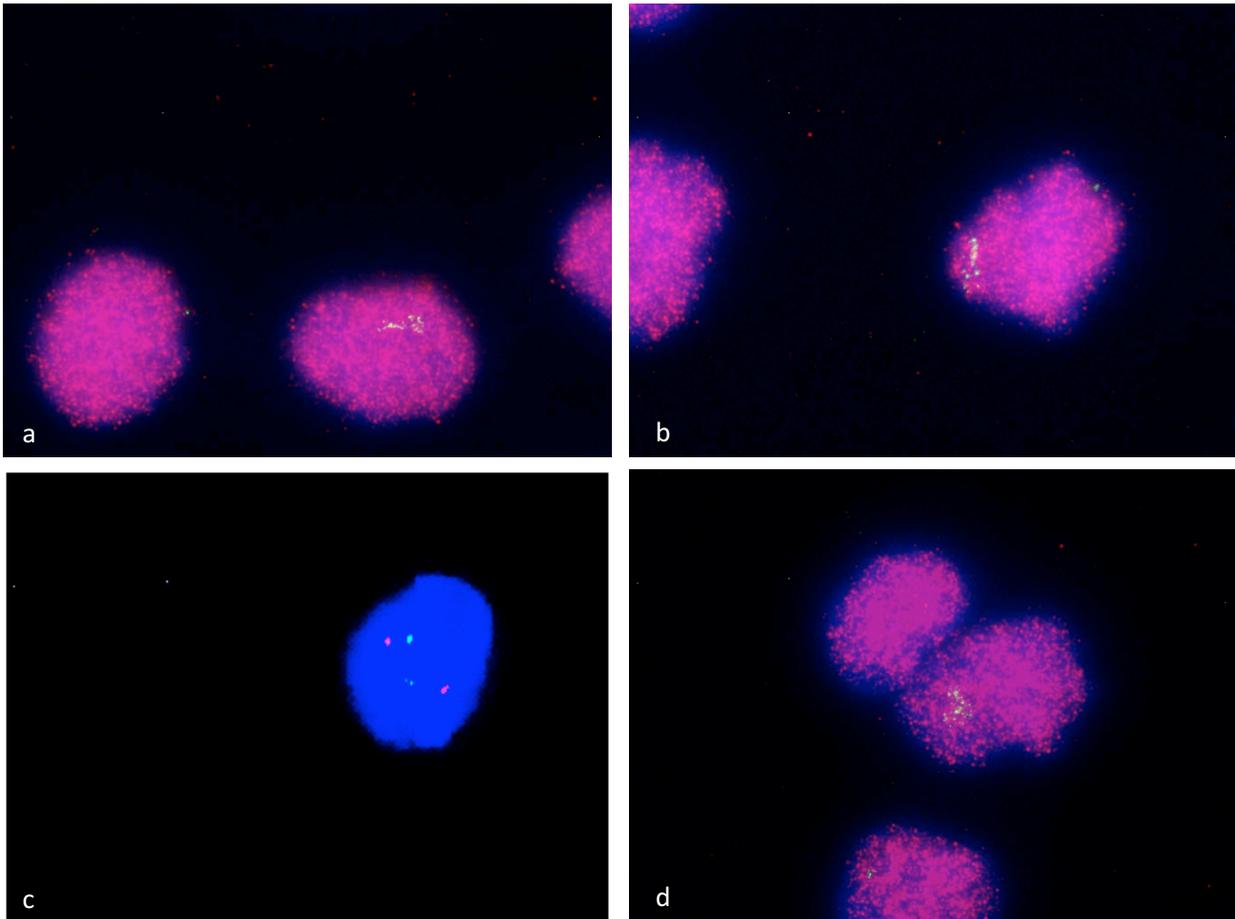


Abbildung 22: Hybridisierung der BAC-Sonde 297B9 und der BAC-Sonde 81J11 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden: BAC-Sonde 297B9 alexa 594 (rot) und BAC-Sonde 81J11 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Die Bilder a, b und d zeigen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Die BAC 297B9-Sonde bindet an viele DNA-Fragmente, jedoch nicht an zwei oder vier gut detektierbare Genloci, die mit den Genloci des Referenzzellkernes des Lymphozyten vergleichbar wären. Auf Bild c ist der Interphasekern des Lymphozyten zum Vergleich abgebildet. Außerdem sind viele grüne Signale zu sehen, was bedeutet, dass der BAC 81J11-Genlocus im Vergleich zu den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen amplifiziert sein könnte.

Es folgte die FISH der BAC-Sonden 297B9 und 81J11 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Die BAC-Sonde 81J11 detektiert Genamplifikationen. Man sieht eine erhöhte Anzahl an grünen Signalen (siehe Abbildung 22 a, b, d). Die roten Signale wirken auf den ersten Blick unspezifisch. Um sicher zu sein, dass die BAC-Sonde 297B9 nicht zerfallen war, wurde ein zweiter Objektträger angefertigt und das Resultat sah identisch aus. Zu erkennen ist, dass die BAC-Sonde 297B9 an viele kleine DNA-Fragmente bindet (siehe Abbildung 22 a, b, d). Zwei oder vier größere Signale, die vergleichbar mit den Signalen des Interphasekernes des Lymphozyten (siehe Abbildung 22 c) wären, sind nicht zu sehen. Dies könnte bedeuten, dass die entsprechenden Genloci nicht mehr in der Form vorliegen, wie sie bei den

Lymphozyten oder den nicht differenzierten Stammzellen mit ihren von der BAC-Sonde 297B9 detektierten Amplifikationen vorlagen.

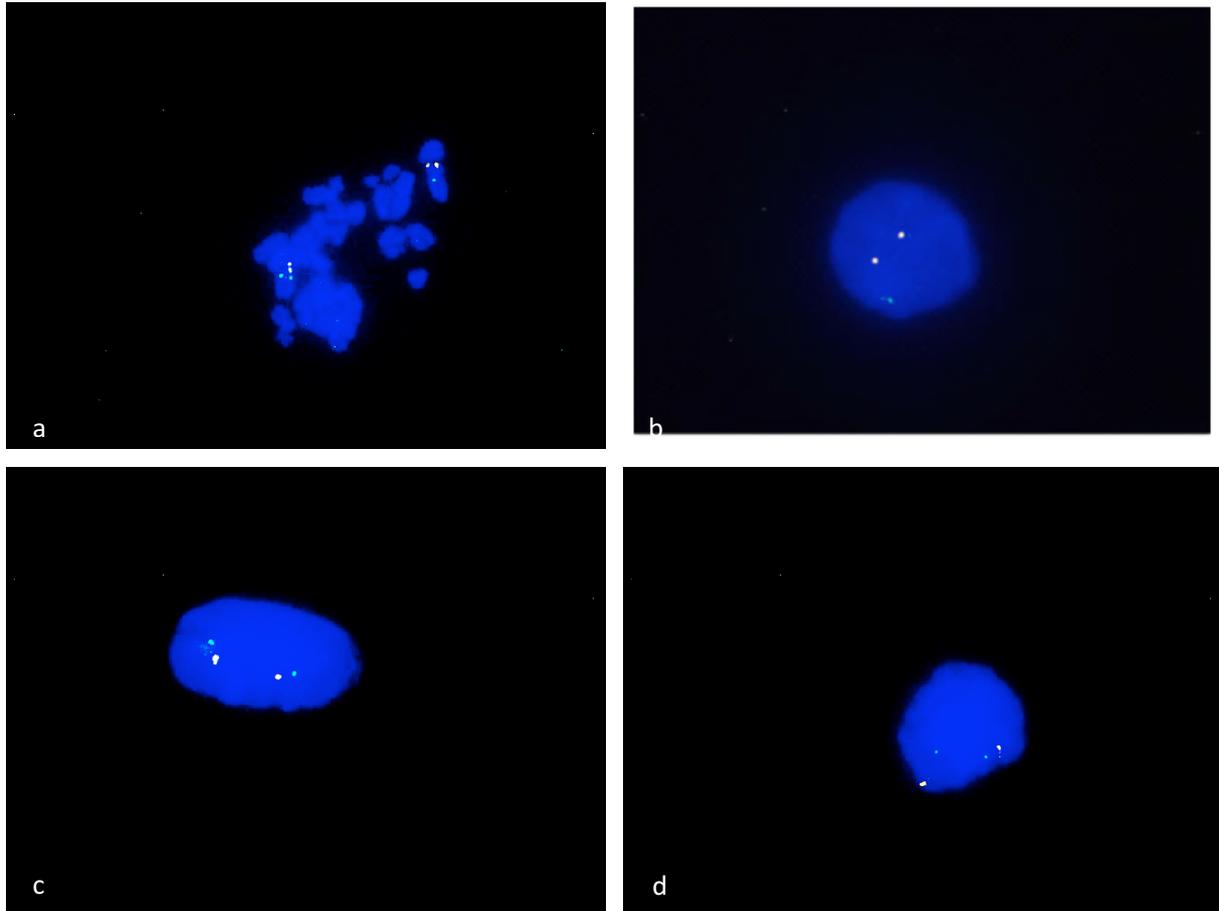


Abbildung 23: Hybridisierung der BAC-Sonde 1142B4 und der BAC-Sonde 162F20 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser beiden BAC-Sonden mit undifferenzierten hMSC: Zwei BAC-Sonden wurden verwendet: BAC 1142B4 alexa 555 (gelb) und BAC 162F20 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Das Bild a zeigt eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasechromosomen eines Lymphozyten, das Bild b zeigt eine FISH mit einem Interphasekern eines Lymphozyten, die Bilder c und d zeigen jeweils eine FISH mit undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen. In den humanen mesenchymalen Stammzellen sind keine Amplifikationen zu sehen.

Sowohl die BAC-Sonde 1142B4, als auch die BAC-Sonde 162F20 hybridisiert mit einer Region auf Chromosom 4.



Abbildung 24: Lokalisation der BAC-Sonde 1142B4



Abbildung 25: Lokalisation der BAC-Sonde 162F20

Die BAC-Sonde 1142B4 wurde so markiert, dass sie eine gelbe Farbe emittiert und die BAC-Sonde 162F20 wurde so markiert, dass sie eine grüne Farbe emittiert. Die DNA-Region, die

mit der BAC-Sonde 1142B4 hybridisiert, kodiert für zwei Zinkfingerproteine. Die DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 162F20 hybridisiert, kodiert für ein Enzym namens Uridindiphosphoglucuronosyltransferase. In der Array-CGH von humanen mesenchymalen Stammzellen, die nicht differenziert wurden, konnten keine Amplifikationen gesehen werden, weder in der chromosomalen Region, die mit der BAC-Sonde 1142B4 hybridisiert, noch in der chromosomalen Region, die mit der BAC-Sonde 162F20 hybridisiert. Auf den Metaphasechromosomen eines Lymphozyten (siehe Abbildung 23 a) sieht man für jede zu testende BAC-Sonde zwei Signale pro Chromosom, was die normale Kopiezahl der entsprechenden Chromosomenregion darstellt. In dem Interphasekern des Lymphozyten (siehe Abbildung 23 b) sind zwei grüne und zwei gelbe Signale zu sehen, was ebenfalls eine normale Kopiezahl darstellt und als Referenz dient. Die humanen mesenchymalen Stammzellen (siehe Abbildung 23 c und d) weisen keine Amplifikationen in den chromosomalen Regionen, die mit den BAC-Sonden 1142B4 und 162F20 hybridisieren, auf, was daran zu sehen ist, dass für beide BAC-Sonden sowohl die Anzahl an Signalen, als auch die Fluoreszenzpunktgröße im Vergleich zu den Signalen des Interphasekerns ähnlich sind.

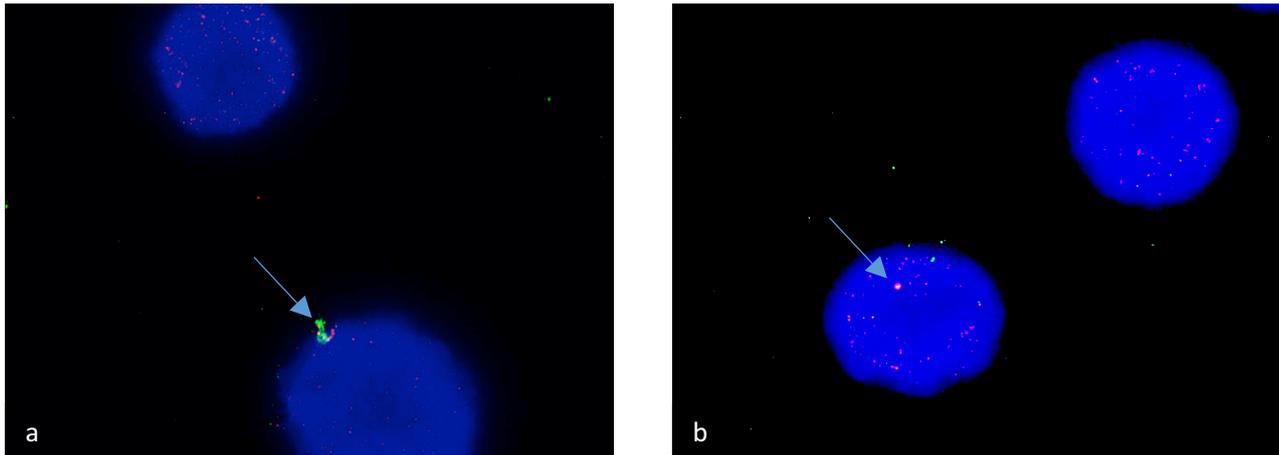


Abbildung 26: Hybridisierung der BAC-Sonde 1142B4 und der BAC-Sonde 162F20 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden: Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung der BAC-Sonde 1142B4 alexa 555 (gelb) zeigt sich hier durch dunkelorangefarbene Signale. Die BAC-Sonde 162F20 alexa 488 wird weiterhin als grün detektiert, Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Die Bilder a und b zeigen eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf Stammzellen, die 3 Tage Richtung Osteozyten differenziert wurden. Die BAC-Sonde 162F20 detektiert Amplifikationen (Pfeil in a). Die BAC-Sonde 1142B4 detektiert viele einzelne DNA-Fragmente. Selten sind Signale (Pfeil in b) in einer Größe zu sehen, die vergleichbar mit der Signalgröße der Signale des Interphasekernes des Referenzlymphozyten wären.

Bei der Analyse der beiden BAC-Sonden mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnten Amplifikationen in den chromosomalen Regionen detektiert werden, mit denen die BAC-Sonde 162F20 hybridisiert (siehe Abbildung 26 a, Pfeil). Neben der Amplifikation des BAC-Sonde-162F20-Genlocus, kann in der Abbildung 26 a keine BAC-Sonde-1142B4-Genlocus-Amplifikation gesehen werden. Es sind keine zwei orangefarbene Signale zu sehen, die in ihrer Signalgröße der Signalgröße der Signale des Interphasekernes des Lymphozyten entsprechen würden. Um die schwachen diffusen gelben Signale besser von den grünen Signalen unterscheiden zu können, wurde der gelbe Farbton am Fluoreszenzmikroskop zu einem dunkel-orangefarbenen Farbton geändert. Die Bilder ähneln den Fluoreszenzbildern der BAC-Sonden 297B9 und 81J11 (siehe Abbildung 22). Eine BAC-Sonde, in diesem Falle auch die grün markierte BAC-Sonde, detektiert Amplifikationen, während die rot markierte bzw. gelb markierte (zu dunkel-orangefarben geändert) BAC-Sonde an viele kleine DNA-Fragmente zu binden scheint. In der Abbildung 26 b ist ein mit Pfeil markiertes Signal zu sehen, welches von der Signalgröße einem Signal des Referenzkernes des Lymphozyten entspricht. Man sieht innerhalb dieses dunkelorangefarbenen Signals ein etwas kleineres grünes Signal, was die Tatsache unterstützt, dass die BAC-Sonden spezifisch an die entsprechenden chromosomalen Regionen binden, weil beide BAC-Sonden an Regionen des Chromosoms 4 binden und somit in enger chromosomaler Nähe an DNA binden. Allerdings konnten nur

selten Signale in dieser Signalgröße detektiert werden. Die meisten dunkel-orangefarbenen Signale entsprachen den kleinen diffusen Signalen wie man sie in dem oberen Zellkern in Abbildung 26 a sehen kann und wie man sie in dem oberen Zellkern in der Abbildung 26 b sehen kann.



Abbildung 27: Lokalisation der BAC-Sonde 728G2

Die BAC-Sonde 728G2 bindet an eine DNA-Region auf Chromosom 3. Die BAC-Sonde wurde so markiert, dass sie eine grüne Farbe emittiert. Die mit der BAC-Sonde hybridisierende DNA kodiert für ein Protein, welches als Enzym an der mitochondrialen Membran arbeitet. In der Array-CGH von humanen mesenchymalen Stammzellen, die nicht differenziert wurden, konnten keine Amplifikationen gesehen werden, während Amplifikationen nach 3 und nach 7 Tagen osteogener Differenzierung nachgewiesen werden konnten. Auf den Metaphasechromosomen eines Lymphozyten (siehe Abbildung 28 a) sieht man zwei Signale pro Chromosom, was die normale Kopiezahl der entsprechenden Chromosomenregion darstellt. In dem Interphasekern des Lymphozyten (siehe Abbildung 28 b) sind zwei grüne Signale zu sehen, was ebenfalls eine normale Kopiezahl darstellt und als Referenz dient. Die humanen mesenchymalen Stammzellen (siehe Abbildung 28 c und d) weisen keine Amplifikationen auf, was daran zu sehen ist, dass die Anzahl an grünen Signalen, als auch die Signalgröße im Vergleich zu den Signalen des Interphasekernes übereinstimmen.

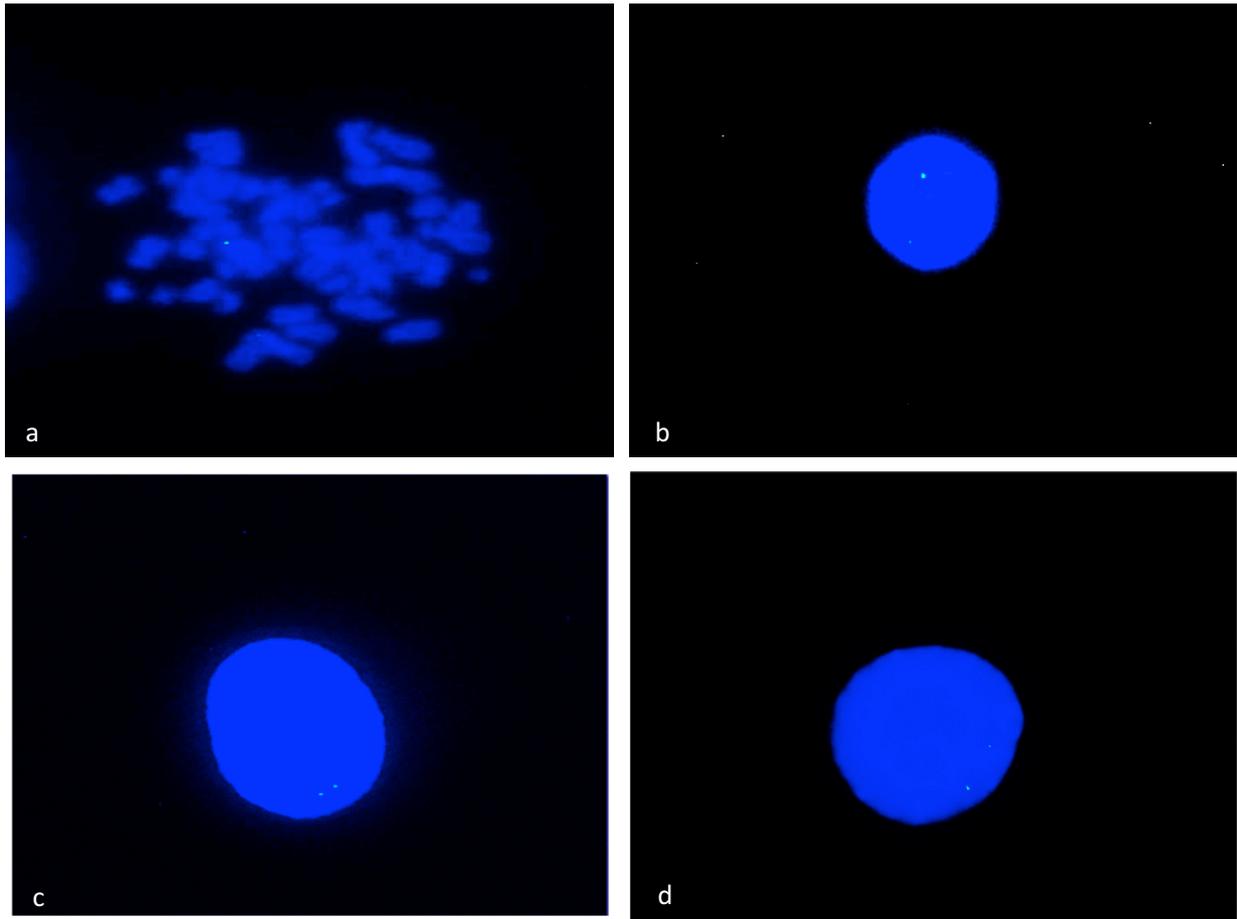


Abbildung 28: Hybridisierung der BAC-Sonde 728G2 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser BAC-Sonde mit undifferenzierten hMSC: Eine BAC-Sonde wurde verwendet: BAC-Sonde 728G2 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) –Bild a zeigt eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf Metaphasechromosomen eines Lymphozyten, Bild b zeigt eine FISH mit einem Interphasekern eines Lymphozyten, die Bilder c und d zeigen jeweils eine FISH mit undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen. In den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen sind keine Amplifikationen zu sehen.

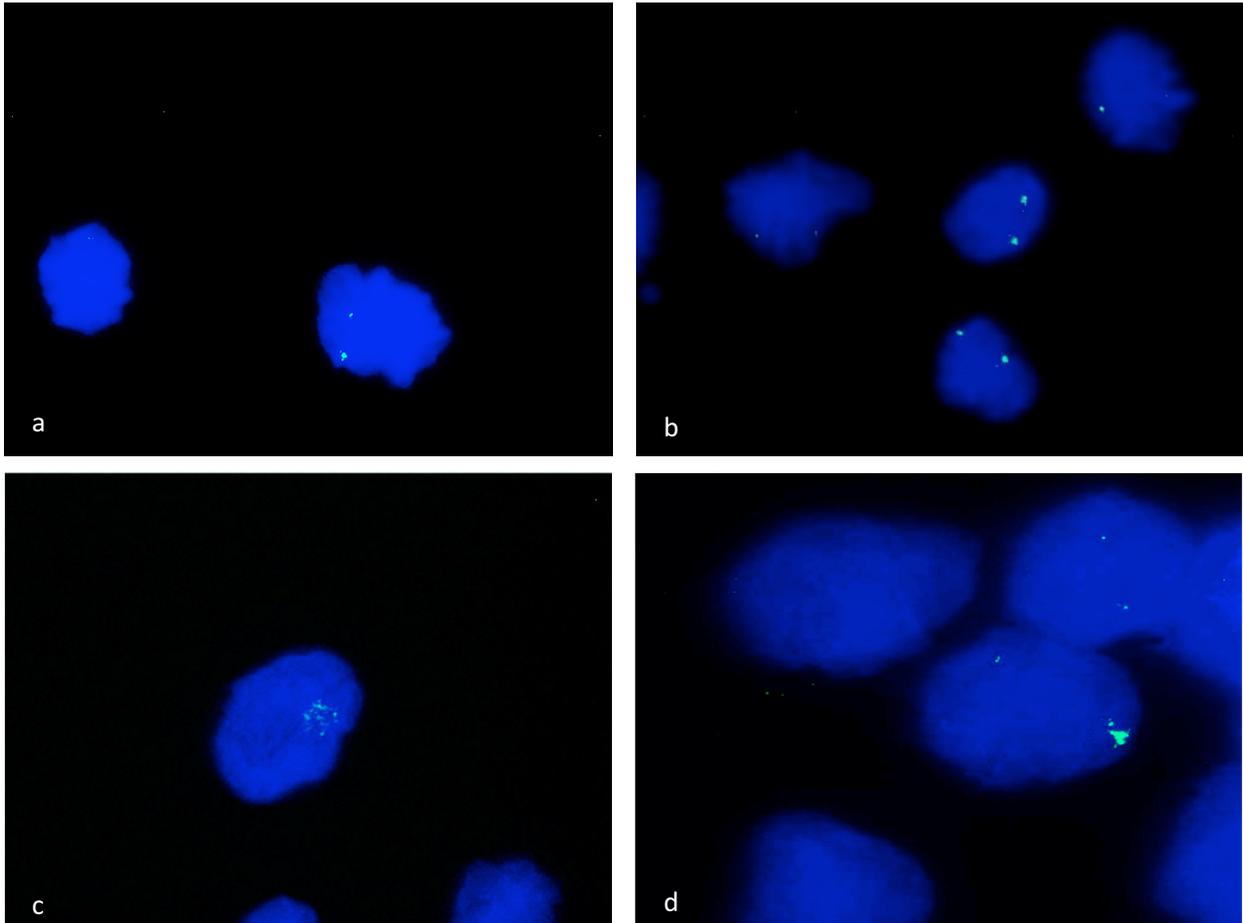


Abbildung 29: Hybridisierung der BAC-Sonde 728G2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden (siehe a und b) und die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden (siehe c und d): BAC-Sonde 728G2 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Die Bilder a und b zeigen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Zu sehen sind unterschiedlich starke grüne Signale, von denen einige eine vergleichbare Signalgröße besitzen wie die Signale des Interphasekernes und wie die Signale der Kerne der undifferenzierten Stammzellen. Daneben sind Signale zu sehen, die größer sind. Die Bilder c und d zeigen eine FISH mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Man sieht, dass die Amplifikationen in Anzahl und Signalgröße zugenommen haben.

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung der BAC-Sonde 728G2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, ist auf den Abbildungen 29 a und b zu sehen. Neben Signalen, die in ihrer Größe der Signalgröße der Signale des Interphasekernes entsprechen, gibt es Signale, deren Größe zugenommen hat. Es handelt sich um beginnende Amplifikationen. In den mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnten teilweise mehr als zwei oder vier Signale detektiert werden und auch die Signalgröße hat in ihrem Durchmesser zugenommen (siehe Abbildung 29 c und d). Zu sehen ist, dass die

Amplifikationen im Vergleich zu den Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, in ihrem Ausmaß zugenommen haben, da sowohl Anzahl als auch Größe angestiegen sind.

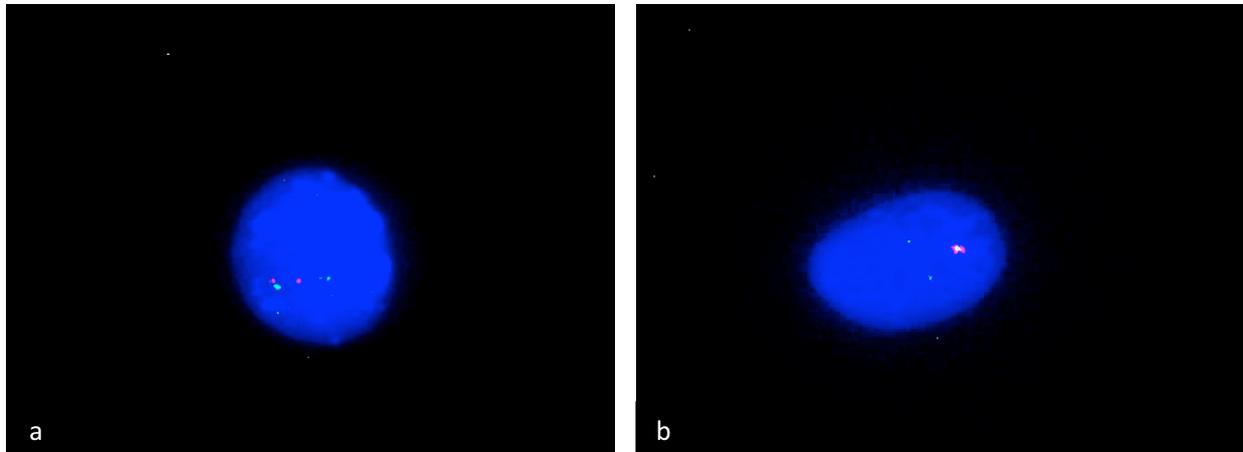


Abbildung 30: Hybridisierung der BAC-Sonde 571M6 und der BAC-Sonde 61102 mit undifferenzierten hMSC:

Zwei BAC-Sonden wurden verwendet: BAC-Sonde 571M6 alexa 488 (grün) und BAC-Sonde 61102 alexa 594 (rot), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Diese BAC-Sonden wurden bereits an Metaphasechromosomen und Interphasekernen von Lymphozyten einer gesunden Testperson getestet (Fischer et al., 2016[14]). Die Bilder a und b zeigen eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen. In den humanen mesenchymalen Stammzellen sind zum größten Teil keine Amplifikationen zu sehen(a), während man einige Zellkerne mit beginnenden Amplifikationen finden konnte(b).

Die BAC-Sonde 571M6 und die BAC-Sonde 61102 hybridisieren jeweils mit einer Region auf Chromosom 12.



Abbildung 31: Lokalisation der BAC-Sonde 571M6



Abbildung 32: Lokalisation der BAC-Sonde 61102

Die BAC-Sonde 571M6 wurde so markiert, dass sie eine grüne Farbe emittiert und die BAC-Sonde 61102 wurde so markiert, dass sie eine rote Farbe emittiert. Die mit der BAC-Sonde 571M6 hybridisierende DNA-Region codiert für viele Proteine, darunter das Protein Cyclin-abhängige Kinase 4, OS-9, welches in Osteosarkomen stark exprimiert vorliegt und ein Cytochrome P450-Enzym. Bei der Cyclin-abhängigen Kinase handelt es sich um ein Enzym, welches zu bestimmten Zeitpunkten eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt. Es interagiert mit

Cyclinen, somit kann die Genexpression verschiedener Zielgene erfolgen. Gleichzeitig interagiert die Cyclin-abhängige Kinase 4 mit sogenannten CDK-Inhibitorproteinen (CDKI). Diese CDKI hemmen die CDK4 und bewirken eine Arretierung. Liegt eine Fehlfunktion dieser CDKI vor, kann es zu einem dauerhaften Vorantreiben des Zellzyklus und somit zur Tumorentstehung kommen. Das Protein ist oft in malignen Melanomen[21], Glioblastomen[22], Sarkomen und Karzinomen der Brust[23], des Darmes, der Lunge[24], des Ovars und der Mundhöhle überexprimiert. Die BAC-Sonde 611O2 codiert für das Protein MDM2 und eine Carboxypeptidase. MDM2 steht für „transformed mouse 3T3 cell double minute 2“ und wird auch als p53-Bindungsprotein bezeichnet. Es ist ein negativer Regulator des Proteins p53 und zählt somit zu den Protoonkogenen. Bei intakter DNA wird p53 direkt abgebaut, sodass eine äußerst geringe Konzentration von p53 normal ist. Der Abbau erfolgt durch MDM2. MDM2 ist eine Ubiquitin-Ligase, ubiquitiniert p53 und veranlasst auf diesem Weg seinen Abbau. Man weiß, dass MDM2 in vielen Tumoren amplifiziert ist. Man vermutet einen Einfluss des erhöhten MDM2-Spiegels in der Entstehung von Tumoren, besonders in der Entstehung von Weichteiltumoren, Osteosarkomen[25] und Ösophaguskarzinomen[26].

In der Array-CGH konnten für beide BAC-Sonden keine Amplifikationen nachgewiesen werden. Die humanen mesenchymalen Stammzellen weisen zum Teil keine Amplifikationen für beide BAC-Sonden auf (siehe Abbildung 30 a). Es konnten jedoch Zellen gefunden werden, in deren Zellkernen beginnende Amplifikationen detektiert werden konnten (siehe Abbildung 30 b), da die Anzahl an Signalen und die Signalgröße im Vergleich zu den daneben liegenden Zellkernen angestiegen ist. Anschließend testeten wir die BAC-Sonden 571M6 und 611O2 an humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden. Neben beginnenden Amplifikationen für beide BAC-Sonden (siehe Abbildung 33 b) sind starke Amplifikationen für beide BAC-Sonden zu sehen (siehe Abbildung 33 a).

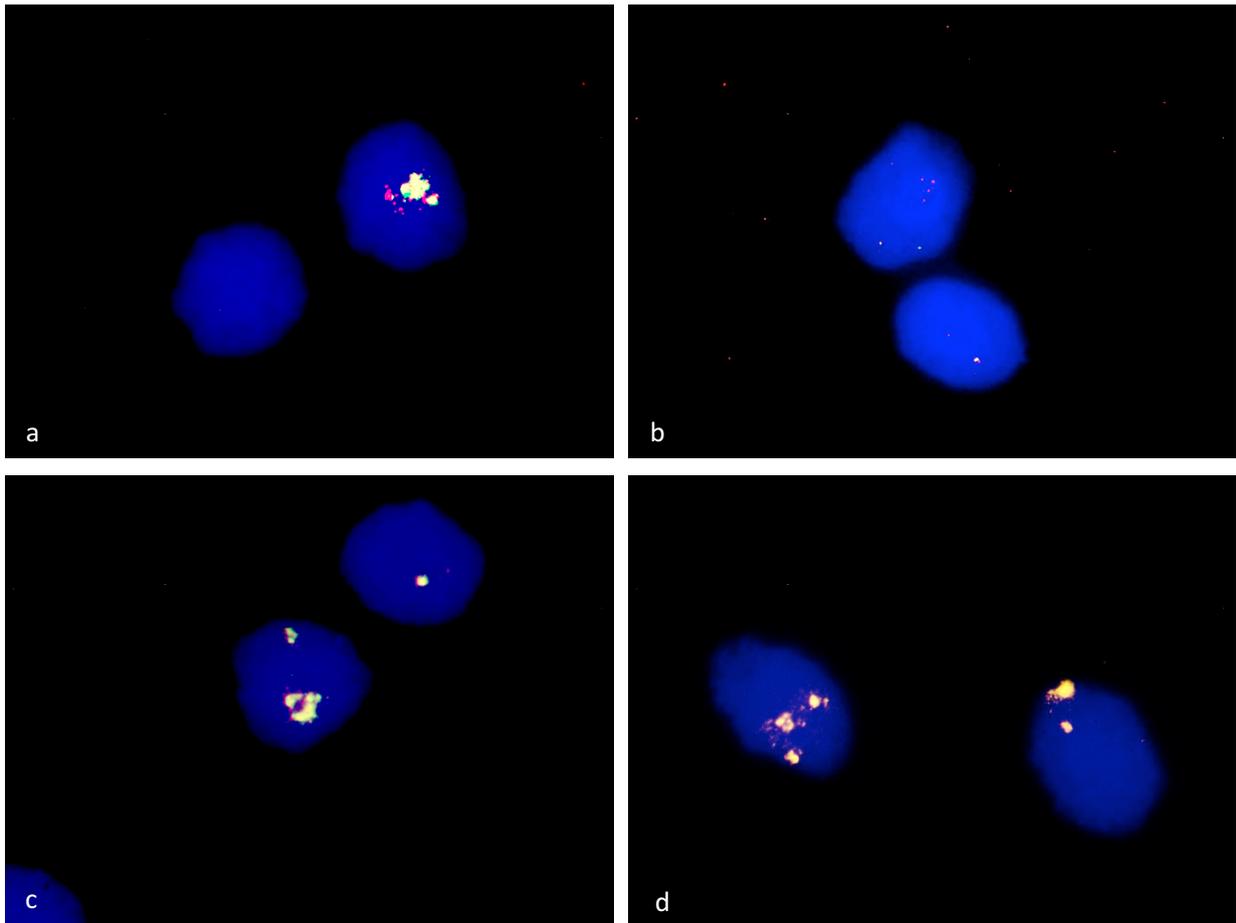


Abbildung 33: Hybridisierung der BAC-Sonde 571M6 und der BAC-Sonde 661O2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden (siehe a und b) und die 7 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden (siehe c und d): BAC-Sonde 571M6 alexa 488 (grün) und BAC-Sonde 611O2 alexa 594 (rot), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Die Bilder a und b zeigen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden. Beide BAC-Sonden detektieren starke Amplifikationen in einem Teil der Zellkerne. Die Bilder c und d zeigen eine FISH mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden. Man sieht, dass die Amplifikationen in ihrer Anzahl zugenommen haben.

Beide BAC-Sonden detektierten ähnlich stark ausgeprägte Amplifikationen in humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tagen in Richtung Adipozyten differenziert wurden. Allerdings wiesen im Vergleich zu den Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden, deutlich mehr Zellkerne Amplifikationen auf (siehe Abbildung 33 c und d).

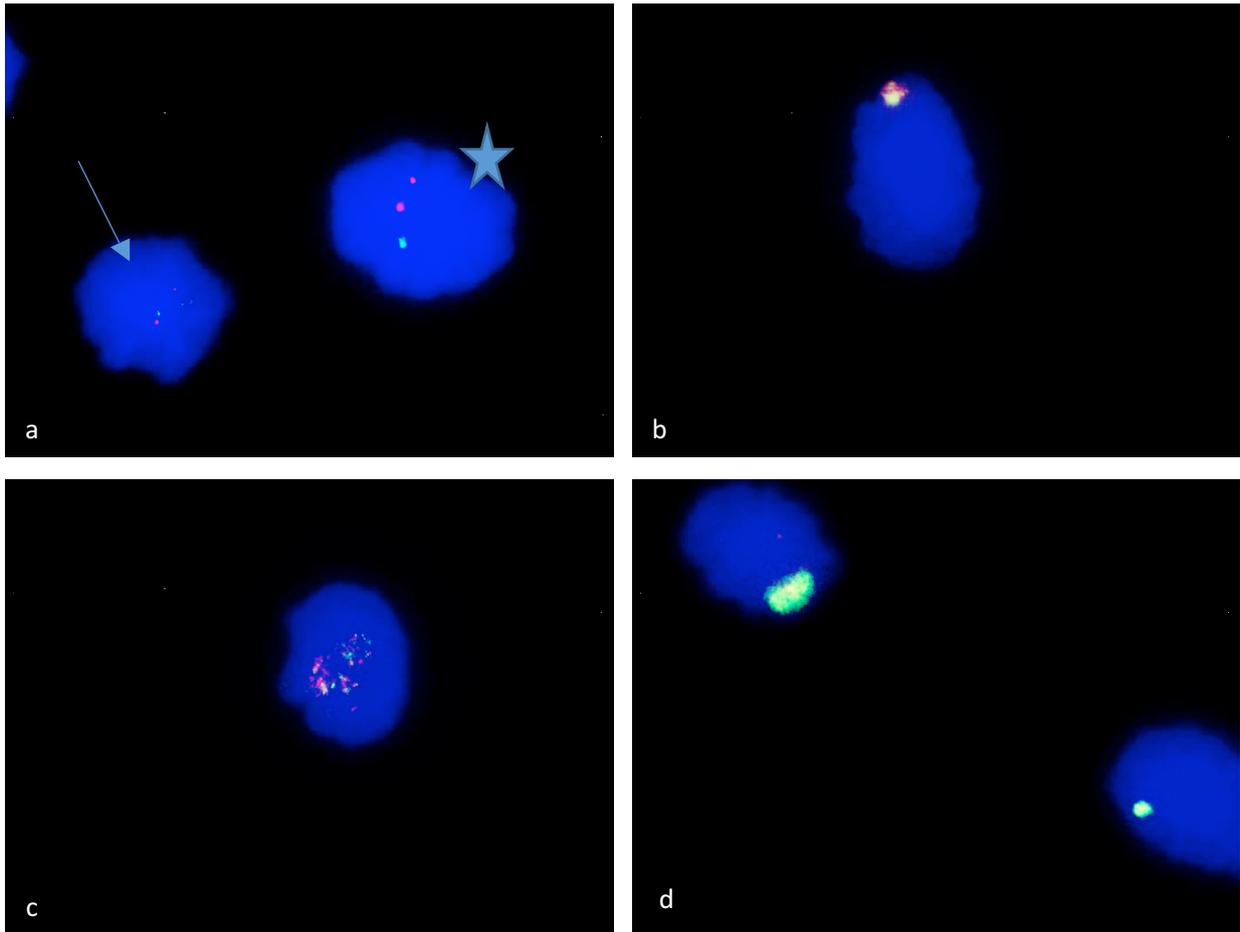


Abbildung 34: Hybridisierung der BAC-Sonde 571M6 und der BAC-Sonde 661O2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 4 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden: BAC-Sonde 571M6 alexa 488 (grün) und BAC-Sonde 611O2 alexa 594 (rot), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Alle vier Bilder zeigen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 4 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden. Beide BAC-Sonden detektieren Verschiedenes: normale Zellkerne (Pfeil), Zellkerne mit beginnenden Amplifikationen (Stern) und Zellkerne mit starken Amplifikationen.

Da gesehen werden konnte, dass die mit den entsprechenden BAC-Sonden hybridisierende DNA in humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden, zum Teil stark amplifiziert vorlag, war nun interessant herauszufinden, ob sich einen Tag später, nach Zugabe des Maintencemediums hinsichtlich der Amplifikationen eine Veränderung zeigen würde. Es waren verhältnismäßig ähnlich viele Zellkerne zu sehen, die Amplifikationen aufwiesen. Es konnten Zellen, die keine Amplifikationen aufwiesen (siehe Abbildung 34 a), Zellen mit beginnenden Amplifikationen (siehe Abbildung 34 b) bis hin zu Zellen mit starken Amplifikationen (Abbildung c und d) detektiert werden.

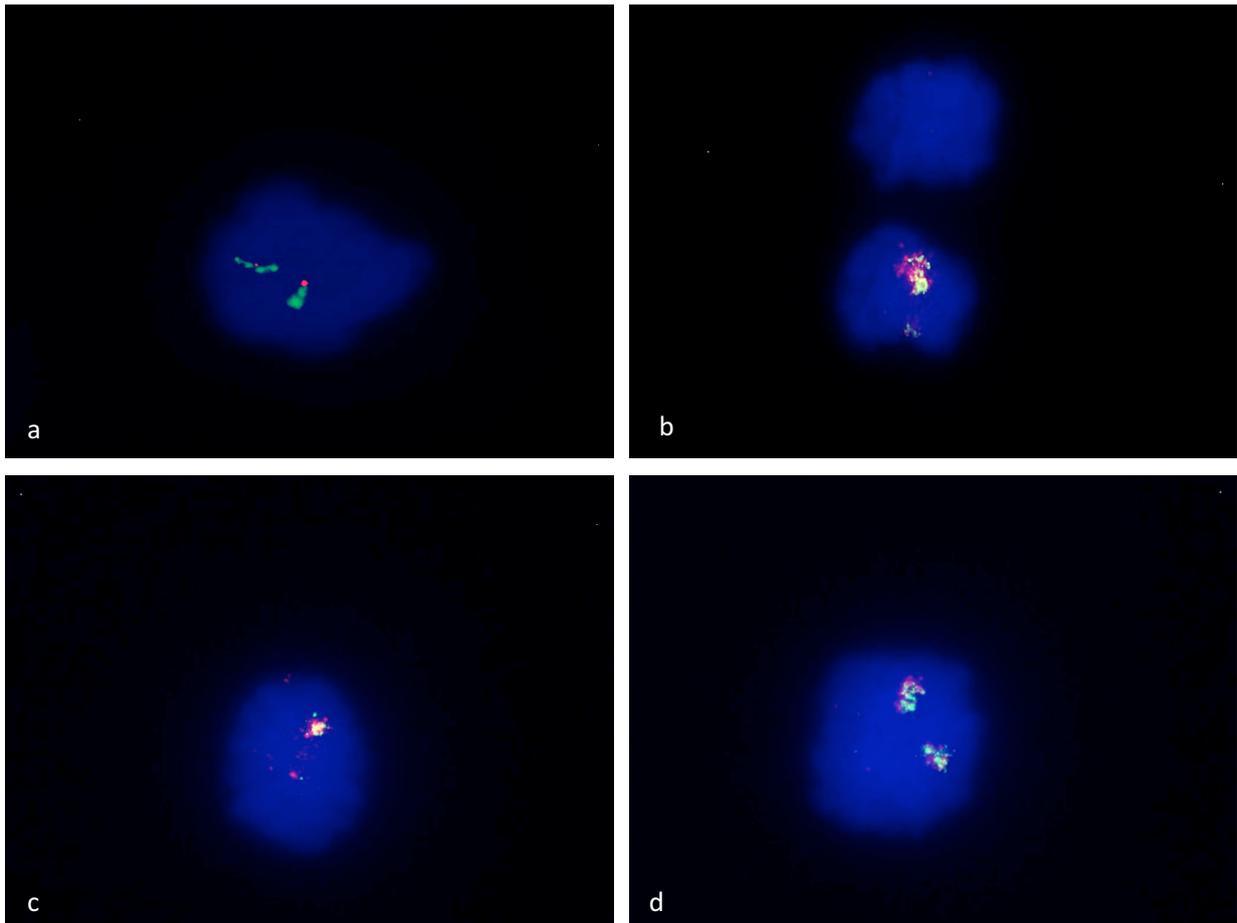


Abbildung 35: Hybridisierung der BAC-Sonde 571M6 und der BAC-Sonde 661O2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden: BAC-Sonde 571M6 alexa 488 (grün) und BAC-Sonde 611O2 alexa 594 (rot), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Zu sehen sind Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Beide BAC-Sonden detektieren starke Amplifikationen in einem Teil der Zellkerne.

Da bekannt ist, dass das Gen für CDK4 und MDM2 nicht nur in Liposarkomen, sondern auch in Osteosarkomen amplifiziert vorliegt, wurden die BAC-Sonden 571M6 und 611O2 auch an humanen mesenchymalen Stammzellen getestet, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden.

Man konnte sehen, dass beide BAC-Sonden stark amplifizierte DNA-Regionen detektieren konnten (siehe Abbildung 35 a, b, c, d).

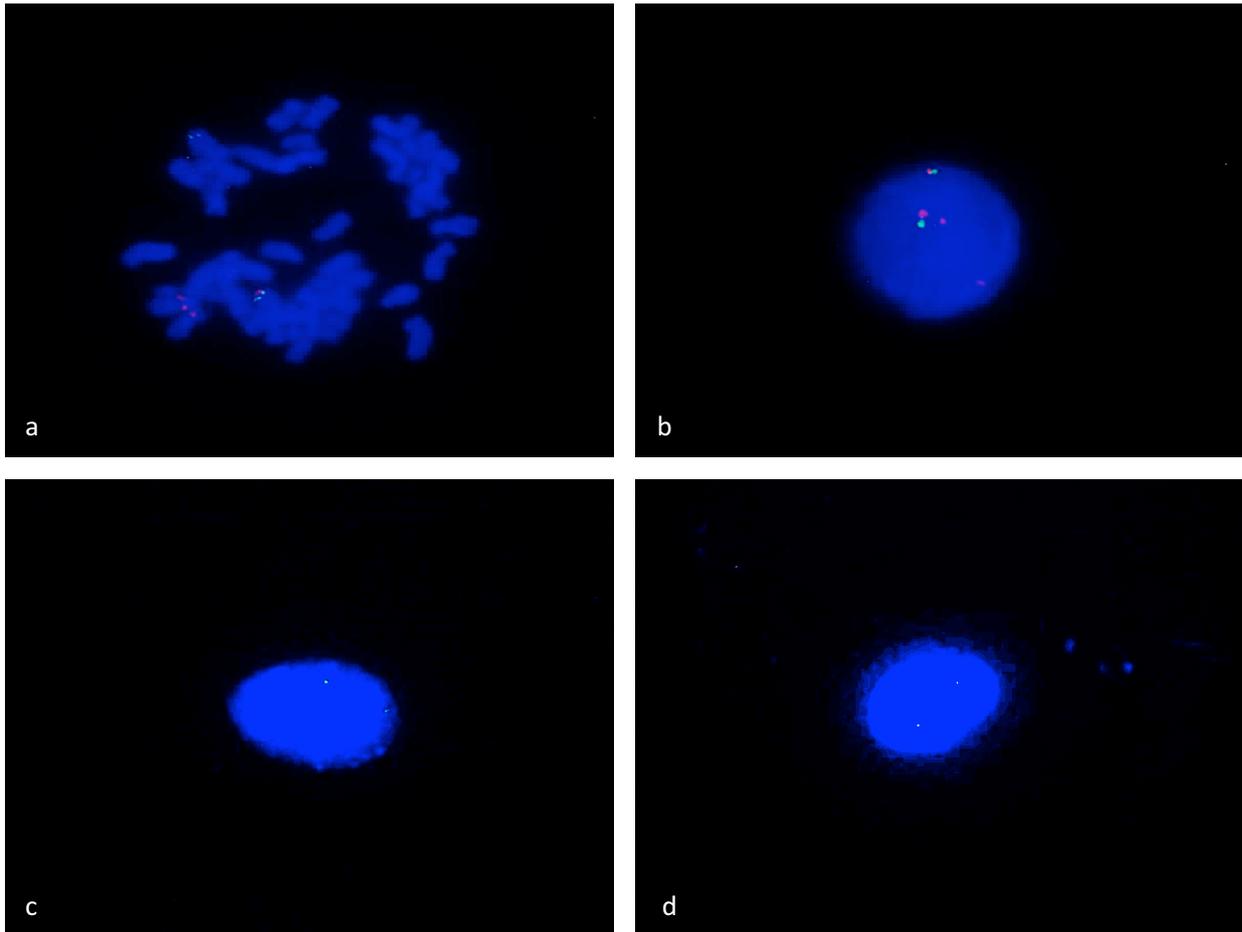


Abbildung 36: Hybridisierung der BAC-Sonde 47G1 mit Metaphasechromosomen eines Lymphozyten und einem Interphasekern eines Lymphozyten, sowie Hybridisierung dieser BAC-Sonde mit undifferenzierten hMSC: Zwei BAC-Sonden wurden verwendet: BAC-Sonde 47G1 alexa 488 (grün) und BAC-Sonde 114B6 alexa 594 (rot), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Das Bild a zeigt eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf Metaphasechromosomen eines Lymphozyten, das Bild b zeigt eine FISH auf einem Interphasekern eines Lymphozyten, die Bilder c und d zeigen eine FISH mit undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen. BAC-Sonde 47G1 ist in den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen nicht amplifiziert.

Die BAC-Sonden 47G1 und 114B6 hybridisieren jeweils mit einer Region auf Chromosom 7.



Abbildung 37: Lokalisation der BAC-Sonde 47G1

Die BAC-Sonde 47G1 wurde so markiert, dass sie eine grüne Farbe emittiert und die BAC-Sonde 114B6 wurde so markiert, dass sie eine rote Farbe emittiert. Die mit der BAC-Sonde 47G1 hybridisierende DNA kodiert für ein Membranprotein und für ein Protein, dessen Funktion noch nicht bekannt ist. In der Array-CGH von humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnten Amplifikationen in der chromosomalen Region gesehen werden, die mit der BAC-Sonde

47G1 hybridisiert. Auf den Metaphasechromosomen eines Lymphozyten (siehe Abbildung 36 a) sieht man nur für die BAC-Sonde 47G1 zwei Signale pro Chromosom, was die normale Kopiezahl der entsprechenden Chromosomenregion darstellt. Was die BAC-Sonde 114B6 angeht, sieht man zwar zwei Signale auf einem Chromosom und dies auch in der Nähe der BAC-Sonde 47G1, aber auf dem zweiten Chromosom sind keine Signale zu detektieren. Drei Signale binden am Rande eines Chromosoms, was für eine unspezifische Bindung spricht. Aus diesem Grunde führen wir nur mit der BAC-Sonde 47G1 fort. In dem Interphasekern des Lymphozyten (siehe Abbildung 36 b) sind zwei grüne, aber mehr als vier rote Signale zu sehen, was ebenfalls ein Indiz für eine unspezifische Bindung der BAC-Sonde ist. Die humanen mesenchymalen Stammzellen weisen keine Amplifikationen für die BAC-Sonde 47G1 auf, was daran zu sehen ist, dass sowohl die Anzahl an grünen Signalen, als auch die Fluoreszenzpunktgröße im Vergleich zu den Signalen des Interphasekerns übereinstimmen (siehe Abbildung 36 c und d) .

Anschließend wurde die BAC-Sonde 47G1 an humanen mesenchymalen Stammzellen getestet, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Man konnte viele Zellkerne mit einer normalen Anzahl an Signalen und einer normalen Signalgröße sehen (siehe Abbildung 38 b). Wurden mehrere Zellkerne neben einander betrachtet (siehe Abbildung 38 a), fiel jedoch auf, dass es leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Zellkernen hinsichtlich der Signalgröße gab.

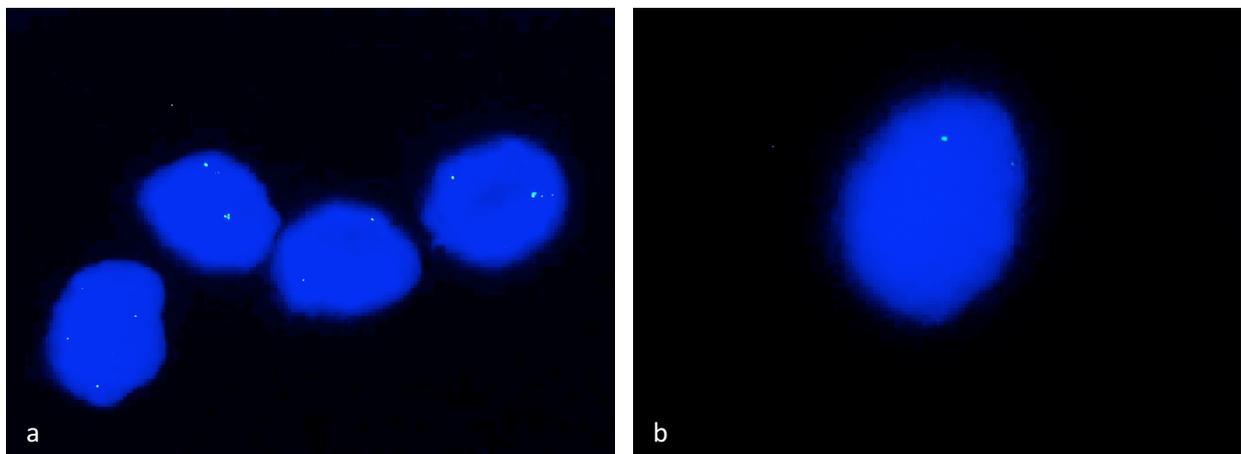


Abbildung 38: Hybridisierung der BAC-Sonde 47G1 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden: BAC-Sonde 47G1 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Man sieht Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Die BAC-Sonde detektiert in einem kleinen Teil der Zellkerne beginnende Amplifikationen (Bild a).

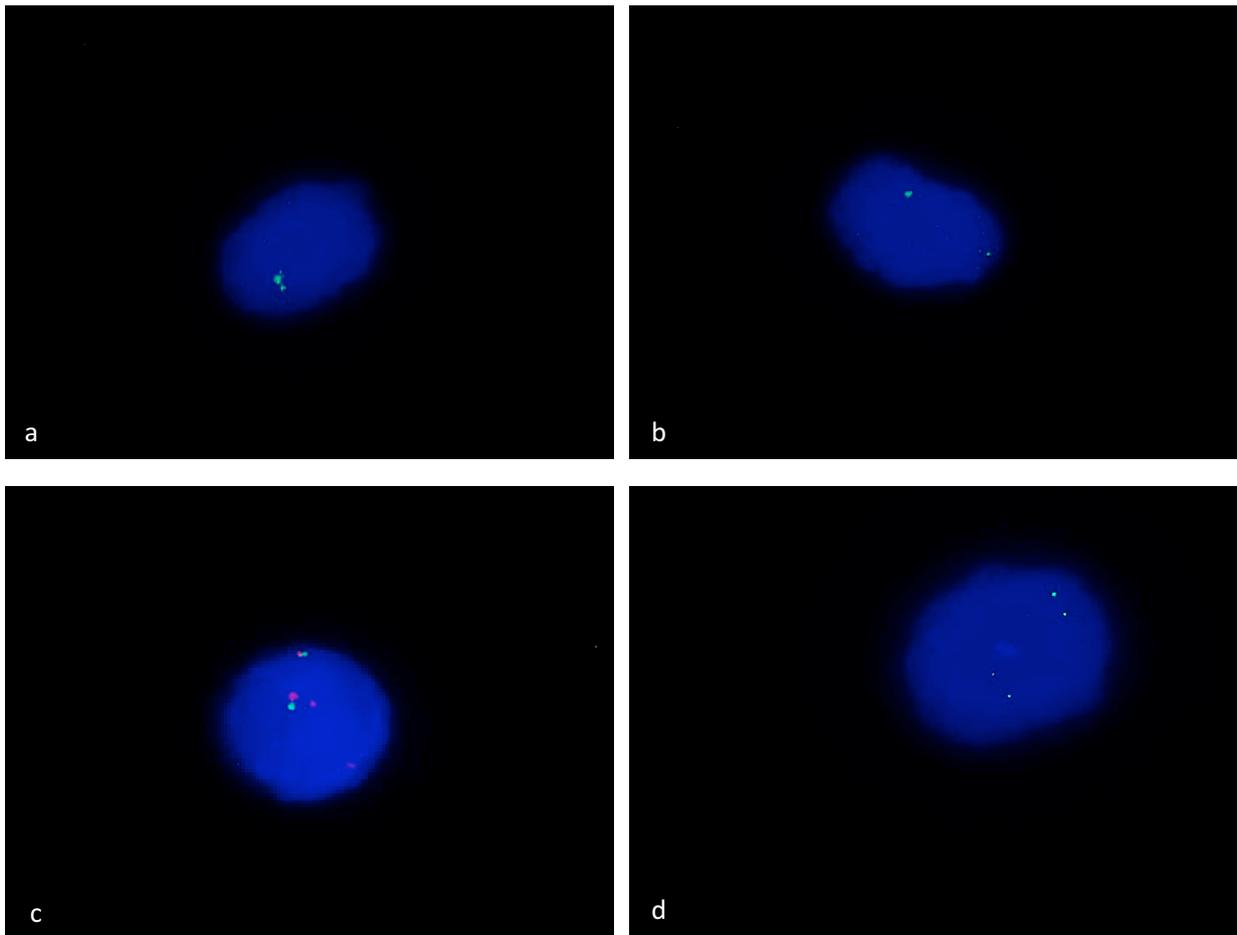


Abbildung 39: Hybridisierung der BAC-Sonde 47G1 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden: BAC-Sonde 47G1 alexa 488 (grün), Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) – Die Bilder a, b und d zeigen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage (3 Tage im 2.Zyklus) in Richtung Adipozyten differenziert wurden. In allen gesichteten Zellkernen waren entweder 2 oder 4 Signale zu detektieren, was die normale Kopiezahl der Chromosomenregion darstellt.

Die BAC-Sonde 47G1 wurde auch an adipogenen Stammzellen getestet (siehe Abbildung 39 a, b, d). Die Signale entsprachen sowohl in Anzahl, als auch in Größe den Signalen des Referenzkernes des Lymphozyten (siehe Abbildung 39 c). Es konnten also keine Amplifikationen detektiert werden, womit die Aussage der Array-CGH bestätigt ist, da in der Array-CGH nur Amplifikationen in osteogen differenzierten Stammzellen nachgewiesen werden konnten.

In der nachfolgenden Tabelle (siehe Tabelle 5) sind alle BAC-Sonden zusammengefasst mit der jeweiligen Chromosomenlokalisierung und den darin lokalisierten Genen.

Tabelle 5: Gene

Chromosom	BAC-Sonde	Gene
15	81J11	<i>GOLGA8B</i>
22	297B9	<i>DERL3, MIF, GSTT2, DDT, GSTT1/2, GSTTP1/2, CABIN1, LOC 391322, SPECC1L, GGT5, SUSD2</i>
16	53C21	<i>AK300387, X69637</i>
16	118F19	<i>GSE1, GINS2</i>
3	728G2	<i>BDH1</i>
7	47G1	<i>CTAGE15, FAM115C</i>
4	1142B4	<i>ZNF141, ZNF721, ABCA11P</i>
4	162F20	<i>UGT2B28</i>
12	571M6	<i>DTX3, ARHGEF 25, SLC26A 10, B4GALNT1, OS9, AGAP2, TSPAN31, CDK4, MARCH9, CYP27B1, METTL21B, METTL1, AVIL, TSFM, CTDSP2</i>
12	611O2	<i>MDM2, CPM</i>

4.3. Beschreibung der PCR-Ergebnisse

Für die PCR-Analyse wurden 5 verschiedene Gene verwendet. Zum einen wurden Gene verwendet, die direkt durch BAC-Sonden detektiert werden konnten wie zum Beispiel die Gene *CDK4*, *MDM2* und *BDH1*. Zum anderen wurden Gene verwendet, die nicht direkt von einer BAC-Sonde detektiert wurden, sondern die sich in chromosomaler Nähe zu DNA-Regionen befanden, die mit verwendeten BAC-Sonden hybridisieren, wie zum Beispiel die Gene *TP53TG3B* und *PRSS1*.

Tabelle 6: Gene, die für die qPCR verwendet wurden

Gen	Detektiert durch BAC-Sonde	Taq-Man-Nummer
<i>CDK4</i>	detektiert durch BAC-Sonde 571M6	Hs00957586_cn
<i>MDM2</i>	detektiert durch BAC-Sonde 611O2	Hs00181272_cn
<i>BDH1</i>	detektiert durch BAC-Sonde 728G2	Hs00871544_cn
<i>TP53TG3B</i>	wurde von keiner BAC-Sonde detektiert, befindet sich jedoch auf Chromosom 16 und befindet sich in chromosomaler Nähe zur BAC-Sonde 53C21	Hs04463315_cn
<i>PRSS1</i>	wurde von keiner BAC-Sonde detektiert, befindet sich jedoch auf Chromosom 7 und befindet sich in chromosomaler Nähe zur BAC-Sonde 47G1	Hs03192321_cn



Abbildung 40: Lokalisation des Genes *TP53TG3B*



Abbildung 41: Lokalisation der BAC-Sonde 53C21



Abbildung 42: Lokalisation des Genes *PRSS1*



Abbildung 43: Lokalisation der BAC-Sonde 47G1

4.3.1. Beschreibung der PCR-Ergebnisse der adipogenen Reihe

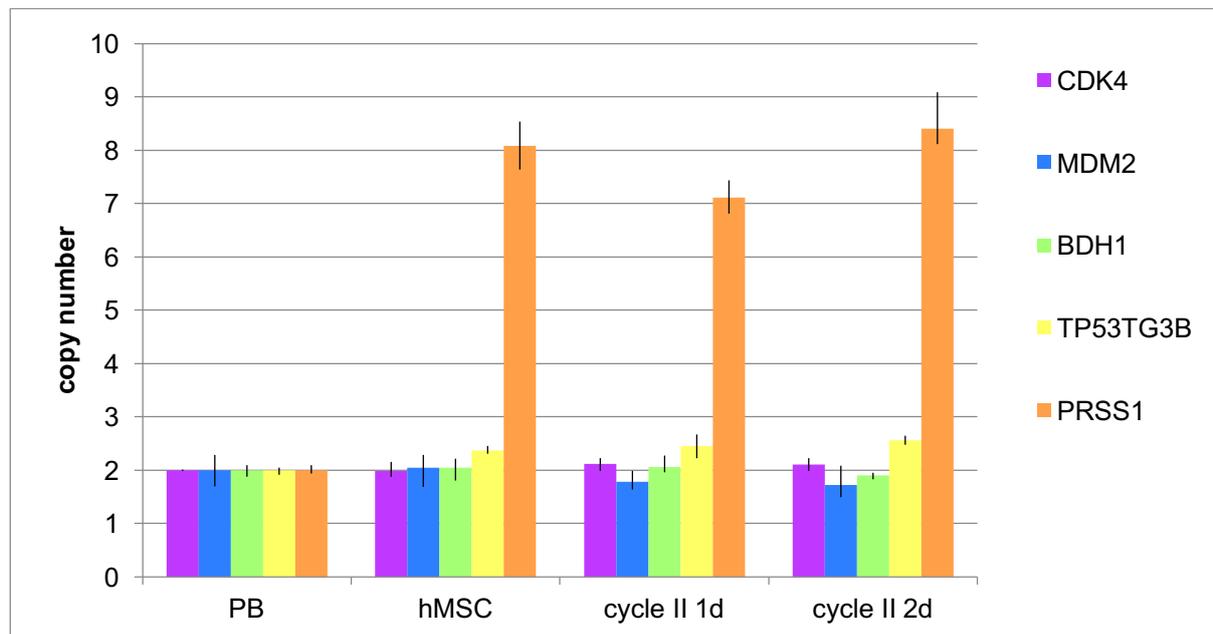


Abbildung 44: qPCR der adipogenen Reihe

Als Referenz dienten Lymphozyten einer gesunden Testperson (peripheral blood= PB). In der PCR wiesen alle 5 Gene in den Lymphozyten der gesunden Testperson eine normale Kopiezahl auf. In den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen, in den humanen mesenchymalen Stammzellen, die 5 Tage (=cycle II 1d) und 6 Tage (=cycle II 2d) in Richtung Adipozyten differenziert wurden, konnte eine starke Zunahme der Kopiezahl des Genes *PRSS1* nachgewiesen werden.

Auch das Gen *TP53TG3B* weist im Vergleich zu den Referenzzellen eine Zunahme der Kopiezahl auf. Das Gen *TP53TG3B* liegt sowohl in den undifferenzierten Stammzellen, als auch in den Stammzellen, die in Richtung Adipozyten differenziert wurden, in amplifizierter Form vor.

Im Vergleich zu den Referenzzellen liegt das Gen *BDH1* nach 6 Tagen adipogener Differenzierung in geringerer Kopiezahl vor. In diesem Falle könnte von einer unterreplizierten Region gesprochen werden.

Das Gen *MDM2* liegt in den undifferenzierten Stammzellen in normaler Kopiezahl vor. In den Stammzellen, die in Richtung Adipozyten differenziert wurden, liegt es jedoch in unterreplizierter Form vor.

Das Gen *CDK4* lag zwar in den undifferenzierten Stammzellen in normaler Kopiezahl vor. Jedoch lag es in den in Richtung Adipozyten differenzierten Stammzellen in leicht erhöhter Kopiezahl vor, sodass von einer leichten Amplifikation gesprochen werden kann.

4.3.2. Beschreibung der PCR-Ergebnisse der osteogenen Reihe

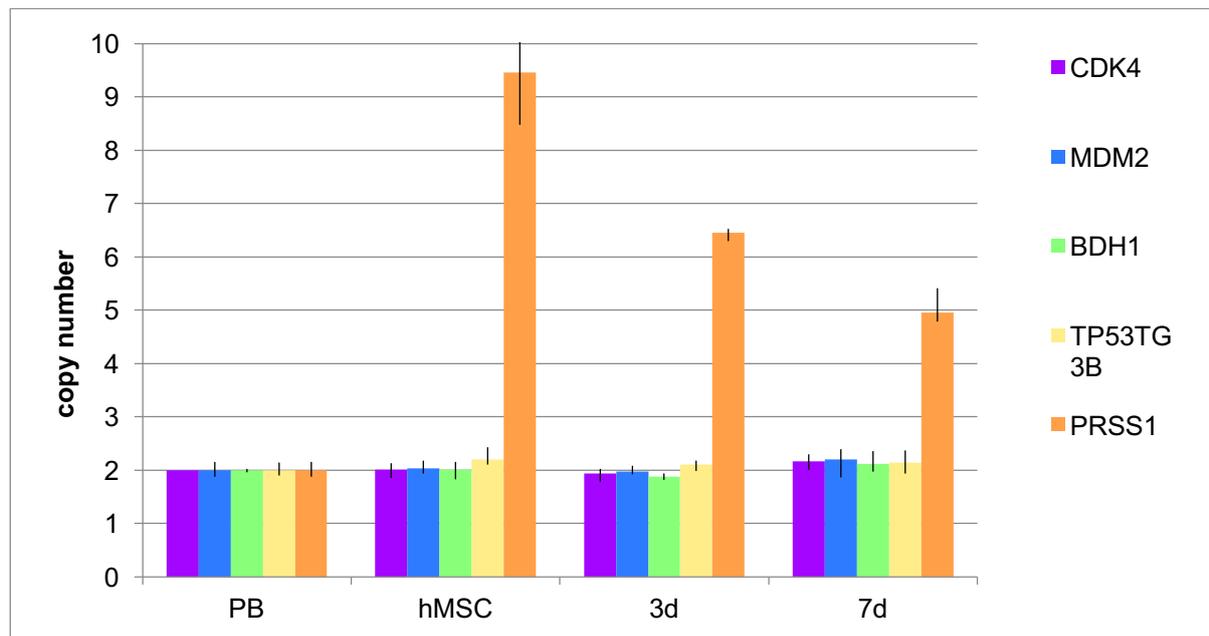


Abbildung 45: qPCR der osteogenen Reihe

Als Referenz dienten wieder Lymphozyten einer gesunden Testperson (peripheral blood= PB). In der PCR wiesen alle 5 Gene in den Lymphozyten der gesunden Testperson eine normale Kopiezahl auf. Im Vergleich zu den Referenzzellen konnte auch hier in den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen und in den humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage und 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, eine hohe Anzahl an Kopien des Genes *PRSS1* nachgewiesen werden. Allerdings sinkt die Kopiezahl von über 9 bei den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen auf unter 5 bei den Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Das bedeutet, dass die Amplifikationen in immer geringerem Ausmaß vorhanden sind, je länger die Stammzellen in Richtung Osteozyten differenziert werden.

Das Gen *TP53TG3B* liegt sowohl in den undifferenzierten, als auch in den 3 und 7 Tage lang differenzierten Stammzellen in leicht amplifizierter Form vor.

Das Gen *BDH1* weist keine starken Kopiezahlveränderungen auf. Nach 3 Tagen osteogener Differenzierung konnte durch die PCR eine geringe Unterreplikation nachgewiesen werden. Nach 7 Tagen Differenzierung in Richtung Osteozyten, konnten in den Stammzellen ein leichter Kopiezahlanstieg gesehen werden, sodass von einer leichten Amplifikation gesprochen werden kann.

Das Gen *MDM2* lag sowohl in den undifferenzierten Stammzellen, als auch in den 3 Tage in Richtung Osteozyten differenzierten Stammzellen in normaler Kopiezahl vor. In den

humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnte die PCR eine leichte Amplifikation für das Gen *MDM2* nachweisen.

Auch das Gen *CDK4* verhält sich ähnlich: Sowohl in den undifferenzierten, als auch in den Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, liegt das Gen in normaler Kopiezahl vor. In den Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, lag das Gen *CDK4* leicht amplifiziert vor.

5. Diskussion

5.1. Übersicht über die Ergebnisse

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Array-CGH-Analysen. Mittels FISH sollten diese Ergebnisse bestätigt werden. Allerdings zeigten sich für einige chromosomale Regionen Abweichungen von den Array-CGH-Ergebnissen. Die Ergebnisse der FISH der 6 Chromosomenregionen, die durch die BAC-Sonden 53C21, 297B9, 81J11, 162F20, 728G2 und 47G1 (auf Stammzellen, die in Richtung Adipozyten differenziert wurden) repräsentiert wurden, konnten die Ergebnisse der Array-CGH bestätigen. Zwei BAC-Sonden, 571M6 und 611O2, konnten sowohl in Stammzellen, die in Richtung Adipozyten differenziert wurden, als auch in Stammzellen, die in Richtung Osteozyten differenziert wurden, starke Amplifikationen nachweisen, die man in der Array-CGH nicht gesehen hatte. Für die BAC-Sonde 47G1 in Stammzellen, die in Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnte keine eindeutige Aussage bezüglich der Übereinstimmung von Array-CGH und FISH getroffen werden, weil in der Array-CGH Amplifikationen nach 7 Tagen osteogener Differenzierung nachgewiesen werden konnten. Allerdings wurden mittels FISH nur Stammzellen analysiert, die 3 Tage lang in Richtung Osteozyten differenziert wurden (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht

Chr.	BAC	Amplifizierte Region nach Array-CGH Start	Amplifizierte Region nach Array-CGH Ende	Amplifikationen, die in der Array-CGH nachgewiesen wurden	Amplifikationen, die in der FISH nachgewiesen wurden	Amplifikationen, die in der qPCR nachgewiesen werden konnten
15	81J11	34.727.647	34.806.953	osteogen 3d, 7d	osteogen 3d, 7d	Wurde nicht untersucht
22	297B9	24.337.608	24.408.525	hMSC	hMSC, DNA-Fragmentation bei osteogen 7d	Wurde nicht untersucht
16	53C21	32.573.808	33.630.726	hMSC	hMSC, osteogen 3d	Gen <i>TP53TG3B</i> -Es konnten Amplifikationen in den adipogen differenzierten Stammzellen nachgewiesen werden.
16	118F19	Wurde nicht untersucht	Wurde nicht untersucht	Wurde nicht untersucht	osteogen 3d	Wurde nicht untersucht
3	728G2	197.038.043	197.485.688	osteogen 3d, 7d	osteogen 3d, 7d	Gen <i>BDHI</i> -Es konnten keine Amplifikationen nachgewiesen werden.
7	47G1	143.203.385	143.519.863	osteogen 7d	osteogen 3d	Gen <i>PRSS1</i> - Es konnten starke Amplifikationen in undifferenzierten, adipogenen und osteogenen Stammzellen nachgewiesen werden.
4	1142B4	302.397	449.774	osteogen 3d, 7d	DNA-Fragmentation bei osteogen 3d	Wurde nicht untersucht
4	162F20	70.096.386	70.259.782	osteogen 3d	osteogen 3d	Wurde nicht untersucht
12	571M6	-	-	Es konnten keine Amplifikationen detektiert werden.	adipogen 3d, adipogen 4d, adipogen 7d, osteogen 7d	Gen <i>CDK4</i> -Es konnten leichte Amplifikationen in 7 d in Richtung Osteozyten diff. Stammzellen und in 7 d in Richtung Adipozyten diff. Stammzellen nachgewiesen werden.
12	611O2	-	-	Es konnten keine Amplifikationen detektiert werden.	adipogen 3d, adipogen 4d, adipogen 7d, osteogen 7d	Gen <i>MDM2</i> -Es konnten leichte Amplifikationen in 7d in Richtung Osteozyten diff. Stammzellen nachgewiesen werden.

5.2. Diskussion der Unterreplikation

Verschiedene Studien und die Experimente dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Chromosomenregionen während der Differenzierung in einer geringeren Kopiezahl vorliegen können. Beispielsweise beschreiben Hannibal et al. [27] das Auftreten von sogenannten URs (underrepresented regions). Ähnliche Ergebnisse und daraus resultierende Schlussfolgerungen wurden von Sher und Nordman 2012 [28] beschrieben, bei denen ebenfalls bestimmte chromosomale Regionen in geringerer Kopiezahl vorliegen. Dieser Zustand, in dem die entsprechende Zelle eine verhältnismäßig geringere Kopiezahl einer Chromosomenregion im Vergleich zu den daneben liegenden amplifizierten Regionen aufweist, wird als Unterreplikation bezeichnet. Hannibal et al.[29] konnten in ihren Array-CGH Experimenten und in ihren NLog2 Ratio-Plots der Chromosomen 6 und 13 unterreplizierte chromosomale Regionen nachweisen. Es handelt sich also nicht um eine Deletion, dem Verlust eines DNA-Abschnittes, sondern um eine verhältnismäßige Reduktion der Kopiezahl eines Genes. Allerdings sind die Begriffe der Unterreplikation und Deletion oft schwer zu trennen wie Yarosh und Spradling in ihrem 2014 veröffentlichten Paper zeigten:

" Jede unterreplizierte euchromatische Region beinhaltet viele verschiedene Deletionen von 10–500 kb-Größe, während sehr wenige Deletionen in vollständig replizierten Chromosomenregionen oder unterreplizierten Regionen von embryonaler DNA vorhanden sind."

Es können mehrere Gründe für eine Unterreplikation diskutiert werden: Erstens könnte die Replikationszeit eine Rolle spielen. Dies zeigen Hannibal et al. in ihrem schon oben erwähnten Paper von 2016[29]. Sie konnten eine starke Korrelation zwischen der Formation von unterreplizierten Regionen und einer Teilmenge von spät replizierten Regionen feststellen. Zweitens gibt es auf Proteinebene Mechanismen, die eine Unterreplikation herbei führen: Das Binden des origin recognition complex (ORC) ist in unterreplizierten Regionen reduziert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass verminderte Initiation ein Mechanismus ist, der zu Unterreplikation führt [28]. Ein weiterer Einflussfaktor auf molekularer Ebene stellt das Protein SUUR (Suppressor of Under-Replication) in Drosophila dar. [30] SUUR bewirkt eine Inhibition der Progression der Replikationagabel, was auch zu einer verminderten Replikation und somit zu einer verminderten Genkopiezahl führt. Es bleibt abzuwarten, ob sich ein Protein mit ähnlicher Funktion in Säugern nachweisen lässt.

Eine weitere mögliche Ursache für eine Reduktion der Kopiezahl eines Genes könnten scaffold or matrix-attachment regions (S/MARs) sein. Es handelt sich um Kerngerüst-/Kernmatrixanheftungsregionen von DNA-Sequenzen von eukaryotischen Chromosomen, die sich an die Kernmatrix anheften. Man weiß, dass diese Kerngerüstanheftungsregionen in der Organisation von eukaryotischen Chromosomen und in der Regulation von mehreren

DNA-Funktionen eine wichtige Rolle spielen [31]. Es gibt aktive und inaktive S/MARs. Wilson et al. vermuten, dass der Initiationsschritt des DNA-Replikationsprozesses durch Kernmatrixaufhängungen verhindert wird[32].

In der FISH konnten Unterreplikationen nachgewiesen werden: Die Array-CGH gab an (siehe Tabelle 7), dass in humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, die DNA-Bereiche, die mit der BAC-Sonde 53C21 hybridisieren, unterrepliziert waren. Wie oben beschrieben detektierte diese BAC-Sonde in der FISH zu einem geringen Prozentsatz Unterreplikationen (siehe Abbildung 18a und 18b). Das PCR-Ergebnis konnte das Ergebnis der Array-CGH und der FISH bestätigen: Das Gen *TP53TG3B* liegt in der qPCR in den undifferenzierten Stammzellen in leicht amplifizierter Form vor. In den humanen mesenchymalen Stammzellen, die 3 Tage lang in Richtung Osteozyten differenziert wurden, konnte die qPCR nur noch eine geringere Amplifikation nachweisen, die durch eine Unterreplikation in Zellen verursacht sein könnte. Da sowohl Amplifikationen als auch Unterreplikationen nur in einem Teil der Zellpopulation auftreten, kommt es zu Verdünnungseffekten der absoluten Werte in der qPCR. Das Gen *TP53TG3B* befindet sich in chromosomaler Nähe zu der DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 53C21 hybridisiert (siehe Abbildung 40 und 41), was bedeutet, dass die amplifizierte chromosomale Region größer ist als die chromosomalen Region, die durch die BAC-Sonde 53C21 repräsentiert wird.

In früheren Experimenten mit embryonalen Mauszellen während der Differenzierung konnten ebenfalls sowohl amplifizierte Regionen, als auch unterreplizierte Regionen in enger chromosomaler Nähe mittels Array-CGH nachgewiesen werden [13]. Mittels qPCR konnten in differenzierenden Mausmyoblasten unterreplizierte chromosomale Regionen für das Gen *ACTA1* nachgewiesen werden, bei gleichzeitiger Amplifikation des *NUP133* Gens, das sich in direkter Nachbarschaft von *ACTA1* befindet [14]. Fischer et al. konnten 2015 [13] mit Hilfe von FISH zeigen, dass die Hybridisierung eines Gens namens TRHDE in 3 Tage lang in Richtung Neuronen induzierten Stammzellen eine verminderte Fluoreszenzsignalstärke aufwies, was bedeutet, dass es während der Differenzierung zu einer Reduktion der Kopiezahl des Gens kam.

In den Experimenten dieser Arbeit konnte eine Koexistenz von amplifizierten chromosomalen Regionen wie z.B. die DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 118F19 hybridisiert und unterreplizierten chromosomalen Regionen wie z.B. die DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 53C21 hybridisiert, in menschlichen mesenchymalen Zellen während der Differenzierung gezeigt werden.

5.3. *Diskussion der Hypothese der DNA-Fragmentation*

In Abbildung 22 a, b, d wird gezeigt, dass die BAC-Sonde 297B9 an viele kleine DNA-Fragmente bindet. Zwei oder vier größere Signale, die vergleichbar mit den Signalen des Interphasekernes des Lymphozyten wären, sind nicht zu sehen. Dies könnte bedeuten, dass die entsprechenden Genloci nicht mehr in der Form vorliegen, wie sie bei den Lymphozyten vorlagen oder wie sie bei den nicht differenzierten Stammzellen mit ihren Amplifikationen vorlagen. Eine Hypothese, die dieses Phänomen erklären könnte, könnte folgende sein: Eine DNA-Fragmentierung der Amplifikationen würde zu einer kurzfristigen Elimination der Amplifikationen führen. Dies könnte dazu führen, dass die Zelle von ihrem amplifizierten Zustand wieder zurück in ihren Ausgangszustand oder möglicherweise in einen unterreplizierten Zustand gelangt. Es wäre denkbar, dass das entsprechende DNA-Material aufbewahrt wird bis zu einem Zeitpunkt, in dem die Zelle die entsprechenden Proteine erneut in größeren Mengen exprimiert.

Genauso verhielt es sich mit den BAC-Sonden 1142B4 und 162F20. Auch hier waren die dispersen Signale reproduzierbar. Auf der Abbildung 26 b ist ein mit Pfeil markiertes Signal zu sehen, welches von der Signalgröße einem Signal des Referenzkernes des Lymphozyten entspricht. Allerdings konnten nur selten Signale in dieser Signalgröße detektiert werden. Die meisten dunkel-orangefarbenen Signale entsprachen den kleinen diffusen Signalen wie man sie in dem oberen Zellkern auf Abbildung 26 a und in dem oberen Zellkern auf Abbildung 26 b sehen kann. Da in den mesenchymalen Stammzellen, die drei Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, in der Array-CGH Amplifikationen für die Genloci beider BAC-Sonden, sowohl der BAC-Sonde 1142B4, als auch der BAC-Sonde 162F20 nachgewiesen werden konnten, stellt sich die Frage, ob die Amplifikationen zwar noch vorhanden sind, jedoch nicht mehr nachweisbar sind. Die Erklärung könnte die Fragmentation der Ziel-DNA sein. DNA-Fragmentation ist bereits in verschiedenen Kontexten beschrieben worden: Es ist bekannt, dass nukleäre DNA in nukleosomale Einheiten degradiert wird, wenn die Zelle den Zelltod erleidet [33]. Diese DNA-Fragmentierung wird durch apoptotische Stimuli in Gang gesetzt [34]. Wichtig für den Vorgang der DNA-Fragmentierung ist das Enzym Caspase-aktivierte-DNase (CAD). Allerdings findet man in der Literatur DNA-Fragmentationen auch im Zusammenhang mit Spermien [35]. In einem 2015 erschienenen Paper werden von Muratori und Tamburrino verschiedene Ursachen der DNA-Fragmentation in Spermien diskutiert. Sie untersuchten DNA-Fragmentation in Spermien mit Augenmerk auf Apoptose, oxidativen Stress und „sperm immaturity“. Die Ergebnisse zeigten, dass apoptotische Prozesse sowohl durch eine Schädigung der Chromatinreifung, als auch durch oxidativen Stress in Gang gesetzt werden. Dass DNA-Fragmentation von verschiedensten äußeren Faktoren abhängig ist, konnte ein

weiteres Paper bestätigen: 2014 beschrieben Wdowiak *et al.* [36] einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhter DNA-Fragmentation und extrem hohen und extrem niedrigen LH- und FSH-Werten. Ein weiteres Beispiel für DNA-Fragmentation ist die DNA-Pulverisation: Crasta *et al.* [37] beschrieben 2012 einen Zusammenhang zwischen DNA-Strangbrüchen und chromosomaler Pulverisation durch Fehler in der Mitose. Sie vermuteten, dass die Pulverisation von Chromosomen in Mikronuklei stattfinden könnte. Des Weiteren wird die Hypothese aufgestellt, dass DNA-Pulverisation eine Erklärung für das Phänomen der Chromothripsis sein könnte. Unter Chromothripsis versteht man eine Umlagerungen von Chromosomenabschnitten. Chromothripsis könnte eine Ursache für die Entstehung von Krebs sein[38].

Der Prozess der DNA-Fragmentation ist höchst unzureichend verstanden. Ein besseres Verständnis der DNA-Fragmentation könnte in ein besseres Verständnis der Genamplifikationen resultieren.

5.4. *Diskussion des Ausschleusens von amplifizierter DNA*

Auffällig war bei der BAC-Sonde 162F20, dass sie oft amplifizierte DNA-Regionen detektierte, die sich am Rande des Zellkernes befanden wie man es auf der Abbildung 26 a sieht. Bei anderen Zellkernen befand sich das grüne Signal außerhalb des Zellkernes, wie man es auf der Abbildung 26 b sieht. Das Ausschleusen von DNA könnte eine weitere Möglichkeit darstellen amplifizierte DNA unbrauchbar zu machen. Fischer *et al.* konnten 2016 [14] zeigen, dass Genamplifikationen sowohl innerhalb, als auch außerhalb des Nukleus detektiert werden konnten, was bedeutet, dass die entsprechende amplifizierte DNA in irgendeiner Weise aus dem Nukleus transportiert worden sein muss.

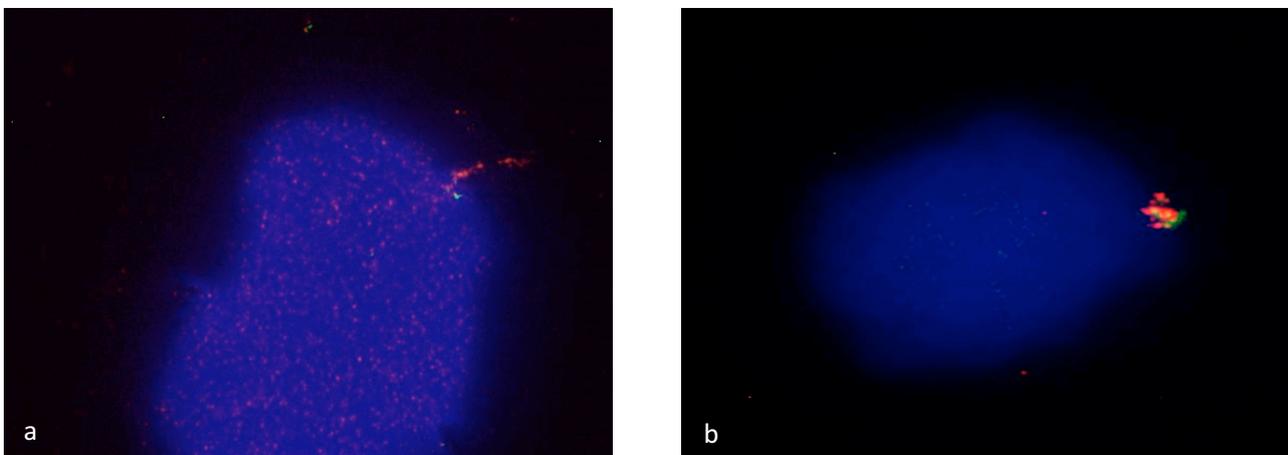


Abbildung 46: Zellkerne, die möglicherweise amplifizierte DNA ausschleusen

Es konnten mehrere weitere Beispiele gefunden werden, dass amplifizierte DNA ausgeschleust werden könnte. In Abbildung 46 a sieht man eine FISH mit den BAC-Sonden 1142B4 und 162F20 nach 3 Tage langer Differenzierung in Richtung Osteozyten. In Abbildung 46 b sieht man eine FISH mit den BAC-Sonden 571M6 und 611O2 mit humanen mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden. Fischer et al. beschrieben 2016 ein selektives Ausschleusen von amplifizierter DNA, da sich bestimmte Fluoreszenzsignale außerhalb des Nukleus befanden, andere Fluoreszenzsignale innerhalb des Nukleus zu sehen waren.

5.5. Diskussion der BAC-Sonden, die die Aussage der Array-CGH nicht bestätigten

Die BAC-Sonden 571M6 und 611O2 konnten die Aussage der Array-CGH nicht bestätigen. In der Array-CGH konnte weder für die DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 571M6, noch für die DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 611O2 hybridisiert, eine Amplifikation nachgewiesen werden. Ganz anders sah es in der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung aus. Beide BAC-Sonden konnten in Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Adipozyten und 7 Tag in Richtung Osteozyten differenziert wurden, starke Amplifikationen nachweisen. Wie kann es nun sein, dass in der Array-CGH keine Amplifikationen nachgewiesen werden konnten? Eine mögliche Antwort liegt in der bioinformatischen Auswertung. Es könnte sein, dass amplifizierte Regionen neben unterreplizierten Regionen lagen. Wurden die Werte nun gemittelt, ergäbe sich ein Nullwert. Zweitens wurden in der Array-CGH Zellen einer anderen Untersuchungsreihe verwendet als in der FISH. Es handelt sich um biologische Replikate, die möglicherweise deutliche genomische Unterschiede aufweisen. Drittens könnte eine große Heterogenität innerhalb der Untersuchungsreihe der Zellen ebenfalls dazu geführt haben, dass manche DNA-Bereiche nicht mehr nachweisbar sind.

5.6. Diskussion der humanen mesenchymalen Stammzellen im Maintenanccemedium

Das Maintenanccemedium war ein Medium, welches nach 3 Tage langer adipogener Induktion, also nach dem ersten Induktionszyklus (siehe Tabelle 4) nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Bei der Testung der BAC-Sonden 571M6 und 611O2 an Stammzellen, die nach dem ersten Differenzierungszyklus einen Tag lang mit Maintenanccemedium kultiviert wurden, konnte folgendes gesehen werden: Zellkerne mit Signalen, die eine normale Anzahl und eine normale Größe der Signale zeigten, bis hin zu Zellkernen mit starken Amplifikationen. Es war schwierig einen Unterschied zwischen den 3 Tage (nach dem 1.Induktionszyklus) lang differenzierten Zellkernen und den 4 Tage (nach dem einen Tag Maintenanccemedium) lang differenzierten Zellkernen zu sehen. In einem nächsten Experiment könnte die Maintenance-Zeit verlängert werden, sodass die Zellen anstatt eines Tages zum Beispiel 3 und 7 Tage lang mit Maintenanccemedium kultiviert werden, um eine bessere Aussage darüber zu treffen, ob schon vorhandene Amplifikationen ohne Differenzierungsmedium zurückgehen, bleiben oder in ihrem Ausmaß zunehmen.

5.7. Diskussion der PCR-Ergebnisse

5.7.1. Diskussion der PCR-Ergebnisse der adipogenen Reihe

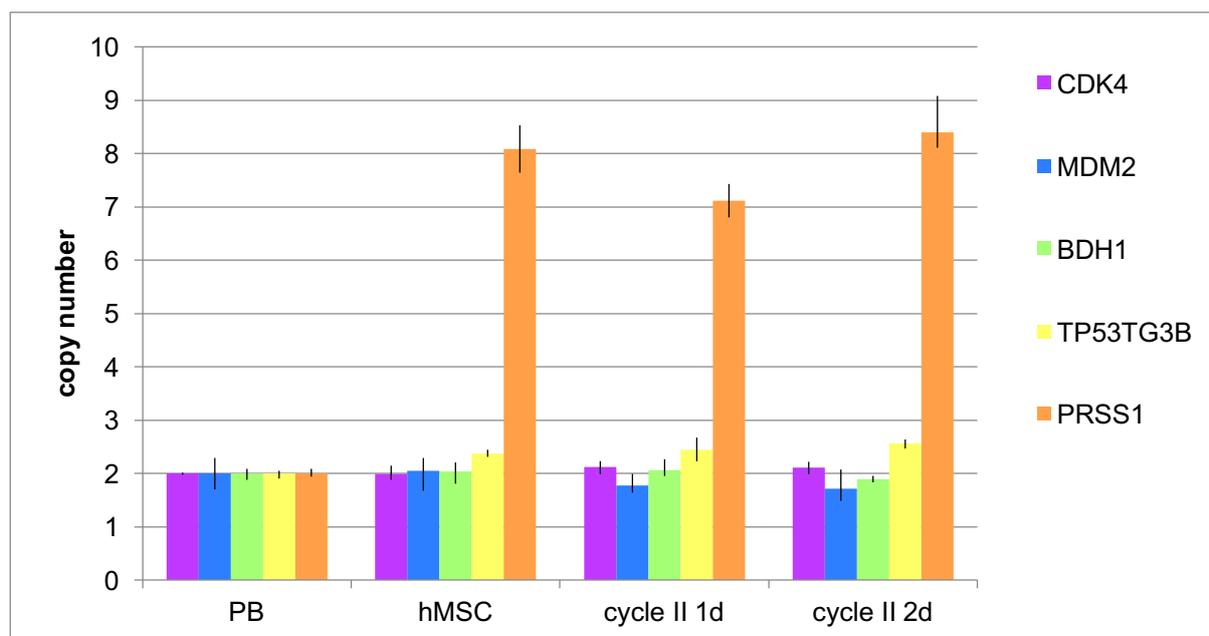


Abbildung 47: qPCR der adipogenen Reihe

Ziel der qPCR war es, für exemplarische Loci die Genamplifikationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung zu verifizieren. Eine vollständige Erfassung aller im Zuge der Differenzierungsprozesse stattfindenden Amplifikationen setzt voraus, dass unterschiedliche Zellchargen verwendet werden und dass es zu jeder BAC-Sonde ein qPCR-Genkorrelat gibt. Auffällig sind die hohen Kopiezahlen des Genes *PRSS1*. Die Kopiezahl des Genes in Lymphozyten einer gesunden Testperson, die als Referenzzellen dienten, ist normal, beträgt also 2. In allen humanen mesenchymalen Stammzellen, ob undifferenziert oder differenziert, ist eine hohe Anzahl an Genkopien zu erkennen. Da die Kopiezahlen des Genes in verschiedenen Differenzierungsstadien der Stammzellen variieren, liegen Genamplifikationen vor. Lügen CNV= copy number variations vor, müsste die Kopiezahl konstant bleiben, was nicht der Fall ist. Die BAC-Sonde 47G1 bindet in enger chromosomaler Nähe zum Gen *PRSS1*. Sie konnte allerdings in Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Adipozyten differenziert wurden, keine Amplifikationen detektieren. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der unterschiedlichen chromosomalen Lokalisation liegen. Da das Gen *PRSS1* für eine Serinprotease kodiert und die DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 47G1 hybridisiert, für ein Membranprotein, könnte es sein, dass sich die Amplifikation nur innerhalb der chromosomalen Region, die für die Serinprotease kodiert, befindet. Möglicherweise wird die Serinprotease benötigt und das Membranprotein nicht.

Das Gen *TP53TG3B* liegt sowohl in den undifferenzierten Stammzellen, als auch in den Stammzellen, die in Richtung Adipozyten differenziert wurden, in amplifizierter Form vor.

Das Gen *MDM2* lag in den undifferenzierten Stammzellen in normaler Kopiezahl vor. In den adipogen differenzierten Stammzellen lag das Gen in leicht unterreplizierter Form vor. In der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung konnte allerdings das Gegenteil gesehen werden: Nach 7 Tagen konnten starke Amplifikationen in einem relativ großen Teil (etwa 50 %) der Zellkerne nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte mit den verschiedenen Methoden zusammenhängen: Die FISH untersucht einzelne individuelle Zellen. Die qPCR analysiert viele Zellen gleichzeitig. Es wäre denkbar, dass auf den untersuchten Objektträgern besonders viele amplifizierte Zellen vorhanden waren, während die Zellgesamtpopulation prozentual einen deutlich geringeren Anteil an amplifizierten Zellen besitzt. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen ist folgende: Die BAC-Sonde 611O2 ist relativ groß. Sie hybridisiert mit einer DNA-Region, die zwei Gene (*MDM2* und *CPM*) enthält. Möglicherweise verhalten sich beide Gene unterschiedlich. *MDM2* könnte unterrepliziert vorliegen und *CPM* könnte amplifiziert vorliegen. Dass amplifizierte chromosomale Regionen häufig neben unterreplizierten chromosomalen Regionen zu finden sind, konnten Fischer *et al.* 2015[13], sowie Leeb und Wutz 2011[39] zeigen. In ihren CGH-Analysen konnten sie „a highly wavy pattern“ der Ratioprofile nachweisen.

Das Gen *CDK4* liegt in den undifferenzierten Stammzellen in normaler Kopiezahl vor. In den Richtung Adipozyten differenzierten Stammzellen zeigte sich in der qPCR eine leichte Amplifikation. In der FISH konnten Amplifikationen für *CDK4* in 3 Tage lang, in 4 Tage lang und in 7 Tage lang differenzierten adipogenen Stammzellen detektiert werden, sodass die Ergebnisse der qPCR die Ergebnisse der FISH bestätigen.

5.7.2. Diskussion der PCR-Ergebnisse der osteogenen Reihe

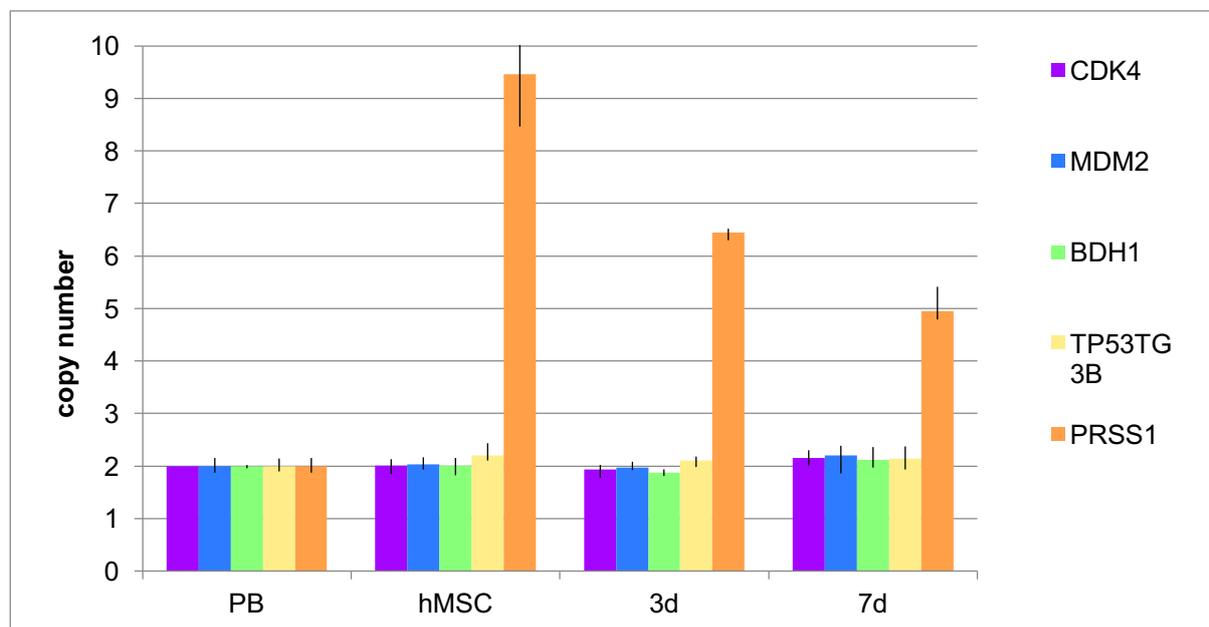


Abbildung 48: qPCR der osteogenen Reihe

Auffällig sind die hohen Kopiezahlen des Genes *PRSS1* in den undifferenzierten und differenzierten osteogenen Stammzellen. Die Werte der Kopiezahlen des Genes *PRSS1* hier innerhalb der osteogen differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich jedoch anders als die Werte der Kopiezahlen des Genes *PRSS1* innerhalb der adipogenen Differenzierungsreihe. Es liegen Amplifikationen vor, weil die Kopiezahlen des Genes *PRSS1* innerhalb der Stammzellen variieren.

Das Gen *TP53TG3B* liegt sowohl in den undifferenzierten, als auch in den osteogen differenzierten Stammzellen leicht amplifiziert vor. Die in der Nähe dieses Genes befindliche DNA-Region, die mit der BAC-Sonde 53C21 hybridisiert, konnte in der FISH in den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen ebenfalls als amplifiziert nachgewiesen werden. Auch in den 3 Tage in Richtung Osteozyten differenzierten Stammzellen konnten in der FISH Amplifikationen detektiert werden. Zwar konnte eine

Abnahme der Kopiezahl der Chromosomenregion gesehen werden, aber viele Zellen zeigten eine deutliche Amplifikation in den FISH-Experimenten.

Das Gen *BDH1* wurde von der BAC-Sonde 728G2 detektiert. Die FISH zeigte, dass Stammzellen, die 3 Tage lang in Richtung Osteozyten differenziert wurden, beginnende Amplifikationen aufwiesen. 5% der Zellkerne zeigten beginnende Amplifikationen. In der qPCR konnte nach 3 Tage langer Differenzierung eine leichte Unterreplikation nachgewiesen werden. Das Gen *BDH1* liegt in 95% der Zellkerne in einer leicht-unterreplizierten Form vor, während 5% der Zellkerne eine leichte Amplifikation aufweisen, was in der qPCR als Unterreplikation zu sehen ist. Diese z.T. widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich durch Verdünnungseffekte erklären, da sowohl Amplifikationen als auch Unterreplikationen nur in Teilen der Gesamtpopulation der Zellen vorhanden sind. In den mesenchymalen Stammzellen, die 7 Tage in Richtung Osteozyten differenziert wurden, waren in der FISH mehr und stärkere Amplifikationen zu sehen. Es wiesen etwa 10% der Zellkerne Amplifikationen auf. In der qPCR konnten in Stammzellen, die 7 Tage lang in Richtung Osteozyten differenziert wurden, eine leichte Amplifikation des Genes *BDH1* nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der qPCR zeigen, dass das Gen *MDM2* in den undifferenzierten Stammzellen eine normale Kopiezahl aufweist. Auch in der FISH mit undifferenzierten Stammzellen konnte eine normalen Anzahl und eine normalen Größe der Signale für die BAC-Sonde detektiert werden. Das Ergebnis der FISH mit Stammzellen, die 7 Tage lang in Richtung Osteozyten differenziert wurden, wird von dem Ergebnis der qPCR bestätigt, da in der FISH in einem Teil der Zellkerne starke Amplifikationen detektiert werden konnten und auch in der qPCR konnte eine leichte Amplifikation nachgewiesen werden.

Die qPCR-Analyse des Gens *CDK4* zeigt vergleichbare Kopiezahlveränderungen wie sie oben für das Gen *MDM2* angesprochen wurden. In den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen liegt das Gen in normaler Kopiezahl vor. Nach 7 Tage langer Differenzierung in Richtung Osteozyten ist in der qPCR eine leichte Amplifikation zu sehen. Auch in der FISH mit undifferenzierten Stammzellen konnte eine normalen Anzahl und eine normalen Größe der Signale für die BAC-Sonden detektiert werden. In der FISH waren nach 7 Tage osteogener Differenzierung Zellkerne mit deutlichen Amplifikationen zu sehen, sodass die Aussage der FISH durch die Aussage der qPCR bestätigt wird.

6. Literaturverzeichnis

1. He, S., D. Nakada, and S.J. Morrison, *Mechanisms of stem cell self-renewal*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 377-406.
2. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
3. Jopling, C., S. Boue, and J.C. Izpisua Belmonte, *Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(2): p. 79-89.
4. Xie, T. and A.C. Spradling, *A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary*. Science, 2000. **290**(5490): p. 328-30.
5. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1068-74.
6. De Los Angeles, A. and G.Q. Daley, *Stem cells: Reprogramming in situ*. Nature, 2013. **502**(7471): p. 309-10.
7. Patel, M. and S. Yang, *Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells*. Stem Cell Rev, 2010. **6**(3): p. 367-80.
8. Bostock, C.J., *Mechanisms of DNA sequence amplification and their evolutionary consequences*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1986. **312**(1154): p. 261-73.
9. Albertson, D.G., *Gene amplification in cancer*. Trends Genet, 2006. **22**(8): p. 447-55.
10. Kuttler, F. and S. Mai, *Formation of non-random extrachromosomal elements during development, differentiation and oncogenesis*. Semin Cancer Biol, 2007. **17**(1): p. 56-64.
11. Stark, G.R. and G.M. Wahl, *Gene amplification*. Annu Rev Biochem, 1984. **53**: p. 447-91.
12. Bailey, S.M. and J.P. Murnane, *Telomeres, chromosome instability and cancer*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(8): p. 2408-17.
13. Fischer, U., et al., *Gene amplification during differentiation of mammalian neural stem cells in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2015. **6**(9): p. 7023-39.
14. Fischer, U., et al., *Gene amplification during myogenic differentiation*. Oncotarget, 2016. **7**(6): p. 6864-77.
15. Makunin, I.V., T.D. Kolesnikova, and N.G. Andreyenkova, *Underreplicated regions in Drosophila melanogaster are enriched with fast-evolving genes and highly conserved noncoding sequences*. Genome Biol Evol, 2014. **6**(8): p. 2050-60.
16. Windle, B., et al., *A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplicon integration*. Genes Dev, 1991. **5**(2): p. 160-74.
17. Lee, H.O., J.M. Davidson, and R.J. Duronio, *Endoreplication: polyploidy with purpose*. Genes Dev, 2009. **23**(21): p. 2461-77.
18. Undritz, E. and K. Nusselt-Bohaumilitzky, *[On the formation of diploid megakaryoblasts, promegakaryocytes and megakaryocytes in severe hemopathies, a return to phylogenesis]*. Schweiz Med Wochenschr, 1968. **98**(42): p. 1686-7.
19. Calvi, B.R. and A.C. Spradling, *Chorion gene amplification in Drosophila: A model for metazoan origins of DNA replication and S-phase control*. Methods, 1999. **18**(3): p. 407-17.
20. Storchova, Z. and D. Pellman, *From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(1): p. 45-54.
21. Mahgoub, T., et al., *Kinase inhibitor screening identifies CDK4 as a potential therapeutic target for melanoma*. Int J Oncol, 2015. **47**(3): p. 900-8.
22. Furgason, J.M., et al., *Whole genome sequence analysis links chromothripsis to EGFR, MDM2, MDM4, and CDK4 amplification in glioblastoma*. Oncoscience, 2015. **2**(7): p. 618-28.
23. Ullah Shah, A., I. Mahjabeen, and M.A. Kayani, *Genetic polymorphisms in cell cycle regulatory genes CCND1 and CDK4 are associated with susceptibility to breast cancer*. J BUON, 2015. **20**(4): p. 985-93.
24. Zhang, Y., et al., *[Cytoplasmic expression of CDK4 protein and its correlation with the clinicopathologic features and prognosis of lung cancer]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2012. **32**(11): p. 1572-5.

25. Guerin, M., et al., *A new subtype of high-grade mandibular osteosarcoma with RASAL1/MDM2 amplification*. Hum Pathol, 2016. **50**: p. 70-8.
26. Nikitakis, N.G., C.B. Drachenberg, and J.C. Papadimitriou, *MDM2 and CDK4 expression in carcinosarcoma of the esophagus: comparison with squamous cell carcinoma and review of the literature*. Exp Mol Pathol, 2002. **73**(3): p. 198-208.
27. Hannibal, R.L., et al., *Copy number variation is a fundamental aspect of the placental genome*. PLoS Genet, 2014. **10**(5): p. e1004290.
28. Sher, N., et al., *Developmental control of gene copy number by repression of replication initiation and fork progression*. Genome Res, 2012. **22**(1): p. 64-75.
29. Hannibal, R.L. and J.C. Baker, *Selective Amplification of the Genome Surrounding Key Placental Genes in Trophoblast Giant Cells*. Curr Biol, 2016. **26**(2): p. 230-6.
30. Nordman, J. and T.L. Orr-Weaver, *Regulation of DNA replication during development*. Development, 2012. **139**(3): p. 455-64.
31. Wasag, P. and R. Lenartowski, *Nuclear matrix - structure, function and pathogenesis*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016. **70**(0): p. 1206-1219.
32. Wilson, R.H. and D. Coverley, *Relationship between DNA replication and the nuclear matrix*. Genes Cells, 2013. **18**(1): p. 17-31.
33. Zhang, J.H. and M. Xu, *DNA fragmentation in apoptosis*. Cell Res, 2000. **10**(3): p. 205-11.
34. Nagata, S., *Apoptotic DNA fragmentation*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 12-8.
35. Andrabi, S.M., *Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation*. J Assist Reprod Genet, 2007. **24**(12): p. 561-9.
36. Wdowiak, A., et al., *Levels of FSH, LH and testosterone, and sperm DNA fragmentation*. Neuro Endocrinol Lett, 2014. **35**(1): p. 73-9.
37. Crasta, K., et al., *DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis*. Nature, 2012. **482**(7383): p. 53-8.
38. Stephens, P.J., et al., *Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development*. Cell, 2011. **144**(1): p. 27-40.
39. Leeb, M. and A. Wutz, *Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos*. Nature, 2011. **479**(7371): p. 131-4.

7. Publikationen/Danksagung

Publikationen

Gene amplification in mesenchymal stem cells and during differentiation towards adipocytes or osteocytes (Stem cells and development)

Das Manuskript ist fertig gestellt und befindet sich in der Einreichung.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. Eckart Meese, Leiter des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums des Saarlandes, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese interessante Arbeit in seinem Institut durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ulrike Fischer für die Betreuung meiner Arbeit. Ich möchte mich für Geduld und Vertrauen bedanken, welche sie mir entgegen gebracht hat. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr professionell und warmherzig begleitet. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die sie mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Auch für die vielen anregenden Diskussionen bin ich sehr dankbar. Uli, Danke!!

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Humangenetik für die liebe Aufnahme in ihren Arbeitskreis, die nette Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft: Danke an Masood, Steffi und Martin für die vielen lustigen Gespräche! Danke an Tamara, Nicole und Julia für ihre Hilfe in Sachen Computer! Danke an Marie, Meike und Giuseppe für die vielen schönen Mittagspausen!

Ich danke herzlich meiner Familie. Danke an Hans-Adolf für das Auto und das Korrekturlesen! Danke an meine Oma für die vielen Telefonate und Unterhaltungen in den letzten Jahren!

Danke an meine Freunde, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben, egal, ob sie in Duisburg, Berlin, Heidelberg, Zürich oder im Saarland waren!