Aus dem Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

Charakterisierung der p21-GFP-Expression in Genom-editierten humanen Zelllinien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Simon Büchel
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. med. Fritz Boege
Zweitgutachter: Prof. Dr. Björn Stork

Meiner Familie

Eigene Publikationen

Die Zusammenfassung und einige Ergebnisse wurden bereits im Rahmen des Symposiums 2021 der medical Research School Düsseldorf veröffentlicht.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Antwortmechanismen humaner Zellen auf eine DNA-Schädigung, welche essentiell zur Tumorprävention ist. Untersucht wird das Tumorsupressorprotein p21, welches eine wesentliche Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus einnimmt. Bei einer Schädigung der Körperzelle wird die Expression von p21 induziert, welches einen Zellzyklusarrest induziert, um die DNA-Reparatur zu ermöglichen.
Studien haben gezeigt, dass sich die Induktion von p21 auf Einzelzellniveau unterschiedlich darstellt. In manchen Zellen erfolgte eine sofortige Induktion der p21 Expression, in anderen eine verzögerte und in einigen gar keine. In dieser Arbeit sollte zum einen geprüft werden, ob diese individuelle p21-Antwort abhängig ist von der Zellzyklusphase, in der die Zellschädigung stattgefunden hat. Zum anderen sollte untersucht werden, ob sich die Dynamik der p21-Expression zwischen verschiedenen Arten der DNA-Schädigung unterscheidet.
Für die Experimente wurden HT-1080- Fibrosarkomzellen verwendet, in denen p21 durch CRISPR/Cas9-Genomeditierung mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP fusioniert wurde. Bei einer Zellschädigung kann somit die Expression des p21-GFP-Fusionsproteins unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Durch die Expression eines Fusionsproteins aus dem Zellzyklusmarker PCNA und dem roten Fluoreszenzprotein RFP kann anhand der Verteilung der roten Fluoreszenz der Zellzyklus bestimmt werden, da sich diese in G1-, S- und G2-Phase unterscheidet. Zusätzlich stand ein durch CRISPR/Cas9-generierter p21-Knockout-Klon zur Verfügung.
Um zu prüfen, ob die p21 Antwort vom Zellzyklus zum Zeitpunkt der Zellschädigung abhängt, wurden die Zellen mit Camptothecin geschädigt und die p21-GFP-Induktion 48 Stunden lang nachverfolgt. Dabei hat sich zwar bestätigt, dass einzelne Zellen stärker nach der Schädigung fluoreszieren, aber eine Zuordnung zum Zellzyklus war durch technische Probleme des Mikroskops nicht möglich. Zusätzlich konnte durch einen Vergleich des p21-Knockout-Klons mit dem Wildtyp gezeigt werden, dass Zellen ohne p21 trotz Schädigung häufiger in die S-Phase gehen, die Zellzyklus-Kontrolle also behindert ist.
Um die zweite Frage zur p21-Expression bei verschiedenen Arten der DNA-Schädigung zu bearbeiten, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen an UVA Strahlen geschädigt und die p21-GFP-Expression quantifiziert. Es hat sich ein sigmoidaler Anstieg der mittleren Fluoreszenz gezeigt. Da bei Röntgenstrahlen ein linearer Anstieg stattfindet, verursacht die Art der DNA-Schädigung also tatsächlich unterschiedliche p21-GFP-Expressionskinetiken. Außerdem zeigte sich, dass p21-GFP-exprimierende Zellen in G1 und G2 verharren, in welcher Phase vermehrt war jedoch abhängig von der Schädigungsart.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die p21-GFP-Induktion schadensspezifische Kinetiken aufweist, sodass dieses Zellsystem als biologisches System zur Toxizitätsbestimmung verschiedenster Substanzen geeignet erscheint.

Abstract

This work deals with the response mechanisms of human cells to DNA damage, which is essential for tumor prevention. The tumor suppressor protein p21 is investigated, which plays an essential role in cell cycle control. Upon damage to the somatic cell, the expression of p21 is induced, which induces cell cycle arrest to allow DNA repair.

Studies have shown that the induction of p21 varies at the single-cell level. In some cells there was an immediate induction of p21 expression, in others a delayed induction and in some none at all. In this work, it was the aim to determine whether this individual p21 response is dependent on the cell cycle phase in which cell damage occurred. The second aim was to investigate whether the dynamics of p21 expression differ between different types of DNA damage.

For the experiments, HT-1080- fibrosarcoma cells were used in which p21 was fused to the green fluorescent protein GFP by CRISPR/Cas9 genome editing. Thus, upon cell injury, expression of the p21-GFP fusion protein can be observed under the fluorescence microscope. By expressing a fusion protein of the cell cycle marker PCNA and the red fluorescent protein RFP, the cell cycle can be determined based on the distribution of red fluorescence as it differs into G1, S, and G2 phases. In addition, a p21 knockout clone generated by CRISPR/Cas9 was available.

To test whether the p21 response depends on the cell cycle at the time of cell damage, cells were damaged with camptothecin and p21-GFP induction was followed up for 48 hours. This confirmed that individual cells fluoresced more strongly after damage, but assignment to the cell cycle was not possible due to technical problems with the microscope. In addition, by comparing the p21 knockout clone with the wild type, it was shown that cells without p21 enter S phase more frequently despite damage, thus cell cycle control is impaired.

To address the second question about p21 expression in different types of DNA damage, cells were damaged with different doses of UVA radiation and p21-GFP expression was quantified. A sigmoidal increase in mean fluorescence was shown. Thus, since a linear increase occurs with X-rays, the type of DNA damage actually causes different p21-GFP expression kinetics. Moreover, p21-GFP-expressing cells were shown to persist in G1 and G2, but in which phase increased was dependent on the type of damage.

In summary, it was shown that p21-GFP induction exhibits damage-specific kinetics, so that this cell system appears to be suitable as a biological system for toxicity determination of a wide variety of substances.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung
ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*
ATR: *ataxia telangiectasia and Rad3 related*
cm: Zentimeter
cm^2: Quadratzentimeter
CO_2: Kohlenstoffdioxid
CPT: (S)-(+)-Camptothecin
CRISPR/Cas: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated*
DMEM: *Dulbecco's Modified EAGLE Medium*
DMSO: Dimethylsulfoxid
DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure
FACS: *Fluorescence assisted cell sorting*
FCS: fetales Kälberserum
GFP: grün fluoreszierendes Protein
Gy: Gray
h: Stunde(n)
J/ cm^2: Joule pro Quadratzentimeter
Mdm2: *mouse double minute 2 homolog*
µl: Mikroliter
ml: Milliliter
NM: Nährmedium
ns: nicht signifikant
p21: *Cyclin dependent kinase -Inhibitor 1*
p53: *cellular tumor antigen p53*
RFP: rot fluoreszierendes Protein
rpm: *rounds per minute*
UVA: Ultraviolette Strahlung der Gruppe A (Wellenlängen von 380–315 nm)
X-Ray: Röntgenstrahlung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
   1.1 Zellzyklus..... 1
   1.2 Die Tumorsupressorproteine p53 und CDKN1A/p21..... 2
   1.3 Antwort der Zelle auf DNA-Schädigung..... 4
   1.4 Funktionsweise von CRISPR/Cas9..... 7
      1.4.1 Erstellung des HT1080 p21-/- Klons..... 8
      1.4.2 Erstellung und Erfolgskontrolle eines p21-GFP-exprimierenden Klons... .10
   1.5 PCNA im Zellzyklus..... .12
   1.6 Hypothesen und Ziele der Arbeit..... ..13
2. Material und Methoden
   2.1 Material
      2.1.1 Medien..... 15
      2.1.2 Lösungen und Reagenzien..... 15
      2.1.3 Zelllinien..... 15
      2.1.4 Verbrauchsmaterialien..... ..16
      2.1.5 Geräte..... ...16
      2.1.6 Software..... ...17
      2.1.7 Sonstiges..... ...17
   2.2 Methoden
      2.2.1 Methodik der Arbeit..... ..18
      2.2.2 Zellkultur..... ...19
      2.2.3 Analysen zur mittleren Fluoreszenz am FACS-Gerät nach UVA Schädigung..... ..20
      2.2.4 Zellzyklusanalyse am FACS in Relation zur p21-GFP Expression von HT1080 p21 -/- im Vergleich zum Wildtyp..... ..24
      2.2.5 Zellzyklusanalyse am FACS in Relation zur p21-GFP Expression von HT1080 p21-GFP Zellen ohne Tag-RFP..... ..26
      2.2.6 Live cell Imaging über 48 Stunden 29
   2.3 Ethikvotum..... ...32
   2.4 Statistik und Software..... ...32
3. Ergebnisse
   3.1 Ergebnisse zur Analyse der mittleren Fluoreszenz nach UVA Bestrahlung..... ...33
   3.2 Ergebnisse der Zellzyklusanalyse am FACS im Vergleich von HT1080 Wildtyp und HT1080 p21-/- 38
   3.3 Ergebnisse der Zellzyklusanalyse am FACS in Relation zur p21-GFP Expression von HT1080 p21-GFP Zellen ohne Tag-RFP..... ...42
   3.4 Ergebnisse des *live cell imagings* über 48 h am konfokalen Mikroskop..... ...45
4. Diskussion
   4.1 Diskussion der Analyse der mittleren Fluoreszenz nach UVA Bestrahlung ..... .48

4.2 Diskussion Zellzyklusanalyse am FACS im Vergleich von HT1080 Wildtyp und HT1080 p21-/- ..50
4.3 Diskussion der Zellzyklusanalyse am FACS in Relation zur p21-GFP Expression ...51
4.4 Diskussion des *live cell imagings* über 48 h am konfokalen Mikroskop 53
4.5 Allgemeine Fehlerquellen und Limitationen ...55
4.6 Schlussfolgerung ...56
5. Verzeichnisse
5.1 Literaturverzeichnis ...58
5.2 Abbildungsverzeichnis ...65
5.3 Tabellenverzeichnis ...66
6. Anhang
6.1 Rohdaten der Experimente ...67
6.2 FACS-Analysen der mittleren Grünfluoreszenz nach UVA Schädigung ...70
6.3 FACS- Analysen im Vergleich von HT1080 Wildtyp und HT1080 p21-/- ...76
6.4 FACS-Analysen in Relation zur p21-GFP Expression von HT1080 p21-GFP Zellen ohne Tag-RFP ...85
6.5 Sonstiges ...89

1. Einleitung

1.1 Zellzyklus

In dieser Arbeit werden humane Zellen und ihr Teilungsverhalten untersucht. Als Grundlage der Teilungsfähigkeit muss zunächst der Zellzyklus der Zellen betrachtet werden. Die Regulation des Zellzyklus wird in dem folgenden Kapitel erläutert.

Humane Zellen sind in der Lage sich zu teilen. Hierfür durchläuft eine Zelle verschiedene Aktivitätsphasen, den Zellzyklus (vgl. im folgenden Abschnitt (Sander van den Heuvel 2005; Graw 2015)). Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen: Der G1-Phase, der Synthese-Phase S, der G2-Phase und der Mitose M (siehe Abbildung 1). G1 und G2 stehen für Gap (englisch für Lücke oder Abstand), da diese Phasen zwischen der DNA-Synthese (S-Phase) und der Zellteilung (Mitose) liegen. Nachdem sich eine Zelle geteilt hat, liegen die Tochterzellen in der G1-Phase vor oder sie gehen in die G0-Phase über, wenn keine weitere Teilung erwünscht ist.
Die G1-Phase dient der Vorbereitung für die nächste Synthese-Phase. Hier werden Nährstoffe aufgefüllt, Zellorganellen und Zytoplasma gebildet und auch Replikationsenzyme produziert (Moeller und Sheaff 2006). Außerdem wird überprüft, ob die zuvor stattgefundene Zellteilung korrekt verlaufen ist, oder ob Schäden an der DNA bestehen und somit eine Gefahr von der Zelle für den Organismus besteht (Siede et al. 1994). Sind die Vorbereitungen abgeschlossen, geht die Zelle in die S-Phase über. In dieser Phase wird die DNA der Zelle verdoppelt. An jedem Chromosom der Zelle entstehen mehrere Replikationsursprünge und es kann die Synthese der DNA erfolgen (Aparicio 2013).
Wenn die Verdopplung der DNA und damit die S-Phase abgeschlossen sind, geht die Zelle in die G2-Phase über. In dieser Phase wird überprüft, ob die Replikation der DNA fehlerhaft war und es können Reparaturmechanismen angewandt werden, um diese zu beheben (Cuddihy und O'Connell 2003). Außerdem wird die Mitose vorbereitet, indem zellteilungsrelevante Proteine synthetisiert werden. Danach rundet sich die Zelle ab und löst sich aus dem bestehenden Zellverband (Jones et al. 2019).
In der Mitose-Phase teilen sich der Chromosomensatz der Zelle, der Zellkern und das Zytoplasma, sodass zwei Tochterzellen mit einem einfachen Chromosomensatz entstehen. Im Schnitt dauert es ungefähr 19,5 Stunden, um einen Zellzyklus zu durchlaufen, wenn keine Störungen auftreten (Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution 2000). Allerdings unterliegt der Zellzyklus verschiedenen internen Regulationsmechanismen und dem Einfluss von äußeren und inneren Faktoren (Barnum und O'Connell 2014).
Äußere Faktoren sind beispielsweise das Nährstoffangebot für die Zelle und der Platz im Zellverband (Bohnsack und Hirschi 2004). Liegen Zellen in einer Zellkultur zu dicht beieinander, so wird das Wachstum inhibiert (Ribatti 2017).
Zellintern bestehen Kontrollpunkte, die einen Übergang in die nächste Zellzyklusphase erst

dann ermöglichen, wenn die vorherige Phase vollständig abgeschlossen ist. An diesen Kontrollpunkten wird der Zustand der DNA geprüft. Im Falle einer Schädigung kann die Zelle in der bestehenden Phase arretiert und der Schaden repariert werden. Ist eine Reparatur nicht möglich, kann die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) übergehen (Fotedar et al. 1996).
Diese Kontrollen sollen verhindern, dass sich eine Zelle mit fehlerhafter DNA teilt. Diese könnte ansonsten ihre fehlerhafte DNA weitergeben und ein unkontrolliertes Wachstum bedingen. Wenn Zellen sich dieser Steuerung durch den Organismus entziehen und autonom wachsen, führt dies zu neoplastischen Zellen (Liu et al. 2022). Somit ist der Zellzyklus die Basis für das Verständnis der Krebsentstehung.

Zellzyklusphasen mit den Kontrollpunkten

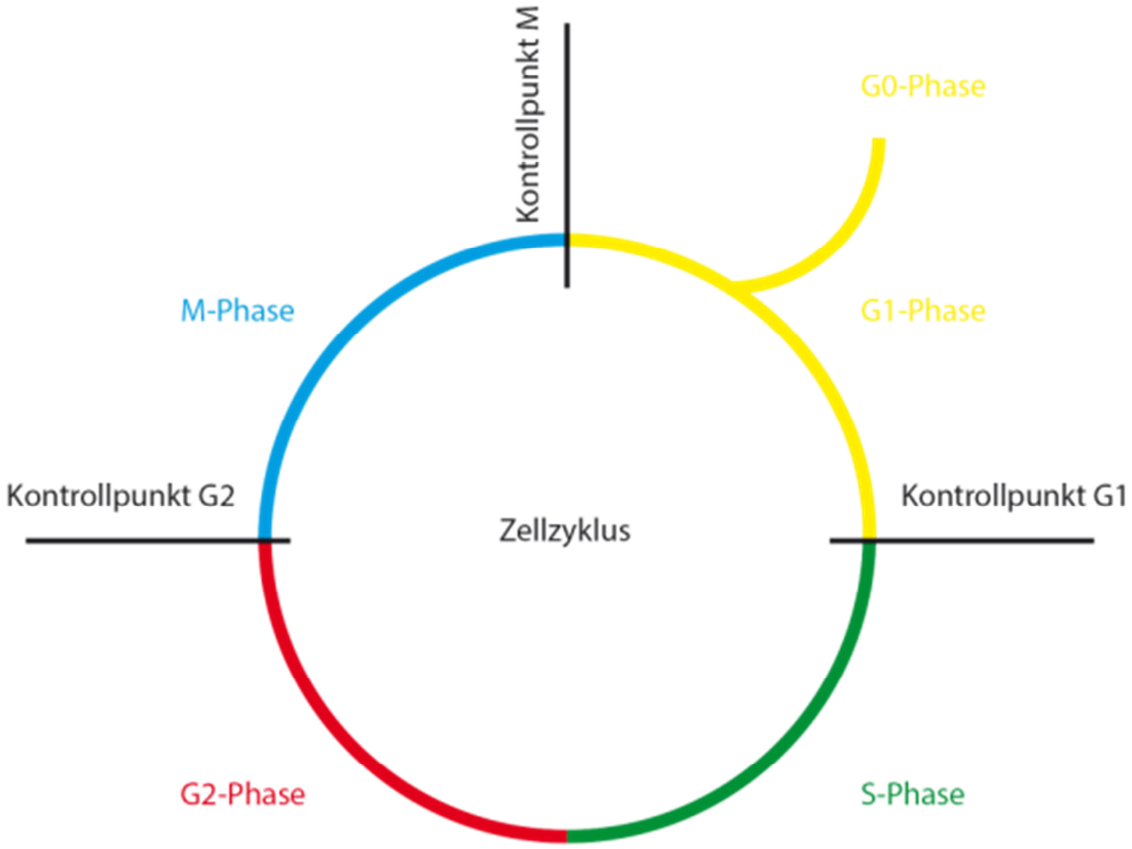


Abb. 1: Illustration des Zellzyklus. G0: Zyklusarrest (gelb), G1: Lücke zwischen Mitose und Synthese (gelb), S: Synthese (grün), G2: Lücke zwischen Synthese und Mitose (rot), M: Mitose (blau). Eigene Darstellung in Anlehnung an (Sander van den Heuvel 2005)

1.2 Die Tumorsupressorproteine p53 und CDKN1A/p21

Der zuvor beschriebene Zellzyklus unterliegt einer feinen Regulation, um die Entartung der Zellen und einem unkontrollierten Wachstum entgegen zu wirken. Zentrale Bausteine dieser Regulationsmechanismen sind die Proteine p53 und p21. Die durchgeführten Experimente

untersuchen insbesondere die Dynamik und das Antwortverhalten von p21 auf DNA-Schädigung. Somit ist die Funktionsweise dieser Proteine wichtig für das Verständnis der Experimente.

Das p53-Protein ist ein Tumorsupressorprotein und wesentlich beteiligt an der Regulation des Zellzyklus (vgl. im folgenden Abschnitt (Woods und Vousden 2001; Hainaut 2007)). Die Expression von p53 spielt eine entscheidende Rolle in der Genreparatur und der Apoptose. Seine Funktion zielt darauf ab, die genomische Stabilität aufrecht zu erhalten. Aufgrund seiner zentralen Rolle wurde es auch als „Wächter des Genoms“ tituliert (Lane 1992).

Bei normal wachsenden Zellen liegt p53 in einer stabilen, aber niedrigen, Konzentration vor. Es wird gleichmäßig neu gebildet und abgebaut. Durch die Aktivität der Mdm2-Ubiquitin-Ligase wird p53 zum Abbau im Proteasom markiert (Chao 2015). Dabei ist die Halbwertszeit ca. 30 Minuten (Anwar et al. 2011). Solange die Zelle genomisch unauffällig ist, liegt p53 zum Großteil gebunden an seinem Inhibitor Mdm2 vor und ist damit inaktiviert.
Wenn es nun aber zu einer Schädigung der DNA kommt, wird p53 über die ATM-Kinase (ataxia teleangiectasia mutated kinase) und die ATR (ataxia teleangiectasia and Rad3-related protein) phosphoryliert und damit auch aktiviert (Caspari 2000). Der Abbau wird verringert, sodass sich p53 intrazellulär akkumuliert. Die Funktion dieses Proteins besteht darin, die Transkription weiterer Signalmoleküle zu induzieren. Es wurden mehr als 150 Gene identifiziert, an die p53 binden kann (Bode und Dong 2004). Sie sind unter anderem für die Induktion des Zellzyklus-Arrests, der DNA-Reparatur, und/oder der Apoptose relevant. Eines dieser Zielgene ist dabei das vom *CDKN1A*-Gen kodierte p21-Protein, welches den Zellzyklus anhalten kann, sodass der DNA-Schaden repariert werden kann. Über p21 kann die Zelle auch in einen Zustand der Teilungsunfähigkeit (Seneszenz) überführt werden (Shtutman et al. 2017). Alternativ kann über das Zielgen BAX der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet werden.
Durch seine zentrale Rolle in der Krebsentstehung ist p53 im Fokus vieler Forschungsansätze zur Therapie neoplastischer Erkrankungen. Eine Wiederherstellung der p53 Funktion ermöglicht einen breiten Ansatz in der Therapie (Wischhusen et al. 2003). Diese Relevanz von p53 zeigt sich insbesondere auch unter dem Gesichtspunkt, dass in über 50% aller Tumorzellen eine Mutation des p53 Gens vorliegt (Toledo und Wahl 2006). Und auch in vielen der anderen Tumoren ist p53 in seiner Funktion durch gestörte Signalwege eingeschränkt.

Das p21-Protein ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus (vgl. im folgenden Abschnitt (Karimian et al. 2016; Abbas und Dutta 2009)). Seine Transkription wird hauptsächlich von p53 induziert, allerdings gibt es auch p53 unabhängige Transkriptionswege. Eine der wichtigsten Funktionen von p21 sind der Zellzyklusarrest und die zelluläre Seneszenz im Falle eines irreparablen DNA-Schadens (Shtutman et al. 2017). Dies erfolgt, indem p21 mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) der S-Phase einen Komplex eingehen und diese inhibiert (Ball 1997). Dadurch kann der Zellzyklus nicht fortgeführt werden und der Zelle ist eine

Reparatur der DNA-Schäden möglich. Da der Zustand der CDK-Inhibierung reversibel ist, kann der Zellzyklus nach erfolgreicher Reparatur der DNA-Schädigung fortgesetzt werden. Ansonsten verbleibt die Zelle in der Seneszenz.
Außerdem kann p21 das PCNA (proliferating cell nuclear antigen) regulieren (Mansilla et al. 2020). Über diesen Weg ist eine Inhibition der DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus möglich.
Allerdings wurde auch berichtet, dass p21 die Apoptose der Zelle inhibieren kann (Gartel und Radhakrishnan 2005).
Somit spielt p21 eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Allerdings ist es nicht ein reiner Tumorsuppressor und kann in manchen Situationen als Onkogen betrachtet werden (Shamloo und Usluer 2019).
Durch diese Dualität der Funktion gibt es Tumore, die p21 herunterreguliert haben, um ihre Proliferation zu verstärken (Abbas und Dutta 2009). Gleichermaßen gibt es Tumore, die p21 hochreguliert haben und darunter auch in der Proliferation befördert werden. Im Durchschnitt scheint es aber so, dass p21 positive Tumore eine bessere Prognose haben, als solche mit einem p21 Funktionsverlust (Komiya et al. 1997).

1.3 Antwort der Zelle auf DNA-Schädigung

In den Experimenten dieser Arbeit werden humane Zellen geschädigt, um das Antwortverhalten der Zellen zu untersuchen. Für die Schädigung der DNA werden UVA Strahlen, Röntgenstrahlen und das Zytostatikum CPT verwendet. Sie greifen die DNA auf unterschiedliche Arten an und können somit auch möglicherweise unterschiedliche Antworten der Zellen hervorrufen. Nach der Schädigung der DNA reagiert die Zelle mit einer Signalkaskade, welche die Expression von den Proteinen beinhaltet, die in dieser Arbeit untersucht werden. Demnach werden diese Mechanismen hier kurz erläutert (vgl. in den folgenden Abschnitten (Chatterjee und Walker 2017)).

UV: Die Schädigung einer Zelle durch UVB-Strahlung basiert auf einer Strukturänderung der DNA (Garbe und Rassner 1998). Diese ergibt sich aus der Bildung von Thymidin-Dimeren. Wenn eine Zelle UVB-Strahlen ausgesetzt wird, so kann die Energie der Strahlen zwei benachbarte Thymidin-Moleküle auf einem DNA-Strang dazu anregen eine Bindung einzugehen (Yadav et al. 2019). Hierbei wird ein Cyclobutan-Ring gebildet. Diese Dimerbildung führt zu einer Änderung der räumlichen Gestalt der DNA. Einige Proteine können das entstandene Dimer nicht mehr passieren und die Transkription und Replikation der Zelle wird gestört (Rumora et al. 2008).
Diese gebildeten Dimere können durch das Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem beseitigt werden und der DNA-Schaden somit wieder behoben werden (Huang et al. 1992).
Dieser Mechanismus trifft nicht auf UVA Strahlung zu, da diese kaum in der Lage ist, das DNA-Molekül direkt anzuregen. Die Schädigung erfolgt hier über einen indirekten, oxidativ induzierten Weg (Karran und Brem 2016). Die UVA Strahlung aktiviert zunächst ein anderes Molekül als die DNA. Dieses Molekül fungiert als Photosensibilisator, indem es durch die

Absorption der UVA-Strahlung eine radikale Sauerstoffspezies abgibt. Dieses hochreaktive Molekül kann dann durch oxidative Basenmodifikation wiederum die DNA schädigen (Srinivas et al. 2019).

CPT: Camptothecin ist ein Hemmstoff der Topoisomerase I, welche benötigt wird, um den Scherungsstress des DNA-Doppelstranges zu mindern, der bei Ablesevorgängen wie der Transkription oder der Replikation zwangsläufig entsteht (Lorence und Nessler 2004). Dabei stabilisiert Camptothecin den Komplex aus Topoisomerase I und der DNA. Damit verhindert CPT, dass die DNA nach ihrer Entwindung wieder verschlossen werden kann. Es können darauffolgend sowohl Einzelstrangbrüche als auch Doppelstrangbrüche entstehen (Yamauchi et al. 2011). Diese Brüche in der DNA führen zur Apoptose der Zelle.

Röntgenstrahlen: Röntgenstrahlen gehören zu der Gruppe der ionisierenden Strahlung (vgl. im folgenden Abschnitt (Nickoloff et al. 2020; Parplys et al. 2012)). Sie schädigen die DNA der Zelle über eine direkte oder eine indirekte Wirkungsweise. Der direkte Weg beinhaltet Basenveränderungen, sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche, welche durch direkte Energieübertragung erfolgen (Kuefner et al. 2015). Bei der indirekten Wirkungsweise trifft die Strahlung auf ein Wassermolekül H_2O und löst ein Elektron aus dem Molekül (Shtarkman et al. 2008). Es entsteht ein H_2O^+ Molekül. Dieses ist instabil und reagiert mit einem anderen Wassermolekül zu einem Hydronium-Ion H_3O^+ und einem Hydroxy-Radikal OH. Dieses Radikal kann nun wiederum DNA- Basen oxidieren. Insbesondere die Bildung von Oxoguanin führt bei der Replikation zu einer fehlerhaften Basenpaarung und somit zur DNA-Schädigung (Fortini et al. 2003).

Nachdem die DNA geschädigt wurde, erfolgt eine Signalkaskade, um eine Reparatur zu ermöglichen oder den Zelltod herbeizuführen (siehe Abbildung 2) (Huang und Zhou 2020; Shiloh 2001). Zunächst wird der DNA-Schaden durch die Serin-Proteinkinasen ATM oder ATR detektiert(Moreno et al. 2019). Die Aktivierung dieser Kinasen führt nun zur Auslösung verschiedener Signalkaskaden (Smith et al. 2010). Am prominentesten ist hierbei die Aktivierung von p53 und p21, welche einen G1 Arrest zur Folge haben. In diesem G1 Arrest kann die Reparatur der DNA-Schädigung erfolgen. Die Funktionsweise und Dynamik dieser Signalkaskade und die Rolle von p21 ist der Fokus dieser Arbeit. Über weitere Signalwege kann auch ein G2-Arrest oder eine DNA-Reparatur erfolgen. Gelingt dies nicht, kann es zur Seneszenz oder zur Apoptose der Zelle kommen.

DNA-Schädigung und darauffolgende Signalkaskade

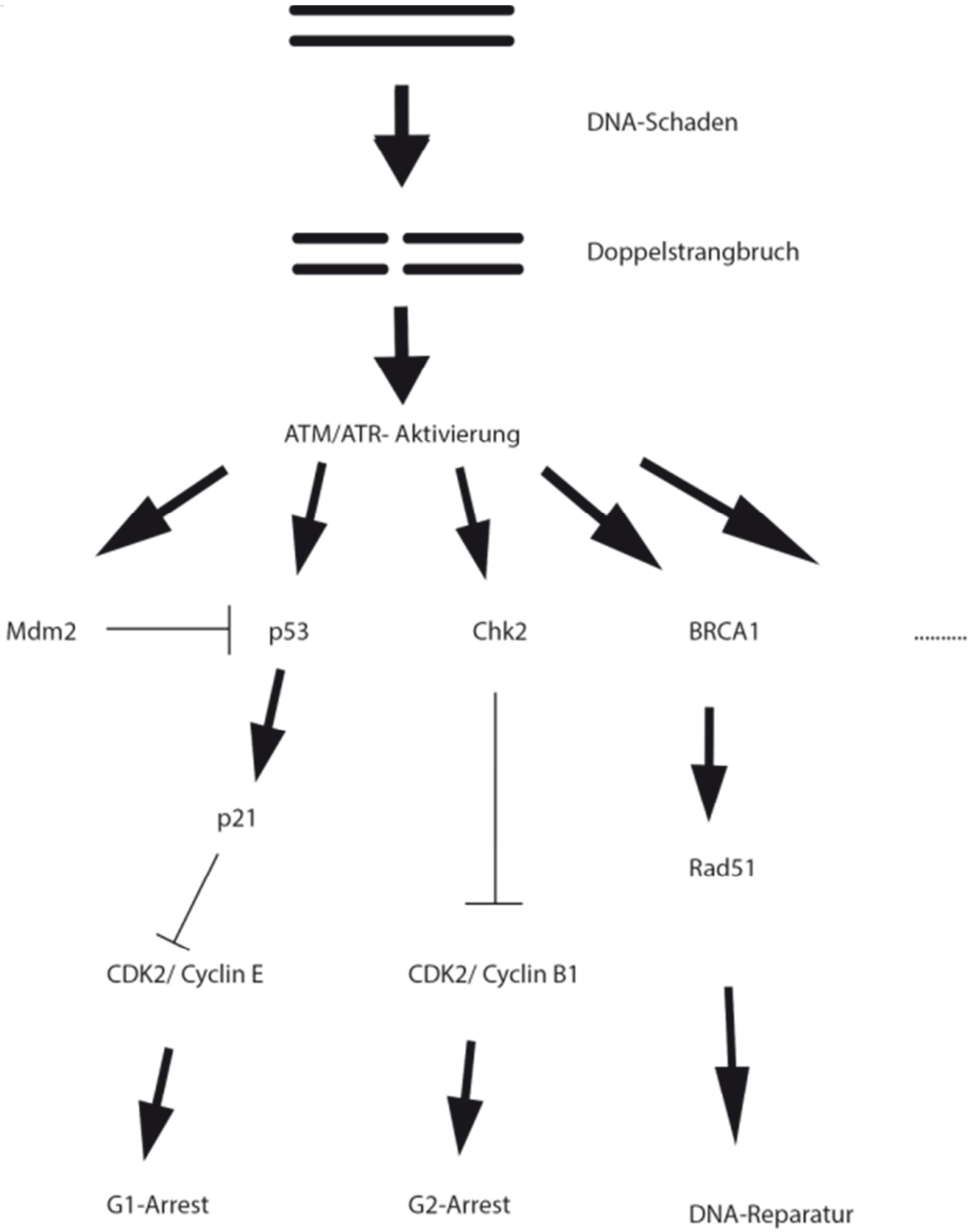


Abb. 2: Illustration der Signalkaskade einer Zelle nach DNA-Schädigung. →: führt zur Ausschüttung von, ⊢: inhibiert die Ausschüttung von, …: weitere mögliche Signalwege, ATM: Ataxia-telangiectasia mutated kinase, ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein , Mdm2: Mouse double minute 2 homolog, p53: Tumor protein P53, Chk2: Checkpoint Kinase 2, BRCA1: Breast Cancer 1, p21: CDK-Inhibitor 1, Rad51: ein DNA bindendes Protein, CDK2: Cyclin-dependent kinase 2. Eigene Darstellung in Anlehnung an (Jackson 2002; Shiloh 2001)

1.4 Funktionsweise von CRISPR/Cas9

Um die Experimente dieser Arbeit auswerten zu können, muss p21 messbar gemacht werden. Dafür wurde der Ansatz gewählt, das endogene Gen für p21 mit der Sequenz für ein grün fluoreszierendes Protein GFP zu fusionieren. Die resultierende Grünfluoreszenz des p21-GFP-Fusionsproteins kann auf Einzelzellebene im Mikroskop beobachtet oder im FACS-Gerät gemessen und quantifiziert werden. Für diese Fusion muss die DNA verändert werden, was mit der CRISPR/Cas 9 Methode möglich ist. Diese Methode ermöglicht es außerdem, die Funktion von p21 vollständig auszuschalten und einen Zellklon p21-/- zu erzeugen, der p21 nicht mehr exprimieren kann. Dieser Zellklon wird in einem Experiment dieser Arbeit eingesetzt, um den Zellzyklus und sein Antwortverhalten ohne die Funktion von p21 zu beobachten. Somit ist die Methode des CRISPR/Cas 9 wichtig für die Experimente und wird im Folgenden kurz dargestellt.

Die CRISPR/Cas-Methode (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) wird eingesetzt, um Genome Editing durchzuführen (vgl. im folgenden Abschnitt (Ma et al. 2014)). Hierfür wird die DNA gezielt geschnitten und es können Gene eingefügt oder auch entfernt werden. Die Methode basiert auf einem antiviralen Abwehrmechanismus von Bakterien (Sun et al. 2016).
Zu Beginn bindet das Enzym Cas (von CRISPR associated) an eine definierte RNA-Sequenz, welche als Anbindung zu der zu schneidenden DNA-Stelle dient (siehe Abbildung 3 (Redman et al. 2016)).

Graphische Darstellung der Bindung und den Schnitt durch Cas9 zum Genome Editing

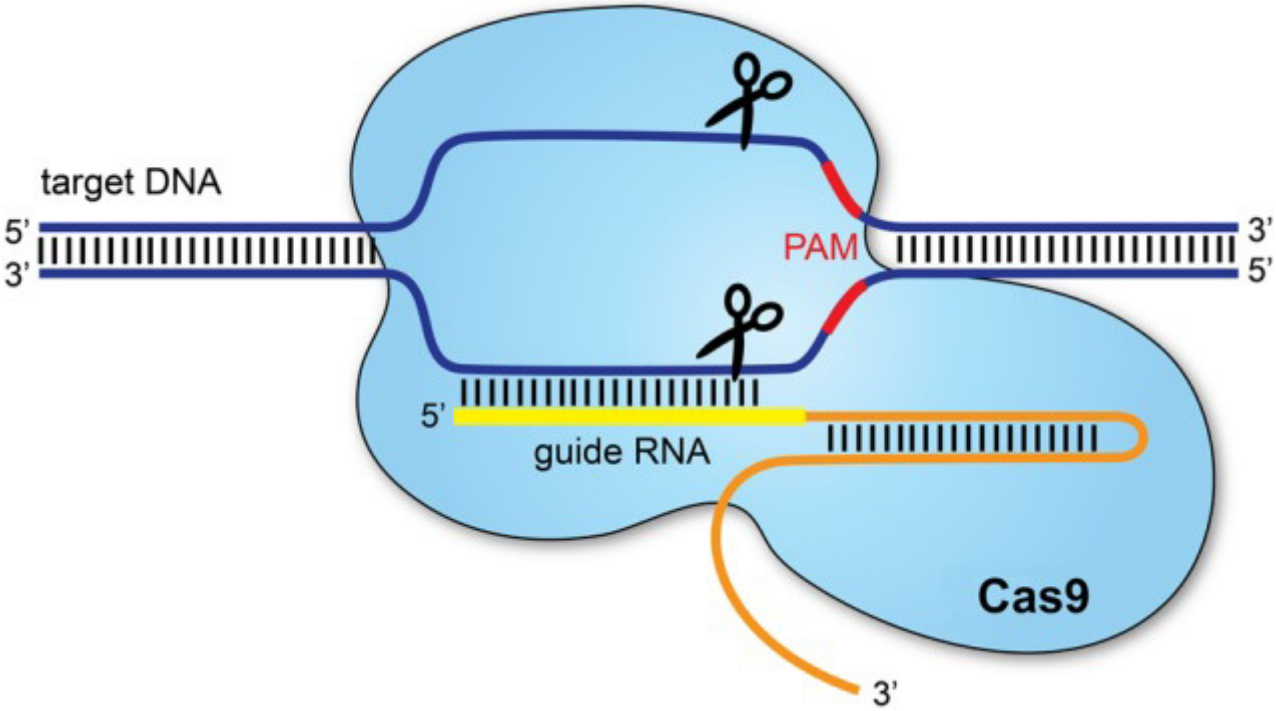


Abb. 3: Unveränderte Grafik von (Redman et al. 2016) mit veränderter Bildbeschreibung nach der Lizenz (CC BY 4.0 Darstellung des CRISPR-Cas9 Systems. Für den gewünschten Schnitt einer DNA wird eine spezifische Sequenz zur Erkennung benötigt. Die Ziel-DNA (dunkelblau) wird von dem Cas Enzym mit Hilfe der homologen

Sequenz einer Führungs-RNA (guide-RNA in gelb) erkannt und gebunden. Der doppelte endonukleolytische Schnitt der beiden DNA-Stränge erfolgt dann in der Nähe einer benachbarten PAM (protospacer adjacent motif) –Sequenz (rot). Nachfolgende DNA-Reparaturprozesse der Zielzelle ermöglichen nun eine Editierung des geschnittenen chromosomalen Bereiches.

Durch die so entstehende räumliche Nähe kann die Endonuklease Cas9 den DNA-Abschnitt gezielt schneiden und einen Doppelstrangbruch hervorrufen. Nun kann der gewünschte DNA-Abschnitt (in dem Fall dieser Arbeit das GFP-Gen) hinzugefügt werden. An seinen Enden muss dieser DNA-Abschnitt eine überlappende Sequenz mit je einem der Enden der Schnittstelle haben. Nun erfolgt die DNA-Reparatur über zwei mögliche Mechanismen. Die erste Möglichkeit ist die nichthomologe Endverknüpfung, bei der zufällig DNA eingefügt oder gelöscht wird (Chatterjee und Walker 2017). Die zweite Möglichkeit ist die homologe Rekombination, bei der ein homologer DNA-Abschnitt als Reparaturvorlage genutzt wird. Dieser homologe DNA-Abschnitt kann gemeinsam mit der gewünschten Sequenzänderung eingebracht werden und ermöglicht somit die Genom-Editierung. Über die zelleigene DNA-Reparatur der homologen Rekombination verbindet die Zelle selbst nun den originalen DNA-Strang mit der hinzugefügten DNA.

Diese Technik ist weit verbreitet in der Grundlagenforschung (Rodríguez-Rodríguez et al. 2019). Sie ermöglicht die Untersuchung der Funktion einzelner Gene. Durch CRISPR/Cas werden diese Gene ausgeschnitten und das Verhalten dieser Zellen mit dem von Zellen mit dem Wildtyp verglichen. So können gut Rückschlüsse auf die Funktion der Gene gezogen werden. Dieses Prinzip wird in dem dritten Experiment genutzt (siehe 2.2.4 und 3.3).

1.4.1 Erstellung des HT1080 p21-/- Klons

In den Experimenten dieser Arbeit (siehe 2.2.4) wird ein HT1080 p21-/- Klon verwendet, dessen Funktion von p21 ausgeschaltet wurde. Dieser wurde folgendermaßen in Vorarbeiten des gastgebenden Instituts erstellt:
Im genomischen Kontext erfolgte der Schnitt mit Cas 9 am Beginn des zweiten Exons von p21. In Abbildung 4 Teil A ist der genomische Kontext grafisch dargestellt.
Nachdem das *Genome Editing* durchgeführt wurde, erfolgte eine Kontrolle, ob die DNA Veränderung erfolgreich war. Dies ist wichtig, um sicherzustellen, dass die Funktion von p21 ausgeschaltet ist. Zugleich soll sich keine andere Veränderung in der DNA ergeben, die die Funktionsweise der Zellen verändern oder beeinträchtigen würde. Als Kontrolle wurde eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt (siehe Abbildung 4 Teil B).

Kontrolle des erfolgreichen DNA-Editierens zur Erstellung von p21-/-

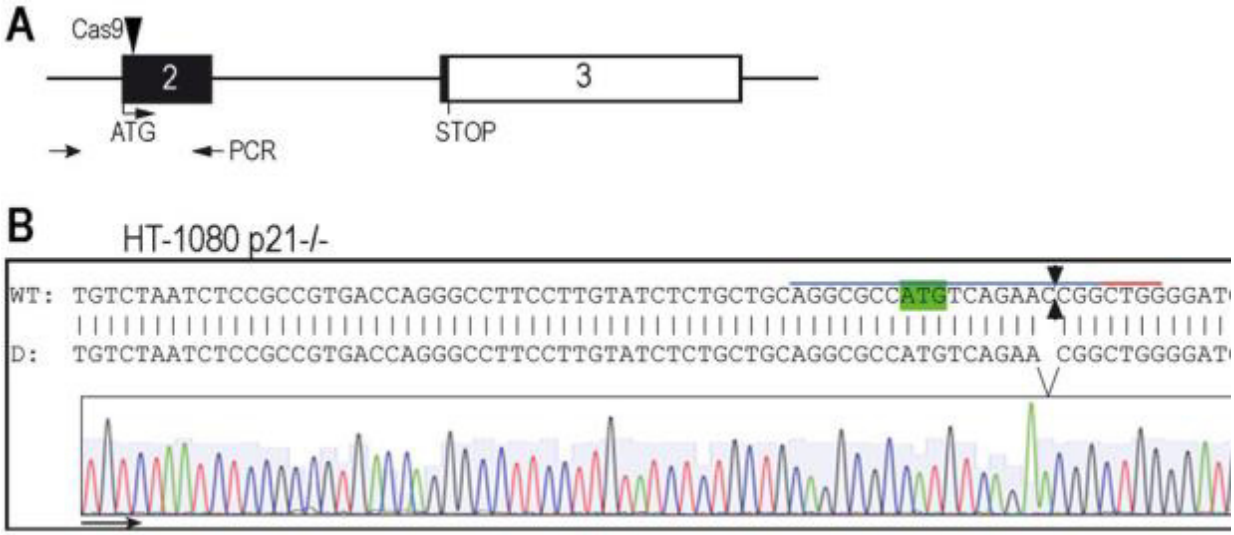


Abb. 4: Aus bisher unveröffentlichten Vorarbeiten des gastgebenden Instituts. Darstellung der Kontrolle einer erfolgreichen Ausschaltung von p21 mit Hilfe von CRISPR/Cas 9. In Teil A sieht man den genomischen Kontext des p21-Gens. Die schwarzen Felder in Exon 2 und 3 stellen den codierenden Bereich dar. Mit dem Pfeil ist die Stelle markiert, an dem mit der CRISPR/Cas 9 Methode ein Doppelstrangbruch gesetzt wurde. Teil B zeigt die DNA-Sequenzanalyse des Wildtyps (WT) und die Sequenzanalyse nach stattgehabter DNA-Editierung (D). Das Startcodon für p21 ist grün markiert. Die Pfeile zeigen die Schnittstelle des Cas 9 an.

In der Abbildung 4 Teil B werden die DNA-Sequenz des Wildtyps und die DNA-Sequenz des editierten Klons gegenübergestellt. Das Startcodon des p21 Gens ist grün markiert und die Schnittstelle des Cas 9 ist mit Pfeilen angezeigt. Bei dem Klon ist gut zu sehen, dass auf beiden Allelen eine Ein-Basenpaar-Deletion stattgefunden hat. Dies führt zu einem Verrutschen des Leserasters, weshalb kein funktionales p21 Protein mehr exprimiert werden kann. Zusätzlich sind keine weiteren Veränderungen in der DNA-Sequenz zu sehen. Somit kann angenommen werden, dass die restliche Integrität der DNA erhalten und die Zellen voll funktionsfähig sind. Zur abschließenden Kontrolle wurde noch ein Westernblot von den Wildtyp-Zellen und von dem p21-/- Klon durchgeführt (Abbildung 5). Hier ist keine Akkumulation von p21 bei dem p21-/- Klon nach Schädigung mit Röntgenstrahlen nachweisbar. Der Wildtyp fungiert als Kontrollgruppe und weist nach Schädigung mit Röntgenstrahlen eine p21-Expression auf.

Westernblot als Erfolgskontrolle der Erstellung des p21-/- Klon

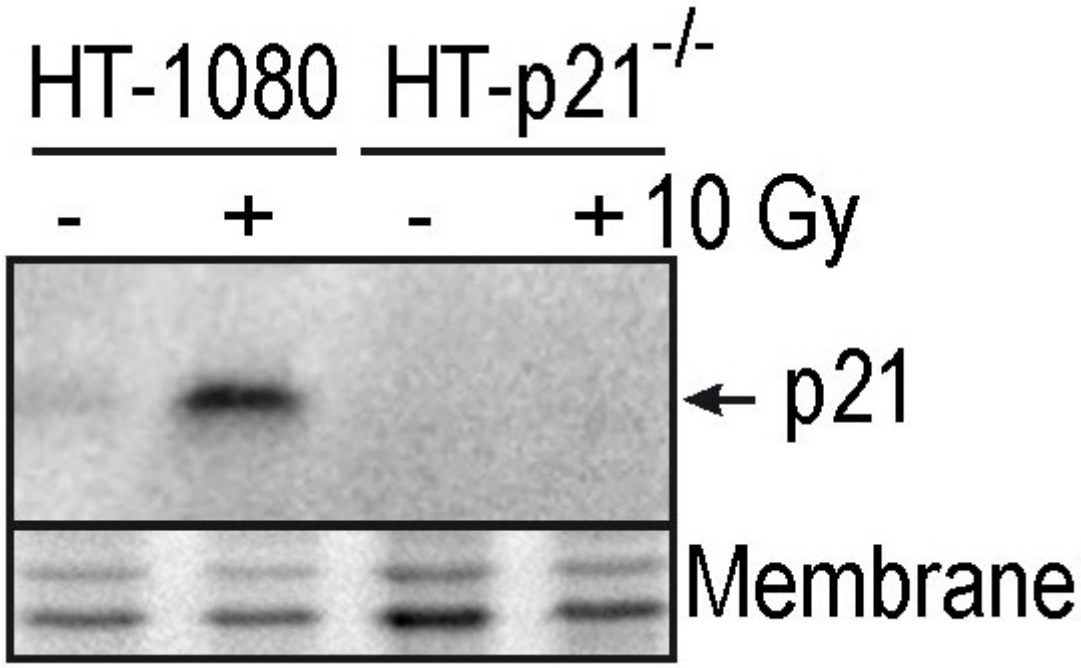


Abb. 5: Aus bisher unveröffentlichten Arbeiten des gastgebenden Instituts. Westernblot zur Erfolgskontrolle der Editierung. Es wird auf der linken Seite der Wildtyp vor (-) und nach (+) Bestrahlung mit 10 Gray Röntgenstrahlen gezeigt. Auf der rechten Seite ist der editierte Klon mit p21-/- vor (-) und nach (+) mit 10 Gray Röntgenstrahlen dargestellt. Die Akkumulation von dem Protein p21 ist auf dem Westernblot mit einem Pfeil markiert.

Die Methode der CRISPR/Cas9 Genom-Editierung wurde ebenfalls eingesetzt, um ein p21-GFP Fusionsprotein zu erstellen.

1.4.2 Erstellung und Erfolgskontrolle eines p21-GFP-exprimierenden Klons

Wie bereits beschrieben, wird für die Experimente ein HT1080 Klon benötigt, der ein p21-GFP Fusionsprotein exprimiert. Mit diesem Fusionsprotein kann die p21 Expression mittels der Grünfluoreszenz quantifiziert werden. Dieser Klon wurde mit Hilfe der CRISPR/Cas 9 Methode in Vorarbeiten des gastgebenden Instituts erstellt. Die Editierung wird in Abbildung 6 (aus bisher unveröffentlichten Vorarbeiten des gastgebenden Instituts) dargestellt. Teil A zeigt den genomischen Kontext an. Es wurde der Cas9-Schnitt (Cas9 Ex 3) am Ende des Leserasters kurz vor dem STOP-Codon gesetzt. Gleichzeitig wurde ein Rekombinationssubstart für die Homologe Rekombination in die Zellen eingebracht und somit transfiziert. Dies bestand aus dem Linken (LHA) und dem Rechten Homologen Arm (RHA), welche die korrekte Positionierung innerhalb der DNA-Sequenz gewährleisten. Dazwischen liegt die Fusion aus p21 und GFP, sodass ein p21-GFP Fusionsprotein in die DNA-Sequenz integriert wurde. Um den Erfolg des Editierens zu überprüfen wurde ein Westernblot durchgeführt (siehe Abbildung 6 Teil B). Hier wird der Wildtyp mit dem

erstellten Klon verglichen. Die Zellen wurden mit Röntgenstrahlen verschiedener Dosen bestrahlt, um eine Expression von p21 zu induzieren. Über alle Bestrahlungsstärken hinweg kann beobachtet werden, dass bei dem Klon ein deutlich größeres Protein exprimiert wird, als bei dem Wildtyp. Dies entspricht dem p21-GFP Fusionsprotein. Somit ist die Editierung erfolgreich gewesen.

Genomischer Kontext der Erstellung eines p21-GFP Klons und Erfolgskontrolle mittels Westernblot

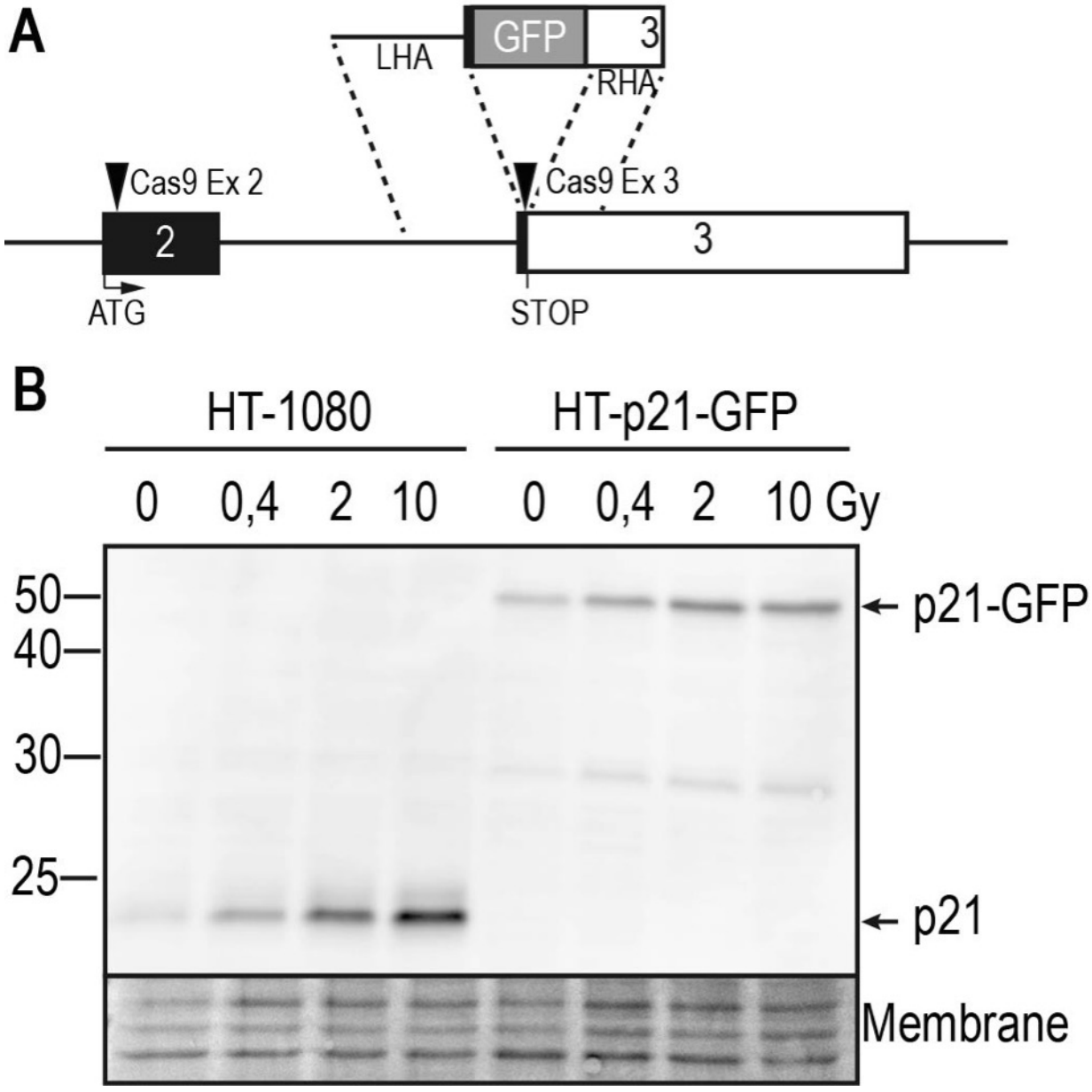


Abb. 6: Diese Abbildung ist aus bisher unveröffentlichten Vorarbeiten des gastgebenden Instituts. Darstellung der Erstellung eines HT1080 Klons, der ein p21-GFP Fusionsprotein exprimiert. In Teil A ist der genomische Kontext dargestellt, in dem die Editierung mittels CRISPR/Cas 9 erfolgte. Die Kästen entsprechen dem Exon 2 und Exon 3, ATG zeigt die Lokalisation des Startcodons von p21. An den Pfeilen sind die Schnittstellen von Cas 9 zu erkennen. Die Gensequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) wird oberhalb der Schnittstelle im Exon 3 dargestellt. LHA und RHA stehen für den linken, sowie den rechten homologen Arm, die die korrekte Positionierung innerhalb der DNA-Sequenz gewährleisten. Teil B zeigt einen Westernblot zur Erfolgskontrolle.

Auf der Y-Achse ist die Proteingröße in Kilodalton dargestellt, auf der X-Achse der Wildtyp im Vergleich zum p21-GFP Klon zu Bestrahlungsdosen von 0, 0,4, 2 und 10 Gray mit Röntgenstrahlen.

1.5 PCNA im Zellzyklus

In dem letzten Kapitel wurde beschrieben, wie die Methode CRISPR/Cas9 es ermöglicht, die p21 Expression zu visualisieren und zu quantifizieren. Für die Durchführung der Experimente ist allerdings auch eine Visualisierung des Zellzyklus nötig. Hierfür wird das Protein PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) verwendet. Die Verteilung innerhalb der Zelle und die Form von PCNA verändern sich in den verschiedenen Zellzyklusphasen (Kalfalah et al. 2015). Um diese Veränderungen sichtbar zu machen, wurde, wie in Khalfalah et al. beschrieben, der p21-GFP-exprimierende Klon zusätzlich mit einem Plasmid für ein PCNA-RFP Fusionsprotein transfiziert, welches rot fluoreszierendes PCNA exprimiert. Dies kann sowohl für die FACS-Analyse, als auch für die Beobachtung am konfokalen Mikroskop genutzt werden. Im Folgenden wird die Funktionsweise von PCNA erläutert.

PCNA ist ein Protein, welches während der DNA-Replikation in der S-Phase als Ring um die DNA liegt (vgl. im folgenden Abschnitt (Voet et al. 2019; Kalfalah et al. 2015; Dröge et al. 2018)). Es gehört zur Gruppe der Ringklemmenproteine (Kontopidis et al. 2005). Für die Synthese der DNA der Zelle in der S-Phase sind die DNA-Polymerasen entscheidend. Sie gleiten entlang der DNA und replizieren einen analogen DNA-Strang. Zentral für die DNA-Replikation sind die DNA-Polymerase δ, die sich am Folgestrang befindet, und die DNA-Polymerase ε, die sich am Leitstrang befindet (González-Magaña und Blanco 2020). Beide DNA-Polymerasen können an das Ringklemmenprotein PCNA binden und den Primer verlängern. Während einer solchen Elongationsphase bleibt PCNA kontinuierlich an den Polymerasen gebunden und verhindert ein Abrutschen vom DNA-Strang. Dadurch wird die DNA-Synthese stabilisiert und beschleunigt. Eine weitere Funktion von PCNA besteht bei der DNA-Schädigung (Cayrol et al. 1998). Nach der Induktion von p21 (siehe 1.2 und 1.3) kann dieses an PCNA binden und damit die DNA-Replikation unterbinden.
Um diese Aufgaben zu erfüllen, verteilt sich PCNA in der Zelle in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase. In der S-Phase kann man dies besonders gut beobachten, da hier die DNA-Replikation erfolgt. Die Visualisierung von PCNA durch ein rot fluoreszierendes Fusionsprotein, kann eine eindeutige Einteilung in den Abschnitt der S-Phase, aber auch in die generelle Zellzyklusphase ermöglichen (siehe Abbildung 7 (Kalfalah et al. 2015)).

Darstellung der PCNA-Verteilung in einer Zelle zu den verschiedenen Zellzyklusphasen

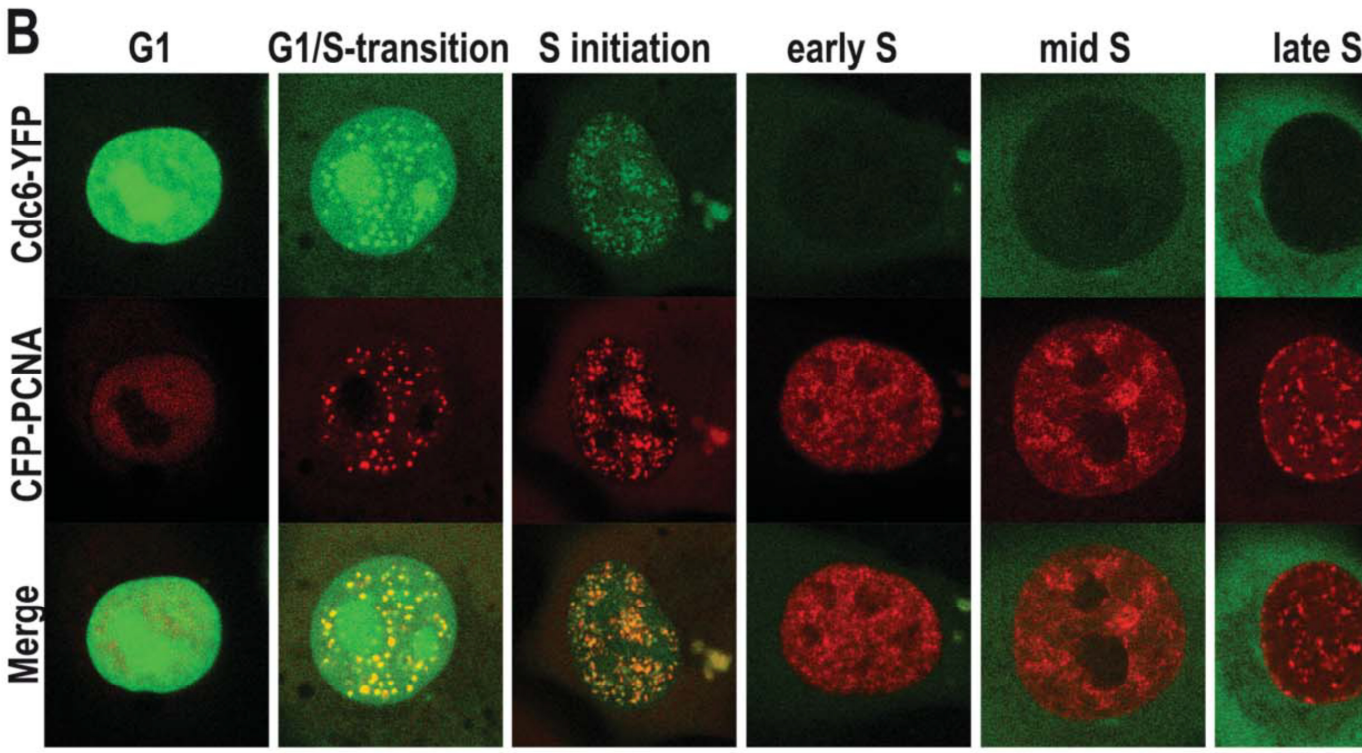


Abbildung 7: Darstellung in Anlehnung an (Kalfalah et al. 2015) nach der Lizenz(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/). Darstellung von humanen Zellen im konfokalen Mikroskop. Die Zelllinie mit rot fluoreszierendem PCNA befindet sich in der Mitte. Von links nach rechts sind die Zellzyklusphasen G1, der Übergang von der G1 in die S-Phase, die Einleitung der S-Phase, eine frühe S-Phase, die mittlere Phase der S-Phase, die späte S-Phase und die G2-Phase dargestellt.

In der Abbildung kann die Verteilung von PCNA innerhalb der S-Phase gut nachvollzogen werden. In der G1 und der G2 Phase wird PCNA nicht verwendet. Dennoch kann anhand der Zellgröße eine Unterscheidung erfolgen. Nach der DNA-Replikation ist die Zelle in der G2 Phase deutlich größer, als in der G1 Phase. Eine Abgrenzung zur S-Phase ist ebenso möglich, da in der G1 und G2 Phase keine Akkumulationen von PCNA sichtbar werden.

1.6 Hypothesen und Ziele der Arbeit

Es wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen, dass nach DNA-Schädigung die p21 Level ansteigen (Sheng et al. 2019; Barr et al. 2017). Allerdings wurde in Vorarbeiten des Instituts gezeigt, dass sich dieser Anstieg auf Einzelzellniveau sehr unterschiedlich darstellen kann (bisher unveröffentlichte Vorarbeiten des gastgebenden Instituts (Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des UKD)). In manchen Zellen erfolgte eine sofortige Induktion der p21 Expression, in anderen Zellen eine verzögerte und in einigen Zellen gar keine Induktion. Weiterhin wurde in Vorarbeiten des Instituts beobachtet, dass

die mittlere Expression von p21-GFP nach Schädigung mit Röntgenstrahlen strikt dosisabhängig ist. Es sollen nun zwei Hypothesen geprüft werden.
Als erste Hypothese wird postuliert, dass sich die Expression von p21 auch bei anderen Arten der DNA-Schädigung strikt dosisabhängig verhält.

Demnach beinhaltet das erste Experiment eine Versuchsreihe, wo Zellen mit UVA Strahlen geschädigt und die p21 Dynamik nachvollzogen wird (siehe 2.1, 3.1 und 4.1).
Nachdem die Dynamik der p21 Expression bei verschiedenen DNA-Schädigungsarten untersucht wurde, wird in dem zweiten Experiment die Bedeutung von p21 für den Zellzyklus bei den jeweiligen Schädigungsarten weitergehend analysiert. Hierfür wurde die p21-/- -Zelllinie verwendet, welche nicht mehr in der Lage ist p21 zu exprimieren, diese einer DNA-Schädigung ausgesetzt, und anschließend die Verteilung der Kultur im Zellzyklus analysiert (siehe 2.2, 3.2 und 4.2).

Die zweite Hypothese dieser Arbeit postuliert, dass die individuelle p21 Antwort abhängig ist von der Zellzyklusphase, in der die Zellschädigung stattgefunden hat.

Hierfür wird in einem dritten Experiment zunächst beobachtet, in welcher Zellzyklusphase sich die Zellen befinden, die nach einer Schädigung hohe Level an p21 exprimieren. Dies werde ich in Relation zu der ersten Hypothese im Vergleich verschiedener DNA-Schädigungsarten untersuchen (siehe 2.3, 3.3 und 4.3).
In dem abschließenden Experiment werden die aktuellen Zellzyklusphasen der Zellen identifiziert und diese daraufhin geschädigt. Nach einer Beobachtungsdauer von 48 Stunden werden die p21 Level gemessen und das Ausmaß der p21 Expression mit der zuvor gegebenen Zellzyklusphase verglichen (siehe 2.4, 3.4 und 4.4).

Die Ziele dieser Arbeit sind ein besseres Verständnis der Funktionsweise von p21 im Zellzyklus bei DNA-Schädigung. Bei einer individuellen Dynamik der p21 Expression auf unterschiedliche DNA-Schädigungsarten, besteht die Möglichkeit p21 als Marker verwenden zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien

Medien der Zellkultur

Nährmedium	Dulbecco's Modified EAGLE Medium (DMEM (1X) + GlutaMAX™-I ([+] 4.5g/l D-Glucose, [+] Pyruvate) (Gibco, Carlsbad, USA)
Modifiziertes Nährmedium für HT1080	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Modifiziertes Nährmedium für HT-p21GFP	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 µg/ml Puromycin
Medium zum Einfrieren der Zellen	(50 ml) FCS + 10% DMSO
Medium zum Mikroskopieren über 48 Stunden, live cell imaging am Konfokalen Mikroskop	Leibovitz's L-15 Medium (1X) + GlutaMAX™-I

Tabelle 1: Medien und ihre Zusammensetzung

2.1.2 Lösungen und Reagenzien

Lösungen und Reagenzien

Fetales Kälber Serum (FCS)	Gibco, Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Ca2+-; Mg2+-frei)	Gibco, Carlsbad, USA
Penicillin Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml)	Gibco, Carlsbad, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Propidium-Iodid	Sigma, St. Louis, USA
RNase A	Qiagen, Hilden, Deutschland
100% Ethanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
0,05% Trypsin-EDTA (1X)	Gibco, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma, St.Louis, USA
Puromycin	Sigma, St.Louis, USA
(S)-(+)-Camptothecin approx. 95% HPLC	Sigma, St. Louis, USA

Tabelle 2: Lösungen und Reagenzien der Experimente

2.1.3 Zelllinien

Verwendete Zelllinien

HT1080 Wildtyp	Zelllinie eines humanen Fibrosarkoms, Gekauft von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), #DSM ACC 315. Braunschweig Deutschland

HT1080 p21-GFP und PCNA-RFP	Veränderte HT1080 Zelllinie, die ein p21-GFP-Fusionsprotein und ein PCNA-RFP Fusionsprotein exprimiert
HT1080 p21-GFP	Veränderte HT1080 Zelllinie, die ein p21-GFP-Fusionsprotein, aber kein PCNA-RFP-Fusionsprotein exprimiert
HT1080 p21 -/-	Veränderte HT1080 Zelllinie, die kein p21 exprimieren kann, p21 knock-out

Tabelle 3: Zelllinien die in den Experimenten eingesetzt wurden

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

Nunc™ EasYFlask™ 25 cm^2 Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific, Waltham, USA
Nunc™ EasYFlask™ 75 cm^2 Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific, Waltham, USA
15 ml BD Falcon Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
50 ml BD Falcon Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
micro-Insert 4 Well FulTrac	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Costar Stripette 5 ml Serological Pipette	Corning, New York, USA
Costar Stripette 10 ml Serological Pipette	Corning, New York, USA
Costar Stripette 25 ml Serological Pipette	Corning, New York, USA
TipOne Pipettenspitzen 10/20 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 200 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tube 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nitrilhandschuhe L, Micro-Touch	Ansell, Richmond, Australia
Kryoröhrchen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kryoröhrchendeckel	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1-20µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Falcon FACS Röhrchen	Corning, New York, USA
Immersionsöl 518 F	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Materialien

2.1.5 Geräte

Genutzte Geräte

Röntgenbestrahlungsgerät Gulmay RS225	Gulmay Limited, Surrey, UK
EpiFluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Konfokales Fluoreszenzmikroskop Anxiovert 200M	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektiv Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil Ph3	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CO_2-Inkubator Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sterilwerkbank Heraesafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Autoklav V150	Systec, Wettenberg, Deutschland

Einfrierbehälter Cryo 1 °C Freezing Container	Nalge Nunc, Rochester, New York, USA
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Inverses Mikroskop Wilovert S	Hund Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCanto™II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Wasserbad WB20	Medingen, Dresden
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Accu-jet pro Pipette Controller	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetman P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Inkubator XL-3	PeCon, Erbach, Deutschland
UVA Lampe Sellamed 1 200	Sellas Medizinische Geräte GmbH, Gevelsberg, Deutschland
Vortexer GLW L46	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg, Deutschland
Tempcontrol 37-2 digital	PeCon, Erbach, Deutschland
Argon-Ionen und Helium-Neon-Laser	Lasos Lasertechnik GmbH, Jena, Deutschland

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte

2.1.6 Software

Verwendete Software

Adobe Photoshop CS4	Adobe, San Jose, USA
Adobe Illustrator CS6	Adobe, San Jose, USA
BD FACSDiva Software	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Cytometer Status	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism 5.0f	GraphPad Software, San Diego, USA
IBM SPSS Statistics 26	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
LSM Image Browser	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
MetaMorph V6.3r6	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmont, USA
Zeiss LSM 510	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Citavi 6.5	Swiss Academic Software

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software

2.1.7 Sonstiges

Weitere Materialien

Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS Clean	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Alkoholhaltiger Reiniger	VWR, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 7: Auflistung der weiteren verwendeten Materialien

2.2 Methoden

2.2.1 Methodik der Arbeit

Für die Experimente werden Fibrosarkom Zellen der Zelllinie HT1080 verwendet. Bei diesen Zellen wurde in Vorarbeiten des gastgebenden Instituts p21 mit Hilfe eines grün fluoreszierenden Proteins GFP sichtbar gemacht. Hierfür wurde durch die CRISPR/Cas9 Technik am Ende des p21-Leserasters ein Doppelstrangbruch in der DNA eingeführt und gleichzeitig das GFP-Gen als Rekombinationssubstrat in die Zellen eingebracht (Ma et al. 2014). Durch die zelleigene homologe Rekombination wurde bei manchen Zellklonen nun die GFP-Sequenz *in frame* an der Stelle des STOP Codons des p21 Gens angefügt. Wird bei diesen Zellklonen nun das p21 Gen transkribiert, wird ein Fusionsprotein aus p21 und GFP exprimiert. Die Expression von p21-GFP kann unter einem Fluoreszenzmikroskop in der lebenden Zelle beobachtet werden. Dadurch können einzelne Zellen und deren p21 Expression über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachten werden. Zusätzlich exprimieren die Zellen ein Fusionsprotein aus dem Zellzyklusmarker Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und einem roten Fluoreszenzprotein (PCNA-RFP). PCNA ist ein Protein, welches während der Replikation die DNA als Ring umgibt (Strzalka und Ziemienowicz 2011). Anhand der Form und Verteilung der roten Fluoreszenz, welche der des PCNAs entspricht, kann der Zellzyklus abgeschätzt werden, da sich G1, S und G2 Phase sichtbar unterscheiden. Dies ermöglicht es den Zellzyklus einzelner Zellen zum Zeitpunkt einer DNA-Schädigung zu bestimmen und die folgende p21-GFP Expression zu messen. Um die erste Hypothese (siehe 1.6) zu prüfen, werde ich diese Zellreihe mit Camptothecin, einem Zytostatikum was die Topoisomerase I hemmt und dadurch Einzelstrangbrüche in der chromosomalen DNA induziert, behandeln und unter einer 48 Stunden Aufnahmeserie die Zunahme der p21 Expression über eine Bilderserie nachverfolgen. Zu Beginn der Serie werde ich anhand der PCNA Verteilung das Stadium des Zellzyklus bestimmen, in der die CPT-Behandlung stattgefunden hat. So kann nachgewiesen werden, ob die p21 Expression von der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Schädigung abhängig ist. Um die zweite Hypothese (siehe 1.6) zu prüfen, wurden in einem anderen Ansatz die Zellen mit unterschiedlichen Dosen an UVA Strahlen geschädigt und es wurde gemessen, ob sich Unterschiede in der p21 Expression zur Schädigung mit Röntgenstrahlen ergeben. Die geschädigten Zellen wurden am FACS-Gerät nach der Intensität ihrer mittleren Grünfluoreszenz, welche den Anteil der p21 Expression darstellt, vermessen. Somit wird die DNA-Schädigung über das FACS-Gerät quantifiziert und es wird die dosisabhängige Kinetik der p21 Expression gemessen. Bei den verwendeten Zellen in dieser experimentellen Arbeit handelt es sich um die Tumorzelllinie HT1080.

2.2.2 Zellkultur

In diesem Kapitel werden zunächst die Methoden der Zellkultur dargestellt. Diese stellen die Basis für die Experimente dar, welche in den drei folgenden Kapiteln erläutert werden.

2.2.2.1 Auftauen einer Zelllinie zur Kultivierung

Die für die Experimente genutzten Zelllinien HT1080 Wildtyp und HT1080 p21-GFP sind Bestandteil des kryokonservierten Vorrats des gastgebenden Instituts. Zu Beginn der experimentalen Arbeiten wurden diese aufgetaut.
Die Zellen liegen in einem Einfriermedium aus 50 ml FCS und 10% DMSO in Plastikröhrchen in einem flüssigen Stickstofftank vor. Das DMSO dient dabei als Gefrierschutz, ist nach dem Auftauen allerdings schädlich für die Zellen. Deshalb empfiehlt sich ein schneller Auftauprozess, um das DMSO frühzeitig entfernen zu können.
Zunächst wird das korrekte Plastikröhrchen aus dem flüssigen Stickstofftank mit entsprechender Schutzausrüstung entnommen. In dem Labor des gastgebenden Instituts werden hierfür kältefeste Handschuhe und ein Gesichtsschutz verwendet. Das Röhrchen wird in einem Wasserbad bei 37 °C zügig erwärmt. Nachdem sich die Zellsuspension verflüssigt, werden 8 ml NM hinzugefügt und in einen Falcon Tube 10ml umgefüllt. Dieser wird für 3 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Somit setzen sich die Zellen als Aggregat ab und der Überstand kann abpipettiert werden. Das verbliebene Zellpellet wird aufgeschüttelt und mit 5 ml NM aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Diese kann nun kultiviert werden.

2.2.2.2 Kultivierung einer Zelllinie

Um eine Zelllinie angemessen zu kultivieren, wird diese im Laufe einer Woche dreimal umgesetzt, damit ein Mangel an Nährstoffen (*serum starvation*) und eine Wachstumshemmung durch benachbarte Zellen verhindert werden kann.
Eine bestehende, konfluent bewachsene Kulturflasche wird folgendermaßen behandelt: Unter der Sterilwerkbank wird zunächst das verbliebene Medium mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt. Dann wird die Kultur mit DPBS gewaschen (Mengenangaben siehe Tabelle 8) und die Flasche einige Sekunden verschlossen geschwenkt. Der Puffer wird wieder abgesaugt. Daraufhin kann 0,05% Trypsin-EDTA hinzugefügt werden, um die fest gewachsenen Zellen von dem Flaschenboden zu lösen. Dieser Vorgang kann einige Minuten dauern und wird durch Schwenken der Flasche unterstützt. Wenn bei dem Schwenken der Flüssigkeitsspiegel Schlieren mit sich zieht, sind die Zellen gelöst. Dann wird die Flasche mehrmals von der Seite beklopft, um Zellnester voneinander zu lösen. Die Zellen können nun in NM aufgenommen werden und in beliebiger gewünschter Verdünnung in eine neue Flasche überführt werden. Diese sollten zuvor mit ausreichend NM befüllt werden. Die Zellen werden danach in den Inkubator überführt und bei 37 °C und 10% CO_2 inkubiert.

Mengenangaben der Zellkulturen

Kulturflasche	25 cm^2	75 cm^2	175 cm^2
DPBS	5 ml	10 ml	15 ml
Trypsin EDTA	0,5 ml	1 ml	3 ml
NM	5 ml	10 ml	25 ml

Tabelle 8: Es werden die verschiedenen Reagenzien gegen die drei Größen der Kulturflaschen aufgetragen. Einheiten sind ml: Milliliter, cm^2: Quadratzentimeter

2.2.2.3 Kryokonservierung einer Zelllinie

Die verwendeten Zelllinien wurden nach erster Kultivierung erneut kryokonserviert, um einen Vorrat an Zellen zu erhalten, sollte eine Zellkultur unerwartet vollständig versterben. Für die Kryokonservierung wird eine Kulturflasche zunächst mit PBS gewaschen, trypsiniert und dann in 7ml NM aufgenommen (siehe 2.2.2.2 Kultivierung einer Zelllinie). Diese Suspension kann nun in einen Falcon Tube 15 ml aufgenommen werden. Dieser Tube kann nun in der Zentrifuge bei 1200 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert werden. Der Überstand kann wieder abpipettiert werden. Das verbleibende Zellpellet wird aufgeschüttelt und mit dem Einfriermedium versetzt, welches aus 50 ml FCS und 10% DMSO als Gefrierschutz besteht. Diese Suspension wird nun in Plastikröhrchen mit je 1 ml gefüllt und in einem Behälter mit Isopropanol in dem – 80°C Gefrierschrank gleichmäßig abgekühlt. Die langsame und gleichmäßige Abkühlung verbessert die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen. Nach einigen Tagen kann dieses Röhrchen in den Flüssigstickstofftank überführt werden.

2.2.3 Analysen zur mittleren Fluoreszenz am FACS-Gerät nach UVA Schädigung

In diesem Kapitel werden die Methoden dargestellt, welche angewandt wurden, um die Zellen mit UVA Strahlen zu schädigen und die darauffolgende p21-GFP Induktion zu messen.

2.2.3.1 Zyklus der Zellkultur

Für dieses Experiment wurde ein kontinuierlicher Wochenrhythmus etabliert, um die Vergleichbarkeit der Versuchsreihen zu erhöhen.
Der Zyklus beginnt mit einer konfluenten kleinen Kulturflasche (25 cm^2) der Zelllinie HT1080 Wildtyp und einer konfluenten mittleren Kulturflasche (75 cm^2) der Zelllinie HT1080 p21-GFP.
Am Montag werden beide Zelllinien zunächst in der Verdünnung 3/5 umgesetzt. Dies bedeutet, dass die freien trypsinierten Zellen in 5 ml NM aufgenommen werden und 3 ml dieser Suspension in eine neue Flasche überführt wurden. Dies erfolgt analog für HT1080 Wildtyp in eine kleine Flasche und für HT1080 p21-GFP in eine mittlere Flasche. Durch diese Verdünnung sind die Kulturen am nächsten Tag wieder konfluent. Diese erste Umsetzung ermöglicht es den Zellen sich wieder zu teilen und überführt die meisten Zellen aus der G0-

Ruhephase in den Zellzyklus. Am Dienstag können diese Zellen bereits für die Experimentalreihe ausgesät werden. Zunächst werden die Zellen der kleinen Flasche der Zelllinie HT1080 Wildtyp in 5 ml NM aufgenommen und in 1/10 sowie in 3/5 je in eine kleine Flasche überführt. Die 1/10 Verdünnung dient als Erhaltungszellkultur für Freitag. Aus der 3/5 Verdünnung wird am nächsten Tag die unbehandelte Kontrollgruppe für Freitag ausgesät.
Die Zellen der mittleren Flasche der Zelllinie HT1080 p21-GFP werden in 10 ml aufgenommen. Da diese Zellen nun in kleine Flaschen überführt werden, muss bei der Verdünnung die Fläche berücksichtigt werden: 75 cm^2/ 25 cm^2 =3. Daraus ergeben sich folgende Werte für die Verdünnung: siehe Tabelle 9.

Verdünnungsgrade

Verdünnung	Menge in µl
3/5	2000
1/10	333
1/8	417
1/6	556
1/4	833

Tabelle 9: Verhältnis der Verdünnung zur Menge des NM

Es wird nun eine kleine Flasche im Verhältnis 1/8 für Freitag als Erhaltungszellkultur kultiviert. Eine weitere kleine Flasche wird im Verhältnis 3/5 für Mittwoch kultiviert, um diese erneut umzusetzen und als unbehandelte Kontrollgruppe am Freitag zu nutzen. Dieser Schritt ist notwendig, damit am Freitag eine Kultur vorliegt, welche keine p21 Induktion durch zu dichtes Wachstum innerhalb der Kulturflasche erleidet. Eine Induktion dieser Art würde die Kontrollgruppe verfälschen. Nun werden weitere fünf Flaschen für die Bestrahlung am Mittwoch ausgesät. Die Verdünnung wird der Belastung durch die Bestrahlung angepasst, da dies zu dem Verlust einiger Zellen führt und eine ähnlich dichte Bewachsung der einzelnen Kulturflaschen wünschenswert ist (siehe Tabelle 10).

Verdünnung in Abhängigkeit zur Bestrahlung

Verdünnung	UVA Bestrahlung J/cm^2
1/10	5
1/8	10
1/6	20
1/4	40
1/4	60

Tabelle 10: Verdünnung in Relation zu der Strahlenbelastung

Am Mittwoch werden die Kulturflaschen der Experimentalreihe bestrahlt (siehe 2.2.3.2 Bestrahlung mit UVA) und das Medium dieser Flaschen ausgetauscht. Dieser Schritt erfolgt, um einen thermischen Schaden zu verhindern und die Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen. Zusätzlich werden die beiden Flaschen für die unbehandelte Kontrollgruppe für Freitag kultiviert. Die Zelllinie HT1080 Wildtyp im Verhältnis 1/15 und die Zelllinie HT1080 p21-GFP im Verhältnis 1/14.

Am Donnerstag erfolgen keine Maßnahmen, da die Zellen der Experimentalreihe 48 Stunden benötigen, um das Fusionsprotein p21GFP auf die Schädigung durch die UVA Strahlung zu exprimieren.
Am Freitag werden die Zellen der Experimentalreihe geerntet. Dafür erfolgen die üblichen Schritte der Zellkultur zur Ablösung der Zellen. Die Zellen werden in 2 ml NM aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Erhaltungszellkulturen werden wieder für den nächsten Zyklus vorbereitet. Hierfür wird die Linie HT1080 Wildtyp in 1/10 Verdünnung in eine kleine Flasche überführt. Die Linie HT1080 p21-GFP wird in 1/8 Verdünnung in eine mittlere Flasche überführt. Hierbei muss wieder das Verhältnis der Fläche berücksichtigt werden. Am Montag der nächsten Woche kann nun dieser Zyklus wiederholt werden.

2.2.3.2 Bestrahlung mit UVA

Am Mittwoch des Zyklus werden die Zellen der Experimentalreihe bestrahlt.
Hierfür werden die Zellen in ihren Kulturflaschen belassen. Um verschiedene Bestrahlungsintensitäten zu erreichen, werden unterschiedliche Bestrahlungszeiten verwendet (siehe Tabelle 11).
Um diese Zeiten zu ermitteln, wurde zu Beginn eine Messung mit einer kleinen Flasche und 5 ml NM durchgeführt, unter die ein UVA Sensor platziert wurde. Diese Eichmessung hat eine Bestrahlungsstärke von 0,05871 $\frac{J}{s*cm^2}$ ergeben. Dies berücksichtigt auch die Strahlenverluste durch das Plastik der Flasche. Aus diesem Wert ergeben sich die Bestrahlungszeiten.

Benötigte Bestrahlungsdauer

Bestrahlungsstärke J/cm^2	Bestrahlungsdauer Minuten + Sekunden
5	1+24
10	2+48
20	5+36
40	11+12
60	16+48

Tabelle 11: Bestrahlungsdauer im Verhältnis zur Bestrahlungsstärke

Der Versuchsaufbau beinhaltet einen Schrank mit der UVA Lampe. In diesem Schrank befindet sich eine Box aus Styropor, um die zu bestrahlenden Flaschen auf die richtige Höhe zu der Lampe zu bringen. Auf der Box steht eine Metallplatte, welche zu Beginn des Versuchs mit destilliertem Wasser benetzt wird. Diese Maßnahme ist notwendig, da sich die Kulturflaschen sonst durch die UVA Bestrahlung erhitzen und ein thermischer Schaden der Zellen die Versuchsergebnisse verfälschen würde. Auf diese benetzte Metallplatte können nun die Kulturflaschen gelegt und entsprechend ihrer Bestrahlungsstärke unterschiedlich lange bestrahlt werden. Bevor die erste Flasche bestrahlt wird, kann die UVA Lampe 5 Minuten vorglühen, um ihre maximale Bestrahlungsstärke zu erreichen.
Nach Beendigung der Bestrahlung wird bei den Zellen das NM ausgewechselt und es folgt eine Inkubation von 48 Stunden bei 37 °C und 10% CO_2.

2.2.3.3 Analyse am FACS-Gerät

Am Freitag werden die Zellen geerntet und am FACS Gerät mittels einer Durchflusszytometrie analysiert. Diese beurteilt die Zellen mit Hilfe eines Lasers und einer Kamera bezüglich deren Form, Größe, Granularität und Fluoreszenz. Die Software des FACS-Geräts wurde so eingestellt, dass die Fluoreszenzintensität der Zellen (FITC-A) gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen wird. Zu Beginn der Messung werden die einzelnen Proben kurz gevortext, um die Zellen zu resuspendieren. Als erstes wurde dann die unbehandelte HT1080 Wildtyp Zelllinie und die unbehandelte HT1080 p21-GFP Linie gemessen. Diese Messungen sind die Grundlage, um die Spannungen des FACS-Geräts einzustellen und eine Vergleichbarkeit der Versuchsreihen zu ermöglichen. Die Spannung des Geräts für FITC-A wurde so angepasst, dass bei dem unbehandelten HT 1080 Wildtyp die Zellzahl bei einer Intensität des zweiten Skalenstrichs von 10^2 begann (siehe blauer Strich in Abbildung 8).

Illustration zur Einstellung der Gerätespannung

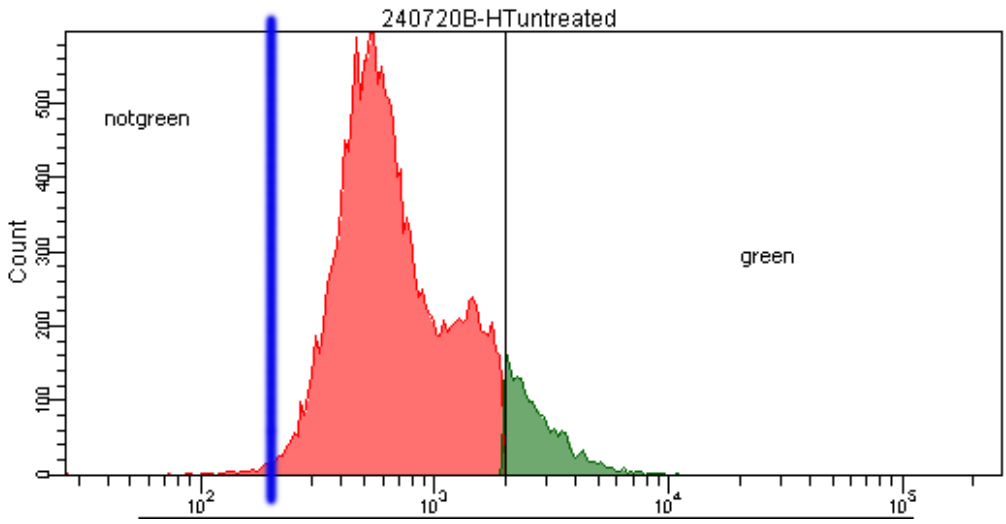


Abb. 8: Einstellung der Gerätespannung anhand des Zellzahlanstiegs. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, auf der X-Achse die mittlere Grünfluoreszenz. Es wurde ein Gate definiert, ab welchem die Zellen als grün und somit p21-GFP exprimierend gewertet werden. Der rot markierte Bereich umfasst die Zellen, welche nicht als p21-GFP exprimierend gewertet werden. Der blaue Strich markiert die Stelle, auf den der Anstieg der Zellzahl normiert wurde.

Danach wurden die Messungen für die bestrahlten Zellen durchgeführt. Die Messungen wurden je nach einer Zahl von 20.000 gemessenen *events* des FACS-Geräts beendet. Nach Durchführung der Messung wurden die Zellen entsorgt.

2.2.4 Zellzyklusanalyse am FACS in Relation zur p21-GFP Expression von HT1080 p21 -/- im Vergleich zum Wildtyp

In diesem Kapitel wird die Zellzyklusanalyse von HT1080 Wildtyp Zellen und HT1080 p21 -/- Zellen und deren Behandlung mit CPT, Röntgenstrahlen und UVA Strahlen beschrieben.

2.2.4.1 Zyklus der Zellkultur

Der Zyklus beginnt mit zwei kleinen Flaschen der Zellreihen HT1080 Wildtyp und HT1080 p21 -/-. Diese werden am Montag jeweils im Verhältnis 3/5 für den Dienstag umgesetzt um am nächsten Tag konfluente Zellkulturen zu erhalten.
Am Dienstag werden für die Zellreihen jeweils vier kleine Flaschen in den Verdünnungen 1/3, 1/8, 1/8 und 1/8 als Experimentalreihe umgesetzt. Eine weitere kleine Flasche wird im Verhältnis 1/8 als Erhaltungszellkultur gesplittet.
Am Mittwoch werden von jeder Zellreihe drei der im Verhältnis von 1/8 umgesetzten Kulturen geschädigt. Dies erfolgt über eine Vergiftung mit CPT (siehe 2.2.6.3), eine Bestrahlung mit 60 J/cm^2 UVA (siehe 2.2.3.2) und eine Bestrahlung mit 5 Gray Röntgenstrahlen (siehe 2.2.4.3). Die Kulturen, die im Verhältnis 1/3 umgesetzt wurden, dienen als gefärbte unbehandelte Kontrollgruppe. Diese können nun bereits am Mittwoch fixiert werden (siehe 2.2.4.2).
Am Donnerstag erfolgt keine Behandlung, da die Zellen 48 Stunden benötigen, um ausreichend auf die DNA-Schädigung zu reagieren.
Am Freitag werden die Zellen der Experimentalreihe geerntet, fixiert und mit Propidium-Jodid gefärbt (siehe 2.2.4.2). Die Kultur der Kontrollgruppe wird nun ebenfalls gefärbt. Aus den Erhaltungszellkulturen werden je ein 1/8 wieder als Erhaltung umgesetzt. Die verbleibenden Zellen werden als unbehandelte und ungefärbte Kontrollgruppe genutzt. Demnach werden diese Zellen nur fixiert und nicht gefärbt. Nun ist es möglich am FACS-Gerät die Zellen der beiden Zellreihen zu analysieren (siehe 2.2.4.4).
Der Zyklus beginnt am Montag erneut.

2.2.4.2 Fixierung und Färbung der Zellen

Die Zellen werden für diesen Schritt zunächst, wie bekannt, geerntet und in 5 ml NM aufgenommen. Diese Suspension kann nun in einen 15 ml Falcon Reaktionsröhrchen überführt werden. Als nächstes werden die Zellen für 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Medium kann danach abgesaugt werden und das Zellpellet in 2 ml eiskaltem DPBS gewaschen werden. Die so entstandene Suspension wird erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml eiskaltem DPBS resuspendiert. Zusätzlich werden 3 ml eiskaltes 100 % Ethanol dazugegeben. Nach einer guten Durchmischung wird das Röhrchen nun 30 Minuten bis mehrere Tage bei -20°C gekühlt, um die Zellen zu fixieren.

Um die Zellen zu färben, werden diese wieder abzentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml eiskaltem DPBS gewaschen. Dieser Schritt wird nun ein weiteres Mal durchgeführt, um die Ethanolreste auszuwaschen. Die Zellen werden erneut zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dann wird die Färbelösung Propidium-Iodid-Triton hergestellt. In 9,5 ml DPBS werden 100 µl einer 10% Tritonlösung, 200 µl einer 100 mg/ml Mischung RNAse und 200 µl einer 1 mg/ml Propidium-Iodid-Lösung gelöst und gut durchmischt.
Das Zellpellet wird nun in 500 µl der Färbelösung resuspendiert und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann kann die Analyse am FACS-Gerät erfolgen.

2.2.4.3 Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Die Kulturflaschen der zu bestrahlenden Zellreihen werden in einer Styroporbox zu dem Bestrahlungsgerät transportiert, um eine Auskühlung der Zellen zu vermeiden. Das Gerät verfügt über eine Kammer, in der die Röntgenbestrahlung erfolgt. Diese Kammer ist mit einem Eisentor verschlossen, um Strahlenschäden des Personals zu verhindern. Zunächst wird das Tor der Kammer geöffnet und die Kulturflaschen zentral im Bereich der Bestrahlungsfläche positioniert. Dann kann das Tor wieder geschlossen werden. Nun kann eine Bestrahlungsstärke von 5 Gray eingestellt werden. Hierfür werden eine Spannung von 150 kV und eine Stromstärke von 15 mA eingestellt. Die Bestrahlungsdauer beträgt 6 Minuten und 57 Sekunden. Nach Eingabe der Parameter kann der Sicherheitsschlüssel auf „Standby“ umgelegt werden, um eine Bestrahlung zu ermöglichen. Die Bestrahlung beginnt mit der Aktivierung des Bestrahlungsknopfes. Nach der Bestrahlungsdauer, wird der Sicherheitsschlüssel wieder umgelegt und das Tor geöffnet, um die Zellen zu entnehmen. Nach der Bestrahlung ist kein Mediumwechsel nötig und es erfolgt eine 48 stündige Inkubation der Zellen bei 37 °C und 10% CO_2.

2.2.4.4 Analyse am FACS-Gerät

Bei der Analyse am FACS-Gerät werden die Zellen der Zelllinie HT1080 Wildtyp mit der Zellreihe HT1080 p21 -/- verglichen. Die beiden Zellreihen werden jeweils nach Vortexen der FACS-Röhrchen mit der Kontrollgruppe und der Experimentalgruppe (CPT-Vergiftung, UVA Bestrahlung und Röntgenbestrahlung) am FACS-Gerät gemessen. Die Messung wird nach 20.000 *events* beendet. Die grafische Darstellung erfolgt über die Anzahl der Zellen aufgetragen gegen die Rotfärbung PE-A. Da die Färbung mit Propidium-Jodid den DNA-Gehalt widerspiegelt, kann von der Verteilung ein Rückschluss auf den Zellzyklus gezogen werden. Zellen, die sich in der G2-Phase befinden, haben doppelt so viel DNA, wie solche in der G1-Phase. Demnach wurden Bereiche innerhalb der Grafik definiert, welche der Zellen in G1-Phase, in S-Phase und in G2-Phase entsprechen (siehe Abbildung 9).

Exemplarische Darstellung der Gates zur Bestimmung des Zellzyklus

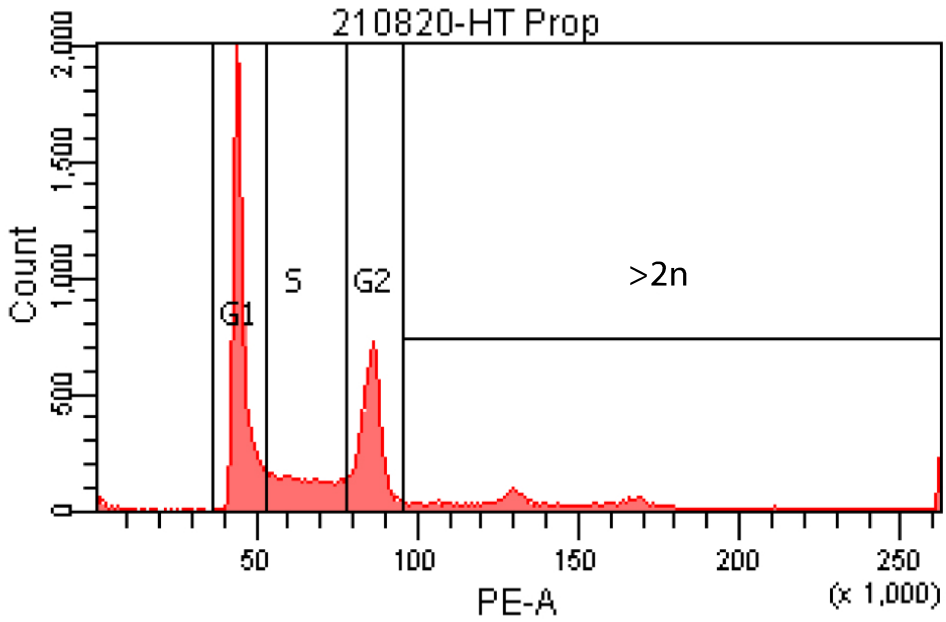


Abb. 9: *Gating* der Zellzyklusphasen am FACS. X-Achse: Intensität der Rotfärbung mit Propidium-Iodid, y-Achse: Zellzahl. Die Gates entsprechen den Zellzyklusphasen G1: erste Lücke, S: Synthesephase, G2: zweite Lücke und >2n: Messungen mit mehr als zwei DNA-Sätzen.

Nach der Messung wurden die Proben entsorgt

2.2.5 Zellzyklusanalyse am FACS in Relation zur p21-GFP Expression von HT1080 p21-GFP Zellen ohne Tag-RFP

In diesem Kapitel wird die Zellzyklusanalyse von HT1080 Wildtyp Zellen und von HT1080 p21-GFP Zellen ohne Tag-RFP und deren Behandlung mit CPT, Röntgenstrahlen und UVA Strahlen beschrieben.

2.2.5.1 Zyklus der Zellkultur

Der Zyklus beginnt mit zwei kleinen Flaschen der Zellreihen HT1080 Wildtyp und HT1080 p21-GFP ohne Tag-RFP. Diese werden am Montag jeweils im Verhältnis 3/5 für den Dienstag umgesetzt um am nächsten Tag konfluente Zellkulturen zu erhalten.
Am Dienstag werden für die Zellreihen jeweils vier kleine Flaschen in den Verdünnungen 1/3, 1/8, 1/8 und 1/8 als Experimentalreihe umgesetzt. Eine weitere kleine Flasche wird im Verhältnis 1/8 als Erhaltungszellkultur gesplittet.
Am Mittwoch werden von jeder Zellreihe drei der im Verhältnis von 1/8 umgesetzten Kulturen geschädigt. Dies erfolgt über eine Vergiftung mit CPT (siehe 2.2.6.3), eine Bestrahlung mit 60 J/cm^2 UVA (siehe 2.2.3.2) und eine Bestrahlung mit 5 Gray Röntgenstrahlen (siehe 2.2.4.3). Die Kulturen, die im Verhältnis 1/3 umgesetzt wurden, dienen als gefärbte unbehandelte Kontrollgruppe. Diese können nun bereits am Mittwoch

fixiert werden (siehe 2.2.4.2).
Am Donnerstag erfolgt keine Behandlung, da die Zellen 48 Stunden benötigen, um ausreichend auf die DNA-Schädigung zu reagieren.
Am Freitag werden die Zellen der Experimentalreihe geerntet, fixiert und mit Propidium-Jodid gefärbt (siehe 2.2.4.2). Die Kultur der Kontrollgruppe wird nun ebenfalls gefärbt. Aus den Erhaltungszellkulturen werden je ein 1/8 wieder als Erhaltung umgesetzt. Die verbleibenden Zellen werden als unbehandelte und ungefärbte Kontrollgruppe genutzt. Demnach werden diese Zellen nur fixiert und nicht gefärbt. Nun ist es möglich am FACS-Gerät die Zellen der beiden Zellreihen zu analysieren (siehe 2.2.5.2).
Der Zyklus beginnt am Montag erneut.

2.2.5.2 Analyse am FACS-Gerät

Am FACS- Gerät wird die Zellreihe HT1080 p21-GFP ohne Tag-RFP im Vergleich zum Wildtyp gemessen. Da diese Zellreihe sowohl eine Grünfluoreszenz über das p21-GFP-Fusionsprotein aufweist, als auch eine Rotfärbung über die Propidium-Jodid gefärbte DNA, muss zunächst eine Kompensation von dem FACS-Gerät errechnet werden. Hierfür wurde zunächst eine ungefärbte und unbehandelte HT1080 Wildtyp Zellreihe gemessen, welche keine Färbung aufweisen sollte. Danach wurde eine ungefärbte HT1080 p21-GFP ohne Tag-RFP Zellreihe gemessen, die nur die Grünfluoreszenz, aber keine Rotfärbung aufweist. Zuletzt wurde eine gefärbte Probe der Zellreihe HT1080 p21 -/- gemessen, welche keine Grünfluoreszenz aufweist, aber die Rotfärbung wiederspiegelt. Die Software hat auf Basis dieser Daten eine Kompensation errechnet, um die Färbungen differenzieren zu können (siehe Anhang 6.5.1).

Nach der Kompensation konnten die Proben der Zellreihe HT1080 p21-GFP ohne Tag-RFP am FACS-Gerät gemessen werden. In der grafischen Darstellung der Zellanzahl gegen die Rotfärbung PE-A wurden wieder Bereiche für die Zellzyklusphasen definiert. In der grafischen Darstellung von der Grünfluoreszenz FITC-A gegen die Rotfärbung PE-A konnte dies auch durchgeführt werden. Anhand der unbehandelten Kontrollgruppe wurde zusätzlich ein Bereich definiert, ab dem eine erhöhte Grünfluoreszenz für eine verstärkte p21-GFP-Expression spricht (siehe Abbildungen 10 und 11).

Gating der unbehandelten und gefärbten Kontrollgruppe

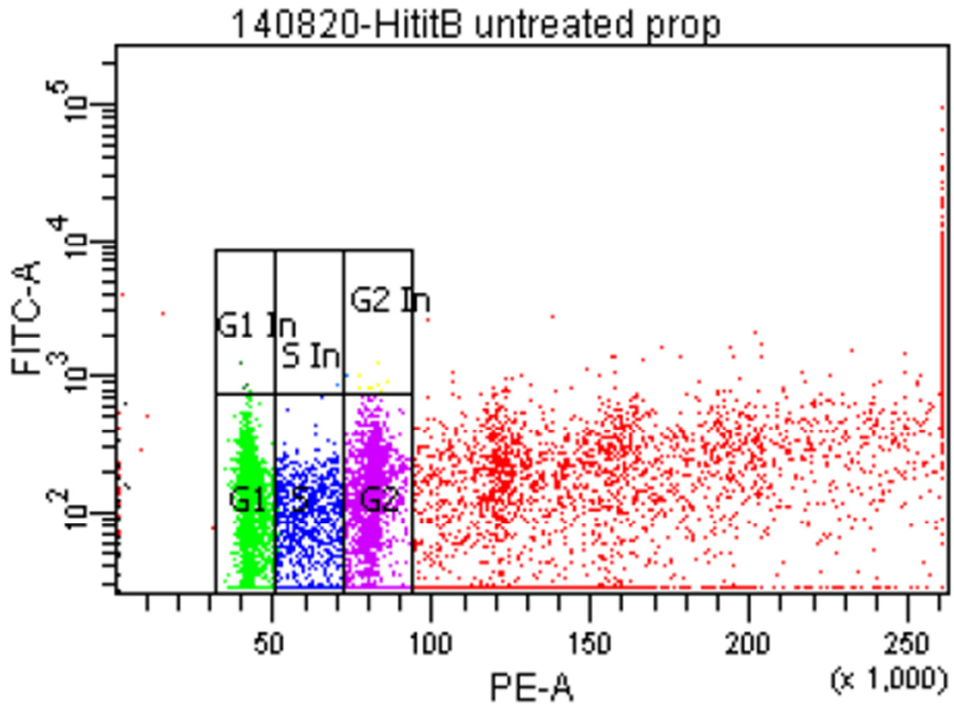


Abb. 10: Darstellung einer gefärbten, aber nicht behandelten Zelllinie. Auf der X-Achse ist die Rotfärbung mit Propidium Jodid aufgetragen, auf der Y-Achse die mittlere Grünfluoreszenz. Es wurde ein Gate gesetzt, ab dem eine Zelle als stark grünfluoreszent und somit geschädigt angesehen wird. Ebenfalls wurden Gates gesetzt, um die Zellzyklusphasen voneinander abzugrenzen. Die Zuordnung der Zellen zu den Gates wird farblich verdeutlicht. Die Zellen außerhalb der Gates sind rot dargestellt.

Gating der mit CPT vergifteten und gefärbten Experimentalgruppe

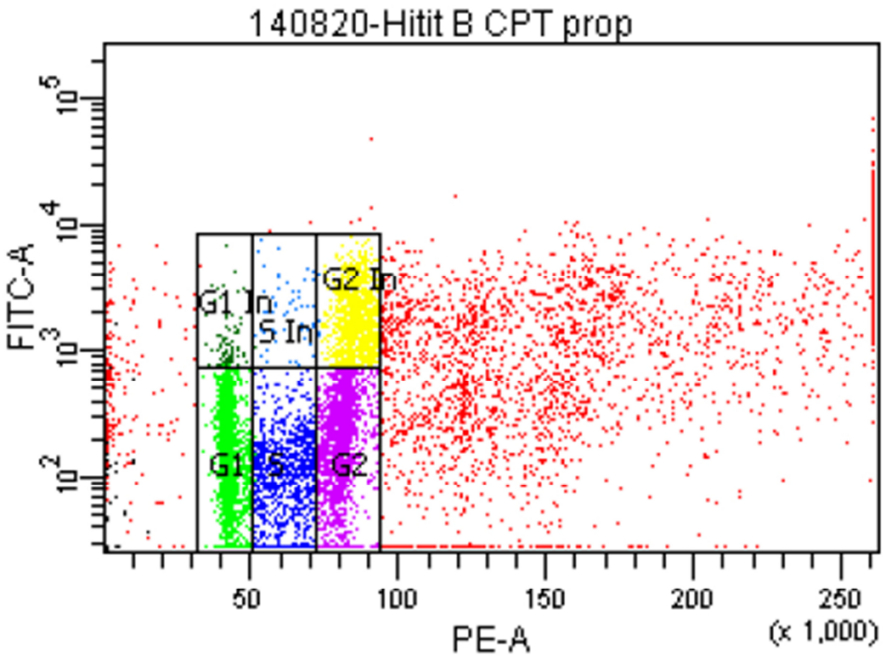


Abb. 11: Darstellung einer gefärbten und mit CPT vergifteten Zelllinie. Auf der X-Achse ist die Rotfärbung mit Propidium Jodid aufgetragen, auf der Y-Achse die mittlere Grünfluoreszenz. Es wurde ein Gate gesetzt, ab dem eine Zelle als stark grünfluoreszent und somit geschädigt angesehen wird. Ebenfalls wurden Gates gesetzt, um

die Zellzyklusphasen voneinander abzugrenzen. Die Zuordnung der Zellen zu den Gates wird farblich verdeutlicht. Die Zellen außerhalb der Gates sind rot dargestellt.

Diese Bereiche dienen als Kontrolle des p21-GFP Anstiegs unter Interventionsbedingungen (UVA, Röntgenstrahlen und CPT-Vergiftung). Die Zellen, welche in diesen als erhöht definierten Bereich fallen, können somit quantifiziert werden.
Nach der Messung der Proben wurden diese entsorgt.

2.2.6 *Live cell Imaging* über 48 Stunden

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den Methoden zur Vergiftung der Zelllinie mit CPT und der kontinuierlichen Beobachtung der darauffolgenden p21-GFP Induktion über 48 Stunden.

2.2.6.1 Zyklus der Zellkultur

Dieses Experiment beginnt am Montag mit einer kleinen konfluenten Flasche HT1080 p21-GFP. Diese wird im Verhältnis 3/5 umgesetzt und inkubiert. Somit liegt am Dienstag wieder eine konfluente Flasche, mit aktivierten Zellen im Zellzyklus vor.
Am Dienstag wird eine Erhaltungszellkultur im Verhältnis 1/8 für Freitag erstellt. Zusätzlich wird die bestehende Zellkultur genutzt, um einen 4-Well-Slide für das Experiment auszusäen (siehe 2.2.6.2 Aussäen der 4-Well-Slides). Der Slide und die Kultur werden wieder inkubiert.
Am Mittwoch kann der bestehende Slide auf neu gebildete Luftblasen überprüft werden und diese bei Bedarf abpipettiert werden. Wenn pro *Well* die gewünschte Anzahl von 5-10 Zellen vorliegt, kann der Slide mit CPT vergiftet werden (siehe 2.2.6.3 Vergiftung mit CPT). Danach wird er zu dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop transportiert und dort zur Beobachtung eingestellt (siehe 2.2.6.4 Beobachtung über 48 Stunden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop).
Am Donnerstag und Freitag erfolgt kontinuierlich die Beobachtung des *Slides*. Nach 48 Stunden sind genügend Daten erhoben und der Slide kann entsorgt werden.
Am Freitag kann die Erhaltungszellkultur von HT1080 p21-GFP im Verhältnis von 1/8 für Montag umgesetzt werden. Der Zyklus kann in der nächsten Woche erneut beginnen.

2.2.6.2 Aussäen der *4-Well-Slides*

Um eine kontinuierliche Beobachtung über 48 Stunden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop zu ermöglichen, werden die Zellen auf einen *Well* des *4-Well-Slides* pipettiert. Dieser *Well* hat eine konische Form und eine Wachstumsfläche von 0,0012 cm^2 (siehe Abbildung 12). Das Volumen eines einzelnen Wells beträgt 10 µl. Diese Form ermöglicht es einen Well mit einer Zellsuspension zu füllen, von der einige Zellen auf den Boden absinken und dort wachsen können. Somit ist eine gute Beobachtung eines kleinen Areals möglich.

Skizze des Aufbaus des 4 Well FulTrac Slides

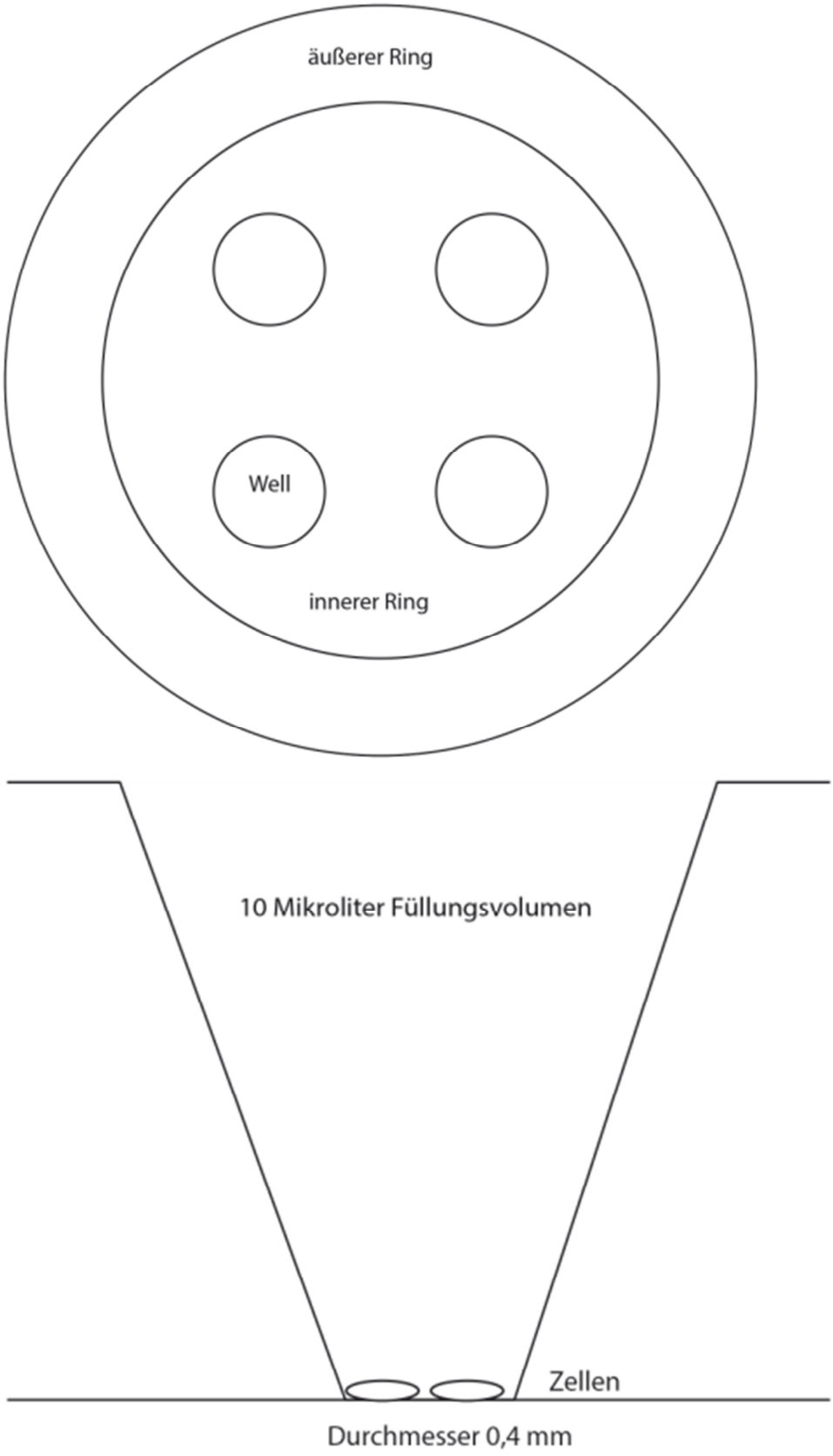


Abb. 12: Darstellung des 4 Well FulTrac Slide Aufbaus. In dem oberen Abschnitt der Skizze ist die Aufsicht auf den Slide dargestellt. Der untere Abschnitt gibt die Seitenansicht wieder. (Frei nach (ibidi), Instructions micro-Insert 4 Well FulTrac Version 1.0 (2016-05-09))

Die Zellen, welche auf dem Boden wachsen, können durch die geringe Fläche nicht aus dem Sichtbereich des Mikroskops wandern. Um eine Anzahl von 5-10 Zellen auf dem Boden des Wells zu erreichen, wurden verschiedene Verdünnungen ausprobiert. Die besten Ergebnisse konnten bei einer Mischung von 4 µl Zellsuspension mit 150 µl NM erreicht werden. Deshalb wurde diese Verdünnung für die gesamte Experimentalreihe eingesetzt. Dies entspricht einer Verdünnung von ungefähr 1:40.
Um einen Well auszusäen werden zunächst die Zellen aus der Kulturflasche geerntet und mit NM verdünnt (siehe oben). Der 4-Well-Slide wird geöffnet und die vier Wells werden zunächst mit NM gespült. Hierdurch sollen nach Möglichkeit Luftblasen verhindert werden, die eine Beobachtung unter dem Mikroskop behindern würden. Nun wird die verdünnte Zellsuspension mit sehr dünnen Pipettenspitzen (geeignet für 0,1-20 µl) möglichst nah an den Boden der konischen Vertiefung pipettiert. Die Pipettenspitzen werden zuvor für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert, um eine bakterielle Kontamination zu verhindern. Bei dem Aussäen der Zellen soll streng darauf geachtet werden, keine Luftblasen abzulassen. Wenn alle vier Wells gefüllt sind, kann der Erfolg bezüglich Zellzahl und Luftblasen am inversen Mikroskop überprüft werden. Bei Bedarf kann mit der Pipette Luft wieder abgesaugt werden. Wenn alle Wells gut gefüllt sind, kann der innere Ring mit NM aufgefüllt werden. Danach kann der Slide inkubiert werden. Nach einer Stunde kann überprüft werden, ob sich sekundär Luftblasen gebildet haben. Wenn dies der Fall ist, können diese nun abpipettiert werden. Nachdem die Zellen einen Tag anwachsen konnten, wird auch der äußere Ring mit NM gefüllt.

2.2.6.3 Vergiftung mit CPT

Um die Zellen eines Slides mit CPT zu vergiften, wird zunächst die Anfangskonzentration des CPT von 20 mM verdünnt. Zunächst wurde eine Verdünnung von 1:10 vorgenommen (1 µl der CPT Lösung in 9 µl NM) und diese wieder 1:2000 verdünnt (2 µl in 4000 µl), sodass eine Gesamtverdünnung von 1:20.000 besteht. Damit beträgt die CPT Konzentration 1 µM. Der zu vergiftende Slide wird geöffnet und das Medium im inneren Ring abgesaugt. Das NM in den Wells selber wird belassen, um die Zellen nicht zu entfernen. Der innere Ring wird nun mit dem verdünnten CPT in 1 µM Konzentration aufgefüllt und der Slide über 3 Stunden inkubiert. In diesem Zeitraum wird der DNA Schaden an den Zellen gesetzt. Danach kann das NM mit dem CPT abpipettiert und gesondert entsorgt werden. Um die Reste des CPT in den Wells zu entfernen, wird der Slide noch dreimal mit NM gespült und wieder abgesaugt. Danach kann der innere Ring mit Leibovitz Medium aufgefüllt werden. Dieses Medium unterstützt das Zellwachstum in Umgebungen ohne CO_2-Stabilisierung, wie es beim konfokalen Fluoreszenzmikroskop der Fall ist. Die vergifteten Zellen können nun am Mikroskop über 48 Stunden beobachtet werden.

2.2.6.4 Beobachtung über 48 Stunden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop

Die Zellen werden über 48 Stunden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Dieses befindet sich in einem isolierten und abgedunkelten Raum, um Messfehler zu minimieren. Der Tisch steht auf einem Luftpolster, um Erschütterungen zu verhindern. Das Mikroskop befindet sich in einem Plastikkasten, welches mit einer Heizungseinheit verbunden ist, sodass die Zellen unter dem Mikroskop eine konstante Temperatur von 37°C haben. Der Slide mit den Zellen kann über kleine Türen an dem Kasten in das Mikroskop eingesetzt werden. Über die Software Zeiss LSM 510 kann das Mikroskop nun programmiert werden. Es wurden Aufnahmeebenen für die Grünfluoreszenz, die Rotfluoreszenz und das normale Durchlicht eingestellt. Die eingesetzten Laser sind ein Argon-Ionen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und 514 nm und ein Helium-Neon Laser mit einer Wellenlänge von 632 nm, 1152 nm und 3392 nm. Als Auflösung wurden 2048*2048 Pixel gewählt und als Objektiv eine 40-fach Vergrößerung mit Phase 3 Kontrast. Nach einem Testbild erfolgt eine Aufnahmeserie über 48 Stunden. Jeweils ein Bild wird nach 15 Minuten aufgenommen, um die Bewegung der Zellen im Slide nachvollziehen zu können. Zu Beginn der Aufnahmeserie verstellt sich häufig der Fokus des Mikroskops, sodass dieses mehrmals nach Beginn der Aufnahmeserie nachjustiert werden musste. Nach Beendigung der 48 Stunden Aufnahmeserie kann der Slide entnommen und entsorgt werden.

2.3 Ethikvotum

Da es sich um eine kommerziell erwerbliche Zelllinie der DSMZ handelt, ist kein Ethikvotum notwendig. Dies wurde zusätzlich in Rücksprache mit der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf abgesichert. Demnach existiert auch kein Aktenzeichen der Ethikkommission zu dieser Dissertation.

2.4 Statistik und Software

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 5.0f und IBM SPSS Statistics 26. Es wurde entsprechende statistische Literatur zur Unterstützung der Auswertung genutzt (Brosius 2018; Rudolf und Müller 2020; Schendera 2014). Für die Literaturrecherche und die Erstellung des Literaturverzeichnisses wurde die Software Citavi 6.5 benutzt. In der Literaturrecherche wurden für die Einleitung auch Internetquellen, wie Wikipedia und Chemgapedia genutzt, um einen Überblick zu erlangen und eine Orientierung für die Struktur zu erhalten.
Die Dissertation wurde mit Microsoft Word 2010 geschrieben. Für die Abbildungen wurde Adobe Photoshop CS4 und Adobe Illustrator CS6 eingesetzt. Die Graphen der FACS-Analysen wurden mit der FACS-Diva Version 6.1.3 Software erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zur Analyse der mittleren Fluoreszenz nach UVA Bestrahlung

In dem ersten Experiment sollte ermittelt werden, ob sich die Dynamik der p21 Expression bei verschiedenen DNA-Schädigungsarten unterscheidet. Dazu wurden Zellen mit UVA Strahlen unterschiedlicher Intensität bestrahlt und ihre DNA damit geschädigt. Darauf folgend wurde die p21-GFP-Expression der bestrahlten Zellen mittels der Grünfluoreszenz im FACS-Gerät gemessen. Die Rohdaten, welche sich aus den sechs Versuchsreihen ergeben haben, befinden sich im Anhang in der Tabelle 16. Im Anhang befinden sich ebenso exemplarisch die Originaldaten des FACS-Geräts für eine Versuchsreihe (siehe 6.1).
Nach der Analyse mit Hilfe des FACS-Gerätes wurden die Zellen je nach ihrer Bestrahlungsintensität aufgeteilt. In Vorversuchen wurde durch die Analyse von nicht veränderten und daher nicht grün fluoreszierenden HT-1080 Wildtypzellen eine Grenze definiert, die eine schwache, also nicht signifikante Autofluoreszenz markiert (nicht dargestellt). Alle Zellen mit einer höheren Fluoreszenz können als grünfluoreszent und somit p21-GFP-exprimierend angesehen werden. Dies ist in Abbildung 13 Teil A zu sehen. In der Abbildung sind bereits bei den unbehandelten Zellen ungefähr die Hälfte der Zellen nicht p21-GFP-exprimierend (hier rot dargestellt) und die andere Hälfte der Zellen sind bereits oberhalb der Grenze für die grüne Fluoreszenz (grün dargestellt). Diese gelten somit bereits als p21-GFP-exprimierend. Dies entspricht der Grundaktivität von p21. Über den Verlauf der gesteigerten Intensität der Bestrahlung mit UVA-Strahlen, kann gesehen werden, dass die Zahl der grün fluoreszierenden Zellen zunimmt. Die Verteilung ist nicht mehr symmetrisch und wird rechtslastiger. Es sind mehr Zellen rechts von der Schwelle zu finden und werden grün dargestellt. Dies bedeutet, dass diese Zellen als p21-GFP-exprimierend gelten. Außerdem liegen die Zellen immer weiter rechts auf der X-Achse. Dies bedeutet, dass sie stärker grün fluoreszieren und somit mehr p21-GFP auf Einzelzellniveau exprimieren. Somit steigt sowohl die gesamte Expression von p21-GFP nach UVA-Bestrahlung, als auch die Expression in den einzelnen Zellen.
Um die Dynamik der Zunahme der p21-GFP Expression im Verhältnis zu der Intensität der UVA-Bestrahlung abschätzen zu können, wurde eine Regressionsanalyse mit variabler Steigung durchgeführt. Die Durchführung der Statistik wird am Ende des aktuellen Kapitels erläutert. Das Ergebnis der durchgeführten Regressionsanalyse wurde zur Veranschaulichung grafisch aufgetragen (siehe Abbildung 13 Teil B). Hier wurden zusätzlich Fehlerbalken bei den verschiedenen Bestrahlungsintensitäten eingefügt, um die Streuung der einzelnen Werte zu veranschaulichen. An der Darstellung kann zu Beginn ein verzögerter Anstieg erkannt werden. Dieser Abschnitt wird von einem linearen Anstieg gefolgt, welcher bei höheren Bestrahlungsintensitäten wieder abflacht. Dies entspricht einem sigmoidalen Verlauf der p21-GFP Dynamik auf UVA-Schädigung.

Verlauf der mittleren Grünfluoreszenz in Relation zur Bestrahlungsstärke

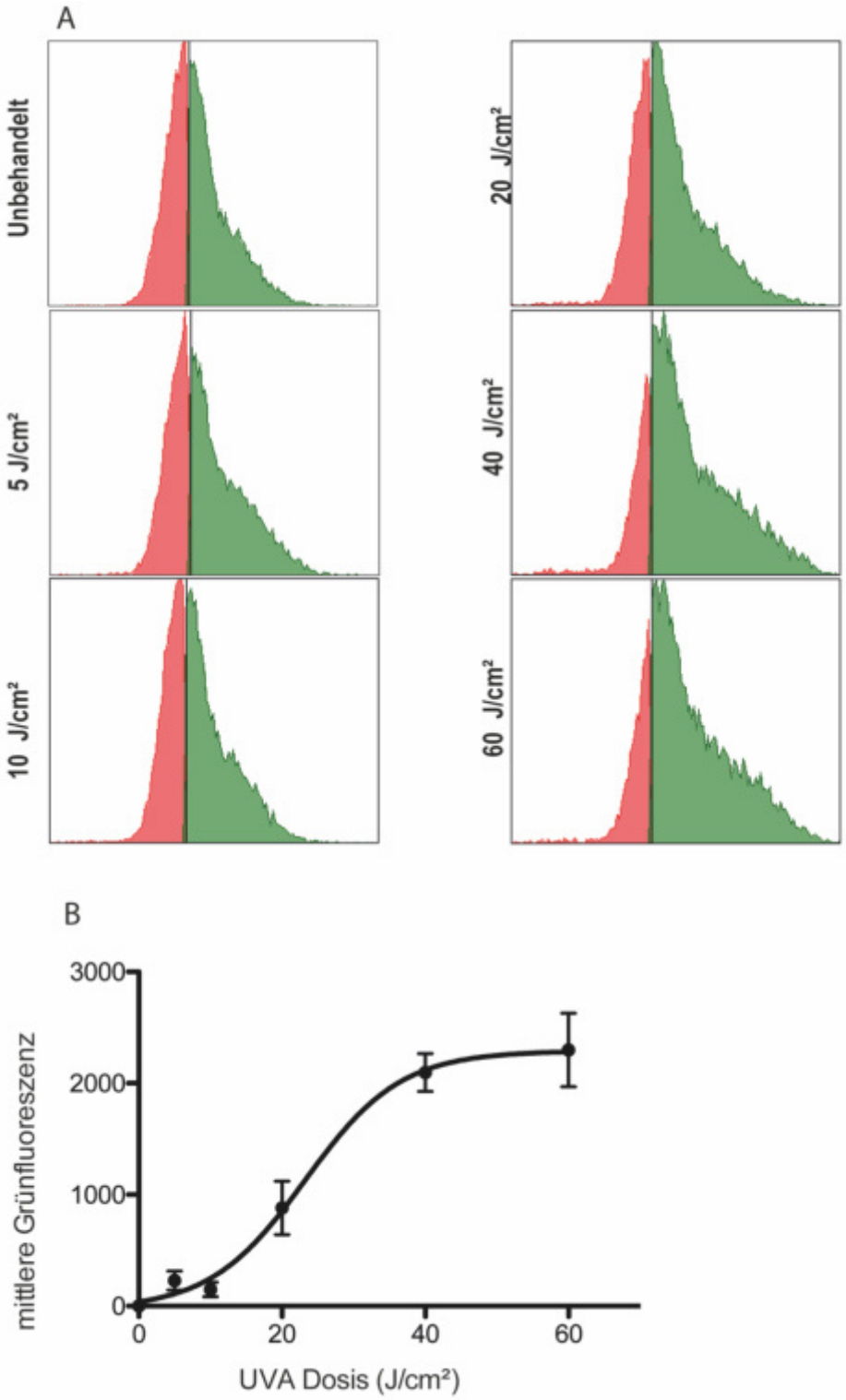


Abb. 13: Darstellung der mittleren Grünfluoreszenz im Verhältnis zur UVA Bestrahlung. Teil A: Beispiele der FACS-Analyse für die verschiedenen Bestrahlungsstärken. Grün dargestellt sind die Zellen, die als p21-GFP exprimierend definiert sind. Rot sind die Zellen, die nicht als p21-GFP exprimierend definiert sind. Auf den X-Achsen wird die mittlere Grünfluoreszenz und auf den Y-Achsen die Zellzahl dargestellt.
Teil B: Grafische Darstellung nach einer nicht-linearen Regressionsanalyse. X-Achse: Dosis der UVA Strahlen. Y-Achse: mittlere Grünfluoreszenz. Die Werte sind von allen sechs Versuchsreihen mit entsprechenden Fehlerbalken berücksichtigt.

Somit wurde die Dynamik von p21-GFP nach UVA-Schädigung als sigmoidal charakterisiert. Aus bisher noch nicht veröffentlichten Vorarbeiten des gastgebenden Instituts ist bekannt, dass die Dynamik nach Schädigung mit CPT als asymptotisch und nach Röntgenstrahlen als linear charakterisiert werden kann. Diese Dynamiken der p21-GFP Expression lassen sich klar voneinander unterscheiden. Somit entspricht das Ergebnis dieses Experiments der Hypothese, dass sich die Dynamik der p21-Induktion bei verschiedenen DNA-Schädigungsarten charakteristisch unterscheiden.

Für die statistische Auswertung dieses Datensatzes wurde zunächst eine Regressionsanalyse mit Kurvenanpassung in der Statistiksoftware SPSS (siehe 2.4) durchgeführt.
Bevor diese ausgeführt werden kann, müssen die Voraussetzungen geprüft werden, da sonst die Aussagekraft, beziehungsweise die Validität, der Regressionsanalyse abnimmt.
Zu der Voraussetzungsprüfung einer Regressionsanalyse gehören 1. Keine Multikolinearität, 2. Normalverteilung der Daten, 3. Keine Autokorrelation der Residuen und 4. Homoskedastizität. Die Homoskedastizität bedeutet, dass die Varianz der Residuen konstant ist.
Da nur eine unabhängige Variable vorliegt, entfällt die Voraussetzung keine Multikolinearität zu haben.
Die Normalverteilung der Daten wurde grafisch dargestellt (siehe Abbildung 14).
Hier ergibt sich bereits der Eindruck, dass die Residuen normalverteilt sind.

Histogramm zur Darstellung der Normalverteilung der Daten

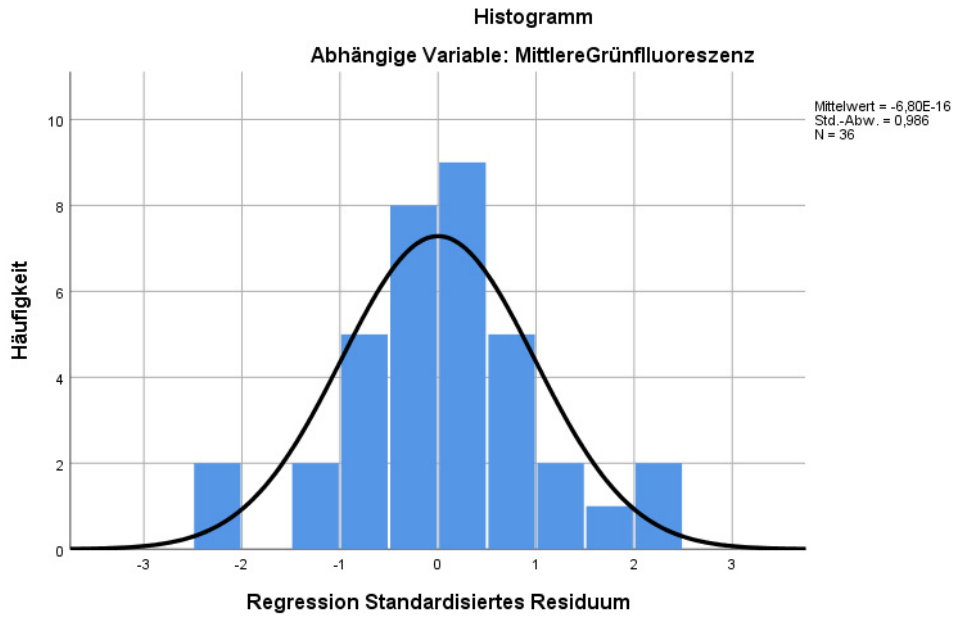


Abb. 14: Darstellung der Verteilung der mittleren Grünfluoreszenz zur Testung der Normalverteilung

Ergänzend wurde der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest durchgeführt (Tabelle 12). Dieser ergab allerdings einen signifikanten Wert (p=0,001). Somit müsste die Nullhypothese einer Normalverteilung verworfen werden. Es ist aber anzunehmen, dass einzelne Ausreiser

bei einer insgesamt geringen Stichprobe zu dem signifikanten Ergebnis führen. Im Folgenden wird deshalb trotz des signifikanten Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests von einer Normalverteilung ausgegangen.

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

	n	36
Parameter der Normalverteilung	Mittelwert	4782,17
	Standardabweichung	1075,157
Extremste Differenzen	Absolut	0,205
	Positiv	0,205
	Negativ	-0,123
Statistik für Test		0,205
Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)		0,001

Tabelle 12: Berechnung des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests zur Bestimmung der Normalverteilung. Es erfolgte eine Signifikanzkorrektur nach Liliefors. n steht für die Stichprobengröße.

Eine weitere Voraussetzung besagt, dass die Residuen keine Autokorrelation aufweisen sollen. Dies wurde mit der Durbin-Watson-Statistik getestet. Diese ergab einen Wert von 1,31, wonach keine Autokorrelation in den Residuen vorlag.
Um die Voraussetzung der Homoskedastizität zu prüfen, wurde ein Streudiagramm erstellt (Abb. 15).

Streudiagramm zur Testung der Homoskedastizität

Abb. 15: Streudiagramm der mittleren Grünfluoreszenz nach UVA-Bestrahlung zur Abschätzung der Homoskedastizität

Hier ergibt sich der Eindruck einer möglichen Heteroskedastizität, weshalb ein Breusch-Pagan-Test auf Heteroskedastizität durchgeführt wurde. Dieser wurde signifikant (p=0,001).

Somit wird die Voraussetzung der Homoskedastizität nicht erfüllt und es wird eine Parameterschätzung mit robusten Standardfehlern notwendig. Dies erfolgte nach der Regressionsanalyse.

Die Regressionsanalyse wurde mit Kurvenanpassung durchgeführt. Hier wurden ein linearer und ein kubischer Zusammenhang miteinander verglichen.
Für die lineare Gleichung ergab sich ein F = 103,38, p < ,001 und ein R^2 von 0,753.
Die kubische Gleichung ergab ein F=41,52, p< ,001 und ein R^2 von 0,796.
Da die kubische Gleichung mehr Varianz aufklären kann, als die lineare, wurde dieses Modell gewählt. Eine grafische Darstellung der Regressionsanalyse ist in Abbildung 16 dargestellt.

Graphische Darstellung der Regressionsanalyse

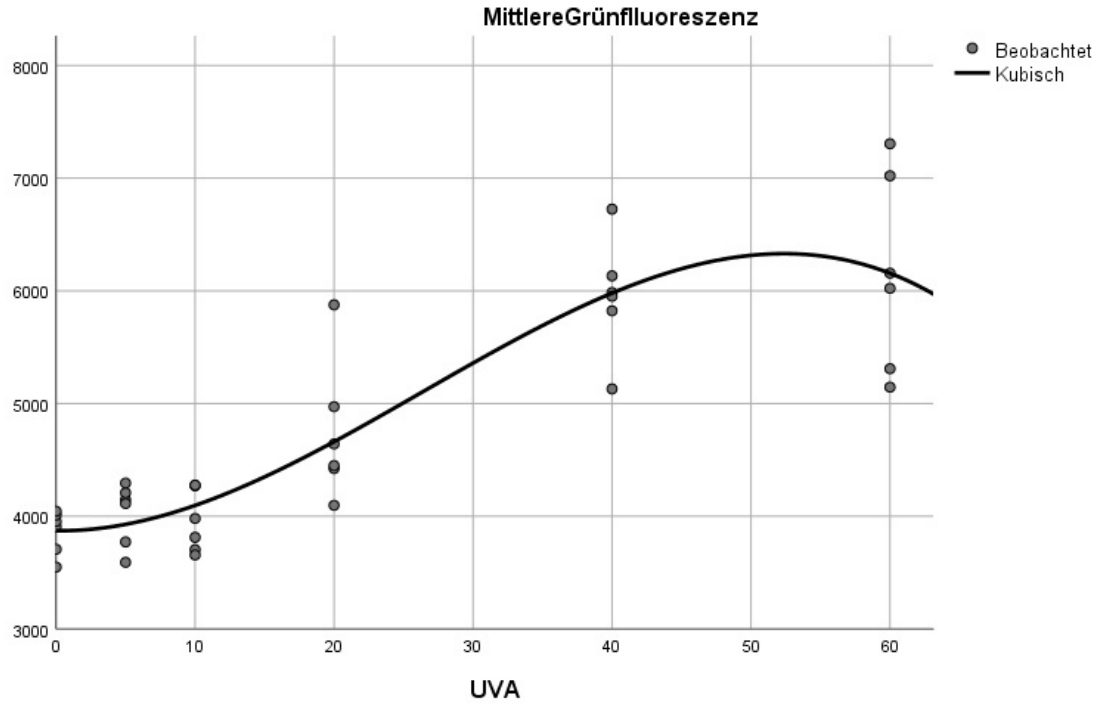


Abb. 16: Grafische Darstellung der mittleren Grünfluoreszenz nach UVA Bestrahlung mit kubischer Regressionsanalyse. Auf der X-Achse ist die UVA Strahlenintensität in J/cm^2 und auf der Y-Achse die mittlere Grünfluoreszenz dargestellt.

Da Heteroskedastizität vorliegt, erfolgte im Anschluss eine univariate Analyse, um eine Parameterschätzung mit robusten Standardfehlern nach der HC3 Methode durchzuführen (Tabelle 13).

Parameterschätzungen mit robusten Standardfehlern

Abhängige Variable: Mittlere Grünfluoreszenz					95%- Konfidenzintervall	
Parameter	Regressionskoeffizient B	Robuster Standardfehler	T	Signifikanz	Untergrenze	Obergrenze
Konstanter Term	3804,481	95,993	39,633	0,000	3609,400	3999,561
UVA	43,453	5,803	7,488	0,000	31,660	55,245

Tabelle 13: Parameterschätzung mit robusten Standardfehlern nach der HC3-Methode zum Ausgleich der Heteroskedastizität.

Hierbei bleibt die Signifikanz unverändert, aber die Standardabweichung wird angepasst.

Um den Einfluss der Bestrahlung auf die p21-GFP-Induktion besser einschätzen zu können, wurde die mittlere Grünfluoreszenz der Kontrollgruppe mit 0 J/cm^2 UVA als Nullpunkt definiert. Die anderen Werte sind jeweils die Differenz des Originalwertes mit der Fluoreszenz der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 17 im Anhang). Wenn ein Fluoreszenzwert der Bestrahlungsgruppe kleiner war, als der Fluoreszenzwert der Kontrollgruppe, so wurde ein Wert von null eingetragen.

Es wurde zusätzlich zu der Auswertung mit SPSS eine nicht-lineare Regressionsanalyse mit variabler Steigung mit GraphPad Prism durchgeführt (siehe Tabelle 20 im Anhang 6.5.2). Dies wurde gemacht, da GraphPad Prism eine Darstellung mit Fehlerbalken erlaubt und es somit gestattet den Verlauf in seiner Dynamik besser mit einem linearen Zusammenhang zu vergleichen.
Nach graphischer Darstellung der Daten, ergibt sich ein sigmoidaler Verlauf (siehe Abbildung 13 Teil B). Dementsprechend konnte die Dynamik der p21-GFP Expression nach Schädigung mit UVA Strahlen als sigmoidal charakterisiert werden.

3.2 Ergebnisse der Zellzyklusanalyse am FACS im Vergleich von HT1080 Wildtyp und HT1080 p21-/-

Nachdem sich für UVA Strahlen eine sigmoidale Dynamik der p21-GFP-Induktion gezeigt hat, während andere Schädigungsarten andere Kinetiken verursachten, stellte sich die Frage, ob p21 auch einen unterschiedlichen, Schädigungs-spezifischen Einfluss auf den Zellzyklus der geschädigten Zellen ausübt. Um dies zu untersuchen, wurde ein Zellklon verwendet, der nicht mehr in der Lage ist p21 zu exprimieren (p21-/-). Die Untersuchung eines solchen dysfunktionalen Zellklons demaskiert die Funktion des ausgeschalteten Proteins. Jede Veränderung im Vergleich zum Wildtyp bei gleichen Umweltbedingungen ist auf die Funktion des p21 Proteins zurückzuführen. Daher wurde in dem zweiten Experiment die Zellzyklus-Verteilung von Wildtypzellen im Vergleich zu solchen ohne funktionierendes p21 nach unterschiedlichen DNA-Schädigungen untersucht.

In dieser Versuchsreihe wurde die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen nach DNA-Schädigung von Wildtyp-Zellen mit dem von HT1080 p21-/- verglichen. Beide Zellreihen wurden in diesem Experiment je mit UVA-Strahlen, mit Röntgenstrahlen und mit CPT geschädigt. Nach der Schädigung erfolgten die Zellzyklusanalyse mit dem FACS-Gerät und die grafische Darstellung der Verteilung der Zellen auf die jeweiligen Zellzyklusphasen (siehe Abbildung 17 linke Spalte). Die FACS-Analysen einer Versuchsreihe befinden sich exemplarisch im Anhang (siehe 6.3). Die Verteilung der Zellen nach Zellzyklusphase für die fünf Versuchsreihen je Schädigungsart findet sich im Anhang in der Tabelle 18.
In der Abbildung 17 linke Spalte kann nun zunächst der unbehandelte Wildtyp mit seinem p21-/- Klon verglichen werden. Hier stellt sich eine übliche Verteilung von gesunden Zellen nach ihren Zellzyklusphasen dar. Es sind keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem p21-/- Klon ersichtlich. Um dies besser darstellen zu können, wurde die prozentuale Verteilung der Zellen in die drei Zellzyklusphasen als Balkendiagramm dargestellt (siehe Abbildung 17 rechte Spalte). Nach einer Schädigung der Zellen mit CPT zeigen sich Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die Zellen befinden sich vermehrt in der G2 Phase und weniger in der G1 Phase. Dieser Effekt zeigt sich sowohl bei dem Wildtyp, als auch bei seinem p21-/- Klon. Allerdings scheint es so, als würden sich die p21-/- Zellen häufiger in der S-Phase befinden, als der Wildtyp. Hier wurde ergänzend ein t-Test auf Unterscheidung der Wildtyp Zellen in S-Phase und der p21-/- Zellen in S-Phase berechnet. Die Durchführung der Statistik wird am Ende des aktuellen Kapitels dargestellt. Der t-Test hat einen signifikanten Unterschied der Zellen in der S-Phase ergeben. Somit befinden sich Zellen mit p21 -/- nach Schädigung mit CPT öfters in der S-Phase, als Wildtyp-Zellen.
Dieser Befund stellt sich ähnlich nach Schädigung mit UVA-Strahlen dar. Auch hier befinden sich mehr Zellen in der G2-Phase, als in der unbehandelten Gruppe, aber es sind auch mehr Zellen in der G1-Phase als es bei den Zellen nach CPT-Schädigung der Fall war. Im Vergleich von den Wildtyp-Zellen und den p21-/- Zellen nach UVA-Schädigung zeigt sich wieder ein ähnliches Muster. Allerdings sind auch hier mehr p21-/- Zellen in der S-Phase. Auch dieser Unterschied wurde im t-Test signifikant.
Außerdem wurden die Zellen mit Röntgenstrahlen geschädigt. Im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe sind hier deutlich mehr Zellen in der G1 Phase zu finden. Die Anzahl der Zellen in der G2-Phase sind annähernd gleich. In diesem Verhalten gleichen sich auch wieder der Wildtyp und sein p21-/- Klon. Wie bei den anderen Schädigungsarten ist auch hier ein klarer Unterschied in der S-Phase zu erkennen. Die p21-/- Zellen befinden sich deutlich häufiger in der S-Phase, als der Wildtyp. Der durchgeführte t-Test wurde auch deutlich signifikant.
Demnach zeigt dieses Experiment zweierlei. Erstens teilen sich die Zellen nach einem individuellen Muster je nach DNA-Schädigungsarten auf die Zellzyklusphasen auf. Zweitens befinden sich die p21-/- Zellen bei allen Schädigungsarten signifikant häufiger in der S-Phase, als dies bei den Wildtyp Zellen der Fall ist.

Vergleich der Zellzyklusphasen bei der Zellreihe mit funktionaler p21 Expression gegenüber ausgeschaltete p21 Expression

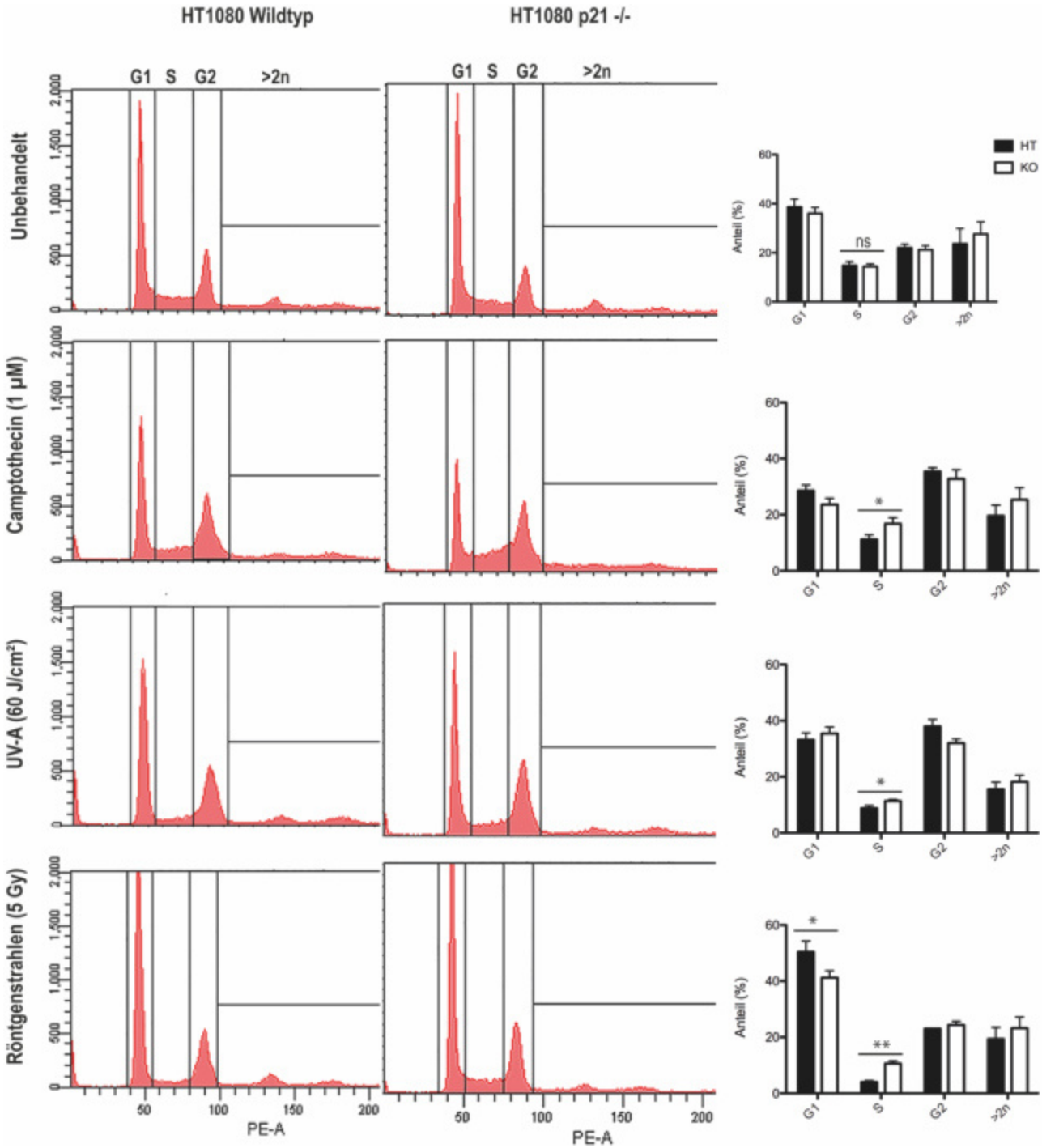


Abb. 17: Darstellung von HT1080 Wildtyp mit funktionaler p21 Expression und HT1080 p21-/- mit einem Knock-out des p21-Gens. Die linken beiden Spalten zeigen die FACS-Analysen zum Zellzyklus bei den DNA-Schädigungsarten CPT, UVA und Röntgenstrahlen. Die Gates geben die Zellzyklusphasen G1, S und G2 wieder; >2n beschreibt die Zellen mit mehr als einem doppelten DNA-Satz. X-Achse: Intensität der Rotfärbung mit Propidium-Iodid, y-Achse: Zellzahl. Die rechte Spalte zeigt ein Balkendiagramm der beiden Zellreihen. HT: HT1080 Wildtyp, KO: HT1080 p21-/- . Es wird der prozentuale Anteil in den Zellzyklusphasen miteinander verglichen. Ein t-Test gibt die Signifikanz der Unterschiede wieder: ns: nicht signifikant, *: 0,01≤p<0,05: signifikant, **: 0,001≤p<0,01: sehr signifikant.

Zur statistischen Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklen über die fünf Versuchsreihen gemittelt mit GraphPad Prism grafisch aufgetragen (siehe Abbildung 17: rechte Spalte). Die Werte der S-Phase wurden in IBM SPSS mit einem ungepaarten t-Test auf signifikante Unterschiede getestet.
Die Voraussetzungsprüfung beinhaltet folgende Punkte: 1. Unabhängigkeit der Gruppen, 2. Metrisches Skalenniveau der Variablen, 3. Normalverteilung der Daten und 4. Homoskedastizität.
Die Unabhängigkeit der getesteten Gruppen ist gegeben, da eigene Zellpopulationen jeweils eigenständig geschädigt wurden.
Außerdem sind die Variablen metrisch, da es sich um prozentuale Angabe der Zellzahlen je nach Zellzyklusphase handelt.
Eine weitere Voraussetzung ist die Normalverteilung der Daten. Hierfür wurde ein Shapiro-Wilk Test durchgeführt (Tabelle 14). Da die Signifikanzwerte größer 0,05 sind kann die Nullhypothese der Normalverteilung beibehalten werden.

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
HT-CPT	0,186	5	0,200	0,943	5	0,687
HT-X-Ray	0,300	5	0,161	0,833	5	0,146
HT-UVA	0,244	5	0,200	0,871	5	0,272
KO-CPT	0,198	5	0,200	0,957	5	0,787
KO-X-Ray	0,180	5	0,200	0,952	5	0,754
KO-UVA	0,237	5	0,200	0,961	5	0,814

Tabelle 14: Ergebnisse der Voraussetzungsprüfung zur Normalverteilung der Daten. df steht für die Anzahl der Freiheitsgrade. Bei dem Test nach Kolmogorov-Smirnov erfolgte eine Signifikanzkorrektur nach Liliefors.

Zuletzt wurde die Voraussetzung der Homoskedastizität mit dem Levene-Test bestimmt (Tabelle 15). Auch hier sind die p-Werte größer 0,05, sodass die Nullhypothese der Homoskedastizität beibehalten werden kann.
Die Ergebnisse der t-Tests können ebenso in der Tabelle abgelesen werden. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem p21 -/- Klon in der S-Phase nach DNA-Schädigung. Bei der unbehandelten Kontrollgruppe bestehen keine signifikanten Unterschiede. In den anderen Zellzyklusphasen besteht nur bei der Schädigung mit Röntgenstrahlen ein signifikanter Unterschied in der G1 Phase.

Ergebnisse der ungepaarten t-Tests

		F-Wert	Sig.	T-Wert	df	Sig. (zweiseitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler	95%-Konfidenzinterva	
									Unterer Wert	Obere Wer
HT-CPT	VG	0,515	0,493	-2,061	8,0	0,073	-5,6	2,717	-11,865	0,665
	VU			-2,061	7,5	0,076	-5,6	2,717	-11,938	0,738
HT-UVA	VG	3,338	0,105	-2,373	8,0	0,045	-2,6	1,095	-5,126	-0,07
	VU			-2,373	6,0	0,055	-2,6	1,095	-5,275	0,075
HT-X-Ray	VG	2,630	0,143	-6,128	8,0	0,000	-6,6	1,077	-9,084	-4,11
	VU			-6,128	6,5	0,001	-6,6	1,077	-9,188	-4,01

Tabelle 15: Levene Test zur Prüfung der Homoskedastizität und Ergebnisse der t-Tests. Sig. steht für das Signifikanzniveau und df für die Freiheitsgrade. VG besagt, dass die Varianzen gleich sind und VU, dass die Varianzen ungleich sind.

3.3 Ergebnisse der Zellzyklusanalyse am FACS in Relation zur p21-GFP Expression von HT1080 p21-GFP Zellen ohne Tag-RFP

In dem vorangegangenen Experiment hat sich gezeigt, dass sich die Zellen je nach DNA-Schädigungsart unterschiedlich in den Zellzyklusphasen (insbesondere in der G1- und der G2-Phase) akkumulieren. Es haben sich demnach unterschiedliche Verteilungsverhältnisse auf die Zellzyklusphasen gezeigt. Es soll im Folgenden geprüft werden, ob sich auch die p21-GFP-Expression in Abhängigkeit von der Art der DNA-Schädigung in den Zellzyklusphasen unterschiedlich darstellt.
In diesem Experiment werden nicht nur die Zellzyklusphasen der Zellen, sondern auch die Intensität der Grünfluoreszenz (was der p21 Expression entspricht) gegeneinander aufgetragen.
In dem dritten Experiment soll somit untersucht werden, in welcher Zellzyklusphase p21-GFP nach Schädigung mit den drei verschiedenen DNA-Schädigungsarten exprimiert wird.

In dieser Versuchsreihe wurde der Zellzyklus mittels Propidium-Iodid Färbung und anschließender FACS-Analyse bestimmt. Zusätzlich wurde die mittlere Grünfluoreszenz als Maß für die p21-GFP Expression ebenfalls mit Hilfe des FACS-Geräts bestimmt. Die Zellen wurden in fünf Versuchsreihen mit CPT, Röntgenstrahlen oder mit UVA Strahlen geschädigt. Danach erfolgte die Analyse im FACS-Gerät. Mithilfe der Rotfluoreszenz durch die Propidium-Iodid Färbung erfolgte eine Aufteilung nach der Zellzyklusphase der Zellen in Richtung der X-Achse. Die Grünfluoreszenz zeigt die Quantität der p21-GFP-Expression an. Diese Aufteilung erfolgte in Richtung der Y-Achse (siehe Abbildung 18 Teil A). Die einzelnen FACS-Analysen einer Versuchsreihe befinden sich exemplarisch im Anhang (siehe 6.4). Der prozentuale Anteil der Zellen mit erhöhter Grünfluoreszenz nach Zellzyklus in Relation zu der Gesamtzahl der Zellen findet sich ebenfalls im Anhang in Tabelle 19 für alle fünf Versuchsreihen.

In der grafischen Darstellung kann gut gesehen werden, dass die unbehandelte Kontrollgruppe eine typische Aufteilung der Zellzyklusphasen einnimmt.

Darstellung der mittleren Grünfluoreszenz in Relation zum Zellzyklus bei verschiedenen DNA-Schädigungsarten

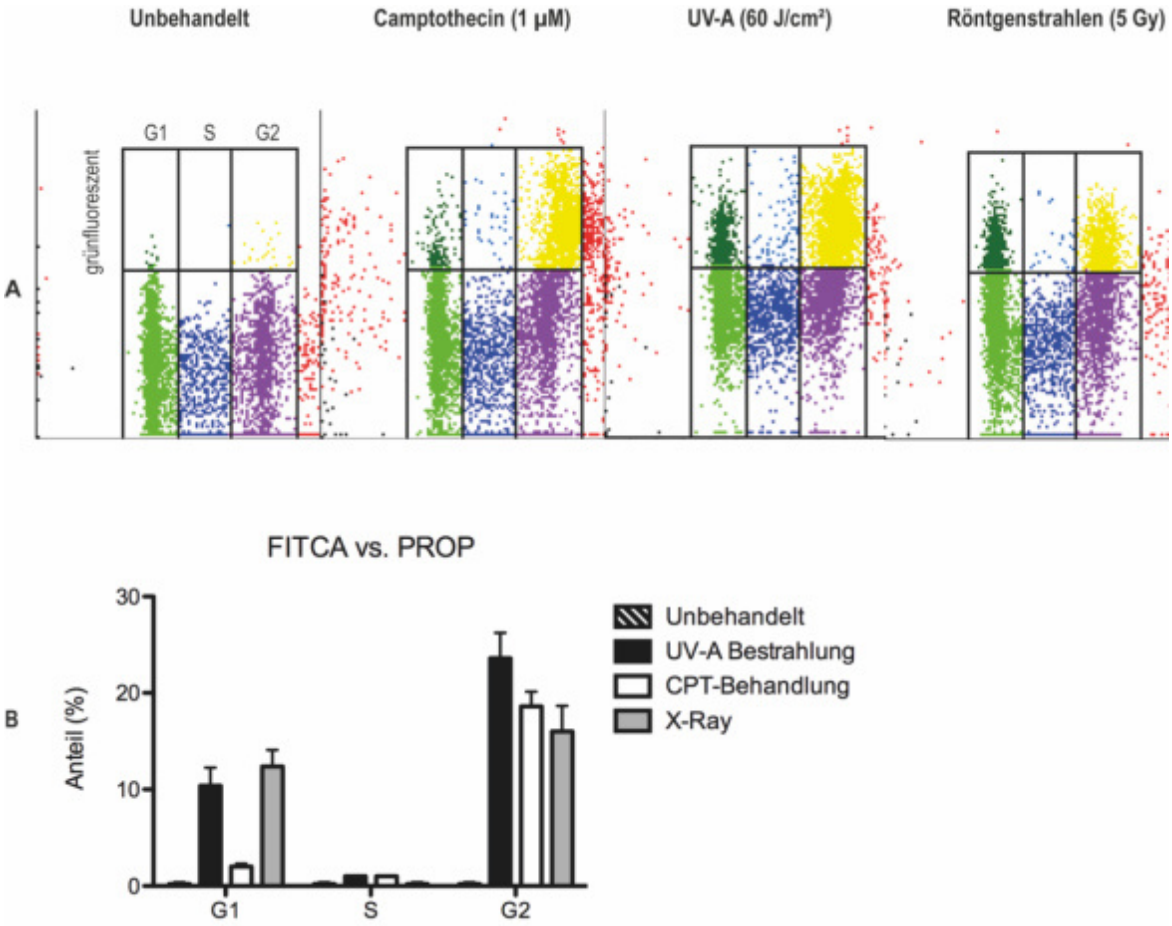


Abb. 18: Teil A: Graphische Darstellung der mittleren Grünfluoreszenz nach Zellzyklusphase bei DNA-Schädigung mit Camptothecin, UVA und Röntgenstrahlen. Die Grünfluoreszenz nimmt entlang der Y-Achse zu. Auf der X-Achse wurden die Zellzyklusphasen anhand ihrer zunehmenden Propidium-Iodid Färbung aufgetrennt. Dies ist möglich, da eine Zunahme des DNA-Gehalts eine Zunahme der Farbintensität mit sich bringt. Außerdem wurde ein Cut-off definiert, ab dem eine Zelle als geschädigt und somit grünfluoreszent angesehen wird. Die Zyklusphasen und die Wertung ob grünfluoreszent oder nicht, wurde farblich verdeutlicht. Teil B: Balkendiagramm mit Fehlerbalken der fünf Durchläufe. Es wird der Anteil der p21-GFP-exprimierenden Zellen in Prozent je nach der Zellzyklusphase und je nach Schädigungsart dargestellt.

Außerdem sieht man hier die Grundaktivität von p21 ohne DNA-Schädigung. Entsprechend wurden die *Gates* so gesetzt, dass eine Zelle nur als p21-GFP-exprimierend gilt, wenn die Grünfluoreszenz die Grundaktivität überschreitet. Die Zellen, die mit CPT geschädigt wurden, überschreiten diese Grenze teilweise und sind daher als p21-GFP-exprimierend identifiziert. Es zeigt sich deutlich, dass sich der Großteil der p21-GFP-exprimierenden Zellen in der G2 Phase befinden. Es sind nur sehr wenige in der G1 Phase und annähernd keine in der S-Phase zu finden. Nach der Schädigung mit UVA Strahlen zeigt sich ein anderes Muster. Die p21-

GFP-exprimierenden Zellen sind auch hier zu einem großen Anteil in der G2 Phase zu finden. Allerdings sind deutlich mehr Zellen in der G1 Phase angesiedelt, als dies nach Schädigung mit CPT der Fall war. Auch hier sind nur sporadisch p21-GFP-exprimierende Zellen in der S-Phase lokalisiert.
Nach der Schädigung mit Röntgenstrahlen hingegen zeigt sich eine relativ ausgeglichene Verteilung der p21-GFP-exprimierenden Zellen auf die G1 und die G2 Phase. In der S-Phase sind wiederum annähernd keine p21-GFP-exprimierenden Zellen aufzufinden.
Um die Verteilung der p21-GFP-exprimierenden Zellen der verschiedenen Schädigungsarten besser miteinander vergleichen zu können, wurde ein Balkendiagramm erstellt (siehe Abbildung 18 Teil B). Hierfür wurden nur die Zellen berücksichtigt, welche die Schwelle der Grünfluoreszenz überschritten haben und als p21-GFP-exprimierend gelten. Dann wurde ihr prozentualer Anteil auf die Zellzyklusphasen bestimmt und jeweils für die drei Schädigungsarten angegeben. Die unbehandelte Kontrollgruppe weist annähernd keine p21-GFP-exprimierenden Zellen auf. In der Darstellung ist der gemeinsame Trend zu erkennen, dass die p21-GFP-exprimierenden Zellen mehr in der G2 Phase, weniger in der G1 Phase und fast gar nicht in der S-Phase aufzufinden sind. Allerdings sind auch die Unterschiede in den Anteilen der G1 und der G2 Phase zu sehen. So befinden sich nach Schädigung mit CPT kaum p21-GFP-exprimierende Zellen in der G1-Phase. Nach einer Schädigung mit Röntgenstrahlen und UVA Strahlen hingegen exprimieren jeweils circa 10 Prozent der Zellen p21-GFP und befinden sich in der G1-Phase. In der G2-Phase sind mehr p21-GFP-exprimierende Zellen nach einer Schädigung mit UVA Strahlen vorzufinden, als nach einer Schädigung mit CPT oder Röntgenstrahlen. Das Verhältnis von p21-GFP-exprimierenden Zellen nach Schädigung mit Röntgenstrahlen oder CPT in der G2- Phase ist annähernd gleich. Demnach sind hier unterscheidbare Verteilungen auf die Zellzyklusphasen nach p21-GFP-Expression für die verschiedenen DNA-Schädigungsarten erkennbar. Dies entspricht der Fragestellung dieser Arbeit.
Eine weitere statistische Auswertung dieser Daten erfolgte nicht, da es nicht um signifikante Unterschiede, sondern die visuell zu beurteilenden Verteilungsmuster geht.

3.4 Ergebnisse des *live cell imaging* über 48 h am konfokalen Mikroskop

In den vorangegangenen Experimenten haben sich klar voneinander abgrenzbare Verteilungen der Zellen auf die Zellzyklusphasen nach verschiedenen DNA-Schädigungsarten gezeigt. Allerdings wurde auch deutlich, dass nicht alle sondern nur ein Teil der Zellen einer Population überhaupt p21-GFP nach einer Schadensexposition exprimieren. Es wurde daher ein viertes Experiment angeschlossen, um zu prüfen, ob die Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung ausschlaggebend ist für die Intensität der folgenden p21-GFP Expression.
Der Effekt der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung auf die p21-GFP-Induktion soll auf Einzelzellniveau untersucht werden. Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops werden

einige Zellen genau verfolgt und beobachtet. Dies erfolgt vom regulären Wachstum, über eine DNA-Schädigung mit CPT bis zu der Expression von p21. Insbesondere liegt hierbei das Augenmerk auf der Zellzyklusphase der Zelle zum Zeitpunkt der Schädigung und dem Ausmaß der darauf folgenden p21-GFP Expression. Außerdem soll beurteilt werden, in welcher Zellzyklusphase sich die Zellen nach der p21-GFP-Expression befinden und ob diese in der Zellzyklusphase verharren.
Für dieses Experiment wurden in sieben Versuchsreihen auf einem full Track Mikroslide p21-GFP-editierte Zellen ausgesät. Diese wurden daraufhin mit CPT vergiftet und 48 Stunden am konfokalen Mikroskop beobachtet. Die Zellen exprimieren ein PCNA-RFP, welches die Einordnung in die Zellzyklusphase ermöglicht. Als Kontrollgruppe erfolgte zunächst eine Versuchsreihe ohne DNA-Schädigung über 48 Stunden (siehe Abbildung 19). Hier sind auf der linken Seite die rotfluoreszierenden Aufnahmen zur Einschätzung des Zellzyklus und auf der rechten Seite die grünfluoreszierenden Aufnahmen der p21-GFP Expression. Es kann gesehen werden, dass sich die Zellen über die 48 h teilen und auch innerhalb des *Slides* bewegen. Es erfolgte keine Schädigung und es ist auch keine Zelle mit einer vermehrten p21-GFP Expression zu erkennen. Das Areal mit vermehrter Grün- und Rotfluoreszenz entspricht am Ehesten Zelldetritus von einer Zelle, die das Aussäen nicht überlebt hat. Nach der Kontrolle erfolgten die Versuchsreihen, in der die Zellen mit CPT geschädigt wurden (siehe eine Versuchsreihe in Abbildung 20). Hier ist die Verteilung der Zellen vor der Vergiftung vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Auch direkt nach der Vergiftung der Zellen sind keine Unterschiede erkennbar. Nach 24 h sind zwei Zellen zu sehen, die stark grünfluoreszieren und somit die Expression von p21-GFP induziert haben. Nach 48 Stunden sind vier Zellen p21-GFP positiv und eine, die vermutlich in die Apoptose übergeht. Darüber hinaus kann auf der linken Seite die Zellzyklusphase nach 48 h beurteilt werden. Hier sieht man, dass sich keine einzige der vergifteten Zellen in der S-Phase befindet. Somit ist der Zellzyklus zum Erliegen gekommen. Außerdem können die p21-GFP-exprimierenden Zellen zu einer Zellzyklusphase zugeordnet werden. Diese befinden sich in der G1 oder G2 Phase.

Die p21-GFP-exprimierenden Zellen sollten nun eigentlich über die Aufnahmeserie zurückverfolgt und bezüglich ihrer Zellzyklusphase eingeschätzt werden. Allerdings war diese geplante Zuordnung nicht möglich, da sich über die Aufnahmeserie von 48 h kontinuierlich der Fokus verstellt hat. Dieses methodische Problem hat sich über alle sieben Versuchsreihen wiederholt und konnte nicht behoben werden. Somit kann keine sichere Zuordnung der Zellen erfolgen und die geplante Auswertung ist nicht möglich. Dennoch zeigen sich die erwartete p21-GFP-Expression nach CPT Schädigung. Auch die Einschätzung der Zellen nach ihrer Zellzyklusphase mit der PCNA-RFP war erfolgreich. Bei stabilem Fokus hätte also die Zellzyklusphase zu Beginn der Schädigung mit dem späteren Ausmaß der p21-GFP Expression verglichen werden können.

Aufnahmen des Konfokalen Mikroskops einer unbehandelten Zelllinie über 48 Stunden

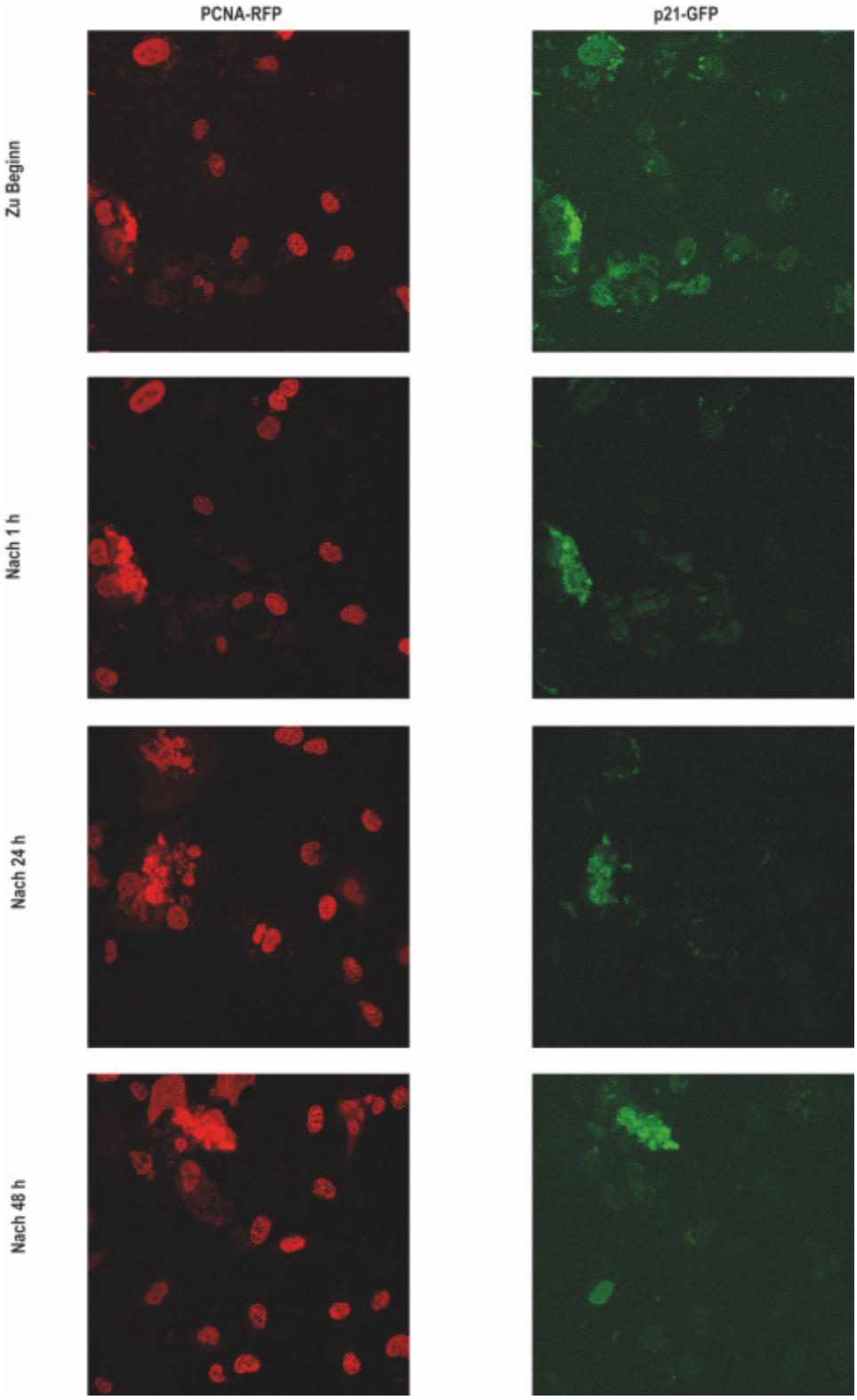


Abb. 19: Darstellung einer unbehandelten Zellreihe zu Beginn der Aufnahme und nach 1 h, 24 h und 48 h in 40-facher Vergrößerung. Auf der linken Seite wird die Rotfluoreszenz der PCNA dargestellt. Hier kann die Zellzyklusphasen der einzelnen Zellen hergeleitet werden. Auf der rechten Seite wird die Grünfluoreszenz des p21-GFP dargestellt. Hier kann der Grad der Schädigung einer Zelle hergeleitet werden.

Aufnahmen des Konfokalen Mikroskops einer mit CPT vergifteten Zelllinie über 48 Stunden

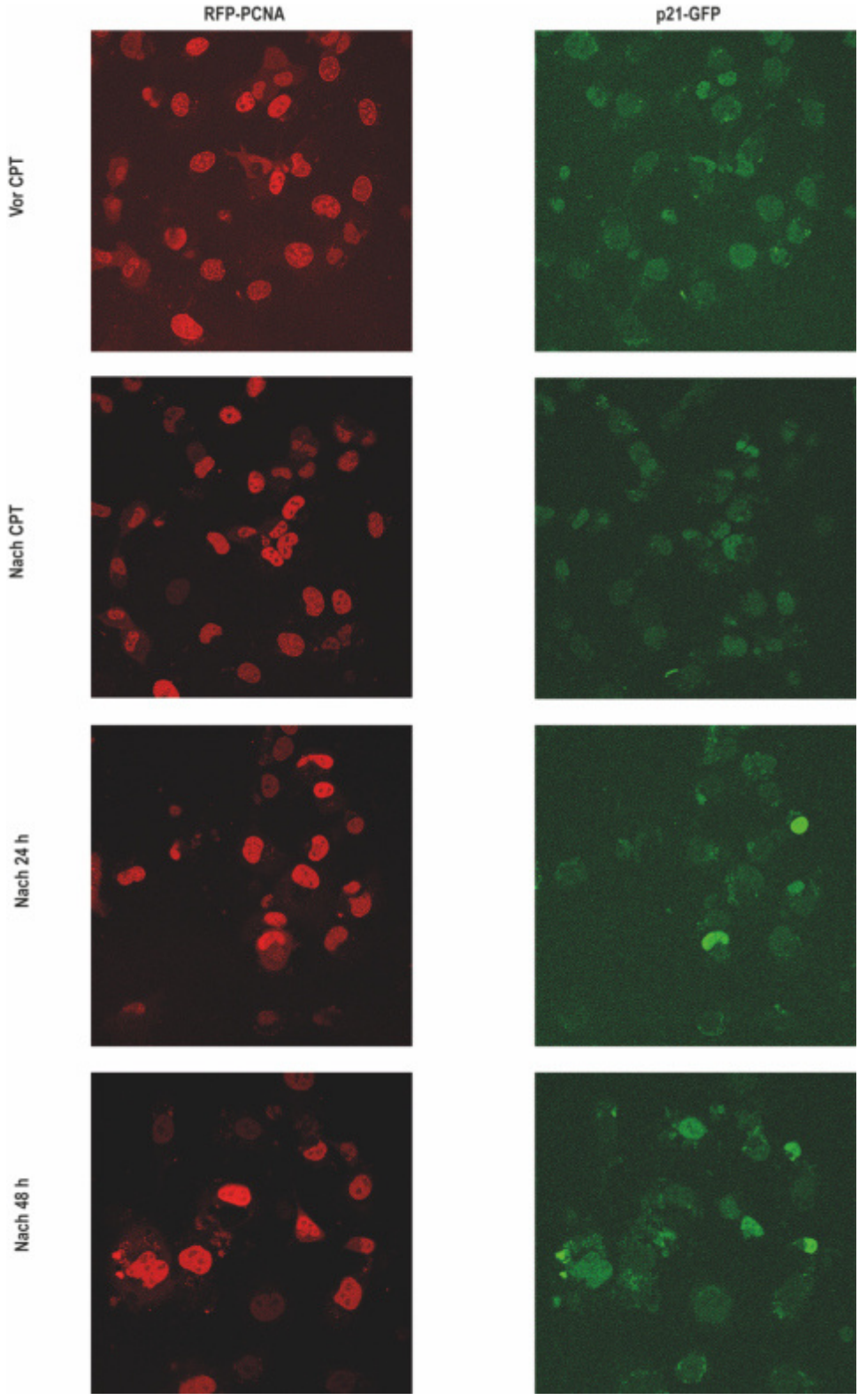


Abb. 20: Darstellung einer mit CPT vergifteten Zellreihe zu Beginn der Aufnahme und nach 1 h, 24 h und 48 h in 40-facher Vergrößerung. Auf der linken Seite wird die Rotfluoreszenz der PCNA dargestellt. Hier kann die Zellzyklusphasen der einzelnen Zellen hergeleitet werden. Auf der rechten Seite wird die Grünfluoreszenz des p21-GFP dargestellt. Hier kann der Grad der Schädigung einer Zelle hergeleitet werden.

4. Diskussion und Schlussfolgerungen

4.1 Diskussion der Analyse der mittleren Fluoreszenz nach UVA Bestrahlung

Die Analyse der mittleren Fluoreszenz nach UVA Bestrahlung hat einen annähernd sigmoidalen Verlauf in der Anstiegsdynamik von p21 bei steigender UVA Strahlung ergeben. In Vorarbeiten des gastgebenden Instituts wurden bereits ein linearer Verlauf für Röntgenstrahlen und ein asymptotischer Verlauf für Camptothecin bestimmt (bisher unveröffentlichte Ergebnisse des gastgebenden Instituts (Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des UKD)). Somit bestehen bei diesen drei Schädigungsarten voneinander abgrenzbare Dosis-Wirkungsverhältnisse.

Es stellt sich die Frage, warum die Dynamik der p21 Expression bei den DNA Schädigungsarten so unterschiedlich verläuft. Dies ist schwer vorherzusagen, da die Signalkaskade auf DNA-Schädigung sehr komplex ist. Die Induktion von p21 ist nur ein Baustein dieser Kaskade und von vielen Faktoren abhängig. Dennoch lässt sich die p21 Dynamik eindeutig einer Schädigungsart zuordnen. Die untersuchten Schädigungsarten haben, wie in der Einleitung unter 1.3 erläutert, einen definierten Wirkmechanismus. Die unterschiedlichen Angriffspunkte bedingen sicherlich das Ausmaß und den Weg der Zellantwort. Eine genaue Quantifizierung und Untersuchung dieser Signalkaskade übersteigt den Rahmen dieser Arbeit. Allerdings ist anzunehmen, dass hier die Ursachen für die unterschiedliche p21 Dynamik nachzuvollziehen sind.

Im Rahmen der Fehleranalyse erscheint dieses Experiment zuverlässig. Die Methodik basiert auf der Durchflusszytometrie, welche seit Jahren eine starke Position als zuverlässige Analysemethode in der Wissenschaft innehat (Robinson und Roederer 2015). Eine weitere mögliche Fehlerquelle besteht in einer Verfälschung der Bestrahlungsintensität durch Nichteinhaltung der korrekten Zeitintervalle. Nach bestem Wissen wurden die Zeitintervalle eingehalten. Demnach sind keine Abweichungen bekannt. Die statistische Auswertung hat einen guten Effekt gezeigt. Bei der Voraussetzungsprüfung hat sich gezeigt, dass die Daten Heteroskedastizität aufweisen. Allerdings konnte dieses Problem behoben werden, indem robuste Standardfehler mit Hilfe von HC3 geschätzt wurden. Dies wird als eine zuverlässige Methode angesehen, um die statistische Auswertung bei Heteroskedastizität zuverlässig zu ermöglichen (Hayes und Cai 2007). Außerdem führt, laut Literatur, die Verletzung der Voraussetzung der Heteroskedastizität nur zu einer geringfügigen Verzerrung der Ergebnisse (Rudolf und Müller 2020). Ein weiteres Problem war die Verletzung der Annahme einer Normalverteilung bei der Voraussetzungsprüfung. Insbesondere ist hier das Problem durch eine scheinbar kleine Stichprobe durch den Einsatz von fünf Versuchsreihen bedingt. Allerdings wurden in den jeweiligen Versuchen je 20.000 Zellen gemessen, sodass die Gesamtzahl n deutlich größer ausfällt. Somit ist die Bedingung weitreichend erfüllt, dass bei

einer ausreichend großen Stichprobe (mindestens n>30) ein Test auf Normalverteilung nicht mehr notwendig ist (Salkind 2010). Demnach ist auch die Voraussetzung der Normalverteilung als gegeben anzusehen. Es ist lediglich eine systematische Verzerrung über die gesamte Versuchsreihe hinweg denkbar. Eine weitere Verzerrung in der statistischen Auswertung ist möglich, da im zweiten Schritt die Daten auf die Grundfluoreszenz genullt wurden (siehe 3.1). Werte die kleiner als die Grundfluoreszenz waren, wurden ebenfalls auf null gesetzt. Dies entspricht einem Informationsverlust und kann eine Verzerrung der Ergebnisse bedingen. Allerdings erfolgte dies nur sporadisch und es kann angenommen werden, dass kein großer Effekt auf die Ergebnisse besteht. Es sind darüber hinaus keine Fehler in der Durchführung der Versuchsreihen auffällig geworden. Es ist dennoch empfehlenswert, die Versuchsreihe zu wiederholen und die Ergebnisse bezüglich Reproduzierbarkeit zu prüfen.

Die bisherige Forschung hat gezeigt, dass p21 allgemein als Marker zur Detektion von DNA-Schädigung verwendbar ist (Koike et al. 2011). Zur Visualisierung der Dynamik von p21 wurde bereits mehrfach erfolgreich ein System mit Fluoreszenz oder Biolumineszenz entwickelt (Ohtani et al. 2007; Stewart-Ornstein und Lahav 2016). Auch wurde die p21 Dynamik schon eingesetzt, um eine Prognose bezüglich Seneszenz oder Proliferation nach DNA-Schädigung zu machen (Hsu et al. 2019). Allerdings wurde in der Literaturrecherche keine Arbeit gefunden, in der die Dynamik verschiedener Schädigungsarten verglichen wurde. In Bezug auf den Wirkmechanismus der DNA-Schädigung durch UVA-Strahlen gab es Arbeiten, die die Rolle der Topoisomerase I näher beleuchten (Mielke et al. 2007). Hier hat sich gezeigt, dass nach UVA-Schädigung eine rapide Akkumulation der Topoisomerase I erfolgt. Die Autoren vermuten eine Funktion der Topoisomerase I als Signalmolekül der DNA-Schädigung, aber auch als Teil der DNA-Reparatur. Dies ist insbesondere deshalb relevant, da CPT (eine weitere untersuchte DNA-Schädigungsart dieser Arbeit) ein Hemmer der Topoisomerase I ist. Hier besteht ein möglicher Ansatz zur Untersuchung der Gemeinsamkeiten und Unterschiede, welcher die unterschiedliche p21 Dynamik der DNA-Schädigungsarten erklären könnte.

Im Verlauf bieten sich weitere Messungen mit anderen DNA-Schädigungsarten an, um das Potential von p21 als Messsystem besser abschätzen zu können. Ein weiteres zu untersuchendes Beispiel wären karzinogene Substanzen wie Benzpyren. Außerdem stellt sich die Frage, inwiefern man Schädigungsarten unterscheiden kann, die den gleichen Schädigungsweg teilen. Zum Beispiel führt ionisierende Strahlung zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (siehe 1.3), welche die DNA schädigen. Gleichermaßen führen einige Pestizide oder auch Tabakrauch zur Aufnahme und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche die DNA schädigen (Kida et al. 2021). Es stellt sich die Frage ob p21 auch hier unterschiedliche Dynamiken zeigen kann und somit auch hier als Messsystem fungieren könnte. Ein Ansatz wäre, dass Pestizide und Tabakrauch neben den reaktiven Sauerstoffspezies noch andere Mechanismen zur DNA-Schädigung aufweisen. So enthält Tabakrauch auch viele chemische Kanzerogene wie Benzo(a)pyren, die über die Bildung von

DNA Addukten zur DNA-Schädigung führen (Gossauer 2006). Somit ist ein Vergleich von ionisierender Strahlung (beispielsweise Röntgenstrahlen gegenüber Gammastrahlung) untereinander vermutlich schwieriger. Es wird sehr interessant sein, herauszufinden, ob eine Unterscheidung mittels der p21 Dynamik möglich ist.

4.2 Diskussion der Zellzyklusanalyse am FACS im Vergleich von HT1080 Wildtyp und HT1080 p21-/-

Der Vergleich des Zellzyklus von HT1080 Wildtyp und HT1080 p21-/- hat weniger Unterschiede ergeben, als zu Beginn erwartet. Dennoch konnten bei allen drei Schädigungsarten ein signifikant höherer Anteil der S-Phase von HT1080 p21-/- festgestellt werden. Am Stärksten ist die Evidenz hierfür bei der Schädigung mit Röntgenstrahlen. Da geschädigte Zellen nach Möglichkeit nicht in die S-Phase übergehen sollten, ist hier die Bedeutung von p21 nachzuvollziehen. Bei der Schädigung mit Röntgenstrahlen ist der Anteil von HT1080 p21-/- in der G1-Phase signifikant geringer, als die vom Wildtyp. Dies entspricht dem Mechanismus, dass die geschädigten Zellen über p21 in den G1-Arrest gehen und nicht weiter in die S-Phase übertreten.

Zunächst ist unklar, warum sich nur so geringe Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem p21-/- Klon zeigen. Möglicherweise beruht dies auf alternativen Signalwegen, welche auch ohne p21 einen Zellzyklusarrest herbeiführen können. Es ist möglich, dass die Funktion von p21 durch einen anderen Signalweg über p53 kompensiert wird. Der signifikant höhere Anteil an Zellen, der sich trotz Schädigung in der S-Phase befindet, zeigt allerdings, dass keine vollständige Kompensation erfolgt ist. Zellen mit einem hohen p21 Level sind nicht in der Lage in die S-Phase überzugehen, um zu verhindern, dass eine DNA-Schädigung an eine Tochterzelle weitergegeben wird. Der Verlust von p21 könnte einen vermehrten Übergang geschädigter Zellen in die S-Phase erklären. Ohne die vermutete Kompensation wäre hier noch ein viel größerer Anteil an Zellen in der S-Phase möglich. Alternativ befinden sich die p21-/- Zellen aber auch aus anderen Gründen vermehrt in der S-Phase. So wäre es denkbar, dass durch die Abwesenheit von p21 die S-Phase der Zellen länger dauert. Dadurch wären mehr Zellen zum Zeitpunkt der Messung in der S-Phase anzutreffen. Gleichermaßen ist es auch denkbar, dass die S-Phase bei DNA-Schädigung länger aufrechterhalten wird, wenn die Signalkaskaden auf die DNA-Schädigung ohne p21 ablaufen müssen.
In jedem Fall scheint p21 eine wichtige Rolle für eine angemessene Antwort auf die DNA-Schädigung zu spielen.

Die Durchführung des Experiments verlief ohne Komplikationen. Die Methode zum Ausschalten eines Gens zur Untersuchung seiner Funktion ist in der Forschung weit verbreitet. Auch die Techniken zur Generierung eines funktionslosen Klons p21-/- mittels CRISPR/Cas ist weitläufig genutzt und ausreichend validiert (Lee et al. 2017). Die Zellen p21-/- wurden mit der CRISPR/Cas Technik in Vorarbeiten des Instituts erstellt. Die korrekte Editierung wurde mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung kontrolliert (siehe 1.4.1). Diese hat

gezeigt, dass die DNA, neben der gewünschten Deletion, keine Veränderungen zeigt. Somit kann angenommen werden, dass hier keine Verzerrung der Experimente verursacht wird. Auch die Schädigung der DNA mittels Röntgenstrahlen (Zhao et al. 2019) und CPT (Sakasai und Iwabuchi 2016) sind rekurrierend eingesetzte Methoden in der Forschung. Es sind keine weiteren Fehlerquellen bekannt.

Vorangegangene Forschung hat bereits die Empfehlung ergeben die p21 Funktion mit genetisch funktionsunfähigen Klonen (p21-/-) zu untersuchen (Karakas et al. 2007). Mit dieser Technik wurden bereits Hinweise gefunden, dass das Auftreten von Tumoren und Metastasen nach Verlust von p21 im Mausmodell gesteigert ist (Adnane et al. 2000). In der Literaturrecherche wurden keine Studien gefunden, welche die Verteilung der Zellzyklusphasen nach DNA-Schädigung bei p21 -/- Zellen beschreiben und miteinander vergleichen. Allerdings wurde bereits die Komplexität der Signalkaskade auf DNA-Schädigung und ihre Beeinflussung durch p53 beleuchtet (Vousden und Prives 2009). Es hat sich gezeigt, dass viele Variablen, wie der Zelltyp, die Dosis der DNA-Schädigung oder die DNA-Schädigungsart Einfluss auf die Induktion der Zielgene von p53 hat. Diese Komplexität und die alternativen Signalwege können somit ein Grund sein, warum in dieser Arbeit die p21-/- Zelllinie nur geringe Unterschiede gezeigt hat.

Im Verlauf bieten sich weitere Experimente an. Zum einen kann der Funktionsverlust von p21 durch eine Kombination von einer Deletion auf DNA-Ebene, RNA-Interferenz und einer Blockade der Proteinfunktion gesichert werden (Vidalin et al. 2009). So kann eine Restfunktion als nahezu unmöglich angesehen werden. Außerdem kann die Verteilung des Zellzyklus nach DNA-Schädigung weitergehend untersucht werden, wenn zusätzlich die alternativen Signalwege blockiert werden. Hierfür könnte auf Methoden und Substanzen aus der Tumorforschung des Mammakarzinoms zurückgegriffen werden (Jin et al. 2021; Carrassa und Damia 2017).

4.3 Diskussion der Zellzyklusanalyse am FACS in Relation zur p21-GFP Expression

Die Analyse des Zellzyklus von p21-GFP-exprimierenden Zellen nach Schädigung mit CPT, UVA und Röntgenstrahlen hat ein individuelles Verteilungsverhältnis für jede dieser drei Schädigungsarten ergeben. Von allen Zellen, die vermehrt p21-GFP exprimiert haben, befinden sich kaum welche in der S-Phase. Allerdings unterscheiden sich die Zellen in Ihrer Aufteilung auf die G1- und die G2-Phase. Für jede Schädigungsart kann ein eigenes Verteilungsverhältnis des Zellzyklus definiert werden. Nach UVA Schädigung befinden sich die p21-GFP-exprimierenden Zellen etwas häufiger in der G2-Phase, als in der G1-Phase. Bei einer Schädigung mit Camptothecin kann nur ein sehr geringer Anteil der p21-GFP-exprimierenden Zellen in der G1-Phase gesehen werden. Der Großteil befindet sich in der G2-Phase. Eine Schädigung durch Röntgenstrahlen hingegen bewirkt eine relativ ausgeglichene Verteilung von G1-Phase und G2-Phase.

Somit ist diese Verteilung des Zellzyklus auch ein mögliches Messsystem für die DNA-Schädigungsart. In Verbindung mit der Messung der p21 Dynamik, kann die Verteilung der Zellzyklusphasen somit die Differenzierung der Schädigungsarten präziser gewährleisten.

Hier ist an erster Stelle zu diskutieren, warum die verschiedenen DNA-Schädigungsarten zu so unterschiedlichen Verteilungen der p21-GFP-Expression im Verhältnis zu der Zellzyklusphase führen. Ähnlich wie in Kapitel 4.1 dargelegt, sind Unterschiede durch die genauen Wirkmechanismen der Schädigungsarten und der entsprechend unterschiedlichen Induktion der Signalkaskaden der Zelle zu vermuten. Allerdings ist unklar, warum diese p21 Dynamiken zu unterschiedlichen Aufteilungen nach Zellzyklusphase führen.
Eine Möglichkeit besteht darin, dass geschädigte Zellen, die sich in der S-Phase befinden, keine p21-Expression zulassen. Befindet sich eine Zelle in der S-Phase wird diese zunächst abgeschlossen und nicht unterbrochen (Barr et al. 2017). Die Expression von p21 erfolgt erst in der darauffolgenden G2-Phase. In der G1- und der G2-Phase hingegen kann die p21-Expression direkt nach der DNA-Schädigung erfolgen. Die Unterschiede in der Verteilung auf die Zellzyklusphasen je nach DNA-Schädigungsart sind vermutlich auf deren unterschiedliche Wirkmechanismen zurückzuführen (siehe Kapitel 1.3).
Ein weiterer Erklärungsansatz besteht darin, dass die p21-GFP-exprimierenden Zellen sich in den Zellzyklusphasen akkumulieren, weil die p21-Induktion zum Zellzyklusarrest in der jeweiligen Phase führt. So inhibiert p21 die Cycline, welche den Übergang in die S-Phase vermitteln. Ein G1-Arrest ist die Folge und viele Zellen könnten sich auf die G1-Phase verteilen. Allerdings ist ein Großteil der p21-GFP-exprimierenden Zellen in der G2-Phase. Dies kann möglicherweise daran liegen, dass p21 auch den Komplex aus Cyclin B und CDK1 inhibieren kann (Satyanarayana und Kaldis 2009). Dieser ist für den Übergang von G2 in die Mitose verantwortlich (O'Connor 1997). Ein weiterer Faktor könnte darin gegeben sein, dass die Zellen in der S-Phase deutlich vulnerabler für die DNA-Schädigung sind. Nach der Schädigung können sie noch in die G2-Phase übertreten und werden hier mit einem hohen Level von p21 auffällig. Diese Vulnerabilität in der S-Phase kann in Abhängigkeit von der DNA-Schädigungsart unterschiedlich stark ausfallen und somit die verschiedenen Verteilungsmuster erklären.
Neben dem Zellzyklusarrest, kann p21 die Zelle in die Seneszenz überführen. Allerdings ist dies eine sehr komplexe Entwicklung und der Zustand der Seneszenz etabliert sich erst deutlich später als die zweitägige Beobachtungsperiode der Experimente (Kumari und Jat 2021). Der Zustand der Seneszenz erfolgt auch in der G1 oder der G0 Phase, sodass sich Zellen, welche langfristig in die Seneszenz übergehen werden, zu der G1-Phase zuordnen lassen dürften. Es ist auch denkbar, dass die Schädigungsarten unterschiedlich häufig eine Seneszenz der Zellen nach Schädigung induzieren. Dies kann ebenso Einfluss auf die verschiedenen Verteilungsmuster nehmen. In anderen Arbeiten hat sich gezeigt, dass p21 die Zellen eher in die Seneszenz zu treiben scheint, als in den programmierten Zelltod (Jänicke et al. 2007). Es ist somit plausibel, dass die p21-GFP-hochexprimierenden Zellen gegebenenfalls später in die Seneszenz übergehen.

Bei der Durchführung der Versuchsreihen sind keinerlei Fehler oder Probleme auffällig geworden.
Die Methodik des Versuches beruht wieder auf der FACS-Analyse, welches eine bewährte Technik ist. Der Einsatz von PCNA als Zellzyklusmarker ist ebenso ein bekanntes und zuverlässiges Verfahren (Connolly und Bogdanffy 1993; Kisielewska et al. 2005).
Eine potentielle Fehlerquelle ist hier die händische Auswertung am FACS-Gerät. Es mussten sowohl die Grenzen für die Zellzyklusphasen, als auch die Grenzen für die p21-GFP-Expression gesetzt werden. Dies hatte sich bei einigen Versuchsreihen als anspruchsvoll herausgestellt. Hier kann es zu Verzerrungen kommen.
Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass sich die Unterschiede in der Verteilung auf die Zellzyklusphasen bei den DNA-Schädigungsarten daher ergeben, dass sich einfach durch Zufall mehr Zellen zum Zeitpunkt der Schädigung in einer bestimmten Zellzyklusphase befanden, als zum Zeitpunkt der Schädigung mit einer anderen DNA-Schädigungsart. Somit würde kein Effekt, sondern nur eine zufällige Verteilung die Ergebnisse bedingen. Dies ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da eine große Stichprobe an gemessenen Zellen vorliegt. Es kann dadurch angenommen werden, dass solche zufälligen Messfehler reguliert werden und nicht die Ergebnisse verzerren können.
Auch hier ist eine Wiederholung der Versuchsreihen sinnvoll, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu prüfen.

Die bisherige Forschung hat bereits die subzelluläre Verteilung von p21 nach DNA-Schädigung untersucht (Li et al. 1996). Außerdem wurde die Bedeutung der zeitlichen Dynamik der p21 Expression untersucht (Perucca et al. 2006), sowie die Bedeutung der p21 Dynamik in der Zelle für die Entscheidung der Proliferation gegenüber der Seneszenz (Hsu et al. 2019). Allerdings ist in der Literaturrecherche keine Studie gefunden worden, welche die p21-GFP-Expression nach verschiedenen DNA-Schädigungsarten in Hinblick auf die Zellzyklusphase vergleicht. Allgemeine Arbeiten zur Funktionsweise von p21 und seiner Induktion wurden in einem Rückblick 2013 zusammengefasst (Warfel und El-Deiry 2013).

Zur weitergehenden Erforschung bieten sich weitere Messungen mit verschiedenen DNA Schädigungsarten an. Insbesondere kann hier eventuell eine Lösung für das Problem der Unterscheidung gleicher Schädigungsmechanismen gefunden werden (siehe 4.1). Möglicherweise lassen sich ionisierende Strahlen untereinander trotz ihres gleichen Schädigungsmechanismus in der Verteilung der p21 Expression nach Zellzyklusphase differenzieren.

4.4 Diskussion des *live cell imagings* über 48 h am konfokalen Mikroskop

Bei der Beobachtung am konfokalen Mikroskop über 48 Stunden konnte die erwartete Zunahme einzelner Zellen an p21-GFP nach Vergiftung mit Camptothecin sehr gut gesehen werden. Die unbehandelte Kontrollgruppe hat vereinzelt auch Grünfluoreszenz gezeigt,

jedoch nicht in der Intensität, wie einzelne sehr stark aktivierte Zellen der Vergiftungsgruppe. Außerdem befanden sich die stark p21-GFP-exprimierenden Zellen in der G1 oder G2 Phase. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des dritten Experiments (siehe 3.3 und 4.3) und entspricht dem Verteilungsverhältnis der geschädigten Zellen auf die Zellzyklusphasen. Allerdings war es nicht möglich, eine Zuordnung der stark aktivierten Zellen nach 48 Stunden mit den Zellen zum Zeitpunkt der Vergiftung zu machen. Dies liegt daran, dass sich in der ersten Nacht kontinuierlich der Fokus des Mikroskops verstellt hat. Somit konnten die Zellen ihre Position ändern, ohne dass man sie danach den Aufnahmen vor der Fokusverschiebung zuordnen konnte. Die Analyse des Zellzyklus zum Zeitpunkt der Vergiftung einer stark aktivierten Zelle nach 48 Stunden ist somit nicht möglich.
Die generelle Funktionsweise unseres Experiments ist allerdings voraussichtlich gegeben. Eine Wiederholung des Experiments mit beispielsweise Keratinozyten, welche sich nicht bewegen, scheint erfolgsversprechend. Auch ist es wahrscheinlich möglich die Durchführung so zu optimieren, dass der verschobene Fokus ausgeglichen wird. Eine entsprechende Wiederholung der Messreihe ist von dem gastgebenden Institut bereits geplant.

Wie bereits beschrieben, gelang keine Zuordnung der p21-GFP-exprimierenden Zellen zu der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Schädigung. Dennoch haben einige Zellen eine starke p21 Induktion gezeigt und einige gar keine Induktion, obwohl die Schädigung mit CPT identisch war. Die zentrale Frage ist nun, warum sich die p21 Induktion so unterschiedlich darstellt. Eine Erklärung wäre, dass Zellen, die sich zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung in der S-Phase befinden, besonders anfällig für die DNA-Schädigung sind. Eine Schädigung würde sich darüber hinaus nach der Teilung auch direkt in zwei Zellen (der Mutter- und der Tochterzelle) zeigen. Somit wäre es sinnvoll, eine solche Zelle forciert an der Teilung zu hindern, was sich in einer starken p21 Induktion äußern könnte. Möglicherweise sind Zellen in der G1 und G2 Phase hingegen resistenter gegen DNA-Schädigung. Eine geringfügigere Schädigung würde somit auch nur eine geringere p21 Induktion nach sich ziehen. Damit könnten die Ergebnisse dieses Experiments erklärt werden. Hier wäre eine Zuordnung der Zellen über die 48 h Aufnahmeserie essentiell zum weiteren Verständnis.

Die Durchführung dieses Experiments ist anspruchsvoll. Die verwendeten *4-Well-Slides* haben nur eine sehr geringe Fläche für die Zellen. Eine Fehlerquelle ist somit eine unbeabsichtigt zu dichte Aussaat der Zellen. Durch Kontaktinhibition und Nährstoffmangel, können die Zellen eines zu dicht bewachsenen *Slides* bereits ohne Behandlung in den Zellzyklusarrest übergehen und eine verstärkte p21 Induktion zeigen (Hoeferlin et al. 2011). Auch können die Zellen bei der Vergiftung des *Slides* mit CPT aspiriert werden. Dies macht den Durchlauf nicht verwertbar. Das größte Problem bestand allerdings in dem sich verändernden Fokus der Kamera. Da das Problem bisher nicht behoben werden konnte, ist dieser Teil leider nicht auswertbar. Er wurde dennoch in diese Arbeit aufgenommen, da er in seinem generellen Aufbau funktioniert hat. Auch die starke p21 Induktion einzelner Zellen zeigt, dass nur die Zuordnung zu einem gelungenen Experiment gefehlt hat.

In der bisherigen Forschung wurde bereits die Technik zur Messung der Dynamik eines Proteins wie p21 mittels Fluoreszenz vorgestellt und untersucht (Stewart-Ornstein und Lahav 2016). Auch wurde bereits gezeigt, dass Zellen, die in der S-Phase geschädigt wurden, in der folgenden G1 Phase vermehrt p21 exprimieren (Barr et al. 2017). In dieser Arbeit wurde auch bereits die Technik verwendet, die Zellen *live* über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass im konfokalen Mikroskop eindeutige Verteilungsmuster des PCNAs der Zellen zu erkennen sind, die es ermöglichen sie einer Zellzyklusphase (im Beispiel der zitierten Arbeit die S-Phase) zuzuordnen (Kalfalah et al. 2015).

Im Verlauf bietet dieser Ansatz einige weitere Experimente. Es können Untersuchungsreihen durchgeführt werden, in denen die stark grünfluoreszierenden Zellen nach ihrer Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Schädigung aufgeschlüsselt werden. Eine statistische Aufstellung kann zeigen, ob die S-Phase signifikant häufiger zu einer starken p21 Expression führt.
Außerdem kann der Ansatz mit weiteren Schädigungsarten wiederholt werden. Hier ist interessant, ob bei anderen Schädigungsarten sich die Häufigkeit der stark grünfluoreszierenden Zellen ändert. Ebenso kann hier überprüft werden, welche Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Schädigung am häufigsten zu einer starken Grünfluoreszenz führt. Nach der Hypothese dieser Arbeit ist die Schädigung zum Zeitpunkt der S-Phase hier entscheidend und es sollten sich keine Unterschiede gegenüber den verschiedenen Schädigungsarten ergeben. Somit könnten diese Experimente helfen, die Funktionsweise und Dynamik der p21 Expression weiter aufzuschlüsseln.

4.5 Allgemeine Fehlerquellen und Limitationen

Im Rahmen der Fehleranalyse und der Limitationen werden hier mögliche Fehlerquellen aufgelistet, die bei allen Experimenten gleichermaßen gegeben sein können.
Zunächst sind Messfehler des FACS-Gerätes denkbar. Allerdings wurden alle Wartungsarbeiten eingehalten, sodass hier kein großes Fehlerpotential zu erwarten ist. Auch bestehen möglicherweise Verzerrungen durch die Veränderung der Zellen mittels CRISPR/Cas. Das *Genome-Editing* wurde von dem gastgebenden Institut durchgeführt. Es wurden auch Erfolgskontrollen gemacht, um eine korrekte Editierung nachzuweisen (siehe 1.4.1 und 1.4.2). Hierbei haben sich jeweils keine Fehler gezeigt und es ist eine korrekte Editierung anzunehmen. Gleichermaßen ist die Methode bereits von anderen Forschungsgruppen verwendet worden. Hier hat sie sich als zuverlässig dargestellt (Stewart-Ornstein und Lahav 2016). In dem Kontext bietet sich der Verweis an, dass die Zellen aus einem bestehenden Vorrat aufgetaut wurden und nicht frisch generiert wurden. Allerdings wurden die Zellen eine Woche vor Beginn der Experimente kultiviert, sodass ausreichend Zeit zur Erholung der Zellen bestand. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Zellkultur. Bei lebenden Zellen handelt es sich um ein komplexes biologisches System, welches natürlichen Schwankungen unterliegen kann. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit größter Sorgfalt.

Dennoch ist immer eine Abweichung der Versuchsreihen je nach Status der Zellkulturen möglich. Auch ist eine Kontamination der Zellkultur mit Bakterien und Pilzen möglich. Bei Einhaltung der generellen Hygienemaßnahmen, konnten allerdings keinerlei Kontaminationen festgestellt werden. Hier ist auch zu erwähnen, dass die Experimente an Fibrosarkom Zellen der Zelllinie HT1080 durchgeführt wurden. Es ist durchaus denkbar, dass bei anderen Zelltypen abweichende Ergebnisse entstehen. Eine Prüfung mit anderen Zelltypen könnte hier weitere Aufklärung erbringen.
Zuletzt bestehen mögliche Verzerrungen durch die Auswertung der Daten am FACS-Gerät. Hier mussten wiederholt bei den Experimenten Grenzen gesetzt werden (sogenannte *Gates*). Beispielsweise wurden Grenzen gesetzt, ab welchem Level der Grünfluoreszenz eine Zelle als p21-GFP-exprimierend gilt. Gleichermaßen musste festgelegt werden, ab welcher Rotfluoreszenz eine Zelle einer Zellzyklusphase zugehörig ist. Dies sind nur Modelle und somit potentiell fehlerbehaftet. Dennoch wurden auch hier die Grenzen mit größter Sorgfalt gesetzt.

4.6 Schlussfolgerung

Abschließend hat diese Arbeit gezeigt, dass die Funktionsweise von p21 nach DNA-Schädigung sehr komplex ist. Die genauen Signalkaskaden und Aktivierungswege sind noch immer Bestandteil aktueller Forschung. Die unterschiedliche Dynamik der p21 Expression bei verschiedenen DNA-Schädigungsarten kann ein weiterer Forschungsansatz zum besseren Verständnis sein. Sowohl als Messsystem, als auch zur weiteren Erforschung der Genese dieser unterschiedlichen Dynamik kann p21 weitergehend genutzt werden.
Auch die Bedeutung der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung in Bezug auf die p21 Induktion scheint sich in dieser Arbeit widerzuspiegeln. Trotz der Limitationen dieser Arbeit, welche weitere Experimente erforderlich machen, ist das generelle Ergebnis eine Bestätigung der Hypothesen. Es hat sich bestätigt, dass die p21 Dynamiken nach den hier getesteten DNA-Schädigungsarten (UVA Strahlen, Röntgenstrahlen und CPT) unterschiedlich sind. Dies hat sich in der Zellzyklusanalyse am FACS Gerät für die einzelnen DNA-Schädigungsarten gezeigt. Somit bestehen also tatsächlich unterschiedliche p21-GFP-Expressionskinetiken. Außerdem unterscheiden sich die DNA-Schädigungsarten im Verteilungsverhältnis der geschädigten Zellen auf die Zellzyklusphasen. Es zeigte sich, dass sich die p21-GFP-exprimierende Zellen auf die G1- und/oder G2-Phasen, nicht jedoch auf die S-Phase verteilen. In welcher Phase vermehrt war jedoch abhängig von der Schädigungsart. Weiterhin hat sich gezeigt, dass Zellen ohne p21 trotz Schädigung häufiger in die S-Phase gehen, die Zellzyklus-Kontrolle also behindert ist. Die Hypothese, dass die Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung ausschlaggebend für die p21 Induktion ist, bleibt bestehen. Dies konnte aber in den Experimenten durch die methodischen Schwierigkeiten nicht nachgewiesen werden.

In den kommenden Jahren wird das Thema der p21 Induktion im Rahmen der Tumorforschung vermutlich weiterhin eine wichtige Rolle spielen. Von dem gastgebenden Institut sind nach aktuellem Stand noch weitere Experimente geplant, sodass eine weitere Aufklärung der Mechanismen zur p21 Induktion bei DNA-Schädigung zu erwarten sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die p21-GFP-Induktion schadensspezifische Kinetiken aufweist. Dieses Zellsystem erscheint somit geeignet als biologisches System zur Toxizitätsbestimmung verschiedenster Substanzen zu fungieren.

5. Verzeichnisse

5.1 Literaturverzeichnis

Abbas, Tarek; Dutta, Anindya (2009): p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (6), S. 400–414. DOI: 10.1038/nrc2657.

Adnane, J.; Jackson, R. J.; Nicosia, S. V.; Cantor, A. B.; Pledger, W. J.; Sebti, S. M. (2000): Loss of p21WAF1/CIP1 accelerates Ras oncogenesis in a transgenic/knockout mammary cancer model. In: *Oncogene* 19 (47), S. 5338–5347. DOI: 10.1038/sj.onc.1203956.

Anwar, Adil; Norris, David A.; Fujita, Mayumi (2011): Ubiquitin proteasomal pathway mediated degradation of p53 in melanoma. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 508 (2), S. 198–203. DOI: 10.1016/j.abb.2010.12.012.

Aparicio, Oscar M. (2013): Location, location, location: it's all in the timing for replication origins. In: *Genes & Development* 27 (2), S. 117–128. DOI: 10.1101/gad.209999.112.

Ball, K. L. (1997): p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding. In: *Progress in cell cycle research* 3, S. 125–134. DOI: 10.1007/978-1-4615-5371-7_10.

Barnum, Kevin J.; O'Connell, Matthew J. (2014): Cell cycle regulation by checkpoints. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1170, S. 29–40. DOI: 10.1007/978-1-4939-0888-2_2.

Barr, Alexis R.; Cooper, Samuel; Heldt, Frank S.; Butera, Francesca; Stoy, Henriette; Mansfeld, Jörg et al. (2017): DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. In: *Nature Communications* 8, S. 14728. DOI: 10.1038/ncomms14728.

Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution (2000). Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum Lehrbuch).

Bode, Ann M.; Dong, Zigang (2004): Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (10), S. 793–805. DOI: 10.1038/nrc1455.

Bohnsack, Brenda L.; Hirschi, Karen K. (2004): Nutrient regulation of cell cycle progression. In: *Annual review of nutrition* 24, S. 433–453. DOI: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073203.

Brosius, Felix (2018): SPSS. Umfassendes Handbuch zu Statistik und Datenanalyse. 8. Auflage. Frechen: mitp (mitp Professional). Online verfügbar unter http://www.content-select.com/index.php?id=bib_view&ean=9783958456693.

Carrassa, Laura; Damia, Giovanna (2017): DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy. In: *Cancer treatment reviews* 60, S. 139–151. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.08.013.

Caspari, Thomas (2000): Checkpoints: How to activate p53. In: *Current Biology* 10 (8), R315-R317. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00439-5.

Cayrol, C.; Knibiehler, M.; Ducommun, B. (1998): p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. In: *Oncogene* 16 (3), S. 311–320. DOI: 10.1038/sj.onc.1201543.

Chao, Chuck C-K (2015): Mechanisms of p53 degradation. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 438, S. 139–147. DOI: 10.1016/j.cca.2014.08.015.

Chatterjee, Nimrat; Walker, Graham C. (2017): Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. In: *Environmental and molecular mutagenesis* 58 (5), S. 235–263. DOI: 10.1002/em.22087.

Connolly, K. M.; Bogdanffy, M. S. (1993): Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 41 (1), S. 1–6. DOI: 10.1177/41.1.7678022.

Cuddihy, Andrew R.; O'Connell, Matthew J. (2003): Cell-cycle responses to DNA damage in G2. In: *International review of cytology* 222, S. 99–140. DOI: 10.1016/s0074-7696(02)22013-6.

Dröge, Peter; Meister, Gunter; Schiebel, Elmar (2018): Molekulare Genetik. 11., unveränderte Auflage. Hg. v. Alfred Nordheim und Rolf Knippers. Stuttgart: Thieme. Online verfügbar unter http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1936767.

Fortini, P.; Pascucci, B.; Parlanti, E.; D'Errico, M.; Simonelli, V.; Dogliotti, E. (2003): 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. In: *Mutation research* 531 (1-2), S. 127–139. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.004.

Fotedar, R.; Diederich, L.; Fotedar, A. (1996): Apoptosis and the cell cycle. In: *Progress in cell cycle research* 2, S. 147–163. DOI: 10.1007/978-1-4615-5873-6_15.

Garbe, C.; Rassner, G. (Hg.) (1998): Dermatologie. Leitlinien und Qualitätssicherung für Diagnostik und Therapie Berichte von der 39. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Gartel, Andrei L.; Radhakrishnan, Senthil K. (2005): Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. In: *Cancer research* 65 (10), S. 3980–3985. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3995.

González-Magaña, Amaia; Blanco, Francisco J. (2020): Human PCNA Structure, Function and Interactions. In: *Biomolecules* 10 (4). DOI: 10.3390/biom10040570.

Gossauer, Albert (2006): Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. Eine Einführung in die organische Chemie. Zürich: Verl. Helvetica Chimica Acta.

Graw, Jochen (2015): Genetik. 6. Aufl. 2015. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1515205.

Hainaut, Pierre (2007): 25 Years of p53 Research. Dordrecht: Springer. Online verfügbar unter http://gbv.eblib.com/patron/FullRecord.aspx?p=238607.

Hayes, Andrew F.; Cai, Li (2007): Using heteroskedasticity-consistent standard error estimators in OLS regression: an introduction and software implementation. In: *Behavior Research Methods* 39 (4), S. 709–722. DOI: 10.3758/BF03192961.

Hoeferlin, L. Alexis; Oleinik, Natalia V.; Krupenko, Natalia I.; Krupenko, Sergey A. (2011): Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress. In: *Genes & Cancer* 2 (9), S. 889–899. DOI: 10.1177/1947601911432495.

Hsu, Chien-Hsiang; Altschuler, Steven J.; Wu, Lani F. (2019): Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. In: *Cell* 178 (2), 361-373.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2019.05.041.

Huang, J. C.; Svoboda, D. L.; Reardon, J. T.; Sancar, A. (1992): Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8), S. 3664–3668. DOI: 10.1073/pnas.89.8.3664.

Huang, Rui-Xue; Zhou, Ping-Kun (2020): DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. In: *Sig Transduct Target Ther* 5 (1), S. 60. DOI: 10.1038/s41392-020-0150-x.

ibidi: Instructions micro–Insert 4 Well FulTrac. Version 1.0 (2016-05-09). Hg. v. ibidi. Martiensried.

Jackson, S. P. (2002): Sensing and repairing DNA double-strand breaks. In: *Carcinogenesis* 23 (5), S. 687–696. DOI: 10.1093/carcin/23.5.687.

Jänicke, Reiner U.; Sohn, Dennis; Essmann, Frank; Schulze-Osthoff, Klaus (2007): The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (4), S. 407–413. DOI: 10.4161/cc.6.4.3855.

Jin, Juan; Tao, Zhonghua; Cao, Jun; Li, Ting; Hu, Xichun (2021): DNA damage response inhibitors: An avenue for TNBC treatment. In: *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 1875 (2), S. 188521. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188521.

Jones, Matthew C.; Zha, Junzhe; Humphries, Martin J. (2019): Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374 (1779), S. 20180227. DOI: 10.1098/rstb.2018.0227.

Kalfalah, Faiza M.; Berg, Elke; Christensen, Morten O.; Linka, René M.; Dirks, Wilhelm G.; Boege, Fritz; Mielke, Christian (2015): Spatio-temporal regulation of the human licensing factor Cdc6 in replication and mitosis. In: *Cell Cycle* 14 (11), S. 1704–1715. DOI: 10.1080/15384101.2014.1000182.

Karakas, Bedri; Weeraratna, Ashani T.; Abukhdeir, Abde M.; Konishi, Hiroyuki; Gustin, John P.; Vitolo, Michele I. et al. (2007): P21 gene knock down does not identify genetic effectors seen with gene knock out. In: *Cancer biology & therapy* 6 (7), S. 1025–1030. DOI: 10.4161/cbt.6.7.4202.

Karimian, Ansar; Ahmadi, Yasin; Yousefi, Bahman (2016): Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. In: *DNA repair* 42, S. 63–71. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008.

Karran, Peter; Brem, Reto (2016): Protein oxidation, UVA and human DNA repair. In: *DNA repair* 44, S. 178–185. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.024.

Kida, Naoko; Matsuo, Yoshiyuki; Hashimoto, Yoshiko; Nishi, Kenichiro; Tsuzuki-Nakao, Tomoko; Bono, Hidemasa et al. (2021): Cigarette Smoke Extract Activates Hypoxia-Inducible Factors in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner in Stroma Cells from Human Endometrium. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (1). DOI: 10.3390/antiox10010048.

Kisielewska, Jolanta; Lu, Pin; Whitaker, Michael (2005): GFP-PCNA as an S-phase marker in embryos during the first and subsequent cell cycles. In: *Biology of the cell* 97 (3), S. 221–229. DOI: 10.1042/BC20040093.

Koike, Manabu; Yutoku, Yasutomo; Koike, Aki (2011): Accumulation of p21 proteins at DNA damage sites independent of p53 and core NHEJ factors following irradiation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 412 (1), S. 39–43. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.032.

Komiya, T.; Hosono, Y.; Hirashima, T.; Masuda, N.; Yasumitsu, T.; Nakagawa, K. et al. (1997): p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 3 (10), S. 1831–1835.

Kontopidis, George; Wu, Su-Ying; Zheleva, Daniella I.; Taylor, Paul; McInnes, Campbell; Lane, David P. et al. (2005): Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (6), S. 1871–1876. DOI: 10.1073/pnas.0406540102.

Kuefner, M. A.; Brand, M.; Engert, C.; Schwab, S. A.; Uder, M. (2015): Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology. In: *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 187 (10), S. 872–878. DOI: 10.1055/s-0035-1553209.

Kumari, Ruchi; Jat, Parmjit (2021): Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. In: *Front. Cell Dev. Biol.* 9, S. 645593. DOI: 10.3389/fcell.2021.645593.

Lane, D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. In: *Nature* 358 (6381), S. 15–16. DOI: 10.1038/358015a0.

Lee, Ciaran M.; Zhu, Haibao; Davis, Timothy H.; Deshmukh, Harshahardhan; Bao, Gang (2017): Design and Validation of CRISPR/Cas9 Systems for Targeted Gene Modification in Induced Pluripotent Stem Cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1498, S. 3–21. DOI: 10.1007/978-1-4939-6472-7_1.

Li, Rong; Hannon, Gregory J.; Beach, David; Stillman, Bruce (1996): Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. In: *Current Biology* 6 (2), S. 189–199. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00452-9.

Liu, Jing; Peng, Yunhua; Wei, Wenyi (2022): Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. In: *Trends in cell biology* 32 (1), S. 30–44. DOI: 10.1016/j.tcb.2021.07.001.

Lorence, Argelia; Nessler, Craig L. (2004): Camptothecin, over four decades of surprising findings. In: *Phytochemistry* 65 (20), S. 2735–2749. DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.09.001.

Ma, Yuanwu; Zhang, Lianfeng; Huang, Xingxu (2014): Genome modification by CRISPR/Cas9. In: *The FEBS journal* 281 (23), S. 5186–5193. DOI: 10.1111/febs.13110.

Mansilla, Sabrina Florencia; La Vega, María Belén de; Calzetta, Nicolás Luis; Siri, Sebastián Omar; Gottifredi, Vanesa (2020): CDK-Independent and PCNA-Dependent Functions of p21 in DNA Replication. In: *Genes* 11 (6). DOI: 10.3390/genes11060593.

Mielke, Christian; Kalfalah, Faiza M.; Christensen, Morten O.; Boege, Fritz (2007): Rapid and prolonged stalling of human DNA topoisomerase I in UVA-irradiated genomic areas. In: *DNA repair* 6 (12), S. 1757–1763. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.06.014.

Moeller, Stephanie J.; Sheaff, Robert J. (2006): G1 phase: components, conundrums, context. In: *Results and problems in cell differentiation* 42, S. 1–29. Online verfügbar unter https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16903206/.

Moreno, Natália Cestari; Garcia, Camila Carrião Machado; Rocha, Clarissa Ribeiro Reily; Munford, Veridiana; Menck, Carlos Frederico Martins (2019): ATR/Chk1 Pathway is Activated by Oxidative

Stress in Response to UVA Light in Human Xeroderma Pigmentosum Variant Cells. In: *Photochemistry and photobiology* 95 (1), S. 345–354. DOI: 10.1111/php.13041.

Nickoloff, Jac A.; Sharma, Neelam; Taylor, Lynn (2020): Clustered DNA Double-Strand Breaks: Biological Effects and Relevance to Cancer Radiotherapy. In: *Genes* 11 (1), S. 99. DOI: 10.3390/genes11010099.

O'Connor, P. M. (1997): Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. In: *Cancer surveys* 29, S. 151–182. Online verfügbar unter https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9338101/.

Ohtani, Naoko; Imamura, Yuko; Yamakoshi, Kimi; Hirota, Fumiko; Nakayama, Rika; Kubo, Yoshiaki et al. (2007): Visualizing the dynamics of p21(Waf1/Cip1) cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (38), S. 15034–15039. DOI: 10.1073/pnas.0706949104.

Parplys, Ann Christin; Petermann, Eva; Petersen, Cordula; Dikomey, Ekkehard; Borgmann, Kerstin (2012): DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. In: *Radiotherapy and Oncology* 102 (3), S. 466–471. DOI: 10.1016/j.radonc.2012.01.005.

Perucca, Paola; Cazzalini, Ornella; Mortusewicz, Oliver; Necchi, Daniela; Savio, Monica; Nardo, Tiziana et al. (2006): Spatiotemporal dynamics of p21CDKN1A protein recruitment to DNA-damage sites and interaction with proliferating cell nuclear antigen. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 8), S. 1517–1527. DOI: 10.1242/jcs.02868.

Redman, Melody; King, Andrew; Watson, Caroline; King, David (2016): What is CRISPR/Cas9? In: *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition* 101 (4), S. 213–215. DOI: 10.1136/archdischild-2016-310459.

Ribatti, Domenico (2017): A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. In: *Experimental Cell Research* 359 (1), S. 17–19. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.06.012.

Robinson, J. Paul; Roederer, Mario (2015): HISTORY OF SCIENCE. Flow cytometry strikes gold. In: *Science (New York, N.Y.)* 350 (6262), S. 739–740. DOI: 10.1126/science.aad6770.

Rodríguez-Rodríguez, Diana Raquel; Ramírez-Solís, Ramiro; Garza-Elizondo, Mario Alberto; Garza-Rodríguez, María De Lourdes; Barrera-Saldaña, Hugo Alberto (2019): Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). In: *International Journal of Molecular Medicine* 43 (4), S. 1559–1574. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4112.

Rudolf, Matthias; Müller, Johannes (2020): Multivariate Verfahren. Eine praxisorientierte Einführung mit Anwendungsbeispielen. 3., überarbeitete Auflage. Göttingen: Hogrefe (Psychlehrbuch plus). Online verfügbar unter https://elibrary.hogrefe.com/book/99.110005/9783840929007.

Rumora, Amy E.; Kolodziejczak, Katarzyna M.; Malhowski Wagner, Anne; Núñez, Megan E. (2008): Thymine dimer-induced structural changes to the DNA duplex examined with reactive probes (†). In: *Biochemistry* 47 (49), S. 13026–13035. DOI: 10.1021/bi801417u.

Sakasai, Ryo; Iwabuchi, Kuniyoshi (2016): The distinctive cellular responses to DNA strand breaks caused by a DNA topoisomerase I poison in conjunction with DNA replication and RNA transcription. In: *Genes & genetic systems* 90 (4), S. 187–194. DOI: 10.1266/ggs.15-00023.

Salkind, Neil (2010): Encyclopedia of research design. Volume 1 - 3. Los Angeles, London, New Delhi, Singapore, Washington, D.C.: Sage. Online verfügbar unter http://worldcatlibraries.org/wcpa/oclc/568735323.

Sander van den Heuvel (2005): Cell-cycle regulation. In: Sander den van Heuvel (Hg.): WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]: WormBook. Online verfügbar unter https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19719/.

Satyanarayana, Ande; Kaldis, Philipp (2009): A dual role of Cdk2 in DNA damage response. In: *Cell Division* 4, S. 9. DOI: 10.1186/1747-1028-4-9.

Schendera, Christian F. G. (2014): Regressionsanalyse mit SPSS. 2., korrigierte und aktualisierte Aufl. München: De Gruyter Oldenbourg.

Shamloo, Bahar; Usluer, Sinem (2019): p21 in Cancer Research. In: *Cancers* 11 (8). DOI: 10.3390/cancers11081178.

Sheng, Caibin; Mendler, Isabella-Hilda; Rieke, Sara; Snyder, Petra; Jentsch, Marcel; Friedrich, Dhana et al. (2019): PCNA-Mediated Degradation of p21 Coordinates the DNA Damage Response and Cell Cycle Regulation in Individual Cells. In: *Cell reports* 27 (1), 48-58.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.03.031.

Shiloh, Yosef (2001): ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 11 (1), S. 71–77. DOI: 10.1016/S0959-437X(00)00159-3.

Shtarkman, I. N.; Gudkov, S. V.; Chernikov, A. V.; Bruskov, V. I. (2008): Effect of amino acids on X-ray-induced hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in water and 8-oxoguanine in DNA. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 73 (4), S. 470–478. DOI: 10.1134/s0006297908040135.

Shtutman, Michael; Chang, Bey-Dih; Schools, Gary P.; Broude, Eugenia V. (2017): Cellular Model of p21-Induced Senescence. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1534, S. 31–39. DOI: 10.1007/978-1-4939-6670-7_3.

Siede, W.; Friedberg, A. S.; Dianova, I.; Friedberg, E. C. (1994): Characterization of G1 checkpoint control in the yeast Saccharomyces cerevisiae following exposure to DNA-damaging agents. In: *Genetics* 138 (2), S. 271–281. DOI: 10.1093/genetics/138.2.271.

Smith, Joanne; Tho, Lye Mun; Xu, Naihan; Gillespie, David A. (2010): The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. In: *Advances in cancer research* 108, S. 73–112. DOI: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0.

Srinivas, Upadhyayula Sai; Tan, Bryce W. Q.; Vellayappan, Balamurugan A.; Jeyasekharan, Anand D. (2019): ROS and the DNA damage response in cancer. In: *Redox biology* 25, S. 101084. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101084.

Stewart-Ornstein, Jacob; Lahav, Galit (2016): Dynamics of CDKN1A in Single Cells Defined by an Endogenous Fluorescent Tagging Toolkit. In: *Cell reports* 14 (7), S. 1800–1811. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.045.

Strzalka, Wojciech; Ziemienowicz, Alicja (2011): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. In: *Annals of Botany* 107 (7), S. 1127–1140. DOI: 10.1093/aob/mcq243.

Sun, Linlin; Lutz, Brianna Marie; Tao, Yuan-Xiang (2016): The CRISPR/Cas9 system for gene editing and its potential application in pain research. In: *Translational perioperative and pain medicine* 1 (3), S. 22–33.

Toledo, Franck; Wahl, Geoffrey M. (2006): Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. In: *Nature reviews. Cancer* 6 (12), S. 909–923. DOI: 10.1038/nrc2012.

Vidalin, Olivier; Muslmani, Machadiya; Estienne, Clément; Echchakir, Hamid; Abina, Amine M. (2009): In vivo target validation using gene invalidation, RNA interference and protein functional knockout models: it is the time to combine. In: *Current opinion in pharmacology* 9 (5), S. 669–676. DOI: 10.1016/j.coph.2009.06.017.

Voet, Donald; Voet, Judith G.; Pratt, Charlotte W. (2019): Lehrbuch der Biochemie. Dritte, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH. Online verfügbar unter https://books.google.de/books?id=aaySDwAAQBAJ.

Vousden, Karen H.; Prives, Carol (2009): Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. In: *Cell* 137 (3), S. 413–431. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.037.

Warfel, Noel A.; El-Deiry, Wafik S. (2013): p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. In: *Current opinion in oncology* 25 (1), S. 52–58. DOI: 10.1097/CCO.0b013e32835b639e.

Wischhusen, J.; Naumann, U.; Ohgaki, H.; Rastinejad, F.; Weller, M. (2003): CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. In: *Oncogene* 22 (51), S. 8233–8245. DOI: 10.1038/sj.onc.1207198.

Woods, Douglas B.; Vousden, Karen H. (2001): Regulation of p53 Function. In: *Experimental Cell Research* 264 (1), S. 56–66. DOI: 10.1006/excr.2000.5141.

Yadav, Vipin Kumar; Awasthi, Poorwa; Kumar, Amit (2019): Detection of UV-Induced Thymine Dimers. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2031, S. 313–322. DOI: 10.1007/978-1-4939-9646-9_17.

Yamauchi, Takahiro; Yoshida, Akira; Ueda, Takanori (2011): Camptothecin induces DNA strand breaks and is cytotoxic in stimulated normal lymphocytes. In: *Oncology reports* 25 (2), S. 347–352. DOI: 10.3892/or.2010.1100.

Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des UKD: Vorarbeiten zur Dynamik der p21 Induktion nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen.

Zhao, Hong; Zhuang, Yafei; Li, Ruibin; Liu, Yinyin; Mei, Zijie; He, Zhongshi et al. (2019): Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. In: *Oncology letters* 17 (1), S. 42–54. DOI: 10.3892/ol.2018.9566.

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zellzyklusphasen mit den Kontrollpunkten…… …2
Abb. 2 DNA-Schädigung und darauffolgende Signalkaskade…… …6
Abb. 3 Graphische Darstellung der Bindung und den Schnitt durch Cas9 zum Genome Editing…… .7
Abb. 4 Kontrolle des erfolgreichen DNA-Editierens zur Erstellung von p21-/-……..9
Abb. 5 Westernblot als Erfolgskontrolle der Erstellung des p21-/- Klon……..10
Abb. 6 Genomischer Kontext der Erstellung eines p21-GFP Klons und Erfolgskontrolle mittels Westernblot…… ..11
Abb. 7 Darstellung der PCNA-Verteilung in einer Zelle zu den verschiedenen Zellzyklusphasen……..13
Abb. 8 Illustration zur Einstellung der Gerätespannung……..23
Abb. 9 Exemplarische Darstellung der Gates zur Bestimmung des Zellzyklus……..26
Abb. 10 Gating der unbehandelten und gefärbten Kontrollgruppe……..28
Abb. 11 Gating der mit CPT vergifteten und gefärbten Experimentalgruppe…… 28
Abb. 12 Skizze des Aufbaus des 4 Well FulTrac Slides…… 30
Abb. 13 Verlauf der mittleren Grünfluoreszenz in Relation zur Bestrahlungsstärke…… 34
Abb. 14 Histogramm zur Darstellung der Normalverteilung der Daten…… 35
Abb. 15 Streudiagramm zur Testung der Homoskedastizität…… 36
Abb. 16 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse…… 37
Abb. 17 Vergleich der Zellzyklusphasen bei der Zellreihe mit funktionaler p21 Expression gegenüber ausgeschaltete p21 Expression……..40
Abb. 18 Darstellung der mittleren Grünfluoreszenz in Relation zum Zellzyklus bei verschiedenen DNA-Schädigungsarten……..43
Abb. 19 Aufnahmen des Konfokalen Mikroskops einer unbehandelten Zelllinie über 48 Stunden……..46
Abb. 20 Aufnahmen des Konfokalen Mikroskops einer mit CPT vergifteten Zelllinie über 48 Stunden……..47

5.3 Tabellenverzeichnis

1. Medien der Zellkultur..... 15
2. Lösungen und Reagenzien.....15
3. Verwendete Zelllinien.....15
4. Verbrauchsmaterialien.....16
5. Genutzte Geräte.....16
6. Verwendete Software..... ...17
7. Weitere Materialien..... 17
8. Mengenangaben der Zellkulturen..... 20
9. Verdünnungsgrade.....21
10. Verdünnung in Abhängigkeit zur Bestrahlung.....21
11. Benötigte Bestrahlungsdauer..... 22
12. Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest.....36
13. Parameterschätzungen mit robusten Standardfehlern.....38
14. Tests auf Normalverteilung.....41
15. Ergebnisse der ungepaarten t-Tests.....42
16. Ergebnisse der mittleren Grünfluoreszenz in Relation zur Bestrahlungsstärke.....67
17 Normierung der mittleren Grünfluoreszenz auf den Nullpunkt..... 67
18. Prozentuale Verteilung der Zellen.....68
19. Datensatz der Zellen mit erhöhter Grünfluoreszenz nach Aufteilung der Zellzyklusphase.....69
20. Ergebnisse der Regeressionsanalyse.....90

6. Anhang

6.1 Rohdaten der Experimente

Ergebnisse der mittleren Grünfluoreszenz in Relation zur Bestrahlungsstärke

UVA Bestrahlung J/cm^2	FITC-A in sechs Versuchsreihen					
0	3549	3906	3954	4010	4044	3707
5	4146	4113	4208	3591	4294	3772
10	3813	4271	3980	3703	4276	3656
20	4423	5876	4972	4449	4641	4097
40	5823	6133	5985	5952	6725	5130
60	6022	7021	5309	6157	7305	5145

Tabelle 16: Mittlere Grünfluoreszenz in Relation zur Bestrahlungsstärke mit UVA Strahlen. Die linke Spalte enthält die Bestrahlungsstärke, die rechten die mittlere Grünfluoreszenz FITC-A in den sechs Versuchsreihen

Normierung der mittleren Grünfluoreszenz auf den Nullpunkt

UVA Bestrahlung J/cm^2	FITC-A in Normierung auf den Nullpunkt					
0	0	0	0	0	0	0
5	597	207	254	0	250	65
10	264	365	26	0	232	0
20	874	1970	1018	439	597	390
40	2274	2227	2031	1942	2681	1423
60	2473	3115	1355	2147	3261	1438

Tabelle 17: Auf den Nullpunkt normierte mittlere Grünfluoreszenz in Relation zur Bestrahlungsstärke mit UVA Strahlen. Die linke Spalte enthält die Bestrahlungsstärke, die rechten die mittlere Grünfluoreszenz FITC-A in den sechs Versuchsreihen.

Prozentuale Verteilung der Zellen

Zellreihe und Behandlungsart	Versuchsreihe	Zellzyklusphase			
		G1	S	G2	>2n
	1	43	17	21	17
	2	40	16	25	18
HT gefärbt	3	46	18	26	9
	4	37	14	20	29
	5	27	9	18	45
	1	31	9	35	18
	2	27	14	40	13
HT CPT	3	34	15	36	11
	4	29	12	31	24
	5	22	6	35	32
	1	30	7	42	15
	2	34	8	40	13
HT UVA	3	40	10	37	9
	4	26	12	42	17
	5	36	7	29	24
	1	47	6	23	20
	2	57	4	23	11
HT X-Ray	3	39	3	23	32
	4	61	4	23	10
	5	48	3	23	24
	1	36	15	22	22
	2	38	14	23	26
p21-/- gefärbt	3	43	18	26	13
	4	35	13	16	36
	5	28	12	19	41
	1	17	10	43	26
	2	25	22	34	19
p21-/- CPT	3	31	20	34	14
	4	22	18	30	29
	5	23	14	23	39
	1	28	11	36	19
	2	37	10	27	22
p21-/- UVA	3	42	12	34	11
	4	37	13	32	15
	5	33	11	31	24
	1	42	8	28	21
	2	47	13	23	16
p21-/- X-Ray	3	35	11	22	32
	4	46	12	27	14
	5	36	9	22	33

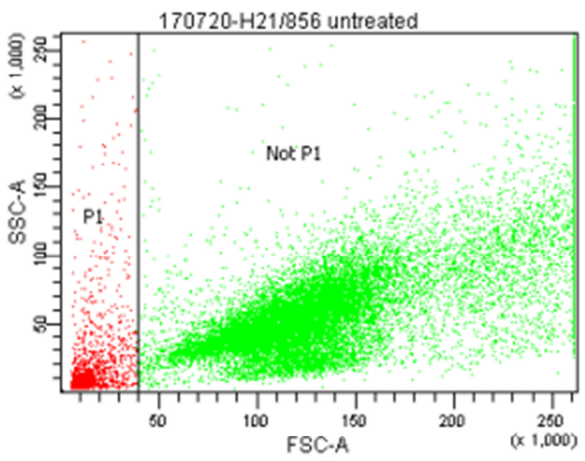
Tabelle 18: Daten der prozentualen Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen über jeweils fünf Versuchsreihen

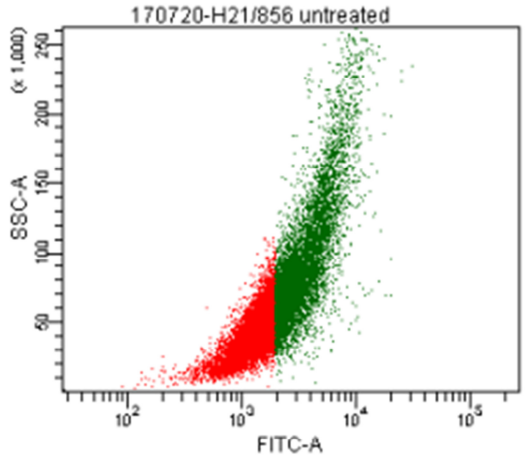
Datensatz der Zellen mit erhöhter Grünfluoreszenz nach Aufteilung der Zellzyklusphase

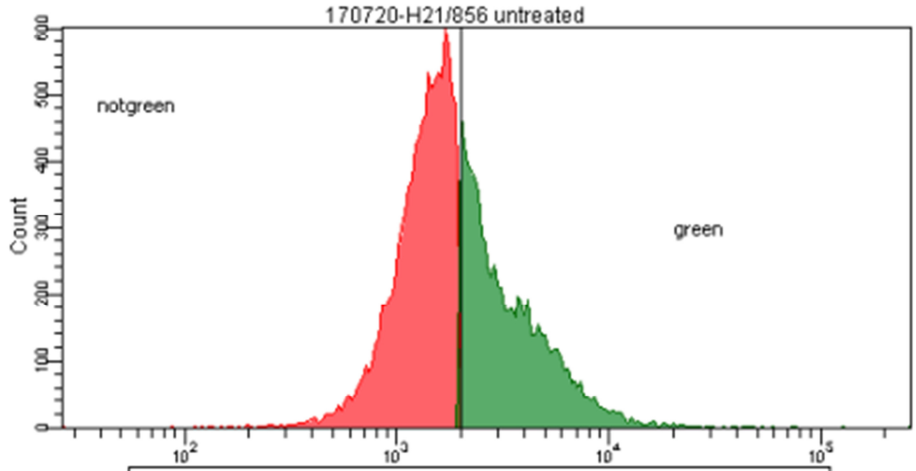
Behandlungsart	Versuchsreihe	Zellzyklusphase		
		G1	S	G2
	1	0	0	0
	2	0	0	0
unbehandelt	3	1	0	0
	4	0	1	0
	5	0	0	1
	1	4	1	15
	2	9	1	20
UVA	3	14	1	27
	4	11	1	27
	5	14	1	29
	1	1	1	14
	2	2	1	16
CPT	3	3	1	20
	4	2	1	21
	5	2	1	22
	1	12	0	11
	2	14	1	15
X-Ray	3	6	0	12
	4	15	0	16
	5	15	0	26

Tabelle 19: Anteil der Zellen mit erhöhter Grünfluoreszenz im Verhältnis auf die Gesamtpopulation der Zellen. Die Aufteilung erfolgt nach den Zellzyklusphasen und den drei verschiedenen Schädigungsarten CPT, Röntgenstrahlen und UVA Strahlung, sowie einer unbehandelten Kontrollgruppe.

6.2 FACS-Analysen der mittleren Grünfluoreszenz nach UVA Schädigung





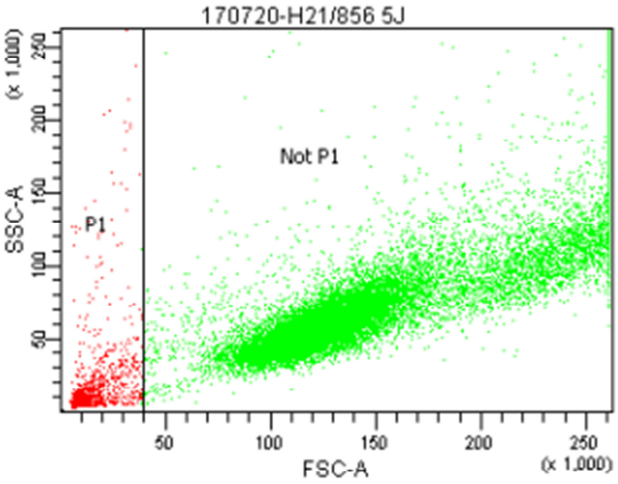


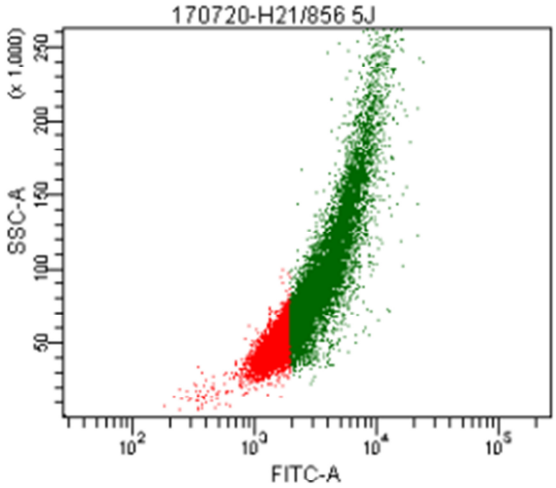
Tube: H21/856 untreated

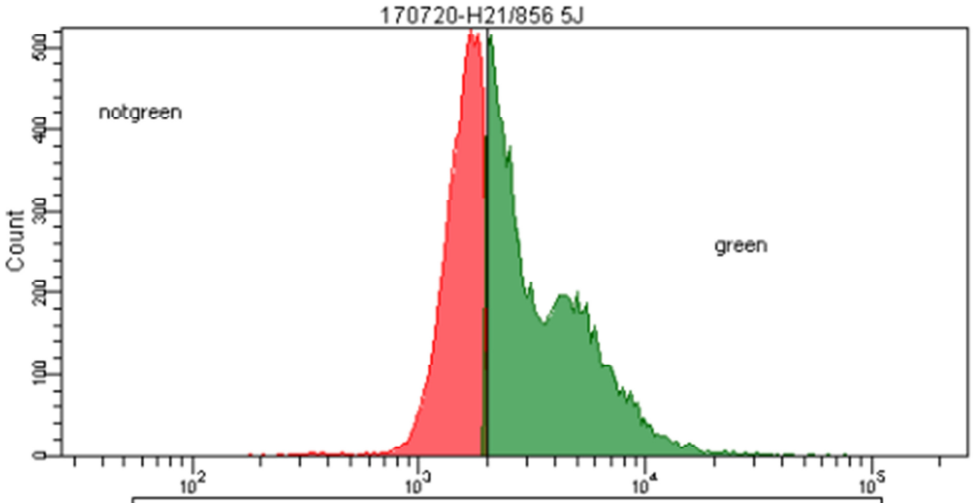
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	1,505	7.5	7.5
Not P1	18,509	92.5	92.5
notgreen	10,667	57.6	53.3
green	7,842	42.4	39.2

Experiment Name: P21 UVA
Specimen Name: 170720
Tube Name: H21/856 untreated
Record Date: Jul 17, 2020 10:44:42 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	20,000	####	2,358
P1	1,505	7.5	731
Not P1	18,509	92.5	2,489
notgreen	10,667	57.6	1,346
green	7,842	42.4	4,044





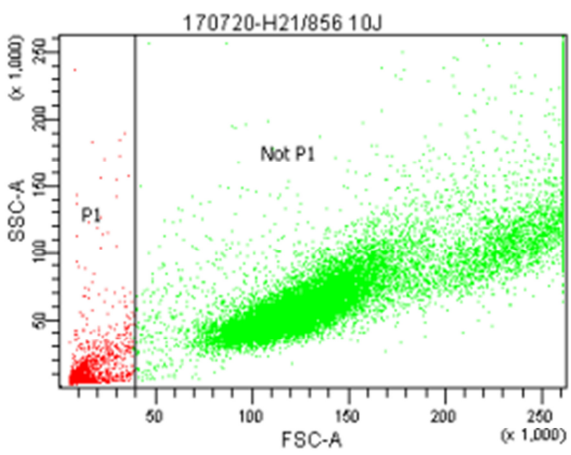


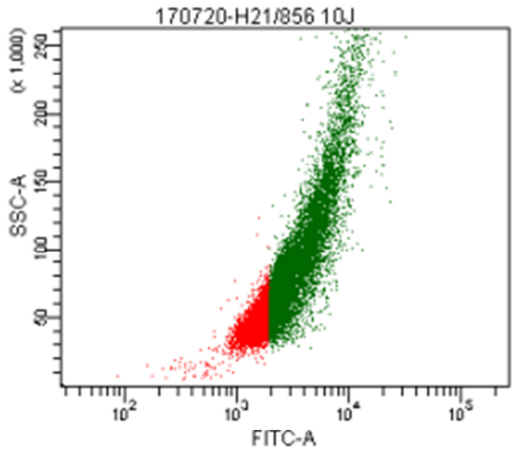
Tube: H21/856 5J

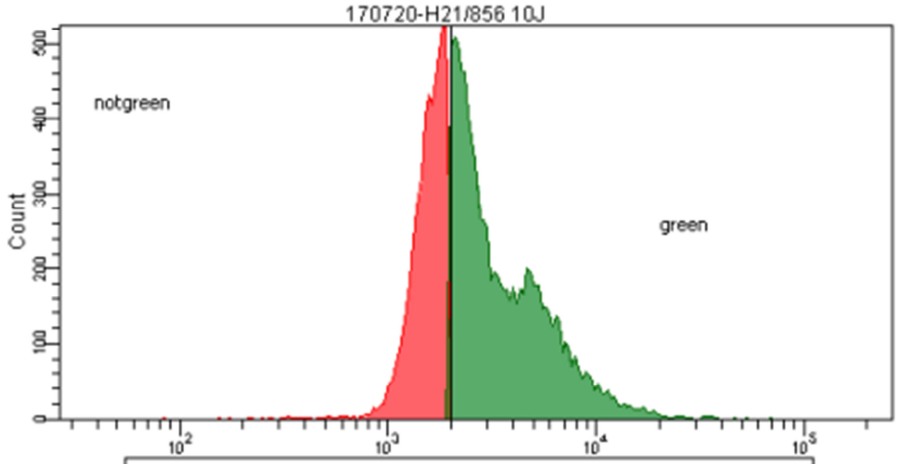
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	1,130	5.6	5.6
Not P1	18,878	94.4	94.4
notgreen	7,610	40.3	38.0
green	11,268	59.7	56.3

Experiment Name: P21 UVA
Specimen Name: 170720
Tube Name: H21/856 5J
Record Date: Jul 17, 2020 10:48:00 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	20,000	####	3,043
P1	1,130	5.6	602
Not P1	18,878	94.4	3,188
notgreen	7,610	40.3	1,551
green	11,268	59.7	4,294





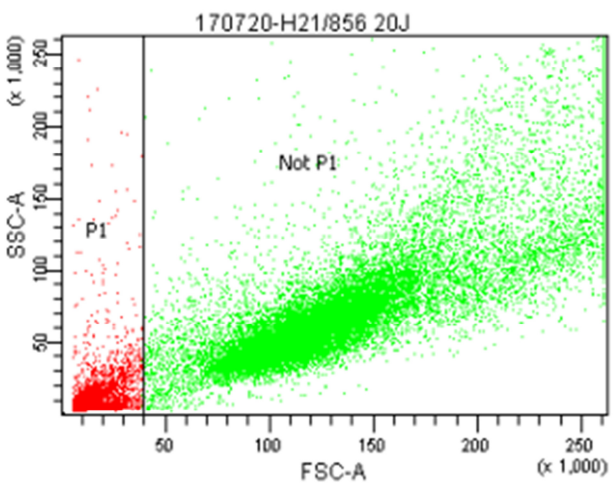


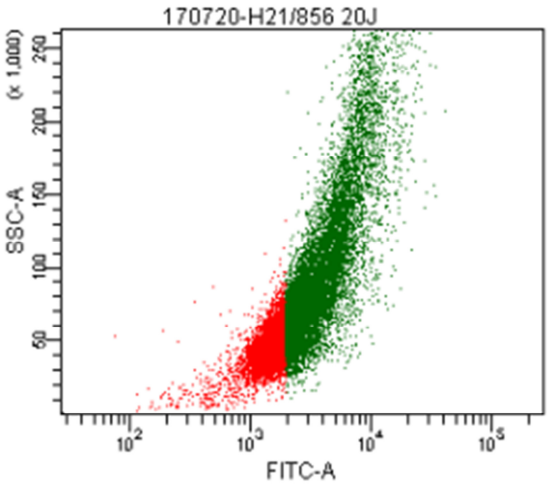
Tube: H21/856 10J

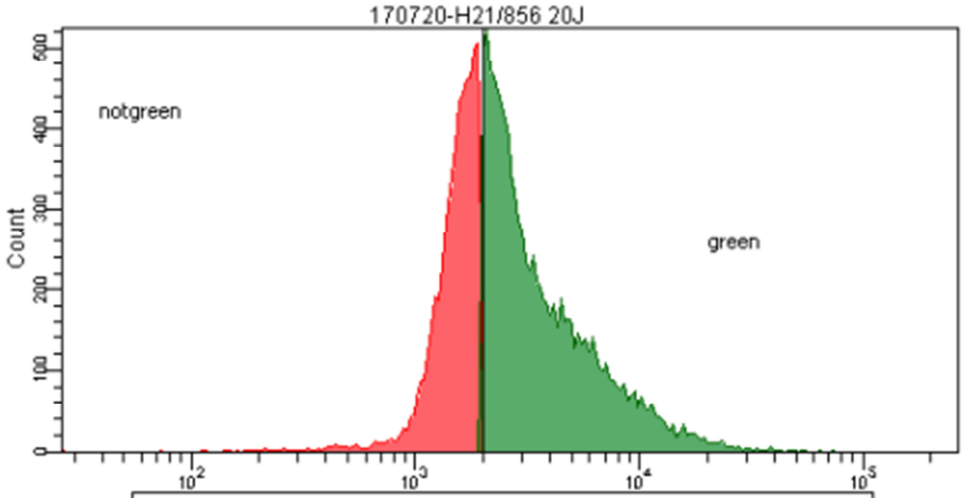
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	1,225	6.1	6.1
Not P1	18,784	93.9	93.9
notgreen	6,985	37.2	34.9
green	11,799	62.8	59.0

Experiment Name: P21 UVA
Specimen Name: 170720
Tube Name: H21/856 10J
Record Date: Jul 17, 2020 10:51:34 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	20,000	####	3,109
P1	1,225	6.1	596
Not P1	18,784	93.9	3,273
notgreen	6,985	37.2	1,578
green	11,799	62.8	4,276





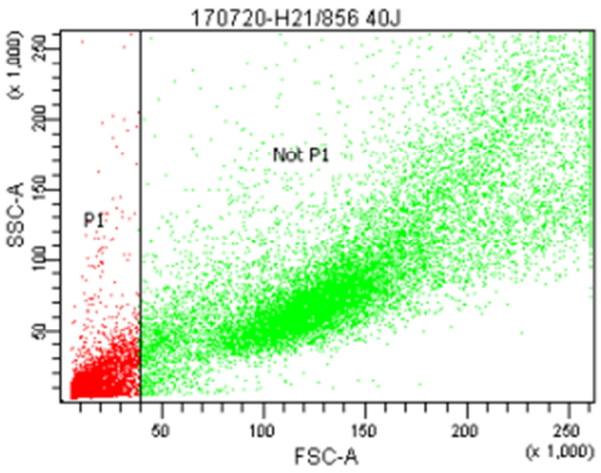


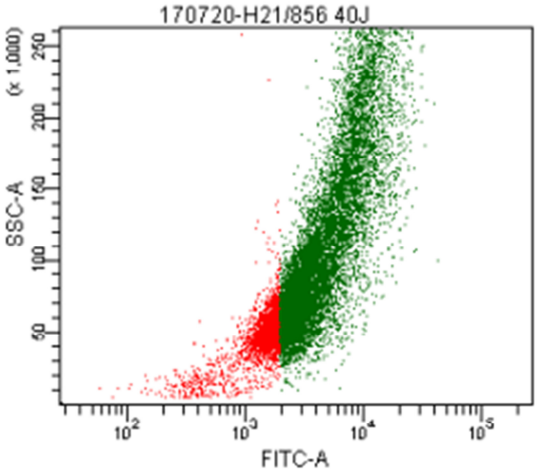
Tube: H21/856 20J

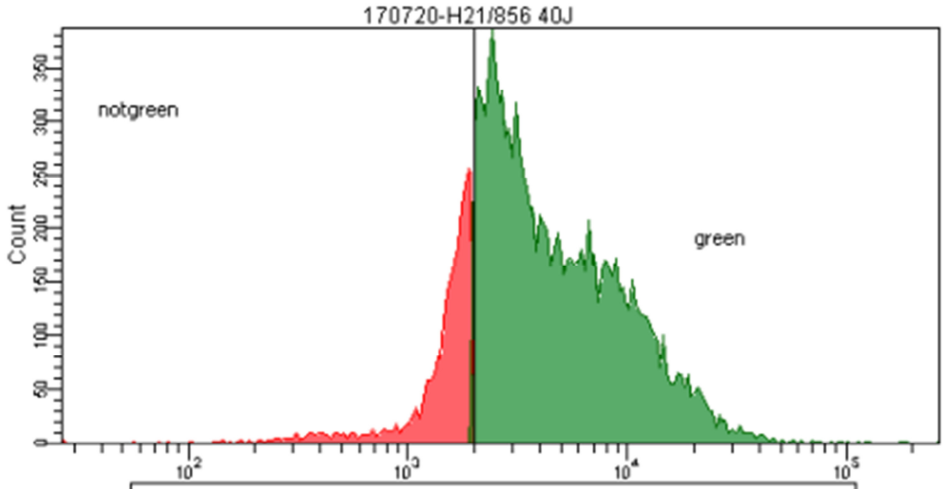
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	25,289	####	100.0
P1	3,375	13.3	13.3
Not P1	21,939	86.8	86.8
notgreen	8,114	37.0	32.1
green	13,825	63.0	54.7

Experiment Name: P21 UVA
Specimen Name: 170720
Tube Name: H21/856 20J
Record Date: Jul 17, 2020 10:58:53 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	25,289	####	3,096
P1	3,375	13.3	521
Not P1	21,939	86.8	3,490
notgreen	8,114	37.0	1,529
green	13,825	63.0	4,641





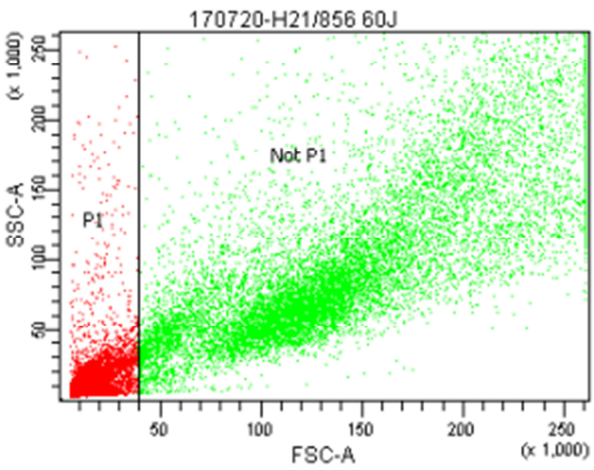


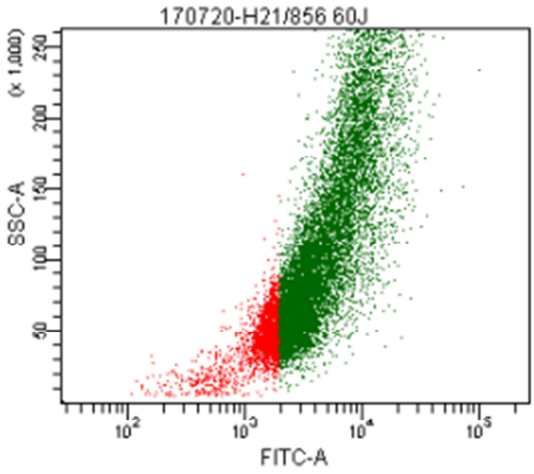
Tube: H21/856 40J

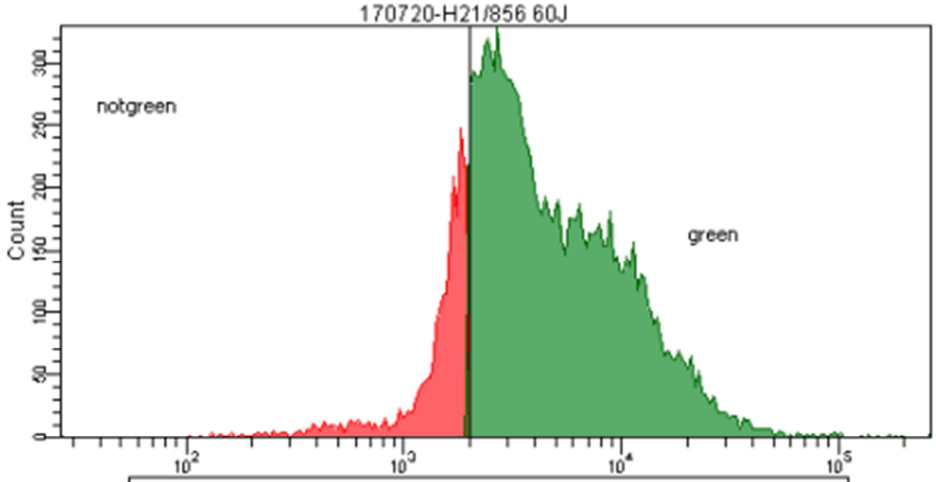
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	5,352	26.8	26.8
Not P1	14,707	73.5	73.5
notgreen	2,563	17.4	12.8
green	12,144	82.6	60.7

Experiment Name: P21 UVA
Specimen Name: 170720
Tube Name: H21/856 40J
Record Date: Jul 17, 2020 11:03:33 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	20,000	####	4,450
P1	5,352	26.8	674
Not P1	14,707	73.5	5,813
notgreen	2,563	17.4	1,493
green	12,144	82.6	6,725







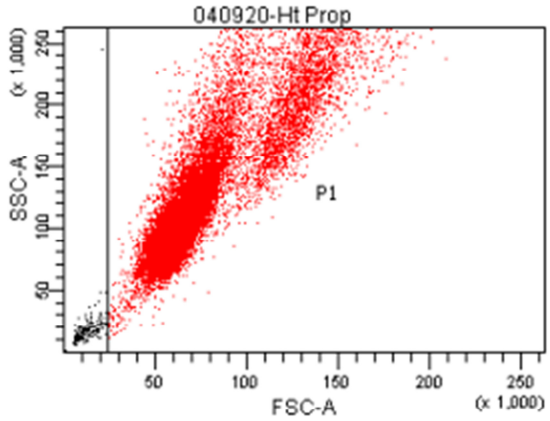
Tube: H21/856 60J

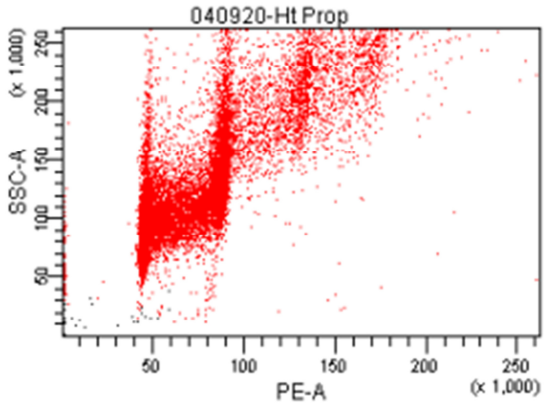
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	5,484	27.4	27.4
Not P1	14,576	72.9	72.9
notgreen	2,308	15.8	11.5
green	12,268	84.2	61.3

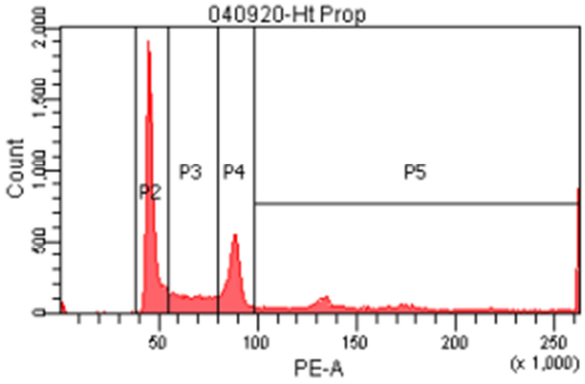
Experiment Name: P21 UVA
Specimen Name: 170720
Tube Name: H21/856 60J
Record Date: Jul 17, 2020 11:25:55 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	20,000	####	4,844
P1	5,484	27.4	717
Not P1	14,576	72.9	6,384
notgreen	2,308	15.8	1,493
green	12,268	84.2	7,305

6.3 FACS- Analysen im Vergleich von HT1080 Wildtyp und HT1080

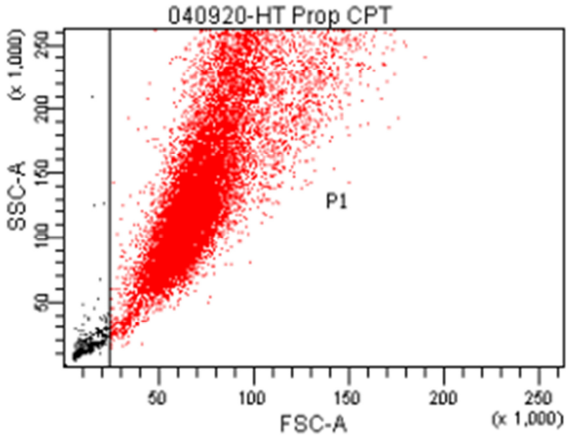


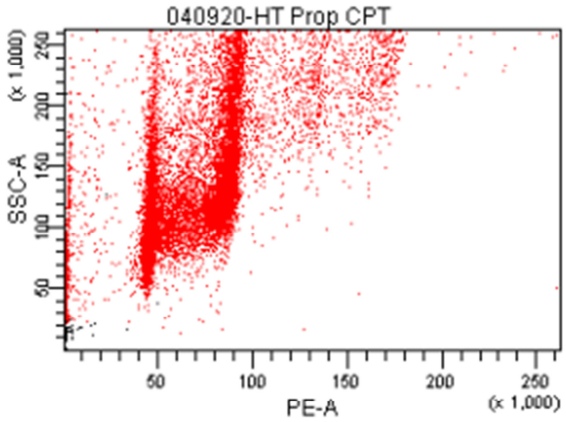


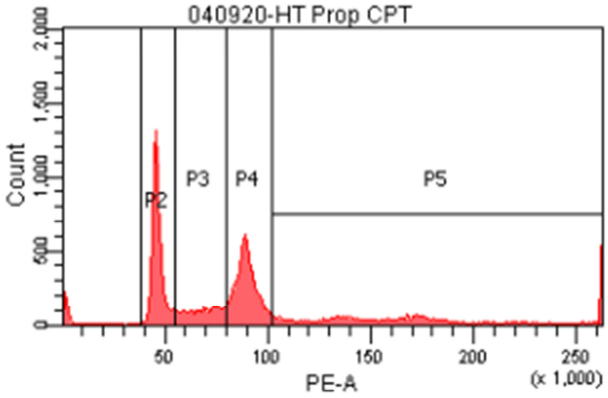


Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	Ht Prop
Record Date:	Sep 4, 2020 1:00:21 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	393f4bed-79cf-4254-bd35-78879eb9e8ba

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	20,000	99.0	96,620
P2	7,346	36.7	46,216
P3	2,727	13.6	66,422
P4	4,038	20.2	87,750
P5	5,793	29.0	182,509

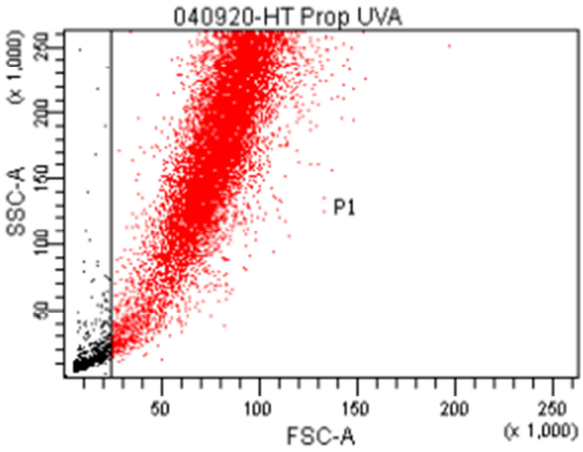


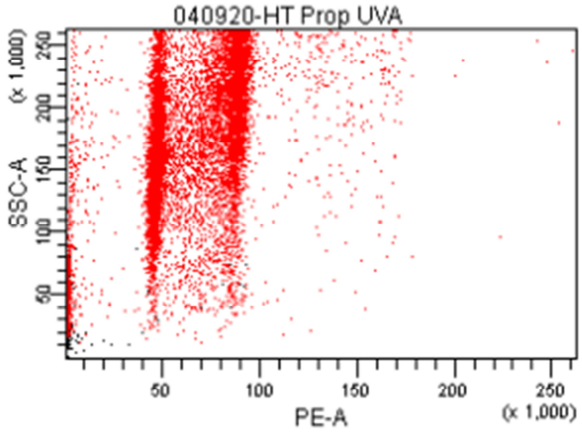


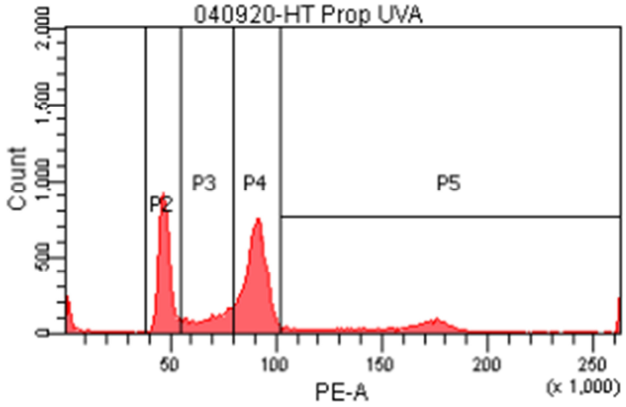


Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	HT Prop CPT
Record Date:	Sep 4, 2020 1:02:38 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	022ce083-134d-47cf-a0c2-c1273de84832

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	20,000	98.3	92,873
P2	5,748	28.7	46,083
P3	2,416	12.1	67,669
P4	6,248	31.2	89,367
P5	4,873	24.4	177,716

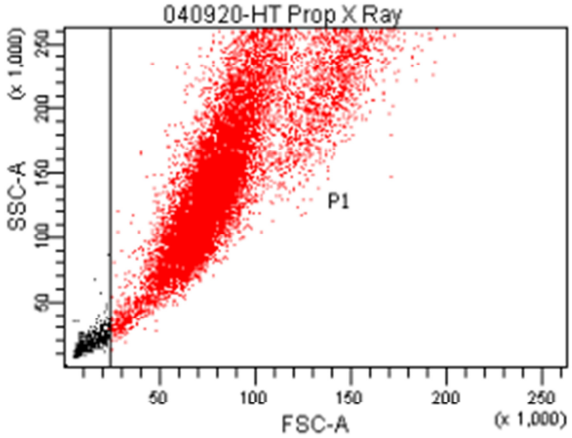


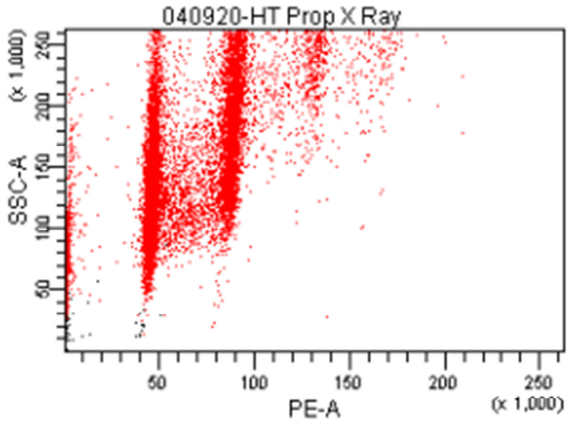


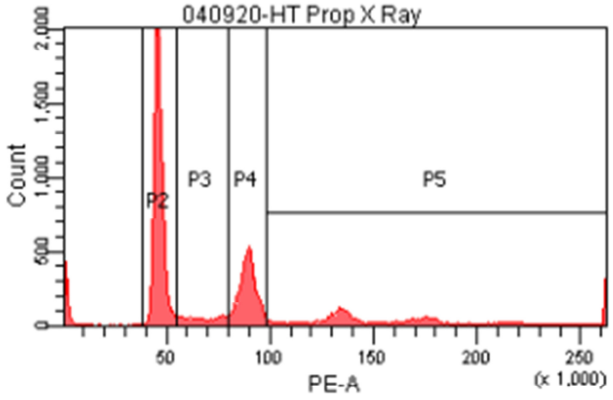


Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	HT Prop UVA
Record Date:	Sep 4, 2020 1:07:20 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	463088f7-e5a9-48ff-b53f-29c9ec716c2b

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	20,000	97.2	86,112
P2	5,276	26.4	46,980
P3	2,336	11.7	68,887
P4	8,381	41.9	90,075
P5	3,296	16.5	168,437

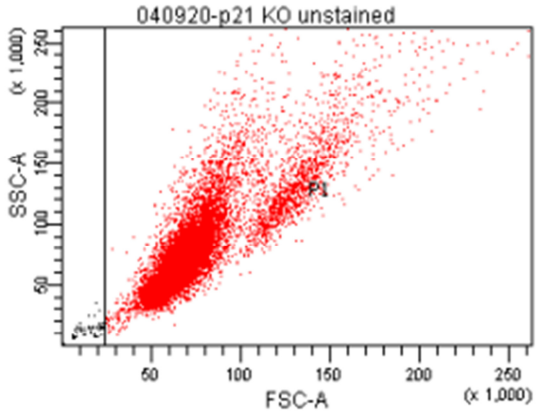


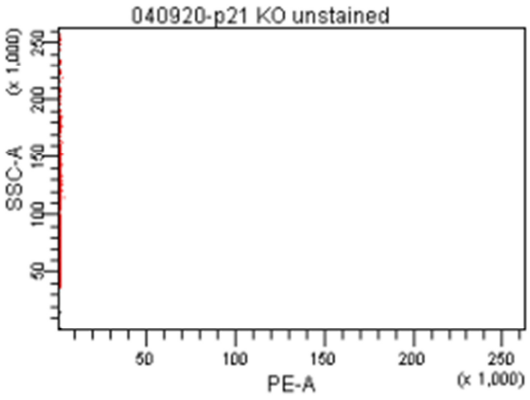


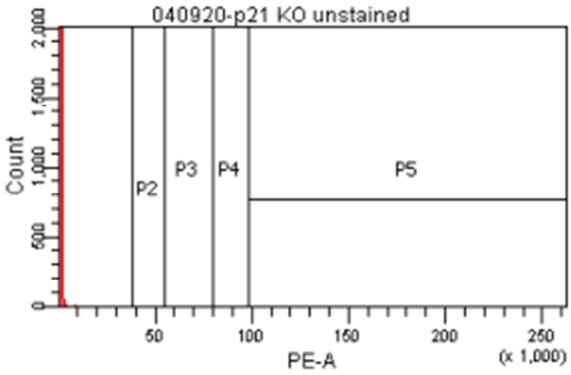


Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	HT Prop X Ray
Record Date:	Sep 4, 2020 1:08:56 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	efe8b9e5-2393-4313-95ae-5281a9e2c41a

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	20,000	98.0	80,196
P2	9,433	47.2	46,029
P3	1,146	5.7	67,081
P4	4,612	23.1	89,065
P5	4,007	20.0	169,735

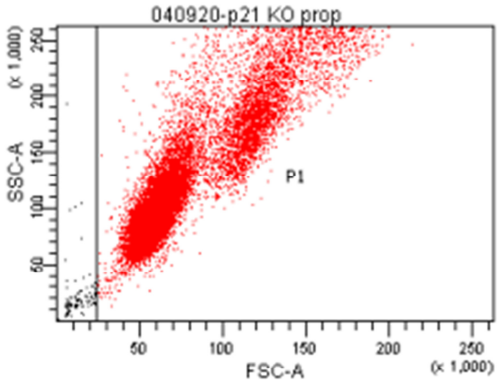


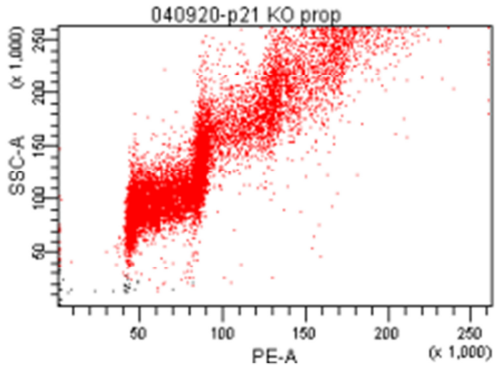


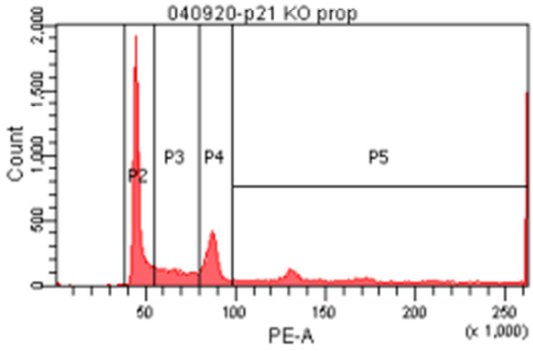


Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	p21 KO unstained
Record Date:	Sep 4, 2020 1:09:52 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	afec93e9-4bd4-4bb5-831a-84528ca6f203

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	20,000	99.7	88
P2	0	0.0	####
P3	0	0.0	####
P4	0	0.0	####
P5	0	0.0	####

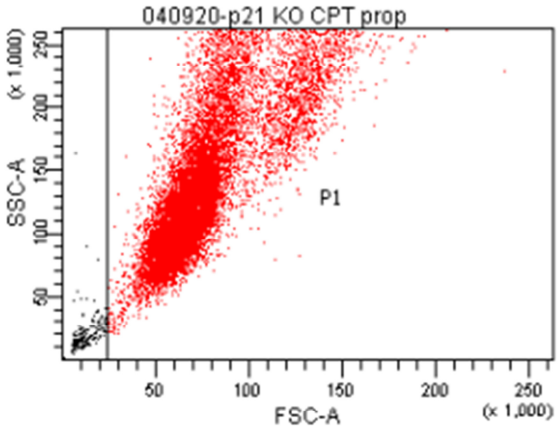


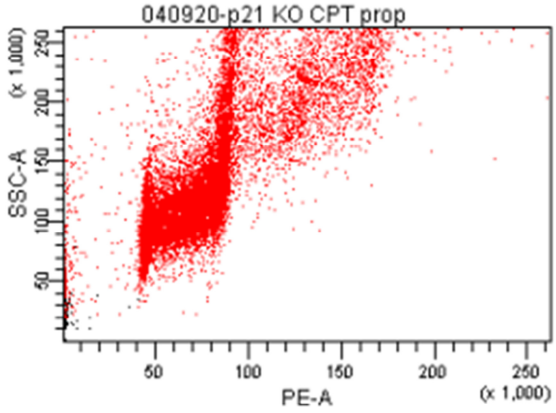


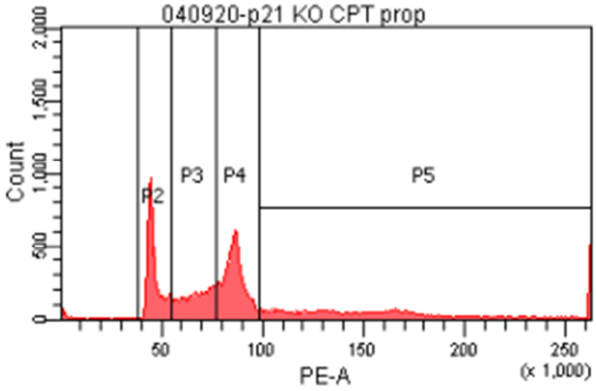


Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	p21 KO prop
Record Date:	Sep 4, 2020 1:11:37 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	9bd6f5f0-97fd-469d-85fe-6dbbbf9792d9

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	20,000	99.5	107,709
P2	6,927	34.6	45,682
P3	2,582	12.9	66,035
P4	3,221	16.1	86,887
P5	7,233	36.2	191,764

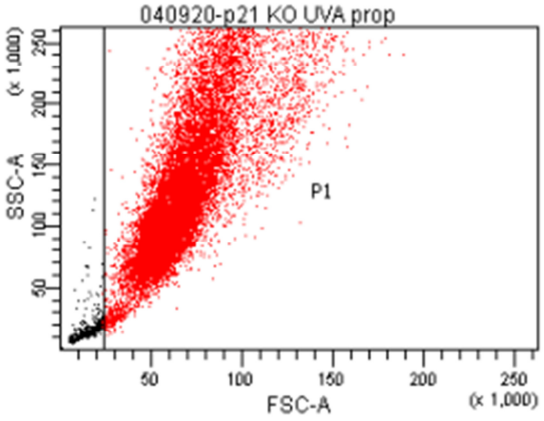


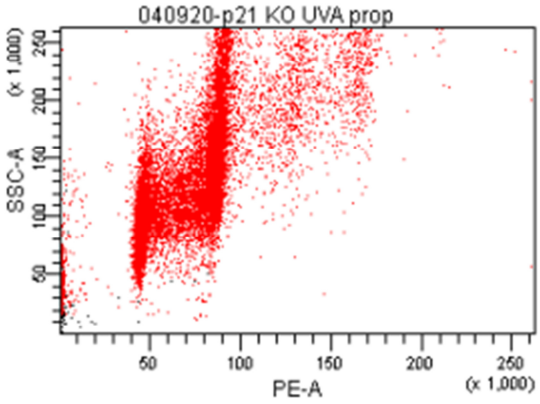


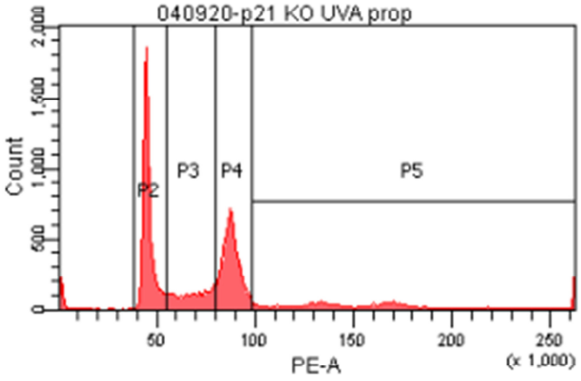


Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	p21 KO CPT prop
Record Date:	Sep 4, 2020 1:19:30 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	733bf11e-920f-41cd-bd08-27a067833923

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	20,000	98.9	96,868
P2	4,408	22.0	45,956
P3	3,561	17.8	66,569
P4	5,958	29.8	85,758
P5	5,838	29.2	168,680

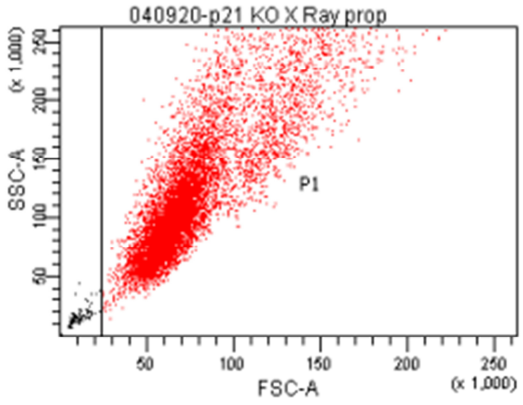


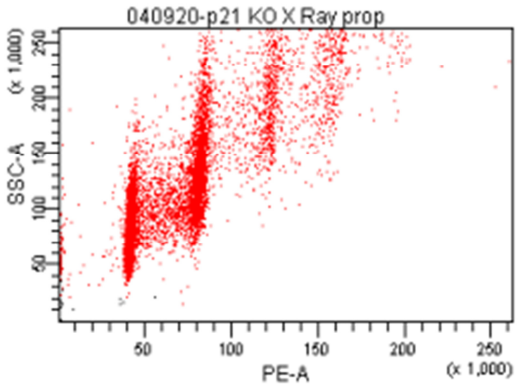


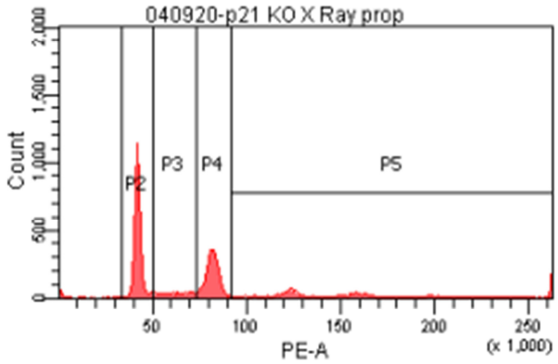


Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	p21 KO UVA prop
Record Date:	Sep 4, 2020 1:18:00 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	d2cfa0f6-d9eb-442e-a698-94934401cf54

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	20,000	97.9	78,980
P2	7,488	37.4	45,296
P3	2,663	13.3	67,853
P4	6,324	31.6	87,636
P5	3,048	15.2	165,327



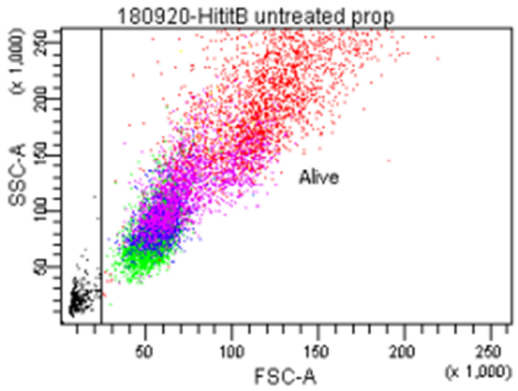


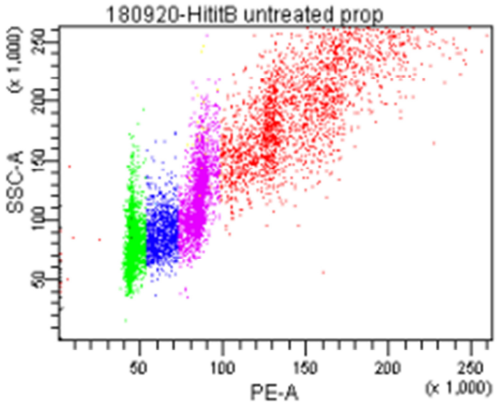


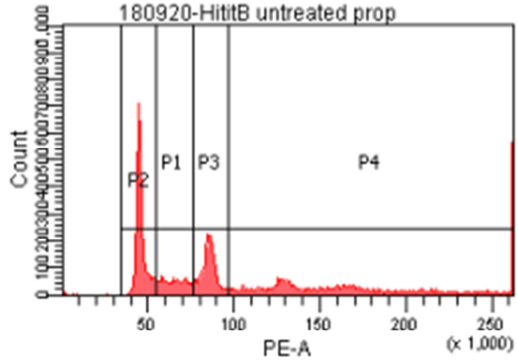
Experiment Name:	Zellzyklusanalyse WT vs KO
Specimen Name:	040920
Tube Name:	p21 KO X Ray prop
Record Date:	Sep 4, 2020 1:20:29 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	cfa1d9aa-a59c-4d21-93b0-50bab1b005d2

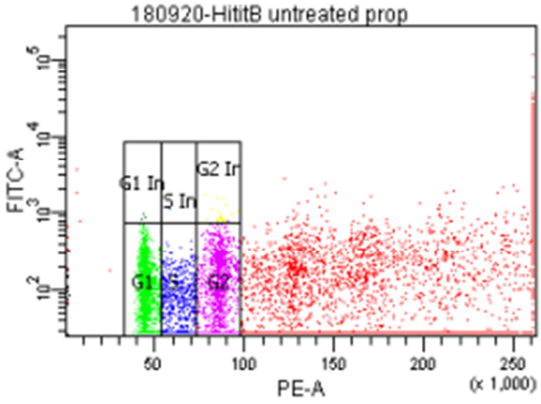
Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
P1	10,000	99.1	79,870
P2	4,223	42.2	41,946
P3	766	7.7	61,718
P4	2,776	27.8	81,419
P5	2,116	21.2	164,244

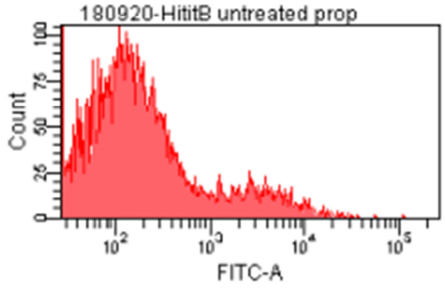
6.4 FACS-Analysen in Relation zur p21-GFP Expression





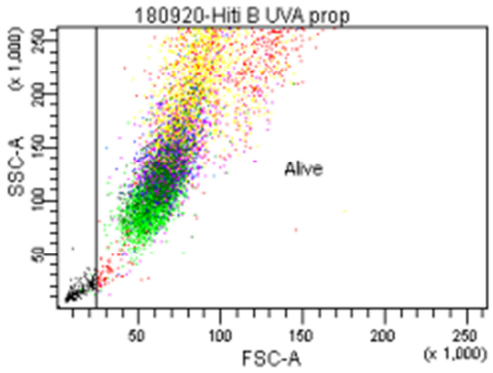


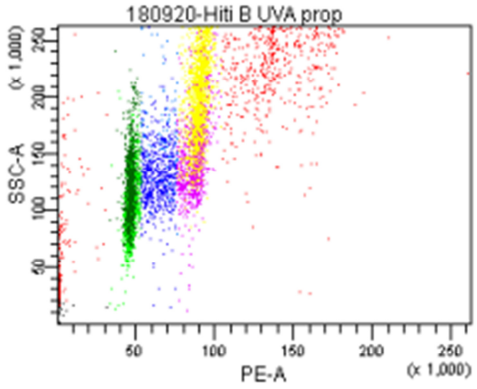


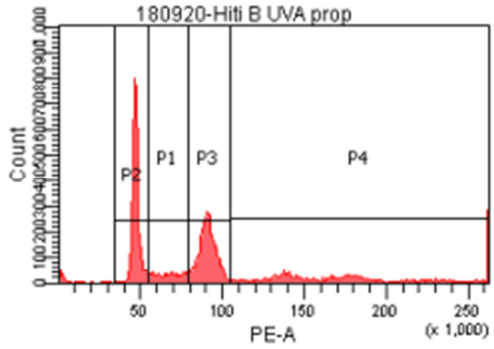


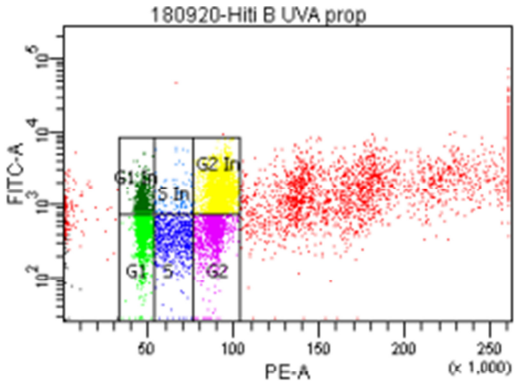
Experiment Name:	ZellZyklusanalyse FITCA vs Prop
Specimen Name:	180920
Tube Name:	HititB untreated prop
Record Date:	Sep 21, 2020 12:56:02 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	2117d936-a756-4f24-8886-d47cb295...

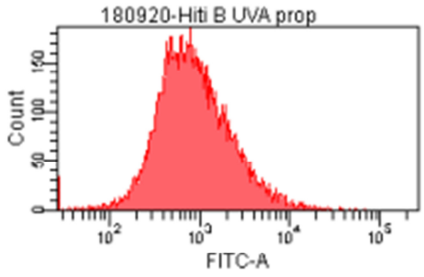
Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean	PE-A Mean
All Events	10,000	####	512	112,530
Alive	9,717	97.2	525	115,799
P1	1,022	10.5	16	64,796
P3	1,824	18.8	75	85,289
P4	3,004	30.9	108	161,374
P2	2,723	27.2	73	45,235
G1	2,720	27.2	72	45,237
S	1,012	10.1	21	63,283
G2	1,986	19.9	61	84,917
G2 In	20	0.2	957	87,489
G1 In	3	0.0	845	43,528
S In	1	0.0	1,041	58,593





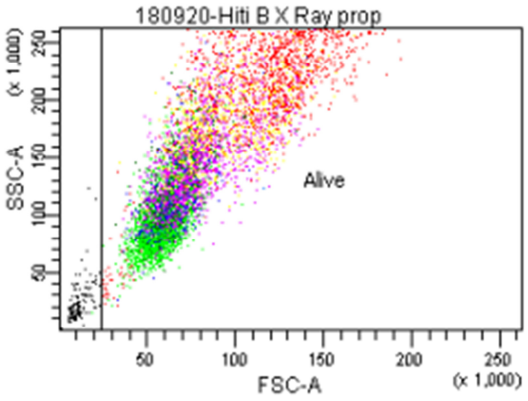


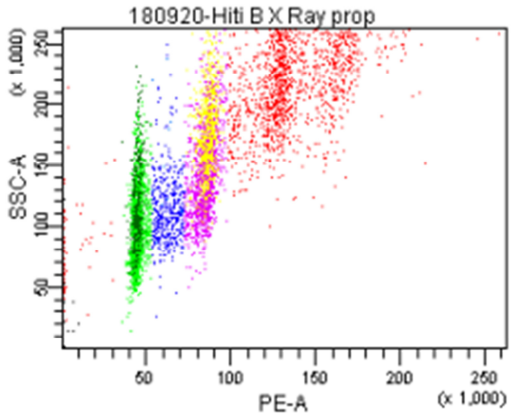


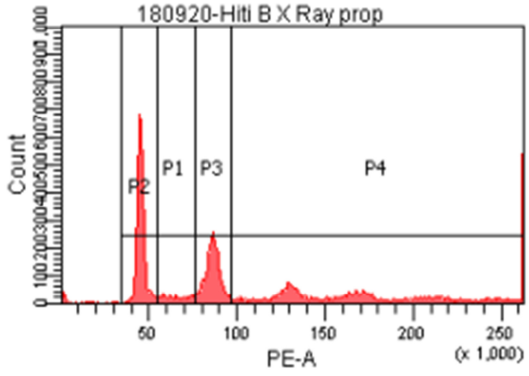


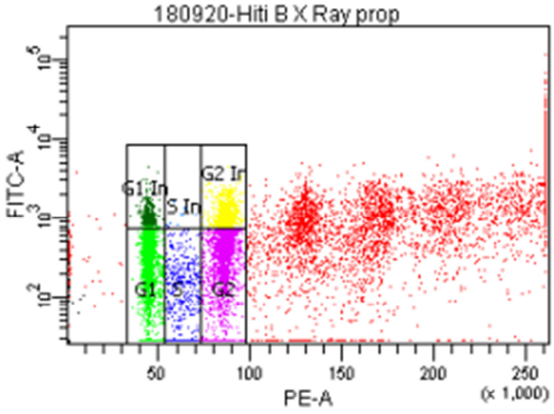
Experiment Name:	ZellZyklusanalyse FITCA vs Prop
Specimen Name:	180920
Tube Name:	Hiti B UVA prop
Record Date:	Sep 21, 2020 12:59:59 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	005bacb2-7cfc-447a-ae23-0180650ea...

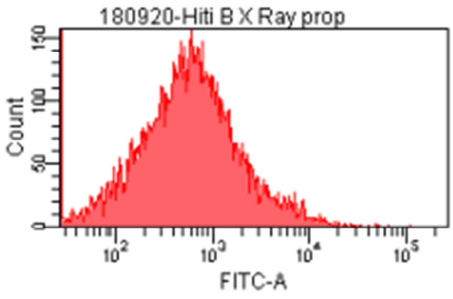
Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean	PE-A Mean
All Events	10,000	####	1,403	96,560
Alive	9,815	98.2	1,425	98,354
P1	795	8.1	582	66,859
P3	3,060	31.2	1,202	90,921
P4	1,942	19.8	1,793	168,980
P2	3,301	33.0	662	46,654
G1	2,309	23.1	464	46,677
S	674	6.7	367	64,658
G2	1,274	12.7	446	88,126
G2 In	1,972	19.7	1,638	91,888
G1 In	994	9.9	1,124	46,574
S In	96	1.0	1,681	66,273





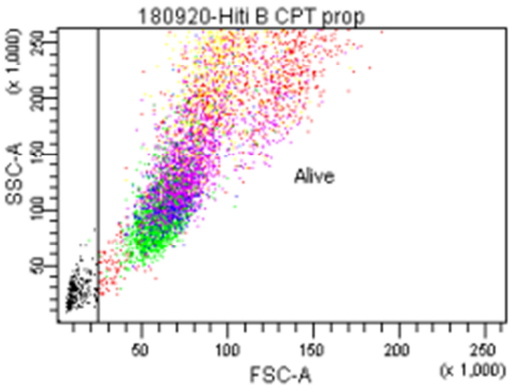


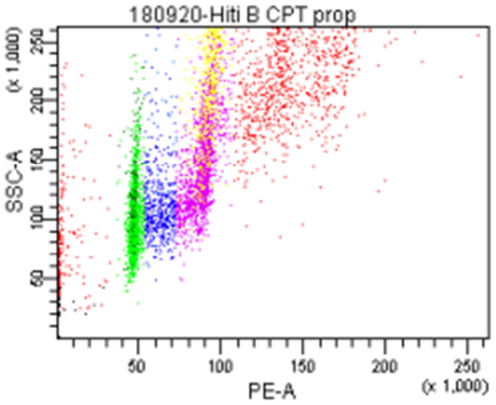


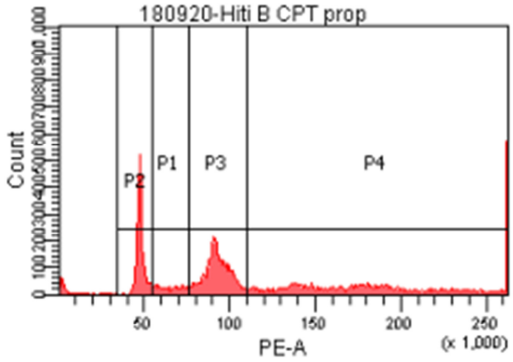


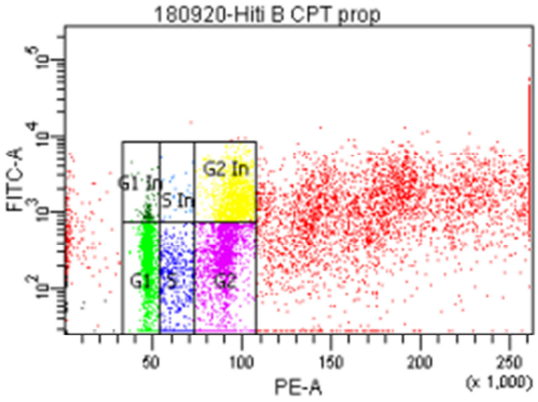
Experiment Name:	ZellZyklusanalyse FITCA vs Prop
Specimen Name:	180920
Tube Name:	Hiti B X Ray prop
Record Date:	Sep 21, 2020 12:58:20 PM
$OP:	AGBoege
GUID:	4b8b130f-745e-4368-9438-39d22830...

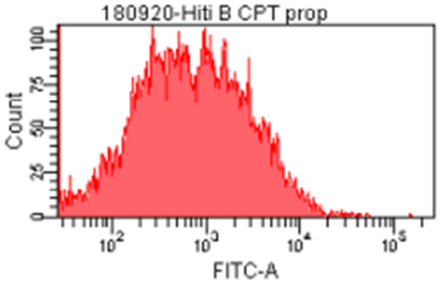
Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean	PE-A Mean
All Events	10,000	####	1,123	115,290
Alive	9,866	98.7	1,137	116,845
P1	498	5.0	172	64,813
P3	2,164	21.9	598	86,162
P4	3,091	31.3	952	168,208
P2	2,959	29.6	423	44,775
G1	2,597	26.0	330	44,800
S	454	4.5	139	63,067
G2	1,605	16.0	322	85,361
G2 In	715	7.1	1,174	86,843
G1 In	362	3.6	1,093	44,601
S In	11	0.1	1,232	61,620









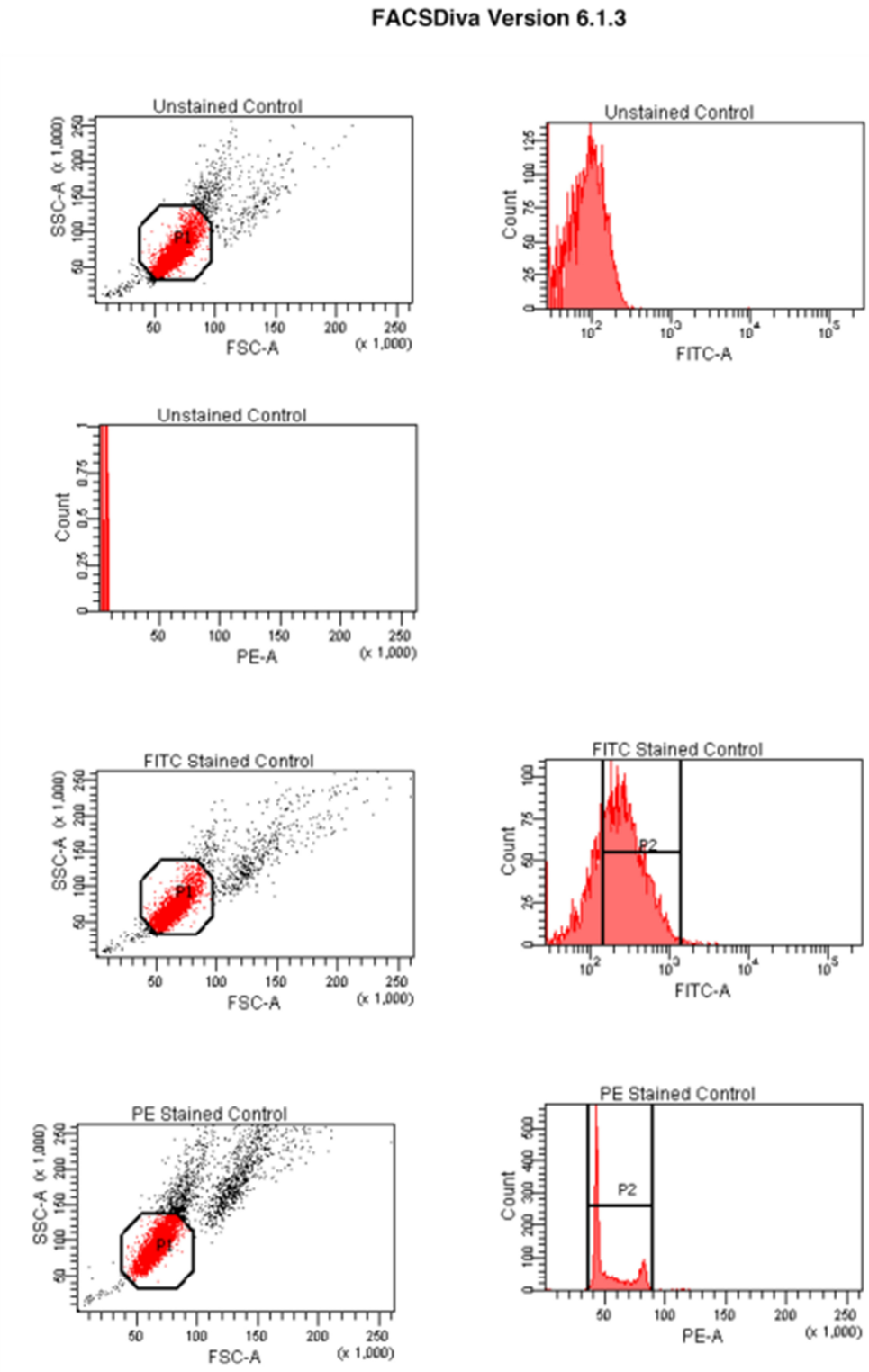


Experiment Name: ZellZyklusanalyse FITCA vs Prop
Specimen Name: 180920
Tube Name: Hiti B CPT prop
Record Date: Sep 21, 2020 12:57:10 PM
$OP: AGBoege
GUID: e01ab0a8-1811-472b-80c8-b6538387...

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean	PE-A Mean
All Events	10,000	####	1,507	123,927
Alive	9,765	97.6	1,541	126,887
P1	559	5.7	238	64,939
P3	2,777	28.4	934	92,942
P4	3,121	32.0	1,475	176,747
P2	1,953	19.5	315	47,126
G1	1,844	18.4	264	47,125
S	507	5.1	129	63,293
G2	1,688	16.9	296	89,349
G2 In	1,197	12.0	1,754	96,319
G1 In	109	1.1	1,182	47,134
S In	27	0.3	1,855	63,338

6.5 Sonstiges

6.5.1 Kompensationsmessung



6.5.2 Regressionsanalyse

Ergebnisse der Regeressionsanalyse

Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	-29,1
Top	2291
LogEC50	23,24
HillSlope	0,06542
EC50	27,7 (1,73E+23)
Standardfehler	
Bottom	234,4
Top	193
LogEC50	2,982
HillSlope	0,03308
95% Konfidenzintervall	
Bottom	-506.7 to 448.5
Top	1897 to 2684
LogEC50	17.16 to 29.31
HillSlope	-0.001978 to 0.1328
EC50	20,9-34,6(1.444e+017 to 2.061e+029)
Anpassungsgüte	
Freiheitsgrade	32
Determinationskoeffizient R^2	0,8296
Absolute Quadratsumme	23,34 (6,38E+06)
Standardabweichung der Residuen sx.y	446,4
n Anzahl analysierter Punkte	36

Tabelle 20: Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse mit GraphPad Prism

Danksagung

Ich bedanke mich von Herzen bei dem gastgebenden Institut, welches mir diese Promotion ermöglicht hat.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Boege für seine freundliche Aufnahme und Unterstützung.

Ebenso danke ich meinem Co-Betreuer Prof. Stork, der sich trotz seines großen Arbeitspensums zur Betreuung bereit erklärt hat.

Ich danke auch Dr. Christian Mielke und dem ganzen Team im Labor. Sie haben mich herzlich aufgenommen und geduldig in der Durchführung meiner Experimente unterstützt. Herzlichen Dank insbesondere auch an Elke Berg, Birgit Hanzen und Frau Dr. Faiza Kalfalah, die mich wunderbar in die Zellkultur eingearbeitet haben.

Gleichermaßen geduldig und hilfsbereit hat mich Dr. Mielke bei der Korrektur meiner Dissertationsschrift unterstützt, wofür ich mich noch einmal besonders bedanken möchte.

Außerdem gilt mein Dank meiner Familie und meiner Freundin, die während der Zeit immer für mich da waren und mich unterstützt haben.

Ohne Sie alle wäre diese Dissertation nie so geworden, wie sie heute ist.