

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

Untersuchung zur möglichen Zellzyklus-abhängigen Induktion des Tumorsuppressorproteins p21

Dissertation

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

vorgelegt von

Susan Chen

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen M. Floß

千
里
之
行
，
始
於
足
下

老
子

Eine Reise von tausend Meilen beginnt mit einem einzigen Schritt – Lao Zi

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der potenziellen zellzyklusabhängigen Induktion des Tumorsuppressorproteins p21 im Kontext von DNA-Schädigungen. p21 ist als Cyclin-abhängiger-Kinasen-Inhibitor (CKI) ein zentraler Regulator der Zellzyklusprogression, der über p53-abhängige und -unabhängige Wege reguliert wird und entscheidend zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beiträgt. Eine Fehlregulation kann die Tumorentstehung begünstigen und den therapeutischen Erfolg beeinträchtigen.

In Vorarbeiten des gastgebenden Instituts wurde das grün fluoreszierende Protein- (GFP) Gen in die HT-1080 Zelllinie mittels *CRISPR/Cas9*-Methode integriert. Während der Rekombination fusionierte das GFP gezielt mit dem endogenen p21-Gen. Die daraus resultierende fluoreszierende Zelllinie HT-p21GFP ermöglicht es, die Expression von p21-GFP auf Einzelzellebene sichtbar zu machen. Diese Eigenschaft wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzt, um mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Lebendzellfluoreszenzmikroskopie die Dynamik und Regulation von p21-GFP detailliert zu analysieren. Ziel war es, die Dynamik und Heterogenität der p21-GFP-Expression nach Behandlung mit Röntgenstrahlen und Camptothecin (CPT) zu untersuchen.

Unsere Ergebnisse im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse zeigten eine dosisabhängige lineare Zunahme der p21-GFP-Expression bei Röntgenexposition sowie eine biphasische Reaktion auf die CPT-Behandlung. Im Zuge des *Live cell imaging* beobachteten wir, dass die p21-GFP-Expression unabhängig von der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Schadensinduktion war. In G1- und G2-Phasen konnte die Anwesenheit von p21-GFP nachgewiesen werden. p21-GFP wurde jedoch in den S-Phasen vollständig abgebaut. Die p21-GFP-Expression ging mit einer verlängerten G1-Phasenlänge und erhöhter Zelltoderate einher.

Zusammenfassend konnten charakteristische Dosis-Wirkungsbeziehungen der p21-Expression für die jeweiligen Induktoren eines DNA-Schadens beobachtet werden. Die Ergebnisse unserer Arbeit suggerieren, dass p21-GFP künftig als diagnostisches Werkzeug zur Identifikation der Toxizität verschiedener Noxen geeignet sein könnte.

Abstract

This study focuses on the potential cell cycle–dependent induction of the tumor suppressor protein p21 in the context of DNA damage. As a cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI), p21 is a key regulator of cell cycle progression. It is controlled through both p53-dependent and independent pathways and plays a crucial role in maintaining the genomic stability. Dysregulation of p21 can promote tumorigenesis and impair therapeutic outcomes.

In preliminary work conducted at the host institute, the green fluorescent protein (GFP) gene was integrated into the HT-1080 cell line using *CRISPR/Cas9* technology. During homologous recombination, GFP was specifically fused to the endogenous p21 gene. The resulting fluorescent cell line, HT-p21GFP, enables visualization of p21-GFP expression at the single-cell level. This feature was leveraged in the present study to analyse the dynamics and regulation of p21-GFP using flow cytometry and confocal live-cell fluorescence microscopy. The aim was to investigate the dynamics and heterogeneity of p21-GFP expression following treatment with ionizing radiation and the chemotherapeutic agent camptothecin (CPT).

Flow cytometric analysis revealed a dose-dependent linear increase in p21-GFP expression following irradiation, while CPT treatment induced a biphasic response. In live-cell imaging, we observed that p21-GFP expression was independent of the cell cycle phase at the time of DNA damage induction. p21-GFP was detectable in G1 and G2 phases but was completely degraded during the S phase. Notably, increased p21-GFP expression correlated with prolonged G1 phase duration and higher rates of cell death.

In conclusion, distinct dose–response relationships of p21 expression were observed for each DNA-damaging agent. Our findings suggest that p21-GFP may serve as a valuable diagnostic tool for assessing the cytotoxicity of various genotoxic stressors in the future.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC/CCdc20-Komplex	<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Cdc20</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
CDK	Cyclin-abhängige-Kinasen
CDKI	Cyclin-abhängiger-Kinasen-Inhibitor
CDKN1A	Cyclin-abhängiger-Kinasen-Inhibitor 1A
Cip1	<i>CDK-interacting protein 1</i>
cm²	Quadratzenimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CPT	Camptothecin
CRISPR/Cas	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated</i>
Cy	Cyclin-Bindungsmotiv
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESB	Einzelstrangbruch
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FEN1	Flap-Endonuklease 1
g	grün
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

Gy	Gray
h	Stunde(n)
HDAC	Histon-Deacetylase-Hemmer
HeNe	Helium-Neon
HR	homologe Rekombination
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LET	linearer Energietransfer
LSM	<i>Laser-Scanning-Mikroskop</i>
mA	Miliampere
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
µs	Mikrosekunde(n)
ml	Milliliter
mM	Milimolar
MMR	<i>Mismatch-Reparatur</i>
NA	numerische Aperatur
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
ng	nicht-grün
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung
NM	Nährmedium
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
p21	Protein 21
p53	Protein 53

PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PIP-box	<i>PCNA interacting peptide-box</i>
pRB	Retinoblastom-Protein
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
S.	Seite
s.	siehe
Tab.	Tabelle
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
Top1	Topoisomerase-I
U/ml	<i>Unit</i> pro Milliliter
UV	Ultraviolett
Waf1	<i>wild-type p53-activated fragment 1</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zellzyklus	1
1.1.1	Zellzyklusphasen	1
1.1.2	Regulation des Zellzyklus	4
1.2	p21	6
1.2.1	Aufbau von p21	7
1.2.2	Funktion von p21 als CDKI	7
1.2.3	Funktion von p21 im Zusammenhang mit PCNA	8
1.2.4	Rolle von p21 in der Apoptose	9
1.2.5	Regulation über p53-abhängige Transkription	10
1.2.6	Regulation über p53-unabhängige Transkription	10
1.2.7	Posttranskriptionelle Regulation über Phosphorylierung	11
1.2.8	Ubiquitin-abhängiger und -unabhängiger Abbau von p21	11
1.2.9	Zelluläre Lokalisation von p21	11
1.3	DNA-Schäden und -Reparatur	12
1.3.1	Röntgenstrahlen-induzierte DNA-Läsionen	13
1.3.2	Camptothecin-induzierte DNA-Läsionen	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material	17
2.1	Zellkultur	17
2.1.1	Zelllinie	17
2.1.2	Medien	17
2.1.3	Lösungen und Reagenzien	18
2.2	weitere Materialien	18
2.3	Chemikalien	18
2.4	Verbrauchsmaterialien	19
2.5	Geräte	20
2.6	Software	21
3	Methoden	22
3.1	Zellkultur	22
3.1.1	Kultivierung	22

3.1.2 Kryokonservierung.....	22
3.1.3 Auftauen	23
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	23
3.2 Ermittlung der mittleren Fluoreszenz nach Röntgenbestrahlung	24
3.2.1 Präparation der Zellen für die Bestrahlung	24
3.2.2 Bestrahlung am Gulmay RS225	24
3.2.3 Präparation der Zellen für die durchflusszytometrische Messung	25
3.2.4 Durchflusszytometrische Messung nach Röntgenbestrahlung	25
3.3 Ermittlung der mittleren Fluoreszenz nach CPT-Behandlung	26
3.3.1 Präparation der Zellen für die CPT-Behandlung.....	26
3.3.2 Behandlung mit CPT.....	27
3.3.3 Präparation der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	27
3.3.4 Durchflusszytometrische Messung nach CPT-Behandlung.....	27
3.4 48 h Serie / Live cell imaging	28
3.4.1 Aussaat der Zellen auf <i>micro-Insert 4 Welll FulTrac</i>	28
3.4.2 Induktion von DNA-Schädigungen.....	29
3.4.3 <i>Live cell imaging</i> am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop	29
3.5 Aufnahmen der CPT-behandelten Zellen	31
3.5.1 Präparation der Zellen	31
3.5.2 CPT-Behandlung	31
3.5.3 Aufnahmen am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop	32
4 Ergebnisse	33
4.1 Durchflusszytometrische Analyse	33
4.2 <i>Live cell imaging</i> : Zellzyklusphasen	36
4.3 Momentaufnahmen von CPT-behandelten Zellen	46
5 Diskussion und Schlussfolgerung	49
5.1 Dynamik der p21-GFP-Expression nach DNA-Schädigung	49
5.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung nach DNA-Schadensinduktion	50
5.1.2 Komplexität der DNA-Schadensantwort und Rolle von p21	51
5.1.3 Zuverlässigkeit der Methodik und kritische Reflexion.....	53
5.1.4 Potenzial von p21-GFP als Biomarker und in der onkologischen Therapie	54
5.2 Erkenntnisse aus dem <i>Live cell imaging</i> nach Röntgenbestrahlung.....	56

5.2.1	Heterogenität in der p21-GFP-Expression und Einfluss der Zellzyklusphase	56
5.2.2	Mutter-Tochter-Vererbung von p21 als mögliches molekulares Gedächtnis	57
5.2.3	Methodische Herausforderung und Optimierungspotenzial	58
5.2.4	p21 und zelluläre Seneszenz	60
5.3	p21-GFP-Expression nach CPT-Behandlung - Momentaufnahmen	60
5.4	Schlussfolgerung	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Abbildungsverzeichnis	74
8	Tabellenverzeichnis	75
9	Anhang	75

1 Einleitung

1.1 Zellzyklus

Zellen durchlaufen zur Vermehrung einen sogenannten Zellzyklus (Abb.1). Ein solcher Zyklus ist definiert durch die Zeitspanne zwischen der Heranreifung einer Zelle aus einer Mutterzelle bis hin zu ihrer Teilung in zwei Tochterzellen, die das identische Erbmateriale aufweisen. *In vitro* beträgt die Zeit eines kompletten Zyklus einer menschlichen Zelle ungefähr 24 h, *in vivo* jedoch länger oder dieser findet erst gar nicht statt (Horn et al., 2019).

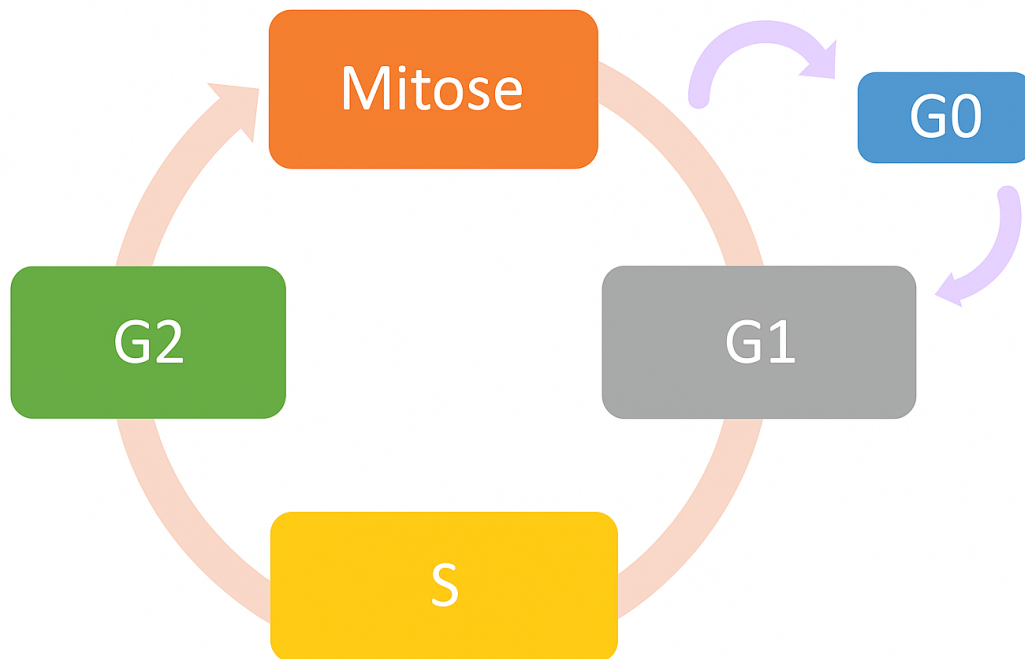


Abb. 1: Zellzyklus. Dieser besteht aus vier Zellzyklusphasen: G1-Phase (grau), S-Phase (gelb), G2-Phase (grün) und Mitose (orange). Alternativ kann die Zelle nach der Mitose in die G0-Phase (blau) übergehen, wo keine Zellteilung stattfindet und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aktiv in den Zellzyklus eintreten.

1.1.1 Zellzyklusphasen

Ein Zellzyklus gliedert sich in vier Phasen:

- G1-Phase

- S (-ynthese) -Phase
- G2-Phase
- M (-itose) -Phase

Die ersten drei genannten Phasen werden als Interphase zusammengefasst und dienen hauptsächlich zur Vorbereitung auf die letzte Phase der Zellteilung.

Die **G1-Phase** zeichnet sich durch das Wachsen und die Heranreifung der Zelle sowie die Synthese von Proteinen aus, die für die weiteren Phasen und Verdopplung des Genoms von großer Bedeutung sind. Je nach Zellart kann die Länge der G1-Phase von 3 bis zu 12 h reichen (Rassow et al., 2016). Nach Ausreifung der Zelle und Synthese aller benötigten Bestandteile für die bevorstehende Zellteilung, wird am Ende der G1-Phase durch die Stimulation von Wachstumsfaktoren der Eintritt in die S-Phase angeregt. Bis zum Abschluss der Mitose erfolgt der weitere Verlauf des Zellzyklus nach dem Alles-oder-nichts-Gesetz. Bei einem Überangebot der Zellpopulation, einem Mangel an Wachstumsfaktoren oder dem Erreichen eines bestimmten Differenzierungsgrades gehen einige Zellen in die G0-Phase über. In dieser Ruhephase wird der Zustand der Zelle ohne weitere Entfaltung beibehalten. Alternativ kann es zu einem späteren Zeitpunkt zu einem Wechsel in die aktive G1-Phase kommen (Königshoff und Brandenburger, 2018).

Als Vorbereitung auf die Zellteilung findet in der **S-Phase** die DNA-Replikation statt. Hierbei wird das Erbmateriale der Zelle verdoppelt, sodass am Ende des Stadiums jedes Chromosom aus jeweils zwei Schwesterchromatiden besteht. Da hierbei über 3 Milliarden Basenpaare abgeschrieben werden müssen, beträgt die Dauer der Phase etwa 7 h (Horn et al., 2019).

Anschließend beginnen die Zellen sich in der **G2-Phase** von ihren Nachbarzellen abzulösen. Durch die Aufnahme von Flüssigkeit nimmt die Zellgestalt an Größe und Volumen zu. In dieser prämitotischen Phase wird kontrolliert, ob während der Synthese Replikationsfehler entstanden sind, die gegebenenfalls repariert werden. Ist die Dauer der Reparatur zu lang oder werden viele Fehler detektiert, kann dies zur Einleitung der Zellapoptose führen. Zusätzlich werden in der G2-Phase vermehrt RNA-Moleküle sowie Proteinkinasen synthetisiert, die für die bevorstehende Zellteilung wichtig sind. In etwa beträgt die Dauer der G2-Phase 4 h (Horn et al., 2019).

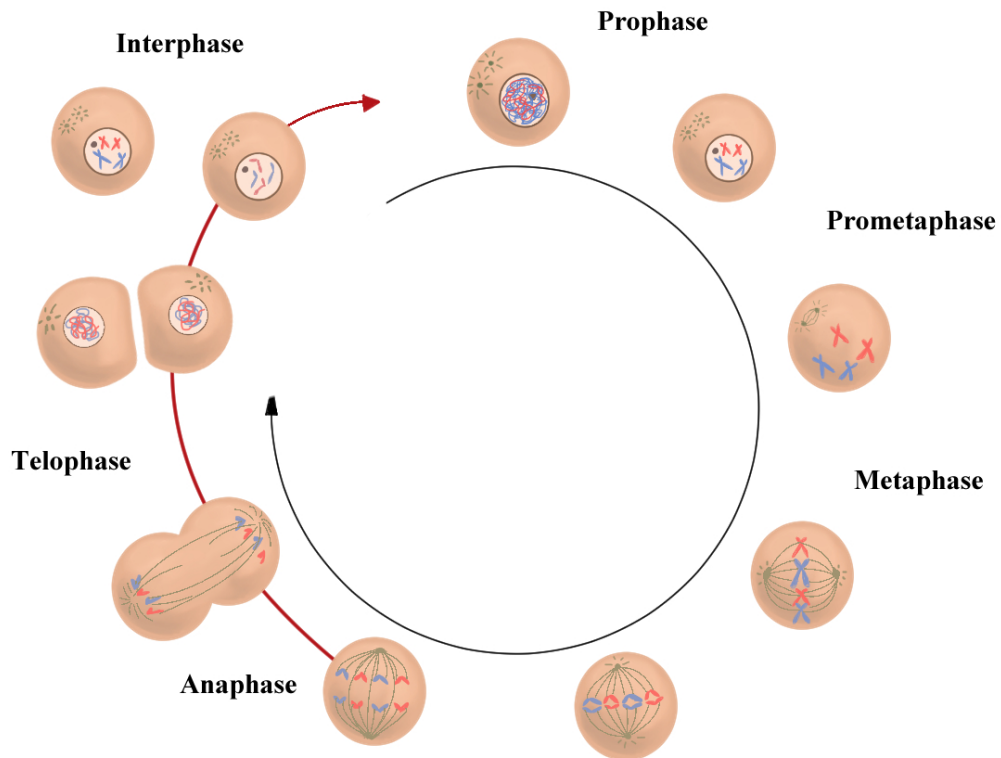


Abb. 2: M-Phase. Hier findet die Mitose (Zellkernteilung) mit fünf Phasen (Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase) sowie die anschließende Zytokinese (Zellteilung) statt. Dabei wird die Erbinformation gleichmäßig auf zwei Tochterzellen verteilt. Jede Tochterzelle tritt anschließend in die Interphase über. Eigene Illustration in Anlehnung an *Diagrama Mitosis, Jpablo cad* (10.5.2009).

In der **M-Phase** (Abb.2) erfolgt die Mitose (Zellkernteilung) sowie die Zytokinese (Zellteilung). Dabei setzt sich die Mitose aus fünf verschiedenen Phasen zusammen:

- Prophase
- Prometaphase
- Metaphase
- Anaphase
- Telophase

Der Ablauf der **Prophase** setzt sich zusammen aus der Trennung der Zentrosome, der Bildung von Mitosespindel und der Auflösung des Nukleolus. Das Ende dieser Phase ist charakterisiert durch die maximale Chromosomenkondensation, wobei die Chromatiden dabei sichtbar werden. Die **Prometaphase** zeichnet sich durch den Zerfall der Zellmembran aus. In der **Metaphase** reihen sich die Chromosomen mit Hilfe des Spindelapparates an der Äquatorialebene an, welche mit ihren Mikrotubuli an den

Kinetochoren binden. In der **Anaphase** trennen sich die Schwesterchromatiden durch den Zug der Spindelfasern an die entgegengesetzten Pole. Schlussendlich kommt es in der **Telophase** zur Dekondensation der Chromosomen, Auflösung des Spindelapparates, Neubildung einer Kernmembran und Formierung neuer Nukleoli sowie zum Eintritt in die rRNA-Synthese. Die nachfolgende **Zytokinese** bezeichnet die Abschnürung der Mutterzelle in zwei Tochterzellen mit jeweils demselben Erbgut, die jeweils in die G1-Phase eintreten und einen neuen Zellzyklus durchlaufen (Nordheim et al., 2018; Horn et al., 2019). Die Zeitspanne der Mitose beträgt in etwa 0,5 bis 1 h (Horn et al., 2019).

1.1.2 Regulation des Zellzyklus

Der Ablauf eines Zellzyklus muss strengstens reguliert werden, da die unkontrollierte Proliferation von entarteten Zellen zur Entstehung von Tumoren führen kann. Hierzu gibt es diverse Zellzyklus-Kontrollsysteme und Regulatoren, die nur bei Vollständigkeit aller erforderlichen Faktoren den weiteren Vorgang des Zellzyklus erlauben und somit zur Qualitätssicherung beitragen. Trotz Reparaturmechanismen kann es zu irreversiblen DNA-Fehlern kommen, welche durch einen programmierten Zelltod (Apoptose) ausgeschaltet werden.

Wichtige Bausteine des **Zellzyklus-Kontrollsystems** bilden zwei große Gruppen:

- Cycline
- Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK)

Cycline sind als regulierende Proteine des Zellzyklus aufgrund ihrer Kontrollzuständigkeit für die CDK-Aktivität von großer Bedeutung. Es wird unterschieden zwischen Cyclin A, -B, -D, -E, die mit Ausnahme von Cyclin D (Abb. 3), während des Zyklus immer wieder auf- und abgebaut werden (Rassow et al., 2016; Horn et al., 2019). Zudem können Cycline in zwei Gruppen eingeteilt werden. Einerseits gibt es die G1-Cycline, die während der G1-Phase aktiv sind und für den Übertritt in die S-Phase essenziell sind. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Cyclin D und E. Andererseits unterscheidet man die G2-Cycline, die am Übergang in die Mitose beteiligt sind. Zu dieser Gruppe zählt zum Beispiel das Cyclin B (Hirsch-Kaufmann et al., 2009; Horn et al., 2019).

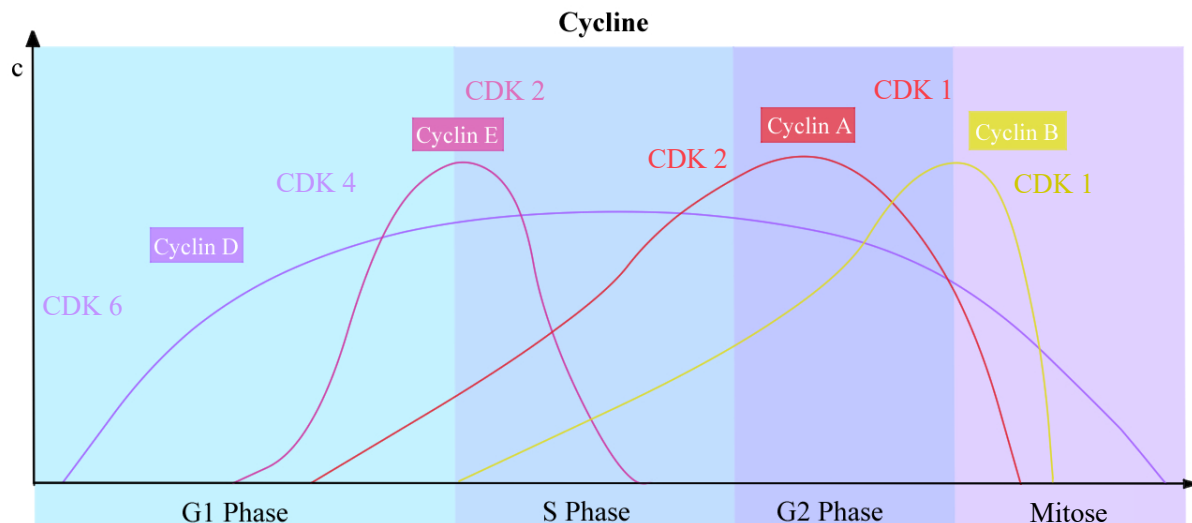


Abb. 3: Cycline und CDKs während des Zellzyklus. Cyclin A, -B und -E werden zyklisch aufgebaut und abgebaut, während Cyclin D dauerhaft vorhanden ist. CDK4 und -6 sind in der G1-Phase aktiv, während CDK2 in der S-Phase und CDK1 in der G2- und M-Phase eine höhere Konzentration aufweisen. Eigene Illustration in Anlehnung an Horn et al., 2019 (S. 306, Abb. 13.15).

Bei den **CDKs** handelt es sich um Proteinkinasen, die wie der Name schon sagt, von Cyclinen abhängig sind. CDKs und Cycline bilden gemeinsame Komplexe, die über De- und Phosphorylierung sowie CDK-Inhibitoren (CDKI) reguliert werden. In menschlichen Zellen unterscheidet man zwischen CDK1, -2, -4, -6, die nicht einer zyklischen Expression unterliegen. CDKs werden in jeder Zellzyklusphase exprimiert und an bestimmten Übergängen aktiviert. Zudem phosphorylieren sie weitere Enzyme und Transkriptionsfaktoren, die den Übertritt in die nächste Phase initiieren (Horn et al., 2019; Koolman und Röhm, 2019).

Weitere Bestandteile des Kontrollsystems sind die **Restriktionspunkte** innerhalb eines Zyklus. Wichtige Kontroll- und Übergangspunkte sitzen am:

- G1-S-Übergang
- G2-M-Übergang
- Spindelkontrollpunkt in der M-Phase

Am **Übergang zwischen der G1- und S-Phase** wird die Ausreifung der Zelle, die genügende Verfügbarkeit von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sowie bestehende DNA-Schäden überprüft. Schlechte Bedingungen für die weitere Entwicklung der Zellen können zu einem G1-Arrest führen. Beteiligt an diesem Kontrollpunkt sind Wachstumsfaktoren-abhängige D-Cycline, die mit CDK4 und CDK6 einen Komplex

bilden. Der D-Cyclin/CDK4/6-Komplex führt zur vermehrten Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRB), welches ein zentrales Schlüsselprotein im Zellzyklus darstellt und auf diese Weise inaktiviert wird. Dadurch wird die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren der Familie E2F gefördert, die im normalen Zustand an das pRB gebunden vorliegen. Gegen Ende der G1-Phase kommt der E-Cyclin/CDK2-Komplex hinzu, der weitere Phosphate an das pRB hängt. Somit wird der Restriktionspunkt überwunden und die S-Phase eingeleitet.

Vor Übertritt in die Mitose wird am **G2-M-Übergang** kontrolliert, ob die Replikation der DNA vollständig und fehlerfrei erfolgt ist. Beim Auffinden von Replikationsfehlern wird der Zellzyklus angehalten, um den Schaden zu reparieren. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das CDK1, welches einen Komplex mit Cyclin B bildet und Proteine phosphoryliert, die für den Zerfall der Kernlamina sowie die Reorganisation des Zytoskeletts verantwortlich ist.

Der **Spindelkontrollpunkt** liegt gegen Ende der Mitose vor. Hierbei wird die Korrektheit der Verknüpfung zwischen den Mikrotubuli an den jeweiligen Kinetochoren der Chromatiden kontrolliert. Falls dies nicht der Fall ist, kann es zu einem M-Arrest kommen (Horn et al., 2019).

Um die Aktivität der CDKs zu regulieren, gibt es sogenannte Cyclin-abhängige-Kinasen-Inhibitoren (CKI). Dazu zählen die CKIs der Ink4-Familie (p15, p16, p17, p18, p19), die speziell hemmend auf CDK4/-6 wirken und dadurch einen G1-Arrest induzieren können. Des Weiteren können CKIs der Cip/Kip-Familie (p21, p27, 57) unterschieden werden, die eine breitere Spezifität für verschiedene CDKs aufweisen (Rassow et al., 2016).

1.2 p21

Im Jahr 1993 wurden erstmals Publikationen über das Protein p21 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander veröffentlicht. In diesem Zusammenhang erklärt sich die unterschiedliche Namensgebung des Proteins. Denn Harper et al. (1993) beschrieb p21^{Cip1} (*CDK-interacting protein 1*) als einen Inhibitor der CDKs und die Wichtigkeit des Proteins in der Regulation der Zellproliferation. Die Forschungsgruppe von el-Deiry et al. (1993) wiederum beschäftigte sich in ihren Untersuchungen mit der Funktion von p21^{Waf1} (*wild-type p53-activated fragment 1*) als Mediator der p53-vermittelten Suppression des Zellwachstums.

1.2.1 Aufbau von p21

Beim Menschen sitzt das für p21 codierende Gen *CDKN1A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) auf Chromosom 6 an Locus p21.2 (el-Deiry et al., 1993). p21 gehört wie bereits im letzten Kapitel (s. 1.1.2) erwähnt, zur Familie Cip/Kip der CDKI. Das Protein besitzt eine molekulare Masse von 21 kDa und setzt sich aus 164 Aminosäuren sowie eines N- und C-Terminus zusammen (Harper et al., 1993). Beide terminalen Domänen sind zuständig für die unterschiedlichen Interaktionen von p21 mit zellzyklusrelevanten Proteinen, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, Caspasen und Proteinkinasen (Dotto, 2000).

Im Gegensatz zum C-Terminus, wurde im N-Terminus eine Sequenzhomologie innerhalb der Cip/Kip-Familie beobachtet (Polyak et al., 1994; Toyoshima und Hunter, 1994; Nakanishi et al., 1995), die insbesondere eine wichtige Rolle in der Bindung an Cyclin/CDK-Komplexe spielt (Chen et al., 1995; Sherr und Roberts, 1999). An der N-terminalen Domäne besitzt p21 zusätzlich das Cyclin-Bindungsmotiv 1 (Cy1), während an der C-terminalen Region das schwächer bindende Cy2 lokalisiert ist. Diese Bindungsmotive ermöglichen eine Bindung an die Untereinheiten der Cycline und sind somit für die p21-vermittelte Aktivitätshemmung von Cyclin/CDK-Komplexen unverzichtbar (Chen et al., 1996). Darüber hinaus interagiert p21 mit CDK für eine optimale Inhibierung über ein CDK-Bindungsmotiv K, das sich ebenfalls im N-Terminus befindet (Chen et al., 1996; Child und Mann, 2006).

Im Bereich der C-terminalen Domäne weist p21 eine Bindungsstelle für das sogenannte *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) auf, worauf im nächsten Kapitel (s. 1.2.3) näher eingegangen wird (Warbrick et al., 1995; Luo et al., 1995).

1.2.2 Funktion von p21 als CDKI

Die bekannteste und meist erforschte Funktion von p21 ist seine Tumorsuppressor-Rolle als CDKI. Eine erhöhte Konzentration von p21 als Antwort auf genotoxischen Stress führt zur direkten Bindung und damit zur Hemmung der Cyclin/CDK-Komplexe. Da p21, wie bereits in Kapitel 1.1.2 genannt, eine breite Spezifität aufweist, ist es in der Lage CDK1, -2, -4, -6 zu inhibieren (Georgakilas et al., 2017). Durch die Einleitung des Zellarrests kann p21 bei erhöhter Expression den Übergang in die verschiedenen Zellzyklusphasen anhalten (Di Leonardo et al., 1994; Dulić et al., 1994; Ogryzko et al., 1997; Niculescu et al., 1998; Radhakrishnan et al., 2004; Charrier-Svournin et al.,

2004; Neganova et al., 2011). Die somit entstandene Unterbrechung der Zellteilung verhindert die unkontrollierte Vermehrung von Zellen mit defektem DNA-Erbgut und verschafft Zeit, den Fehler im Genom zu beheben. Gelingt der Zelle dies nicht, verfällt sie in die zelluläre Seneszenz (Chang et al., 2000) oder sie geht in die Apoptose (Bartek und Lukas, 2007).

1.2.3 Funktion von p21 im Zusammenhang mit PCNA

Eine weitere Funktion von p21 ist die Inhibierung der DNA-Synthese während der Replikation über die *PCNA interacting peptide-box* (PIP-box), die wie zuvor erwähnt am C-Terminus lokalisiert ist (Xiong et al., 1993; Warbrick et al., 1995; Luo et al., 1995; Warbrick 1998; Kelman und Hurwitz, 1998; Ando et al., 2001). PCNA stellt sowohl aufgrund ihrer Ringklemmstruktur (Kroker und Bruning 2015) als auch ihrer Fähigkeit an die DNA-Polymerasen δ und ϵ während der Elongationsphase zu binden, einen wichtigen Cofaktor der DNA-Replikation dar (Waga et al., 1994; Flores-Rozas et al. 1994). Mit dieser Eigenschaft sichert PCNA eine gesteigerte Prozessivität und verhindert die Dissoziation der Polymerase vom DNA-Strang (Gulbis et al., 1996).

Es existieren weitere Strukturen, die ebenfalls über das PIP-box Motiv an PCNA binden können und daher miteinander in Konkurrenz stehen (Warbrick et al. 1998). Bisher weist jedoch p21 die höchste Bindungsaffinität für PCNA auf (Moldovan et al., 2007; Havens und Walter, 2009; Punchihewa et al., 2012; Mailand et al., 2013). So besitzen zum Beispiel p66, eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ und die Flap-Endonuklease 1 (FEN1) im Vergleich zu p21 eine 189- bis 725-fach schwächere Affinität für PCNA (Bruning und Shamoo 2004). Zudem ist PCNA sowohl an DNA-Reparaturmechanismen (*Mismatch-Reparatur* (MMR), Basenexzisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER)) als auch an verschiedenen postreplikativen Prozessen beteiligt (Jónsson und Hübscher, 1997; Kelman, 1997; Moldovan et al., 2007;).

Die Bindung von p21 an PCNA bewirkt demnach zum einen eine Arretierung des Zellzyklus während der S-Phase und zum anderen die Modulation verschiedener DNA-Reparaturmechanismen (Abbas und Dutta 2009). Hierzu ist anzumerken, dass p21 eine duale Rolle im Prozess der DNA-Reparatur spielt. Einerseits erlaubt p21 die DNA-Reparatur durch die Blockierung der Replikation (Warbrick et al. 1995; Gulbis et al. 1996), andererseits besitzt p21 die Fähigkeit andere PCNA-Bindungspartner über die

erhöhte Affinität zur PIP-box zu verdrängen. Letzteres kann in einer negativen Wirkung auf PCNA-abhängige DNA-Reparaturmechanismen resultieren (Abbas und Dutta, 2009; Georgakilas et al., 2017).

1.2.4 Rolle von p21 in der Apoptose

Des Weiteren spielt p21 eine wichtige Rolle in der Inhibition der Apoptose. Apoptose-regulierende Kinasen und Proteasen können direkt mit p21 interagieren und werden auf diese Weise gehemmt (Asada et al., 1999). So besitzt p21 die Fähigkeit über die ersten 33 Aminosäuren am N-Terminus eine Interaktion mit Procaspase-3 einzugehen. Die Bindung an den inaktiven Vorläufer inhibiert die Konversion in die aktive Effektor-Caspase-3. Folglich kommt es zum Abbruch der Fas-Rezeptor-induzierten Caspasen-Kaskade und die Einleitung des programmierten Zelltodes wird verhindert (Suzuki et al., 1999). Als Reaktion auf oxidativen Stress, UV-Licht und Zytokin Ausschüttungen, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktoren, wird der MAP-Kinase-Signalweg (MAP, *mitogen-activated protein*) aktiviert. Die katalytischen Aktivitäten der Apoptose-fördernden Kinasen des MAPK-Signalweges wie ASK1(*apoptosis signal regulation kinase 1*), JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen) und p38 können ebenfalls von p21 gehemmt werden (Asada et al., 1999). Zusätzlich kann p21 sowohl die Induktion von mitogenen als auch von Apoptose-fördernden Genen positiv beeinflussen (Chang et al., 2000). Aufgrund des anti-apoptotischen Potentials und damit einhergehend unterstützende Wirkung auf onkogene Prozesse, kann in der Zusammenschau der Ergebnisse verschiedener Studien, p21 nicht dem klassischen Tumorsuppressor zugeordnet werden.

Im Gegensatz dazu, weisen einige Studien auf die proapoptotische Wirkung von p21 während des Zellzyklusstillstandes in Folge von Erbgutschädigung hin. Ob p21 pro- oder antiapoptotisch fungiert, scheint sowohl von seiner zellulären Lokalisation als auch vom Zelltyp, Stressfaktor und von der Art der Apoptose-Stimuli abzuhängen (Al Bitar und Gali-Muhtasib, 2019). Ein ebenfalls bestimmender Faktor für den weiteren Vorgang – DNA-Reparatur oder Apoptose – ist das Verhältnis zwischen der p21-Expression und der DNA-Schädigung (Cazzalini et al., 2010). Geringe DNA-Schäden führen zur p21-induzierten Inhibition der Apoptose und damit zur DNA-Reparatur, wohingegen eine hohe Anzahl von DNA-Schäden eine Apoptose einleitet. Einige Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Caspase-3 p21 spaltet und dadurch eine Apoptose herbeiführt (Gervais et al., 1998; Zhang et al., 1999, Jin et al., 2000). Es

besteht eine Korrelation zwischen der Akkumulierung von p21 im Nukleus und eine dadurch optimierte Apoptose (Gartel 2005). Jedoch bleibt noch unerforscht, ob die Anwesenheit von p21 essenziell für den programmierten Zelltod ist. Zudem ist eine direkte Rolle von p21 in der Apoptose bisher unklar, da eine Vielzahl von Variablen die Aktivität von p21 zu beeinflussen scheint (Al Bitar und Gali-Muhtashib, 2019). Viele Studien haben bislang, wie oben beschrieben nur die direkte Interaktion von p21 mit Apoptose-fördernden zytoplasmatischen Proteinen zeigen können. Neben einem Modulator der Apoptose (Gartel und Tyner, 2002; Gartel, 2005) ist p21 auch an der Autophagie beteiligt (Zheng et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass p21 vielfältige Funktionen in der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der Apoptose sowie Seneszenz besitzt. Ausschlaggebend für die komplexe Funktion ist der Expressionsstatus von p21. Dieser wird zum einen über die p53-abhängige oder -unabhängige Transkription und zum anderen posttranskriptionell über die Proteinstabilisierung durch Phosphorylierung oder über den Ubiquitin-abhängigen und -unabhängigen Abbau von p21 reguliert (s. 1.2.5 und 1.2.6).

1.2.5 Regulation über p53-abhängige Transkription

p21 ist ein Zielgen des Tumorsuppressors p53, der auch als Wächter des Genoms (Lane, 1992) bekannt ist. Im Promotorbereich des p21 codierenden Gens CDKN1A (s. 1.2.1) sitzen zwei hoch konservierte Stellen, woran p53 direkt binden kann und damit einen wichtigen Transkriptionsregulator von p21 darstellt (el-Deiry, 1998). Es gibt zahlreiche extrinsische Ursachen wie Strahlung und Chemikalien, aber auch intrinsische Stresssignale wie Replikationsfehler und DNA-Schäden, die zur Aktivierung von p53 und dadurch zur Induktion der p21-Expression führen können.

1.2.6 Regulation über p53-unabhängige Transkription

Neben der p53-abhängigen Expression gibt es zahlreiche weitere p53-unabhängige Wege zur Transkriptionsstimulation von p21. Extrazelluläre antiproliferative Signale, wie zum Beispiel TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*), führen zur Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls einen Einfluss auf die p21-Induktion besitzen. Zu diesen Transkriptionsfaktoren zählen unter

anderem Sp1, Sp3, Smads, STATs, C/EBP α und C/EBP β (Gartel und Tyner, 1999; Abbas und Dutta, 2009).

1.2.7 Posttranskriptionelle Regulation über Phosphorylierung

Auch posttranskriptionell gibt es einige Mechanismen zur Regulation von p21. Es ist bekannt, dass Phosphorylierungen an Threonin-145 oder Serin-146 zur Proteinstabilisierung von p21 beitragen und das Zellüberleben fördern (Wulf et al., 2002; Li et al., 2002). Zudem wurde in einer Studie gezeigt, dass beide zuvor genannten Phosphorylierungen die Bindung von p21 an PCNA verhindern (Rössig et al., 2001; Karimian et al., 2016).

1.2.8 Ubiquitin-abhängiger und -unabhängiger Abbau von p21

Der Abbau von p21 kann Ubiquitin-abhängig oder -unabhängig erfolgen. Eine Vielzahl von Ligasen, die im Zellzyklus beteiligt sind, können je nach Stadium des Zellzyklus den Ubiquitin-abhängigen Abbau von p21 durch Proteasomen fördern (Jung et al., 2011). Während der Prometaphase kontrolliert zum Beispiel der APC/CCdc20-Komplex (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Cdc20*) den Abbau von p21 und begünstigt damit die Aktivierung von CDK1, die für die weiteren Zellzyklusphasen von Bedeutung sind (Amador et al., 2007). SCFskp2 und CRL4Cdt2 sind weitere Proteine, die vor allem in der S-phase den Ubiquitin-abhängigen p21-Abbau als Ziel haben (Bornstein et al., 2003; Kim et al., 2008; Al Bitar und Gali-Muhtasib, 2019).

Der Ubiquitin-unabhängige Abbau erfolgt über die direkte Bindung von p21 an die C8-Alpha-Untereinheit des 20s Proteasoms (Touitou et al., 2001). Zudem kann Mdm2, welches bekanntlich für den Abbau von p53 zuständig ist, ebenfalls den Abbau von p21 initiieren. Dies erfolgt jedoch unabhängig von seiner üblichen E3-Ubiquitinligasen-Eigenschaft (Jin et al., 2003; Al Bitar und Gali-Muhtasib, 2019).

1.2.9 Zelluläre Lokalisation von p21

Wie zuvor schon erwähnt (s. 1.2.4), wird die komplexe Funktion von p21 auch von seiner zellulären Lokalisation beeinflusst. Nukleoläres p21 begünstigt durch die Bindung an PCNA und die Hemmung der Cyclin/CDK-Komplexen seine

Tumorsuppressorfunktion (LaBaer et al., 1997). Hingegen korreliert die zytoplasmatische Lokalisation mit der onkogenen Eigenschaft von p21. Hierzu zeigten Studien, dass zytoplasmatisches p21 die Translokation des CDK4/Cyclin D1-Komplexes in den Nukleus fördert. Des Weiteren kann p21 im Zytoplasma zur Hemmung der Apoptose an ASK1 und Caspase 3 binden (Asada et al., 1999; Tanaka et al., 2002). Beide genannten Mechanismen tragen zur Unterstützung der Zellzyklusprogression und damit des onkogenen Potentials von p21 bei.

1.3 DNA-Schäden und -Reparatur

DNA-Schäden in Folge von endogenen oder exogenen Ursachen weisen veränderte chemische Strukturen der DNA auf. Werden Läsionen an der DNA nicht oder falsch behoben, können diese zur Apoptose oder im schlimmsten Fall zu Mutationen führen, die bei Progression unkontrollierter Zellteilung die Karzinogenese fördern. Aus diesem Grund sind zelleigene Response- und Reparaturmechanismen essenziell für die Erhaltung der genomischen Stabilität und die Unterbindung von Tumorentstehung. Die Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen (z.B. Röntgenstrahlung, UV-Strahlung, Gammastrahlung), chemischen Mutagenen (z.B. Alkylanzien), endogenen Stoffwechselvorgängen oder spontanen Replikationsfehlern können Auslöser von DNA-Schäden sein. Je nach Zeitpunkt und der Art des DNA-Schadens existieren verschiedene Reparaturmechanismen, um die ursprüngliche Struktur des Erbguts wiederherzustellen (Sancar et al., 2004). Eine Zelle repariert am Tag ungefähr 10.000 Einzelstrangbrüche (ESB), 2 Doppelstrangbrüche (DSB) und bis zu 5.000 Basenschäden (Abugable et al., 2024; Vilenchik und Knudson, 2003; Alberts et al., 2002). Zu den bekanntesten Basen-Reparatursystemen zählen die BER und NER, die die Exzision und den Ersatz der einzelnen beschädigten Basen oder des ganzen Nukleotidfragmentes ausführen. Die Reparatur von ESB erfolgt über einen ähnlichen Prozess. Zudem werden Fehlpaarungen der DNA bei der Replikation durch die MMR erkannt und entfernt. Des Weiteren gibt es Mechanismen zur Reparatur von DSB, wie zum Beispiel die homologe Rekombination (HR) und die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ). Die HR ist vor allem in der G2- und späten S-Phase das dominierende Reparatursystem (Kostyrko et al., 2015) wohingegen die NHEJ in der G1- und G0-Phase von großer Bedeutung ist (Jackson, 2002).

1.3.1 Röntgenstrahlen-induzierte DNA-Läsionen

In diesem Kapitel wird aufgrund der Relevanz in den experimentellen Untersuchungen besonders auf röntgenstrahleninduzierte und Camptothecin-induzierte Mechanismen von Schäden an der DNA eingegangen.

Ionisierende Strahlen können auf direktem oder indirektem Weg Veränderungen der DNA-Struktur herbeiführen, wobei der indirekte Variante 65 % ausmacht (Alanazi und al., 2023). Die indirekte Wirkung in Zellen erfolgt über Radiolyse von Wasser und führt somit zur Entstehung von reaktiven Hydroxyl-Radikalen, die in Folge ihrer Instabilität und ausgeprägten Reaktionsfreudigkeit weitere Moleküle ihrer Umgebung oxidieren. Daraus resultieren Veränderungen an den DNA-Basen, die zu ESB seltener DSB und veränderten Zuckermolekülen führen. Hierzu besagen Studien, dass ionisierende Strahlen mit geringem linearen Energietransfer (LET), wie zum Beispiel Röntgenstrahlen, pro Gray (Gy) bis zu 1.000 ESB, 40 DSB und 2.700 Basenläsionen verursachen (Ward, 1988). Die Art der Bestrahlung bestimmt mitunter die Art der DNA-Läsion, wobei DSB einen kritischeren Schaden als ESB darstellen, da deren Reparatur komplizierter ist (Ciccia und Elledge, 2010)

1.3.2 Camptothecin-induzierte DNA-Läsionen

Camptothecin (CPT) ist ein pentazyklisches Alkaloid, das erstmals in den mittleren 50er Jahren in den USA aus *Camptotheca acuminata*, einem Baum chinesischen Ursprungs, isoliert wurde (Hevener et al., 2018). Seine zytostatische Wirkung entfaltet es durch die Inhibition des Enzyms Topoisomerase-I (Top1), das vor allem während der DNA-Replikation zur Entspannung von verdrehten DNA-Strängen durch Einzelstrangsnitte zuständig ist. Demnach führt die starre Komplexbildung aus CPT, Top1 und der DNA zu einer dauerhaften Stabilisierung des ESB. Der Reparaturweg für DNA-ESB zählt zu den zentralen Mechanismen der zellulären Antwort auf CPT sowie dessen klinisch eingesetzte Derivate (Pommier et al., 2003; Chatterjee und Walker, 2017). Bleiben ESB unbehandelt, führen sie zum Abbruch der Replikation und zur Bildung von DSB (Pommier et al., 2006; Tomicic und Kaina, 2012). Da die durch CPT verursachte DNA-Schäden hauptsächlich während der Replikation in der S-Phase auftreten, erfolgt ihre Reparatur typischerweise über den Weg der HR. Es wird angenommen, dass die NHEJ vor allem Top1-vermittelte DSB außerhalb der S-Phase behebt (Iyama und Wilson, 2013).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Bestreben nach einem besseren Verständnis für die Funktion, Aktivität und Regulation von Proteinen, die innerhalb des Zellzyklus dem Schutz vor unkontrollierten Zellteilungen dienen, ist ein stets relevantes Thema in der Tumorforschung. Aus diesem Grund möchten wir uns in dieser experimentellen Arbeit näher mit der Charakterisierung des Proteins p21 beschäftigen.

In der Zelllinie HT-1080, welches ursprünglich aus einem unbehandelten menschlichen Fibrosarkom in den 1970er Jahren stammt, wurde bereits in Vorarbeiten des gastgebenden Instituts mit Hilfe der *CRISPR/Cas9*-Methode das Gen für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) mit dem endogenen p21-Gen fusioniert, so dass diese Zelllinie ein fluoreszentes p21-GFP-Protein exprimiert (Abb.4).

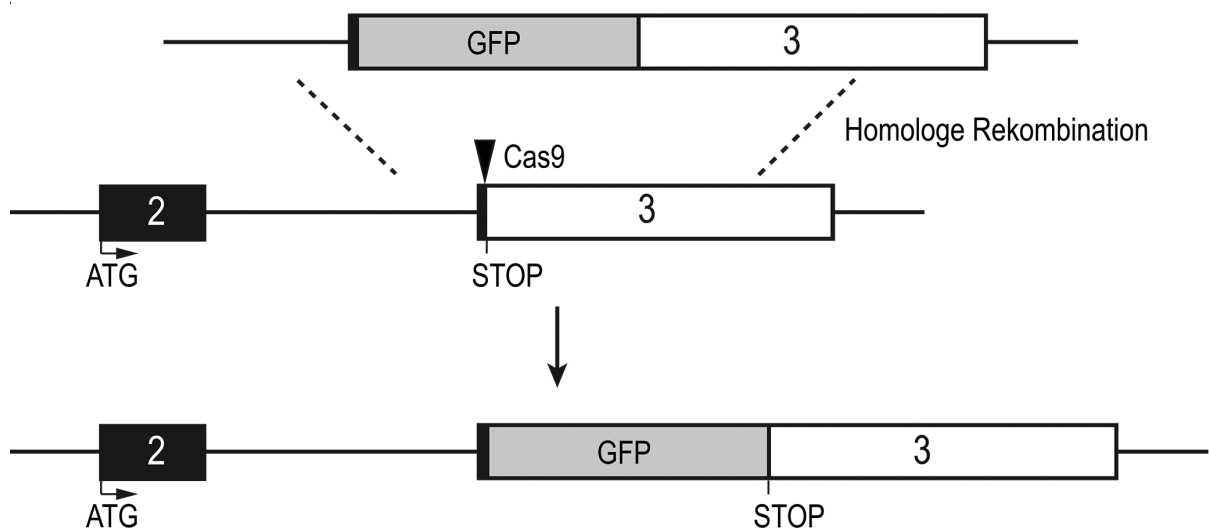


Abb. 4: *CRISPR/Cas9* Exon. Zunächst wurde mittels der *CRISPR/Cas9*-Methode, welche inzwischen häufig ihren Einsatz im *Genome Editing* findet, gezielt ein Schnitt in der DNA an der Stelle des p21-Gens gesetzt. Zur Reparatur dieses DSB wurde als Rekombinationssubstrat zusätzlich das GFP-Gen in die behandelten Zellen eingeschleust. Da flankierend zu der GFP-Sequenz auch die p21-Sequenzen, die rechts und links des DSB vorliegen, in dem Rekombinationssubstrat vorlagen, wurde es in manchen Zellklonen über die zelleigene homologe Rekombination zielgenau an das Ende des p21-Gens integriert. Bei transkriptioneller Induktion wird somit ein p21-GFP-Fusionsprotein exprimiert. Die verwendete Abbildung wurde im Rahmen von Vorarbeiten am gastgebenden Institut erstellt und für diese Dissertation zur Verfügung gestellt. Diese Abbildung ist bislang nicht veröffentlicht worden. Eine ähnliche Darstellung wurden jedoch bereits im Rahmen einer zeitlich folgenden Dissertation am selben Institut publiziert (Büchel, 2022).

Der Nachweis der erfolgreichen Fusion beider Gene erfolgte über eine Western-Blot Analyse (Abb. 5) nachdem zur p21 Induktion sowohl die Wildtyp- als auch die p21-GFP-fusionierte Zelllinie mit Röntgenstrahlen verschiedener Dosis behandelt wurden. Es ist bekannt, dass p21 nach einem DNA-Schaden induziert wird, und dies traf auch auf das Fusionsprotein p21-GFP zu. Mittels Western-Blot ist die Quantifizierung der p21-GFP-Expression jedoch nur bedingt möglich. Des Weiteren wurde in Vorbefunde des Gastlabors eine überraschende Heterogenität der p21-GFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Einige Zellen induzieren sehr schnell p21-GFP, andere im Gegensatz dazu erst nach Tagen und manche Zellen überhaupt nicht. Dies führte zu der Vermutung, dass die Expression von p21 abhängig ist von der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung befunden hat.

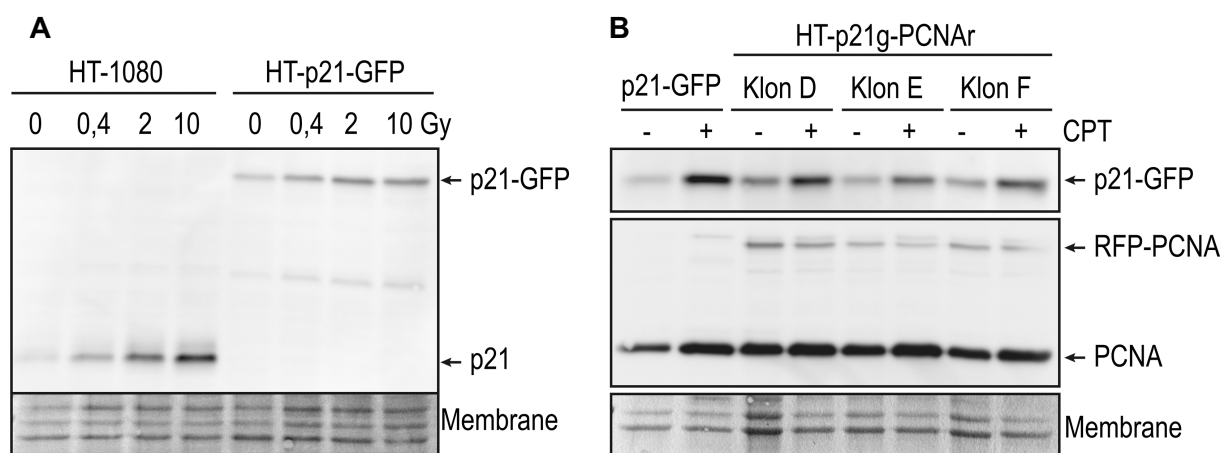


Abb. 5: Western-Blot. (A) Linksseitig ist die Western-Blot Analyse der Wildtypzellen der Zelllinie HT-1080 dargestellt. Die Zellen wurden zusätzlich mit 0,4 Gy, 2 Gy und 10 Gy bestrahlt, um die Expression von p21 zu induzieren. Rechtsseitig ist das Ergebnis der p21-GFP-exprimierenden Zellen abgebildet, die ebenfalls mit Röntgenstrahlen behandelt wurden und p21-GFP-Expression nachweisen. (B) Hier wurde zusätzlich das PCNA mit RFP markiert. Die Bilder stammen aus Vorarbeiten des gastgebenden Institutes und für diese Dissertation zur Verfügung gestellt. Die Abbildung 5 (A) wurde bereits im Rahmen einer zeitlich folgenden Dissertation am selben Institut publiziert (Büchel, 2022).

Die zentralen Zielsetzungen, die somit im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit verfolgt werden, lauten:

1. Quantifizierung und Abhängigkeit der p21-GFP-Expression von der Dosis verschiedener DNA-schädigender Expositionen mittels Durchflusszytometrie
2. Untersuchung der Rolle der Zellzyklusphase vor der DNA-Schädigung bei der Induktion von p21 unter Verwendung von *Live cell imaging*

2 Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinie

Tab. 1: Zelllinie

HT-1080	Humane Fibrosarkom-Zelllinie Gekauft bei DSMZ #DSM ACC 315. Braunschweig Deutschland
H21-856F (HT-p21GFP)	p21 mit GFP und PCNA

2.1.2 Medien

Tab. 2: Medien für die Zellkultur

Medium	Dulbecco's Modified EAGLE Medium (DMEM (1X) + GlutaMAX™-I ([+] 4.5 g/l D-Glucose, [+] Pyruvate) (Gibco, Carlsbad, USA)
Nährmedium für HT-1080	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
(Selektions)Nährmedium für HT-p21GFP	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 µg/ml Puromycin
Einfriermedium	(50 ml) FCS + 10 % DMSO
Medium zum Mikroskopieren (für <i>Live cell imaging</i>)	Leibovitz's L-15 Medium (1X) + GlutaMAX™-I

2.1.3 Lösungen und Reagenzien

Tab. 3: Lösungen und Reagenzien

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Ca ²⁺ -; Mg ²⁺ -frei)	Gibco, Carlsbad, USA
Fetal Bovine Serum (FCS)	Gibco, Carlsbad, USA
Pen Strep (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml)	Gibco, Carlsbad, USA
0,05 % Trypsin-EDTA (1X)	Gibco, Carlsbad, USA
Puromycin	Sigma, St. Louis, USA
Dimethyl sulfoxide	Sigma, St. Louis USA

2.2 Weitere Materialien

Tab. 4. weitere Materialien

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

2.3 Chemikalien

Tab. 5: Chemikalien

(S)-(+)-Camptothecin approx. 95 % HPLC	Sigma, St. Louis, USA
Trypan Blue stain 0.4 %	Invitrogen, Eugene, USA

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien

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
Countess™ cell counting chamber slide	Invitrogen, Carlsbad, USA
Parafilm M	Bemis, Neenah, USA
Nunc™ EasYFlask™ 25 cm ² Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific, Waltham, USA
Nunc™ EasYFlask™ 75 cm ² Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific, Waltham, USA
μ-Slide 2 Well Glass Bottom	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
Kryoröhrchen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Deckel für Kryoröhrchen	Brand, Wertheim, Deutschland
Nitrilhandschuhe XS	Ansell, Richmond, Australia
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tube 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 200 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 10/20 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Falcon FACS Röhrchen	Corning, New York, USA
Pipettenspitzen 0,1-20 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Immersionsöl 518 F	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

2.5 Geräte

Tab. 7: Geräte

63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Autoklav V150	Systec, Wettenberg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Heraecell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Countess™ automated cell counter	Invitrogen, Carlsbad, USA
Einfrierbehälter Cryo 1 °C Freezing Container	Nalge Nunc, Rochester, New York, USA
Sterilwerkbank Heraesafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
EpiFluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
inverses Mikroskop Wilovert S	Hund Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
Licht	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland
pE-100 Licht	CoolLED, Andover, UK
RT KE/SE Power Supply	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland
ebq 100 (elektronisches Vorschaltgerät)	Isolated
Durchflusszytometer BD FACSCanto™II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Wasserbad WB20	Medingen, Dresden, Deutschland
Bestrahlungsgerät Gulmay RS225	Gulmay Limited, Surrey, UK
Accu-jet pro Pipette Controller	Brand, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Pipetten	
Konfokales Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil Ph3	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipetman	Gilson, Middleton, USA
Rotor FA 45-30-11 für 1,5-2 ml Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubator XL-3	PeCon, Erbach, Deutschland

2.6 Software

Tab. 8: Software

Adobe Photoshop CS4	Adobe, San Jose, USA
Cytometer Status	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
BD FACSDiva Software	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
MetaMorph V6.3r6	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
GraphPad PrismR 4.0a	GraphPad Software, San Diego, USA
Office	Microsoft, Redmont, USA
LSM Image Browser	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Adobe Illustrator CS6	Adobe, San Jose, USA
Zeiss LSM 510	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

3 Methoden

Im folgenden Kapitel wird im Detail erklärt, wie die Kultivierung, die Vorbereitung und das Aussäen der Zellen in eine für die inverse Mikroskopie geeignete Kulturschale mit einem Wachstumsareal von 0,0012 cm² durchgeführt wird. Die dabei verwendeten Medien und Reagenzien sind in Kapitel 2 Material aufgelistet. Aufgrund der kommerziell erwerblichen Zelllinie der DSMZ ist kein Ethikvotum für die vorliegende experimentelle Arbeit notwendig. Somit ist kein Aktenzeichen der Ethikkommission zu dieser Dissertation vorhanden.

3.1 Zellkultur

Die Durchführung der Zellkulturarbeiten erfolgte an einer Sterilwerkbank. Mittels eines inversen Mikroskops (Wilovert S, Hund Wetzlar) wurde die Morphologie und der Wachstumszustand der Zellen beurteilt.

3.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung der HT-p21GFP-Zellen erfolgte mit einem supplementierten Selektionsmedium (s. 2.1.2, Tab. 2) in einem Brutschrank bei 37 °C und 10 % CO₂. Die Zellen wurden in regelmäßigen Zeitabständen dreimal in der Woche in neue Kulturflaschen überführt. Der Vorgang der Passage läuft wie folgt ab: das Waschen der Zellen mit PBS, das Ablösen vom *Monolayer* mit 0,5 % Trypsin-EDTA und die anschließende Resuspension der Zellen mit Medium in eine neue Kulturflasche.

Die Kultivierung der HT-1080 fand in supplementierten Nährmedium (s. 2.1.2, Tab. 2) unter den gleichen Bedingungen wie bei den HT-p21GFP Zellen statt.

3.1.2 Kryokonservierung

Um bei laufenden Experimenten auf Zellen mit einer niedrigen Passagezahl zurückgreifen zu können, wurden ein Teil der Zellen zur Dauerlagerung im flüssigen Stickstofftank und in einer Tiefkühltruhe eingefroren.

Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 0,5 % Trypsin-EDTA trypsiniert, anschließend mit 7 ml DMEM resuspendiert und in ein 15 ml *Falcon Tube* überführt. Die Lösung wurde für 3 min bei 1200 rpm mit Gegengewicht zentrifugiert. Nach dem

Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet aufgeschüttet und mit 6 ml Einfriermedium resuspendiert, welches sich aus 50 ml FCS und 10 % DMSO zusammensetzt. Es wurde jeweils 1 ml der Suspension in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden danach in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter aufbewahrt, welches ein schonungsvolles Einfrieren sicherstellt und in einer Tiefkühltruhe bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Auftauen

Der Vorgang des Auftauens der eingefrorenen Zellen sollte so schnell wie möglich erfolgen, um eine schonende Revitalisierung der Zellen zu gewährleisten und die toxische Wirkung von DMSO zu verhindern. DMSO dient in der Zellkultur als Gefrierschutzmittel und verhindert die Bildung von Eiskristallen, die ansonsten zur Zerstörung der Zellorganellen und schließlich zum Absterben der Zellen führen kann. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen, welches zuvor in der Tiefkühltruhe bzw. in flüssigem Stickstofftank aufbewahrt wurde, in einem Wasserbad bei 37 °C für wenige Minuten erwärmt. Nach Verflüssigung erfolgte die zügige Zugabe von 8 ml NM bevor die Lösung bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert wurde. Der dadurch entstandene Überstand wurde abpipettiert, das Sediment aufgeschüttet, mit 5 ml NM resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte am *CountessTM automated cell counter*. Zunächst wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gemischt, welches zuvor für wenige Sekunden zentrifugiert wurde. Anschließend wurden 10 µl der Mischung in eine Kammer des *CountessTM cell counting slide* pipettiert, in den Zellzähler geschoben und ausgewertet. In lebenden Zellen wird Trypanblau nicht aufgenommen. Jedoch kann der Farbstoff in das Zytoplasma von toten Zellen gelangen und diese dunkelblau färben, wenn diese eine defekte Plasmamembran aufweisen. Somit kann der Zellzahlzähler lebende von abgestorbenen Zellen differenzieren.

3.2 Ermittlung der mittleren Fluoreszenz nach Röntgenbestrahlung

3.2.1 Präparation der Zellen für die Bestrahlung

Ein Tag vor Beginn der Präparation wurde eine Verdünnung der Zellen von 3:5 hergestellt, um frische und konfluente Zellen für den Versuch sicherzustellen. Am Tag der Präparation wurden insgesamt acht T-25 Kulturflaschen (Nunc™ EasYFlask™ 25 cm² Nunclon™ Delta Surface) für die durchflusszytometrische Messung passagiert, wobei zwei davon als Kontrolle dienten und nicht bestrahlt wurden. Die jeweiligen Behandlungsdosen und die zugehörige Verdünnung sind in der untenstehenden Tabelle (Tab. 9) aufgelistet. Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass die Zellen nach drei Tagen Inkubationszeit konfluent gewachsen sind. Da unbehandelte Zellkulturen deutlich schneller wachsen als Behandelte, wurde eine höhere Verdünnung für diese festgelegt. Die Zellkulturen wurden nach Passage für einen Tag inkubiert, bevor sie bestrahlt wurden.

Tab. 9: Durchflusszytometrie Röntgen, Verdünnung

unbehandelt:	Verdünnung:
HT-1080, Wildtyp	1:20
HT-p21GFP	1:11
behandelt (HT-p21GFP) – Röntgendosis:	Verdünnung:
0,4 Gy	1:6
2 Gy	1:6
4 Gy	1:6
7 Gy	1:5
10 Gy	1:5
20 Gy	1:5

3.2.2 Bestrahlung am Gulmay RS225

Die Bestrahlung der Zellen in Kulturflaschen erfolgte am *Bestrahlungsgerät RS225 (medical research system)* von der Firma *Gulmay*, das vom Labor für Molekulare Radioonkologie der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurde. Die Einstellungen sowie Bestrahlungszeiten der zugehörigen Röntgendosen sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 10) aufgeführt.

Tab. 10: Durchflusszytometrie Röntgendosis

Röntgendosis in Gy	Bestrahlungsdauer	kV	mA
0,4	0 min 33 s	150	15
2	2 min 47 s	150	15
4	5 min 33 s	150	15
7	9 min 43 s	150	15
10	13 min 53 s	150	15
20	19 min 42 s	175	15

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 48 h im Brutkasten bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert.

3.2.3 Präparation der Zellen für die durchflusszytometrische Messung

Nach 48-stündiger Inkubation wurde zunächst die Konfluenz aller acht Zellkulturen mittels des inversen Mikroskops erfasst. Danach wurden die Zellen wie bei der Erhaltungskultur, mit 5 ml PBS gewaschen und in 0,5 ml 0,5 % Trypsin-EDTA trypsinisiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml NM aufgenommen und in ein 15 ml *Falcon Tube* überführt. Die Suspension wurde für 3 min bei 1200 rpm mit Gegengewicht zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet aufgeschüttet und in PBS gelöst. Je nach Wachstumsdichte wurden die Zellen entweder in mehr oder weniger Puffer resuspendiert und in einzelnen Röhrchen abgefüllt.

3.2.4 Durchflusszytometrische Messung nach Röntgenbestrahlung

Zur Ermittlung der mittleren Fluoreszenz der unbehandelten und behandelten Zellen wurde mittels des *FACSCantoTMII* der Firma *Becton Dickinson* eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Durchflusszytometrische Analysen basieren auf Messungen optischer Signale wie Lichtstreuung und Fluoreszenz, während Zellen an einer Lichtquelle vorbeigeleitet werden. Informationen über die Form, Größe, Oberfläche und Granularität der Zellen können über die Streuung des Lichtes erhoben werden. Die Fluoreszenz wird nach Absorption energiereicher Strahlung der Moleküle durch das rasche Abklingen der Lichtemission definiert.

Da p21 in unseren Zellen mit GFP markiert wurden, ist es möglich die mittlere Fluoreszenz einer Probe durch die durchflusszytometrische Messung zu erheben. Die Standardeinstellung wurde so gewählt, dass die mittlere Fluoreszenz der p21-GFP Expression gegen die Anzahl (*Count*) aufgetragen wurde. Bei der Datenakquisition wurde, um einen besseren Vergleich zwischen den Ergebnissen ziehen zu können, die Zahl der gewerteten Ereignisse auf 30.000 festgelegt. Die Abgrenzung zwischen nicht-grünfluoreszierenden und grünfluoreszierenden Zellen wurde beim ersten Versuch mit Hilfe von Wildtypzellen bestimmt und für alle weiteren Versuche übernommen. Die einzelnen Proben wurden vor jeder Messung mit einem Vortex aufgemischt.

3.3 Ermittlung der mittleren Fluoreszenz nach CPT-Behandlung

3.3.1 Präparation der Zellen für die CPT-Behandlung

Bei diesem Versuch wurden ebenfalls ein Tag vor der Präparation eine T-25 Kulturflasche im Verhältnis von 3:5 vorbereitet. Insgesamt wurden sieben T-25 Kulturflaschen mit verschiedenen Verdünnungen (Tab. 11) passagiert, wobei fünf davon zur CPT-Behandlung und zwei zur Kontrolle dienten. Da die Behandlung der Zellen einen Tag nach der Passage erfolgte, wurden sie in der Zwischenzeit inkubiert.

Tab. 11: Durchflusszytometrie CPT, Verdünnung

unbehandelt:	Verdünnung:
HT-1080, Wildtyp	1:20
HT-p21GFP	1:11
behandelt (HT-p21GFP) – CPT-Dosis in μM:	Verdünnung:
0,05	1:8
0,1	1:7
0,4	1:7
0,7	1:6
1	1:6

3.3.2 Behandlung mit CPT

Da die vorhandene Ausgangslösung von CPT 20 mM betrug, wurde zunächst eine Vorverdünnung von 1:1.000 (3 µl CPT in 3000 µl NM) hergestellt. Aus dieser Vorverdünnung wurden im zweiten Schritt weitere Verdünnungen mit den gewünschten Zieldosen von CPT hergestellt. Das Verdünnungsschema ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (Tab. 12).

Tab. 12: Durchflusszytometrie CPT-Dosis

CPT-Zieldosis in µM	µl aus der Vorverdünnung	NM in µl
1	250	4750
0,7	175	4825
0,4	100	4900
0,1	25	4975
0,05	12,5	4987,5

Im nächsten Schritt wurde das NM der fünf zu behandelten Kulturflaschen abgesaugt und das neue mit CPT zugesetzte NM hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h inkubiert. Um das toxische NM zu entfernen, wurden die Kulturen mit PBS gewaschen und frisches NM ohne CPT hinzugefügt. Nach der Behandlung wurden die Zellen ebenfalls für 48 h bei 37 °C und 10 % CO₂ im Brutkasten inkubiert.

3.3.3 Präparation der Zellen für die Durchflusszytometrie

Der Vorgang der Präparation (s. Kapitel 3.2.3) wurde für die CPT-behandelten Zellen unverändert übernommen.

3.3.4 Durchflusszytometrische Messung nach CPT-Behandlung

Die durchflusszytometrische Messung inklusive der Einstellung wurde eins zu eins für die CPT-behandelten Zellen übernommen (s. Kapitel 3.2.4).

3.4 48 h Serie / *Live cell imaging*

Unter *Live cell imaging* versteht man das Mikroskopieren an lebenden Zellen. Da lebende Organismen, anders als fixierte Präparate, dynamische Veränderungen aufweisen und in der Lage sind sich zu bewegen, ist eine Kulturschale mit einem kleinen Wachstumsareal besonders wichtig für Beobachtungen von Zellen über einen längeren Zeitraum. So kann auch bei Mehrfachvergrößerung sichergestellt werden, dass lebende Zellen nicht aus dem Beobachtungsfeld wandern.

Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt: mit behandelten Zellkulturen bei zwei verschiedenen Röntgendosen und einmal mit Unbehandelten als Kontrolle.

3.4.1 Aussaat von Zellen auf *micro-Insert 4 Well FulTrac*

Micro-Insert 4 Well Fultrac Kulturschalen (*ibidi*, Martinsried) bestehen aus einer äußeren und inneren Schale. In der inneren Schale befinden sich vier konische Vertiefungen (*Well*) mit jeweils einem Wachstumsareal von $0,0012 \text{ cm}^2$ (s. Abb. 6). Dadurch eignen sie sich besonders gut für *Live cell imaging* Untersuchungen.

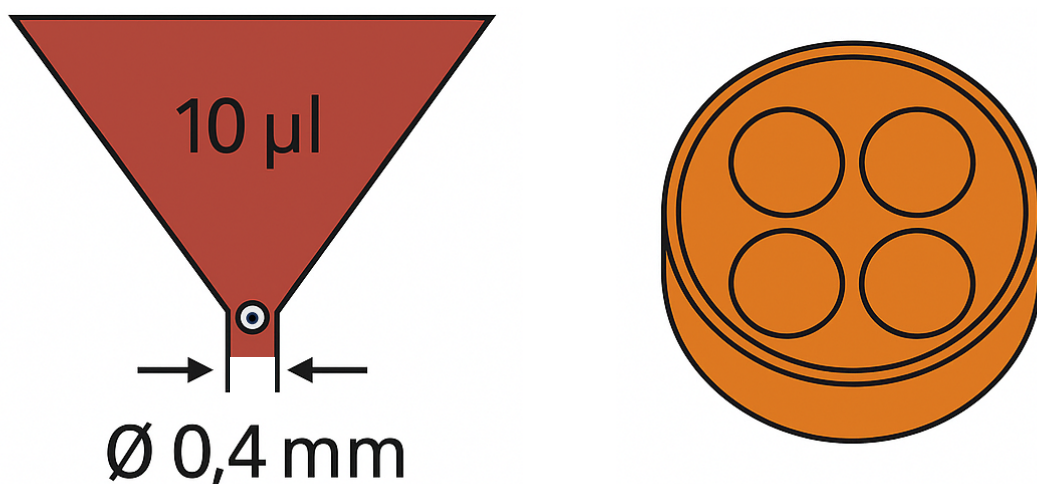


Abb. 6: Aufbau des *micro-Insert 4 Well FulTrac*. Auf der linken Seite ist eine vereinfachte Skizze des Slides dargestellt. Die rechte Seite zeigt die Seiteneinsicht eines konischen Wells. Eigene Illustration in Anlehnung an *ibidi, Instructions micro-Insert 4 Well FulTrac Version 1.0* (09.05.2016).

Vor Aussaat der Zellen auf die Kulturschalen, wurden alle vier Vertiefungen zuerst mit NM vorgespült. Wie vor jedem Versuch wurden die Zellen der HT-p21GFP Reihe ein Tag zuvor im Verhältnis von 3:5 umgesetzt. Aus der neuen Passage wurde am nächsten Tag verschiedene Verdünnungen ausgesät (s. Tab. 13). Die Verdünnungen

wurden auf das Volumen der innere Schale (150 µl, 0,78 cm²) berechnet. Um den Boden der konisch geformten Wells zu erreichen und Luftbläschen zu vermeiden, wurden zum Pipettieren der Zellsuspension sehr dünne für 01,-20 µl geeignete Pipettenspitzen (Brand, Wertheim) verwendet.

Zunächst wurden 10 µl von den 150 µl der gleichen Verdünnung jeweils in die vier Wells pipettiert. Nachdem mit dem Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar) sichergestellt wurde, dass sich keine Luftblasen auf dem Wachstumsareal befinden, wurden die restlichen 110 µl in die innere Schale zugegeben. Es erfolgte eine Inkubationszeit von einer Stunde bevor die äußere Schale mit 2 ml NM gefüllt wurde.

Tab. 13: *Live cell imaging* – Verdünnung

Verdünnungen	µl Zellsuspension in 150 µl NM
1:40	3,9
1:50	3,1
1:60	2,6
1:80	1,95

3.4.2 Induktion von DNA-Schädigungen

Am Tag der Bestrahlung wurde zunächst das gesamte NM vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und mit *Leibovitz's L-15 Medium* (s. Kap 2.1.2) ersetzt. *Leibovitz's L-15 Medium* eignet sich sehr gut für *Live cell imaging*, da es den Zellwachstum CO₂-unabhängig fördert. Die Bestrahlung aller ausgesäten Verdünnungen erfolgte am Gulmay RS225 (s. Tab. 14).

Tab. 14: *Live cell imaging* – Röntgendosis

Röntgendosis	Bestrahlungsdauer	kV	mA
5 Gy	6 min 57 s	150	15
10 Gy	13 min 53 s	150	15

3.4.3 *Live cell imaging* am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop

Für das *Live cell imaging* wurden die Zellen direkt nach der Bestrahlung in das Labor des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie transportiert. Die Aufnahmen wurden an einem Konfokalen Fluoreszenzmikroskop (*Anxiovert 200M*, Zeiss, Oberkochen) mit integriertem Inkubator (*Incubator XL-3*, Pecon, Erbach) erstellt, der eine geeignete

Umgebungstemperatur bei 37 °C für die lebende Zellen und somit das Fortschreiten des Zellwachstums sicherstellt.

Es handelt sich beim verwendeten Konfokalen Fluoreszenzmikroskop um ein spezielles Verfahren, bei dem das gesamte Präparat mit Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen angeregt wird (s. Tab. 15). Speziell das GFP, welches in unseren Zellen an p21 gebunden vorliegt, absorbiert das vom blauen Laser stammende Anregungslicht, welches eine Wellenlänge von 488 nm hat. Auf atomarer Ebene werden dadurch instabile Elektronen der fluoreszierenden Moleküle auf einen energiereicheren Zustand angehoben. Bei Abfall der Elektronen in ihren ursprünglichen Zustand, geben sie das langwellige Emissionslicht ab, welches bei GFP grün fluoresziert. Über einen Emissionsfilter wird das Anregungslicht abgefangen, sodass nur das entstandene Emissionslicht wahrgenommen wird. Ein weiterer Vorteil dieses Gerätes liegt in der Gewährleistung von qualitativ sehr hochwertigen Aufnahmen.

Nach Beurteilung der Zelldichte und -morphologie der verschiedenen Präparate unter dem Konfokalen Fluoreszenzmikroskop, wurde die bestgeeignete ausgesäte Verdünnung für die Beobachtung ausgewählt. Da es sich hierbei um lebende Zellen handelte, die sich im Laufe der Zeit weitervermehrten, war es wichtig auf genügend Abstand zwischen den einzelnen Zellen zu achten. Zudem sollte die Kulturschale nicht zu dicht bewachsen sein. Das verwendete Programm und die Einstellungen sind in der nachfolgenden Tabelle (s. Tab. 15) aufgeführt.

Tab. 15: Live cell imaging – Konfokales Fluoreszenzmikroskop

Programm	Zeiss LSM510
Laser	Argon (458, 477, 488, 514 nm) HeNe1 (543 nm)
Objektiv	Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil Ph3
Pixel	2048 x 2048
Aufnahmegeschwindigkeit	1 Aufnahme/15 min
Scangeschwindigkeit	5 Pixeldauer: 3,20 µs Scandauer: 1 min 2 sec

Es wurden insgesamt über 48 h Aufnahmen pro Versuchsdurchgang gemacht. Die abgespeicherten Bilder wurden über das zugehörige Programm *LSM Image Browser* (Zeiss, Oberkochen) geöffnet und ausgewertet.

3.5 Aufnahmen der CPT-behandelten Zellen

Der Versuchsaufbau für die einmaligen Aufnahmen von CPT-behandelten Zellen am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop gleicht dem der Ermittlung der mittleren Fluoreszenz von CPT-behandelten Zellen (s. Kapitel 3.2.2). Jedoch mit dem Unterschied, dass die Zellen nicht in T-25 Kulturfラスchen, sondern auf *μ -Slide 2 Well Glass Bottom* (ibidi, Martinsried) mit einem Wachstumsareal von 5,1 cm² in entsprechender Verdünnung ausgesät wurden.

3.5.1 Präparation der Zellen

Aus einer konfluenten Kulturfラスche mit einer ursprünglichen Verdünnung von 3:5 wurden Zellen in zwei *μ -Slides 2 Well Glass Bottom* passagiert. Insgesamt wurden drei Kulturen angelegt, wobei eine davon wieder zur Kontrolle dient. Die jeweiligen Verdünnungen sind in der nachfolgenden Tabelle (s. Tab. 16) aufgelistet.

Tab. 16: CPT-Verdünnung

unbehandelt:	Verdünnung:
HT-p21GFP	1:11
behandelt (HT-p21GFP) – CPT-Dosis in μ M:	Verdünnung:
0,1	1:7
0,4	1:7

Anschließend wurden die Zellen für einen Tag inkubiert.

3.5.2 CPT-Behandlung

Aus der CPT-Ausgangslösung (20 mM) wurde zunächst eine Vorverdünnung im Verhältnis von 1:1000 (1 μ l CPT in 1000 μ l NM) vorbereitet. Im nächsten Schritt wurde aus der Vorverdünnung eine definierte Menge entnommen, um die gewünschte CPT-Zieldosen herzustellen (s. Tab. 17).

Im Anschluss wurde das alte NM der drei Wells abgesaugt und mit dem CPT zugesetzten NM ersetzt. Im Inkubator wurden die Zellen für drei Stunden mit dem toxischen NM behandelt. Nach der Behandlung wurde das NM erneut vollständig entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem NM ohne CPT inkubiert. Die Zellen hierbei wieder für 48 h bei 37 °C und 10 % CO₂ in den Brutkasten.

Tab. 17: CPT-Dosis

CPT-Zieldosis in µM	µl aus der Vorverdünnung	NM in µl
0,4	20	1480
0,1	5	1495

3.5.3 Aufnahmen am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop

Für die Aufnahmen am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen ebenfalls in das Labor des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie gebracht. Die Einstellungen gleichen der im Kapitel 3.3.3 *Live cell imaging am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop* aufgeführten Angaben. Jedoch wurde für die Aufnahmen zusätzlich das 63x/1,35 NA Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Oberkochen) verwendet sowie die Laserstärke auf die höchste Stufe gestellt, da die Zellen nur einmalig und nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden. Es wurden für jeweils alle drei Wells an mehreren Stellen zufällige Aufnahmen gemacht, um repräsentative und objektive Ergebnisse zu gewinnen. Die Bilder wurden im Anschluss über *LSM Image Browser* geöffnet und ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Durchflusszytometrische Analyse

Es ist bekannt und in den Vorversuchen des Gastlabors zu sehen, dass bei steigender Strahlendosis die Menge an exprimierten p21-Protein auf Western-Blots zunimmt. Da wir bereits wissen, dass p21 in diversen Zellen unterschiedlich stark exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob alle Zellen im Mittel dosisabhängig p21 exprimieren oder nur einige Zellen bei steigender Dosis die p21-GFP-Expression erhöhen. Daher wurde die Methode der Durchflusszytometrie angewandt, um die graduelle Induktion der p21-GFP-Expression in den Zellen zu quantifizieren, die in unseren Versuchen entweder durch Röntgenstrahlen oder einer CPT-Behandlung geschädigt wurden.

In Abbildung 7 zeigen die ersten Reihen eine Abgrenzung zwischen nicht-grünfluoreszierenden (rot) und grünfluoreszierenden (grün) Zellen, die bei der ersten Messung mit Hilfe von HT-1080 Wildtypzellen festgelegt und für alle weitere Versuche übernommen wurde. Zu erkennen ist eine sehr geringe Eigenfluoreszenz von Proteinen der HT-1080 Wildtypzellen, die wir als Hintergrund definiert haben, da Wildtypzellen kein GFP enthalten. Die Darstellung der Grafik wurde so gewählt, dass auf der x-Achse logarithmisch die mittlere Fluoreszenz der p21-GFP Expression gegen die Anzahl (Count) der Zellen auf der y-Achse aufgetragen ist. Es ist zu beachten, dass die Skalierung der y-Achse nicht einheitlich ist. Sie wurde aus Gründen der einheitlichen Vergleichbarkeit so gewählt, dass der maximale Ausschlag die Skalierung der y-Achse bestimmt. Da sich die Verteilung der grünfluoreszierenden Zellen bei zunehmender Zellschädigung weiter verbreitert, nimmt bei gleichbleibender Zellzahl naturgemäß der Maximalausschlag der mittleren Fluoreszenz immer weiter ab. In den zweiten Reihen sind die Ergebnisse der unbehandelten, mit GFP markierten p21-Zellen (HT-p21GFP) abgebildet. Je weiter abwärts die Reihen, desto höher die Dosis der Röntgenstrahlen bzw. der CPT-Behandlung. Pro Versuch wurden insgesamt 30.000 Ereignisse ausgewertet. Es konnte festgestellt werden, dass bei einer Erhöhung der Röntgendosis nicht nur insgesamt die Anzahl der grünen Zellen stieg, sondern auch der Hauptpeak. Dies bedeutet somit, dass die mittlere Fluoreszenzintensität deutlich höher lag als bei den unbehandelten Kontrollproben (Abb. 7 A). Im Gegensatz dazu ging eine Zunahme der CPT-Dosis nicht mit einer Rechtsverschiebung des Hauptpeaks einher (Abb. 7 B). Stattdessen war ein 2. Peak in den grün-fluoreszierenden Zellen festzustellen. Insgesamt war dennoch die mittlere Fluoreszenz im Unterschied zu den unbehandelten Zellen erhöht.

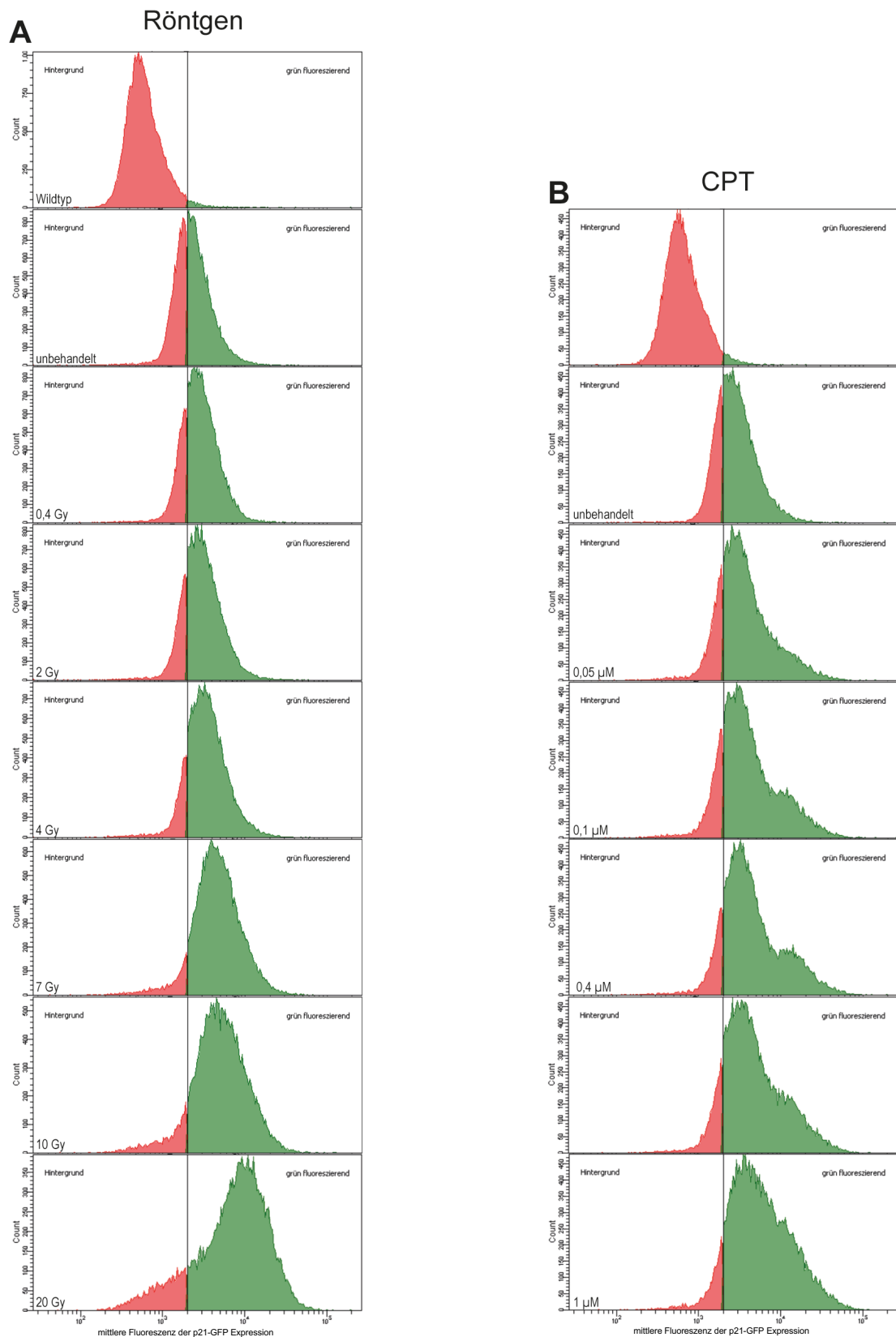


Abb. 7: durchflusszytometrische Analyse. Die Darstellung zeigt ein repräsentatives Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse bezogen auf die mittlere Fluoreszenz der p21-GFP-Expression mit Röntgenstrahlen (A) und CPT (B) behandelten Zellen. Je höher die Dosis der Röntgenstrahlen gewählt wurde, desto mehr grüne Zellen mit vermehrter p21-GFP-Expression (= Rechtsverschiebung des Hauptpeaks) konnten vermerkt werden. Mit Zunahme der CPT-Dosis, steigt auch insgesamt die mittlere Fluoreszenz mit Bildung eines 2. Peaks. Die Y-Achse wird durch den jeweils maximalen Ausschlag skaliert, der wegen der breiter werdenden Fluoreszenzverteilung bei stärkerer Zellschädigung naturgemäß abnimmt.

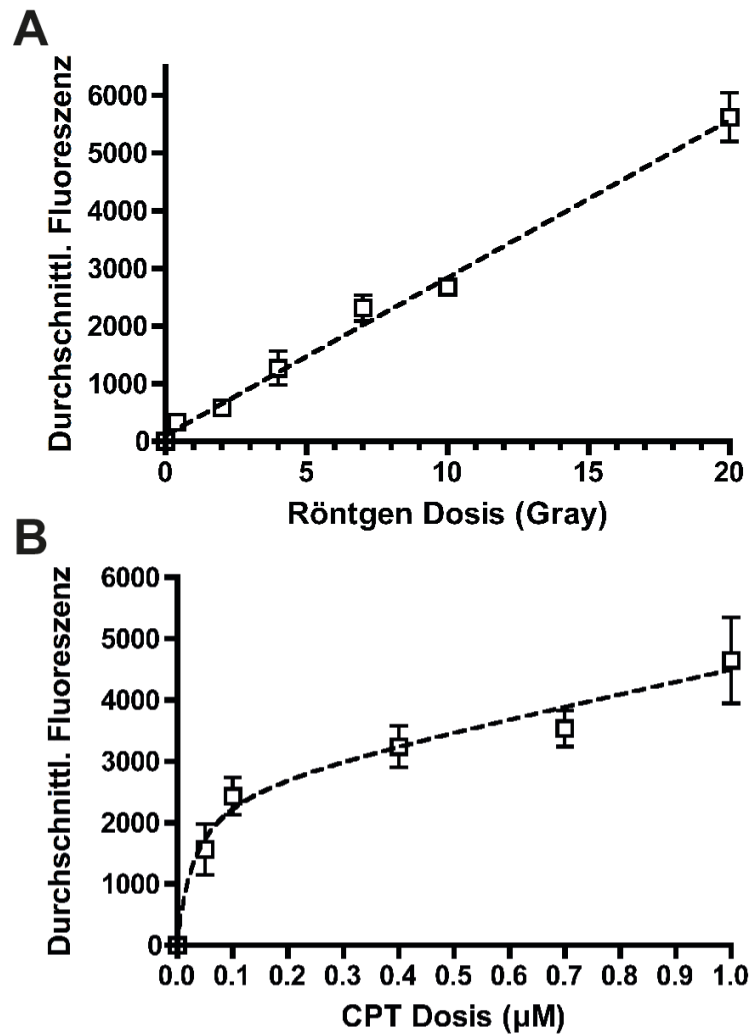


Abb. 8: Dosis-Wirkungs-Kurven der p21-GFP-Induktion. Dargestellt sind alle bei der Durchflusszytometrie erhobenen Werte der mittleren Fluoreszenz, aufgetragen gegen die Dosis der Röntgenstrahlen (A) und der CPT-Dosis (B). Graph (A) beschreibt die lineare und Graph (B) die asymptotische Zunahme der durchschnittlichen Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Behandlungsdosis. Zur Ermittlung dieser Werte erfolgten insgesamt an bestrahlten Zellkulturen zehn und an CPT-behandelten Zellkulturen vier unabhängige Versuchsdurchgänge.

Die im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen erhobenen Werte wurden grafisch aufbereitet, indem die durchschnittliche p21-GFP-Fluoreszenz gegen die applizierten Dosen von Röntgenstrahlen bzw. CPT aufgetragen wurde (Abb. 8). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dabei die Fluoreszenzwerte der unbehandelten Kontrollgruppe von den jeweiligen Messwerten subtrahiert, sodass beide Graphen im Nullpunkt beginnen.

Bei den mit Röntgenstrahlen behandelten Zellen zeigte sich eine lineare Zunahme der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Mit steigender Dosis nahm die p21-GFP-Expression signifikant zu ($p\text{-Wert} < 0,0001$). Dieses Ergebnis korreliert mit der Erwartung einer dosisproportionalen Aktivierung der DNA-Schadensantwort. Entsprechend konnte in den Histogrammen der durchflusszytometrischen Analyse eine deutliche Rechtsverschiebung des Hauptpeaks (Abb. 7 A) beobachtet werden, was eine zunehmende Zahl p21-GFP-exprimierender Zellen belegt.

Im Gegensatz zu den röntgenbestrahlten Zellen zeigte sich bei den CPT-behandelten Zellen eine andere Dosis-Wirkungs-Kurve der p21-GFP-Induktion. Auch hier nahm die durchschnittliche Fluoreszenz mit steigender Konzentration zu, jedoch nicht linear. Vielmehr zeigte sich eine asymptotische Sättigungskurve: Bereits bei niedrigen Konzentrationen ($0,1 - 0,2 \mu\text{M}$) war ein starker Anstieg der p21-GFP-Expression zu verzeichnen, während sich die Werte bei höheren Konzentrationen ($\geq 0,5 \mu\text{M}$) graduell steigerten. In den Histogrammen war keine kontinuierliche Rechtsverschiebung des Hauptpeaks wie bei den röntgenbestrahlten Zellen zu erkennen, sondern vielmehr eine biphasische Verteilung mit Auftreten eines zweiten Peaks (Abb. 7).

Die Durchflusszytometrie zeigte eine lineare Zunahme der p21-GFP-Expression nach Röntgenbestrahlung, während die Behandlung mit CPT eine asymptotische Zunahme der p21-GFP-Expression mit biphasischer Zellantwort hervorruft. Diese Ergebnisse unterstreichen die unterschiedliche Natur und Dynamik der p21-GFP-induzierenden Wirkung von Röntgenstrahlen und CPT und weisen auf divergente Mechanismen der zellulären Schadensantwort hin.

4.2 *Live cell imaging*: Zellzyklusphasen

In den Vorversuchen des Gastlabors sowie in den durchflusszytometrischen Analysen konnte die Ungleichmäßigkeit der Expression des markierten Tumorsuppressors p21-GFP in den Zellen festgestellt werden. Einige Zellen zeigten zwei Tage nach der DNA-Schädigung durch Röntgenbestrahlung eine sehr intensive Grünfärbung, andere wiederum nur eine schwache bis keine Anfärbung. Somit stellte sich die Frage, wovon die verstärkte Induktion von p21-GFP in einigen, aber nicht allen Zellen abhängig ist.

Eine denkbare Theorie könnte die Abhängigkeit der p21-Expression von der jeweiligen Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Beschädigung sein. Im weiteren Sinne kann die Zellzyklusphase zum Zeitpunkt des induzierten DNA-Schadens bei der Hochregulation von p21 eine Rolle spielen. Um diese Frage zu klären, eignet sich insbesondere eine *Live cell imaging* Betrachtung mit Hilfe des Konfokalen Fluoreszenzmikroskops, da sich hiermit Zellen auf mikroskopischer Ebene einzeln visualisieren und über einen längeren Zeitraum beobachten lassen.

Zur genaueren Untersuchung und Beantwortung der aufgeworfenen Forschungsfrage eignen sich die HT-p21GFP Zellen in Kombination mit dem Konfokalen Fluoreszenzmikroskop besonders gut. Mit dieser Methode lassen sich nämlich nicht nur grün fluoreszierende p21-exprimierende Zellen, sondern auch einzelne Zellzyklusphasen im Detail beobachten. Da die Zellen zusätzlich den Zellzyklusmarker PCNA als rot fluoreszierendes Fusionsprotein RFP-PCNA exprimieren, ist es möglich anhand des Verteilungsmusters von PCNA (Celis und Celis, 1985) direkt nach der Bestrahlung bzw. am Ende der zweitägigen Aufnahmeserie, die Zellzyklusphasen zu bestimmen (Abb. 9). In der G1-Phase ist lediglich ein schwaches RFP-Signal nachweisbar. Infolge des kernmembranbedingten Umbaus während der Mitose ist PCNA in dieser Phase neben dem Zellkern auch in geringem Umfang im Zytoplasma detektierbar. Mit Eintritt in die frühe S-Phase steigt die PCNA-Expression deutlich an, wobei sich im Zellkern ein charakteristisches, granuläres Verteilungsmuster ausbildet, das die Nukleoli ausspart. In der mittleren S-Phase verstärkt sich die Signalintensität weiter, und der Schwerpunkt der PCNA-Verteilung verlagert sich zunehmend in Richtung der Kernperipherie. In der späten S-Phase erfolgt eine erneute Umorganisation der PCNA-Lokalisation mit einer Konzentration im Bereich der Nukleoli. Dabei entstehen punktförmige Strukturen durch lokale Anreicherungen von RFP-PCNA, die als sogenannte *replication factories* bezeichnet werden (Leonhardt et al., 2000). Im weiteren Verlauf nimmt die Anzahl dieser Replikationszentren kontinuierlich ab, während ihre Größe zunimmt. Mit dem Übergang in die G2-Phase sowie während der Mitose verschwinden die *replication factories* vollständig, und PCNA ist nur noch als schwaches diffuses Signal nachweisbar.

Mit den p21-GFP-exprimierenden Zellen wurden Zellkulturen in speziellen Kulturschalen angelegt (s. Kapitel 3.4.1), die entweder mit 5 oder 10 Gy bestrahlt und anschließend über 48 h mittels des Inkubator-Fluoreszenzmikroskop beobachtet

wurden. Aus der abgespeicherten Bildserie wurde die p21-GFP-Expression der bestrahlten Zellen bestimmt.

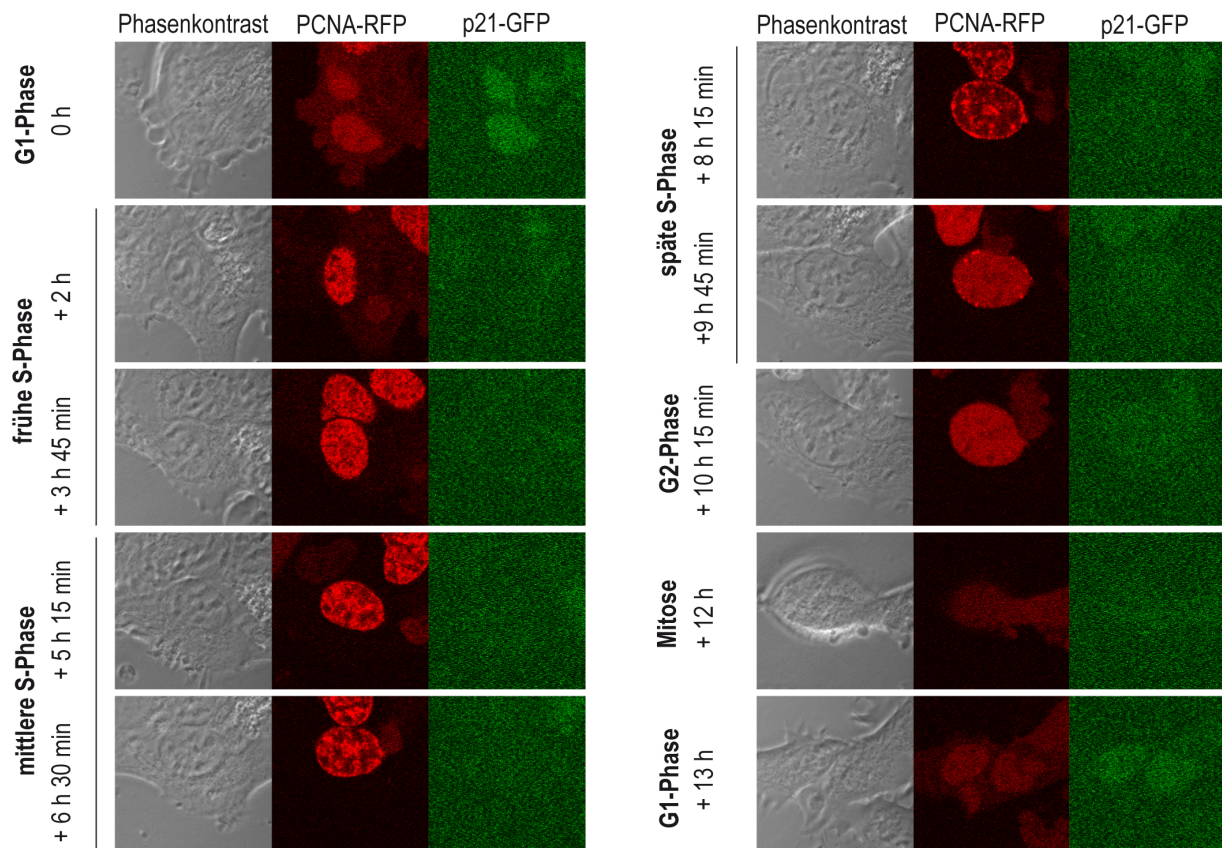


Abb. 9: PCNA-Verteilung über einen kompletten Zellzyklus. Da das PCNA mit RFP markiert ist, konnte aufgrund der Aufnahmen, die Verteilung von PCNA sichtbar und dadurch eine Aussage bezüglich der Zellzyklusphase gemacht werden. In der G1-Phase ist nur ein schwaches Signal von RFP zu erkennen. PCNA, welches normalerweise im Nucleus lokalisiert ist, ist in dieser Phase auch schwach im Zellplasma vorhanden, da während der Mitose die Kernmembran zerfallen ist. In der frühen S-Phase wird vermehrt PCNA exprimiert und es entsteht ein granuliertes Muster im Nucleus, wobei die Nucleoli ausgespart bleiben. Die Verteilung von PCNA in der mittleren S-Phase ähnelt die der frühen S-Phase, allerdings mit dem Unterschied, dass das Signal intensiver ist und sich der Fokus in Richtung der Zellmembran verschiebt. In der späten S-Phase kommt es zu einer Umverteilung von PCNA mit dem Fokus um die Nucleoli. Dabei bilden sich *replication factories*, die in der Anzahl immer weiter abnehmen, während die Größe zunimmt. Es kommt zum Verschwinden der *replication factories* und zum schwachen Signal von PCNA in der G2-Phase sowie in der Mitose.

Untersucht wurden die Zellzyklen der einzelnen Zellen direkt nach der Bestrahlung. Diese erwiesen sich im weiteren Verlauf des Experimentes als irrelevant, da unsere Beobachtung zeigte, dass unabhängig vom Zeitpunkt der Zellzyklusphase, in der die Zellen bestrahlt wurden, es immer Zellen gab, die in der G1- oder G2-Phase eine grüne

Fluoreszenz aufweisen und somit p21 exprimieren. Sobald die S-Phase anfang, war keine grüne Fluoreszenz der Zellen zu vermerken. Daher ist die ursprüngliche Hypothese, dass die Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Bestrahlung die spätere p21-GFP-Expression widerlegt.

Im Zuge der Beobachtung ließen sich Zellen der G2-/G1-Phasen in 3 Gruppen aufteilen:

1. Gruppe: G2ng-G1ng (Abb. 10)

Zellen, die im Zuge einer Zellzyklusphase nicht grün wurden

2. Gruppe: G2ng-G1g (Abb. 11)

Zellen, die nach der Zellteilung grün wurden

3. Gruppe: G2g-G1g (Abb. 12)

Zellen, die vor sowohl und nach der Mitose grün waren

ng = nicht grün; g = grün

Ebenfalls war festzustellen, dass Zellen, welche während des Versuches schließlich in Zelltod (Abb. 13) gegangen sind, sich Großteils in der G2-Phase befanden.

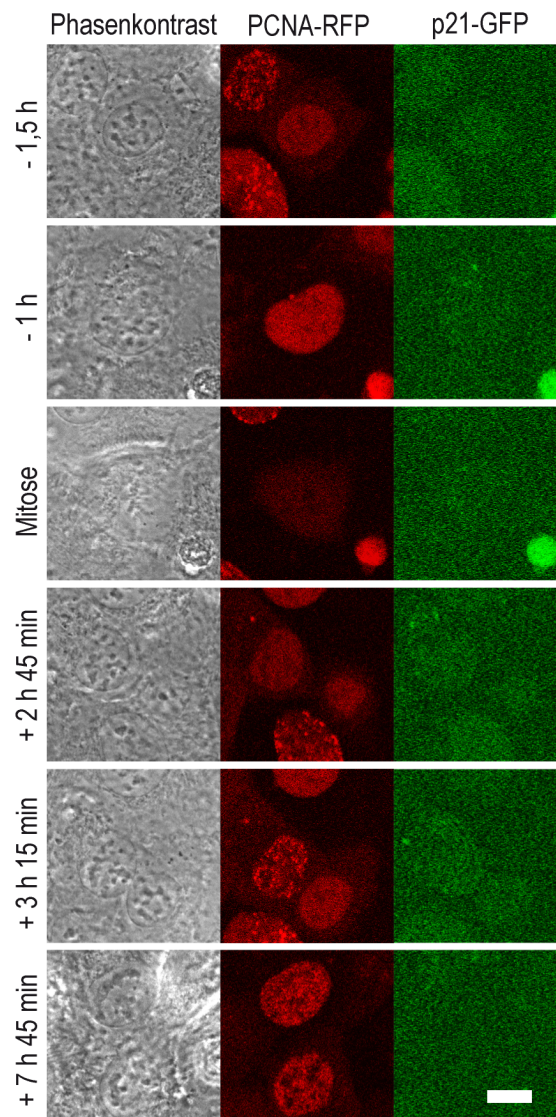


Abb. 10: G2ng-G1ng. Abb. 10 zeigt eine Zelle, die einen Zellzyklus durchläuft, ohne dass es dabei zur p21-GFP-Expression kommt. Maßstabsbalken: 10 μ M.

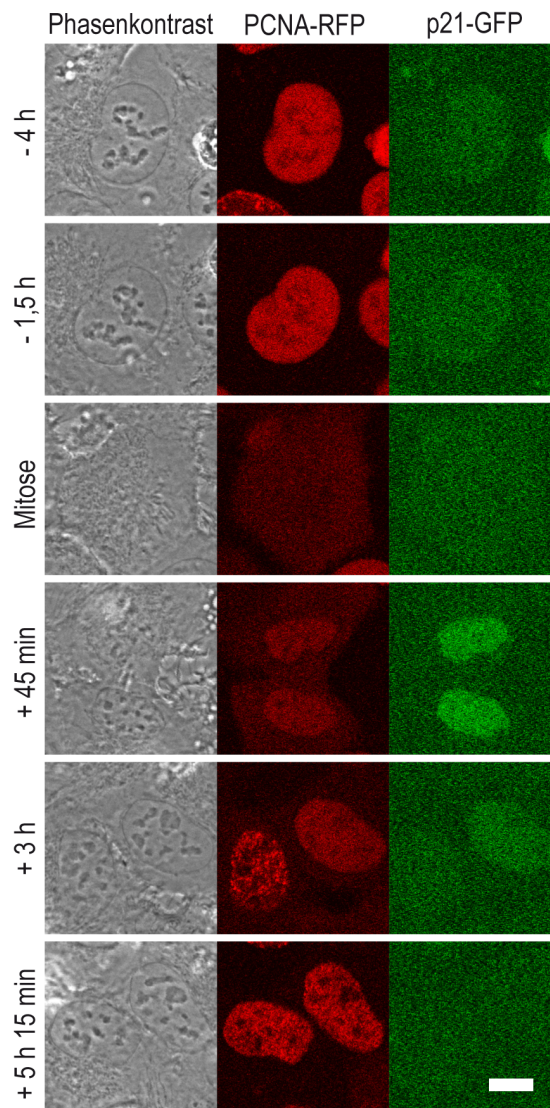


Abb. 11: G2ng-G1g. Abb. 11 zeigt eine nicht grün-leuchtende Zelle, die sich nach Abschluss der Mitose in zwei grüne Tochterzellen teilt. Vor Eintritt der S-Phase wird p21-GFP wieder vollständig abgebaut. Maßstabsbalken: 10 μ M.

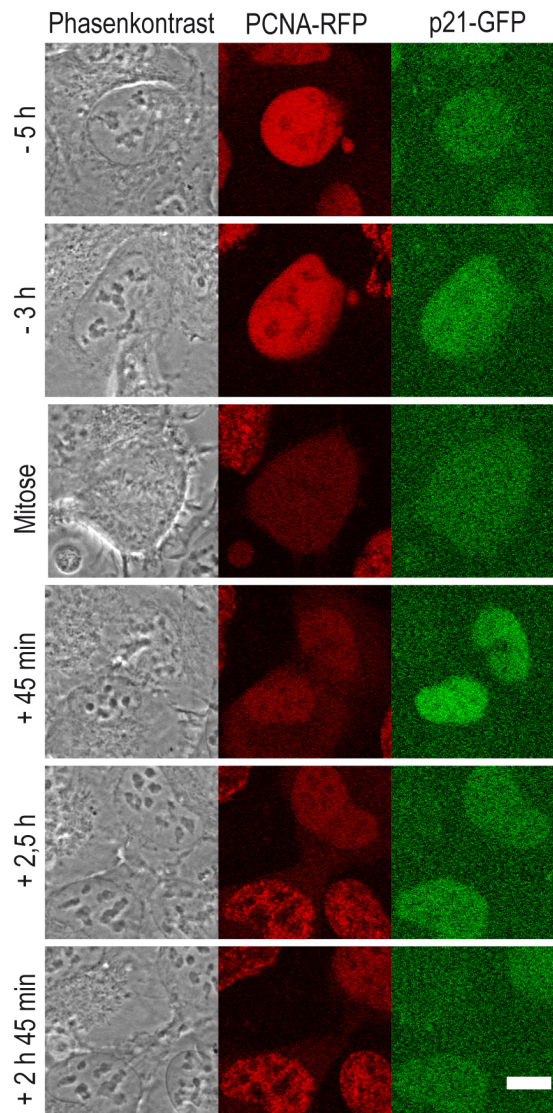


Abb. 12: G2g-G1g. Hier ist eine Zelle abgebildet, die schon bereits in der G2-Phase (-5h) grün fluoresziert und nach abgeschlossener Zellteilung über die Tochterzellen weiterhin p21-GFP exprimiert. Je näher die Zelle sich vor der S-Phase befindet, desto schwächer ist das GFP-Signal. Maßstabsbalken: 10 μ M.

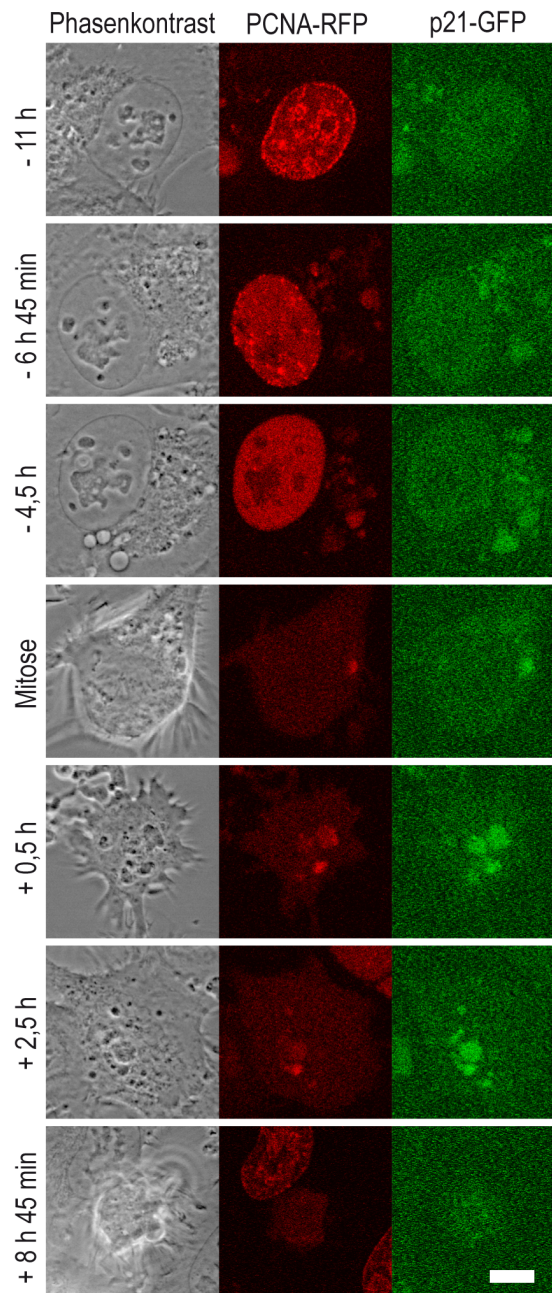


Abb. 13: mitotische Katastrophe. Dargestellt ist eine mitotische Katastrophe im Zuge der Zellteilung. Der programmierte Zelltod wird gestartet, wenn es während der Mitose zu einem nicht reparierbaren Fehler kommt. Somit kann verhindert werden, dass fehlerhafte Tochterzellen entstehen, die wiederum bösartig werden. Bei den intensiv grün-leuchtenden Strukturen neben der Zelle handelt es sich am ehesten um Zellschrott. Maßstabsbalken: 10 μ M.

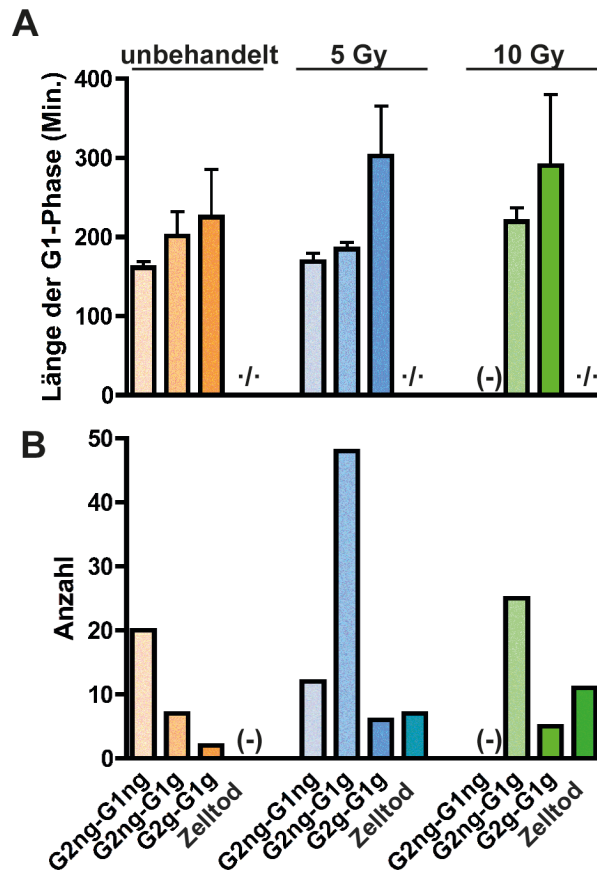


Abb. 14: Balkendiagramm – Länge der G1-Phase und Anzahl der Ereignisse. Abgebildet sind die erhobenen Beobachtungen im Zuge der *Live cell imaging* Analysen. In der linken Spalte (orange) sind die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollgruppe abzulesen, in der Mitte (blau), die mit 5 Gy behandelten sowie in der rechten Spalte (grün), die mit 10 Gy bestrahlten Zellen. Die erste Darstellung (A) zeigt die Länge der G1-Phase der einzelnen Gruppen. Im zweiten Diagramm (B) ist die Anzahl der einzelnen Ereignisse in den Gruppen abzulesen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit einer steigenden Röntgendosis (und somit auch der DNA-Schaden), die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen, aber auch die Häufigkeit des Zelltods steigt und damit auch im Durchschnitt die Länge der G1-Phase prolongiert ist.

Mit Hilfe der beschriebenen Zeitserien ließ sich nun untersuchen, ob die strahleninduzierte Expression von p21-GFP tatsächlich zu einer Verzögerung des Zellzyklus führt und in welcher Zellzyklusphase p21-GFP am häufigsten exprimiert wird. Um den Unterschied von strahlungsbehandelten und unbehandelten Kulturen zu erheben, wurde daher auch eine *Live cell imaging* Serie mit unbehandelten Zellen vorgenommen. Zur Auswertung wurden sowohl die Filme der bestrahlten als auch die der unbehandelten Probe herangezogen. Hierbei wurde jede Zelle einzeln betrachtet

und mitverfolgt. Die Aufnahmen der Anfangs- sowie Endpunkte der Phasen wurden anhand des PCNA-Verteilungsmusters notiert. Mit Hilfe des Konfokalen Fluoreszenzmikroskops wurden alle 15 min ein Bild geschossen. Dadurch war es möglich die Länge jeder einzelnen Zellzyklusphase zu berechnen. Die Ergebnisse der drei unabhängigen *Live cell imaging* Versuche einschließlich der Anzahl der beobachteten Ereignisse und G1-Phasenlänge sind in Abb. 14 zusammengefasst und werden im Folgenden näher erläutert.

Betrachtet man die Darstellung für die unbehandelte Kontrollgruppe, ist im Balkendiagramm (Abbildung 14 B) deutlich zu erkennen, dass der Großteil der Zellen (ca. 69 %) einen Zellzyklus durchläuft, ohne p21-GFP zu exprimieren und somit nicht grün aufscheint (G2ng-G1ng). Zudem konnten in dem Zeitraum von über 48 h kein Zelltod in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Beobachtung verdeutlicht den gesunden Zustand der unbehandelten HT-p21-GFP Zellen. Im Vergleich dazu, wiesen Zellen, die in der G2-Phase nicht grün waren, sondern sich erst in der G1-Phase grün anfärbten (G2ng-G1g), eine zeitlich längere G1-Phase auf (Abb. 14 A unbehandelte Zellen). Noch anschaulicher wird der Unterschied bei Betrachtung der Zellen, die bereits in der G2-Phase schon grün waren und nach der Replikation wieder grün geworden sind (G2g-G1g). Ausschlaggebend ist nicht nur die geringe Anzahl der betroffenen Zellen, sondern hierbei durchliefen die Zellen auch eine deutlich längere G1-Phase als die oben genannten Gruppen.

Für die mit 5 Gy bestrahlten Zellen zeigte sich, dass die Mehrzahl der Zellen (ca. 76 %) nach abgelaufener Zellteilung in der G1-Phase grün wurde. Im Gegensatz dazu durchliefen die Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe unbeschädigt weiter den Zellzyklus. Die 3. Gruppe (G2g-G1g) wies eine signifikante Verlängerung der G1-Phase auf. Bei den mit 5 Gy bestrahlten Zellen wurden einzelne Zelltod-Fälle festgestellt.

Noch eindeutiger machten sich die Unterschiede bei dem Versuch mit der Bestrahlungsdosis von 10 Gy bemerkbar. Hierbei waren keine Zellen festzustellen, die einen kompletten Zellzyklus ohne p21-GFP-Expression durchlaufen haben (G2ng-G1ng). Hingegen stieg die Zahl der 2. Gruppe (G2ng-G1g) sowie die Anzahl der beobachteten Zelltode. Der Großteil der mit 10 Gy bestrahlten Zellen wurde erst im Zuge der abgeschlossenen Mitose grün.

Mithilfe der *Live cell imaging* wurde untersucht, ob die p21-GFP-Expression nach DNA-Schädigung durch Röntgenstrahlen von der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Bestrahlung abhängt. Die Ergebnisse zeigten, dass p21-GFP unabhängig vom Zellzyklusstadium exprimiert wurde, jedoch bevorzugt in G1- und G2-Phasen auftrat und in der S-Phase vollständig abgebaut wurde. Zudem korrelierte eine erhöhte p21-Expression mit einer verlängerten G1-Phase und einer erhöhten Zelltodrate, insbesondere bei höherer Strahlendosis.

4.3 Momentaufnahmen von CPT-behandelten Zellen

Die Beobachtungen der *Live cell imaging* erklärten jedoch nicht den Unterschied zur Dynamik der p21-GFP-Expression bei CPT-behandelten Zellen. Um dies und insbesondere den Grund für den 2. Peak (Abb. 7 B), der bei der durchflusszytometrischen Analyse festgestellt wurde zu erforschen, führten wir hierzu folgenden Versuch durch: Analog zum Verdünnungsverhältnis des CPT-Versuchs für die Durchflusszytometrie (s. 3.2.2) wurden Zellen jeweils in drei 5,1 cm² Wells pipettiert. Anschließend wurden zwei Wells für 3 h entweder mit 0,1 µM oder 0,4 µM CPT behandelt, während ein Well als unbehandelte Kontrolle diente (s. 3.5). Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop zufällige Aufnahmen der Kulturen gemacht (Abb. 15).

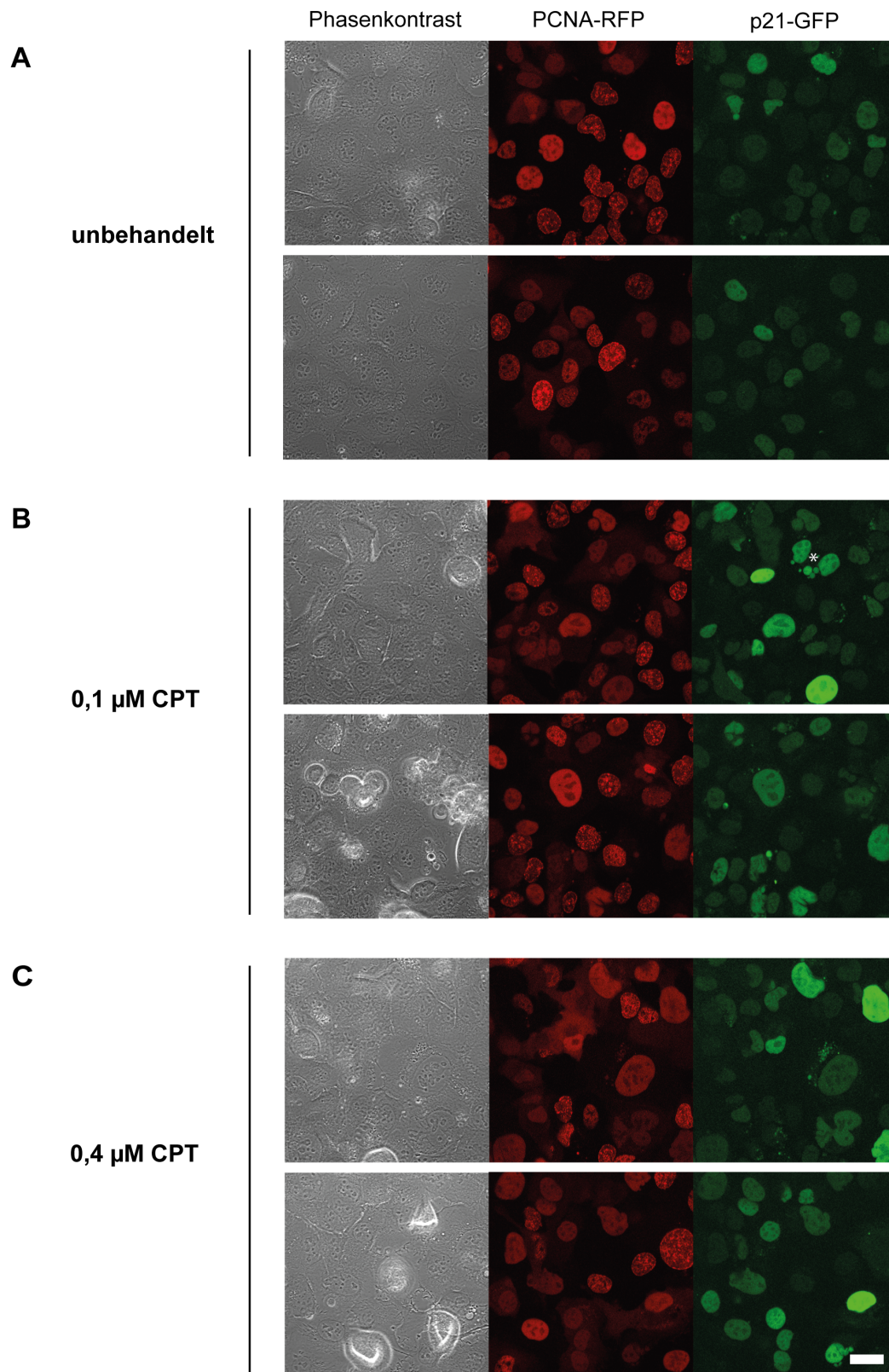


Abb. 15: Aufnahmen von CPT-behandelten Zellen am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop. (A) zeigt Aufnahmen von der unbehandelten Gruppe mit einer Vielzahl von gesunden und normalgroßen Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Die mit CPT-behandelten Zellkulturen sind in Abbildungen (B) (0,1 μ M CPT) und (C) (0,4 μ M CPT) dargestellt. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle, sind sehr viele ungewöhnlich große und intensiv p21-GFP-exprimierende Zellen festzustellen. Hierbei lassen sich viele Zellen keiner definierten Zellzyklusphase eindeutig zuordnen, da typische phasenspezifische Merkmale fehlen. Bei dem Stern (*) in Abbildung (B) handelt es sich um eine Apoptose. Maßstabsbalken: 20 μ M.

Bei Betrachtung der unbehandelten Probe (Abbildung 15 A), sind viele gesunde Zellen in unterschiedlichen Phasen zu erkennen, die weiterhin ungestört ihren Zellzyklus durchlaufen. Hierbei waren einzelne p21-GFP-exprimierende Zellen zu erkennen. Diese waren zu erwarten, da eine gewisse Eigenexpression als gewöhnlich einzuordnen ist.

In Hinblick auf die mit CPT-behandelten Kulturen (Abbildung 15 B+C) stachen auf den ersten Blick unter der gleichen Vergrößerung, die zahlreichen großen und intensiv p21-GFP-exprimierenden Zellen hervor. Auffallend waren außerdem zahlreiche zellzyklus-atypische und ungewöhnlich große Zellen, bei denen charakteristische Merkmale der G1-, S- und G2-Phasen nicht erkennbar waren. Unter anderem waren ebenfalls einzelne Zelltodereignisse (z.B. * Abbildung 15 B) festzustellen.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass nach einer CPT-Behandlung einige Zellen einen sehr hohen p21-GFP-Level aufweisen und andere dagegen fast gar keine. Daraus erklären sich die zwei unterschiedlichen Peaks in der durchflusszytometrischen Messung der GFP-Expression nach CPT-Behandlung. Was diese unterschiedliche p21-GFP-Expression bewirkt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

5 Diskussion und Schlussfolgerung

Zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen ist das Verständnis von biologischen Vorgängen um die Entstehung von Krankheiten grundlegend. Dabei sind Zellzyklus-Checkpoint-Mechanismen während Zellteilungen für den Schutz und die Aufrechterhaltung der Genomintegrität bei Exposition gegenüber Stresssignalen entscheidend. Entweder werden DNA-Schäden durch Reparaturmechanismen behoben oder beschädigte Zellen werden durch Apoptose eliminiert. Deregulation dieser Kontroll- und Übergangspunkte können die Tumorentstehung fördern und sich negativ auf Behandlungsstrategien auswirken. Das Protein p21 ist als CKI ein wichtiges Schlüsselprotein und Regulator der Zellzyklusprogression, der unter anderem durch den bekannten Tumorsuppressor p53 transaktiviert wird. Dessen zelluläre Reaktion ist jedoch nicht nur abhängig von der Reizquelle, sondern auch vom gegenwärtigen Zustand der Zelle. Faktoren, die das heterogene Verhalten von genetisch identischen Zellen beeinflussen können, sind die Zellzyklusphase, Mikroumgebung und zelluläre Konzentration von relevanten Proteinen. Um ein tieferes Verständnis für die Heterogenität in einer Zellpopulation zu erlangen, bedarf es der Verknüpfung der zellulären Antworten mit einem definierten Zellzustand. In der vorliegenden Arbeit haben wir mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode fluoreszenzmarkierten Zielproteinen, durchflusszytometrische Analysen und Zeitraffermikroskopie ein System zur dynamischen Untersuchung von zellulärer Antwort von p21 auf DNA-Schäden etabliert.

5.1 Dynamik der p21-GFP-Expression nach DNA-Schädigung

Obwohl p21 mittlerweile gut etabliert ist als funktioneller Sensor zellulärer Stressantworten, fehlt bislang ein direkter Vergleich der Expressionsdynamik unter verschiedenen zelltoxischen Bedingungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die dosisabhängige Expression von p21-GFP unter Röntgenbestrahlung und CPT-Behandlung mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht und quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsarten.

5.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung nach Schadensinduktion

Mit steigender Röntgendosis wurde sowohl eine Erhöhung der Anzahl p21-GFP-exprimierende Zellen als auch der Fluoreszenzintensität beobachtet. In Zusammenschau der Ergebnisse bestehen über 10 unabhängige Versuche hinweg eine signifikante Korrelation mit linearer Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität mit der Röntgendosis. Dieses Resultat reflektiert die Funktion von p21 als Schadenssensor und Zellzyklusregulator. Je mehr Strahlenbelastung besteht, desto mehr DNA-Schäden und Aktivierung der DNA-Schadensantwort, was unter anderem zu einer verstärkten Stabilisierung und Aktivierung von p53 führt und konsekutiv eine erhöhte Expression von p21 bewirkt. Auch Bahreyni-Toossi et al. (2021) konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine Bestrahlung die Expression des p21-Gens in vier verschiedenen humanen Fibroblasten-Zelllinien, insbesondere bei einer Dosis von 4 Gy signifikant hochreguliert. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen beobachteten sie jedoch bei einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy eine Abnahme der p21-Expression in allen untersuchten Zelllinien. Diese abweichende Dynamik wurde mit zellulären Mechanismen, wie etwa verstärkte Apoptose, Nekrosen oder Kollaps der DNA-Schadensantwort bei erhöhter Strahlendosis begründet.

Im Unterschied zur Röntgenbestrahlung zeigte die CPT-Behandlung eine biphasische Reaktion mit einem zweiten Peak der mittleren Fluoreszenzintensität, welche auf eine Heterogenität der Zellantwort hindeutet: einer mit hoher und eine mit niedrigerer p21-GFP-Expression. Bereits bei niedrigen CPT-Konzentrationen wurde ein merklicher Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenz beobachtet. Es zeigt sich hier eine asymptotische Zunahme über 4 unabhängige Versuche.

Die durchgeführten Versuche demonstrieren, dass die Dosis-Wirkungsbeziehung der p21-GFP-Induktion spezifisch für die jeweilige Noxe ist. Die unterschiedliche Dynamik wirft die Frage auf, welche Mechanismen dieser Divergenz zugrunde liegen. Eine Erklärung lässt sich jedoch schwer formulieren, da die durch DNA-Schäden ausgelöste zelluläre Signalkaskade äußerst komplex ist und eine Vielzahl molekularer Faktoren umfasst.

Aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität an PCNA (s. 1.2.3), welches ein zentrales Regulatorprotein der DNA-Replikation ist, stellt sich die Frage, ob p21 auch einen direkten Einfluss auf die Reparaturmechanismen nimmt. PCNA ist nicht nur

essenziell für die DNA-Synthese, sondern auch ein integraler Bestandteil nahezu aller bekannten DNA-Reparaturwege. Eine kompetitive Bindung von p21 könnte daher potenziell die Funktion von PCNA-interagierenden Reparaturfaktoren beeinflussen. Allerdings liefern sowohl *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Studien widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von p21 auf die DNA-Reparatur (Cazzalini et al., 2010; Tillhon et al., 2013; Ticli et al., 2022). Diese Diskrepanzen lassen sich zum Teil auf die Unterschiede in den verwendeten Modellsystemen, die Zelltyp-spezifischen Unterschiede sowie auf variierende Expressionsniveaus von p21 zurückführen, was die Interpretation der Daten erheblich erschwert.

5.1.2 Komplexität der DNA-Schadensantwort und Rolle von p21

Kumaravel et al. (1998) berichteten erstmals über eine Interaktion zwischen p21 und Ku70, einem zentralen Bestandteil der NHEJ, in peripheren Blutlymphozyten nach γ -Bestrahlung. Diese Assoziation war zeitlich und dosisabhängig: Sie ließ sich bei einer Dosis von 2 Gy innerhalb von zwei Stunden nachweisen, bei 4 Gy jedoch nicht mehr. Die Autoren vermuteten, dass die Bindung von Ku70 an p21 eine Rolle bei der Regulation des zellulären Schicksals nach DNA-Schädigung spielt, insbesondere im Hinblick auf einen p21-vermittelten G1-Zellzyklusarrest. In humanen Fibroblasten, die Schwerionenbestrahlung ausgesetzt waren, wurde eine schnelle Rekrutierung von p21 an DNA-Schadensstellen beobachtet, begleitet von einer Kolo-kalisierung mit reparaturbeteiligten Proteinen wie Mre11, Rad50 und PCNA (Jakob et al., 2002). Interessanterweise erfolgte diese p21-Akkumulation unabhängig vom MRN-Komplex (Mre11, Rad50, NBS1) und p53, sondern PCNA abhängig (Koike et al. 2011). Auch Perucca et al. (2006) beobachtete, dass p21 in humanen Fibroblasten, die mit 337-nm-Laser bestrahlt wurden und unter bestimmten Bedingungen gezielt Doppelstrangbrüchen erzeugten, an die entstandenen Schadensstellen rekrutiert wurde. Die Forscher vermuten, dass die p21-Antwort nicht strikt von der Art der DNA-Schädigung abhängt, sondern vielmehr mit PCNA-abhängigen Reparaturmechanismen verknüpft ist.

Dahingegen deuten andere Studien darauf hin, dass p21 eine regulierende Rolle bei der replikationsgekoppelten Reparatur von DSBs spielen könnte. In p21-defizienten Zellen wurde eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DSB-auslösenden Substanzen (u.a. CPT) beobachtet, begleitet von einer verstärkten Aktivierung des fehleranfälligen NHEJ-Reparaturwegs und einer gleichzeitigen Reduktion der effizienten HR (Mauro et

al., 2012). Dies legt nahe, dass p21 die HR bevorzugt unterstützt und NHEJ hemmt. Zusätzlich wurde eine direkte Bindung von p21 an die p50-Untereinheit der DNA-Polymerase δ nach DNA-Schädigung gefunden, welche CDK2 und nicht PCNA assoziiert war. Dies deutet eher auf einen Zusammenhang mit dem Zellzyklus als mit der DNA-Reparatur hin (Li et al., 2006).

Die Rolle von p21 in der NER ist bislang nicht eindeutig geklärt und Gegenstand kontroverser Diskussionen. Während einige *in vitro*-Studien nahelegen, dass p21 die DNA-Replikation, nicht jedoch die DNA-Reparatur hemmt (Li et al., 1994; Shivji et al., 1994), berichten andere von einer hemmenden Wirkung (Pan et al., 1995; Podust et al., 1995). Cooper et al. (1999) zeigte, dass der C-Terminus von p21 die NER sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmen kann. Die Hemmung tritt nicht bei physiologisch niedrigen, sondern erst bei hohen Konzentrationen des p21-Fragmentes im Verhältnis zu PCNA auf. Die Hemmung ist PCNA-abhängig, da sie durch Zugabe von zusätzlichem PCNA aufgehoben werden konnte. Neue Erkenntnisse (Hasan et al., 2001; Cazzalini et al., 2008; Tillhon et al., 2012) deuten darauf hin, dass p21 nicht nur durch PCNA-Bindung, sondern auch indirekt über die Modulation von p300, einer lysinacetylierenden Histonmodifikation, Einfluss auf den NER-Prozess nimmt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass p21 die Reparaturaktivität über multiple Mechanismen – sowohl strukturell als auch funktionell – reguliert. Gratchev (2008) berichtete über die hemmende Funktion von p21 im NER an einem Modell an Mäusen für das Xeroderma pigmentosum (einer genetisch bedingten NER-Störung). Hierbei beschrieb er, dass eine Hochregulation von p21 die NER-Aktivität verringert und umgekehrt. Im Gegensatz dazu existieren auch Gegenbefunde, die zeigen, dass p21^{-/-}-Zellen selbst NER-defizient sein können (Stivala et al., 2001) und, dass p21 NER *in vivo* nicht hemmt (Soria et al., 2008; Al Bitar und Gali-Muhtasib, 2019), was eher auf eine unterstützende Rolle von p21 schließen lässt.

Letztendlich lässt sich eine Erklärung schwer formulieren, da die durch DNA-Schäden ausgelöste zelluläre Signalkaskade äußerst komplex ist und eine Vielzahl molekularer Faktoren umfasst. In diesem Kontext ist zu betonen, dass p21 lediglich einen Teilaspekt der DNA-Schadensantwort darstellt und seine Expression durch endogene und exogene Faktoren beeinflusst wird, darunter p53, Zellzyklusstatus, Reparaturmechanismen und posttranslationale Modifikationen. Dennoch lässt sich feststellen, dass die beobachtete p21-GFP-Dynamik jeweils eindeutig der

zugrundeliegenden Schädigungsart zugeordnet werden kann. Diese Schädigungsarten unterscheiden sich nicht nur in ihrer chemisch-physikalischen Wirkung, sondern besitzen auch einen jeweils definierten Angriffspunkt im Zellstoffwechsel. Daraus resultieren unterschiedliche Auslösepunkte und Wege der DNA-Schadensantwort, die letztlich auch das Ausmaß und die Kinetik der p21-Expression beeinflussen. Zur weiteren Aufklärung der molekularen Hintergründe erscheint es daher notwendig, die beteiligten Signalwege in zukünftigen Arbeiten detailliert zu quantifizieren und systematisch zu untersuchen. Es ist naheliegend anzunehmen, dass sich die Ursachen für die divergente p21-Dynamik genau dort finden lassen – in der differenziellen Aktivierung, Modulation und Integration der zellulären Stressantwort abhängig von der Art des DNA-Schadens.

5.1.3 Zuverlässigkeit der Methodik und kritische Reflexion

Die durchgeführten Experimente mittels Durchflusszytometrie erscheinen bei der Überprüfung möglicher Fehlerquellen als zuverlässig. Die verwendete Methodik basiert auf der Durchflusszytometrie, einer etablierten und bewährten Analysemethode, die seit Jahren als verlässlicher Standard in der Wissenschaft gilt und in z.B. der Molekularbiologie, Virologie, Bakteriologie, Krebsbiologie, Immunologie und der Überwachung von Infektionskrankheiten Anwendung findet (McKinnon, 2018). Eine mögliche Fehlerquelle könnte in einer fehlerhaften Bestrahlungs- und Behandlungsintensität infolge von Nichteinhaltung der vorgesehenen Zeitintervalle liegen. Die Röntgenbestrahlung der Zellen erfolgte am Gulmay RS225-Bestrahlungsgerät des Labors für Molekulare Radioonkologie der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Dieses Gerät ermöglicht die Bestrahlung von Zellkulturen mit 150 kV-Röntgenstrahlen unter Bedingungen von 37 °C und findet in vielen Studien geläufig ihre Anwendung. Da sich das Gerät in einem anderen Gebäude befindet, mussten die Zellkulturflaschen für die Bestrahlung in Styroporboxen transportiert und während der Bestrahlung in den dort verfügbaren Inkubatoren zwischengelagert werden. Der Transportweg betrug fußläufig etwa 15 min pro Strecke. Es ist denkbar, dass Schwankungen in Temperatur und Luftfeuchtigkeit sowie Veränderungen in den Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid einen Einfluss auf die Zellen und ihr Wachstumsverhalten genommen haben könnten. Ebenso könnten suboptimale lebenserhaltende Bedingungen und transportbedingte Scherkräfte die Zellviabilität beeinträchtigt haben

(Miller et al., 2017). Studien zeigen, dass Temperaturen unterhalb von 37 °C *in vitro* zu einer reduzierten Proliferationsrate und einer doppelt so hohen Verdopplungszeit führen können, begleitet von einem niedrigeren Mitoseindex. Nach bestem Wissen und mit größtmöglicher Sorgfalt wurden die vorgesehenen Intervalle während des Versuchsablaufs sowie des Transportes eingehalten. Zudem zeigten sich in den Ergebnissen über mehrere unabhängigen Versuchsreihen hinweg konstante Werte ohne größere Abweichungen, was den guten Zustand der Zellen und die Zuverlässigkeit der Experimente weiter unterstützt.

Trotz der unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen der Experimente der beiden Behandlungsgruppen erscheinen beide Datensätze als verlässlich, da pro Versuch jeweils 30.000 Ereignisse mittels durchflusszytometrische Analyse erfasst wurden. Dadurch ergibt sich eine insgesamt sehr große Stichprobe. Die hohe Ereigniszahl trägt dazu bei, zufällige Schwankungen zu minimieren und die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich zu erhöhen. Insgesamt sind im Verlauf der Versuchsreihen keine systematischen Fehler in der Durchführung erkennbar geworden. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse jedoch zu überprüfen, wäre es sinnvoll, die Experimente zu wiederholen. Zudem könnten auch weitere zelltoxische Substanzen/Bedingungen und deren spezifische Dosis-Wirkungsbeziehung der p21-GFP-Induktion Gegenstand der Untersuchung sein.

5.1.4 Potenzial von p21-GFP als Biomarker und in der onkologischen Therapie

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Eignung von p21-GFP als Marker zur Detektion von DNA-Schädigung, wie bereits von Koike et al. (2011) beschrieben. Angesichts der vielseitigen Funktionen von p21 in der Genregulation sowie seiner Rolle bei der genomischen Stabilität, Apoptose, Seneszenz und DNA-Reparatur ergibt sich ein komplexes Bild: p21 kann sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Aktivitäten entfalten (s. 1.2.9). Diese duale Wirkung beeinflusst nicht nur die Krebsentstehung, sondern auch die Effektivität DNA-schädigender Wirkstoffe und anderer Medikamente, die p21 induzieren. Eine große Herausforderung besteht darin, gezielt die onkogenen Funktionen von p21 zu hemmen, ohne seine tumorsuppressiven Eigenschaften zu beeinträchtigen. Ein vielversprechender Ansatz wäre die Entwicklung von Substanzen, die spezifisch die Interaktion von p21 mit CDK4/6-Cyclin-D-Komplexen verhindern, während die Hemmung von CDK2 und CDK1

erhalten bleibt. Alternativ könnten *upstream*- oder *downstream*-liegende Regulatoren von p21 als therapeutische Ziele dienen. Besonders attraktiv erscheint die gezielte Hemmung der antiapoptotischen Funktionen von p21 in Kombination mit DNA-schädigenden Therapien. Mehrere etablierte Wirkstoffe, etwa Histon-Deacetylase-(HDAC)-Hemmer (Ocker und Schneider-Stock, 2007; Belluci et al., 2013) oder Statine (Ukomadu und Dutta, 2003; Wang et al., 2017), wirken zumindest teilweise über eine p21-Induktion und werden auf ihr antitumorales Potenzial untersucht. Allerdings erfordert die therapeutische Modulation von p21 aufgrund der komplexen Netzwerke seiner biologischen Funktionen große Vorsicht.

In diesem Zusammenhang stellt sich die wichtige Frage, ob p21-GFP als Biomarker in der Onkologie eingesetzt werden könnte. Denkbar wäre eine Bestimmung der p21-GFP-Konzentration zur Prädiktion, ob tumorsuppressive oder onkogene Effekte überwiegen. Ebenso könnte eine Messung der p21-GFP-Dynamik vor und nach Beginn der Chemotherapie eingesetzt werden, um Therapieeffekte frühzeitig zu beurteilen und die weitere Behandlung, etwa eine Dosisanpassung, zu steuern. Erste Ansätze zeigen bereits, dass die Dynamik der p21-Expression genutzt werden kann, um eine Prognose bezüglich Seneszenz oder Proliferation nach DNA-Schädigung zu stellen (Hsu et al., 2019).

Des Weiteren könnte p21-GFP als biologischer Messwert zur Erfassung von Zellschädigungen unterschiedlicher Ursachen, wie etwa Röntgen-, UVA- und UVB-Strahlung oder der Behandlung mit verschiedenen Zytostatika eingesetzt werden. Auch Bahreyni-Toossi et al. (2021) suggerieren, dass p21 eine zentrale Rolle der Zellreaktion auf Strahlung spielt und schlugen vor, p21 als potenziellen Biomarker zur Vorhersage der Strahlenempfindlichkeit in normalen Zelllinien einzusetzen. p21-GFP könnte genutzt werden, um zelluläre Stressreaktionen standardisiert zu quantifizieren. In diesem Kontext ist die Entwicklung eines standardisierbaren Biosensors, so wie er in dieser Arbeit vorgestellt wird, bestehend aus einer Kombination von durchflusszytometrischer Analyse und weiteren komplementären Messverfahren, ein innovativer Ansatz. Dieser Biosensor kann nicht nur die Zytotoxizität bekannter Expositionen erfassen, sondern auch für das Screening neuer Substanzen eingesetzt werden. Dies hätte den zusätzlichen Vorteil, Tierversuche zu reduzieren oder gar zu vermeiden, indem *in vitro* präzisere und hochsensitive Methoden zur Risikobewertung und Wirksamkeitsprüfung bereitgestellt werden. Die Etablierung von p21-GFP-basierten Testsystemen könnte damit einen wichtigen Beitrag zur modernen

toxikologischen Forschung und zur Entwicklung alternativer Testmethoden leisten. Diese Perspektiven unterstreichen die Relevanz weiterer Untersuchungen zur präzisen Charakterisierung der p21-Regulationsmechanismen in unterschiedlichen therapeutischen Kontexten.

5.2 Erkenntnisse aus dem *Live cell imaging* nach Röntgenbestrahlung

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen der mit Röntgenstrahlen-behandelten Zellen suggerieren, dass die DNA-Schädigung eine relativ homogene Induktion der p21-GFP-Expression in der Zellpopulation verursacht. Dieses Bild einer gleichmäßigen p21-Antwort kontrastiert jedoch mit Beobachtungen aus Vorversuchen des Gastlabors sowie mit Ergebnissen weiterer Studien (Ciznadija et al., 2011; Stewart-Ornstein und Lahav, 2016; Barr et al., 2017; Sheng et al., 2019; Tran et al., 2022), die eine deutliche Heterogenität der p21-Expression auf Einzelzellebene zeigten. Es stellte sich daher die Frage, ob die Induktion von p21 durch DNA-Schädigung von der Zellzyklusphase abhängt, in der sich die Zelle zum Zeitpunkt der Schädigung befand. Jackson (2002) postulierte, dass der Weg für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Schadensinduktion beeinflusst wird. Zur Beantwortung dieser Frage verfolgten wir mittels *Live cell imaging* die dynamischen und heterogenen zellulären Antworten auf DNA-Schädigung in Echtzeit, um die p21-GFP-Dynamik detaillierter zu charakterisieren.

5.2.1 Heterogenität in der p21-GFP-Expression und Einfluss der Zellzyklusphase

Auch in dieser Arbeit wurde eine Heterogenität der p21-GFP-Expression nach DNA-Schädigung beobachtet. Einzelne Zellen zeigten zwei Tage nach Röntgenbestrahlung eine deutliche Expression von p21-GFP, während andere nur geringe oder keine Fluoreszenz aufwiesen. Im weiteren Verlauf des Experiments erwies sich die Abhängigkeit der p21-GFP-Expression von der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung als irrelevant. Unsere Auswertung zeigte, dass unabhängig vom Zeitpunkt der Zellzyklusphase, in der die Zellen bestrahlt wurden, es immer Zellen gab,

die in der G1- oder G2-Phase eine grüne Fluoreszenz aufweisen und somit p21-GFP exprimieren. Sobald die S-Phase anfangt, war keine grüne Fluoreszenz der Zellen zu vermerken. Dieses Erkenntnis kann mit dem Abbau von p21 vor Beginn der S-Phase durch die beiden Ubiquitinligasen CRL4Cdt2 und SCFSkp2 begründet werden (Barr et al. 2017). Interessanterweise konnte Sheng et al. (2019) abgeschwächte oder verzögerte p21-Expression beobachten. Durch die Kombination von Zeitraffermikroskopie endogener Fluoreszenzreporter mit computergestützter Einzelzell-Analyse konnte detailliert nachvollzogen werden, wie die p53-vermittelte DNA-Schadensantwort im Verlauf des Zellzyklus angepasst wird. Erstaunlicherweise wurden auch bei höheren Bestrahlungsdosen stets homogene p53- und heterogene p21-Reaktionen beobachtet und unterschiedliche Schädigungsgrade schienen keine divergierende p21-Dynamik zu verursachen. Sie suggerieren, dass die p21-Dynamik bei Bestrahlung von der anfänglichen Zellzyklusphase und dem Zellzyklusverlauf während der Schädigungsreaktion abhängt. Die Ergebnisse von Sheng et al. (2019) zeigen, dass die heterogene p21-Dynamik nach DNA-Schädigung maßgeblich durch einen S-Phasen-spezifischen Abbau von p21 über PCNA/CRL4Cdt2 verursacht wird, der essenziell für die Aufrechterhaltung der Genomstabilität ist. Mathematische Modellierungen und experimentelle Validierungen zeigten, dass der gezielte Abbau von p21 in der S-Phase allein ausreicht, um die beobachtete Heterogenität der p21-Expression zu erklären.

Interessanterweise demonstrieren die Ergebnisse von Tran et al. (2022), dass die Heterogenität der p21-Antwort auf DNA-Schäden stark vom Zellzyklusstadium zum Zeitpunkt der Bestrahlung abhängt. In ihrer Studie wurden Zellen anhand ihres Status in frühe (G1) und späte Zellzyklusphasen (S, G2, M) unterteilt. Besonders auffällig war, dass Zellen, die in den späteren Phasen bestrahlt wurden, eine deutlich stärkere p53- und p21-Induktion zeigten und gleichzeitig im Verlauf von fünf Tagen weniger Zellteilungen aufwiesen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Zellen in S/G2/M-Phasen empfindlicher gegenüber DNA-Schäden sind und mit einem stärkeren, proliferationshemmenden Signal antworten.

5.2.2 Mutter-Tochter-Vererbung von p21 als mögliches molekulares Gedächtnis

Basierend auf den Ergebnissen von Barr et al. (2017) lassen sich zentrale Parallelen zu den eigenen Beobachtungen aus den *Live cell imaging* Versuchen ziehen. Wir

observierten nach Bestrahlung mit 5 Gy eine Zunahme von Zellen, die nach der Mitose p21-GFP exprimierten und eine verlängerte G1-Phase aufwiesen. Bei 10 Gy Bestrahlung gab es nahezu keine Zellen mehr, die ohne p21-GFP-Expression durch den Zellzyklus gingen, und die Häufigkeit von Zelltodereignissen nahm deutlich zu. Auch Barr et al. (2017) machten die Beobachtung, dass die Länge der G1-Phase mit der Höhe der p21-Expression korreliert. Zusätzlich wiesen G1-Zellen die höchste und variabelsten p21-Spiegel auf. Ebenso konnte kein p21 in der S-Phase detektiert werden. Sie beobachteten bemerkenswerterweise keinen Abbau von p21 in der Mitose und suggerieren, dass Tochterzellen p21 von ihrer Mutterzelle übernehmen. Diese Hypothese wurde durch die positive Korrelation zwischen den p21-Werten in der G2-Phase der Mutter und der G1-Phase der Tochter gestützt. Auch zwischen Schwesterzellen bestand eine signifikante Korrelation sowohl hinsichtlich der p21-Spiegel als auch der G1-Dauer. Diese p21-Kontinuität könnte als molekulares Gedächtnis dienen, das Informationen über den DNA-Schadensstatus in die nächste Zellgeneration überträgt.

5.2.3 Methodische Herausforderungen und Optimierungspotential

Die zuletzt genannte Beobachtung von Barr et al. (2017) konnten wir leider aufgrund der methodischen Einschränkungen nicht bestätigen. Trotz der geringen Kulturfläche der eingesetzten 4-Well-Slides, welche die präzise Nachverfolgung einzelner Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum erleichtern sollte, war diese nicht ausreichend, sodass die Ränder der Kulturfläche durch das Sichtfeld des Mikroskops abgeschnitten wurden. Des Weiteren bestand aufgrund der kleinen Fläche der Slides das Risiko von Aussaat einer unbeabsichtigt überhöhten Zelldichte, welches zur limitierten Nährstoffverfügbarkeit sowie Kontaktinhibition und somit zur Hochregulation von p21 führen könnte ohne zusätzliche externe Schädigung (Hoeferlin et al., 2011). Mit diesem Wissen wurde verschiedene Verdünnungen pro Well vorbereitet und die anhand der Zelldichte und -morphologie am besten geeignete Verdünnung für die *Live cell imaging* verwendet. Die Überwindung dieser Herausforderung spiegelt sich in den Ergebnissen der unbehandelten Kontrollgruppe im Vergleich zu den Behandelten wider. Auch hier bestand eine potenzielle Fehlerquelle aufgrund der Transportzeit, wie oben (s. 5.1.3) bereits behandelt. Zu Beginn der *Live cell imaging* traten technische Schwierigkeiten auf, die auf die Versiegelung der Wells mit Paraffin zurückzuführen waren. Aufgrund thermischer Kontraktionen kam es während der 48-stündigen

Aufnahmephase zu Fokusabweichungen, was die Bilddaten der ersten Versuchsdurchläufe unbrauchbar machte. Nach Entfernung des Paraffins konnten diese Fokusprobleme deutlich reduziert werden. Die Bildaufnahme am konfokalen Mikroskop erfolgte automatisiert alle 15 min. Da sich der Fokus dennoch gelegentlich etwas verschob, wurden in regelmäßigen Abständen manuelle Kontrollen durchgeführt und gegebenenfalls der Fokus nachjustiert. Dabei entstandene Kontrollbilder wurden bei der Datenauswertung ausgeschlossen bzw. abgezogen. Letztlich konnte das Experiment erfolgreich in drei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt werden – ohne Austrocknung der Zellkulturen. Nichtsdestotrotz bleibt die Zahl der analysierten Zellen insgesamt begrenzt, weshalb zusätzliche Wiederholungen mit optimierter Zellverfolgung, besserem Imaging-Setup und größerem Beobachtungsfeld erforderlich sind, um die aufgeworfenen Fragestellungen zuverlässig zu untersuchen.

Der Einsatz von PCNA als Marker zur Bestimmung der Zellzyklusphase erwies sich auch in dieser Arbeit als verlässlich und valide. Mehrere Forschungsgruppen haben PCNA bereits erfolgreich zur Phaseneinteilung von Zellen genutzt (Celis et Celis, 1985; Leonhardt et al., 2000; Kisielewska et al., 2005; Kalfalah et al. 2015), da das typische Verteilungsmuster der PCNA-Fluoreszenz eine klare Differenzierung der Zellzyklusphasen – insbesondere S-Phase gegenüber G1 und G2 – erlaubt. Diese Methode eignet sich daher sehr gut zur parallelen Analyse von Zellzyklusstatus und p21-GFP-Expression im *Live cell imaging*.

Eine wesentliche Einschränkung ergibt sich jedoch aus der manuellen, visuellen Auswertung der Fluoreszenzsignale. Insbesondere die Unterscheidung zwischen nicht fluoreszierenden und schwach grün fluoreszierenden Zellen unterliegt einer gewissen Subjektivität, da der Punkt, an dem die p21-GFP-Expression als „positiv“ gewertet wird, nicht exakt definiert ist. Diese Schwelle kann je nach Beobachter variieren und birgt somit das Risiko einer systematischen Verzerrung. Unsere Versuche wurden alle durch die gleiche Person ausgewertet, um diese Variabel zu verringern. Um die Aussagekraft zukünftiger Analysen zu erhöhen, wäre der Einsatz automatisierter Bildanalyseverfahren, wie etwa computergestützter Segmentierungsalgorithmen oder auf Deep Learning basierender Zelltracker, sinnvoll. Eine weitere Option bestünde in der quantitativen Messung der Fluoreszenzintensität pro Zelle, um objektive Schwellenwerte für die p21-GFP-Expression zu definieren und interindividuelle Bewertungsschwankungen zu eliminieren. Solche standardisierten Verfahren könnten

die Reproduzierbarkeit verbessern und ermöglichen darüber hinaus eine präzisere Korrelation von Fluoreszenzsignal, Zellzyklusphase und zellulärem Schicksal.

Zudem könnte eine sinnvolle Ergänzung in einer zukünftigen Folgearbeiten die gleichzeitige Bestimmung der Zellzyklusphasen sowie die Erfassung von Zelltodereignissen mittels durchflusszytometrischer Analyse (Darzynkiewicz et al., 2001; McKinnon, 2018) erfolgen und diese mit den Ergebnissen der *Live cell imaging* zu vergleichen.

5.2.4 p21 und zelluläre Seneszenz

Eine weitere essenzielle Funktion von p21 neben dem Zellzyklusarrest, ist die Einleitung der Zelle in die Seneszenz. Dieses Phänomen wurde jedoch nach den 48 h unseres Experimentes nicht beobachtet, da es sich hierbei um einen komplexen und zeitlich verzögerten Prozess handelt (Kumari und Jat, 2021). Eine irreversible Seneszenz erfordert in kultivierten Zellen einen längeren Zeitraum von mindestens vier Tagen von Reizen (He und Sharpless, 2017). Da seneszente Zellen bevorzugt in der G1- oder G0-Phase verweilen, würden sie sich in den Versuchen in diesen Zellzyklusphasen zuordnen lassen. Darüber hinaus ist es denkbar, dass unterschiedliche Schädigungsarten ein jeweils unterschiedliches Potenzial zur Seneszenzinduktion besitzen, was sich wiederum auf die beobachteten Verteilungsmuster der p21-Expression auswirken könnte. Die Forschungsgruppe von Jänicke et al. (2007) zeigte, dass p21 in stressgeschädigten Zellen tendenziell eher eine seneszente Reaktion als den programmierten Zelltod begünstigt. Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass jene Zellen, die in unseren Experimenten eine hohe p21-GFP-Expression aufwiesen, möglicherweise später in einen seneszenten Zustand übergehen.

5.3 p21-GFP-Expression nach CPT-Behandlung – Momentaufnahmen

Zur Untersuchung der bei der durchflusszytometrischen Analyse beobachteten biphasischen p21-GFP-Expressionsdynamik bei CPT-behandelten Zellen wurden ein weiterer Versuch mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie 48 h nach Behandlung durchgeführt. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrollgruppe wiesen die CPT-

behandelten Zellen eine auffällig hohe p21-GFP-Expression auf. Zudem fielen große, morphologisch auffällige Zellen sowie solche auf, die zellzyklisch nicht mehr klassifizierbar waren. In einigen Zellen waren die typischen Merkmale aktiver Zellzyklusphasen weitgehend verschwunden. In beiden CPT-Konzentrationen wurden vermehrt Zellen mit stark erhöhter p21-GFP-Expression sowie einzelne Zelltodereignisse beobachtet. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass CPT in höherer Konzentration zu einer zunehmend heterogenen Zellantwort führt, was den zweiten Peak in der durchflusszytometrischen Analyse plausibel erklären könnte. Die hier durchgeführten Versuche liefern wertvolle Momentaufnahmen der p21-GFP-Expression 48 h nach CPT-Behandlung. Ein vielversprechender nächster Schritt wäre daher die Durchführung eines vergleichbaren *Live cell imaging* Experiments über denselben Zeitraum. Ein solcher Versuchsaufbau würde es ermöglichen, die p21-GFP-Expressionsverläufe unter CPT-Einfluss mit denen nach Röntgenschädigung zu vergleichen und Rückschlüsse auf Unterschiede in der Ausprägung und Zellzyklusabhängigkeit der p21-Antwort zu ziehen. Aufgrund des hohen experimentellen Aufwands und begrenzter zeitlicher Ressourcen konnte diese Untersuchung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr realisiert werden. Sie stellt jedoch eine logische und inhaltlich bedeutsame Erweiterung dar, die im Rahmen einer zukünftigen Folgearbeit angestrebt werden sollte.

5.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit liefert einen Einblick in die dynamische p21-GFP-Expression als Reaktion auf DNA-Schädigung durch unterschiedliche zelltoxische Einflüsse wie Röntgenbestrahlung und einem Topoisomerase-I Hemmer. Sowohl die durchflusszytometrischen Analysen als auch die *Live cell imaging* Versuche verdeutlichen, dass p21 nicht nur als unmittelbarer Sensor zellulären Stresses fungiert, sondern auch eine zentrale Schnittstelle zwischen Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz bildet. Die Untersuchungen zeigen, dass p21-Dynamiken spezifisch auf Art und Dosis der Schädigung reagieren. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung mit der p21-GFP-Expression beobachtet werden. Trotz methodischer Herausforderungen konnten jedoch reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass p21-GFP in Zukunft ein vielversprechender Biomarker für die Detektion von DNA-Schäden sein könnte.

Nachfolgende Arbeiten sollten die hier aufgezeigten Ansätze weiterverfolgen, um die Funktion, Regulation, Expression und Dynamik von p21 in unterschiedlichen Kontexten weiter aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas T, Dutta A.** p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400-414. doi:10.1038/nrc2657
- Abugable AA, Antar S, El-Khamisy SF.** Chromosomal single-strand break repair and neurological disease: Implications on transcription and emerging genomic tools. *DNA Repair (Amst).* 2024;135:103629. doi:10.1016/j.dnarep.2024.103629
- Alanazi N, Alanazi R, Algawati M, Alzahrani K, Alodhayb AN.** Effect of Gold Nanoparticle Radiosensitization on DNA Damage Using a Quartz Tuning Fork Sensor. *Micromachines (Basel).* 2023;14(10):1963. Published 2023 Oct 21. doi:10.3390/mi14101963
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002. DNA Repair. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26879/>
- Al Bitar S, Gali-Muhtasib H.** The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p21^{cip1/waf1} in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. *Cancers (Basel).* 2019;11(10):1475. Published 2019 Sep 30. doi:10.3390/cancers11101475
- Amador V, Ge S, Santamaría PG, Guardavaccaro D, Pagano M.** APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell.* 2007;27(3):462-473. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.013
- Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M, Okamoto T.** Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J Biol Chem.* 2001;276(46):42971-42977. doi:10.1074/jbc.M106460200
- Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S.** Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J.* 1999;18(5):1223-1234. doi:10.1093/emboj/18.5.1223
- Bahreyni-Toossi MT, Azimian H, Aghaee-Bakhtiari SH, Mahmoudi M, Sadat-Darbandi M, Zafari N.** Radiation-induced DNA damage and altered expression of p21, cyclin D1 and Mre11 genes in human fibroblast cell lines with different radiosensitivity. *Mutat Res.* 2021;823:111760. doi:10.1016/j.mrfmmm.2021.111760
- Bargonetti J, Manfredi JJ.** Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol.* 2002;14(1):86-91. doi:10.1097/00001622-200201000-00015
- Barr AR, Cooper S, Heldt FS, Butera F, Stoy H, Mansfeld J, Novák B, Bakal C.** DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nat Commun.* 2017;8:14728. Published 2017 Mar 20. doi:10.1038/ncomms14728

- Bartek J, Lukas J.** DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(2):238-245. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.009
- Bellucci L, Dalvai M, Kocanova S, Moutahir F, Bystricky K.** Activation of p21 by HDAC inhibitors requires acetylation of H2A.Z. *PLoS One.* 2013;8(1):e54102. doi:10.1371/journal.pone.0054102
- Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A.** Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25752-25757. doi:10.1074/jbc.M301774200
- Bruning JB, Shamoo Y.** Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure.* 2004;12(12):2209-2219. doi:10.1016/j.str.2004.09.018
- Büchel S.** Charakterisierung der p21-GFP-Expression in Genom-editierten humanen Zelllinien. 09.09.2022. urn:nbn:de:hbz:061-20220919-105715-9
- Cazzalini O, Perucca P, Savio M, Necchi D, Bianchi L, Stivala LA, Ducommun B, Scovassi AI, Prosperi E.** Interaction of p21(CDKN1A) with PCNA regulates the histone acetyltransferase activity of p300 in nucleotide excision repair [published correction appears in *Nucleic Acids Res.* 2023 May 22;51(9):4694-4697. doi: 10.1093/nar/gkad264.]. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(5):1713-1722. doi:10.1093/nar/gkn014
- Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E.** Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res.* 2010;704(1-3):12-20. doi:10.1016/j.mrrev.2010.01.009
- Celis JE, Celis A.** Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(10):3262-3266. doi:10.1073/pnas.82.10.3262
- Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB.** Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):4291-4296. doi:10.1073/pnas.97.8.4291
- Charrier-Savournin FB, Château MT, Gire V, Sedivy J, Piette J, Dulic V.** p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. *Mol Biol Cell.* 2004;15(9):3965-3976. doi:10.1091/mbc.e03-12-0871
- Chatterjee N, Walker GC.** Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58(5):235-263. doi:10.1002/em.22087
- Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A.** Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature.* 1995;374(6520):386-388. doi:10.1038/374386a0

Chen J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A. Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol.* 1996;16(9):4673-4682. doi:10.1128/MCB.16.9.4673

Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle.* 2006;5(12):1313-1319. doi:10.4161/cc.5.12.2863

Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010;40(2):179-204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019

Ciznadija D, Zhu XH, Koff A. Hdm2- and proteasome-dependent turnover limits p21 accumulation during S phase. *Cell Cycle.* 2011;10(16):2714-2723. doi:10.4161/cc.10.16.16725

Cooper MP, Balajee AS, Bohr VA. The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair In vitro and In vivo. *Mol Biol Cell.* 1999;10(7):2119-2129. doi:10.1091/mbc.10.7.2119

Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol.* 2001;38(2):179-193. doi:10.1016/s0037-1963(01)90051-4

Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994;8(21):2540-2551. doi:10.1101/gad.8.21.2540

Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1471(1):M43-M56. doi:10.1016/s0304-419x(00)00019-6

Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell.* 1994;76(6):1013-1023. doi:10.1016/0092-8674(94)90379-4

el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.* 1998;8(5):345-357. doi:10.1006/scbi.1998.0097

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993;75(4):817-825. doi:10.1016/0092-8674(93)90500-p

Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan ZQ, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M, Hurwitz J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(18):8655-8659. doi:10.1073/pnas.91.18.8655

Gartel AL. The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. *Leuk Res.* 2005;29(11):1237-1238. doi:10.1016/j.leukres.2005.04.023

Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(8):639-649.

- Gartel AL, Tyner AL.** Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* 1999;246(2):280-289. doi:10.1006/excr.1998.4319
- Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM.** p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med.* 2017;23(4):310-319. doi:10.1016/j.molmed.2017.02.001
- Gervais JL, Seth P, Zhang H.** Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273(30):19207-19212. doi:10.1074/jbc.273.30.19207
- Gratchev A.** The nucleotide excision repair of DNA in human cells and its association with xeroderma pigmentosum. *Adv Exp Med Biol.* 2008;637:113-119. doi:10.1007/978-0-387-09599-8_12
- Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J.** Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell.* 1996;87(2):297-306. doi:10.1016/s0092-8674(00)81347-1
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ.** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 1993;75(4):805-816. doi:10.1016/0092-8674(93)90499-g
- Hasan S, Hassa PO, Imhof R, Hottiger MO.** Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature.* 2001;410(6826):387-391. doi:10.1038/35066610
- Havens CG, Walter JC.** Docking of a specialized PIP Box onto chromatin-bound PCNA creates a degron for the ubiquitin ligase CRL4Cdt2. *Mol Cell.* 2009;35(1):93-104. doi:10.1016/j.molcel.2009.05.012
- He S, Sharpless NE.** Senescence in Health and Disease. *Cell.* 2017;169(6):1000-1011. doi:10.1016/j.cell.2017.05.015
- Hevener K, Verstak TA, Lutat KE, Riggsbee DL, Mooney JW.** Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. *Acta Pharm Sin B.* 2018;8(6):844-861. doi:10.1016/j.apsb.2018.07.008
- Hirsch-Kaufmann M, Schweiger M, Schweiger MR.** *Biologie und molekulare Medizin*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2009. ISBN 9783137065074.
- Hoeflerlin LA, Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA.** Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress. *Genes Cancer.* 2011;2(9):889-899. doi:10.1177/1947601911432495
- Horn F, Moc I, Ziegler P, Berghold S.** *Biochemie des Menschen*, 7. korrigierte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2019. ISBN 9783132427433.

Hsu CH, Altschuler SJ, Wu LF. Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. *Cell*. 2019;178(2):361-373.e12. doi:10.1016/j.cell.2019.05.041

ibidi. Instructions micro-Insert 4 Well FulTrac Version 1.0. 09.05.2016. Hg. v. ibidi, Martinsried.

Iyama T, Wilson DM 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 2013;12(8):620-636. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015

Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. 2002;23(5):687-696. doi:10.1093/carcin/23.5.687

Jänicke RU, Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K. The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle*. 2007;6(4):407-413. doi:10.4161/cc.6.4.3855

Jakob B, Scholz M, Taucher-Scholz G. Characterization of CDKN1A (p21) binding to sites of heavy-ion-induced damage: colocalization with proteins involved in DNA repair. *Int J Radiat Biol*. 2002;78(2):75-88. doi:10.1080/09553000110090007

Jin Y, Lee H, Zeng SX, Dai MS, Lu H. MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *EMBO J*. 2003;22(23):6365-6377. doi:10.1093/emboj/cdg600

Jin YH, Yoo KJ, Lee YH, Lee SK. Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J Biol Chem*. 2000;275(39):30256-30263. doi:10.1074/jbc.M001902200

Jónsson ZO, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays*. 1997;19(11):967-975. doi:10.1002/bies.950191106

Jpablo cad. Diagrama Mitosis.svg. 10.05.2009. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schemazeichnung_Mitose.svg

Jung YS, Qian Y, Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*. 2010;22(7):1003-1012. doi:10.1016/j.cellsig.2010.01.013

Kalfalah FM, Berg E, Christensen MO, Linka RM, Dirks WG, Boege F, Mielke C. Spatio-temporal regulation of the human licensing factor Cdc6 in replication and mitosis. *Cell Cycle*. 2015;14(11):1704-1715. doi:10.1080/15384101.2014.1000182

Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2016;42:63-71. doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008

Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*. 1997;14(6):629-640. doi:10.1038/sj.onc.1200886

Kelman Z, Hurwitz J. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism?. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(7):236-238. doi:10.1016/s0968-0004(98)01223-7

- Kim Y, Starostina NG, Kipreos ET.** The CRL4Cdt2 ubiquitin ligase targets the degradation of p21Cip1 to control replication licensing. *Genes Dev.* 2008;22(18):2507-2519. doi:10.1101/gad.1703708
- Kisielewska J, Lu P, Whitaker M.** GFP-PCNA as an S-phase marker in embryos during the first and subsequent cell cycles. *Biol Cell.* 2005;97(3):221-229. doi:10.1042/BC20040093
- Koike M, Yutoku Y, Koike A.** Accumulation of p21 proteins at DNA damage sites independent of p53 and core NHEJ factors following irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(1):39-43. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.032
- Königshoff M, Brandenburger T.** Kurzlehrbuch Biochemie, 4. vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2018. ISBN 9783132414907.
- Koolman J, Röhm KH.** Taschenatlas Biochemie des Menschen, 5. Vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2019. ISBN 9783132417403.
- Kostyrko K, Bosshard S, Urban Z, Mermod N.** A role for homologous recombination proteins in cell cycle regulation. *Cell Cycle.* 2015;14(17):2853-2861. doi:10.1080/15384101.2015.1049784
- Kroker AJ, Bruning JB.** p21 Exploits Residue Tyr151 as a Tether for High-Affinity PCNA Binding. *Biochemistry.* 2015;54(22):3483-3493. doi:10.1021/acs.biochem.5b00241
- Kumaravel TS, Bharathy K, Kudoh S, Tanaka K, Kamada N.** Expression, localization and functional interactions of Ku70 subunit of DNA-PK in peripheral lymphocytes and Nalm-19 cells after irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1998;74(4):481-489. doi:10.1080/095530098141357
- Kumari R, Jat P.** Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:645593. Published 2021 Mar 29. doi:10.3389/fcell.2021.645593
- LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E.** New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 1997;11(7):847-862. doi:10.1101/gad.11.7.847
- Lane DP.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15-16. doi:10.1038/358015a0
- Leonhardt H, Rahn HP, Weinzierl P, Sporbart A, Cremer T, Zink D, Cardoso MC.** Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol.* 2000;149(2):271-280. doi:10.1083/jcb.149.2.271
- Li H, Xie B, Rahmeh A, Zhou Y, Lee MY.** Direct interaction of p21 with p50, the small subunit of human DNA polymerase delta. *Cell Cycle.* 2006;5(4):428-436. doi:10.4161/cc.5.4.2425

- Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B.** Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*. 1994;371(6497):534-537. doi:10.1038/371534a0
- Li Y, Dowbenko D, Lasky LA.** AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem*. 2002;277(13):11352-11361. doi:10.1074/jbc.M109062200
- Luo Y, Hurwitz J, Massagué J.** Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*. 1995;375(6527):159-161. doi:10.1038/375159a0
- Mailand N, Gibbs-Seymour I, Bekker-Jensen S.** Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(5):269-282. doi:10.1038/nrm3562
- Mauro M, Rego MA, Boisvert RA, Esashi F, Cavallo F, Jasin M, Howlett NG.** p21 promotes error-free replication-coupled DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(17):8348-8360. doi:10.1093/nar/gks612
- McKinnon KM.** Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.1-5.1.11. Published 2018 Feb 21. doi:10.1002/cpim.40
- Miller PG, Wang YI, Swan G, Shuler ML.** A simple cell transport device keeps culture alive and functional during shipping. *Biotechnol Prog*. 2017;33(5):1257-1266. doi:10.1002/btpr.2512
- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S.** PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 2007;129(4):665-679. doi:10.1016/j.cell.2007.05.003
- Nakanishi M, Robetorye RS, Adami GR, Pereira-Smith OM, Smith JR.** Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *EMBO J*. 1995;14(3):555-563. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07031.x
- Neganova I, Vilella F, Atkinson SP, Lloret M, Passos JF, von Zglinicki T, O'Connor JE, Burks D, Jones R, Armstrong L, Lako M.** An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2011;29(4):651-659. doi:10.1002/stem.620
- Niculescu AB 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI.** Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication [published correction appears in *Mol Cell Biol* 1998 Mar;18(3):1763]. *Mol Cell Biol*. 1998;18(1):629-643. doi:10.1128/MCB.18.1.629
- Nordheim A, Knippers R, Dröge P, Meister G, Schiebel E, Vingron M, Walter J.** *Molekulare Genetik*, 11. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2018. ISBN 9783132426375.
- Ocker M, Schneider-Stock R.** Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(7-8):1367-1374. doi:10.1016/j.biocel.2007.03.001

- Ogryzko VV, Wong P, Howard BH.** WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 1997;17(8):4877-4882. doi:10.1128/MCB.17.8.4877
- Pan ZQ, Reardon JT, Li L, Flores-Rozas H, Legerski R, Sancar A, Hurwitz J.** Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem.* 1995;270(37):22008-22016. doi:10.1074/jbc.270.37.22008
- Perucca P, Cazzalini O, Mortusewicz O, Necchi D, Savio M, Nardo T, Stivala LA, Leonhardt H, Cardoso MC, Prosperi E.** Spatiotemporal dynamics of p21CDKN1A protein recruitment to DNA-damage sites and interaction with proliferating cell nuclear antigen. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 8):1517-1527. doi:10.1242/jcs.02868
- Podust VN, Podust LM, Goubin F, Ducommun B, Hübscher U.** Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Biochemistry.* 1995;34(27):8869-8875. doi:10.1021/bi00027a039
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J.** Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell.* 1994;78(1):59-66. doi:10.1016/0092-8674(94)90572-x
- Pommier Y, Barcelo JM, Rao VA, Rao VA, Sordet O, Jobson AG, Thibaut L, Miao ZH, Seiler JA, Zhang H, Marchand C, Agama K, Nitiss JL, Redon C.** Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2006;81:179-229. doi:10.1016/S0079-6603(06)81005-6
- Pommier Y, Redon C, Rao VA, Seiler JA, Sordet O, Takemura H, Antony S, Meng L, Liao Z, Kohlhagen G, Zhang H, Kohn KW.** Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res.* 2003;532(1-2):173-203. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.08.016
- Punchihewa C, Inoue A, Hishiki A, Fujikawa Y, Connelly M, Evison B, Shao Y, Heath R, Kuraoka I, Rodrigues P, Hashimoto H, Kawanishi M, Sato M, Yagi T, Fujii N.** Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. *J Biol Chem.* 2012;287(17):14289-14300. doi:10.1074/jbc.M112.353201
- Radhakrishnan SK, Feliciano CS, Najmabadi F, Haegerbarth A, Kandel ES, Tyner AL, Gartel AL.** Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene.* 2004;23(23):4173-4176. doi:10.1038/sj.onc.1207571
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R.** Duale Reihe Biochemie, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2016. ISBN 9783131253545.

- Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S.** Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21(16):5644-5657. doi:10.1128/MCB.21.16.5644-5657.2001
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39-85. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723
- Sheng C, Mendler IH, Rieke S, Snyder P, Jentsch M, Friedrich D, Drossel B, Loewer A.** PCNA-Mediated Degradation of p21 Coordinates the DNA Damage Response and Cell Cycle Regulation in Individual Cells. *Cell Rep.* 2019;27(1):48-58.e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.031
- Sherr CJ, Roberts JM.** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995;9(10):1149-1163. doi:10.1101/gad.9.10.1149
- Shivji MK, Grey SJ, Strausfeld UP, Wood RD, Blow JJ.** Cip1 inhibits DNA replication but not PCNA-dependent nucleotide excision-repair. *Curr Biol.* 1994;4(12):1062-1068. doi:10.1016/s0960-9822(00)00244-x
- Soria G, Speroni J, Podhajcer OL, Prives C, Gottifredi V.** p21 differentially regulates DNA replication and DNA-repair-associated processes after UV irradiation. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 19):3271-3282. doi:10.1242/jcs.027730
- Stewart-Ornstein J, Lahav G.** Dynamics of CDKN1A in Single Cells Defined by an Endogenous Fluorescent Tagging Toolkit. *Cell Rep.* 2016;14(7):1800-1811. doi:10.1016/j.celrep.2016.01.045
- Stivala LA, Riva F, Cazzalini O, Savio M, Prosperi E.** p21(waf1/cip1)-null human fibroblasts are deficient in nucleotide excision repair downstream the recruitment of PCNA to DNA repair sites. *Oncogene.* 2001;20(5):563-570. doi:10.1038/sj.onc.1204132
- Suzuki A, Tsutomi Y, Miura M, Akahane K.** Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene.* 1999;18(5):1239-1244. doi:10.1038/sj.onc.1202409
- Tanaka H, Yamashita T, Asada M, Mizutani S, Yoshikawa H, Tohyama M.** Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J Cell Biol.* 2002;158(2):321-329. doi:10.1083/jcb.200202071
- Ticli G, Cazzalini O, Stivala LA, Prosperi E.** Revisiting the Function of p21CDKN1A in DNA Repair: The Influence of Protein Interactions and Stability. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7058. Published 2022 Jun 24. doi:10.3390/ijms23137058
- Tillhon M, Cazzalini O, Dutto I, A. L, Prosperi E.** p21CDKN1A and DNA Repair Systems: Recent Findings and Future Perspectives. *New Research Directions in DNA Repair.* InTech; 2013. doi: 10.5772/54173

Tillhon M, Cazzalini O, Nardo T, Necchi D, Sommatitis S, Stivala LA, Scovassi AI, Prosperi E. p300/CBP acetyl transferases interact with and acetylate the nucleotide excision repair factor XPG. *DNA Repair (Amst)*. 2012;11(10):844-852. doi:10.1016/j.dnarep.2012.08.001

Tran AP, Tralie CJ, Reyes J, Moosmüller C, Belkhatir Z, Kevrekidis IG, Levine AJ, Deasy JO, Tannenbaum AR. Long-term p21 and p53 dynamics regulate the frequency of mitosis events and cell cycle arrest following radiation damage. *Cell Death Differ*. 2023;30(3):660-672. doi:10.1038/s41418-022-01069-x

Tomicic MT, Kaina B. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1835(1):11-27. doi:10.1016/j.bbcan.2012.09.002

Touitou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J*. 2001;20(10):2367-2375. doi:10.1093/emboj/20.10.2367

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 1994;78(1):67-74. doi:10.1016/0092-8674(94)90573-8

Ukomadu C, Dutta A. p21-dependent inhibition of colon cancer cell growth by mevastatin is independent of inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43586-43594. doi:10.1074/jbc.M307194200

Vilenchik MM, Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12871-12876. doi:10.1073/pnas.2135498100

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994;369(6481):574-578. doi:10.1038/369574a0

Wang ST, Ho HJ, Lin JT, Shieh JJ, Wu CY. Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis*. 2017 Feb 23;8(2):e2626. doi:10.1038/cddis.2016.472. PMID: 28230855; PMCID: PMC5386458.

Warbrick E. PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays*. 1998;20(3):195-199. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199803)20:3<195::AID-BIES2>3.0.CO;2-R

Warbrick E, Lane DP, Glover DM, Cox LS. A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr Biol*. 1995;5(3):275-282. doi:10.1016/s0960-9822(95)00058-3

Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1988;35:95-125. doi:10.1016/s0079-6603(08)60611-x

Wulf GM, Liou YC, Ryo A, Lee SW, Lu KP. Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 2002;277(50):47976-47979. doi:10.1074/jbc.C200538200

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993;366(6456):701-704. doi:10.1038/366701a0

Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene.* 1999;18(5):1131-1138. doi:10.1038/sj.onc.1202426

Zheng K, He Z, Kitazato K, Wang Y. Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. *Theranostics.* 2019;9(1):104-125. Published 2019 Jan 1. doi:10.7150/thno.30308

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zellzyklus.....	1
Abb. 2 M-Phase	3
Abb. 3 Cycline und CDKs während der Zellzyklus	5
Abb. 4 CRISPR/Cas9 Exon	14
Abb. 5 Western-Blot.....	15
Abb. 6 Aufbau des <i>micro-Insert 4 Well FulTrac</i>	28
Abb. 7 durchflusszytometrische Analyse	34
Abb. 8 Durchschnittliche Fluoreszenz aller Versuche	35
Abb. 9 PCNA-Verteilung über einen kompletten Zellzyklus.....	38
Abb. 10 G2ng-G1ng.....	40
Abb. 11 G2ng-G1g.....	41
Abb. 12 G2g-G1g.....	42
Abb. 13 mitotische Katastrophe	43
Abb. 14 Balkendiagramm – Länge der G1-Phase und Anzahl der Ereignisse	44
Abb. 15 Aufnahmen von CPT-behandelten Zellen am Konfokalen Fluoreszenzmikroskop.....	47

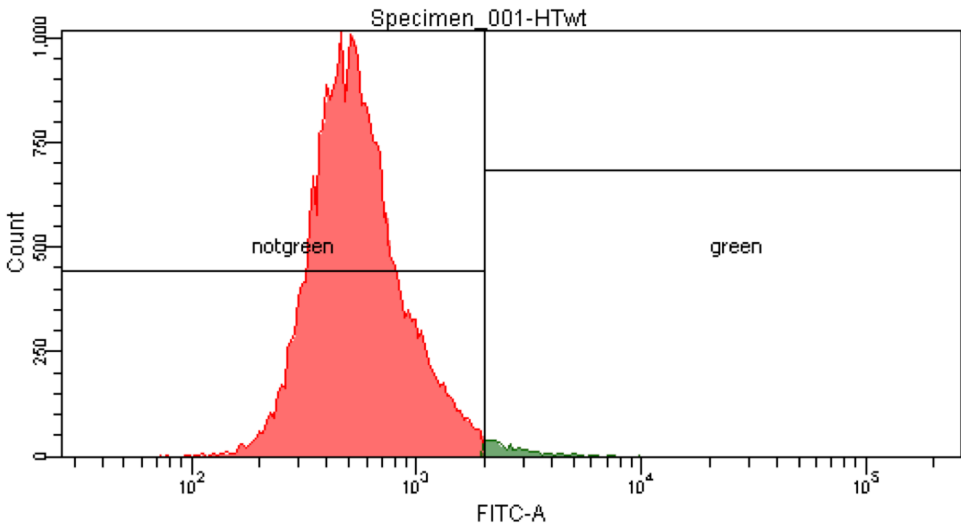
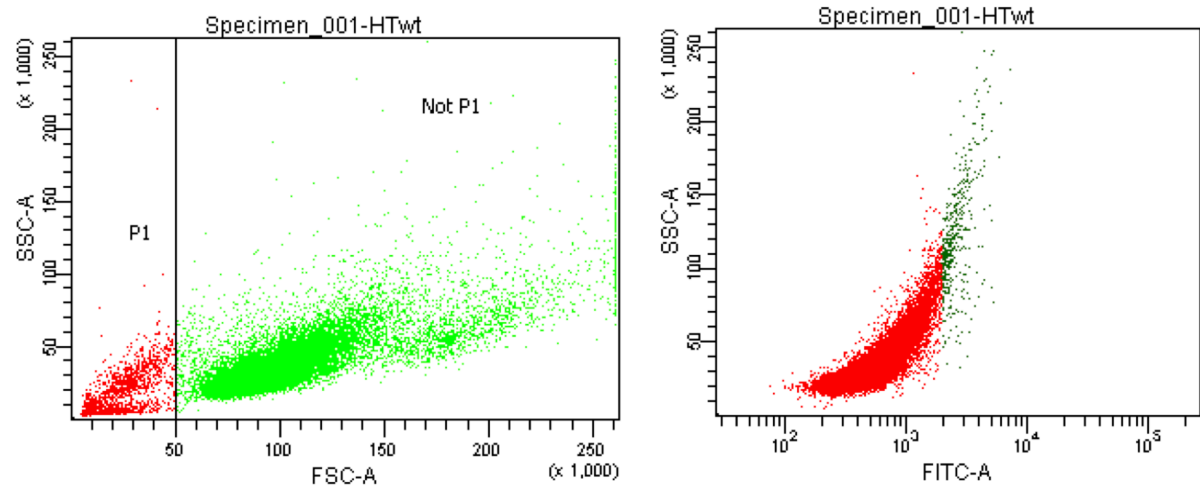
8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Zelllinie	7
Tab. 2 Medien für die Zellkultur	7
Tab. 3 Lösungen und Reagenzien.....	18
Tab. 4 weitere Materialien	18
Tab. 5 Chemikalien.....	18
Tab. 6 Verbrauchsmaterialien.....	19
Tab. 7 Geräte.....	20
Tab. 8 Software	21
Tab. 9 Durchflusszytometrie Röntgen, Verdünnung.....	24
Tab. 10 Durchflusszytometrie Röntgendosis	25
Tab. 11 Durchflusszytometrie CPT, Verdünnung	26
Tab. 12 Durchflusszytometrie CPT-Dosis.....	27
Tab. 13 <i>Live cell imaging</i> – Verdünnung	29
Tab. 14 <i>Live cell imaging</i> – Röntgendosis	29
Tab. 15 <i>Live cell imaging</i> – Konfokales Fluoreszenzmikroskop	30
Tab. 16 CPT-Verdünnung.....	31
Tab. 17 CPT-Dosis	32

9 Anhang

9.1 Durchflusszytometrische Analyse der mittleren Fluoreszenz nach Röntgenbestrahlung

FACSDiva Version 6.1.3

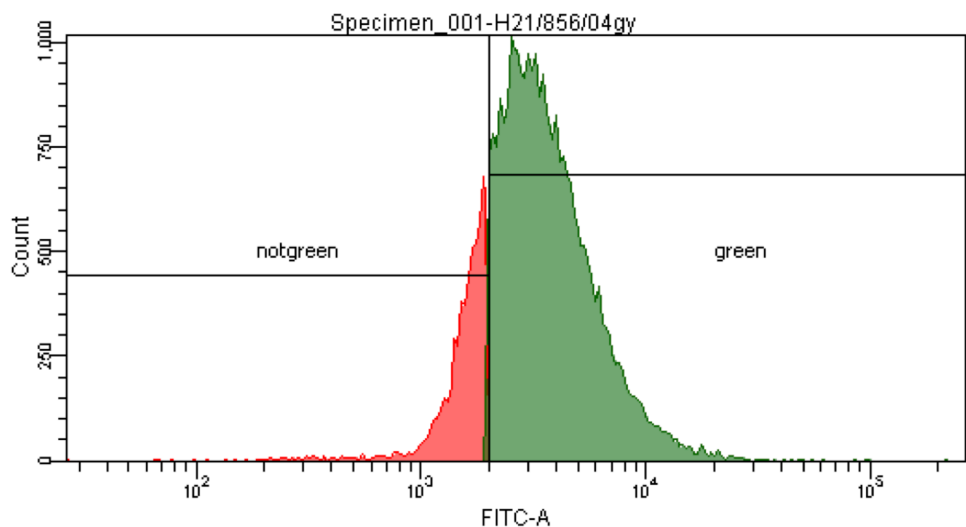
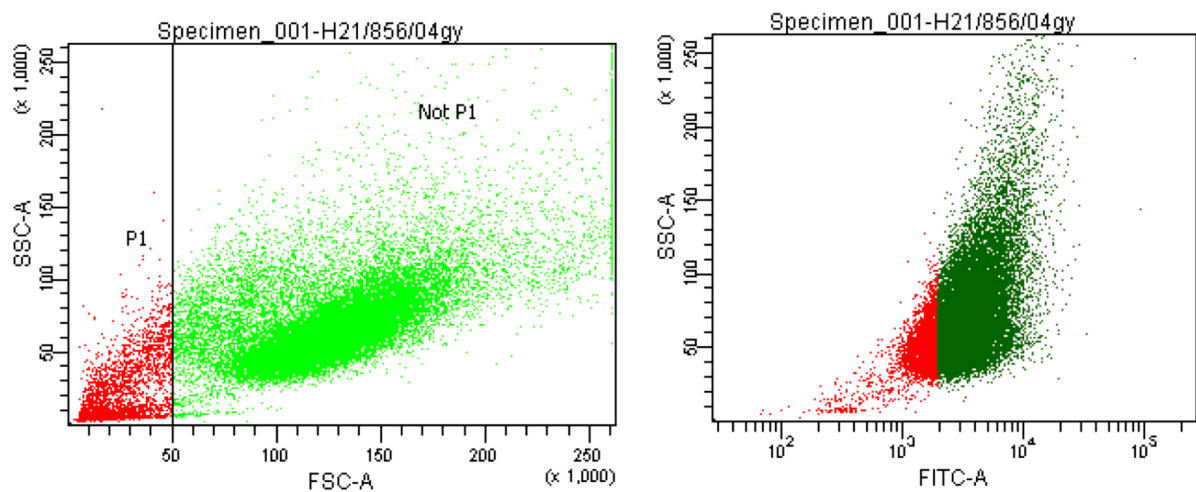


Tube: HTwt			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	30,000	###	100.0
■ P1	1,895	6.3	6.3
■ Not P1	28,121	93.7	93.7
■ notgreen	27,686	98.5	92.3
■ green	435	1.5	1.5

Experiment Name: P21 XRAY 25Okt19
Specimen Name: Specimen_001
Tube Name: HTwt
Record Date: Oct 25, 2019 10:43:06 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
■ All Events	30,000	###	617
■ P1	1,895	6.3	262
■ Not P1	28,121	93.7	641
■ notgreen	27,686	98.5	606
■ green	435	1.5	2,845

FACSDiva Version 6.1.3
FACSDiva Version 6.1.3



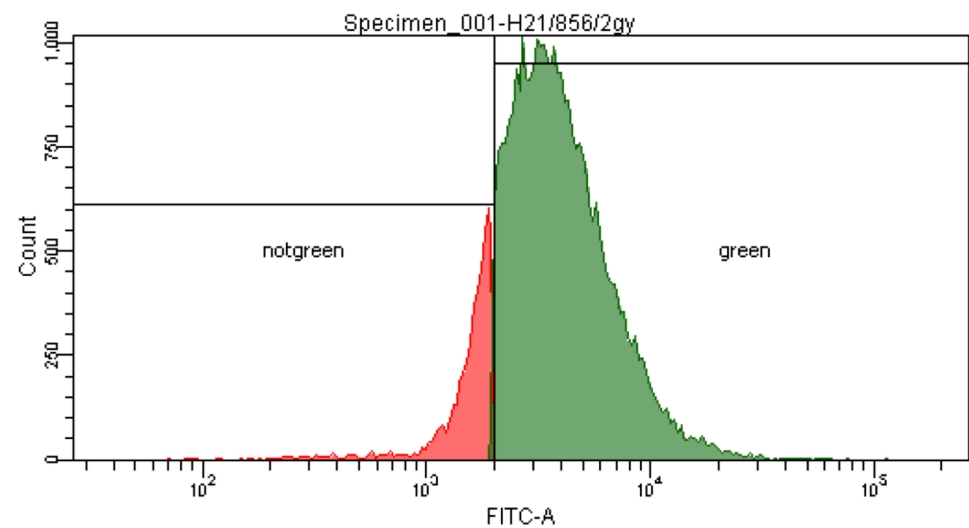
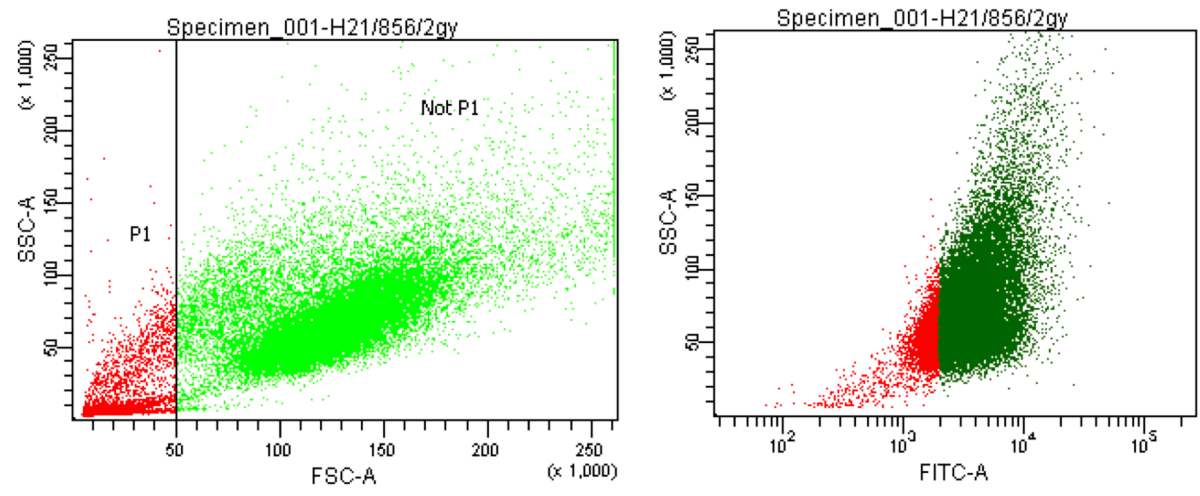
Tube: H21/856/04gy

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
P1	3,828	12.8	12.8
Not P1	26,226	87.4	87.4
notgreen	4,634	17.7	15.4
green	21,592	82.3	72.0

Experiment Name: P21 XRAY 25Okt19
Specimen Name: Specimen_001
Tube Name: H21/856/04gy
Record Date: Oct 25, 2019 10:34:19 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	30,000	###	3,437
P1	3,828	12.8	518
Not P1	26,226	87.4	3,859
notgreen	4,634	17.7	1,569
green	21,592	82.3	4,351

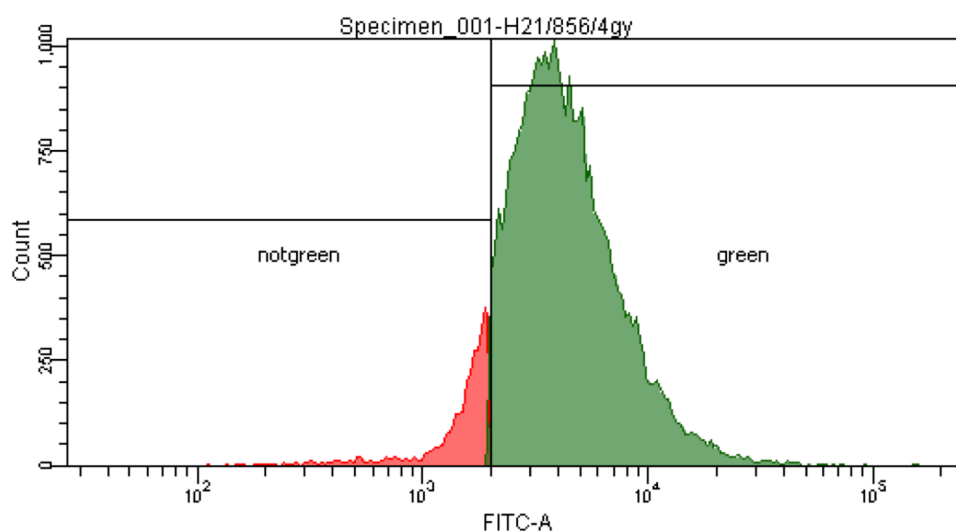
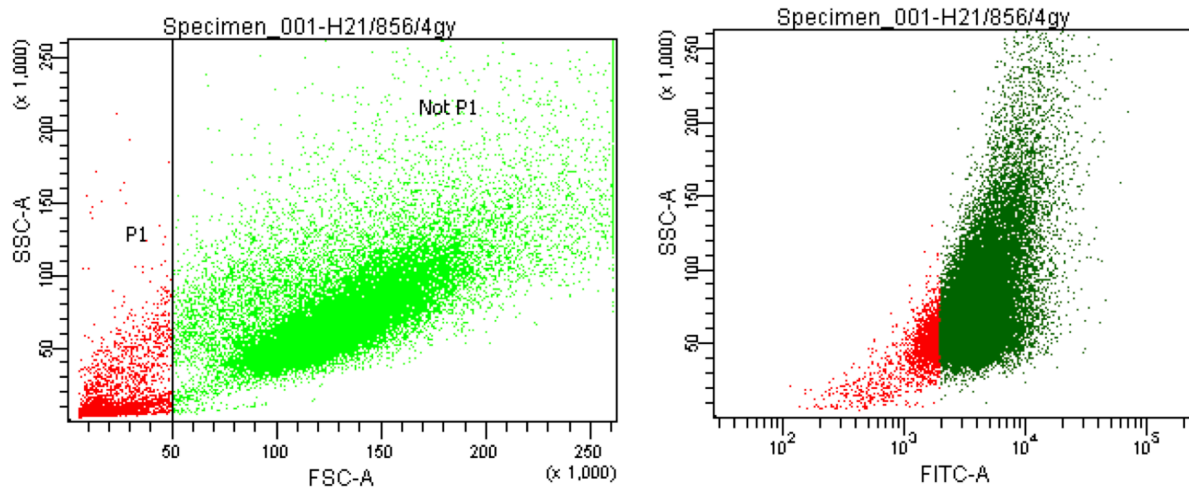
FACSDiva Version 6.1.3



Tube: H21/856/2gy			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
P1	3,383	11.3	11.3
Not P1	26,666	88.9	88.9
notgreen	3,592	13.5	12.0
green	23,074	86.5	76.9

Experiment Name: P21 XRAY 25Ok119			
Specimen Name: Specimen_001			
Tube Name: H21/856/2gy			
Record Date: Oct 25, 2019 10:35:01 AM			
Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	30,000	###	3,917
P1	3,383	11.3	533
Not P1	26,666	88.9	4,343
notgreen	3,592	13.5	1,568
green	23,074	86.5	4,775

FACSDiva Version 6.1.3



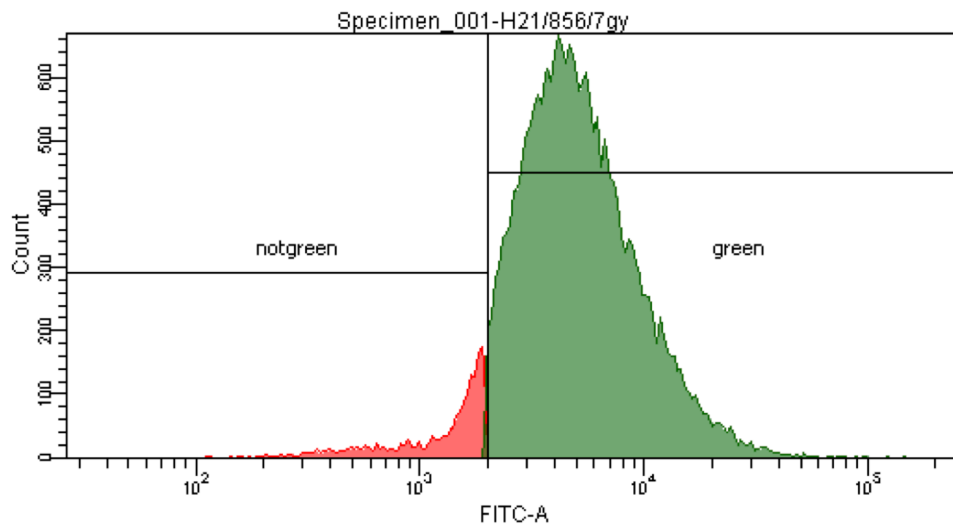
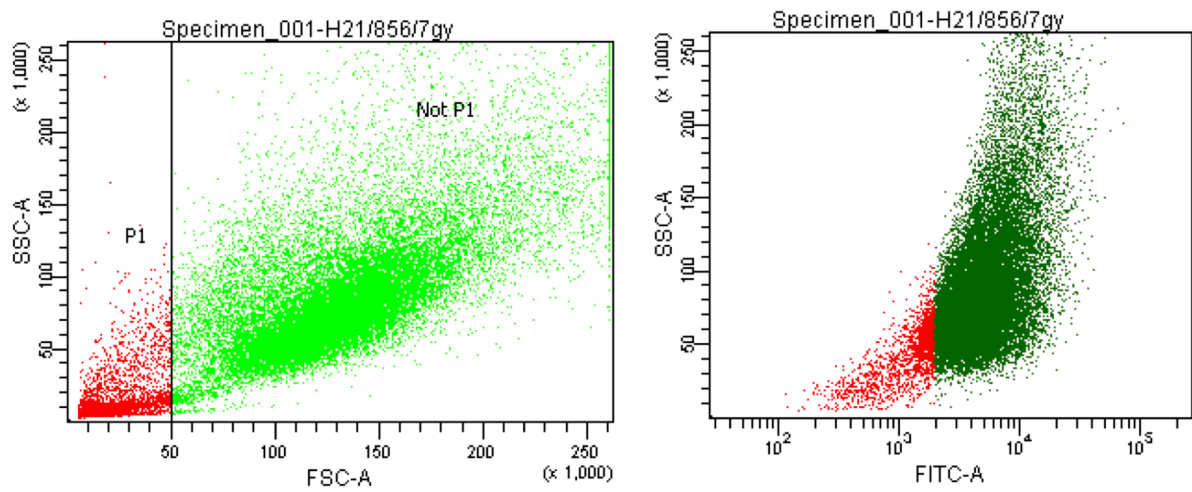
Tube: H21/856/4gy

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	30,000	###	100.0
■ P1	2,808	9.4	9.4
■ Not P1	27,233	90.8	90.8
■ notgreen	2,469	9.1	8.2
■ green	24,764	90.9	82.5

Experiment Name: P21 XRAY 25Okt19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H21/856/4gy
 Record Date: Oct 25, 2019 10:35:50 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
■ All Events	30,000	###	4,547
■ P1	2,808	9.4	578
■ Not P1	27,233	90.8	4,953
■ notgreen	2,469	9.1	1,527
■ green	24,764	90.9	5,294

FACSDiva Version 6.1.3



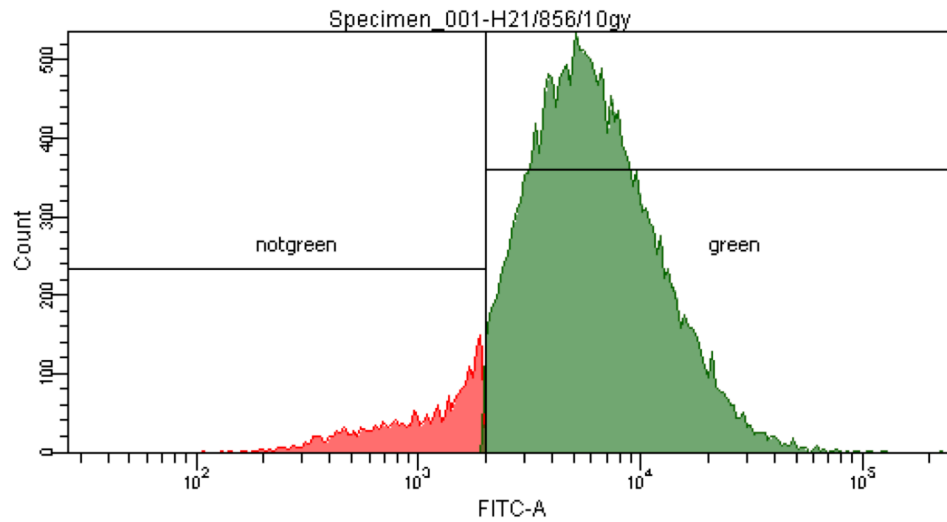
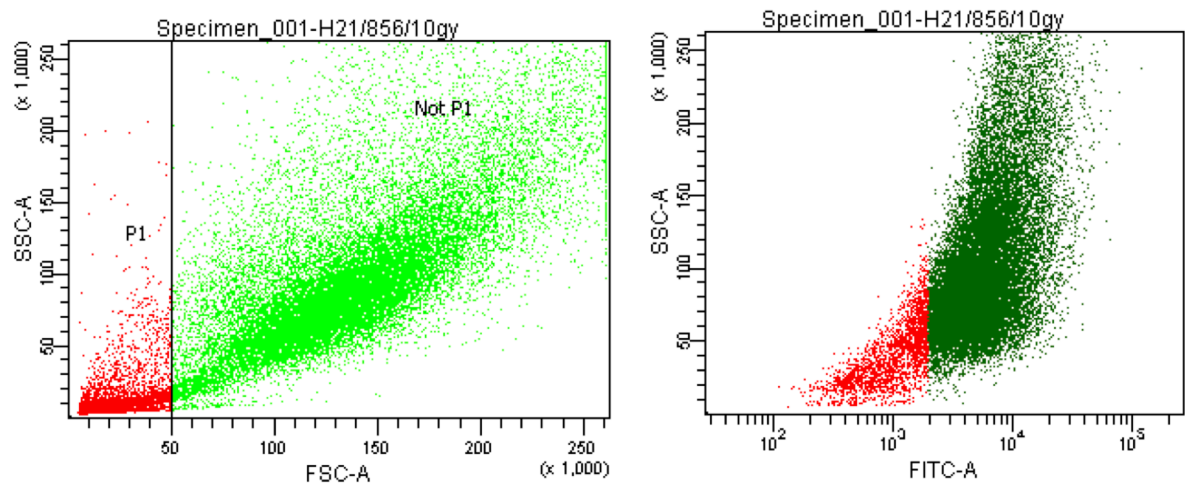
Tube: H21/856/7gy

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
P1	3,674	12.2	12.2
Not P1	26,370	87.9	87.9
notgreen	1,857	7.0	6.2
green	24,513	93.0	81.7

Experiment Name: P21 XRAY 25Okt19
Specimen Name: Specimen_001
Tube Name: H21/856/7gy
Record Date: Oct 25, 2019 10:37:22 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	30,000	###	5,388
P1	3,674	12.2	471
Not P1	26,370	87.9	6,066
notgreen	1,857	7.0	1,370
green	24,513	93.0	6,422

FACSDiva Version 6.1.3

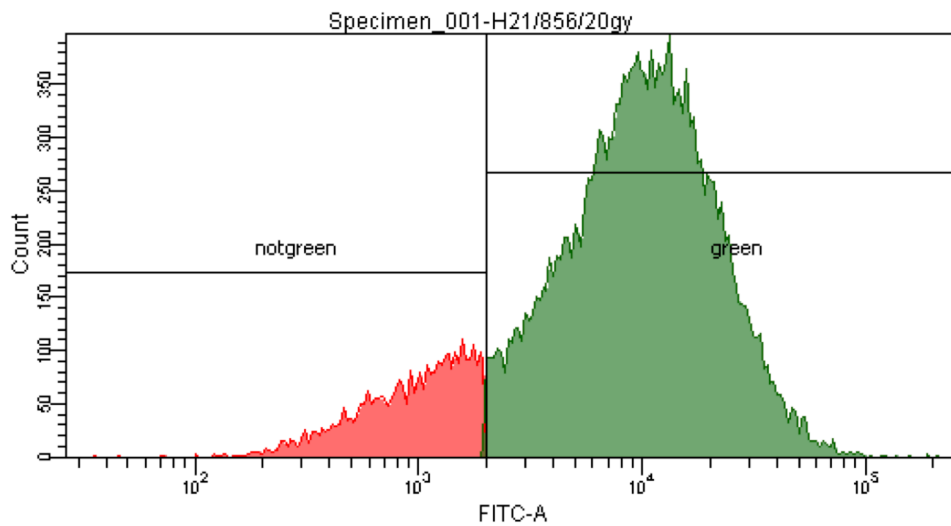
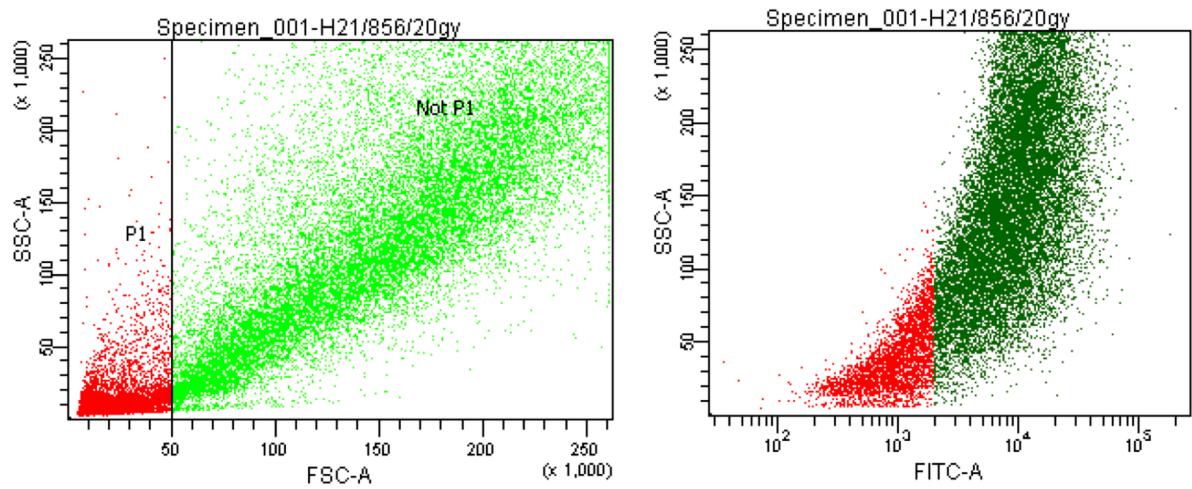


Tube: H21/856/10gy			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
P1	5,024	16.7	16.7
Not P1	25,033	83.4	83.4
notgreen	2,379	9.5	7.9
green	22,654	90.5	75.5

Experiment Name: P21 XRAY 250kt19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H21/856/10gy
 Record Date: Oct 25, 2019 10:38:53 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	30,000	###	6,162
P1	5,024	16.7	405
Not P1	25,033	83.4	7,306
notgreen	2,379	9.5	1,174
green	22,654	90.5	7,950

FACSDiva Version 6.1.3



Tube: H21/856/20gy

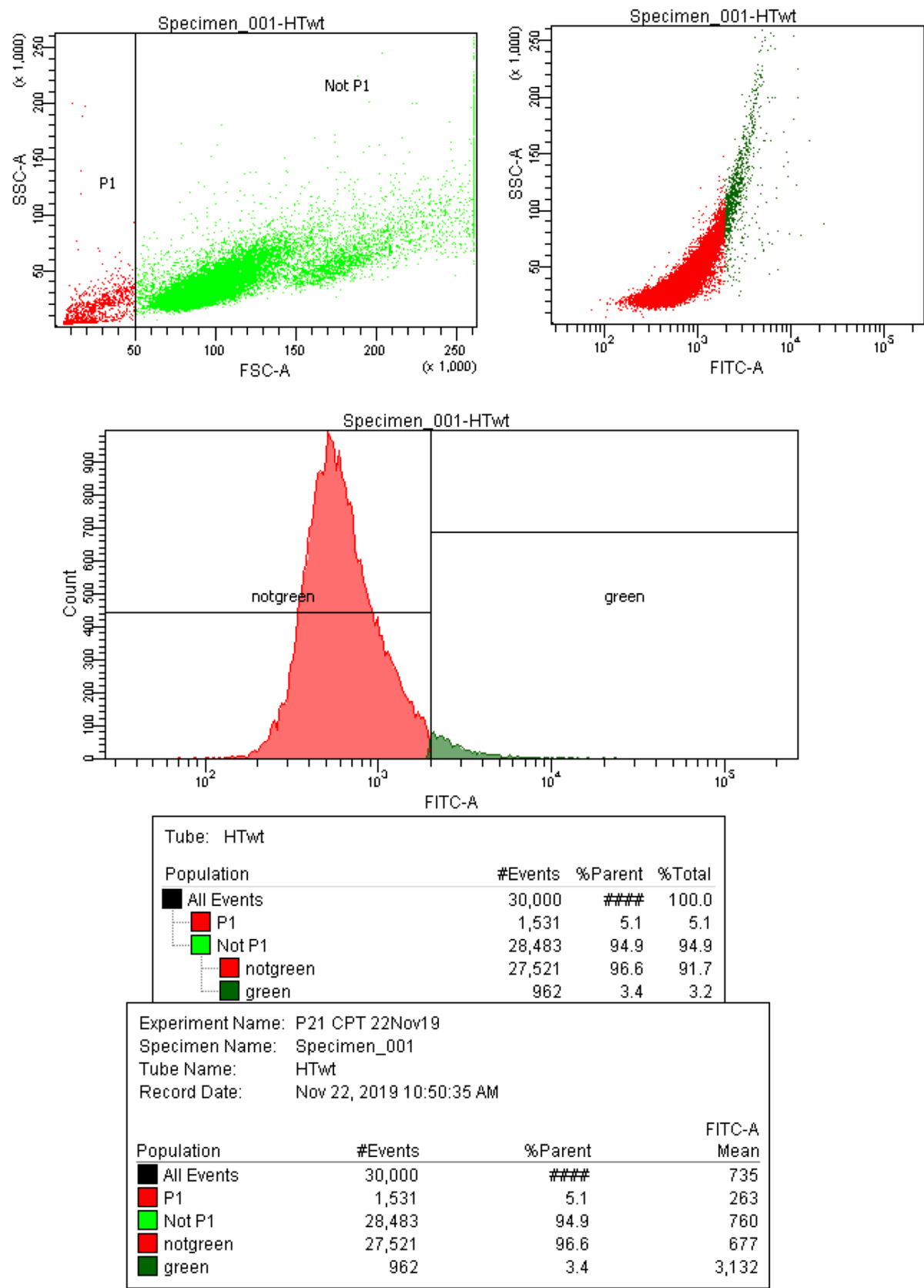
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
P1	7,495	25.0	25.0
Not P1	22,593	75.3	75.3
notgreen	3,299	14.6	11.0
green	19,294	85.4	64.3

Experiment Name: P21 XRAY 25Okt19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H21/856/20gy
 Record Date: Oct 25, 2019 10:47:02 AM

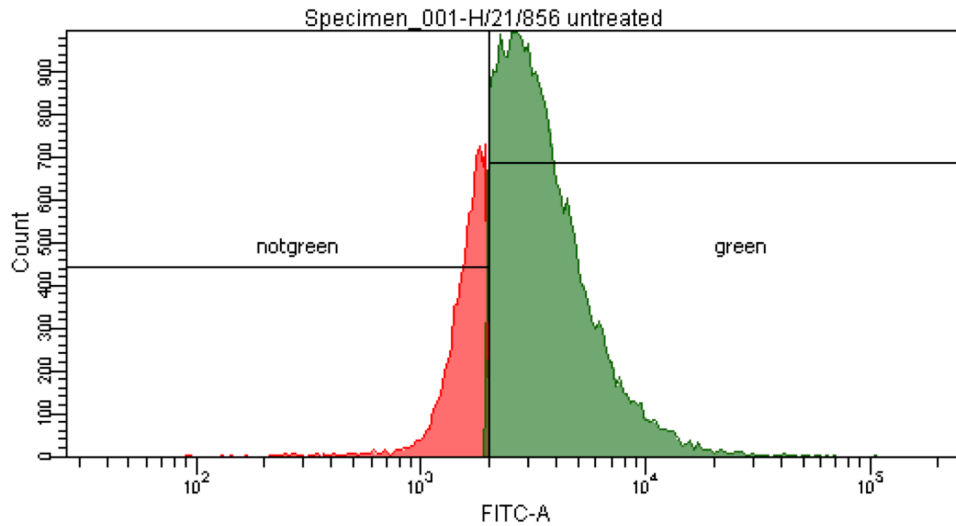
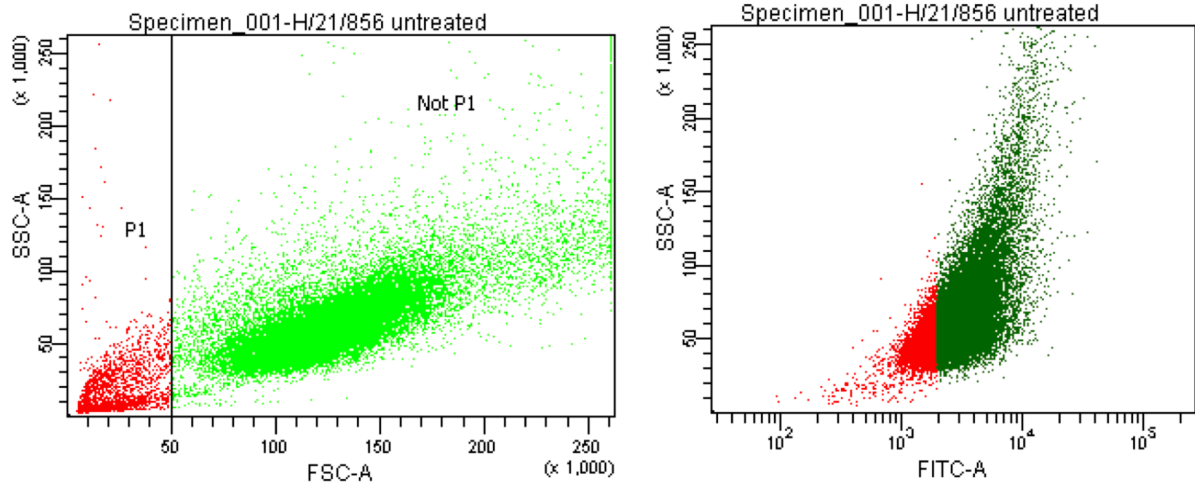
Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	30,000	###	8,732
P1	7,495	25.0	429
Not P1	22,593	75.3	11,457
notgreen	3,299	14.6	1,056
green	19,294	85.4	13,235

9.2 Durchflusszytometrische Analyse der mittleren Fluoreszenz nach CPT-Behandlung

FACSDiva Version 6.1.3



FACSDiva Version 6.1.3



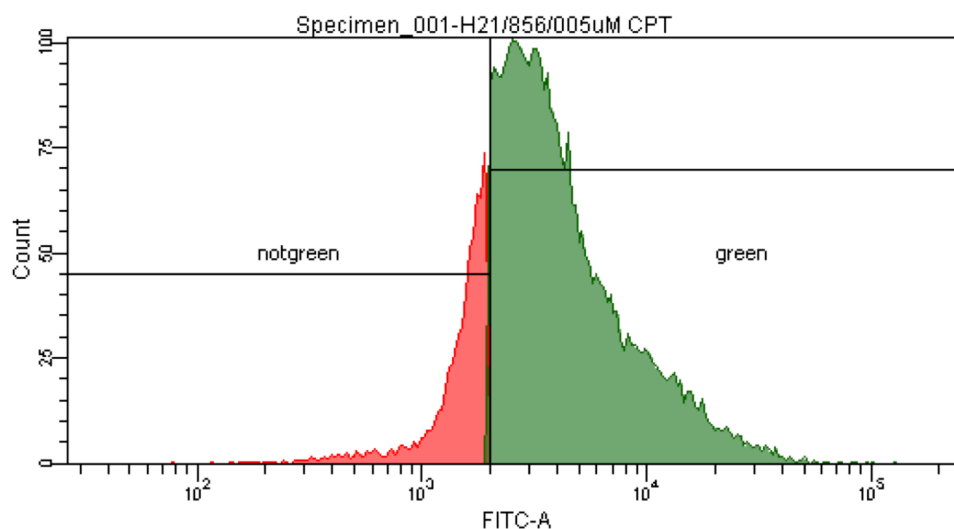
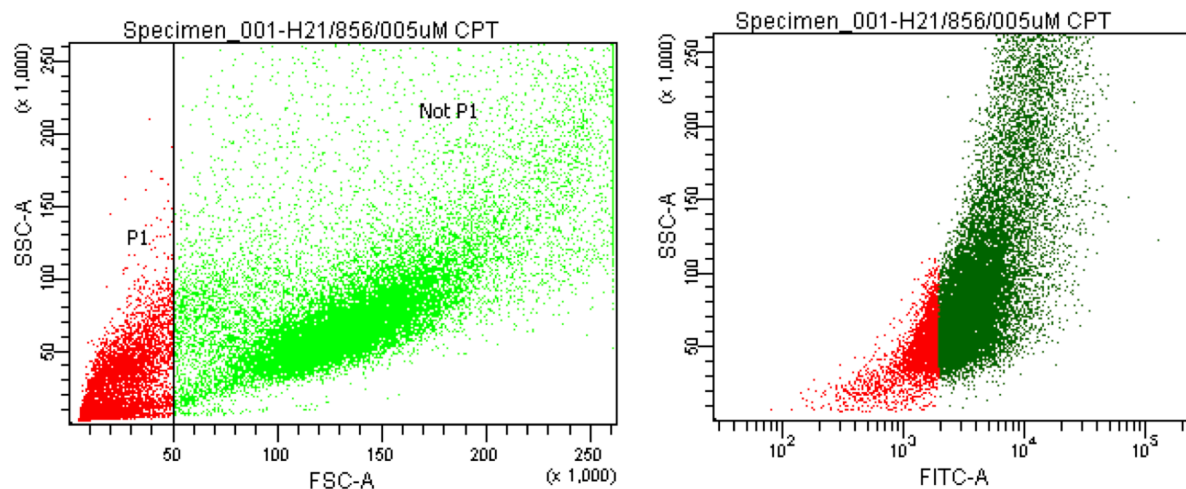
Tube: H/21/856 untreated

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
P1	2,518	8.4	8.4
Not P1	27,503	91.7	91.7
notgreen	5,827	21.2	19.4
green	21,676	78.8	72.3

Experiment Name: P21 CPT 22Nov19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H/21/856 untreated
 Record Date: Nov 22, 2019 10:51:20 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	30,000	###	3,367
P1	2,518	8.4	372
Not P1	27,503	91.7	3,640
notgreen	5,827	21.2	1,592
green	21,676	78.8	4,190

FACSDiva Version 6.1.3



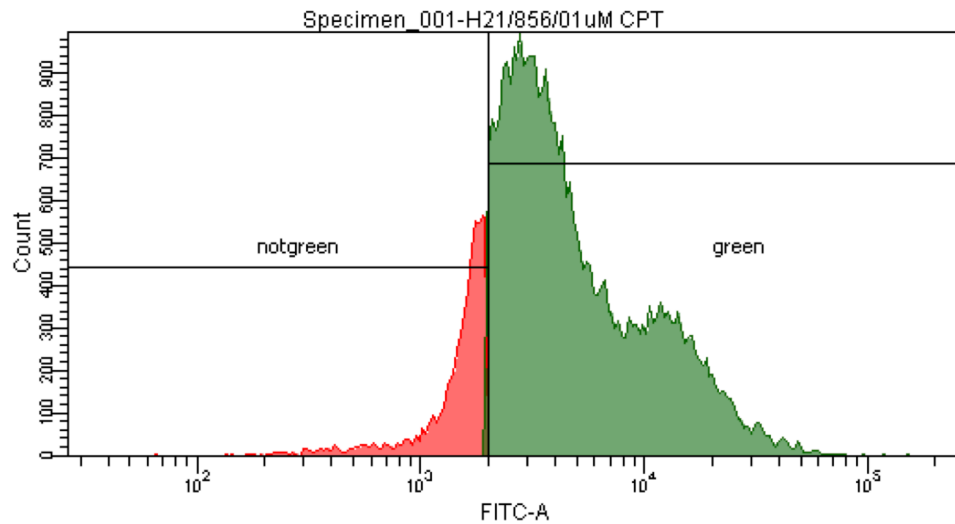
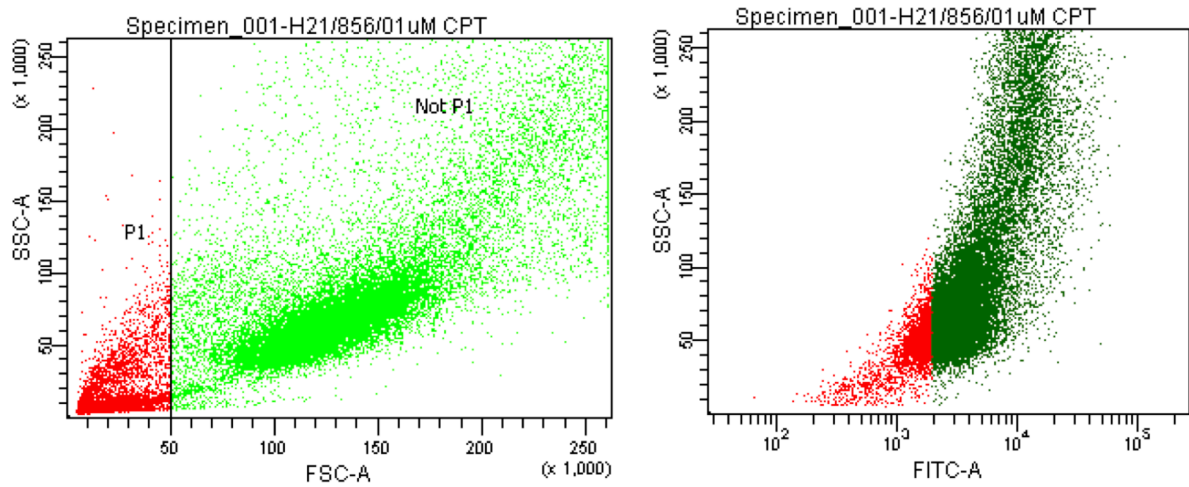
Tube: H21/856/005uM CPT

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	30,000	###	100.0
■ P1	6,548	21.8	21.8
■ Not P1	23,512	78.4	78.4
■ notgreen	4,020	17.1	13.4
■ green	19,492	82.9	65.0

Experiment Name: P21 CPT 22Nov19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H21/856/005uM CPT
 Record Date: Nov 22, 2019 10:52:12 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
■ All Events	30,000	###	4,154
■ P1	6,548	21.8	688
■ Not P1	23,512	78.4	5,113
■ notgreen	4,020	17.1	1,513
■ green	19,492	82.9	5,856

FACSDiva Version 6.1.3



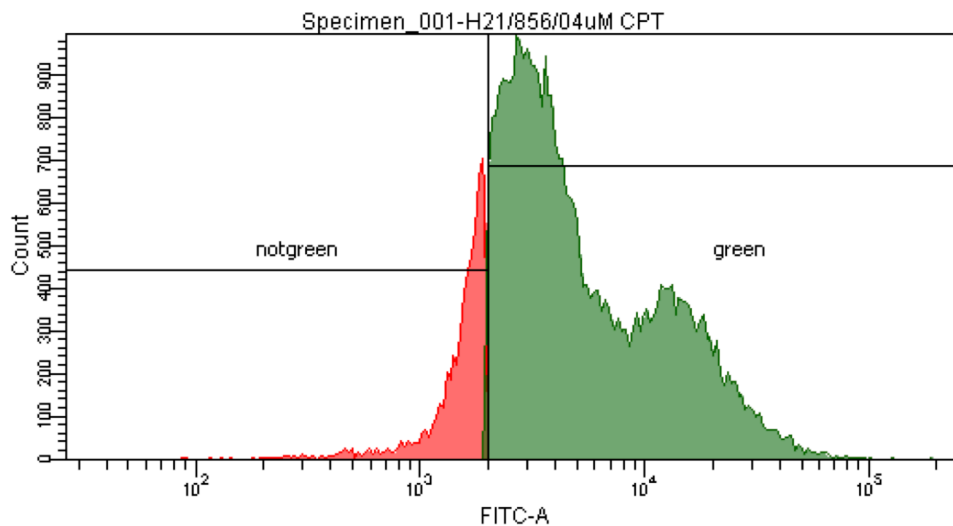
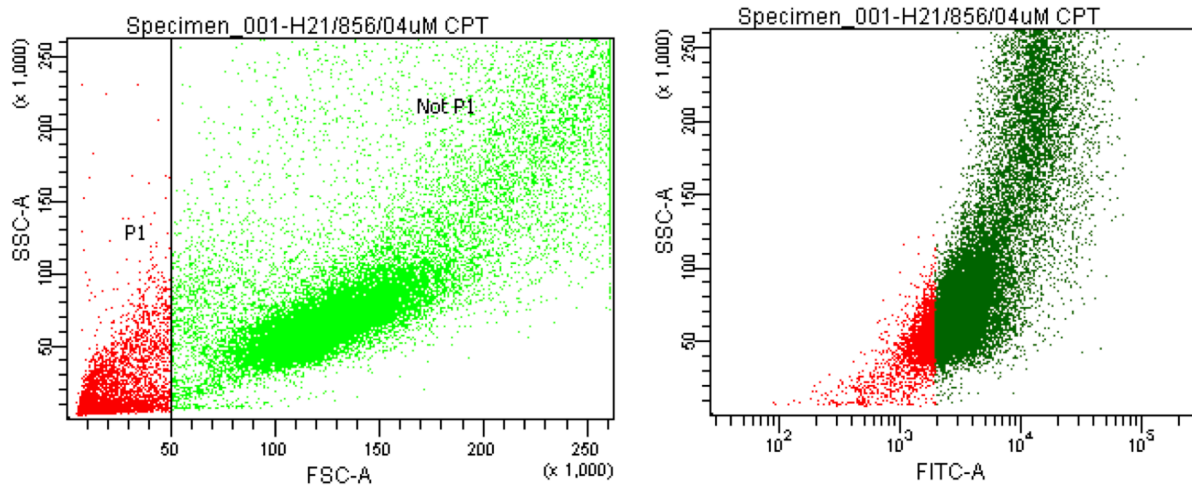
Tube: H21/856/01uM CPT

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
P1	5,058	16.9	16.9
Not P1	24,987	83.3	83.3
notgreen	3,514	14.1	11.7
green	21,473	85.9	71.6

Experiment Name: P21 CPT 22Nov19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H21/856/01uM CPT
 Record Date: Nov 22, 2019 10:52:57 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	30,000	###	5,354
P1	5,058	16.9	550
Not P1	24,987	83.3	6,319
notgreen	3,514	14.1	1,513
green	21,473	85.9	7,106

FACSDiva Version 6.1.3



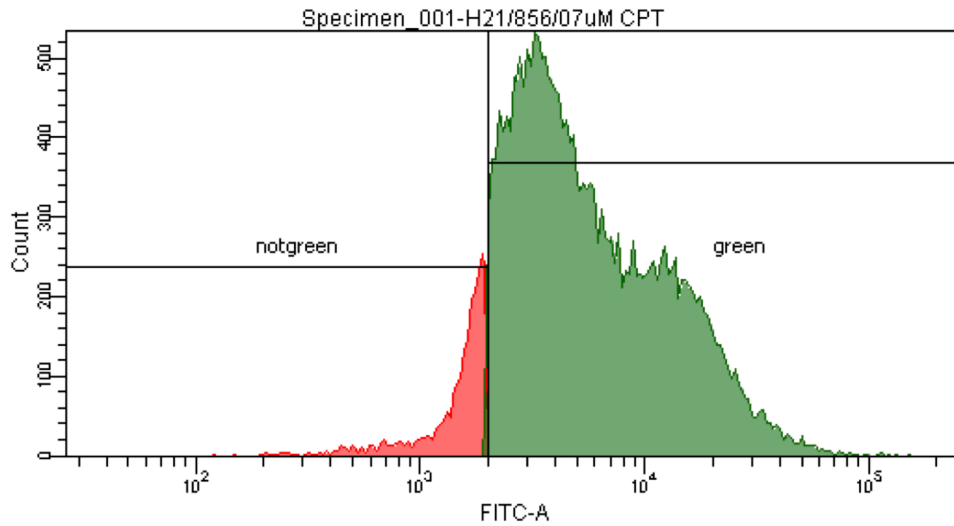
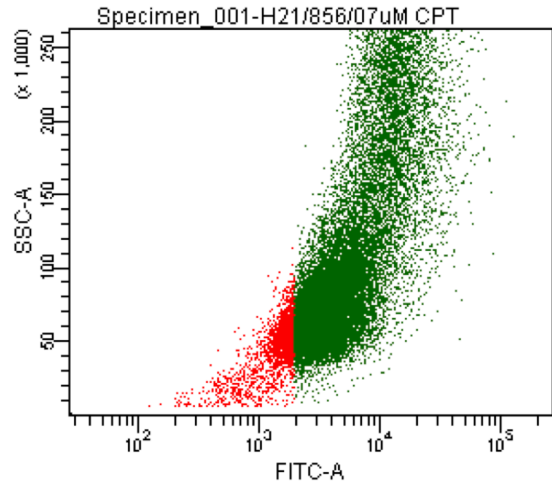
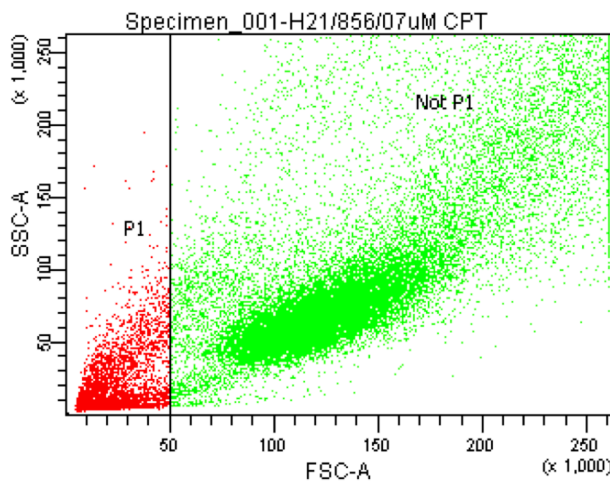
Tube: H21/856/04uM CPT

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	30,000	###	100.0
■ P1	4,524	15.1	15.1
■ Not P1	25,524	85.1	85.1
■ notgreen	3,602	14.1	12.0
■ green	21,922	85.9	73.1

Experiment Name: P21 CPT 22Nov19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H21/856/04uM CPT
 Record Date: Nov 22, 2019 10:53:44 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
■ All Events	30,000	###	6,192
■ P1	4,524	15.1	682
■ Not P1	25,524	85.1	7,159
■ notgreen	3,602	14.1	1,550
■ green	21,922	85.9	8,081

FACSDiva Version 6.1.3



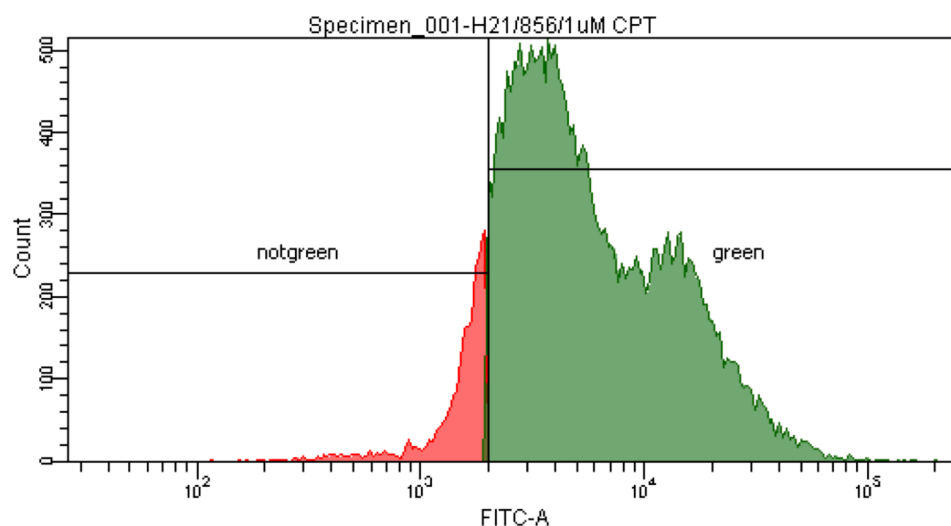
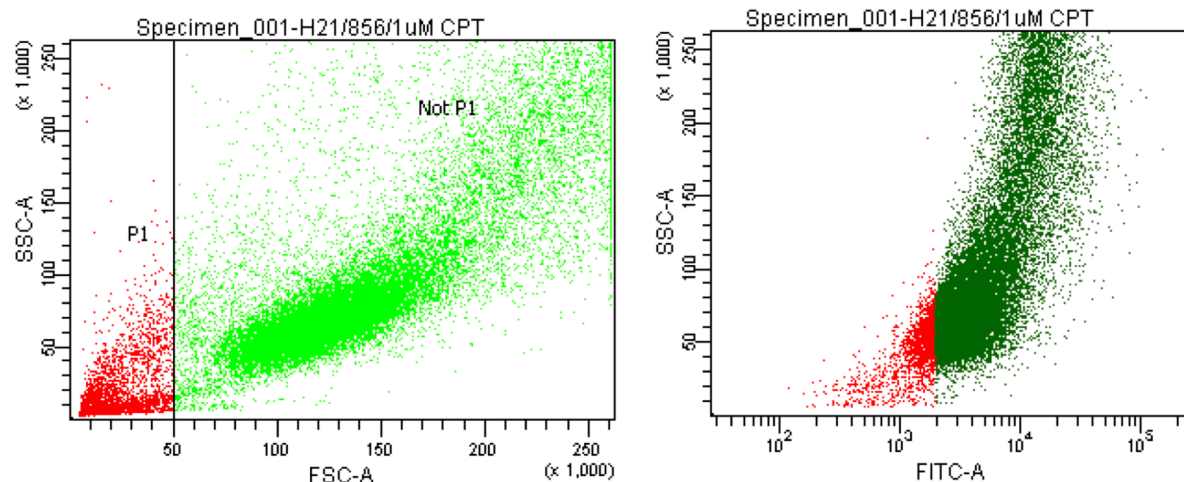
Tube: H21/856/07uM CPT

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	30,000	###	100.0
■ P1	4,983	16.6	16.6
■ Not P1	25,079	83.6	83.6
■ notgreen	2,319	9.2	7.7
■ green	22,760	90.8	75.9

Experiment Name: P21 CPT 22Nov19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H21/856/07uM CPT
 Record Date: Nov 22, 2019 10:54:35 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
■ All Events	30,000	###	6,581
■ P1	4,983	16.6	657
■ Not P1	25,079	83.6	7,746
■ notgreen	2,319	9.2	1,513
■ green	22,760	90.8	8,381

FACSDiva Version 6.1.3



Tube: H21/856/1uM CPT

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
P1	3,879	12.9	12.9
Not P1	26,154	87.2	87.2
notgreen	2,459	9.4	8.2
green	23,695	90.6	79.0

Experiment Name: P21 CPT 22Nov19
 Specimen Name: Specimen_001
 Tube Name: H21/856/1uM CPT
 Record Date: Nov 22, 2019 10:55:20 AM

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	30,000	###	7,252
P1	3,879	12.9	662
Not P1	26,154	87.2	8,223
notgreen	2,459	9.4	1,542
green	23,695	90.6	8,916

9.3 Rohdaten der 48 h *Live cell imaging* nach Röntgenbestrahlung

G2	Mitose, X. Bild	G1	S-Phase, X. Bild	Länge der G1-Phase in min
unbehandelt				
ng	23	g	35	180
ng	31	g	50	285
ng	38	ng	48	150
ng	28	ng	38	150
ng	47	ng	56	135
ng	54	ng	61	105
ng	64	ng	73	135
ng	53	g	76	345
ng	55	g	66	165
ng	62	g	82	150
ng	60	ng	70	150
ng	65	ng	75	150
ng	64	ng	78	210
ng	64	g	74	150
ng	60	ng	73	195
ng	91	ng	104	195
ng	94	ng	105	165
ng	95	ng	104	135
ng	100	ng	117	255
ng	111	ng	122	165
ng	112	ng	123	165
ng	116	ng	125	135
ng	109	g	118	135
ng	118	ng	126	120
ng	114	ng	125	165
ng	115	ng	128	195
ng	122	ng	132	150
g	62	g	81	285
g	62	g	73	165
5 Gy				
ng	21	g	29	120
ng	22	g	31	135
ng	21	ng	32	165
ng	25	Zelltod		
ng	24	g	40	240
ng	27	g	41	210
ng	29	g	59	450
ng	33	ng	45	180
ng	31	g	41	150
ng	32	g	48	240
ng	35	g	48	195
ng	37	g	45	120

ng	37	g	48	165
ng	37	g, Zelltod		
ng	37	g	49	180
ng	37	g	49	180
ng	39	g	49	150
ng	40	g	50	150
ng	51	Zelltod		
ng	41	g	53	180
ng	43	g	55	165
ng	47	ng	59	180
ng	55	Zelltod		
ng	47	g	60	195
ng	49	ng	59	150
ng	46	g	54	120
ng	49	g	59	150
ng	48	g	52	60
ng	54	g	64	150
ng	52	g	61	135
ng	55	ng	64	135
ng	56	g	65	150
ng	57	g	72	225
ng	55	g	65	150
ng	61	g	72	165
ng	60	ng	78	270
ng	63	g	73	150
ng	65	g	75	150
ng	73	g	84	165
ng	73	ng	86	195
ng	76	ng	86	150
ng	84	ng	94	150
ng	84	ng	95	165
ng	91	g	106	225
ng	91	g	105	210
ng	90	g	98	120
ng	91	g	103	180
ng	89	g	104	225
ng	93	g	105	180
ng	94	g	106	180
ng	90	ng	99	135
ng	105	g	121	240
ng	106	Zelltod		
ng	106	g	123	225
ng	105	g	118	195
ng	107	g	118	165
ng	111	g	125	210
ng	108	Zelltod		
ng	115	g	131	240
ng	117	g	131	210
ng	123	ng	133	150
ng	130	g	149	285

ng	133	g	153	300
ng	136	g	147	165
ng	140	g	150	150
ng	150	g	161	165
g	15	g	27	180
g	16	g	47	465
g	20	g	32	180
g	18	g	41	345
g	21	g	31	150
g	64	g	97	495
10 Gy				
ng	44	g	54	150
ng	46	g	56	150
ng	52	g	61	135
ng	62	g	Zelltod	
ng	53	g	60	
ng	34	g	44	195
ng	62	g	73	150
ng	65	g	Zelltod	165
ng	62	g	75	195
ng	89	g, Zelltod		
ng	85	g	Zelltod	
ng	82	g	91	135
ng	71	g	85	210
ng	89	g	106	255
ng	95	g	111	240
ng	111	g	120	135
ng	114	g	130	240
ng	117	g	135	270
ng	104	g	115	165
ng	103	g	113	150
ng	121	g	Zelltod	
ng	125	g, Zelltod		
ng	117	g, Zelltod		
ng	120	g	132	180
ng	125	g	143	270
ng	122	g	138	240
ng	131	g, Zelltod		
ng	134	g	148	210
ng	160	g	172	180
ng	162	g	180	270
ng	145	g	166	315
ng	157	g	182	375
ng	150	g	184	510
g	36	g	81	645
g	84	g	112	420
g	85	g, Zelltod		
g	71	g	86	225
g	57	g	70	195

g	89	g, Zelltod		
g	89	g	106	225

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die mich auf meinem Weg zur Fertigstellung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Boege, für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, für seine Unterstützung und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Des Weiteren möchte ich meiner Co-Betreuerin PD Dr. Floß danken, die sich bereit erklärt hat, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Christian Mielke, dessen fachliche Anleitung, konstruktives Feedback und geduldige Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke ihm für sein Vertrauen und seine Förderung in jeder Phase dieses Projekts.

Ein großer Dank an das Team des Labors Elke Berg, Dr. Faiza Kalfalah und Birgit Hanzen für ihre geduldige Lehre im Labor, fachliche Hinweise und Unterstützung. Ebenso gilt mein Dank an meine Schreibtischnachbarin Anna für die angenehme Atmosphäre, Tipps und Gespräche, in denen ich neue Kraft für die Doktorarbeit sammeln konnte.

Ein herzliches Dankeschön geht an das Labor für Molekulare Radioonkologie der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Düsseldorf für die Bereitstellung und Ausleihe des Gulmays. In ehrendem Gedenken möchte ich auch meinem ehemaligen Co-Betreuer Prof. Dr. Jänicke danken.

Danke an meinen Bruder Erik für die Erstellung der Illustrationen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld, ihren Zuspruch und ihr Verständnis während der oft fordernden Phasen dieser Promotion.

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

Vielen Dank.