

Fakultät für Physik der Technischen Universität München  
Teilinstitut E12

# Mikroskopisch genaue Zellbestrahlung mit hochenergetischen Ionen

**Andreas Hauptner**

Vollständiger Abdruck der von der  
Fakultät für Physik der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Krücken
2. Hon.-Prof. Dr. H.G. Paretzke

Die Dissertation wurde am 9.2.2006 bei der  
Technischen Universität München eingereicht und durch  
die Fakultät für Physik am 6.7.2006 angenommen.



# Zusammenfassung

Durch Ionenmikrobestrahlung von lebenden Zellen können systematisch biologische Strahlenschäden erzeugt werden. Insbesondere werden bei Bestrahlung eines Zellkerns in quantifizierbarer Weise DNA-Schäden generiert. Die Abschätzung der physikalisch-biologischen Wirkung von Ionenstrahlung auf mikroskopischer Ebene ist ebenso wie der Aufbau eines Bestrahlungsplatzes am Rasterionenmikroskop SNAKE ein Hauptbestandteil dieser Arbeit. In ersten Bestrahlungsexperimenten mit hochenergetischen Ionen konnte im Speziellen die Dynamik geschädigter Chromatinbereiche geklärt sowie die räumliche Verteilung von Proteinen untersucht werden, welche an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind.

Die Verwendung des Garching 14 MV-Tandembeschleunigers und seines Ionenspektrums erlaubt Bestrahlungen mit  $LET$ -Werten von  $2,0 \text{ keV}/\mu\text{m}$  bis  $11 \text{ MeV}/\mu\text{m}$ . In linearer Abschätzung können damit innerhalb eines Zellkerns DNA-Doppelstrangbrüche mit einer Dichte von 0,02 bis zu 100 pro  $\mu\text{m}$  zurückgelegter Ionenspur erzeugt werden. Eine einfache geometrische Überlegung unter Annahme einer Zellkernarchitektur bestehend aus gleichverteilten 30-nm-Fasern zeigt, dass im Mittel jedoch nur 1,8 Chromatinfasern pro  $\mu\text{m}$  Wegstrecke der Ionenspur direkt getroffen werden. Ergänzend dazu konnten durch Monte-Carlo-Simulationsrechnungen (PARTRAC), welche am Institut für Strahlenschutz der GSF (Neuherberg) durchgeführt wurden, für eine Auswahl von Ionenstrahlen jeweils die Anzahl von Chromatinfasersträngen mit induzierten Doppelstrangbrüchen abgeschätzt werden. Für einen Strahl von  $100 \text{ MeV } ^{16}\text{O}$ -Ionen ergibt sich dabei eine Anzahl von ca. 3 pro  $\mu\text{m}$  Wegstrecke des Ions. Durch analytische Betrachtungen (Chatterjee-Modell) bzw. aus PARTRAC-Monte-Carlo-Simulationen wurden radiale Dosisverteilungen bzw. radiale Verteilungen von Doppelstrangbrüchen berechnet. Bei den Spuren von  $100 \text{ MeV } ^{16}\text{O}$ -Ionen zeigt sich, dass 90 % der physikalischen Dosis innerhalb eines radialen Abstandes von 300 nm und 90 % aller erzeugten Doppelstrangbrüche innerhalb eines Radius von nur 50 nm liegen.

Durch Erweiterung des Rasterionenmikroskops SNAKE um eine Einrichtung zur Einzelionenpräparation, einen Strahlaustrittsmechanismus und ein optisches Mikroskop wurde ein Bestrahlungsplatz aufgebaut. Für die zu bestrahlenden HeLa-Zellen

wurden geeignete Behälter mit einer 6  $\mu\text{m}$  dicken Mylar-Folie als Wachstumssubstrat entwickelt. Testbestrahlungen von Kernspurdetektoren zeigen eine Gesamtauflösung des Systems von 0,55  $\mu\text{m}$  in x- bzw. 0,40  $\mu\text{m}$  in y-Richtung. Darüberhinaus sind Zellbestrahlungen unter 10°-Winkel zum Wachstumssubstrat, allerdings ohne mikroskopische Auflösung, möglich. Durch Immunfluoreszenzmethoden werden Proteine angefärbt, die an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind. Diese Arbeiten werden von Kollaborationspartnern aus dem Strahlenbiologischen Institut der LMU-München durchgeführt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop können diese markierten Proteine in Form sogenannter Foci mit lichtoptischer Auflösung nachgewiesen werden. An HeLa-Zellen wurden Bestrahlungsexperimente mit einzelnen Ionen durchgeführt, wobei diese in einer lateralen Anordnung gemäß vordefinierter Muster appliziert wurden. So konnte im Rahmen einer Diplomarbeit die zeitlich-räumliche Dynamik geschädigter Chromatinbereiche mit  $\gamma$ -H2AX Markierung untersucht werden. Hier zeigt sich ein komplexes Zeitverhalten in der Fokus-Größe, welche nach anfänglicher Zunahme ein signifikantes Schrumpfen aufweist. Die Zeitkonstante dieser Dynamik sowie die absoluten Fokus-Größen sind von der radialen Lage des Fokus im Zellkern abhängig. Die zeitliche Entwicklung der Foci-Positionen ist hingegen mit einer diffusionsbedingten Aufstreuung verträglich. Eine gerichtete Bewegung der Foci über größere Bereiche des Zellkerns hinweg konnte nicht beobachtet werden, eine Existenz von „DNA-Reparaturfabriken“ scheint somit nicht zu bestehen.

Durch zeitlich separierte Bestrahlungen einer Zellprobe wurde eine Wechselwirkung zwischen den Reparaturantworten an den jeweils erzeugten DNA-Doppelstrangbrüchen festgestellt. In diesen Experimenten wird beobachtet, dass in vorbestrahlten Zellkernen die Ansammlung von 53BP1-Proteinen an nachfolgenden Bestrahlungen deutlich unterdrückt ist. Die quantitative Auswertung dieses „Konkurrenzeffektes“ wurde im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit durchgeführt.

Der experimentelle Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Durchführung von Bestrahlungen unter flachem Einfallswinkel zum Wachstumssubstrat der Zellen. Diese Geometrie ermöglicht eine hohe optische Auflösung bei der Fluoreszenzmikroskopie entlang der Ionenspur. Nach Bestrahlungen mit 29 MeV  $^7\text{Li}$  bzw. 24 MeV  $^{12}\text{C}$ -Ionen konnten durch Nachweis des Proteins 53BP1 Ansammlungen von DNA-Doppelstrangbrüchen beobachtet und die Dichte dieser Cluster zu weniger als 1 pro  $\mu\text{m}$  Ionenspur für beide Strahlarten ermittelt werden. Dies weist darauf hin, dass bereits bei dem *LET*-Wert der 29 MeV  $^7\text{Li}$ -Ionen von 86 keV/ $\mu\text{m}$  eine Sättigung in der Anzahl von Schadensorten auftritt. Die beobachtete Schädigungsstruktur muss daher auf die Zellkernarchitektur zurückgeführt werden, bei der die 30-nm-Chromatinfasern auf höherer Ebene organisiert sind.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>iii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Biologische Strahlenschäden durch hochenergetische Ionen</b>	<b>5</b>
2.1 Dosimetrie im Zellkern und Erzeugung von DNA–Strangbrüchen . . . .	5
2.2 Clusterbildung von DNA–Doppelstrangbrüchen . . . . .	11
2.3 Radiale Dosis– und DNA–Strangbruchverteilungen . . . . .	17
<b>3 Zellbestrahlungsaufbau an SNAKE</b>	<b>23</b>
3.1 Ionenoptik . . . . .	23
3.2 Strahlaustritt und Ionendetektion . . . . .	25
3.3 Einzelionenpräparation . . . . .	28
3.4 Handhabung der Zellen . . . . .	29
3.5 Visualisierung der Zellproben mittels Phasenkontrastmikroskopie . . . .	32
3.6 Bestrahlungsanordnung . . . . .	34
3.7 Limitierung der Bestrahlungsgenauigkeit durch Winkelstreuung . . . .	35
3.8 Fokusprozedur und Bestimmung der Bestrahlungsgenauigkeit . . . . .	39
3.9 Modifikation des Aufbaus zur Schrägbestrahlung lebender Zellen . . . .	42
<b>4 Zellantwort auf Doppelstrangbrüche und Probenuntersuchung</b>	<b>45</b>
4.1 Markierung von DNA–Doppelstrangbrüchen mittels $\gamma$ -H2AX . . . . .	45
4.2 Reparaturmechanismen für DNA–Doppelstrangbrüche . . . . .	47
4.2.1 Nicht–homologe Endverknüpfung . . . . .	48
4.2.2 Homologe Rekombination . . . . .	49
4.3 Untersuchte Proteine . . . . .	51
4.3.1 53BP1 . . . . .	51
4.3.2 MDC1 . . . . .	51
4.3.3 Rad51 . . . . .	51
4.4 Immunofluoreszenz . . . . .	52

4.5	Optische Auflösung und Objekt-Rekonstruktion . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Erste Zellbestrahlungsexperimente</b>	<b>59</b>
5.1	Dynamik geschädigter Chromatinbereiche . . . . .	59
5.2	Konkurrenzeffekte bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen .	63
5.3	Untersuchung der Schädigungsstruktur entlang von Ionenspuren . . . .	67
5.4	Gezielte Bestrahlung einzelner Zellkerne . . . . .	72
<b>6</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>75</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>85</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>87</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Lebende Zellen eines biologischen Organismus sind permanent äußeren Einflüssen ausgesetzt. Einen dieser Einflüsse stellt ionisierende Strahlung dar. Diese kann natürlichen Ursprungs sein, wie aus dem radioaktiven Zerfall primordialer Nuklide in Gesteinen als auch aus der kosmischen Strahlung. Aber auch durch Anwendungen in der medizinischen Diagnostik und insbesondere der medizinischen Strahlentherapie werden lebende Zellen beeinflusst oder sogar gezielt geschädigt.

In einer makroskopischen Herangehensweise wird die Energie- bzw. Äquivalentdosis als Maß herangezogen, um die Schädigungswirkung zu beschreiben, z.B. um das Krebsrisiko für einen gesamten Organismus nach Bestrahlung zu bestimmen. Ein tatsächliches Verständnis der Vorgänge kann jedoch nur auf mikroskopischer bzw. molekularer Zellebene erfolgen. Dazu wurden bereits in der Vergangenheit zahlreiche Experimente mit unterschiedlichen Arten ionisierender Strahlung durchgeführt. Einen vielversprechenden Ansatz in Bezug auf systematische Bestrahlungsuntersuchungen bieten die sogenannten Mikro-Bestrahlungsanlagen, welche die jeweilige Strahlungseinwirkung auf mikroskopische Bereiche, vergleichbar mit oder kleiner als die Längenskala in biologischen Zellen, beschränken. Kombiniert mit einer genauen Dosiskontrolle, die im Extremfall nur ein einzelnes Teilchen appliziert, können so in definierter Weise Bestrahlungsexperimente durchgeführt werden, welche mit einer „konventionellen“, flächenhaften Bestrahlung nicht möglich sind [1, 2, 3, 4, 5]. Neu entdeckte, zellbiologische Effekte, wie z.B. der sogenannte „Bystander“-Effekt [6, 7], konnten bereits an Mikro-Bestrahlungsanlagen systematisch charakterisiert werden. Der Begriff „Bystander“-Effekt umfasst alle Beobachtungen, bei denen primär unbeeinflusste Zellen Stresssymptome zeigen, lediglich aufgrund ihrer Nachbarschaft zu einer direkt, z.B. durch ionisierende Strahlung geschädigten Zelle. Mikro-Bestrahlungen mit der Möglichkeit, ausgewählte Probenbereiche zu bestrahlen bzw. nicht zu bestrahlen, sind dabei für Studien zum „Bystander“-Effekt das Mittel der Wahl.

Auch der Bereich niedrigster Strahlendosen, deren biologische Auswirkungen weitgehend unbekannt sind und kontrovers diskutiert werden, soll durch definierte Bestrahlung von Zellen mit genau abgezählten Teilchen systematisch untersucht werden. So kann geklärt werden, ob für eine Zellreaktion eine applizierte Schwellendosis notwendig ist, oder ob das Zellverhalten aus dem bekannten Bereich hoher Strahlendosen linear extrapoliert werden kann. Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass niedrige Strahlendosen durch Stimulation von DNA-Reparaturprozessen sogar einen positiven Einfluss auf die Integrität von Zellen haben könnten.

Durch die gezielte Erzeugung von DNA-Schäden bei Mikrobestrahlung wird auch eine neue Art von Experimenten möglich, die sich mit der Dynamik von DNA-Reparaturprozessen und der Wechselwirkung zwischen separiert induzierten DNA-Schäden beschäftigen. Hier stellt sich z.B. die Frage, ob es in einem Zellkern räumlich festgelegte „Reparaturfabriken“ gibt, zu denen beschädigte DNA-Moleküle hintransportiert werden, oder ob Reparatur überall stattfinden kann. Desweiteren ist von Interesse, wie sich die Chromatindichte um DNA-Schadensorte herum entwickelt. Diesbezügliche Untersuchungen konnten mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Bestrahlungsapparatur durchgeführt werden.

Hochenergetische Ionen, wie sie am 14 MV-Tandembeschleuniger in Garching zur Verfügung stehen, eignen sich aufgrund ihrer definierten Ionisationsspuren sowie der Variierbarkeit der Strahlenschädigung in besonderer Weise für eine mikroskopisch genaue Bestrahlung lebender Zellen. Dieser Sachverhalt wird in Kapitel 2 dargestellt. Dort soll quantitativ diskutiert werden, welche physikalische Dosisverteilung bei Ionenbestrahlung zu erwarten ist. Bei Bestrahlung des sensibelsten Zellbestandteils, des Zellkerns, werden Schäden im Erbgut der Zelle, d.h. in DNA-Molekülen, erzeugt. Daher wird in Kapitel 2 die Induzierung und räumliche Verteilung von DNA-Einzel- und insbesondere von DNA-Doppelstrangbrüchen entlang Ionenspuren abgeschätzt.

Um Mikro-Bestrahlungen lebender Zellen mit einzelnen Ionen am Garchinger Tandembeschleuniger durchführen zu können, wurde die dort bestehende Rasterionenmikrosonde SNAKE im Rahmen dieser Arbeit entsprechend ausgebaut. Neben den apparativen Problemen zur Strahlführung und -präparation musste auch die dazu kompatible Handhabung der Zellen gelöst werden. Diese Punkte werden in Kapitel 3 ausgeführt. Desweiteren wird dort dargestellt, welche räumliche Bestrahlungsgenauigkeit prinzipiell erreichbar ist und welche Genauigkeit im konkreten Fall erreicht wurde.

Die durch Ionenbestrahlung generierten DNA-Schäden können von lebenden Zellen repariert werden. In Kapitel 4 wird ein kurzer Überblick der biologischen Abläufe gegeben, welche für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen verantwortlich sind. Die Untersuchung der bestrahlten Zellen erfolgt mit Immunfluoreszenz-Methoden und



optischer Mikroskopie. Die dadurch bedingten Auflösungslimitierungen werden ebenso wie die Möglichkeit zur dreidimensionalen Objekt-Rekonstruktion als Abschluss von Kapitel 4 diskutiert.

In Kapitel 5 werden durchgeführte Experimente und deren Auswertungen vorgestellt. Im Rahmen zweier Diplomarbeiten konnte die zeitlich-räumliche Dynamik von Chromatinbewegungen im Verlauf von DNA-Reparaturprozessen untersucht und ein neu entdeckter „Konkurrenzeffekt“ bezüglich der Wechselwirkung zwischen fraktioniert erzeugten DNA-Schäden charakterisiert werden. Als ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Bestrahlung von Zellen unter flachem Ionen-Einfallswinkel zu sehen. Dadurch konnte ein Einblick in die dreidimensionale Struktur von Schädigungsereignissen entlang von Ionenspuren gewonnen und mit Modellvorstellungen verglichen werden. Die quantitativen Abschätzungen des Kapitels 2 sind speziell im Hinblick auf diese Untersuchungen durchgeführt worden.



# Kapitel 2

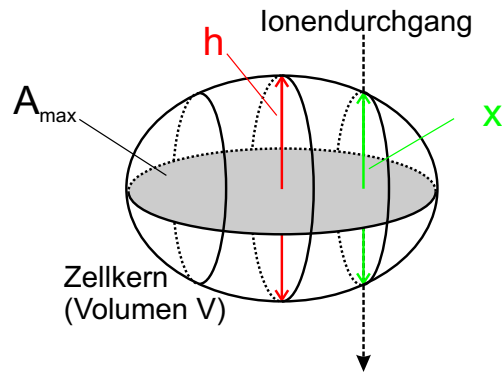
## Biologische Strahlenschäden durch hochenergetische Ionen

Als geladene Teilchen gehören hochenergetische Ionen ebenso wie schnelle Elektronen, d.h.  $\beta$ -Strahlung, zu den direkt ionisierenden Strahlenarten, die längs ihrer Flugbahn durch Materie mittels Coulomb-Stößen freie Ladungsträger sowie angeregte Molekülzustände erzeugen. In einer lebenden Zelle führen diese Prozesse zu Schäden am biologischen System. Der Zellkern, welcher in Form von DNA-Molekülen die genetische Information beinhaltet, stellt dabei den sensibelsten Zellbestandteil dar. Daher beschäftigen sich die folgenden Kapitel insbesondere mit strahlungsinduzierten Schäden an DNA.

### 2.1 Dosimetrie im Zellkern und Erzeugung von DNA-Strangbrüchen

Allgemein wird für makroskopische Körper als Größe zur Quantifizierung eines Strahlenschadens die Energiedosis  $ED$  verwendet. Diese gibt das Verhältnis von absorbierter Strahlungsenergie zur Masse des Körpers an. Einheit der Energiedosis ist das Gray ( $Gy = J/kg$ ). In Bezug auf ein biologisches System kann dieser Körper ein gesamter Organismus oder aber einzelne Bestandteile (Organe, Gewebearten) davon sein, welche sich in ihrer Strahlensensitivität unterscheiden können.

Die kleinste, lebende Einheit eines makroskopischen Gewebes stellt eine einzelne Zelle dar. Bei Bestrahlungsexperimenten an isolierten Zellen, wie sie in Kulturen der Zellbiologie vorliegen, wird die absorbierte Strahlungsenergie auf den sensitiven Bereich des Zellkerns einer einzelnen Zelle bezogen. Der Zellkern stellt ein dreidimensionales Objekt dar, welches durch ein oblates Ellipsoid angenähert werden kann (siehe Abb. 2.1). Die eingezeichnete Querschnittsfläche  $A_{\max}$  kann jedoch in der Realität von der Form einer

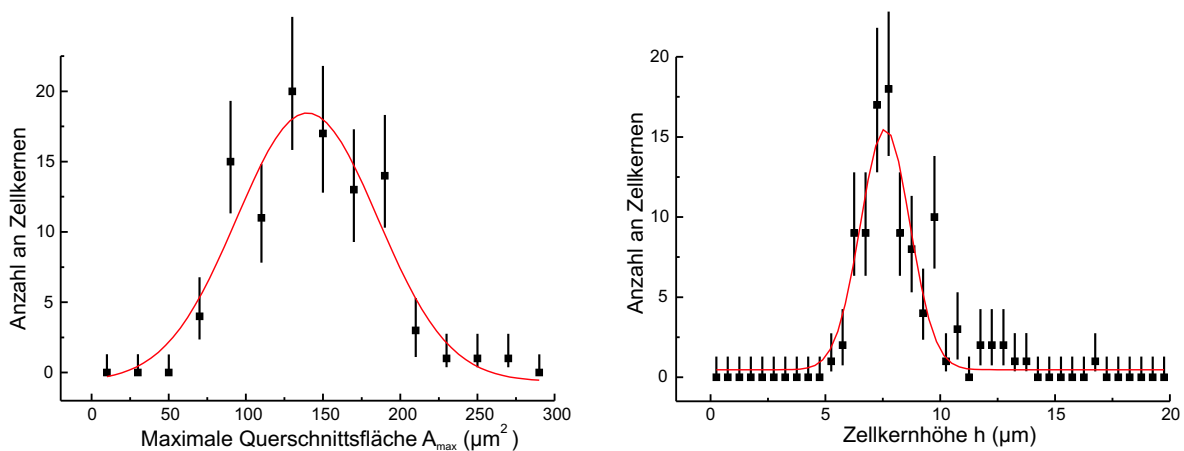


**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung eines Zellkerns mit eingezeichnetem Ionendurchgang.

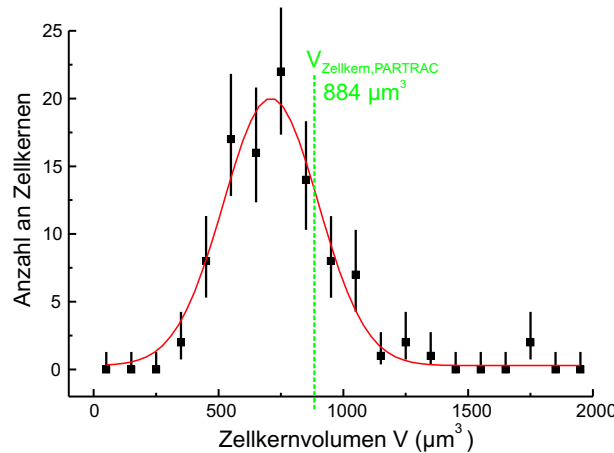
Ellipse abweichen. Bei Zellen in Kultur, welche adhären auf einem Substrat wachsen, wird die Orientierung des Zellkerns meist vom Wachstumssubstrat festgelegt. Die Querschnittsfläche mit maximalem Inhalt liegt dann parallel zum Substrat. Außerdem ist in Abbildung 2.1 ein Ionendurchgang mit der bei den Zellmikrobestrahlungen üblichen Richtung senkrecht zum Substrat ersichtlich.

Um im Hinblick auf die an HeLa-Zellen<sup>(1)</sup> durchgeführten Bestrahlungen relevante Abschätzungen machen zu können, wurden die Kerne der in den Bestrahlungsbehältern kultivierten und bestrahlten Zellen geometrisch vermessen. Dazu wurde unter Verwendung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (siehe Kap. 4.4) für insgesamt 100 mit dem Farbstoff DAPI gefärbte Zellkerne aus 10 verschiedenen Proben jeweils die maximale Querschnittsfläche  $A_{\max}$  und die Höhe  $h$  ermittelt. Es ergeben sich die in

<sup>(1)</sup>Zelllinie von menschlichen Epithelzellen, die einem Cervix-Carcinom entnommen wurden.



**Abbildung 2.2:** Häufigkeitsverteilung der maximalen Querschnittsfläche  $A_{\max}$  und der Höhe  $h$  von 100 HeLa-Zellkernen. Die statistischen Unsicherheiten stammen aus [8].



**Abbildung 2.3:** Häufigkeitsverteilung des Volumens von 100 HeLa–Zellkernen (statistische Unsicherheiten für Ereignisanzahlen  $\leq 20$  siehe [8]). Dem Volumen liegt jeweils das Modell eines Ellipsoids zugrunde. Eingezeichnet ist zudem das Volumen des in den PARTRAC–Simulationen verwendeten Modell–Zellkerns (siehe Kap. 2.2).

Abbildung 2.2 dargestellten Häufigkeitsverteilungen. An die Daten wurde jeweils eine Gauß–Kurve angepasst, welche die Annahme einer Normalverteilung für Querschnittsfläche und Höhe rechtfertigt. Die Anpassung liefert folgende Mittelwerte sowie die jeweiligen Unsicherheiten ( $\pm \sigma$ ):  $A_{\max} = (140 \pm 5) \mu\text{m}^2$  und  $h = (7,60 \pm 0,11) \mu\text{m}$ . Das Volumen eines Ellipsoids ergibt sich nach [9]:

$$V = \frac{2}{3} \cdot A_{\max} \cdot h \quad (2.1)$$

Die Volumina, die man für die 100 betrachteten Zellkerne erhält, sind in Abbildung 2.3 in einem Histogramm aufgetragen. Eine Gauß–Anpassung liefert für den Volumen–Mittelwert sowie für die Unsicherheit dieses Mittelwertes ( $\pm \sigma$ ):  $V = (710 \pm 20) \mu\text{m}^3$ . Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit entsprechenden Daten aus [10]. Da ca. 70 % der Zellmasse aus Wasser besteht, sollen die folgenden Dosis–Betrachtungen für ein System aus Wasser angestellt werden. Mit der entsprechenden Dichte ( $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \text{ g/cm}^3$ ) hat der Zellkern eine mittlere Masse von  $m_{\text{Zellkern}} = 0,71 \text{ ng}$ . Bezieht man die Gesamtmenge des menschlichen Erbgutes von  $6 \cdot 10^9 \text{ bp}$  (Basenpaare) auf das mittlere Volumen, so erhält man für die DNA–Dichte der hier betrachteten HeLa–Zellkerne den Wert von  $\rho_{\text{DNA}} = 8,5 \cdot 10^6 \text{ bp}/\mu\text{m}^3$ .

Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, soll der Zellkern an beliebiger Stelle von einem hochenergetischen Ion durchquert werden. Die Spurlänge innerhalb des Kerns sei  $\Delta x$ , die Energiedeposition pro Ion ergibt sich dabei aus dem jeweiligen  $LET_{\infty}$  ( $LET =$  linearer Energietransfer)–Wert.  $LET_{\infty}$  beschreibt den gesamten Energieeintrag pro Einheitslänge der Ionenspur ohne Begrenzung bezüglich der radialen Verteilung bzw. bezüg-

lich eines maximalen Einzel-Energietransfers und ist damit identisch zur sogenannten „Stopping Force“  $dE/dx$ . In Abbildung 2.4 ist der  $LET_\infty$ -Wert in Wasser für eine Auswahl von Ionen in Abhängigkeit von deren Geschwindigkeit (untere Abszisse) bzw. von deren Energie pro Masse (obere Abszisse) dargestellt. Man erkennt, dass verschiedene Isotope eines Elements (z.B.  $^1\text{H}$  und  $^2\text{H}$ ) in dieser Auftragung nicht unterscheidbar sind. Die Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms SRIM ermittelt [11]. Bei allen Schädigungsprozessen durch ionisierende Strahlung stellen Elektronen die entscheidenden Sekundärteilchen dar. Daher ist in Abbildung 2.4 zu Vergleichszwecken der  $LET_\infty$ -Wert von Elektronen im Energiebereich von 40 eV bis einige 10 keV aufgetragen. In diesem Energiebereich erfolgt die Abbremsung der Elektronen nur durch Stöße mit den Targetelektronen, Abbremsung durch Erzeugung von Bremsstrahlung tritt in Wasser erst ab einer Energie von ca. 10 MeV signifikant auf und wird bei noch höheren Energien dominant. Für hohe Geschwindigkeiten nähert sich, aufgrund des gleichen Betrags der Projektilladung, der  $LET_\infty$ -Wert von Elektronen demjenigen von Protonen bzw. Deuteronen an. Die Daten für niederenergetische Elektronen (Kreuze) stammen aus [12] (IAEA), für höherenergetische Elektronen (gestrichelte Linie) aus [13] (ESTAR).

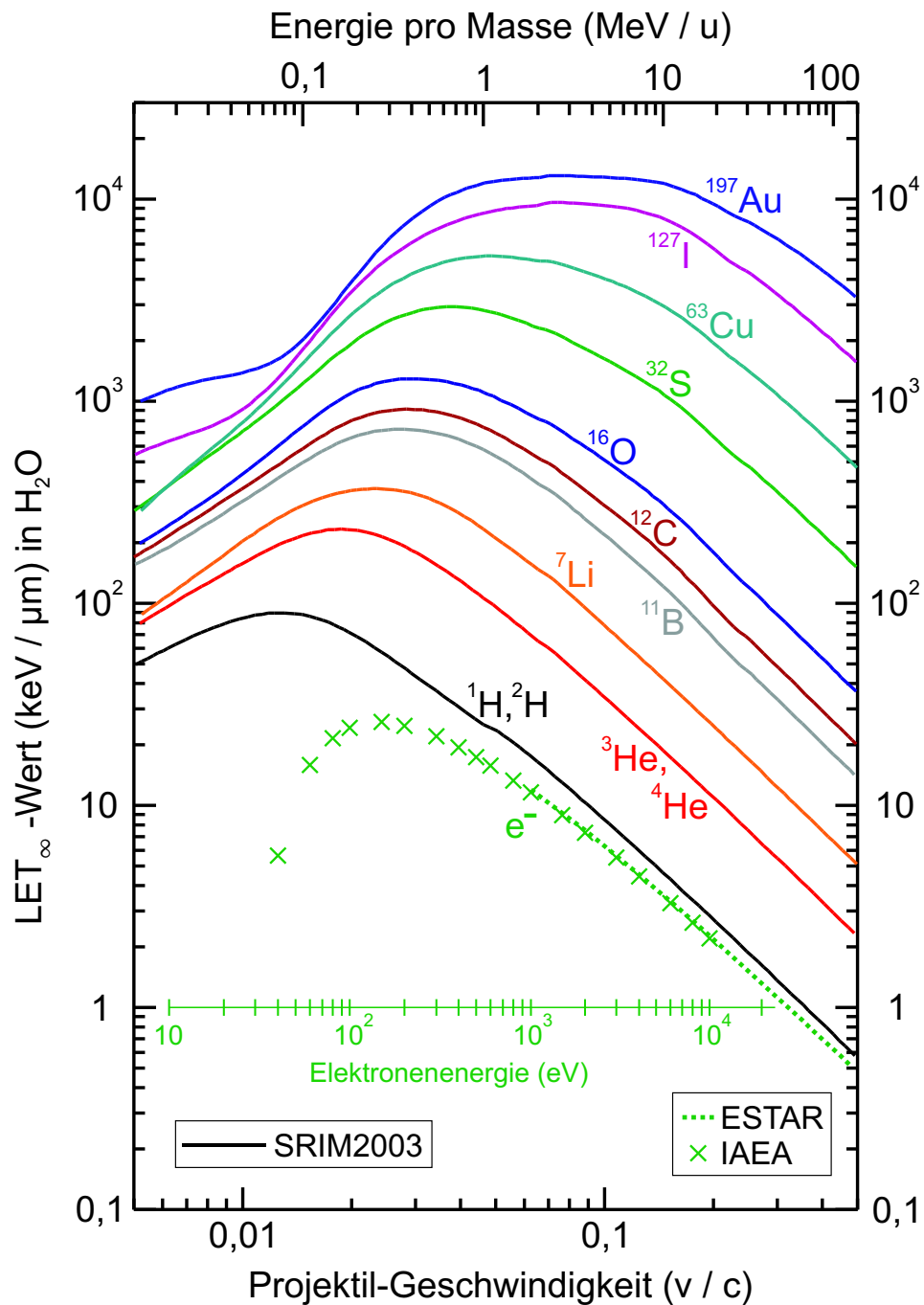
Die Energiedosis  $ED$ , die ein Zellkern pro Ionendurchgang erhält, ergibt sich mit der oben berechneten, mittleren Masse zu:

$$ED = \frac{E_{\text{deponiert}}}{m_{\text{Zellkern}}} = \frac{\Delta x \cdot LET_\infty}{m_{\text{Zellkern}}} \quad (2.2)$$

Da in dieser Arbeit nicht der Gesamt-Strahlenschaden im Zellkern im Vordergrund steht, sondern die Struktur der Schädigung entlang von Ionenspuren (siehe insbesondere Kap. 5.3), wird im Folgenden die spurlängenbezogene Energiedosis  $ED/\Delta x$  verwendet:

$$\frac{ED}{\Delta x} = \frac{LET_\infty}{m_{\text{Zellkern}}} \quad (2.3)$$

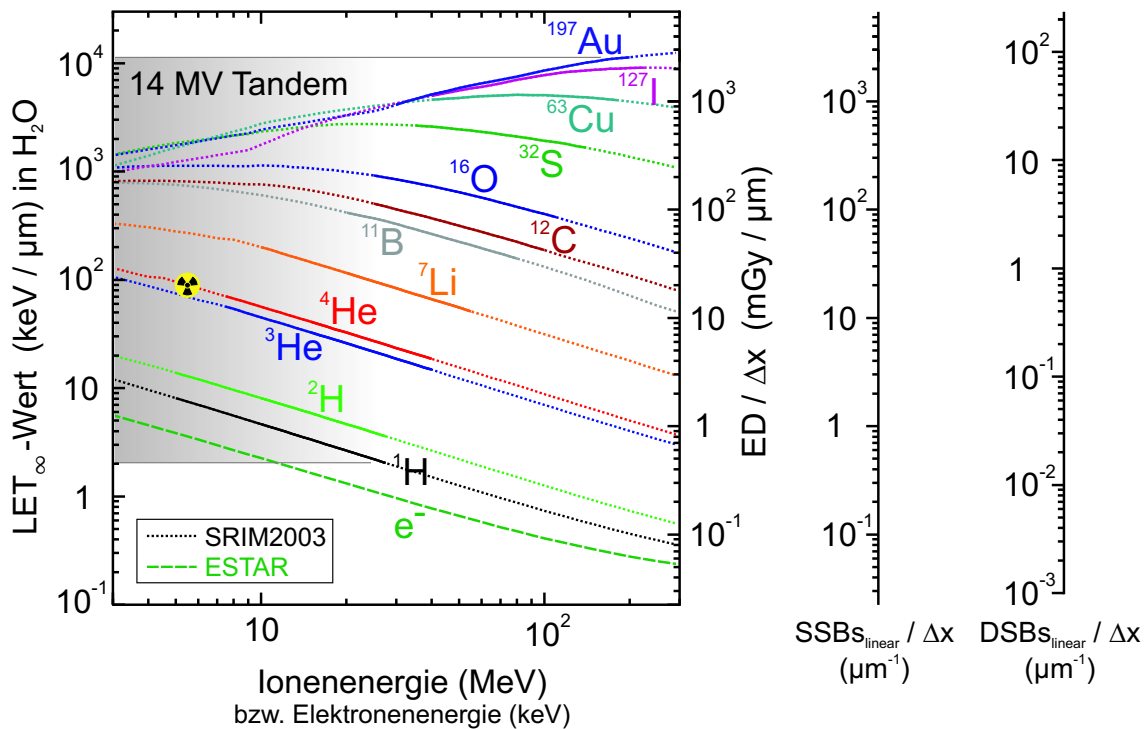
Für Zellbestrahlungsexperimente am Münchener Tandembeschleuniger steht ein breites Spektrum an Ionensorten zur Verfügung, welche jeweils auf Energien aus einem bestimmten Bereich beschleunigt werden können. In Abbildung 2.5 ist eine Übersichtsdarstellung des Strahlspektrums zu erkennen. Exemplarisch ist darin für eine Anzahl von Ionensorten der  $LET_\infty$ -Wert (linke Ordinate) bzw. die spurlängenbezogene Energiedosis (rechte Ordinate) über der Ionenenergie aufgetragen. Die durchgezogenen Kurvenstücke stellen dabei den jeweiligen Bereich dar, welcher vom Münchener Tandembeschleuniger abgedeckt wird. Man erkennt, dass der  $LET_\infty$ -Wert in diesem Bereich um mehr als drei Größenordnungen variiert. Durch die Wahl von leichten, schnellen Projektilen wie 28 MeV Protonen können locker ionisierte Spuren mit einem  $LET_\infty$ -Wert von 2,0 keV/ $\mu\text{m}$  bzw. einer spurlängenbezogenen Energiedosis von 0,45 mGy/ $\mu\text{m}$



**Abbildung 2.4:**  $LET_{\infty}$ -Werte in Wasser von Ionen und Elektronen in Abhängigkeit deren Geschwindigkeit (untere Skala, Einheit: Lichtgeschwindigkeit  $c$ ) bzw. deren Energie pro Masse (obere Skala, Einheit:  $\text{MeV/u}$ ). Für die Elektronen-Daten ist eine absolute Energie-Skala (grün) eingefügt. Die  $LET_{\infty}$ -Werte für Ionen wurden mit SRIM2003 [11] ermittelt. Die Daten für Elektronen wurden aus [12] (IAEA) bzw. [13] (ESTAR) entnommen.

erzeugt werden. Bei Bestrahlung mit Schwerionen werden hingegen dicht ionisierte Spuren mit Werten bis zu  $11 \text{ MeV}/\mu\text{m}$  bzw.  $2,5 \text{ Gy}/\mu\text{m}$  ( $200 \text{ MeV } ^{197}\text{Au}$ ) generiert. Um den angegebenen Bereich der Strahlenschädigung allerdings lückenlos abdecken zu können, muss bei den leichten Ionen insbesondere das Isotop  $^2\text{H}$  und eventuell das seltene  $^3\text{He}$  verwendet werden. Zudem ist es hier notwendig, den Tandembeschleuniger auch bei sehr niederen Terminalspannungen von bis zu  $2,5 \text{ MV}$  zu betreiben. Da verschiedene Ionensorten je nach deren Energie zu gleichen  $LET_\infty$ -Werten führen können, ist es z.B. möglich,  $5,5 \text{ MeV}$   $\alpha$ -Teilchen aus dem Zerfall von  $^{222}\text{Rn}$  (siehe „radioaktiv“-Symbol in Abb. 2.5) mit einem Strahl von  $28 \text{ MeV } ^7\text{Li}$ -Ionen zu simulieren. Allerdings muss wie in Kapitel 2.3 (Abb. 2.11 rechts) dargestellt die unterschiedliche radiale Dosisverteilung beachtet werden.

Die beiden wichtigsten, strahlungsinduzierten Schäden im Zellkern stellen Einzelstrangbrüche (single-strand breaks: *SSBs*) und die biologisch schwerwiegenden Doppelstrang-



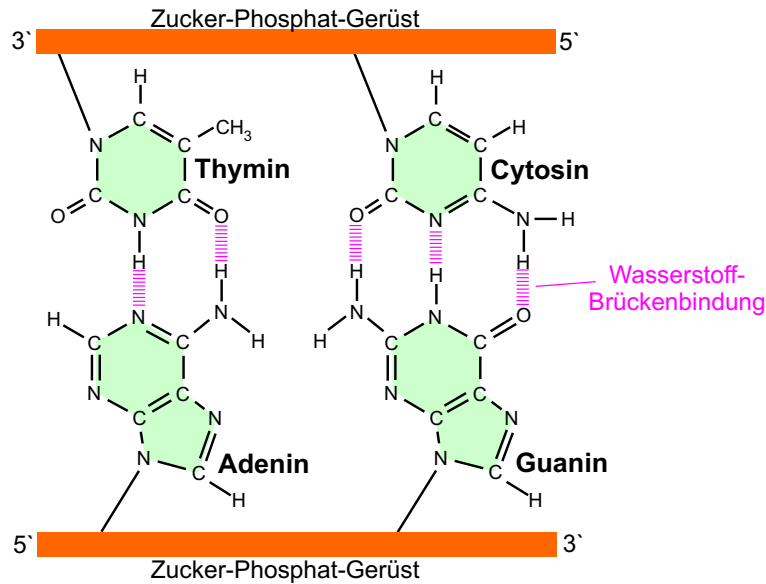
**Abbildung 2.5:**  $LET_\infty$ -Werte in Wasser bzw. spurlängenbezogene Energiedosis in HeLa-Zellkernen ( $m_{\text{Zellkern}} = 0,71 \text{ ng}$  bzw.  $\rho_{\text{DNA}} = 8,5 \cdot 10^6 \text{ bp}/\mu\text{m}^3$ ) für verschiedene Ionen in Abhängigkeit der kinetischen Energie. Die durchgehenden Kurvenabschnitte werden vom  $14 \text{ MV}$ -Tandembeschleuniger abgedeckt. Die beiden Skalen rechts neben dem Diagramm geben die lineare Umrechnung der Energiedosis in Anzahlen von DNA-Einzel- bzw. DNA-Doppelstrangbrüchen pro Spurlänge wieder.



brüche (double–strand breaks: *DSBs*) in DNA–Molekülen dar (siehe Abb. 4.1). Aus der Strahlenbiologie locker ionisierender Strahlung, wie z.B. Röntgenstrahlung, ist bekannt, dass 1 Gy Energiedosis im Mittel 1000 Einzel– und 35 Doppelstrangbrüche der DNA pro Zellkern erzeugt [14, 15]. Angewandt auf die in Gleichung 2.3 definierte, spurlängenbezogene Energiedosis erhält man so eine Anzahl von DNA–Einzel– bzw. DNA–Doppelstrangbrüchen pro Einheit der Spurlänge. Diese lineare Skalierung  $SSB_{S_{\text{linear}}}/\Delta x$  bzw.  $DSB_{S_{\text{linear}}}/\Delta x$  ist auf der rechten Seite von Abbildung 2.5 eingetragen. Bei Ausnutzung des Strahlspektrums am Münchener Tandembeschleuniger kann, zunächst unter Annahme dieses einfachen Zusammenhangs, die Zahl der erzeugten Einzelstrangbrüche von 0,5 pro  $\mu\text{m}$  bis auf mehr als 2000 pro  $\mu\text{m}$  eingestellt werden. Die im Folgenden speziell interessierenden DNA–Doppelstrangbrüche können von weniger als 0,02 pro  $\mu\text{m}$  bis auf ca. 100 pro  $\mu\text{m}$  für einen einzelnen Ionentreffer variiert werden. Es sei darauf hingewiesen, dass diese Umrechnung nur für Zellkerne mit einer DNA–Dichte von  $\rho_{\text{DNA}} = 8,5 \cdot 10^6 \text{ bp}/\mu\text{m}^3$  gültig ist. Für andere DNA–Dichten müssen die Werte entsprechend umskaliert werden.

## 2.2 Clusterbildung von DNA–Doppelstrangbrüchen

Die im vorigen Abschnitt dargestellte Abschätzung der Anzahl an DNA–Strangbrüchen stellt eine Extrapolation aus dem Bereich der locker ionisierenden Strahlung dar. In diesem Bereich, der experimentell durch Bestrahlung mit z.B.  $^{60}\text{Co}$ – $\gamma$ –Quanten (Energie: 1,173 MeV bzw. 1,332 MeV) oder 250 kV–Röntgenphotonen zugänglich ist, kann die Energiedeposition als kontinuierlich über den Zellkern verteilt angesehen werden. Die räumliche Struktur der DNA spielt hier eine untergeordnete Rolle. Bei Bestrahlung mit Ionen hingegen, vor allem mit Schwerionen, handelt es sich um lokalisierte Ereignisse mit hohen lokalen Energiedosiswerten im Zentrum der Ionenspur (siehe Kap. 2.3). Die biologische Auswirkung, d.h. insbesondere die Erzeugung von DNA–Doppelstrangbrüchen, ergibt sich aus der räumlichen Überlagerung von Ionisierungseignissen und Anordnung der DNA, welche in mehreren Hierarchiestufen organisiert ist. Das reine DNA–Molekül stellt ein langes, strickleiterartiges Molekül dar, welches schraubenförmig gewandelt ist (sog. Doppelhelix). Das Rückgrat zu beiden Seiten dieses Moleküls wird von sich wiederholenden Zucker–Phosphat–Einheiten gebildet. Die genetische Information ist in der Abfolge der daran angelagerten Stickstoffbasen enthalten, von denen jeweils zwei über Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Basenpaar (bp) gebunden sind (Guanin–Cytosin bzw. Adenin–Thymin). Dies ist in Abbildung 2.6 ersichtlich. Die Breite des DNA–Moleküls beträgt ca. 2 nm, eine Schraubenwindung

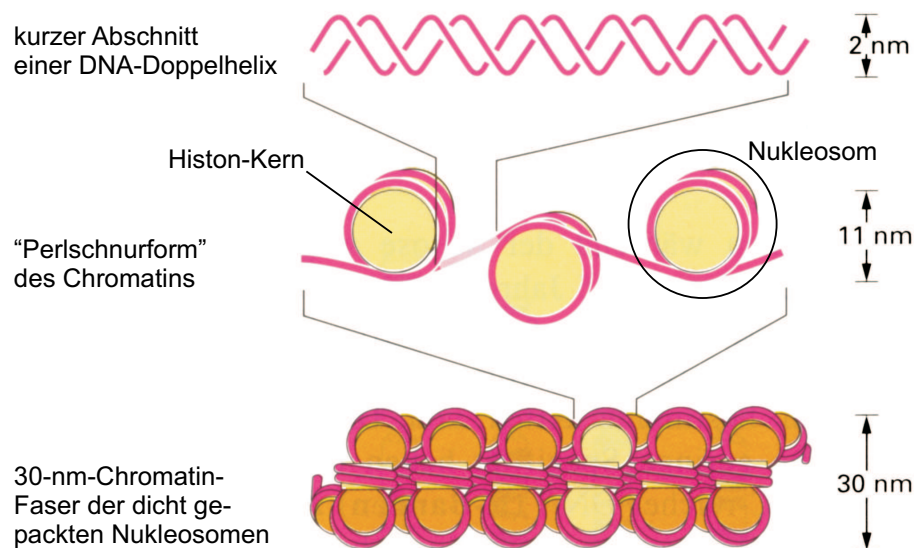


**Abbildung 2.6:** Chemische Struktur der Stickstoffbasen in der DNA. Zwei dieser Basen bilden jeweils eine komplementäre Paarung über Wasserstoffbrücken (zwei Brücken zwischen Thymin und Adenin, drei Brücken zwischen Cytosin und Guanin). Das Zucker-Phosphat-Gerüst ist nur angedeutet. Die Vorlage für die Abbildung stammt aus [16].

enthält bei einer Länge von 3,4 nm ca. 10 Basenpaare. Im Kern einer lebenden Zelle ist das DNA-Molekül an Proteine, die sogenannten Histone, gebunden. Die so entstehenden Nukleosomen bilden die Grundeinheit des Chromatins (siehe Abb. 2.7). Die Nukleosomen ihrerseits lagern sich zu größeren Einheiten zusammen und bilden eine Faser mit einem Durchmesser von ca. 30 nm. Der Kern einer menschlichen Zelle enthält 46 Chromosomen mit insgesamt  $6 \cdot 10^9$  Basenpaaren. Pro nm Länge der 30-nm-Faser finden ca. 110 Basenpaare Platz, insgesamt besitzt die Faser eine Länge von ca. 5,5 cm. Durch eine einfache geometrische Betrachtung und ohne Berücksichtigung weiterer DNA-Organisationsstufen kann nun abgeschätzt werden, wieviele Chromatinfaserstränge pro  $\mu\text{m}$  Wegstrecke vom Zentrum einer Ionenspur getroffen werden. Das Gesamtvolumen der 30-nm-Faser pro Zellkern beträgt ca.  $39 \mu\text{m}^3$ . Mit dem Zellkernvolumen von  $710 \mu\text{m}^3$  folgt für das entsprechende Volumenverhältnis:

$$p = \frac{V_{\text{Faser}}}{V_{\text{Zellkern}}} = 5,5\% \quad (2.4)$$

Dieses Volumenverhältnis  $p$  ist zugleich die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Ion beim Durchtritt durch eine 30 nm dicke Zellkernschicht eine Chromatinfaser trifft. Für eine Flugstrecke von  $1 \mu\text{m}$  ergibt sich daher eine mittlere Anzahl direkt getroffener Chromatinfasern von ca. 1,8. Die Abbildung 2.8 stellt dazu einen maßstäblichen Ausschnitt aus dem Zellkern dar. In lateraler Richtung besitzt der Ausschnitt eine Kantenlänge

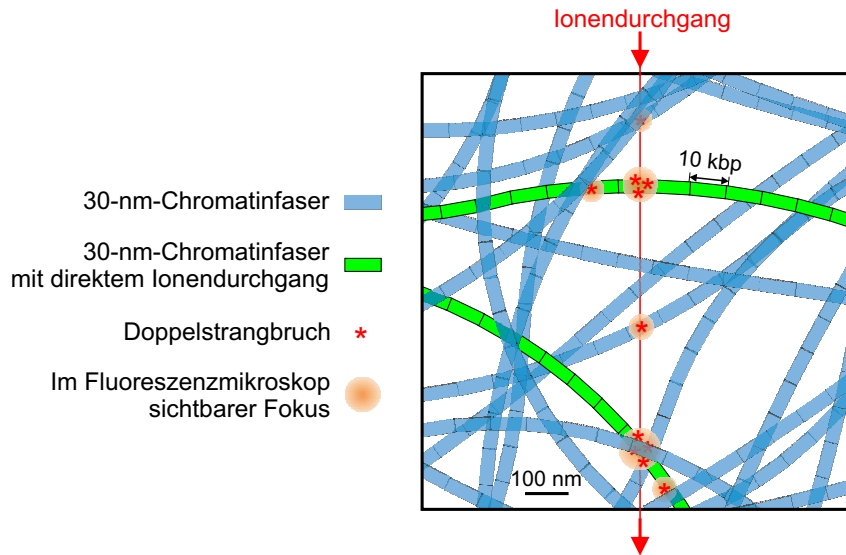


**Abbildung 2.7:** Organisationsstufen der DNA: In der ersten Stufe ist die DNA um Histone gewickelt. Die so entstehenden Nucleosomen formen eine sogenannte „Perlschnur“. In der zweiten Stufe bilden die Nucleosomen einen dichten Verbund, die 30-nm-Chromatin-Faser. Höhere und weniger stringente Organisationsstufen sind nicht dargestellt. Die Abbildung ist aus [16] entnommen.

von 1  $\mu\text{m}$ , senkrecht zur Zeichenebene ist eine Projektion einer 300 nm dicken Schicht dargestellt. Der Verlauf der 30-nm-Fasern wurde als zufällig angenommen, ihr Anteil am dargestellten Volumen beträgt 5,5 %. Aufgrund der großen Ionisationsdichte bei hoch-LET-Ionenbestrahlung überlagern sich im Zentrum der Spur einzelne Schädigungsereignisse bzw. Spuren von Sekundärelektronen. Bei direkten Treffern in den 30-nm-Fasern führt dies zu einer gehäuften und insgesamt überproportionalen Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese Ereignisse sind in Abbildung 2.8 an den grün gefärbten Chromatinfasern illustrativ dargestellt. Die Überhöhung der DSB-Erzeugung kann durch einen entsprechenden  $RBE$ -Faktor ( $RBE_{\text{DSB}}$ ,  $RBE$  = „relative biological effectiveness“) beschrieben werden:

$$RBE_{\text{DSB}} = \frac{DSBs(^A\text{X}, E)}{DSBs(^{60}\text{Co}-\gamma)} \quad (2.5)$$

$DSBs(^A\text{X}, E)$  ist dabei die Anzahl der von einem Ion des Nuklids  $^A\text{X}$  (Element X, Massenzahl A) mit der Energie  $E$  erzeugten Doppelstrangbrüche.  $DSBs(^{60}\text{Co}-\gamma)$  ist die Anzahl der mit einer locker ionisierenden Referenzstrahlung bei gleicher Energiedosis generierten Doppelstrangbrüche. Der Faktor  $RBE_{\text{DSB}}$  beschreibt somit die Effektivität einer Strahlung in Bezug auf die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen und muss für jede Strahlart und -energie neu bestimmt werden. Durch Multiplikation mit die-



**Abbildung 2.8:** Maßstabsgetreue Darstellung von zufällig verteilten 30-nm-Chromatinfasern. In Blickrichtung ist eine 300 nm dicke Zellkernschicht auf die Zeichenebene projiziert. Die Betrachtung gilt für einen Zellkern mit einer DNA-Dichte von  $\rho_{\text{DNA}} = 8,5 \cdot 10^6 \text{ bp}/\mu\text{m}^3$ . Bei dem eingetragenen Ionendurchgang wurde die radiale Ausdehnung der deponierten Dosis vernachlässigt. Die Anzahl direkt getroffener Chromatinfasern kann zu 1,8 pro  $\mu\text{m}$  Ionenspur abgeschätzt werden.

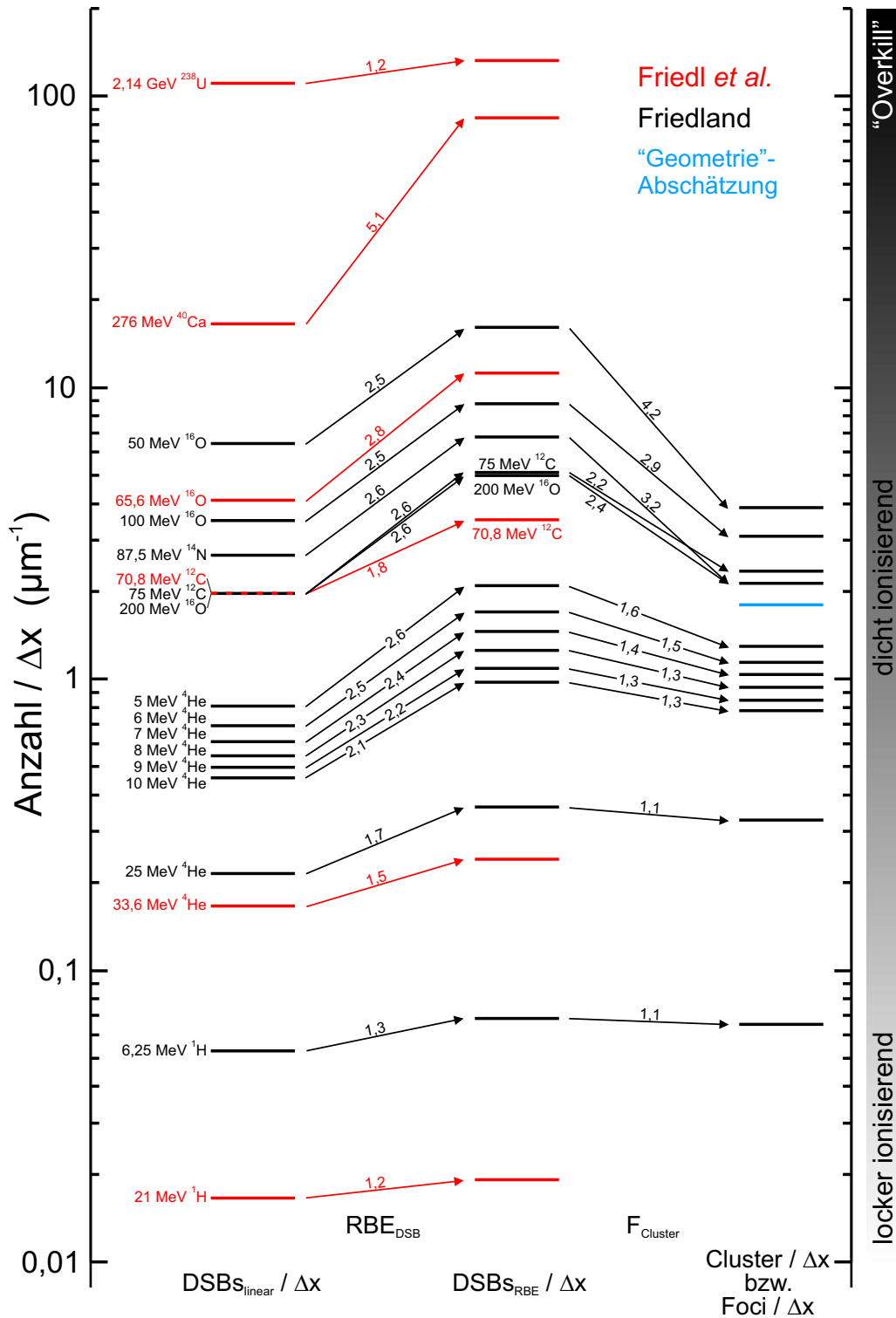
sem Faktor erhält man aus der linearen Abschätzung  $DSB_{\text{slinear}}/\Delta x$  des Kapitels 2.1 die tatsächlich zu erwartende Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen pro Einheit der Spurlänge  $DSB_{\text{sRBE}}/\Delta x$ .

Für eine Auswahl von verschiedenen Ionensorten und -energien wurden dazu Rechnungen mit dem Monte-Carlo-Simulationsprogramm „PARTRAC“ (PARTicle TRACK) [17, 18, 19, 20] am Institut für Strahlenschutz der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, W. Friedland) durchgeführt. In diesen Simulationen wird ein Modell-Zellkern zylindrischer Gestalt (Durchmesser: 15  $\mu\text{m}$ , Höhe: 5  $\mu\text{m}$ , Masendichte: 1,06  $\text{g}/\text{cm}^3$ , [18]) mit einem Volumen von 884  $\mu\text{m}^3$  (vgl. Abb. 2.3) und einer dementsprechenden DNA-Dichte von  $\rho_{\text{DNA}} = 6,8 \cdot 10^6 \text{ bp}/\mu\text{m}^3$  verwendet. Die DNA wird dabei in einzelne, 150 nm lange (entspricht 18 kbp) Chromatinfaserstücke eingeteilt, an welchen Strahlenschäden simuliert und deren Koordinaten registriert werden. Neben den direkten Ionisations- bzw. Anregungsprozessen am DNA-Molekül werden im PARTRAC-Code auch indirekte, chemische Schädigungsereignisse durch Wasser-Radikale berücksichtigt. Bei diesen Rechnungen zeigt sich, dass bei Bestrahlung mit Schwerionen überproportional viele DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, d.h. der  $RBE_{\text{DSB}}$ -Faktor ist größer als eins. Außerdem bestätigen die Simulationsrechnungen den in Abbildung 2.8 angedeuteten Effekt, dass sich Gruppen bestehend aus meh-

rerer *DSBs* innerhalb eines Chromatinfaserstücks ausbilden. Dieser Cluster-Effekt soll durch einen Cluster-Faktor  $F_{\text{Cluster}}$  beschrieben werden.  $F_{\text{Cluster}}$  gibt an, wieviele Doppelstrangbrüche im Mittel auf einem 150 nm langen, geschädigten Chromatinfaserstück beisammen liegen. Diese gehäuften Doppelstrangbrüche befinden sich dabei innerhalb des Durchmessers einer Chromatinfaser, welcher 30 nm beträgt.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellbestrahlungsexperimenten werden, insbesondere bei Verwendung von Ionenstrahlen mit hohen *LET*-Werten, derart gehäufte Doppelstrangbrüche erzeugt. Die Zellantwort auf diese Schäden (Phosphorylierung von H2AX-Histon-Proteinen (Kap. 4.1) bzw. Ansammlung von Reparaturproteinen (Kap. 4.3)) wird mittels Immunofluoreszenz-Methoden sichtbar gemacht, es entstehen sogenannte Foci (siehe Kap. 4.4). Die anschließende optische Mikroskopie erlaubt dabei eine räumliche Auflösung von ca. 190 nm (siehe Kap. 4.5), d.h. eventuell vorhandene, getrennte Foci innerhalb eines Doppelstrangbruch-Clusters werden als ein Fokus registriert. Daher wird im Hinblick auf die Bestrahlungsexperimente eine neue Größe, die Anzahl der *DSB*-Cluster und damit der getrennt sichtbaren Foci pro Einheitslänge der Ionenspur ( $Foci/\Delta x$ ) eingeführt. Diese ergibt sich, indem die spurlängenbezogene Anzahl an Doppelstrangbrüchen  $DSB_{\text{SRE}}/\Delta x$  durch den Cluster-Faktor  $F_{\text{Cluster}}$  dividiert wird. Eine Übersicht der eben beschriebenen Größen für ausgewählte Ionensorten und -energien ist in Abbildung 2.9 zu sehen. Neben den PARTRAC-Daten [22] (schwarz, Friedland) sind außerdem experimentelle Daten für  $RBE_{\text{DSB}}$ -Werte aus [21] (rot, Friedl et al.) eingetragen. In den Bereich der locker ionisierenden Strahlung fallen dabei hochenergetische Protonen mit Energien von mindestens einigen MeV. Diese weisen einen  $RBE_{\text{DSB}}$ -Wert von nur geringfügig über eins auf, Cluster-Effekte spielen wegen der geringen Dichte der Schädigungsereignisse keine Rolle. Schwerere Ionen stellen dicht ionisierende Strahlung dar mit  $RBE_{\text{DSB}}$ -Werten von 2 bis ca. 5. Die Cluster-Bildung von Doppelstrangbrüchen führt dazu, dass die Anzahl beobachtbarer Foci reduziert sein sollte. Dieser Effekt kann sogar die vermehrte Bildung von Doppelstrangbrüchen an sich überwiegen (siehe 50 MeV  $^{16}\text{O}$  in Abb. 2.9). Für schwere Schwerionen mit Energien nahe dem *LET*-Maximum (2,14 GeV  $^{238}\text{U}$ ) zeigt sich ein deutlicher Rückgang des  $RBE_{\text{DSB}}$ -Wertes auf knapp über eins. Dies liegt daran, dass hier ein Sättigungseffekt in der Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen auftritt. Diese Sättigung wird dadurch verursacht, dass innerhalb der Ionenspur jede Molekülbindung zerstört wird, sich dort aber andererseits aus Gründen der räumlichen Anordnung nur eine begrenzte DNA-Menge befindet. Eine Steigerung der Energiedeposition in der Ionenspur führt zu keinen zusätzlichen Schäden mehr („Overkill“-Effekt).

Die weiter oben durchgeführte, geometrische Überlegung bezüglich der Anzahl direkt getroffener Chromatinfasern (1,8 pro  $\mu\text{m}$  Ionenspur) ist ebenfalls in Abbil-



**Abbildung 2.9:** Anzahl an erzeugten Doppelstrangbrüchen pro  $\mu\text{m}$  Ionenspur in linearer Abschätzung (links) für einen Zellkern mit einer DNA-Dichte von  $\rho_{\text{DNA}} = 8,5 \cdot 10^6 \text{ bp}/\mu\text{m}^3$  (siehe Abb. 2.5, Skala ganz rechts). Die Gewichtung mit dem entsprechenden  $\text{RBE}_{\text{DSB}}$ -Wert ergibt die tatsächlich zu erwartende Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen (mitte). Außerdem ist die zu erwartende, um den Cluster-Faktor  $F_{\text{Cluster}}$  reduzierte Anzahl an getrennt sichtbaren Foci eingetragen (rechts). Die rot markierten, experimentellen Daten stammen aus [21], die schwarz markierten Simulationsdaten aus [22]. Der blau markierte Eintrag entspricht der einfachen Abschätzung direkt getroffener Chromatinfasern (siehe Abb. 2.8).

dung 2.9 (blau) eingetragen. Dieser Wert kann als grobe Abschätzung der erzeugten *DSB*-Cluster ( $Cluster/\Delta x$  bzw.  $Foci/\Delta x$ ) bei „durchgehenden“, d.h. hinreichend dicht ionisierenden Spuren betrachtet werden. Man erkennt, dass die PARTRAC-Simulationsdaten und die einfache „Geometrie“-Abschätzung im Rahmen der Vergleichbarkeit miteinander vereinbar sind.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die durch den Cluster-Effekt bewirkte Reduzierung der beobachteten Foci keinerlei Reduzierung eines biologischen Effekts wie z.B. des Zellabsterbens bedeutet. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass sehr nahe beieinanderliegende DNA-Doppelstrangbrüche aufgrund der Gefahr fehlerhafter DNA-Reparatur zu erhöhter Zellschädigung führen.

## 2.3 Radiale Dosis- und DNA-Strangbruchverteilungen

Bei den bisherigen Betrachtungen wurden die Energiedosis im Zellkern und die dadurch erzeugten DNA-Strahlenschäden lediglich auf die Länge der Ionenspür bezogen. Tatsächlich jedoch sind die lokalen Energiedosiswerte, abhängig von ihrem radialen Abstand zum Ionendurchgang, sehr unterschiedlich. Diese Art der Betrachtungsweise stellt den Übergang zur Mikrodosimetrie dar. Von den existierenden Modellen [23, 24] soll im Folgenden das analytisch leicht auswertbare Modell nach Chatterjee [23] behandelt werden. Die Modelle der radialen Dosisverteilung unterscheiden sich insbesondere bei kleinen radialen Abständen (im „core“-Bereich) sowie bei der maximalen Ausdehnung am Ende der Reichweite von hochenergetischen Sekundärelektronen [24].

Zur Veranschaulichung zeigt das linke Teilbild in Abbildung 2.10 eine Monte-Carlo-Simulation (PARTRAC) der Verteilung von Ionisationsereignissen eines 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen-Durchgangs in Wasser. Man erkennt deutlich die zentrale Spur aus sich überlappenden Ionisationsereignissen, die nach dem Modell von Chatterjee als „core“ bezeichnet wird [23]. Als Untergrenze für die Ausbildung eines zusammenhängenden „core“ kann ein minimaler  $LET_{\infty}$ -Wert von 13 keV/ $\mu\text{m}$  angegeben werden [25]. Durch Stöße mit höheren Energieüberträgen entstehen Sekundärelektronen mit größerer Reichweite (sog.  $\delta$ -Elektronen), welche die zentrale Spur verlassen und die sogenannte „Penumbra“ bilden [23]. Die Radien von „core“  $r_C$  und „Penumbra“  $r_P$  hängen nur von der Projektilgeschwindigkeit ab und können für das Targetmaterial Wasser nach Chatterjee durch folgende empirische Ausdrücke ermittelt werden [23]:

$$r_C = 0,0116 \cdot \beta \quad (\mu\text{m}) \quad \text{mit} \quad \beta = \frac{v_{\text{Projektil}}}{c} \quad (2.6)$$

$$r_P = 0,768 \cdot E - 1,925 \cdot \sqrt{E} + 1,257 \quad (\mu\text{m}) \quad \text{mit} \quad E = \frac{E_{\text{kin,Projekt}}}{m_{\text{Projekt}}} \quad (\text{MeV/u}) \quad (2.7)$$

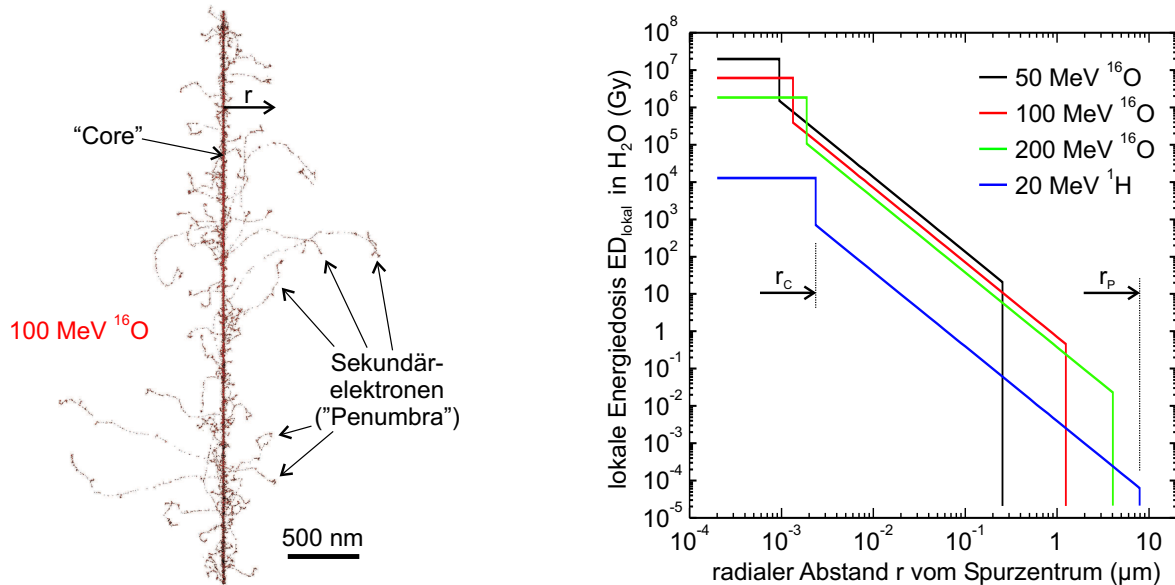
Die Ausdrücke 2.6 und 2.7 sind anwendbar für Werte von  $E > 2 \text{ MeV/u}$ , wobei der Zahlenwert von  $E$  dimensionslos in Formel 2.7 einzusetzen ist. Vernachlässigt man die im linken Teilbild von Abbildung 2.10 dargestellte, stochastische Erzeugung von Sekundärelektronen, so kann man zu einer kontinuierlichen Beschreibung der lokalen Energiedosis gelangen, welche nur vom Abstand zum Spurzentrums abhängt. Innerhalb des „core“ kann die Energiedosis  $ED_{\text{lokal}}$  als konstant angesetzt werden [23]:

$$ED_{\text{lokal}} = \rho_{\text{H}_2\text{O}}^{-1} \cdot \left( \frac{LET_{\infty}/2}{\pi \cdot r_C^2} + \frac{LET_{\infty}/2}{2 \cdot \pi \cdot r_C^2 \cdot \ln(\sqrt{e} \cdot r_P/r_C)} \right) \quad \text{für} \quad r \leq r_C \quad (2.8)$$

$e \approx 2,718$  stellt dabei die Basis des natürlichen Logarithmus dar. In diesem zentralen Spurbereich werden Energiedosen von mehr als  $10^7 \text{ Gy}$  deponiert. Außerhalb des „core“ fällt die lokale Energiedosis  $ED_{\text{lokal}}$  mit  $r^{-2}$  ab und nimmt bei  $r_P$  durch die begrenzte Reichweite der Sekundärelektronen maximaler Energie den Wert 0 an:

$$ED_{\text{lokal}}(r) = \rho_{\text{H}_2\text{O}}^{-1} \cdot \frac{LET_{\infty}/2}{2 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \ln(\sqrt{e} \cdot r_P/r_C)} \quad \text{für} \quad r_C < r \leq r_P \quad (2.9)$$

In Abbildung 2.10 (rechts) ist exemplarisch für eine kleine Anzahl von Ionenstrahlensorten die radiale Verteilung der lokalen Energiedosis aufgetragen. Die großen, abso-

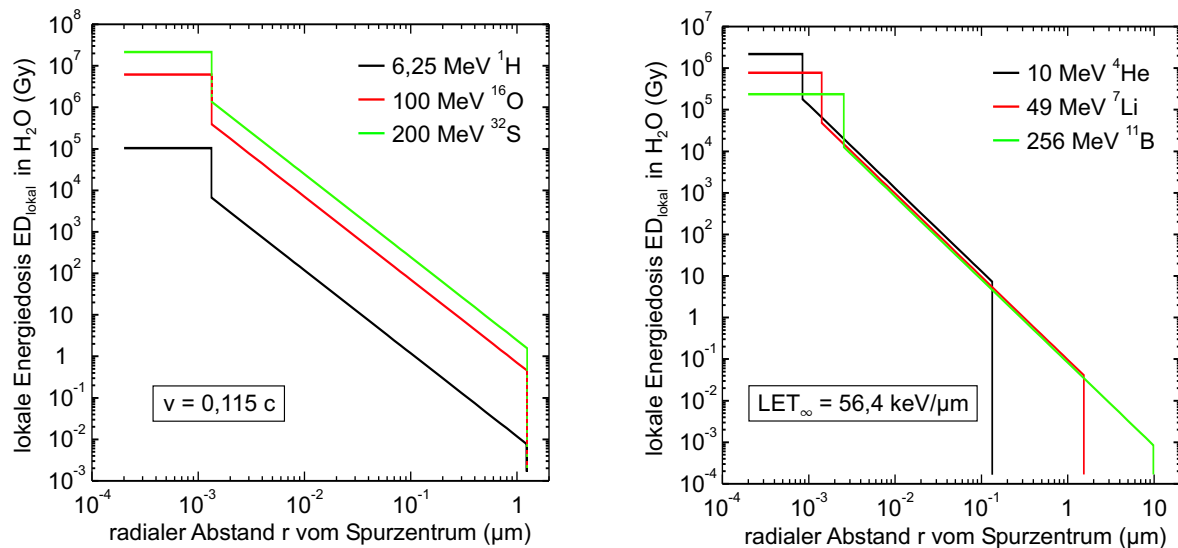


**Abbildung 2.10:** Links: PARTRAC-Monte-Carlo-Simulation [22] der Ionisationsereignisse der Spur eines  $100 \text{ MeV } ^{16}\text{O}$ -Ions in Wasser. Rechts: Radiale Verteilung der lokalen Energiedosis  $ED_{\text{lokal}}$  nach dem Modell von Chatterjee [23].



luten Unterschiede in der lokalen Dosis zwischen 20 MeV  $^1\text{H}$ - und z.B. 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen spiegeln die entsprechenden Unterschiede im  $LET_\infty$ -Wert wider. Der „core“-Radius der betrachteten Ionen erstreckt sich dabei von knapp unter 1 nm bis über 2 nm. Der „Penumbra“-Radius weist eine deutlich stärkere Abhängigkeit von der Projektilgeschwindigkeit auf und reicht von weniger als 300 nm (50 MeV  $^{16}\text{O}$ ) bis knapp 8  $\mu\text{m}$  (20 MeV  $^1\text{H}$ ). Dieser Bereich überdeckt somit die für Zellbestrahlungen relevanten Größenverhältnisse, von Substrukturen des Zellkerns bis hin zur Ausdehnung einer kompletten Zelle. Zu beachten ist jedoch, dass die Dosisbeiträge bei großen radialen Abständen von höherenergetischen Sekundärelektronen herrühren, welche nur mit geringer Wahrscheinlichkeit erzeugt werden. So kann bei einem zentralen Stoß ein 20 MeV  $^1\text{H}$ -Ion maximal eine Energie von 44 keV auf ein Elektron übertragen. Der Wirkungsquerschnitt für die Erzeugung eines Sekundärelektrons mit mehr als 30 keV beträgt jedoch nur 62 b<sup>(2)</sup>. Bei einer Elektronendichte von  $3,35 \cdot 10^{23} \text{ cm}^{-3}$  in Wasser muss ein 20 MeV  $^1\text{H}$ -Ion im Mittel eine Strecke von ca. 0,5 mm durchlaufen, damit ein derartiger Energieübertrag stattfindet. Daher ist die in Abbildung 2.10 (rechts) gezeigte, radiale Dosisverteilung als Mittelung über ein Spurstück hinreichender Länge ( $> 0,5 \text{ mm}$ ) zu verstehen. Für den konkreten Fall der Bestrahlung eines Zellkerns mit einer Höhe von

<sup>(2)</sup>1 b = 1 barn =  $10^{-24} \text{ cm}^2$  ist die Einheit des Wirkungsquerschnitts.

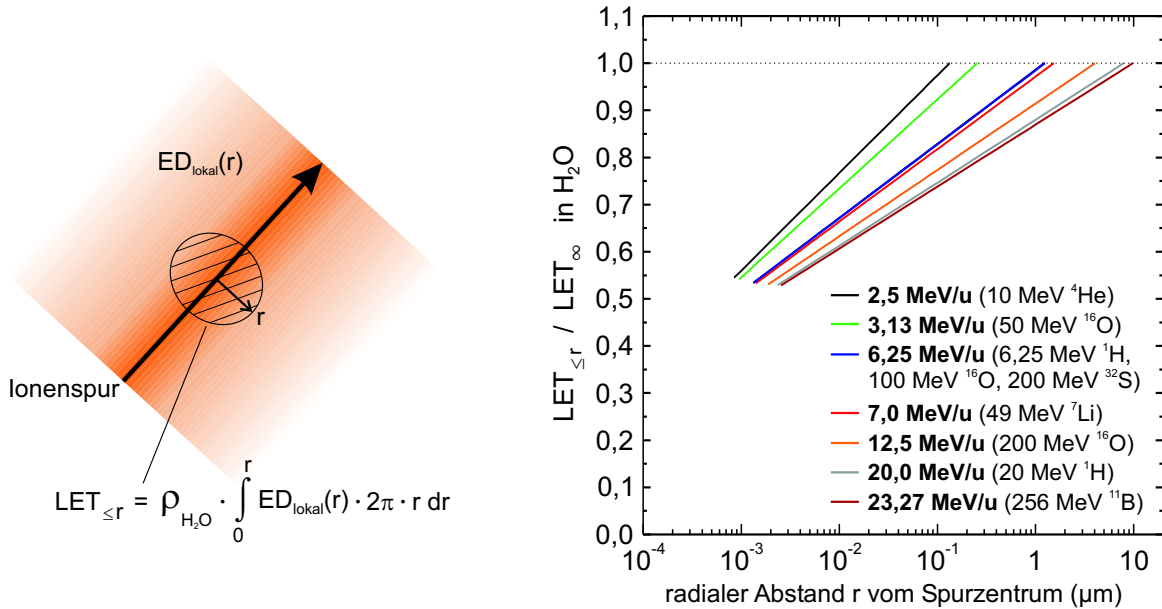


**Abbildung 2.11:** Links: Radiale Dosisverteilungen [23] bei gleicher Ionengeschwindigkeit aber unterschiedlichen  $LET_\infty$ -Werten (6,25 MeV  $^1\text{H}$ : 6,8 keV/ $\mu\text{m}$ , 100 MeV  $^{16}\text{O}$ : 405 keV/ $\mu\text{m}$ , 200 MeV  $^{32}\text{S}$ : 1,41 MeV/ $\mu\text{m}$ ).

Rechts: Radiale Dosisverteilungen [23] bei gleichem  $LET_\infty$ -Wert aber unterschiedlichen Geschwindigkeiten (10 MeV  $^4\text{He}$ : 0,0731 c, 49 MeV  $^7\text{Li}$ : 0,122 c, 256 MeV  $^{11}\text{B}$ : 0,219 c).

7,60  $\mu\text{m}$  bedeutet dies, dass ein 20 MeV  $^1\text{H}$ -Ion nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,6 % ein Sekundärelektron mit einer Energie von mehr als 30 keV innerhalb des Zellkerns erzeugt.

In Abbildung 2.11 sind die radialen Dosisverteilungen für zwei Spezialfälle dargestellt. Im linken Teilbild erkennt man die Verteilungen für drei Ionenstrahlen mit gleicher Geschwindigkeit aber unterschiedlichen  $LET_\infty$ -Werten. In diesem Fall ergeben sich einheitliche Werte für den „core“- und den „Penumbra“-Radius. Im rechten Teilbild sind die entsprechenden Verteilungen für drei Strahlarten mit dem gleichen  $LET_\infty$ -Wert aber unterschiedlichen Geschwindigkeiten dargestellt. Während sich hier die lokalen Energiedosen in einem weiten Radiusbereich kaum unterscheiden, so differieren die Ausläufer bis zum jeweiligen „Penumbra“-Radius deutlich.



**Abbildung 2.12:** Links: Zusammenhang zwischen radialer Dosisverteilung und radial beschränktem LET-Wert. Rechts: Radial beschränkter LET-Wert normiert auf den  $LET_\infty$ -Wert für eine exemplarische Auswahl an Ionensorten im „Penumbra“-Bereich [23].

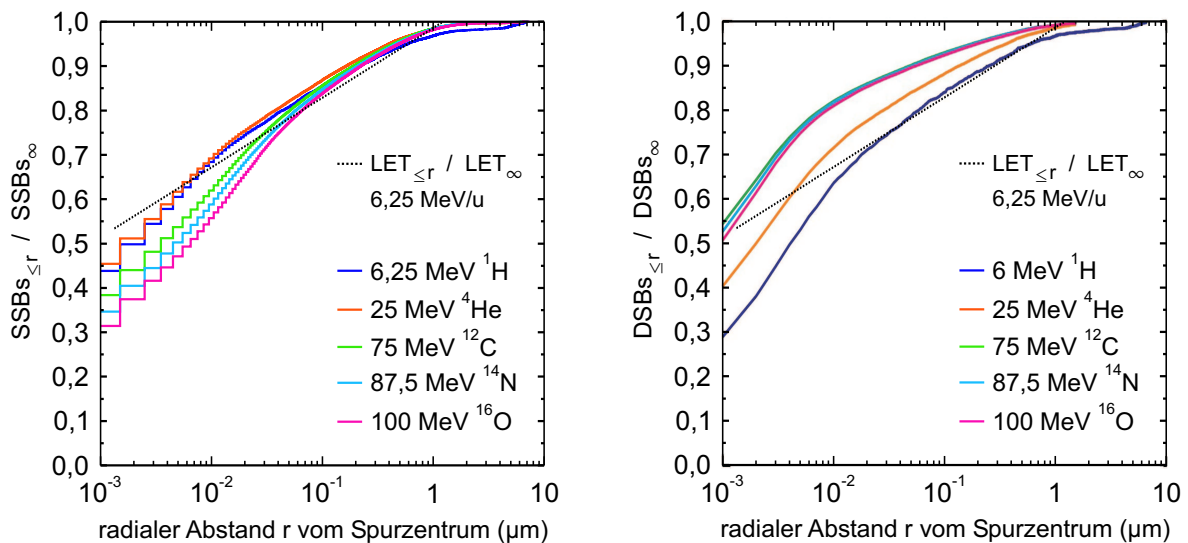
Integriert man die eben diskutierte, radiale Energiedosisverteilung über die Kreisfläche, welche sich innerhalb des Radius  $r$  um die zentrale Ionenspur befindet (siehe Abb. 2.12 links), so erhält man, unter Berücksichtigung der Massendichte  $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ , den radial beschränkten LET-Wert ( $LET_{\leq r}$ -Wert). Dieser beschreibt die Energie, die pro Einheitslänge der Spur innerhalb eines bestimmten Radius  $r$  deponiert wird. Normiert auf den  $LET_\infty$ -Wert erhält man so für den Radiusbereich innerhalb der „Penumbra“ [23]:

$$\frac{LET_{\leq r}}{LET_\infty} = 0,5 + \frac{1 + 2 \cdot \ln(r/r_C)}{4 \cdot \ln(\sqrt{e} \cdot r_P/r_C)} \quad \text{für } r_C < r \leq r_P \quad (2.10)$$

In Abbildung 2.12 (rechts) ist der normierte  $LET_{\leq r}$ -Wert für eine Auswahl an Ionensorten im Bereich der „Penumbra“ dargestellt. Durch die Normierung ergibt sich für alle Projektile mit gleicher Geschwindigkeit bzw. mit gleichem Verhältnis von kinetischer Energie zu Massenzahl dieselbe radiale Abhängigkeit (vgl. mit Abb. 2.11 links). Man erkennt, dass jeweils ungefähr die eine Hälfte der Energie im „core“, die andere Hälfte in der „Penumbra“ deponiert wird. Verglichen mit Monte-Carlo-Simulationsrechnungen zeigt das empirische Modell von Chatterjee gute Übereinstimmung im Bereich größerer Radien von mehr als ca. 10 nm [26].

Bisher wurde in diesem Kapitel die radiale Verteilung der Energiedosis untersucht. Für die mikroskopische Analyse bestrahlter Zellkerne sind jedoch die Verteilungen der erzeugten DNA-Einzel- und insbesondere der DNA-Doppelstrangbrüche von Interesse. Daher wurden mit Hilfe des PARTRAC-Programmpakets für unterschiedliche Ionensortensorten Simulationsrechnungen durchgeführt [22]. Um die effektiven Unterschiede zwischen leichten und schweren Ionen darzustellen, wurden dabei nur Ionen mit gleicher kinetischer Energie pro Massenzahl von 6,25 MeV/u und dadurch gleichem, normiertem  $LET_{\leq r}$ -Wert betrachtet. Die Auswertung der Koordinaten für die auftretenden Einzel- bzw. Doppelstrangbruchereignisse liefert jeweils deren radiale Abstände vom Zentrum der Ionenspur.

Im linken Teilbild von Abbildung 2.13 erkennt man für die betrachtete Auswahl



**Abbildung 2.13:** Radial beschränkte Verteilungen der DNA-Einzelstrangbrüche (links) bzw. DNA-Doppelstrangbrüche (rechts) normiert auf die jeweilige Gesamtanzahl berechnet mit dem Monte-Carlo-Simulationsprogramm PARTRAC [22]. Die gestrichelte Linie zeigt das Resultat für die physikalische Dosisverteilung nach dem Chatterjee-Modell [23] (siehe Gleichung 2.10 bzw. Abbildung 2.12 rechts).

an Ionen die berechneten, radial beschränkten Verteilungen von Einzelstrangbrüchen  $SSBs_{\leq r}$  normiert auf die Gesamtanzahl  $SSBs_{\infty}$ . Innerhalb des „core“ liegt bei den leichten Ionen ein größerer Anteil an Einzelstrangbrüchen als bei den schwereren Ionen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass dort bei den schweren Ionen Sättigungseffekte in der Schädigung und damit eine Erniedrigung der Effizienz in der  $SSB$ -Generierung vorliegen. Außerhalb eines Radius von ca. 100 nm sind die Unterschiede in der radialen Verteilung vernachlässigbar, das empirische Modell von Chatterjee für die Energiedosisverteilung steht in Einklang mit den Kurvenverläufen.

Im rechten Teilbild der Abbildung 2.13 sind die entsprechenden, radial beschränkten Doppelstrangbruchverteilungen  $DSBs_{\leq r}$  normiert auf die Gesamtanzahl  $DSBs_{\infty}$  dargestellt. Die Verhältnisse innerhalb des „core“ sind hier gegensätzlich zu den Einzelstrangbruchverteilungen. Da zwei dicht beieinander liegende Einzelstrangbrüche einen Doppelstrangbruch bilden können (siehe Abb. 4.1), werden diese von schweren Ionen mit überproportionaler Häufigkeit in den dicht geschädigten Spurbereichen nahe des „core“ erzeugt. Daher bleibt der relative Anteil an Doppelstrangbrüchen, welcher außerhalb eines bestimmten Radius liegt, bei schweren Ionen deutlich hinter dem relativen Anteil an Einzelstrangbrüchen zurück. Dagegen gehen bei einem simulierten Strahl von 25 MeV  $^4\text{He}$  die radialen Verteilungen der Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche konform. 6,25 MeV  $^1\text{H}$  weisen im Bereich des „core“ einen geringeren Anteil an Doppelstrangbrüchen auf, außerhalb eines Radius von ca. 20 nm stimmt hier der radiale Verlauf der Doppelstrangbrüche sehr gut mit dem Chatterjee-Modell der Dosisverteilung überein. Für einen 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Strahl lässt sich zusammenfassend feststellen, dass bei diesen Spuren 90 % der physikalischen Dosis innerhalb eines Radius von 300 nm, 90 % der DNA-Einzelstrangbrüche innerhalb eines Radius von 200 nm und 90 % der DNA-Doppelstrangbrüche innerhalb eines Radius von lediglich ca. 50 nm liegen. Bei der optischen Analyse räumlicher Verteilungen von immunofluoreszenzmarkierten Doppelstrangbrüchen (siehe Kap. 5.1, Foci-Größen: Abb 5.2) ist der letztgenannte Beitrag daher vernachlässigbar.

Werden für Mikro-Bestrahlungsexperimente jedoch leichtere und vor allem schnellere Projektile (z.B. 20 MeV Protonen) anstelle der oben diskutierten 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen verwendet, so muss bei der optischen Untersuchung von auftretenden DNA-Doppelstrangbrüchen berücksichtigt werden, dass diese bereits bei ihrer Entstehung eine erhebliche, nicht vernachlässigbare ( $> 1 \mu\text{m}$ ) Streuung um die Ionenspur aufweisen.

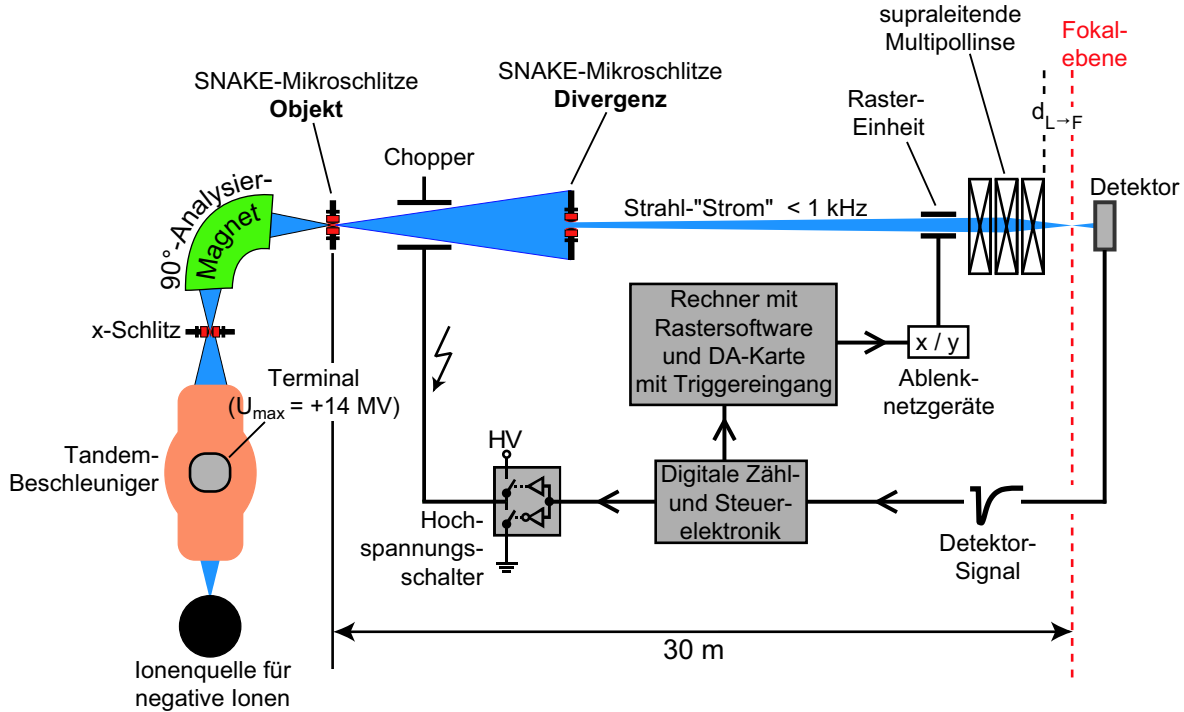
# Kapitel 3

## Zellbestrahlungsaufbau an SNAKE

### 3.1 Ionenoptik

Ausgangsbasis für den Bestrahlungsaufbau ist das supraleitende Rasterionenmikroskop SNAKE (supraleitendes Nanoskop für angewandte kernphysikalische Experimente) [27, 28] am Garching 14 MV-Tandembeschleuniger. Das Rasterionenmikroskop wurde ursprünglich dafür ausgelegt, hochenergetische Ionen auf Strahldurchmesser von bis zu 100 nm zu fokussieren. Dabei sollten die für Materialuntersuchungen notwendigen Strahlströme im Bereich von 100 pA erreicht werden. In Abbildung 3.1 ist eine schematische Übersicht der Strahlführung am Rasterionenmikroskop SNAKE zu sehen. Die Ionen des gewünschten Nuklids werden zunächst in der Ionenquelle im Ladungszustand  $q_- = -1$  erzeugt und zum positiv geladenen Hochspannungs-Terminal (Spannung  $U$ , mit  $U_{\max} = +14$  MV) in der Mitte des Beschleuniger-Drucktanks beschleunigt. Beim Durchfliegen der dortigen Kohlenstoff-Stripperfolie [29] werden Elektronen der Ionen abgestreift. Die Ionen liegen nun in einem positiven Ladungszustand  $q_+ = +x$  vor, wobei  $x$  einer statistischen Verteilung unterliegt [30]. Vom Terminal werden diese Ionen abgestoßen und erreichen das Massepotential des Beschleuniger-Ausgangs mit einer kinetischen Energie von  $E_{\text{kin}} = U \cdot (1 + x) \cdot e$  (mit  $e =$  Elementarladung). Der  $90^\circ$ -Analyse-Magnet selektiert den gewünschten Ionenstrahl, der ein bestimmtes Verhältnis von Impuls zu Ladungszustand besitzt.

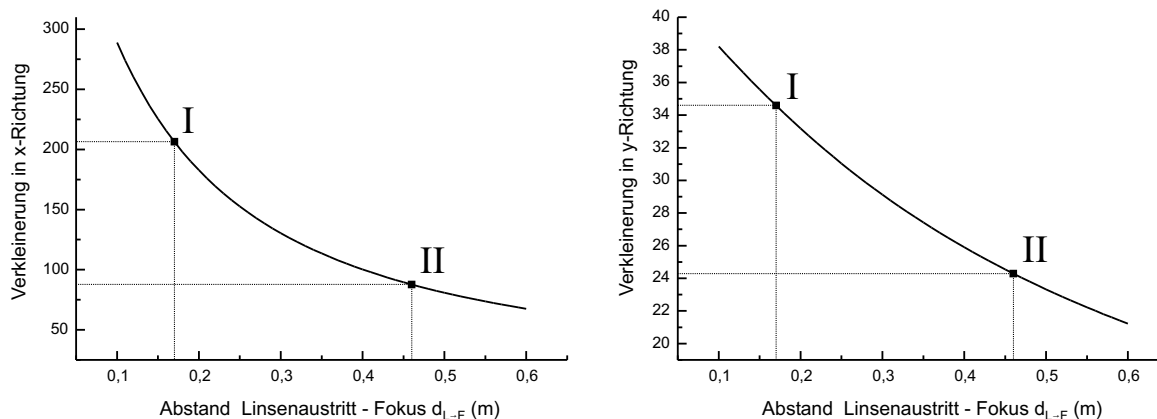
Das Ausgangsobjekt für die Ionenoptik der Mikrosonde SNAKE wird von den Objekt-Mikroschlitz [31] definiert. Die Apertur des Strahls kann mit Divergenz-Mikroschlitz eingestellt werden. Der in dieser Weise präparierte Ionenstrahl wird mittels einer supraleitenden, magnetischen Multipollinse [28] in die Fokalebene fokussiert. Die kurze Brennweite des Systems sowie in die Polschuhform eingearbeitete Multipolfelder höherer Ordnung erlauben eine starke Verkleinerung bei minimierten Abbildungsfehlern. Elektrostatische Ablenkplatten (Raster-Einheit) ermöglichen die



**Abbildung 3.1:** Schematische Übersicht der Strahlführung am Rasterionenmikroskop SNAKE. Dargestellt ist der Betriebs-Modus zur Einzelionenbestrahlung.

Ablenkung und damit die Positionierung des Ionenstrahls an unterschiedliche Orte in der Fokalebene.

Ursprüngliche Experimente fanden in einer evakuierten Targetkammer statt [32, 33]. Für eine Bestrahlung von lebenden Zellen, welche an Atmosphärendruck erfolgen muss, ist diese Umgebung jedoch ungeeignet. Zum einen stellt die Targetkammer als solche eine räumliche Einschränkung dar. Zum anderen wird durch die kurze Brennweite der supraleitenden Linse der Einbau spezieller Komponenten wie eines verstellbaren Austrittsmechanismus und einer Beleuchtungseinrichtung (siehe Kap. 3.2 bzw. 3.5) erschwert oder sogar unmöglich. Es wurde daher entschieden, die Targetvakuumkammer zu entfernen sowie die Fokalebene des Rasterionenmikroskops weiter von der supraleitenden Linse entfernt zu positionieren. Mit der Verlängerung der Brennweite nimmt man allerdings eine Reduzierung der ionenoptischen Verkleinerung in Kauf. Unter Verwendung des Computercodes Transport [34] wurden daher für verschiedene Abstände zwischen Linsenausritt und Fokuspunkt  $d_{L \rightarrow F}$  (siehe Abb. 3.1) die Verkleinerungsmaßstäbe für die beiden lateralen Richtungen  $x$  und  $y$  ermittelt. Abbildung 3.2 zeigt den Zusammenhang dieser Größen. Der Berechnung wurde dabei zugrundegelegt, dass die erste Sektion der supraleitenden Linse in  $y$ , die zweite und dritte Sektion mit je-



**Abbildung 3.2:** Ionenoptische Verkleinerungsfaktoren in Abhängigkeit des Abstandes Linsenaustritt – Fokus  $d_{L \rightarrow F}$  für die beiden lateralen Richtungen  $x$  und  $y$ . I: ursprüngliche Konfiguration, II: neue Konfiguration. Man beachte die Unterdrückung des Nullpunktes auf beiden Achsen.

weils gleichstarkem Magnetfeld in  $x$ -Richtung fokussieren. Dadurch ergibt sich für die  $x$ -Richtung generell eine stärkere Verkleinerung. In der ursprünglichen Konfiguration von SNAKE betrug der Abstand zwischen Linsenaustritt und Fokalebene 17 cm, die Verkleinerungsfaktoren berechnen sich dementsprechend zu 206 in  $x$ - und 35 in  $y$ -Richtung (siehe Abb. 3.2, Punkt I). Dem Bestrahlungsaufbau liegt ein neuer Abstand von 46 cm zugrunde. Die Verkleinerung beträgt jetzt 88 in  $x$ - und 24 in  $y$ -Richtung (Abb. 3.2, Punkt II). Bei einer typischen Öffnung der Objektschlitze von  $25 \mu\text{m}$  in  $x$ - und  $10 \mu\text{m}$  in  $y$ -Richtung ist mit diesen Verkleinerungsfaktoren in der Fokalebene immer noch ein Strahldurchmesser von unter  $0,5 \mu\text{m}$  erreichbar.

Die Korrekturen durch höhere Multipolordnungen, welche in der supraleitenden Linse integriert sind, arbeiten nur optimal für den ursprünglichen Abstand zwischen Linse und Strahlfokus von 17 cm. Da jedoch bei den Zellbestrahlungen mit einzelnen Ionen nur ein kleiner Bruchteil der Apertur ausgeleuchtet wird, sind keine merklich negativen Auswirkungen der höheren Ordnungen bei einem Abstand von 46 cm zu erwarten [35].

## 3.2 Strahlaustritt und Ionendetektion

Zweck des Bestrahlungsaufbaus ist es, lebende biologische Zellen zielgenau mit hochenergetischen Ionen bestrahlen zu können. Eine wesentliche Voraussetzung für die Handhabung der Zellen ist dabei, dass die Bestrahlung an Atmosphärendruck erfolgt. Der Ionenstrahl muss daher das Vakuum des Strahlführungssystems verlassen bei gleichzeitiger Bewahrung der lateralen Auflösung des fokussierten Strahls. Außer-

dem muss die Zellprobe für den Strahl mit je nach Ionensorte begrenzter Reichweite zugänglich sein.

In Abbildung 3.3 ist eine Übersichtszeichnung des Bestrahlungsaufbaus gegeben. Man erkennt eine Querschnittsdarstellung des Außenbehälters des He-Bad-Kryostaten, in dem sich die elektrostatische Raster-Einheit sowie die supraleitende Linse auf Temperatur von flüssigem Helium (4,2 K) befindet. Wegen der neuen, längeren Brennweite des ionenoptischen Systems wurden die Skalierungsfaktoren der Ablenkeinheit, die man zur absoluten Positionierung des Strahls am Fokuspunkt benötigt, neu ermittelt. In den Aufbau wurde ein inverses, optisches Mikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss (Lichtmikroskopie), Göttingen) mit CCD-Kamera zur Bildaufnahme sowie Fluoreszenzvorbereitung für eventuelle Fluoreszenzbeobachtungen integriert. An diesem Mikroskop, welches gewöhnlich für Routineuntersuchungen an Zellkulturen verwendet wird, wurde die Einheit zur Durchlichtbeleuchtung entfernt. So ist es möglich, den Ionenstrahl von der Seite, welche den Mikroskopobjektiven gegenüberliegt, an die Zellprobe heranzuführen. Um das Blickfeld des optischen Mikroskops auf die Achse des Ionenstrahls ausrichten zu können, ist dieses auf ein Positioniersystem (Fa. isel, Eichenzell) montiert.

Als Abschluss für das Vakuum des Strahlführungssystems dient eine 7,5  $\mu\text{m}$  dicke Kapton-Folie. Diese wird auf ein Endstück aus Messing aufgeklebt. Eine Querschnittszeichnung dieser Anordnung ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Man erkennt die erhabene Struktur des eigentlichen Austrittsfensters, welches vom Ionenstrahl passiert wird.

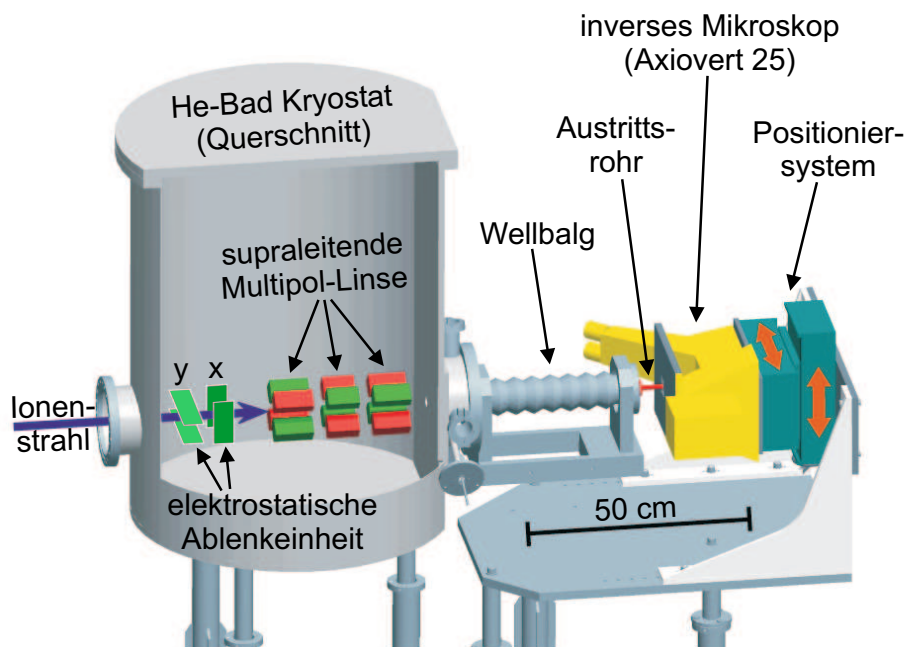
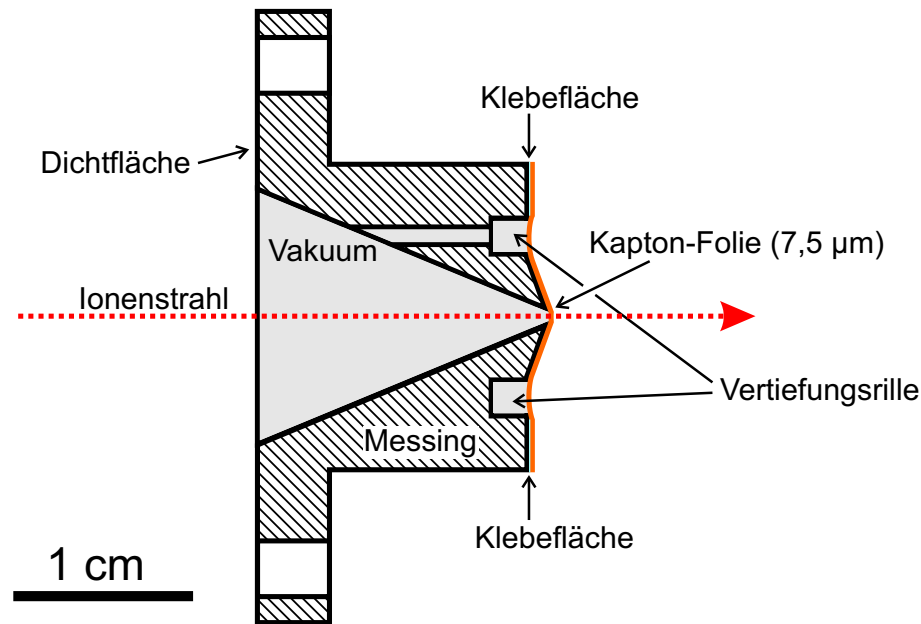


Abbildung 3.3: CAD-Übersichtszeichnung [36] des Bestrahlungsaufbaus.





**Abbildung 3.4:** Querschnittszeichnung durch das Endstück für den Strahlaustritt aus dem Vakuum.

Außerdem ist in das Endstück eine umlaufende Vertiefungsrille eingearbeitet, welche mit dem Vakuumsystem verbunden ist. Dadurch wird auf die geklebte und vorgespannte Folie zusätzlich Zugkraft ausgeübt. Ein Durchhängen der Folie im eigentlichen Fensterbereich aufgrund des äußeren Luftdrucks kann so minimiert werden. Das eingebaute Vakuumfolienfenster kann dabei stets mit dem optischen Mikroskop kontrolliert werden. Mit einem Objektiv mit 40facher Vergrößerung, numerischer Apertur 0,5 und dementsprechend geringer optischer Tiefenschärfe von ca.  $4\ \mu\text{m}$  konnte die maximale Durchbiegung des Fensters in dessen Mitte zu weniger als  $30\ \mu\text{m}$  ermittelt werden. Diese Durchbiegung des Austrittsfensters ist bei der Verbreiterung des Strahls durch Winkelstreuung zu berücksichtigen (siehe Kap. 3.7).

Das Strahlaustrittsfenster kann mit Hilfe einer vakuumdichten Wellbalgverbindung in Strahlrichtung verschoben werden. Der Antrieb erfolgt durch einen schrittmotorgetriebenen Lineartisch (Fa. isel, Eichenzell), welcher von einer rechnergesteuerten Endstufe (Fa. Phytron, Gröbenzell) angesteuert wird. Die minimale Schrittweite beträgt dabei ca.  $3\ \mu\text{m}$ . Dies erlaubt ein definiertes Anfahren von einjustierten Positionen des Austrittsfensters, wodurch während den Zellbestrahlungen ein schneller Probenwechsel möglich ist. Eine laterale Ausrichtung des Austrittsfensters relativ zur Strahlachse kann durch manuell betätigte Mikrometerschrauben vorgenommen werden.

Der Nachweis einzelner, an Atmosphärendruck vorliegender Ionen bei den Zellbestrahlungsexperimenten erfolgt mit einem Szintillationsdetektor, der anstelle eines Mikro-

skopobjektivs in den Objektivrevolver eingeschraubt ist. Dieser Detektor besteht aus einem kompakten Photomultiplier (Metal Package, R7400P, Fa. Hamamatsu, Herrsching am Ammersee), auf dessen Fenster ein 1 mm dickes Plättchen aus Plastiksintillator (BC400, Fa. Bicron (Saint-Gobain Crystals), Nemours Cedex, Frankreich) montiert wurde. Diese Anordnung wurde mit Hilfe einer 5  $\mu\text{m}$  dicken Aluminiumfolie lichtdicht versiegelt. Eine zusätzliche, aluminisierte Mylarfolie (0,9  $\mu\text{m}$ ) dient als Schutz und reduziert darüberhinaus den Lichteintrag durch eventuelle Pinholes in der Aluminiumfolie. Die hohe Energie der bei den Zellbestrahlungen verwendeten Ionen ermöglicht den Eintritt in den Detektor durch diese beiden Folien.

### 3.3 Einzelionenpräparation

Um eine Bestrahlung der Zellen mit genau definierter Dosis zu gewährleisten, genügt es nicht, durch Auswahl der Ionensorte sowie der Ionenenergie einen bestimmten *LET*-Wert (siehe Abb. 2.5) einzustellen. Darüberhinaus muss die Bestrahlung mit einer bestimmten Anzahl von Ionen erfolgen. Die geringste applizierbare Dosis stellt ein einzelnes Ion dar.

Voraussetzung für das Herauspräparieren von einzelnen Ionen aus einem kontinuierlichen Teilchenstrahl, wie er vom Tandembeschleuniger geliefert wird, ist eine Reduktion der Ionenrate auf weniger als  $10^3 \text{ s}^{-1}$ . Dies geschieht durch eine starke Beschneidung des Ionenstrahls, welche ohnehin notwendig ist, um mit der Mikrosonde SNAKE gute Abbildungseigenschaften zu erzielen. Die Beschneidung erfolgt mit den in Abbildung 3.1 dargestellten SNAKE-Mikroschlitzten. Typische Öffnungen sind z.B. 25  $\mu\text{m}$  für die x- und 10  $\mu\text{m}$  für die y-Objektschlitzte. Die 5,7 m entfernten Divergenzschlitze zur Beschneidung der Apertur werden auf 50  $\mu\text{m}$  in beiden lateralen Richtungen eingestellt. Am Fokuspunkt führt dies zu einer Strahldivergenz von 0,77 mrad in x- und 0,21 mrad in y-Richtung.

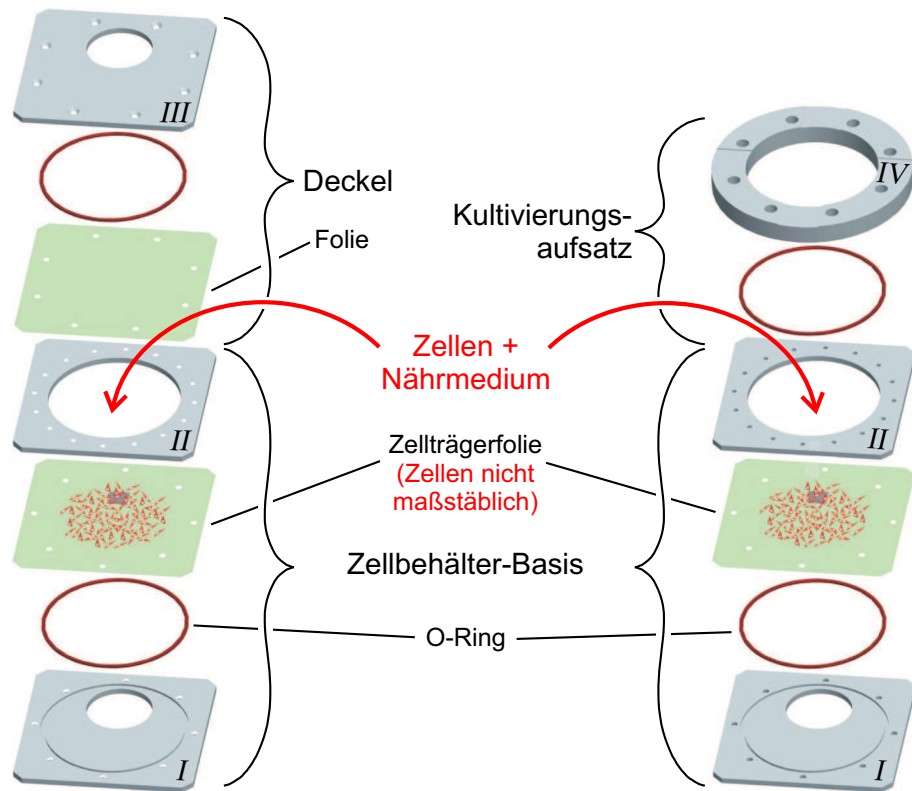
Um aus einem derart präparierten Strahl einzelne Ionen herauszuschneiden, muss man den Strahl innerhalb einer Zeitspanne ein- bzw. ausschalten können, welche deutlich unterhalb der mittleren Zeit zwischen zwei Ionentreffern, also  $10^{-3} \text{ s}$ , liegt. Dieser Vorgang geschieht mittels eines elektrostatischen Ablenkplattensystems (Chopper) [37]. Es wird bei den Bestrahlungsexperimenten so betrieben, dass die obere der beiden Platten konstant auf Massepotential gehalten wird, während ein Halbleiter(MOSFET)-Hochspannungsschalter (HTS 81-06-GSM, Fa. Behlke, Kronberg) an die untere der beiden Platten wechselseitig negative Hochspannung, typisch -0,5 kV, und ebenfalls Massepotential anlegt. Bei anliegender Spannung ändert der Ionenstrahl am Chopper seine Richtung und kann daher aufgrund der engen Divergenzschlitze die supraleitende

Linse nicht mehr erreichen. Auf ein Triggersignal hin wird die Platte auf Massepotential gelegt. Die Strahlteilchen, die den Chopper jetzt passieren, erreichen die supraleitende Linse und treffen fokussiert auf die Bestrahlungsprobe. Hat der Detektor (siehe Kap. 3.2) die gewünschte Ionenanzahl registriert, so wird die Platte erneut auf Hochspannung gebracht und dadurch der Strahl gestoppt.

Die Schaltzeit für die Hochspannungsrampe beträgt dabei  $0,2\ \mu\text{s}$ . Als wesentliche Begrenzung der Reaktionsgeschwindigkeit des Strahlschalters wirken sich allerdings die Laufzeiten, vor allem die des Ions ( $100\ \text{MeV } ^{16}\text{O}$ :  $0,9\ \mu\text{s}$ ), aber auch die des Steuersignals ( $0,3\ \mu\text{s}$ ), auf dem Weg vom Chopper zum Bestrahlungsort bzw. umgekehrt aus. Diese Verzögerungszeiten in der Steuerkette des Strahlschalters summieren sich auf insgesamt  $1,4\ \mu\text{s}$ , sodass sich mit einer angenommenen Teilchenrate von  $10^3\ \text{s}^{-1}$  eine Wahrscheinlichkeit für unbeabsichtigte Doppeltreffer von  $0,14\ \%$  ergibt. Demgegenüber steht die deutlich bessere Zeitauflösung des Ionen-Detektionssystems. Hier ist eine Trennung von eintreffenden Teilchen möglich, solange diese voneinander einen zeitlichen Abstand von mindestens ca.  $20\ \text{ns}$  aufweisen. Damit können unbeabsichtigte Mehrfachtreffer registriert und bei der Auswertung der Messergebnisse berücksichtigt werden. Die Wahrscheinlichkeit für nicht detektierbare Doppeltreffer liegt bei lediglich  $2 \cdot 10^{-5}$ . In Abbildung 3.1 ist darüberhinaus schematisch die Ablaufsteuerung für das Bestrahlen von vordefinierten Targetpositionen mit abgezählten Ionen dargestellt. An der im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten digitalen Zähl- und Steuerelektronik kann per Hardware-Schalter die gewünschte Ionenanzahl von 1 bis  $2^{32} \approx 4,3 \cdot 10^9$  in Einzelschritten eingestellt werden. Die Bestrahlung mit dieser Trefferanzahl erfolgt dann durch einmalige Betätigung des Strahlschalters. Diese Zähl- und Steuerelektronik besitzt eine Schnittstelle zu einem Rechner, welcher mit einem Programm zur Strahlrasterung (DDA-Control, [38]) nach vordefinierten Mustern und einer Digital-Analog-Ausgabekarte zur Ansteuerung der Raster-Netzgeräte ausgestattet ist. So können sequentiell Targetpositionen angesteuert und mit definierter Anzahl an Ionentreffern bestrahlt werden.

## 3.4 Handhabung der Zellen

Da die Bestrahlungsexperimente an lebenden Zellen erfolgen sollen, müssen diese unter Bedingungen gehandhabt werden, welche das Zellüberleben sicherstellen. Der in Kapitel 3.2 beschriebene Strahlaustrittsmechanismus ermöglicht, dass die Bestrahlung unter Atmosphärendruck erfolgen kann. Der Behälter für die lebenden Zellen muss eine Bestrahlung am horizontalen Strahl von SNAKE erlauben und darf die Ionen zugleich nur soweit abbremsen, dass noch ein Nachweis im Detektor möglich ist. Da kein kommerzielles Zellbehältersystem für diesen Zweck bekannt ist, wurde ein eigenes Sys-



**Abbildung 3.5:** Explosionsdarstellung [36] des Zellbehälters. Links: Zellbehälter-Anordnung für den Bestrahlungsvorgang. Rechts: Zellbehälter-Anordnung für das Kultivieren der Zellen.

tem entwickelt und aufgebaut. Als Wachstumssubstrat für die Zellen wird eine  $6\ \mu\text{m}$  dicke Mylar-Folie verwendet. Um die bestrahlten Zellen bei der folgenden Fluoreszenzmikroskopie besser wiederzufinden, wurden diese einseitig aluminisierten Folien im institutseigenen Reinraum mittels Photolithographie und anschließendem Ätzprozess mikrostrukturiert [39]. Die Struktur besteht aus einem zweidimensionalen Linienmuster mit einem Gitterabstand von  $150\ \mu\text{m}$  und einem alphanumerischen Koordinatensystem, welches mit einer Schrittweite von  $300\ \mu\text{m}$  eine eindeutige Markierung von Bereichen garantiert. Der eigentliche Zellbehälter besteht aus drei Edelstahlplatten (Spezifikation: 1.4301, Cr-Ni-Stahl mit 17,0 % bis 19,5 % Cr- und 8,0 % bis 10,5 % Ni-Gehalt) mit einer Dicke von je 3 mm. Dieses Material wurde bereits für Zellbehälter in Experimenten am Institut für Strahlenbiologie der GSF (Neuherberg) verwendet. Durch seine Verwendung konnten keine negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum bzw. -überleben festgestellt werden [40].

In Abbildung 3.5 ist eine Explosionsdarstellung der Zellbehälter-Anordnung zu sehen. Die Zellträgerfolie wird zuerst vorgespannt und anschließend zwischen zwei der Edelstahlplatten mittels einer Schraubverbindung geklemmt. Eine der Platten (II) besitzt

eine zentrische, kreisförmige Aussparung mit einem Durchmesser von 66 mm. Diese Aussparung stellt den Zellbehälterinnenraum mit einem Volumen von 10,3 ml dar. Die andere der beiden Platten (I) enthält eine azentrische Aussparung mit einem Durchmesser von 33 mm. Sie erlaubt während der Bestrahlung einen Kontakt des Strahlaustrittsfensters mit der Rückseite der Zellträgerfolie (siehe dazu Abb. 3.7). In dieser Platte befindet sich zudem eine Nut zur Aufnahme eines O-Rings. Durch diese Abdichtung wird ein Durchsickern des im Behälter befindlichen Nährmediums verhindert. Diese beiden verschraubten Platten (I + II) mit eingespannter Folie stellen die Basis des gesamten Zellbehälters dar. Auf die Folie werden 1 bis 2 Tage vor dem Bestrahlungsexperiment die Zellen ausgesät. Um einen höheren Füllstand an Nährmedium über den ausgesäten Zellen zu erreichen, kann auf die Zellbehälterbasis ein ebenfalls O-Ringgedichteter, 10 mm hoher Aufsatz (IV) (Material: 1.4301) aufgeschraubt werden (siehe Abb. 3.5 rechts). Die so präparierte Anordnung mit den eingebrachten Zellen wird im Brutschrank bei 37°C und einem Gehalt von 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Bestrahlung aufbewahrt. Der O-Ring zur Dichtung des Aufsatzes kommt dabei in direkten Kontakt mit dem Nährmedium. Es musste daher ein Dichtungsmaterial gefunden werden, welches das Zellüberleben nicht beeinflusst. Dazu wurde am Institut für molekulare Strahlenbiologie der GSF eine definierte Anzahl von HeLa-Zellen in Petrischalen zusammen mit Abschnitten von O-Ringen unterschiedlichen Materials über mehrere Tage hinweg kultiviert und anschließend die Anzahl der Zellen mit einem Zellzahl-Messgerät (Coulter Z1, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) analysiert. Die Ergebnisse [41] sind in Tabelle 3.1 zu sehen. Man erkennt, dass sowohl Fluor- als auch Silikonkautschuk gegenüber der Kontrollgruppe keine negativen Auswirkungen auf das Zellüberleben verursachen. Daher wurden für die Verwendung in den Zellbehältern O-Ringe aus dem chemisch stabileren Fluorkautschuk gewählt.

Zur Durchführung der Bestrahlung am horizontalen Ionenstrahl muss der Zellbehälter um 90° gedreht werden. Um ein Herauslaufen des Kulturmediums zu vermeiden,

O-Ring-Material	Zell-Anzahl
Kontrolle (ohne O-Ring)	10 439 880
Fluorkautschuk (FPM 80)	10 489 600
Silikonkautschuk (VMQ 70)	10 426 020
Chloroprenkautschuk (CR 70)	5 714 940
Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM 70)	kein Zellüberleben
Acrylnitril-Butadien-Kautschuk (NBR 70)	kein Zellüberleben

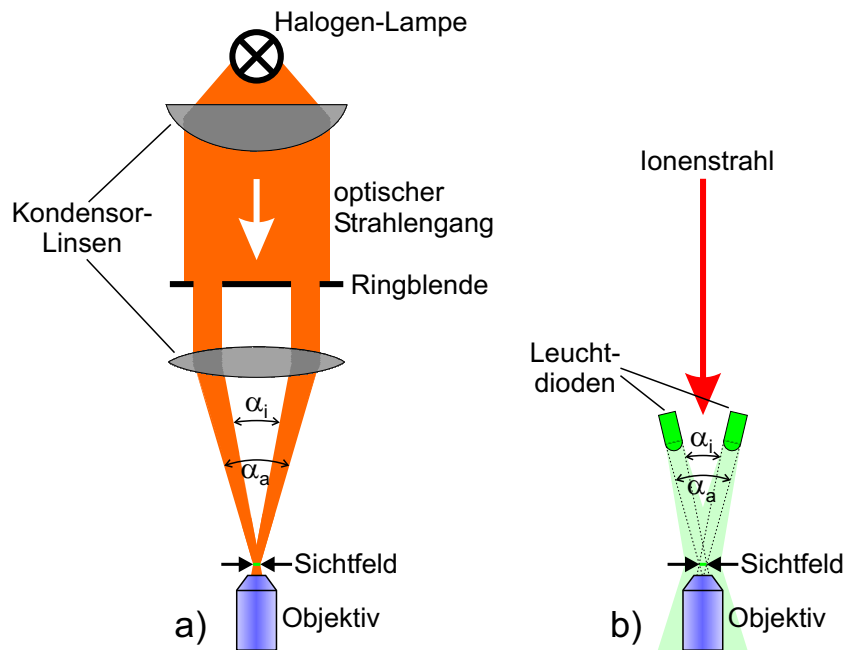
**Tabelle 3.1:** Verschiedene O-Ring-Materialien im Test bezüglich ihrer Anwendbarkeit bei Kontakt mit lebenden HeLa-Zellen. Alle O-Ringe stammen von der Fa. Gehrckens [42].

wird der Behälter mit einem Deckel über eine weitere Schraubverbindung verschlossen. Dieser Deckel besteht aus einer dritten Edelstahlplatte (III), auf welcher eine ebenfalls 6  $\mu\text{m}$  dicke, gespannte Mylar-Folie mit dazwischenliegender O-Ring-Dichtung am Rand festgeklebt (Epoxydharzkleber, UHU-Plus) wird.

### 3.5 Visualisierung der Zellproben mittels Phasenkontrastmikroskopie

Um einzelne Zellen gezielt bestrahlen zu können bzw. um dicht bewachsene Bereiche des Zellbehälters als Zielgebiete auswählen zu können, muss an der Bestrahlungsapparatur ein mikroskopisches Verfahren angewandt werden, welches lebende Zellen kontrastreich darstellt. Die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente dürfen dadurch nicht beeinflusst werden. Deswegen soll auf eine Anfärbung der Zellen bzw. ihrer Bestandteile mit chemischen Farbstoffen möglichst verzichtet werden.

Da eine lebende Zelle ein transparentes Objekt ist, erscheint sie in normaler Durchlicht- bzw. Aufsicht-Hellfeldbeleuchtung als kontrastarmes Objekt. Vor allem für die Zellbiologie sind daher mikroskopische Verfahren entwickelt worden, welche die Darstellung von sogenannten Phasenobjekten erlauben. Diese Phasenobjekte, zu denen lebende Zellen gehören, enthalten im Gegensatz zu den Amplitudenobjekten keine absorbierenden



**Abbildung 3.6:** Ursprüngliche a) und neue b) Phasenkontrastbeleuchtung im Vergleich. Die Beleuchtung ist jeweils als rotationssymmetrisch um die optische Achse zu betrachten.

Ringblende	$\alpha_i$	$\alpha_a$
Ph1	13°	17°
Ph2	24°	33°

**Tabelle 3.2:** Winkel der Phasenkontrastbeleuchtung für Ph1 und Ph2.

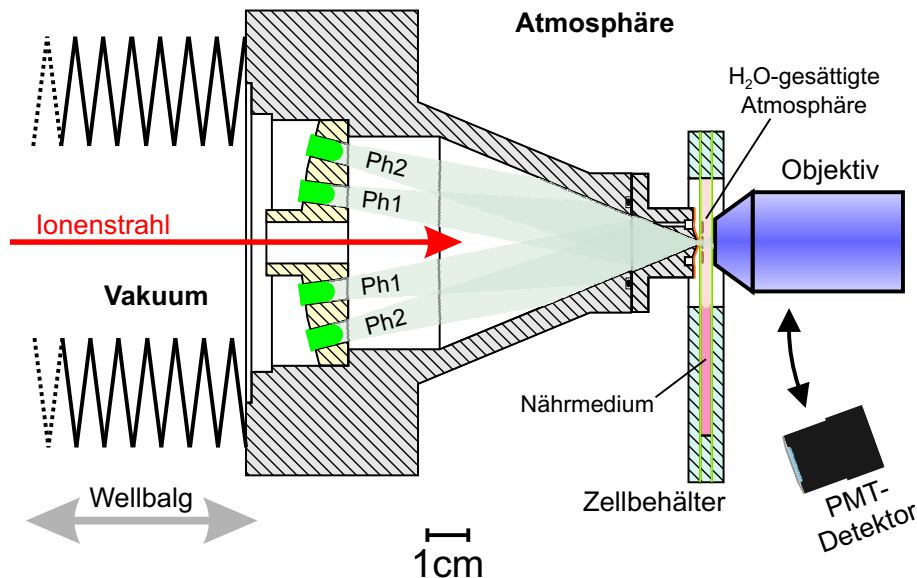
Strukturen, dafür jedoch Strukturen mit unterschiedlichem Brechungsindex. Die beiden wichtigsten in der Zellbiologie verwendeten Mikroskopieverfahren stellen das Phasenkontrastverfahren und das apparativ aufwändigere, differentielle Interferenzkontrastverfahren dar.

Das in den Bestrahlungsaufbau integrierte optische Mikroskop (Axiovert 25) beinhaltet eine Phasenkontrasteinrichtung. Diese setzt sich aus einer speziellen Durchlicht-Beleuchtungsgeometrie und einem dazu angepassten Objektiv zusammen. Das optische Prinzip des Phasenkontrastverfahrens ist in [43] dargestellt. Die Durchlicht-Beleuchtungseinheit wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben entfernt und kann somit am Bestrahlungsaufbau nicht verwendet werden. Daher wurde ein Ersatz für die ursprüngliche Beleuchtungseinheit entwickelt, die vor dem Austrittsfenster im Vakuum montiert werden kann und ein Passieren des Ionenstrahls erlaubt. Eine schematische Übersicht dazu ist in Abbildung 3.6 ersichtlich. Die Aufgabe der Phasenkontrastbeleuchtung besteht darin, dass die Beleuchtung, vom Objekt im Sichtfeld aus gesehen, nur aus einem bestimmten Winkelbereich erfolgt. Der Beleuchtungsstrahlengang formt dabei einen Kegelmantel. Bei der Standard-Durchlichtbeleuchtung wird dies durch Einfügen einer Ringblende erreicht (siehe Abb. 3.6 a). Bei der neuen Beleuchtungseinheit ist die Linsenoptik und die Ringblende ersetzt durch eine entsprechende Anordnung von Leuchtdioden (siehe Abb. 3.6 b). Auf eine Fokussierung des Lichtes in das Sichtfeld des Mikroskops kann verzichtet werden, wenn die Lichtstärke im Sichtfeld ausreichend ist. Im konkreten Fall war dies möglich durch Verwendung von Leuchtdioden mit einem Durchmesser von 5 mm und einer sehr schmalen Abstrahlcharakteristik von  $\pm 4^\circ$  für das Abfallen auf die halbe Intensität (TLHG5800, grüne LED,  $\lambda = 565$  nm, Vishay, Selb). Die Phasenkontrastbeleuchtung muss ebenso wie die normale Hellfeldbeleuchtung an die numerische Apertur des Objektivs angepasst werden. Bei Mikroskopen des Herstellers Zeiss unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Beleuchtungsgeometrien, abgekürzt mit Ph1, Ph2 und Ph3. Im vorliegenden Fall wurde für die optische Ausstattung mit den Objektiven CP Achromat 10 fach/0,25 Ph1 und LD A-Plan 40 fach/0,50 Ph2 die notwendige Beleuchtungsgeometrie vermessen. Für die in Abbildung 3.6 definierten Winkel  $\alpha_i$  und  $\alpha_a$  konnten die in Tabelle 3.2 dargestellten Werte ermittelt werden. Mit diesen Werten wurde ein entsprechender Leuchtdioden-Halter konstruiert. 10 ringförmig angeordnete Leuchtdioden bilden dabei die Beleuchtungsgeometrie für Ph1 und 20

Leuchtdioden für Ph2. Mit Hilfe einer zusätzlichen Blende (in Abb. 3.6 bzw. 3.7 nicht dargestellt) mussten dabei für Ph1 die Beleuchtungswinkel auf  $\alpha_i$  und  $\alpha_a$  begrenzt werden. Eine zentrale Bohrung von 10 mm Durchmesser im Leuchtdioden-Halter erlaubt nun ein Durchtreten des Ionenstrahls durch die Beleuchtungseinheit.

### 3.6 Bestrahlungsanordnung

In Abbildung 3.7 ist eine Gesamtübersicht des Strahlaustrittsmechanismus mit dem Zellbehälter in Bestrahlungsposition zu erkennen. Der in Kapitel 3.4 beschriebene Zellbehälter ist zur Bestrahlung halb mit Nährmedium gefüllt, welches sich aufgrund der senkrechten Lage des Behälters im unteren Bereich ansammelt. Im oberen Bereich, der die zu bestrahlenden Zellen enthält, befindet sich eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre. Dadurch wird das Austrocknen und somit das Absterben der Zellkultur



**Abbildung 3.7:** Gesamtübersicht des Strahlaustrittsmechanismus mit Phasenkontrastbeleuchtung und Zellbehälter.

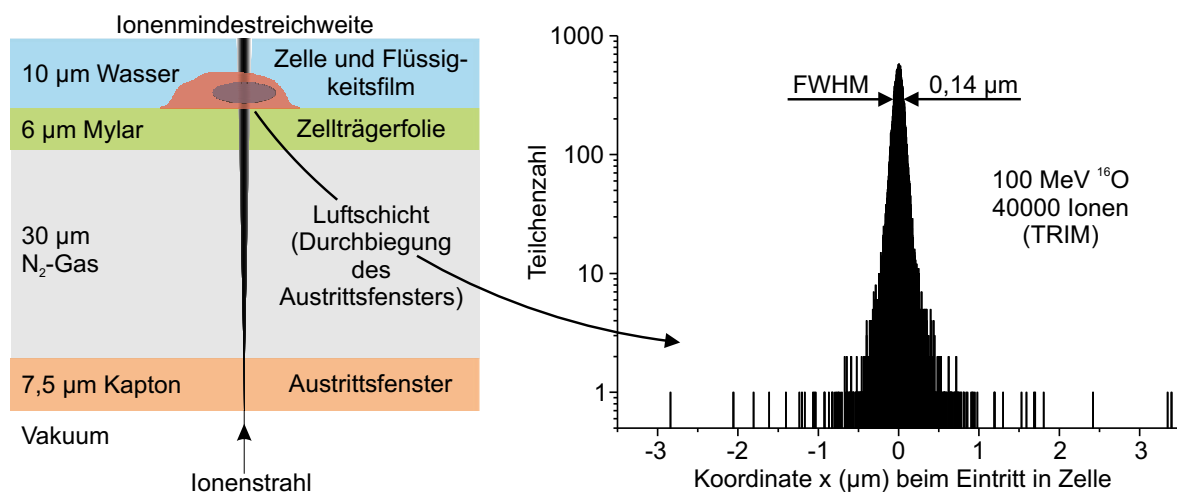
während der maximal 20 min lang dauernden Bestrahlungsprozedur verhindert. Eine Temperierung des Zellbehälters auf 37°C findet am Bestrahlungsplatz zur Zeit noch nicht statt, sodass die Zellen während des Bestrahlungsvorgangs auf Raumtemperatur abkühlen. Die Phasenkontrastbeleuchtung erlaubt in Kombination mit dem entsprechenden Objektiv des optischen Mikroskops eine Betrachtung der Zellen. Mittels eines mechanischen Tisches mit Mikrometerschrauben kann dann der Zellbehälter lateral bezüglich der Ionenstrahlachse verschoben werden. Auf diese Weise können geeignete Bereiche der Zellkultur sowie auch einzelne Zellen in das Bestrahlungsfeld platziert wer-



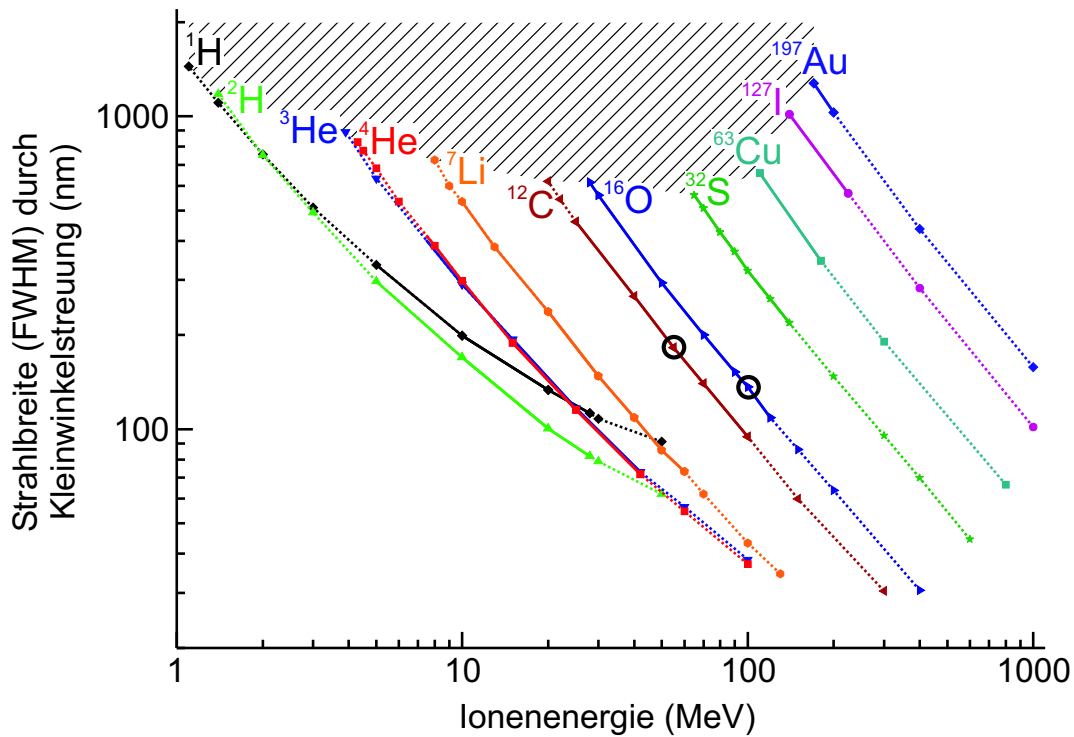
den. Zum eigentlichen Bestrahlungsvorgang wird das erhobene Austrittsfenster (siehe Kap. 3.2) auf mechanischen Kontakt zur Rückseite der Zellträgerfolie gebracht, um die im folgenden Kapitel diskutierten Effekte der Winkelstreuung des Strahls zu minimieren. Da der obere Bereich des Zellbehälters kein flüssiges Nährmedium mehr enthält, kann der Ionenstrahl den Zellbehälter dort durchdringen und vom Szintillationsdetektor nachgewiesen werden. Dieser wird dazu anstelle des Objektivs hinter dem Zellbehälter eingeschwenkt.

### 3.7 Limitierung der Bestrahlungsgenauigkeit durch Winkelstreuung

Der fokussierte Strahl des Rasterionenmikroskops SNAKE bietet die Möglichkeit, Bestrahlungen mit sub- $\mu\text{m}$  Auflösung durchzuführen. Ein limitierender Faktor bei den Zellbestrahlungsexperimenten besteht jedoch in der Kleinwinkelstreuung des Ionenstrahls bei dessen Durchgang durch das Vakuumaustrittsfenster und die Zellträgerfolie. Außerdem ist der dazwischenliegende Luftspalt mit einer maximalen Dicke von  $30\ \mu\text{m}$  (siehe Kap. 3.2) zu berücksichtigen. In Abbildung 3.8 sind die Verhältnisse dargestellt. Im linken Teil erkennt man die vom Ionenstrahl zu durchlaufende Schichtstruktur. Die Luftschicht (angenähert durch  $\text{N}_2$ -Gas) stellt dabei im Wesentlichen eine Driftstrecke dar, d.h. sie trägt kaum zur eigentlichen Winkelstreuung bei, jedoch sehr wohl zur Verbreiterung des Strahlquerschnitts. Der Verlauf des Strahls ist schematisch eingezeichnet.



**Abbildung 3.8:** Effekt der Winkelstreuung beim Übertritt des Ionenstrahls in den Zellbehälter. Links: Materialschichten, die der Ionenstrahl durchlaufen muss. Rechts: Simuliertes (TRIM) Ortsspektrum eines 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Strahls für eine laterale Richtung beim Eintritt in die Zelle.



**Abbildung 3.9:** Volle Halbwertsbreite (*FWHM*) des Strahlprofils aufgrund der Winkelstreuung beim Eintritt in die zu bestrahlende Zelle. Die durchgezogenen Kurvenabschnitte sind die am Münchener Tandembeschleuniger nutzbaren Bereiche.

net. Für einen Strahl von 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen wurden mit dem Monte-Carlo-Programm TRIM (the Transport of Ions in Matter [11]) für die beschriebene Geometrie Berechnungen durchgeführt. Im rechten Teil der Abbildung 3.8 ist für 40 000 Ionen das auf eine Ortskoordinate projizierte, simulierte Strahlprofil zu sehen. Man erkennt eine im zentralen Bereich gaußförmige Verteilung, die von vielen, sich aufsummierenden Kleinwinkelstreuereignissen herrührt. Daneben gibt es jedoch seltene Einzelstreuereignisse mit größerem Ablenkwinkel. Diese verursachen in der Verteilung Ausläufer zu größeren Ortsabweichungen hin. Eine charakteristische Größe zur Beschreibung der Aufstreuung stellt die volle Halbwertsbreite (*FWHM*) dar. Sie gibt an, innerhalb welchen Bereichs ca. 76 % der Strahlteilchen auftreffen.

Für das zur Bestrahlung an der Mikrosonde SNAKE verfügbare Spektrum an Ionensorten wurden mittels TRIM projizierte Ortsspektren simuliert und durch einen Gauß-Fit jeweils die volle Halbwertsbreite ermittelt. Eine grafische Übersicht dazu ist in Abbildung 3.9 zu sehen. Jeder eingetragene Datenpunkt entspricht der Simulation von 10 000 Ionen (5 000 Ionen für  $^{127}\text{I}$  bzw.  $^{197}\text{Au}$  aufgrund hoher Rechenzeit) einer bestimmten Sorte und Energie. Als Kriterium wurde zugrunde gelegt, dass die Ionen nach Durchdringen der Zellträgerfolie eine minimale Restreichweite von 10  $\mu\text{m}$  in Wasser besitzen

sollen (siehe Abb. 3.8). Nur in diesem Fall ist eine definierte Zellbestrahlung möglich. Dieses Kriterium liefert für jede Ionensorte eine minimale Energie, welche jeweils an der Grenze des schraffierten Bereichs in Abbildung 3.9 liegt. Das Abschneiden zu hohen Energien hin ist willkürlich gewählt. Die durchgezogenen Kurvenabschnitte stellen dabei die Energiebereiche dar, welche für die entsprechenden Ionensorten am Münchener Tandembeschleuniger zugänglich sind. Aus der Literatur [44] ist folgende Abhängigkeit der Kleinwinkel–Vielfachstreuung ( $FWHM$  der Aufstreuung) von der Kernladung  $Z$  und Ionenenergie  $E$  bekannt:

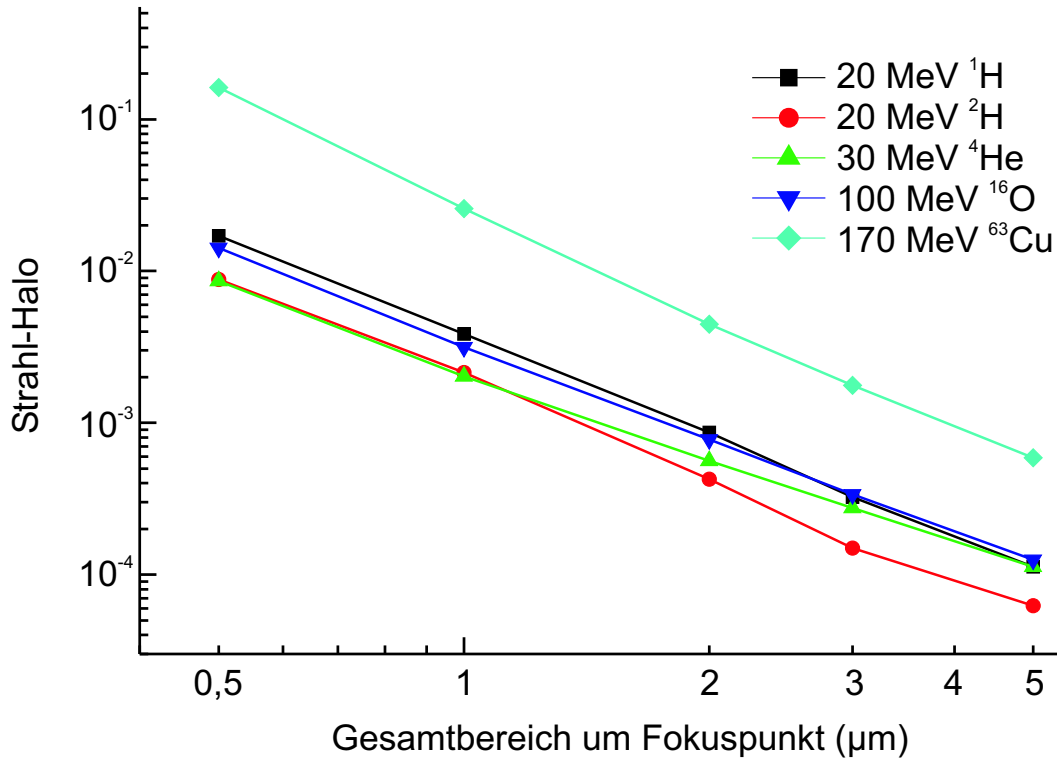
$$FWHM_{\text{Winkelstreuung}} \sim \frac{Z}{E} \quad (3.1)$$

Im doppeltlogarithmischen Maßstab der Abbildung 3.9 führt die Abhängigkeit von  $E^{-1}$  zu fallenden Geraden, die  $Z$ -Abhängigkeit bewirkt, dass bei gleicher Energie schwerere Ionen eine größere Aufstreuung aufweisen. Man erkennt, dass für Ionenstrahlen leichter als  $^{32}\text{S}$  mit hinreichender, am Tandembeschleuniger erreichbarer Energie die Verbreiterung aufgrund der Kleinwinkelstreuung unter 200 nm ( $FWHM$ ) liegt. Mit schwarzen Kreisen sind die beiden Strahlarten (100 MeV  $^{16}\text{O}$  bzw. 55 MeV  $^{12}\text{C}$ ) markiert, welche in ersten Mikrobestrahlungen eingesetzt wurden. Für Ionen schwerer als  $^{63}\text{Cu}$  muss wegen des Reichweitenkriteriums die höchste am Tandembeschleuniger mögliche Energie verwendet werden. Trotzdem sind hier Strahlverbreiterungen bis zu 1  $\mu\text{m}$  und darüber zu erwarten. Unter der in Abbildung 3.8 beschriebenen Bestrahlungsgeometrie sind mit Ionen schwerer als  $^{32}\text{S}$  am Tandembeschleuniger keine Zellbestrahlungen mit Auflösungen unter 300 nm ( $FWHM$ ) möglich. Dazu müssten Parameter wie Foliendicken und Abstände zwischen den Folien reduziert werden.

Um den Einfluss der verschiedenen Geometrie–Parameter auf die Strahlaufösung zu untersuchen, wurden exemplarisch für einen 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Strahl die Parameter Austrittsfenster, Dicke des Luftspalts und Dicke der Zellträgerfolie variiert. Das Ergebnis der Rechnungen (analog zu Abb. 3.9) ist in Tabelle 3.3 erkennbar. Geometrie 1 stellt

Geometrie	1	2	3	4
Austrittsfenster	7,5 $\mu\text{m}$ K	200 nm $\text{Si}_3\text{N}_4$	7,5 $\mu\text{m}$ K	7,5 $\mu\text{m}$ K
Luftspalt ( $\text{N}_2$ -Gas)	30 $\mu\text{m}$	30 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	30 $\mu\text{m}$
Zellträgerfolie (Mylar)	6 $\mu\text{m}$	6 $\mu\text{m}$	6 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$
Aufstreuung ( $FWHM$ )	137 nm	30 nm	67 nm	109 nm

**Tabelle 3.3:** Alternative Bestrahlungsgeometrien zur Reduktion der Strahlfleckvergrößerung durch Winkelaufstreuung: Es werden Austrittsfenster (Geometrie 2), Dicke der Luftschicht (Geometrie 3) und Dicke der Zellträgerfolie (Geometrie 4) variiert. Die berechnete Aufstreuung gilt für einen 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Strahl. (K = Kapton,  $\text{Si}_3\text{N}_4$  = Siliziumnitrid)



**Abbildung 3.10:** Bruchteil derjenigen Strahlteilchen, die außerhalb eines bestimmten Fokusbereichs auftreten (Strahl-Halo).

die in Abbildung 3.8 gezeigte, bereits realisierte Lösung dar. Die größte Reduzierung der Winkelaufstreuung kann durch eine Reduktion der Dicke des Austrittsfensters erzielt werden. Als Austrittsfenster ist eine Siliziumnitridmembran mit einer Dicke von nur 200 nm denkbar (Geometrie 2) [5]. Eine Verringerung der Driftstrecke zwischen Austrittsfenster und Zellträgerfolie (Geometrie 3) führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Aufstreuung. Den geringsten Gewinn bringt die Verwendung einer dünneren Zellträgerfolie (Geometrie 4), da die in ihr auftretende Winkelstreuung wegen des kurzen Abstandes zu den Zellen dort keine große laterale Ortsablage mehr verursacht.

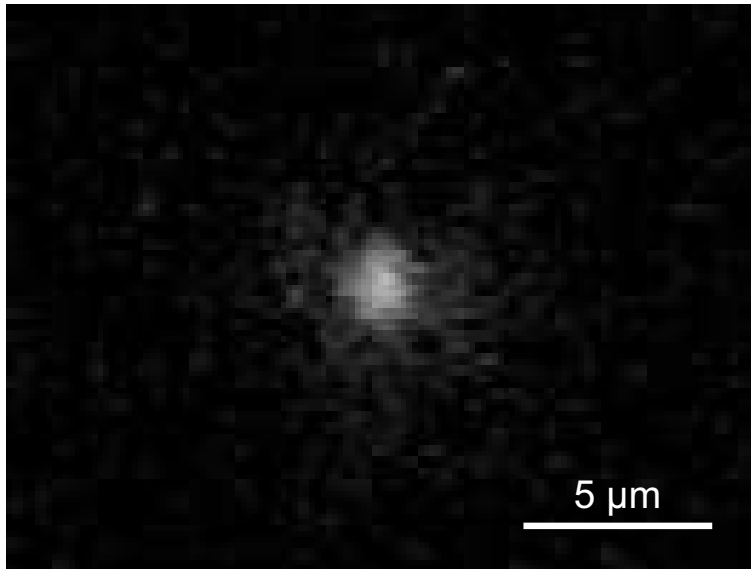
Neben der gerade diskutierten vollen Halbwertsbreite (*FWHM*) als Maß für die Strahlaufstreuung kann für eine Reihe von Experimenten (z.B. Bystander-Effekt) die Wahrscheinlichkeit wichtig sein, mit welcher Strahlteilchen aufgrund von seltenen Streuergebnissen um größere Winkel den Fokuspunkt weit verfehlen (sog. Strahl-Halo). In Abbildung 3.10 ist exemplarisch für eine Auswahl an Ionenstrahlen der Zusammenhang zwischen der Gesamtausdehnung des Fokusbereichs und dem außerhalb dieses Bereichs auftreffenden Bruchteil an Strahlteilchen aufgetragen. Für die dargestellten Strahlarten wurden jeweils 80 000 Ionen mit TRIM simuliert und die Anzahl der Ionen

ausgezählt, welche, projiziert auf eine laterale Achse, außerhalb der fünf verschiedenen Fokusbereiche  $0,5\ \mu\text{m}$ ,  $1\ \mu\text{m}$ ,  $2\ \mu\text{m}$ ,  $3\ \mu\text{m}$  und  $5\ \mu\text{m}$  in die zu bestrahlende Zelle eintreten. Jede Auszählung wird durch einen Datenpunkt repräsentiert. Man erkennt, dass für die leichten Strahlen bis einschließlich  $100\ \text{MeV } ^{16}\text{O}$  nur einige  $10^{-3}$  aller Teilchen außerhalb  $1\ \mu\text{m}$  um den Fokuspunkt auftreffen. Außerhalb eines Bereichs von  $5\ \mu\text{m}$  sind dies nur noch wenige  $10^{-4}$ . Schwere Ionen wie  $170\ \text{MeV } ^{63}\text{Cu}$  erzeugen einen Halo, in dem sich etwa eine Größenordnung mehr an Teilchen befindet.

Es sei darauf hingewiesen, dass die in den Abbildungen 3.9 und 3.10 dargestellten Aufstreuungen nur die Streuungen an der Austrittsfolie des Vakuumsystems, am Luftspalt und an der Zellträgerfolie beinhalten. Das SNAKE-Schlitzsystem (siehe Abb. 3.1) stellt eine weitere Struktur dar, an der Ionen gestreut werden. Ein Bruchteil dieser Ionen liegt trotz der Streuung im Akzeptanzbereich der supraleitenden Linse und kann den Bestrahlungsplatz erreichen. Insbesondere Umladungsprozesse bei der Streuung von z.B.  $^{16}\text{O}^{7+}$  nach  $^{16}\text{O}^{8+}$ , die auch am Restgas des Vakuumsystems stattfinden können, führen dann zu einer anderen ionenoptischen Abbildung und damit zu großen Ortsablagen an der Bestrahlungsprobe. In der Regel sind derartige Ionentreffer ihrer Sollposition nicht mehr zuordenbar, d.h. am vorgesehenen Ort fehlt der Treffer. Eine generelle Quantifizierung dieser Effekte ist jedoch aufgrund unbekannter und je nach Strahlzeit wechselnder Randbedingungen, wie z.B. der genauen Strahlage relativ zu den Schlitzoberflächen, nicht möglich. Die Auswertung bestrahlter Kernspurdetektoren lässt jedoch den Schluss zu, dass die Streuung am Schlitzsystem bzw. Umladungsprozesse mit großen Ortsablagen nicht dominant sind und mit einer Wahrscheinlichkeit von deutlich weniger als 1 % auftreten (siehe dazu Abb. 3.12 links).

### 3.8 Fokusprozedur und Bestimmung der Bestrahlungsgenauigkeit

Zur optimalen Fokussierung des Ionenstrahls müssen die Ströme in der supraleitenden Linse entsprechend eingestellt werden. Der Strahlfokus wird dabei mit Hilfe eines CsI(Tl)-Kristalls ( $\lambda_{\text{Emission}} = 565\ \text{nm}$ ) optisch charakterisiert. Dieser Leuchtkristall wird in eine Ebene, die spätere Fokalebene, positioniert, in welcher sich anschließend auch die zu bestrahlenden Zellen befinden. Das Strahlaustrittsfenster wird dabei auf direkten Kontakt mit dem CsI(Tl)-Kristall gebracht, damit die bereits beschriebenen Effekte der Kleinwinkelstreuung beim Durchtritt des Strahls durch das Vakuumfenster minimiert werden. Um eine ausreichende optische Qualität des Leuchtprofils des Ionenstrahls zu erhalten, wurde der ca.  $0,2\ \text{mm}$  dicke Kristall mit der strahlabgewandten Seite auf ein Deckglas als Träger geklebt (UHU-Plus). Vor allem für Objektive hoher Auflösung



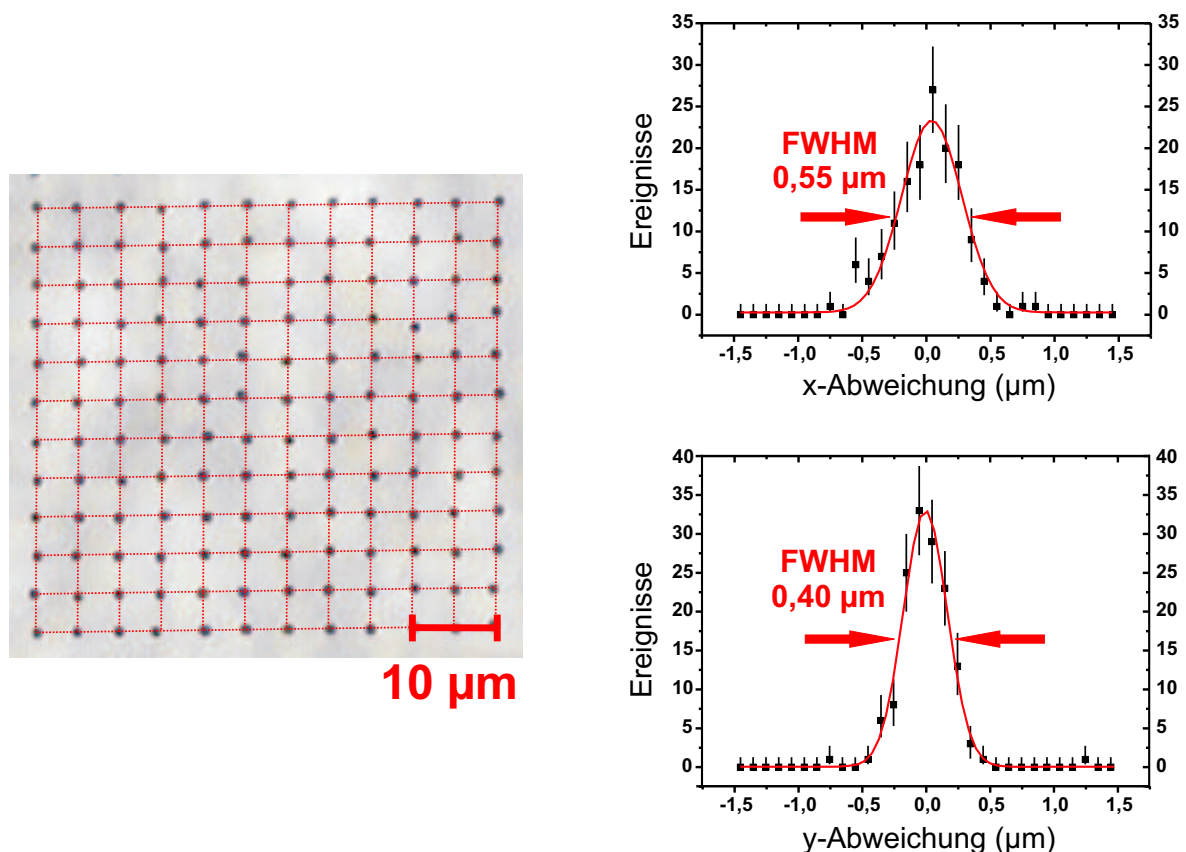
**Abbildung 3.11:** Video-Aufnahme eines auf den CsI(Tl)-Leuchtkristall fokussierten 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionenstrahls.

ist diese optische Ankopplung der ansonsten matten CsI(Tl)-Oberfläche wichtig. Das Leuchtprofil des Strahlflecks wird dabei mit Hilfe der CCD-Kamera des optischen Mikroskops betrachtet.

Um die Fokussierwirkung der supraleitenden Linse besser beurteilen und einstellen zu können, wird zu diesem Zweck die Divergenz des Ionenstrahls nicht zu stark beschnitten. Der Fokussiervorgang findet bei einer Öffnung der Divergenzschlitze von  $600\ \mu\text{m}$  statt. Dies entspricht in etwa einem Drittel der Öffnung bei voller Linsenausleuchtung und dem zehnfachen der Öffnung bei Einzelionenbestrahlung. Ein zu hoher Strahlstrom, der sich während des optischen Fokussierens durch volle Aussteuerung der Videokamera bemerkbar macht, kann hierbei durch Einbringen eines Strahlabschwächers (Faktor  $1/33$ ) begrenzt werden. Erst wenn optisch die optimale Fokussierstärke gefunden ist, wird die Divergenz auf das für die Einzelionenbestrahlung notwendige Maß beschnitten. Durch das Einschränken der Strahldivergenz werden Abbildungsfehler der supraleitenden Linse und damit auch die Ausdehnung des Strahlfokus nochmals reduziert. In Abbildung 3.11 ist ein Beispiel eines auf den CsI(Tl)-Kristall fokussierten 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Strahls zu sehen. Die Aufnahme wurde mit einem LDA-Plan 40 fach/0,50 Ph2-Objektiv und einer schwarz-weiß Videokamera angefertigt. Mit Hilfe von Bildbearbeitungsprogrammen wurde der Ausschnitt mit dem Strahlfleck stark vergrößert und der Bildkontrast erhöht. Prinzipiell kann durch die Auswertung des Leuchtprofils die Fokusgröße des Ionenstrahls und damit die Bestrahlungsauflösung bestimmt werden. Im vorliegenden Fall liefert die Analyse aufgrund des Streulichts

von der optisch matten Strahleintrittsseite des CsI(Tl)-Kristalls und der Lichtemission aus Probentiefen, welche sich nicht im optischen Fokus befinden, zu große Werte für den Strahldurchmesser. Darüberhinaus liegt der Strahldurchmesser bereits unter der Auflösungsgrenze von ca.  $0,58\ \mu\text{m}$  ( $FWHM_{\text{lateral}}$ , siehe Formel 4.2) des verwendeten Objektivs. Eine quantitative Auswertung des Leuchtprofils ist damit nur sehr schwer und mit großer Unsicherheit möglich.

Eine bessere Methode zur Bestimmung der Strahlaufösung stellt das Bestrahlen von Kernspurdetektoren mit einzelnen Ionen nach vordefinierten Mustern dar. Als Kernspurdetektoren wurden  $40\ \mu\text{m}$  dicke Folien aus Polycarbonat (makrofol, Bayer AG, Leverkusen) verwendet. Jedes die Folie durchdringende Ion erzeugt in seiner Bahnspur Ionisationsereignisse, wodurch ein Aufbrechen von chemischen Bindungen in der Polymerstruktur bewirkt wird. Durch einen Ätzprozess in alkoholischer Natronlauge ( $50\ \text{g NaOH} + 200\ \text{ml H}_2\text{O} + 25\ \text{ml C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) [45] wird das Polycarbonat bevorzugt an



**Abbildung 3.12:** Links: Mit einzelnen  $100\ \text{MeV } ^{16}\text{O}$ -Ionen bestrahlter und geätzter Kernspurdetektor. Rechts: Statistische Auswertung der Abweichungen einzelner Treffer zur Ermittlung der Bestrahlungsgenauigkeit. Für Ereignisanzahlen  $\leq 20$  wurden die statistischen Unsicherheiten aus [8] entnommen.

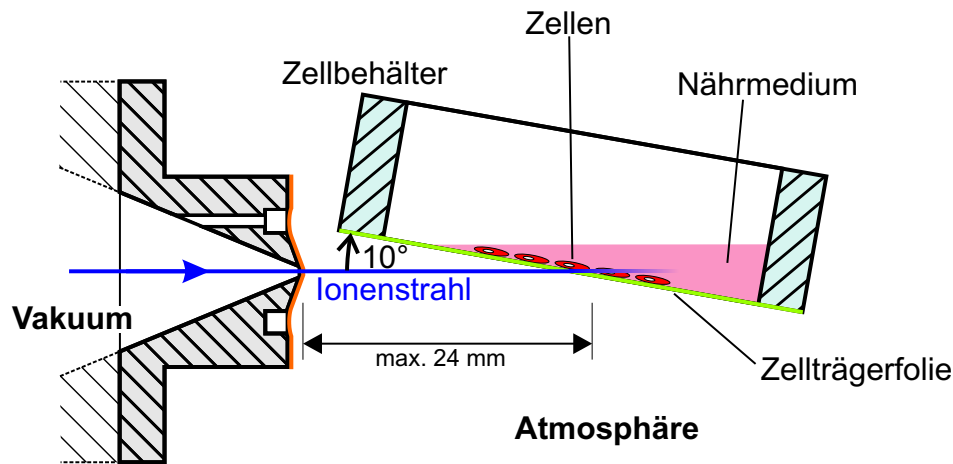
den geschädigten Bereichen gelöst. So entstehen an der Polymeroberfläche sowohl am Eintritts- als auch am Austrittspunkt des Ions kegelförmige Ätzgruben, deren Tiefe und Durchmesser mit der Dauer und Temperatur des Ätzvorgangs zunehmen. Bei ca. 75°C und nach einer Ätzzeit von 1 h sind die Ionenspuren im optischen Mikroskop deutlich zu erkennen. Die Verwendung des 40fach/0,50-Objektivs gestattet dabei aufgrund der geringen optischen Tiefenschärfe eine klare Unterscheidung der Ätzgruben auf der Strahleintritts- und Strahlaustrittsseite. Wegen der Winkelstreuung beim Durchgang durch den Kernspurdetektor muss zur Analyse der Auftrefforte der Ionen die Strahleintrittsseite untersucht werden.

Im linken Teilbild der Abbildung 3.12 erkennt man die mikroskopische Aufnahme eines bestrahlten und geätzten makrofol-Kernspurdetektors. Zur Bestrahlung wurde der Kernspurdetektor an die Stelle nach dem Vakuumaustrittsfenster positioniert, welche normalerweise von der Zellträgerfolie eingenommen wird. Die Einschläge einzelner 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen formen ein Matrix-Muster mit einem Zeilen- bzw. Spaltenabstand von 5  $\mu\text{m}$ . Die Schnittpunkte der gestrichelten Linien zeigen dabei die Soll-Positionen der Bestrahlungsorte an. Für ein Ensemble von  $12 \times 12$  Treffern wurde jeweils die Abweichung in x- und y-Richtung extrahiert und als Histogramm aufgetragen. Das Ergebnis in Abbildung 3.12 rechts zeigt eine volle Halbwertsbreite (*FWHM*) des Ionenstrahls von 0,55  $\mu\text{m}$  in x- und 0,40  $\mu\text{m}$  in y-Richtung. Mit dieser Auflösung ist die gezielte Bestrahlung von Substrukturen eines Zellkerns möglich, welcher einen typischen Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  bis 10  $\mu\text{m}$  besitzt.

### 3.9 Modifikation des Aufbaus zur Schrägbestrahlung lebender Zellen

Bei der bisher beschriebenen Bestrahlungsgeometrie erfolgt die Ionenbestrahlung senkrecht zur Zellträgerfolie. Die mikroskopische Analyse der fluoreszenzmarkierten Foci wird ebenfalls in senkrechter Aufsicht auf die Zellträgerfolie mittels eines optischen Fluoreszenzmikroskops durchgeführt. Da die optische Auflösung hierbei in lateraler Richtung besser ist als die Tiefenauflösung (siehe Kap. 4.5), kann somit die radiale Struktur der Ionenspuren besser untersucht werden als die Struktur entlang der Spur. Für Fragestellungen, die sich mit der Schädigungsstruktur entlang von Ionenspuren beschäftigen (siehe Kap. 2.1 und 2.2), ist jedoch eine gute optische Auflösung in Spurrichtung wünschenswert. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der bestrahlten Zellen unter einem kleinen Winkel zur Zellträgerfolie ist nicht praktikabel. Daher wurde durch Modifikation des Bestrahlungsaufbaus eine Bestrahlung von lebenden Zellen unter flachem Einfallswinkel der Ionen ermöglicht. Man erhält dann bei der optischen Mi-





**Abbildung 3.13:** Modifikation der Bestrahlungsanordnung zur Bestrahlung von lebenden Zellen unter flachem Ioneneinfallswinkel.

kroskopie eine verbesserte Auflösung in Richtung der Ionenspur (siehe dazu Abb. 5.8). Der Winkel zwischen Strahlrichtung und Zellträgerfolie beträgt bei der modifizierten Bestrahlungsgeometrie  $10^\circ$ . Die Anordnung dazu ist in Abbildung 3.13 zu sehen. Als Zellbehälter werden ringförmige Edelstahlgefäße (Material: 1.4301) mit geklemmter Zellträgerfolie (Mylar,  $6\ \mu\text{m}$  dick) verwendet. Das in den Behältern vorhandene Nährmedium bedeckt dabei die lebenden Zellen. In dieser einfachen Bestrahlungsgeometrie muss der Ionenstrahl nach dem Vakuumaustrittsfenster eine Strecke an Luft unter Atmosphärendruck von maximal 24 mm Länge durchqueren. Dies führt aufgrund von Winkelstreueffekten zu einer drastischen Verbreiterung des Strahldurchmessers am Ort der Zellen, sodass eine gezielte Bestrahlung von Zellen nicht möglich ist. Eine Simulation mit dem Programm TRIM liefert für einen fokussierten  $100\ \text{MeV } ^{16}\text{O}$ -Strahl einen Strahldurchmesser ( $FWHM$ ) beim Eintritt in die Zelle von ca.  $0,12\ \text{mm}$ .

Darüberhinaus muss der Energieverlust des Ionenstrahls bis zum Erreichen der Zellen berücksichtigt werden. Insbesondere die Zellträgerfolie erhält durch den  $10^\circ$ -Winkel eine effektive Dicke von  $35\ \mu\text{m}$ .  $^{16}\text{O}$ -Ionen mit einer Energie von  $100\ \text{MeV}$  im Vakuum werden bis zum Erreichen der Zellen auf eine Energie von  $61,0\ \text{MeV}$  abgebremst. Entsprechend erhöht sich dadurch der  $LET$ -Wert (siehe Abb. 2.5). Durch die statistische Natur der Energieverlustprozesse in den Folien bzw. der Strecke an Luft erfährt der Ionenstrahl zudem eine Energieverluststreuung, d.h. die Energieverteilung der Ionen wird breiter. Mit Hilfe von TRIM kann für einen  $100\ \text{MeV } ^{16}\text{O}$ -Strahl diese Verbreiterung zu weniger als  $0,6\ \text{MeV}$  ( $FWHM$ ) abgeschätzt werden. Dadurch werden alle Zellen einer Probe nach wie vor mit einheitlicher Ionenenergie und damit definiertem  $LET$ -Wert bestrahlt.

Aufgrund der Konstruktion des in Abbildung 3.13 gezeigten Zellbehälters können die

Ionen das Detektionssystem auf dem Mikroskoprevolver nicht mehr erreichen. Die Bestrahlung von Zellen unter flachem Winkel kann daher momentan nicht mit einzeln abgezählten Ionen, sondern nur mit einer gemäß der Poisson-Statistik verteilten Anzahl an Ionen erfolgen.

# Kapitel 4

## Zellantwort auf Doppelstrangbrüche und Probenuntersuchung

Durch die Ionenbestrahlung mit Hilfe des im vorigen Kapitel beschriebenen Aufbaus werden in den lebenden Zellen Strahlenschäden erzeugt. Von besonderer Bedeutung für das biologische System sowie für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente sind dabei die generierten DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), für deren Erzeugung bereits in Kapitel 2 eine quantitative Abschätzung gegeben wurde. Nach der Bestrahlung sind die Zellen in der Lage, diese Doppelstrangbrüche zu erkennen und Reparaturprozesse einzuleiten. Die Reparaturprozesse benötigen eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen, deren Funktionen weitgehend bekannt sind. Diese Proteine können durch geeignete Antikörper erkannt und über daran gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie können dadurch die Ansammlungen bestimmter Proteine, die Dynamik und eventuellen Wechselwirkungen von DNA-Reparaturvorgängen sowie indirekt auch die räumliche Verteilung von erzeugten Doppelstrangbrüchen studiert werden.

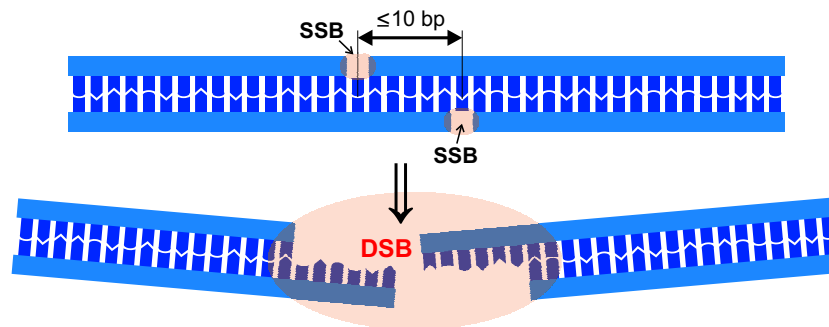
### 4.1 Markierung von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels $\gamma$ -H2AX

Ein früher Schritt in der Zellantwort auf Doppelstrangbrüche ist die Markierung des entsprechenden Bereichs der DNA. Dazu wird das H2AX-Protein, ein spezielles Protein aus der Familie der H2A-Nukleosom-Histone, phosphoryliert, d.h. mit einer Phosphatgruppe versehen. Der so entstehende Komplex trägt die Bezeichnung  $\gamma$ -H2AX. Das H2A-Protein bildet zusammen mit anderen Nukleosom-Histonen Protein-Oktamere, welche das DNA-Molekül räumlich organisieren (Abb. 2.7). Der Verbund von DNA und Histonen wird als Chromatin bezeichnet.

Die Phosphorylierung des H2AX findet innerhalb von 1 bis 3 Minuten nach Induzierung des Doppelstrangbruchs statt [46, 47] und wird von den Kinasen ATM, ATR und DNA-PK bewerkstelligt [48]. Die Aktivierung, d.h. die Autophosphorylierung, dieser Kinasen wird wiederum unterstützt durch den Mre11/Rad50/NBS1 (MRN) Protein-Komplex, der als möglicher Sensor für DNA-Schäden betrachtet wird [49]. Da für die modifizierte Form des H2AX Antikörper kommerziell erhältlich sind, ist der Nachweis von  $\gamma$ -H2AX mit Immunofluoreszenzmethoden möglich.

Die Ausbildung der  $\gamma$ -H2AX-Proteine erfolgt in einem Bereich von ca. 2 Mbp (Megabasenpaare) um die DNA-Schadensstelle. Dies entspricht einem ca. 18  $\mu$ m langen Abschnitt der 30-nm-Faser (siehe Abb. 2.7). Aufgrund der anzunehmenden Schleifenstruktur, in der die 30-nm-Faser organisiert ist [19], bleibt die  $\gamma$ -H2AX-Markierung auf einen deutlich kleineren Raumbereich von der Größenordnung eines  $\mu$ m beschränkt. Allerdings führt dies bei der Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop zu einer echten, d.h. nicht auflösungsbegrenzten Foci-Größe.

Durch die Universalität, d.h. Unabhängigkeit vom eingeschlagenen DNA-Reparaturweg (siehe Kap. 4.2), und durch die schnelle Generierung der  $\gamma$ -H2AX-Proteine steht nach deren Visualisierung ein zuverlässiger Nachweis für Strahlenschäden durch hochenergetische Ionen, also ein Kernspurdetektor im biologischen System zur Verfügung. Da es sich beim  $\gamma$ -H2AX lediglich um eine modifizierte Form des überall entlang der DNA vorhandenen H2AX-Proteins handelt, ist eine mögliche Beschränkung der  $\gamma$ -H2AX-Antwort nur durch die Menge der notwendigen Kinasen bedingt. Eine Unterversorgung und damit auch eine Unterdrückung von  $\gamma$ -H2AX-Foci kann erst bei sehr hohen Strahlendosen erwartet werden. Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente (siehe Kap. 5) wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

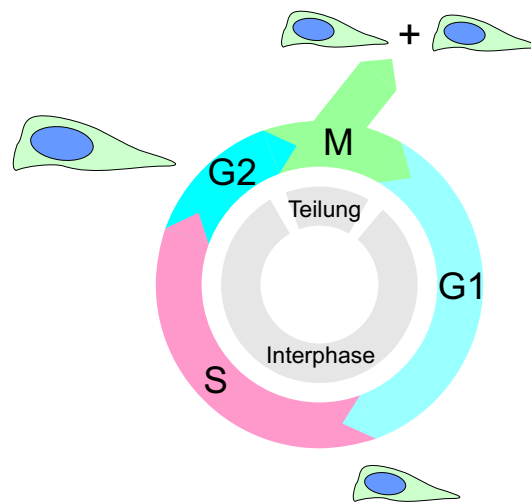


**Abbildung 4.1:** Entstehung eines Doppelstrangbruchs (DSB) aus zwei nahe beieinanderliegenden Einzelstrangbrüchen (SSB) auf gegenüberliegenden Seiten des DNA-Moleküls. Ein Einzelstrangbruch liegt vor, wenn das Zucker-Phosphat-Gerüst eines Strangs durchtrennt ist.

## 4.2 Reparaturmechanismen für DNA–Doppelstrangbrüche

DNA–Doppelstrangbrüche stellen von mehreren möglichen DNA–Schäden die größte Gefährdung für die Integrität einer lebenden Zelle dar. Ein Doppelstrangbruch (DSB) entsteht, wenn innerhalb einer Distanz von maximal 10 Basenpaaren die gegenüberliegenden Zucker–Phosphat–Gerüste durchtrennt sind [50, 18]. Dies ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Bei einem zentralen Treffer eines hochenergetischen Ions in einer Chromatinfaser können sehr viele Einzelstrangbrüche (SSB) und dadurch auch mehrere Doppelstrangbrüche in direkter Nachbarschaft auf dem DNA–Molekül induziert werden (siehe Kap. 2.2). Die Organisation des DNA–Moleküls in den Nukleosomen innerhalb der 30–nm–Faser kann möglicherweise verhindern, dass die freiliegenden DNA–Enden nach dem Bruch über größere Entfernungen voneinander wegdiffundieren [50] und die Reparatur dadurch erschweren.

In der Regel weisen die beiden DNA–Strang–Enden am Ort des DSBs, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, jeweils einen überstehenden Einzelstrang auf. Eine lebende Zelle besitzt zwei unterschiedliche Wege, um Doppelstrangbrüche zu reparieren. Dabei handelt



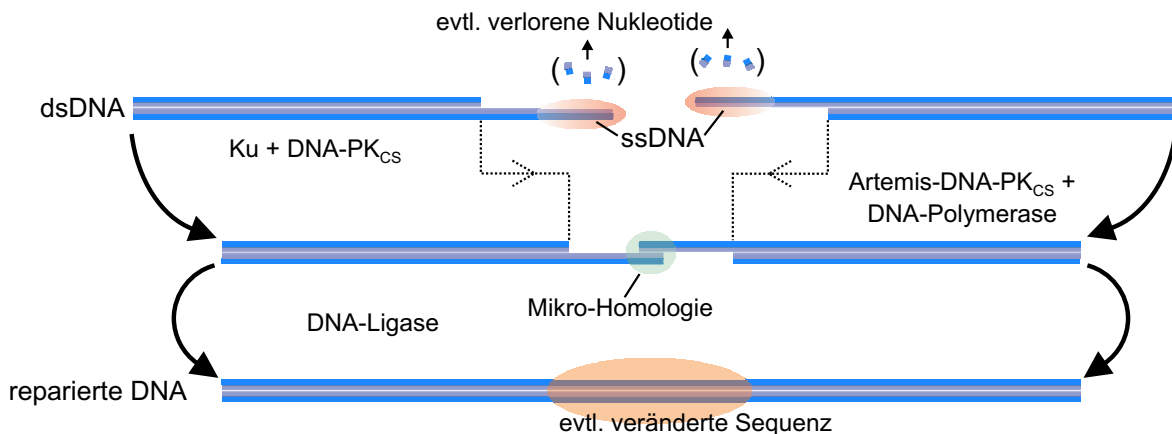
**Abbildung 4.2:** Zellzyklus einer Eukaryontenzelle: Die eigentliche Zellteilung (M–Phase, M = Mitose) erfolgt nur während eines kurzen Abschnitts des Zellzyklus. In der sogenannten Interphase, die den Großteil im Zellzyklus darstellt, wächst die Zelle und bereitet sich auf die Teilung vor. Die Interphase beginnt mit der G<sub>1</sub>–Phase (G = gap, d.h. Lücke), in der die Zelle ihre Umgebung und die eigene Größe überprüft. Während der S–Phase (S = Synthese) wird die DNA verdoppelt. Die G<sub>2</sub>–Phase kann als Sicherheits–Pause betrachtet werden, in welcher die Zelle die erfolgreiche Verdoppelung der DNA kontrolliert. Die Angaben stammen aus [16].

es sich um die „Nicht-homologe Endverknüpfung“ und die „Homologe Rekombination“, welche nachfolgend beschrieben werden.

### 4.2.1 Nicht-homologe Endverknüpfung

Der in den Zellen der höheren Lebewesen vorherrschende Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche ist die sogenannte Nicht-homologe DNA-Endverknüpfung (NHEJ, engl: Non-homologous end-joining). Bei diesem Prozess (siehe Abb. 4.3), der während des gesamten Zell-Zyklus (siehe Abb. 4.2) ablaufen kann, werden die gebrochenen DNA-Enden zusammengeführt und der DNA-Strang wieder geschlossen. Der Reparaturprozess kann durch vorhandene, komplementäre Paarungen auf einer Länge von 1 bis 4 Basenpaaren (sog. Mikro-Homologie [50]) zwischen den einzelsträngigen (ssDNA, engl: single-stranded DNA), überstehenden DNA-Enden begünstigt werden. NHEJ läuft jedoch auch bei völlig inkompatiblen DNA-Enden ab.

Eingeleitet wird der Vorgang der nicht-homologen DNA-Endverknüpfung durch die Bindung von sogenannten Ku-Proteinen und DNA-PK<sub>CS</sub> Proteinkinase (in Abb. 4.3 nicht dargestellt) an die beiden DNA-Enden, die durch den Doppelstrangbruch entstanden sind. Möglicherweise wird dadurch ein Auseinanderdiffundieren der beiden DNA-Enden unterbunden [50]. Sind durch den vorhergehenden DNA-Schädigungsprozess keine Nukleotide (= Bausteine des DNA-Strickleitermoleküls jeweils bestehend aus kodierender Base + Zucker + Phosphat) verlorengegangen, so besteht die Möglichkeit einer fehlerfreien Reparatur. Speziell jedoch bei der DSB-Erzeugung mit dichtionisierender Strahlung und den damit verbundenen komplexen Schäden ist dieser Fall unwahrscheinlich, die beiden einzelsträngigen DNA-Enden sind für eine Paarung nicht mehr kompatibel. Um zumindest abschnittsweise komplementäre Basenpaarungen, d.h.



**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung der Nicht-homologen DNA-Endverknüpfung (NHEJ). dsDNA: double-stranded DNA, ssDNA: single-stranded DNA.

Mikro-Homologie, zu erreichen, werden die überstehenden Enden daher meist durch Entfernen bzw. Hinzufügen weiterer Nukleotide umgestaltet. Dies wird von dem Proteinkomplex Artemis-DNA-PK<sub>CS</sub> bzw. von DNA-Polymerase ausgeführt [50]. Die beiden DNA-Strang-Enden weisen nun einen Überlapp komplementärer Basenpaare auf, an dem eine Bindung zwischen den beiden DNA-Molekülen stattfindet. Die einzelsträngigen Lücken werden von DNA-Ligase geschlossen. Als Folge der Umgestaltung der DNA-Enden tritt eine veränderte Basensequenz im reparierten DNA-Molekül auf.

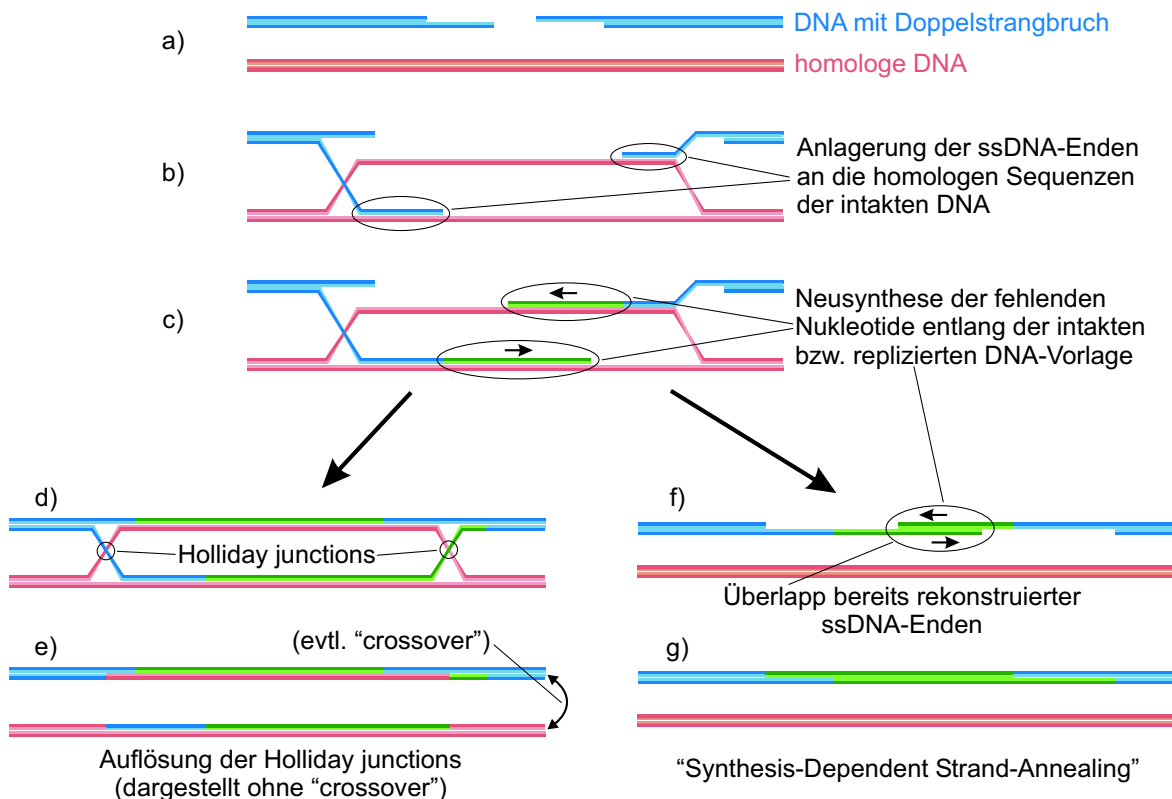
## 4.2.2 Homologe Rekombination

Den zweiten bedeutsamen Weg zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in lebenden Zellen stellt die sogenannte Homologe Rekombination (HR) dar. Um diese Reparatur durchführen zu können, wird eine Vorlage mit der gleichen oder einer möglichst ähnlichen Basensequenz wie im DSB-Bereich des geschädigten DNA-Moleküls, eine homologe DNA, benötigt (siehe Abb. 4.4 a). Als Vorlage wird dabei das identische Schwesterchromatid [51] bevorzugt, welches nach der DNA-Replikation in der G<sub>2</sub>- und frühen M-Phase des Zellzyklus [16] in unmittelbarer Nachbarschaft zur Verfügung steht. Die Bedeutung der verschiedenen Zellzyklusphasen einer Eukaryontenzelle<sup>(1)</sup> ist in Abbildung 4.2 ersichtlich. Durch Experimente wird bestätigt, dass in der späten S-, der G<sub>2</sub>- und der frühen M-Phase die Homologe Rekombination einen wesentlichen Anteil an DNA-Doppelstrangbrüchen repariert [52].

Die Reparatur durch HR wird vorbereitet, indem an den beiden Enden des gebrochenen DNA-Moleküls Nukleotide entfernt werden und somit jeweils überstehende Einzelstränge entstehen. Das Protein Rad52 bindet sodann an die überstehenden ssDNA-Stränge zu beiden Seiten des Doppelstrangbruchs (in Abb. 4.4 nicht dargestellt). Dieser Vorgang steht in Analogie zur Anlagerung der Ku-Proteine (siehe Kap. 4.2.1) bei der NHEJ, sodass das verwendete DNA-Bindeprotein möglicherweise über den eingeschlagenen Reparaturweg entscheidet [53]. Experimentelle Ergebnisse [54] deuten darauf hin, dass Ku und Rad52 bevorzugt an unterschiedliche Konstellationen von DNA-Bruchenden binden und somit auf komplementäre DNA-Schäden reagieren. Im Verlauf der Homologen Rekombination werden dann unter Beteiligung des Proteins Rad51 die beiden überstehenden DNA-Einzelstränge der beschädigten DNA an die homologen Sequenzen der intakten DNA herangeführt und dort über die Wechselwirkung der Basenpaare (Wasserstoffbrücken) gebunden (Abb. 4.4 b). Dies erfordert ein partielles Aufspalten der homologen DNA in Einzelstränge. Nun können die beiden Einzelstrang-Enden

---

<sup>(1)</sup>Eukaryontenzellen sind Zellen, die einen abgegrenzten Zellkern besitzen [16]. Dies trifft auf die Zellen höherer Lebewesen zu.



**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung der Homologen Rekombination (HR). Die Teilbilder unter a) bis c) sind universell für die beiden unterschiedlichen Endpunkte (Auflösung der Holliday-junctions bzw. Synthesis-Dependent Strand-Annealing).

der beschädigten DNA entlang der Vorlage rekonstruiert werden (Abb. 4.4 c). Wird dieser Prozess fortgeführt, bis das gebrochene DNA-Molekül wieder geschlossen ist, so entsteht die in d) gezeigte Situation mit Kreuzungspunkten (sog. Holliday-junctions). Durch Schneiden an diesen Kreuzungspunkten und anschließendes Verbinden der entstehenden Einzelstrangbrüche können die beiden DNA-Moleküle wieder getrennt werden, das Ergebnis ist in e) ersichtlich. Man erkennt einen Austausch von Basensequenzen, auch in dem als Vorlage dienenden DNA-Molekül. Darüberhinaus besteht die Gefahr, dass die Auflösung der Holliday-junctions in der Weise stattfindet, sodass ein sogenanntes crossover entsteht, bei welchem an der Reparaturstelle ein Übergang vom ursprünglich geschädigten zum homologen DNA-Molekül erfolgt. Dieser Vorgang ist jedoch gegenüber dem oben dargestellten non-crossover deutlich unterdrückt [51]. Alternativ zur Ausbildung der Holliday-junctions kann sich das beschädigte DNA-Molekül auch vorzeitig von der homologen Vorlage lösen. Sobald sich die rekonstruierten Einzelstränge in ihrer Basensequenz komplementär überlappen, kann die weitere Rekonstruktion ohne Vorlage erfolgen (Abb. 4.4 f). Nach Abschluss dieses Vorgangs



(Synthesis-Dependent Strand-Annealing) bleibt das homologe DNA-Molekül unverändert zurück, die Gefahr eines crossovers und damit einer potenziellen Chromosomentranslokation besteht nicht (siehe Abb. 4.4 g).

## 4.3 **Untersuchte Proteine**

Aus einer Vielzahl von Proteinen, die eine lebende Zelle zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen bereitstellt, wurden einige ausgewählt und für die Analyse nach Ionenmikrobestrahlung verwendet. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt:

### 4.3.1 **53BP1**

53BP1 (p53 binding protein 1, Molekulargewicht 214 kDa<sup>(2)</sup>, [55]) ist ein im Zellkern-Plasma vorkommendes Binde-Protein zum Tumor-Supressor Protein p53. Das Protein 53BP1 bildet bereits 5 Minuten nach Exposition von Zellen in ionisierender Strahlung Foci aus [48], welche signifikant mit  $\gamma$ -H2AX-markierten DNA-Abschnitten kolokalisieren [56]. Es wird vermutet, dass 53BP1 als wichtiges Bindeglied in der frühen Signalkette nach einem Doppelstrangbruch-Ereignis zur Aktivierung von ATM beiträgt [48].

### 4.3.2 **MDC1**

Die Funktion des Proteins MDC1 (Molekulargewicht 227 kDa, [55]) ist in einem möglicherweise dosisabhängigen Alternativweg zur Signalübertragung mittels 53BP1 zu sehen. Während nach Strahlendosen von 1 Gy nur Ansammlungen von 53BP1 an DNA-Schadensorten beobachtet werden, treten nach höheren Dosen von 5 bis 9 Gy sowohl 53BP1- als auch MDC1-Foci auf [57]. Die Anlagerung von MDC1 erfolgt dabei in annähernd gleicher Geschwindigkeit wie die des Mre11/Rad50/NBS1 (MRN) Protein-Komplexes innerhalb von 2 bis 3 Minuten. Das Vorhandensein von MDC1 am Ort des DSBs stellt unter Umständen eine Voraussetzung dafür dar, dass auch der MRN-Komplex dort gebunden bleibt [58].

### 4.3.3 **Rad51**

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Proteinen, welche unabhängig vom Reparaturweg zu Beginn der Reaktion auf einen DNA-Doppelstrangbruch stehen, wird das Protein Rad51 (Molekulargewicht 37 kDa, [55]) von Zellen benötigt, in denen der

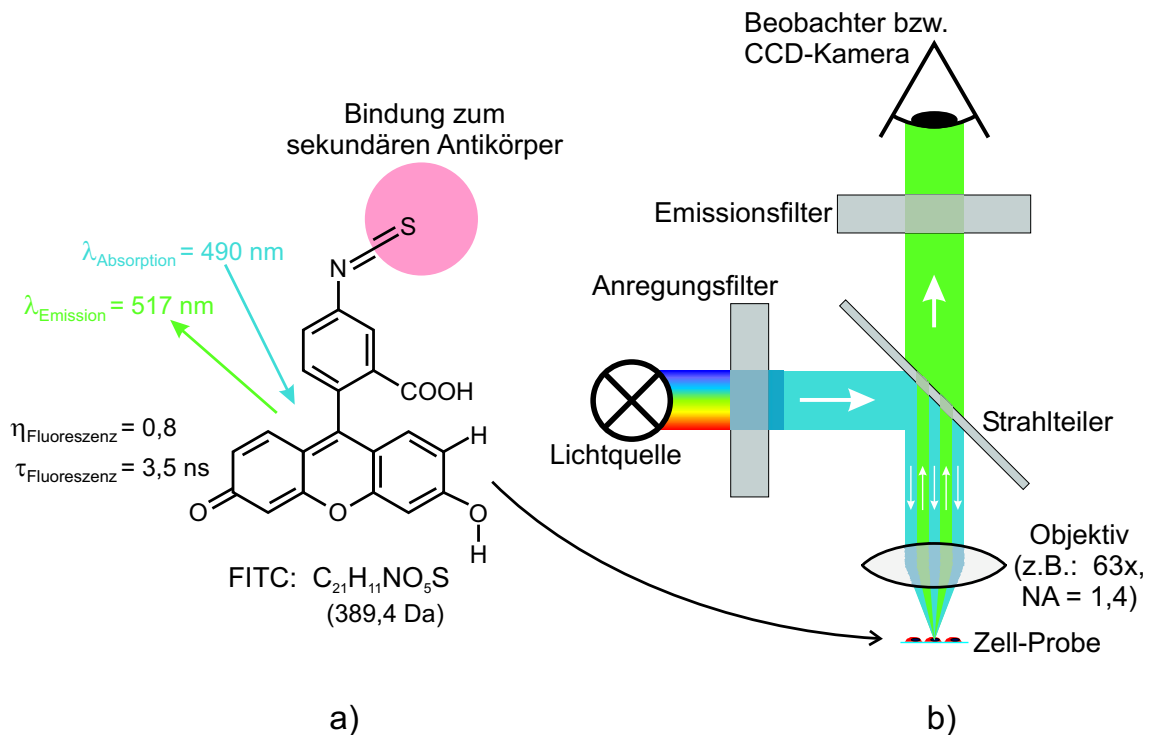
---

<sup>(2)</sup>Da (Dalton) ist die in der Biochemie gebräuchliche Masseneinheit. Es gilt: 1 Da = 1 u (atomare Masseneinheit)

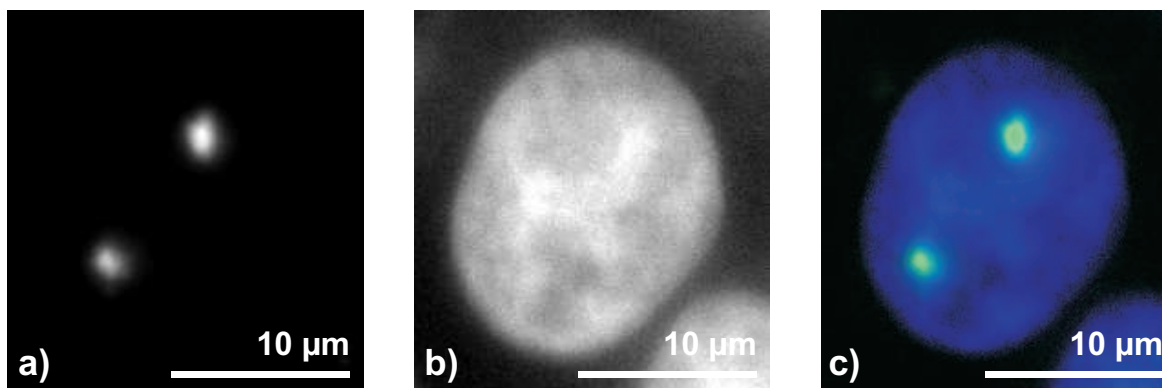
Vorgang der Homologen Rekombination (siehe Kap. 4.2.2) abläuft. Rad51-Foci werden innerhalb von 10 bis 20 Minuten nach einer Bestrahlung sichtbar [59] und treten nur in Zellen auf, die in der S- oder G2-Phase geschädigt wurden. In seiner aktiven Form bildet Rad51 einen helikalen Proteinkomplex aus vielen einzelnen Rad51-Molekülen und der geschädigten, einzelsträngigen DNA sowie der doppelsträngigen DNA-Reparaturvorlage. Rad51 katalysiert dadurch das Auffinden und Paaren der homologen Sequenzen von geschädigtem und intaktem DNA-Molekül [60, 53].

## 4.4 Immunofluoreszenz

Um die in Kapitel 4.1 bzw. 4.3 beschriebenen, an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligten Proteine bzw. Proteinkomplexe untersuchen zu können, müssen diese markiert und einem geeigneten, mikroskopischen Verfahren zugänglich gemacht werden. Dies geschieht, indem in einer biochemischen Prozedur bestehend aus ca. 25 Einzelschritten [40, 62] geeignete Antikörper (Immunglobuline) in die Kerne der fixierten Zellen eingeschleust werden. Diese Arbeiten werden von Kollaborations-



**Abbildung 4.5:** a): Chemische Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes FITC mit den wichtigsten Daten: Wellenlängen maximaler Absorption bzw. Emission ( $\lambda_{\text{Absorption}}$  bzw.  $\lambda_{\text{Emission}}$ ), Fluoreszenzausbeute ( $\eta_{\text{Fluoreszenz}}$ ) und Lebensdauer des angeregten Zustandes ( $\tau_{\text{Fluoreszenz}}$ ) [61]. b): Schematischer Strahlengang eines Fluoreszenzmikroskops.



**Abbildung 4.6:** Fluoreszenzaufnahmen eines mit zwei 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen bestrahlten HeLa-Zellkerns: a) Monochromaufnahme des markierten Reparaturproteins 53BP1 (Farbstoff Cy3) b) Monochromaufnahme von markiertem Chromatin (Farbstoff DAPI) c) Überlagerung der Aufnahmen aus a) und b) in verschiedenen Farbkanälen.

partnern aus dem Strahlenbiologischen Institut der LMU–München durchgeführt. Antikörper stellen Y-förmige Proteine (Molekulargewicht ca. 150 kDa) dar und sind für eine Vielzahl von Target-Molekülen kommerziell erhältlich [63]. In einem ersten Schritt binden primäre, aus einem Tier (z.B. Kaninchen) stammende Antikörper spezifisch an die zu untersuchenden Proteine. In einem zweiten Schritt lagern sich sekundäre, aus einem anderen Tier (z.B. Esel) stammende Antikörper an die primären Antikörper an. An den sekundären Antikörper ist ein fluoreszierendes Molekül (z.B. FITC = Fluorescein-Isothiocyanat) gebunden (siehe Abb. 4.5 a). Fluoreszenzfarbstoffe sind dabei ebenfalls in großer Vielfalt kommerziell verfügbar. Dabei handelt es sich um kleine organische Moleküle mit einem delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystem, welches elektronische Übergänge im optischen Spektralbereich aufweist. Dieses delokalisierte Elektronensystem wird meist durch benachbarte, aromatische Ringe (siehe Abb. 4.5 a) oder aber durch lineare Ketten aus konjugierten C–C-Doppelbindungen gebildet [64].

Durch den zweistufigen Prozess mit primärem und sekundärem Antikörper kann man sich auf eine kleine Anzahl sekundärer, fluoreszenzmarkierter Antikörpertypen beschränken. Darüberhinaus führt die Anlagerung mehrerer, sekundärer Antikörper-Moleküle an ein primäres Antikörper-Molekül zu einer Signalverstärkung. Dieses Antikörper-vermittelte Verfahren zur Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen wird unter der Bezeichnung Immunofluoreszenz zusammengefasst. Eine Ansammlung von fluoreszierenden Molekülen wird als Fokus bezeichnet. Darüberhinaus können durch Anfärbung des Chromatins mittels des Farbstoffes DAPI die Zellkerne visualisiert werden. Untersucht werden die so präparierten Zellproben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops, welches in Abbildung 4.5 b) schematisch dargestellt ist. Die Proben werden

über ein System von Lichtquelle (meist Hg-Dampfampe), Anregungsfilter und selektivem Strahlteiler mit dem Objektiv beleuchtet. Das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte, längerwellige Licht wird sodann über das Objektiv, den Strahlteiler und einen Emissionsfilter dem Okular bzw. einer empfindlichen CCD-Kamera zugeleitet. Ein Wechsel des kompletten Filtersystems im Mikroskop erlaubt es dabei, mehrere unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe und somit auch mehrere DNA-Reparaturproteine innerhalb einer Zellprobe zu untersuchen. Durch Zuordnen der monochromen CCD-Kamera-Aufnahmen zu verschiedenen Farbkanälen und anschließende Überlagerung können in einem Bild die Informationen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt werden. Dies ist in Abbildung 4.6 a) bis c) am Beispiel eines bestrahlten HeLa-Zellkerns für das Reparaturprotein 53BP1 (grün) und markiertes Chromatin (blau) gezeigt.

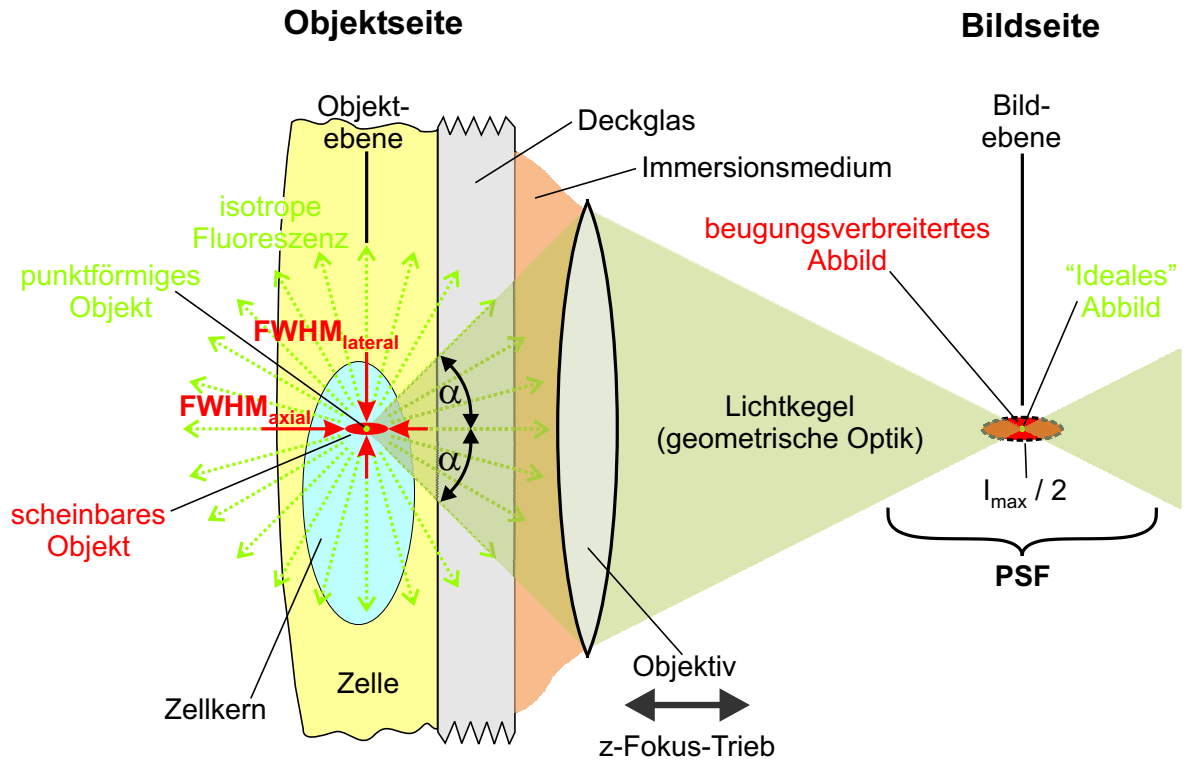
## 4.5 Optische Auflösung und Objekt-Rekonstruktion

Die mikroskopische Untersuchung der Zellproben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops unterliegt den prinzipiellen Einschränkungen der Lichtmikroskopie. Diese sind durch Beugungseffekte aufgrund der Wellennatur des Lichtes bedingt. Wichtigste Kenngröße bei der optischen Auflösung stellt die sogenannte numerische Apertur  $NA$  dar, die sich aus dem Aperturwinkel  $\alpha$  (= halber Öffnungswinkel) der Objektivlinse und dem Brechungsindex  $n$  des Mediums zwischen Linse und Objekt ergibt:

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad (4.1)$$

In Abbildung 4.7 ist die Untersuchung eines Zellkerns mit den für die optische Abbildung wichtigen Komponenten illustrativ dargestellt. Um eine hohe numerische Apertur und gute Abbildungseigenschaften zu erreichen, muss der Raum zwischen Objektiv und Objekt (Zellkern) durch ein Deckglas (Dicke: 170  $\mu\text{m}$ ) und Immersionsmedium (Öl) mit definiertem Brechungsindex ausgefüllt sein.

Strukturen in der Objektebene werden in die Bildebene abgebildet. Ein punktförmiges, isotrop leuchtendes Objekt erzeugt dabei aufgrund des Abbildungsstrahlenganges gemäß der geometrischen Optik sowie aufgrund von Beugungseffekten an der begrenzenden Linsenapertur eine komplexe, dreidimensionale Intensitätsverteilung (Punktbild-Verwaschungsfunktion, engl. point spread function, PSF) im Bildraum. Diese Punktbild-Verwaschungsfunktion ist in Abbildung 4.7 vereinfacht dargestellt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Bildbereich, an dem die Intensität auf die Hälfte des Maximalwertes abgesunken ist. Um Aussagen über die optische Auflösung am Ort des beobachteten Objekts zu erhalten, muss das beugungsverbreiterte Abbild in



**Abbildung 4.7:** Begrenzung der lateralen bzw. axialen Auflösung in einem optischen (Fluoreszenz-) Mikroskop. Die Punktbild-Verwaschungsfunktion (PSF) ist nur schematisch dargestellt.

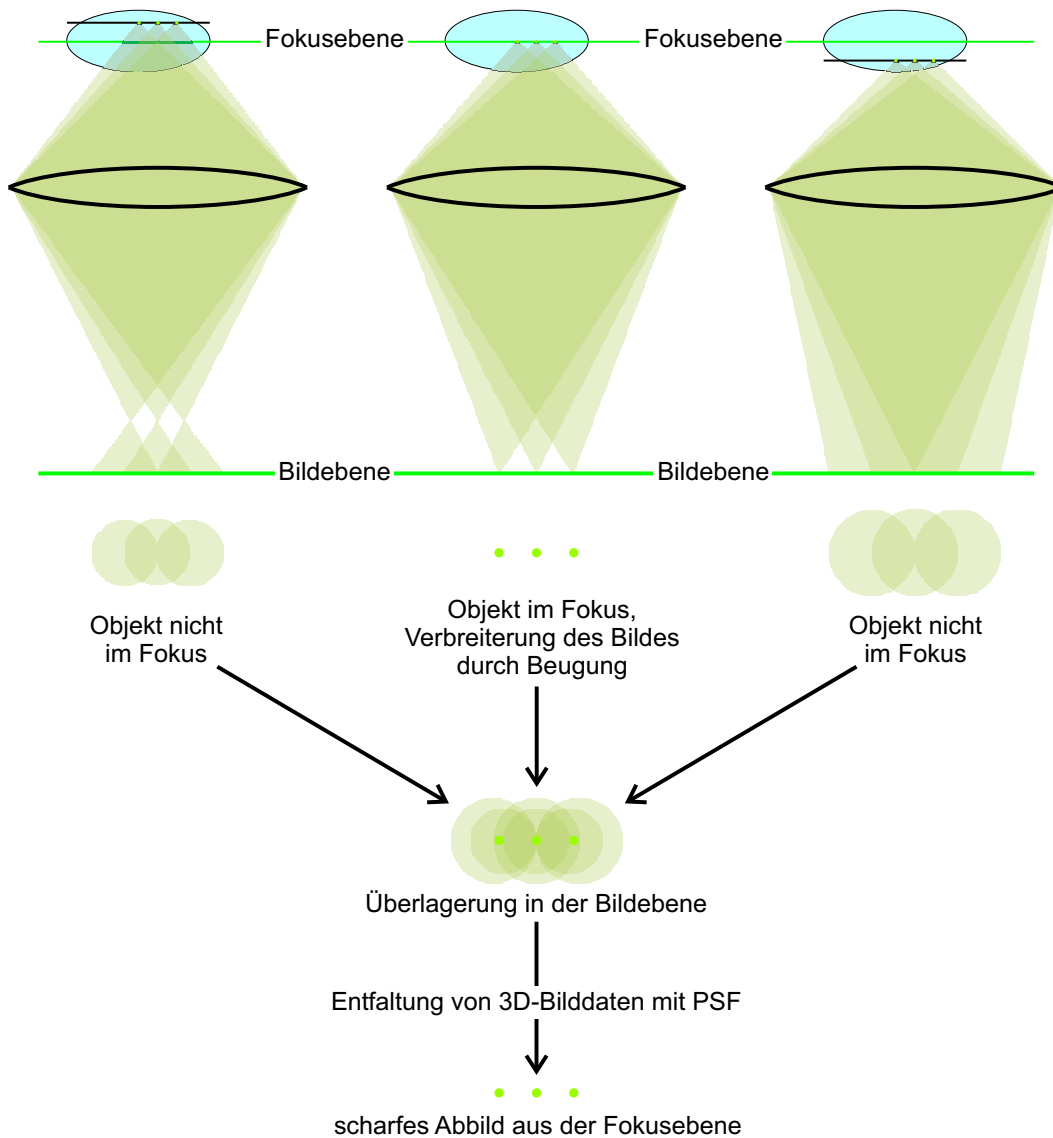
den Objektbereich zurückgerechnet werden. Dies liefert ein scheinbares Objekt mit folgenden Ausdehnungen für die halbe Intensität [65]:

$$FWHM_{\text{lateral}} = \frac{0,51 \cdot \lambda_{\text{Emission}}}{NA} \quad \text{bzw.} \quad FWHM_{\text{axial}} = \frac{1,77 \cdot n \cdot \lambda_{\text{Emission}}}{NA^2} \quad (4.2)$$

Mit der emittierten Wellenlänge  $\lambda_{\text{Emission}} = 517 \text{ nm}$  des Fluoreszenzfarbstoffes FITC, dem Brechungsindex  $n = 1,52$  für das verwendete Deckglas sowie Immersionsöl und einer hohen numerischen Apertur von  $NA = 1,4$  (z.B. Zeiss Plan-Apochromat 63fach) erhält man für die erreichbaren Auflösungen:

$$FWHM_{\text{lateral}} = 0,19 \mu\text{m} \quad \text{bzw.} \quad FWHM_{\text{axial}} = 0,71 \mu\text{m} \quad (4.3)$$

Neben diesen Auflösungsbegrenzungen durch Beugungseffekte tritt bei der Mikroskopie dreidimensionaler Körper wie z.B. eines Zellkerns zusätzlich das Problem auf, dass Objekte, welche außerhalb der Fokusebene liegen, ein unscharfes Abbild in der Bildebene erzeugen. In Abbildung 4.8 (links bzw. rechts) ist dies an drei punktförmigen Objekten, die jeweils in einer Ebene liegen, veranschaulicht. Objekte in der Fokusebene (Abb. 4.8 mitte) erzeugen ein scharfes Abbild, das lediglich durch Beugung verbreitert ist. In der



**Abbildung 4.8:** Überlagerung der Bilder von Objekten aus unterschiedlichen Fokustiefen und Abhilfe durch Entfaltung von dreidimensionalen Bilddaten (*z*-Stapel).

Bildebene überlagern sich die Abbilder aller Objektpunkte, das Abbild aus der Fokusebene wird verwaschen.

Durch ein mathematisches Verfahren (Maximum Likelihood Estimation) kann jedoch der Bildbeitrag aus Objektebenen, welche sich nicht im Fokus befinden, rechnerisch eliminiert werden. Voraussetzung dafür ist, dass Bildinformation nicht nur aus einer, sondern aus mehreren benachbarten Fokusebenen gewonnen wird. Dies geschieht durch ein sukzessives Verstellen der Fokusebene entlang der Beobachtungsrichtung (siehe Abb. 4.7, *z*-Fokus-Trieb) mit jeweiliger elektronischer Bildaufnahme. Es entsteht ein sogenannter *z*-Bildstapel (engl. *z*-stack) aus einzelnen, zweidimensionalen Aufnahmen

(als Beispiel siehe Abb. 5.9 a). Der Abstand zwischen benachbarten Fokusebenen sollte dabei weniger als die Hälfte der axialen Auflösung  $FWHM_{\text{axial}}$  betragen. Die Entfaltung der Bilddaten erfolgt mit geeigneter Software (Huygens, [66]) unter Verwendung einer Punktbild-Verwaschungsfunktion für das eingesetzte Mikroskopobjektiv. So kann, wie in Abbildung 4.8 unten gezeigt, der unscharfe Bildbeitrag von Objekten, die nicht in der gewählten Fokusebene liegen, entfernt werden.

Ein  $z$ -Bildstapel enthält die dreidimensionale Information über das untersuchte Objekt. Durch das Setzen von Intensitätsschwellen können nun transparente und solide Objektbereiche definiert werden. Dies erlaubt mit Hilfe von Render-Programmen eine plastische Darstellung von mikroskopischen Strukturen. In Kapitel 5.3 werden auf diese Weise Ionenspuren in Zellkernen untersucht.





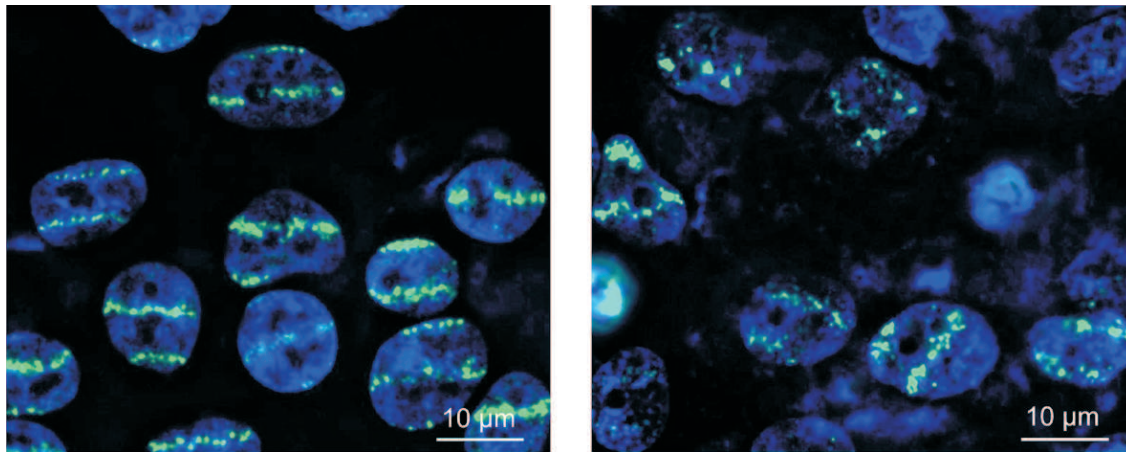
# Kapitel 5

## Erste Zellbestrahlungsexperimente

Durch Bestrahlung mit einzelnen, hochenergetischen Ionen können in lebenden Zellen definiert und quantifizierbar biologische Strahlenschäden wie z.B. DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt werden. Das Rasterionenmikroskop SNAKE und der Bestrahlungsaufbau erlauben dabei eine Bestrahlung mit einer räumlichen Treffergenauigkeit, welche näherungsweise an die Auflösung eines hochwertigen Lichtmikroskops heranreicht (vgl. Kap. 3.8 und Kap. 4.5). Daher stellt die Kombination von Ionenmikrobestrahlung mit der in Kapitel 4.4 beschriebenen Immunfluoreszenz-Technik ein geeignetes Werkzeug dar, um in unterschiedlichen, experimentellen Fragestellungen die Verteilung von Proteinen zu studieren, welche an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind.

### 5.1 Dynamik geschädigter Chromatinbereiche

Eine ungeklärte Frage bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in biologischen Zellen ist, ob jeder erzeugte Schaden direkt „vor Ort“ repariert oder zuerst zu speziellen Orten im Zellkern, eventuellen „Reparaturfabriken“, transportiert wird. Zum Studium dieser Abläufe muss die Dynamik geschädigten Chromatins verfolgt werden. Dazu kann die Aktivierung des zellkerneigenen DSB-Markers  $\gamma$ -H2AX an den durch Ionenbestrahlung induzierten Schäden benützt werden (siehe Kap. 4.1). Geschädigtes Chromatin wird so als Fokus im Fluoreszenzmikroskop sichtbar, die zeitlich-räumliche Entwicklung dieser Foci offenbart somit auch die Dynamik von geschädigten Chromatinbereichen. Interpretiert man einen einzelnen Fokus als eigenständige Antwort auf ein DNA-Schädigungsereignis bestehend aus einem Doppelstrangbruch bzw. mehreren, geclusterten Doppelstrangbrüchen, so ist es sinnvoll, die Dynamik in eine Entwicklung der Fokus-Größe sowie der Fokus-Lage aufzutrennen. Die entsprechende quantitative Analyse wurde im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt [39] und soll hier kurz



**Abbildung 5.1:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellkernen, die mit einzelnen 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen nach einem Zeilenmuster bestrahlt wurden. Links: 0,5 h zwischen Bestrahlung und Fixierung. Rechts: 15 h zwischen Bestrahlung und Fixierung.

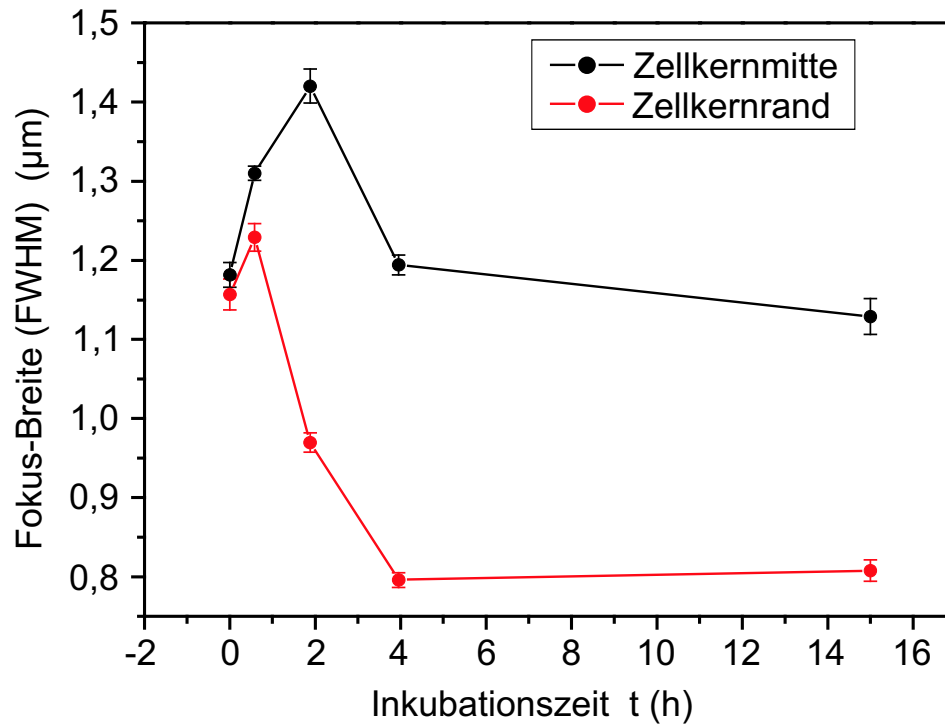
zusammengefasst werden.

Die zeitliche Dynamik in den lebenden Zellen wurde ermittelt, indem mehrere Zellproben bestrahlt und für unterschiedlich lange Zeiträume im Brutschrank bis zur Fixierung gelagert wurden. Während dieser Inkubationszeit laufen in den lebenden Zellen unter physiologischen Bedingungen DNA-Reparaturprozesse und die hier interessierenden Chromatinbewegungen ab. Da die Immunofluoreszenz-Untersuchung retrospektiv an den fixierten Zellen durchgeführt wird, kann die Analyse der zeitlichen Entwicklung der Fokus-Lage nur erfolgen, wenn die ursprüngliche Fokus-Position bekannt ist. Daher wurden HeLa-Zellen mit 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen nach einem vorgegebenen Zeilen-Muster bestrahlt. Dieses besteht aus einzelnen Iontentreffern mit einem Abstand von 1  $\mu\text{m}$  in x- und einem Abstand von 6  $\mu\text{m}$  in y-Richtung. Eine Bewegung der Foci relativ zu diesen bestrahlten Zeilen kann somit auch retrospektiv ermittelt werden.

In Abbildung 5.1 sind exemplarisch Ausschnitte aus zwei bestrahlten und präparierten Zellproben mit Inkubationszeiten von 0,5 h (links) bzw. 15 h (rechts) zu sehen. Man erkennt in der kurz inkubierten Probe deutlich das applizierte Muster sowie die Foci aufgrund einzelner Iontentreffer wieder, während sich in der lang inkubierten Probe eine zunehmende Streuung der Foci zeigt.

Für eine quantitative Analyse wurden in vielen Zellkernen Schnitte senkrecht zu den bestrahlten Linien betrachtet und Gauß-Fits an die erhaltenen Intensitätsprofile des Fluoreszenzsignals angepasst. Durch die Breite der Fit-Kurven erhält man die Ausdehnung der Foci, durch den Fit-Schwerpunkt die Lage der Foci [39, 67].

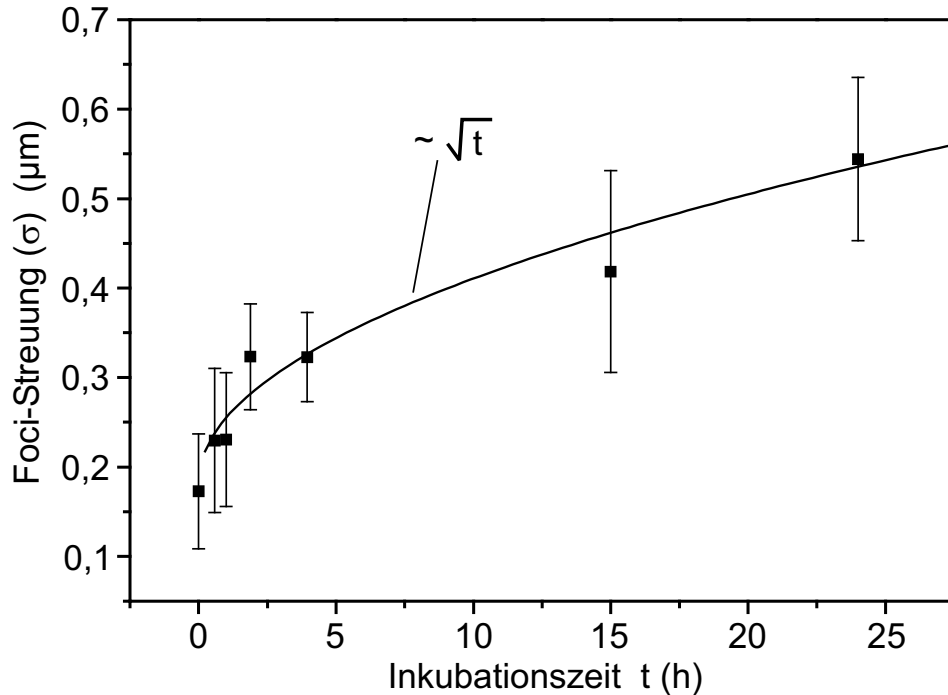
Eine einfache Mittelwertbildung über die Fit-Breiten ergibt ein repräsentatives Maß für die Foci-Größe in jeweils einer Bestrahlungsprobe. Die Analyse mehrerer Zellpro-



**Abbildung 5.2:** Zeitliche Entwicklung der Foci-Breiten: Man erkennt ein signifikant unterschiedliches Verhalten zwischen Zellkernmitte und Zellkernrand.

ben mit unterschiedlichen Inkubationszeiten zwischen Bestrahlung und Fixierung liefert die zeitliche Entwicklung der Foci-Größen. Ein zusätzlicher Parameter bezüglich dieser Dynamik ist in der Position innerhalb des Zellkerns zu sehen, an welcher ein Fokus entsteht. Durch das Auswerten von Mikroskopaufnahmen aus einem z-Stapel konnte zwischen Zellkernmitte und Zellkernrand unterschieden werden. Abbildung 5.2 zeigt für 5 unterschiedlich lange Inkubationszeiten die Entwicklung der Foci-Größen. Man erkennt eine anfängliche Zunahme, was eventuell auf eine fortschreitende Phosphorylierung der H2AX-Histone und damit eine Bildung des  $\gamma$ -H2AX zurückzuführen ist. Nach einer Zeitdauer, die von der Fokuslage abhängig ist (0,5 h am Zellkernrand bzw. 2 h in der Zellkernmitte), zeigt sich jedoch ein Schrumpfen der Foci auf einen konstanten Wert. Dieser Effekt ist bei Foci am Zellkernrand deutlicher ausgeprägt als bei Foci in der Zellkernmitte. Das Schrumpfen hat seine Ursache eventuell in einer Komprimierung der Chromatinbereiche an den Schadensorten. Dies erleichtert möglicherweise die Reparatur der bei 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Bestrahlung vorliegenden, geclusterten Doppelstrangbrüche. Die geringere Gen-Dichte am Zellkernrand [68] könnte dort den Effekt der Chromatin-Komprimierung begünstigen.

Der Schwerpunkt der Fit-Kurve, die an einen Intensitätsschnitt der Fluoreszenzaufnahme angepasst ist, liefert die Position des jeweiligen Fokus. Die Entfernung dieser



**Abbildung 5.3:** Zeitliche Entwicklung der Foci–Streuung: Das beobachtete Verhalten ist verträglich mit einer Diffusionsbewegung der Foci.

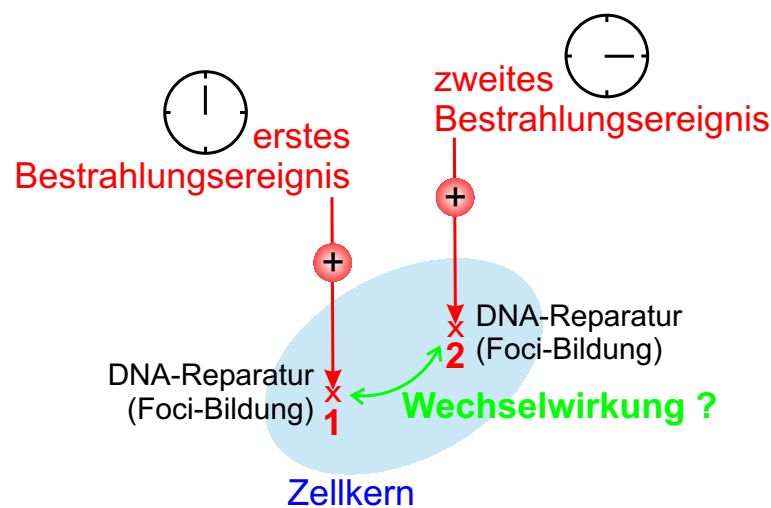
Position zur ursprünglich bestrahlten Linie ist ein Maß für die Bewegung des Fokus innerhalb der Inkubationszeit. Für eine hinreichende Anzahl von Foci aus einer Bestrahlungssprobe erhält man so ein Histogramm dieser Entfernungen, welches sich durch eine Gauß–Kurve annähern lässt. Nach Abzug der Bestrahlungsauflösung (siehe Kap. 3.8) gemäß der Fortpflanzung von Unsicherheiten nach Gauß gibt die Breite (Standardabweichung  $\sigma$ ) dieser Kurve ein Maß für die ungerichtete Bewegung der Foci innerhalb der Inkubationszeit [39, 67]. Wird die eben beschriebene Auswertung für unterschiedliche Proben mit variierten Inkubationszeiten durchgeführt, so erhält man die in Abbildung 5.3 gezeigte Dynamik der Foci–Streuung. Man erkennt eine Zunahme der Foci–Streuung mit wachsender Inkubationszeit. Die eingezeichnete Fit–Kurve mit wurzelförmigem Verlauf zeigt, dass die Daten unter Berücksichtigung der eingetragenen Unsicherheiten verträglich mit der Annahme einer Diffusionsbewegung der Foci sind. Ein signifikanter Unterschied im Verhalten zwischen Zellkernmitte und Zellkernrand konnte nicht festgestellt werden.

Abschließend betrachtet gibt es somit keinen Hinweis darauf, dass geschädigte Chromatinbereiche gezielt zu vordefinierten „Reparaturfabriken“ transportiert werden. Vielmehr werden die DNA–Schäden in unmittelbarer Nähe ihrer Entstehung repariert, wobei die oben dargestellte Chromatin–Kompression auf ein Zusammenfassen von Schäden hindeutet, welche innerhalb von ca. 1  $\mu\text{m}$  erzeugt wurden.

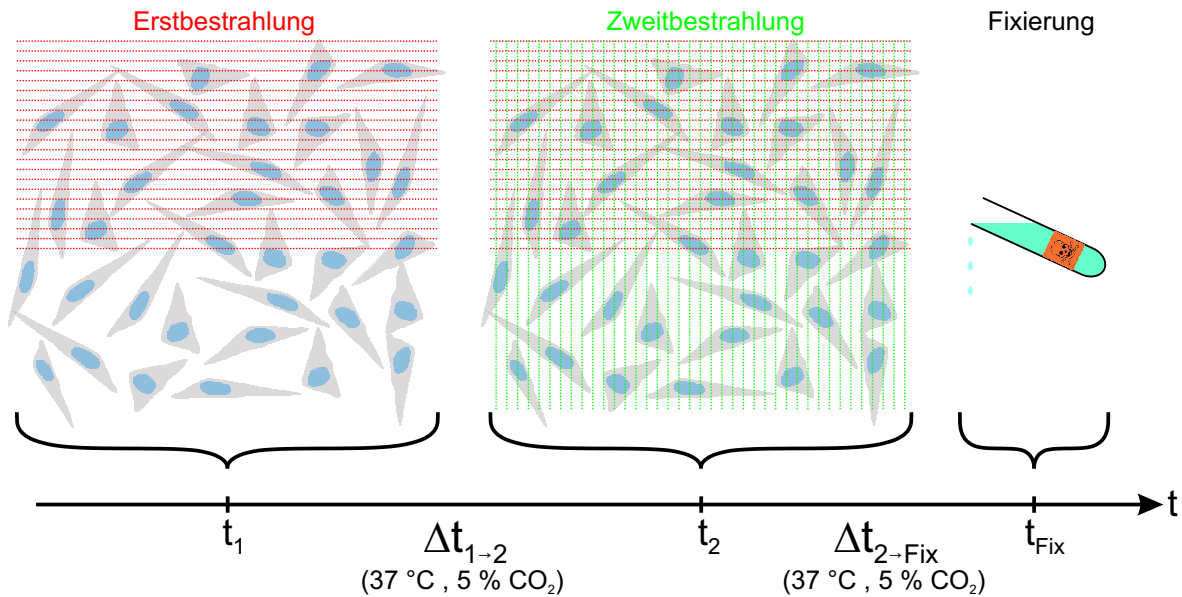
## 5.2 Konkurrenzeffekte bei der Reparatur von DNA–Doppelstrangbrüchen

Die in Kapitel 5.1 vorgestellten Experimente zeigen die Chromatin–Dynamik nach Strahlenschäden, welche, verglichen mit der biologischen Zeitskala, gleichzeitig innerhalb eines Zellkerns generiert werden. Durch das definierte Erzeugen von Schäden eignet sich die Ionenmikrobestrahlung auch dafür, zeitlich und räumlich separierte Schädigungsereignisse zu induzieren und eine eventuelle Wechselwirkung zwischen diesen Schäden innerhalb eines Zellkerns zu studieren. Der grundlegende, experimentelle Ansatz dazu ist in Abbildung 5.4 veranschaulicht. Die Entfernung und die Zeitspanne zwischen den Schädigungsereignissen stellen zwei Parameter dar, in deren Abhängigkeit eine Wechselwirkung von Zellantworten, wie z.B. DNA–Reparatur, untersucht werden kann.

Um das Zellverhalten nach zeitlich separierten, d.h. fraktionierten Bestrahlungen retrospektiv mittels Fluoreszenzmikroskopie studieren zu können, müssen die Bestrahlungsereignisse markiert werden. In den durchgeführten Experimenten wurde diese Markierung durch das Bestrahlen mit einzelnen Ionen nach vorgegebenen Mustern erreicht. Die Bestrahlung wurde dabei ohne Beachtung der Positionen von einzelnen Zellen bzw. Zellkernen auf einen Bereich von ca.  $0,6 \cdot 0,5 \text{ mm}^2$  appliziert. Durch die große Anzahl von Zellen ( $> 100$ ) in diesem Bereich konnte eine ausreichende Bestrahlungsstatistik erreicht werden. Die experimentelle Vorgehensweise ist in Abbildung 5.5 ersichtlich, die einen schematisierten Ausschnitt aus dem bestrahlten Bereich zeigt. Zu einem Zeitpunkt  $t_1$  findet eine erste Bestrahlung statt, bei der mit einzelnen Ionentref-



**Abbildung 5.4:** Experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zeitlich bzw. räumlich getrennten Schädigungsereignissen innerhalb eines Zellkerns.

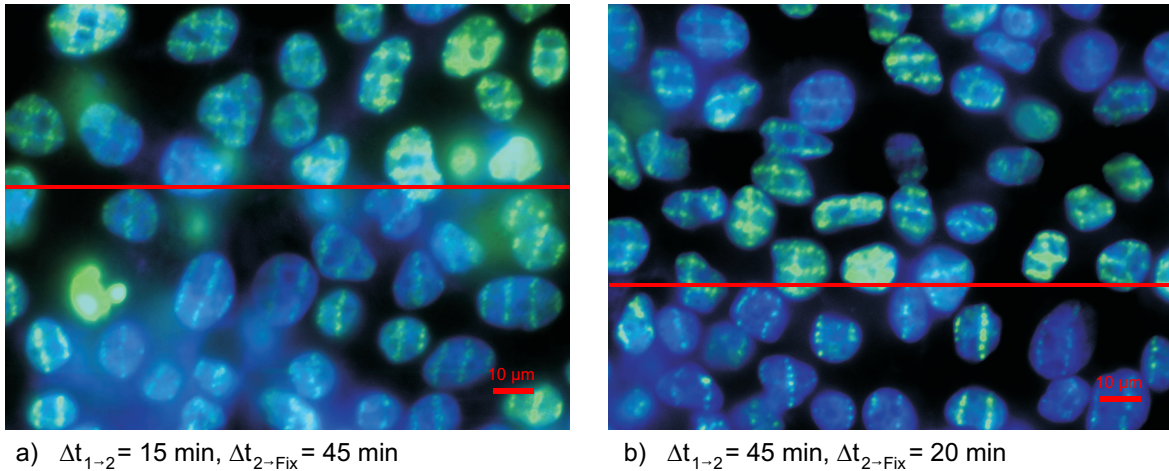


**Abbildung 5.5:** Vorgehensweise bei der Untersuchung zeitlich separierter Bestrahlungseignisse: Die Bestrahlungseignisse werden durch definierte Muster-Bestrahlung markiert (1. Bestrahlung: waagrechte Linien, 2. Bestrahlung: senkrechte Linien).

fern ein horizontales Zeilenmuster erzeugt wird. Anschließend wird die Zellprobe im Brutschrank eine Zeitspanne  $\Delta t_{1 \rightarrow 2}$  lang inkubiert, damit DNA-Reparaturvorgänge in den lebenden Zellen ablaufen können. In einer darauffolgenden zweiten Bestrahlung zum Zeitpunkt  $t_2$  wird ein vertikales Zeilenmuster bestehend aus einzelnen Ionentreffern appliziert. Nach einer weiteren Inkubationszeit  $\Delta t_{2 \rightarrow \text{Fix}}$  werden die Zellen fixiert und somit eine Momentaufnahme der Proteinverteilung zum Zeitpunkt  $t_{\text{Fix}}$  festgehalten.

Limitiert wird die Bestimmbarkeit der biologisch relevanten Zeitdauern  $\Delta t_{1 \rightarrow 2}$  bzw.  $\Delta t_{2 \rightarrow \text{Fix}}$  dadurch, dass die Zellproben während des Bestrahlungsvorgangs auf Raumtemperatur abkühlen, was zu einer undefinierbaren Verlangsamung oder sogar Einstellung biologischer Abläufe führt. Insbesondere bei kurzen Zeitspannen  $\Delta t_{1 \rightarrow 2}$  bzw.  $\Delta t_{2 \rightarrow \text{Fix}}$  von weniger als 20 min wird die oben nicht berücksichtigte Dauer des Bestrahlungsvorgangs, die Abkühldauer nach der Entnahme aus dem Brutschrank sowie die Aufwärmdauer bei Lagerbeginn im Brutschrank dominant. Dies führt zu Verfälschungen der biologisch relevanten Zeitdauern und damit zu systematischen Fehlern bei den Ergebnissen. Abhilfe könnte hier eine durchgehende Zelltemperierung auf  $37^\circ\text{C}$  während der gesamten, experimentellen Prozedur schaffen.

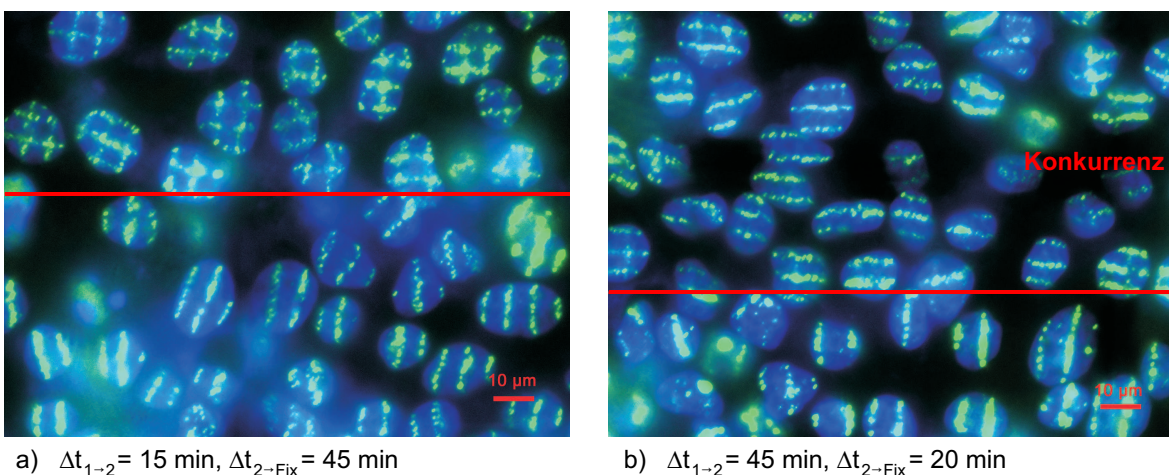
In mehreren Experimenten wurden auf die in Abbildung 5.5 gezeigte Weise Bestrahlungen mit  $100 \text{ MeV } ^{16}\text{O}$ -Ionen an HeLa-Zellen durchgeführt und dabei die Zeitintervalle  $\Delta t_{1 \rightarrow 2}$  sowie  $\Delta t_{2 \rightarrow \text{Fix}}$  variiert. Die bestrahlten Zellproben wurden für den Nachweis des



**Abbildung 5.6:**  $\gamma$ -H2AX-Signal von HeLa-Zellkernen, welche mit 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen nach dem Schema der Abb. 5.5 bestrahlt wurden. Es ist kein Konkurrenzeffekt beobachtbar.

DNA-Doppelstrangbruch-Markern  $\gamma$ -H2AX (Farbstoff Cy3) sowie des Reparaturproteins 53BP1 (Farbstoff Alexa) präpariert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Für die erste Bestrahlung (waagrechtes Zeilenmuster) wurde eine durchschnittliche Energiedosis von 15 Gy ermittelt [69].

Die Abbildungen 5.6 a) bzw. 5.7 a) zeigen für  $\Delta t_{1-2} = 15$  min bzw.  $\Delta t_{2 \rightarrow \text{Fix}} = 45$  min die jeweiligen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aus dem gleichen Probenbereich. Der dargestellte Ausschnitt wurde aus dem Übergangsbereich zwischen zweifacher Bestrahlung und alleiniger Zweitbestrahlung gewählt (siehe Abb. 5.5). Der rote Balken trennt beide Bereiche. Man erkennt, dass an allen Ionentreffern in den Zellkernen sowohl



**Abbildung 5.7:** 53BP1-Signal von HeLa-Zellkernen, welche mit 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen nach dem Schema der Abb. 5.5 bestrahlt wurden: a) kein Konkurrenzeffekt b) deutlicher Konkurrenzeffekt in der Verteilung des 53BP1-Proteins.

von Erst- als auch Zweitbestrahlung  $\gamma$ -H2AX-Markierung stattfindet bzw. Reparaturprotein 53BP1 akkumuliert ist.

Wird jedoch für die Zeitintervalle  $\Delta t_{1 \rightarrow 2} = 45$  min und  $\Delta t_{2 \rightarrow \text{Fix}} = 20$  min gewählt, so unterscheiden sich die Beobachtungen. Die Markierung der DNA-Doppelstrangbrüche mittels  $\gamma$ -H2AX erfolgt nach wie vor an allen durch Ionenbeschuss erzeugten Schadensorten (siehe Abb. 5.6 b). Demgegenüber zeigt 53BP1 im zweifach bestrahlten Bereich (oberhalb des roten Balkens) seine Anwesenheit nur an der ersten Bestrahlung kodiert durch horizontale Zeilen (siehe Abb. 5.7 b). Im unteren Probenbereich hingegen, auf welchen lediglich die zweite Bestrahlung appliziert wurde, ist 53BP1 zu detektieren. Diese Beobachtung weist auf eine Inhibierung der 53BP1-Ansammlung an Orten der zweiten Bestrahlung in Zellkernen hin, die bereits der ersten Bestrahlung ausgesetzt waren.

Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens liegt im begrenzten Vorrat an Reparaturprotein 53BP1 bzw. im begrenzten Vorrat eines für 53BP1 notwendigen Vorläufer-Proteins innerhalb eines Zellkerns. Bei hinreichender DNA-Schädigung durch die erste Bestrahlung und für bestimmte Werte der Zeitparameter  $\Delta t_{1 \rightarrow 2}$  bzw.  $\Delta t_{2 \rightarrow \text{Fix}}$  wird der Protein-Vorrat an den Orten der ersten Bestrahlung gebunden und steht somit für eine Versorgung der zweiten Bestrahlung nicht mehr zur Verfügung. Die  $\gamma$ -H2AX-Markierung ist nicht durch einen vergleichbaren Vorrat begrenzt und kann daher an jedem Schadensort nachgewiesen werden.

Wegen dieser Konkurrenz zwischen unterschiedlichen Bestrahlungsereignissen um den verfügbaren Protein-Vorrat wird die dargestellte Beobachtung als „Konkurrenzeffekt“ bezeichnet. Die Experimente weisen auf eine Abhängigkeit des Effekts sowohl von der Zeitdauer  $\Delta t_{1 \rightarrow 2}$  als auch von der Dauer  $\Delta t_{2 \rightarrow \text{Fix}}$  hin. Die quantitative Auswertung wurde im Rahmen einer Diplomarbeit [69] durchgeführt. In dieser wurde anhand von Zeitreihenmessungen und entfalteten Fluoreszenz-Aufnahmen die Abhängigkeit des „Konkurrenzeffekts“ vom Zeitintervall  $\Delta t_{1 \rightarrow 2}$  zwischen den beiden Bestrahlungsfraktionen bestimmt. Für das Protein 53BP1 zeigt sich ein maximaler „Konkurrenzeffekt“ für  $\Delta t_{1 \rightarrow 2} = 50$  min. Das Verhältnis der gemessenen 53BP1-Signalintensitäten von Zweit- zu Erstbestrahlung nimmt hier einen Minimalwert von  $\Xi_{53\text{BP1}} = 0,179 \pm 0,025$  an. Die Auswertung des  $\gamma$ -H2AX-Signals zeigt hingegen eine stetige Zunahme des Signalverhältnisses von Zweit- zu Erstbestrahlung auf  $\Xi_{\gamma\text{H2AX}} = 1,36 \pm 0,15$  nach  $\Delta t_{1 \rightarrow 2} = 4$  h bei Bestrahlung mit 100 MeV  $^{16}\text{O}$ -Ionen. Diese Beobachtung ist eventuell auf eine Rückbildung der  $\gamma$ -H2AX-Proteine während der Zeitdauer  $\Delta t_{1 \rightarrow 2}$  an den Schäden der Erstbestrahlung zurückzuführen.

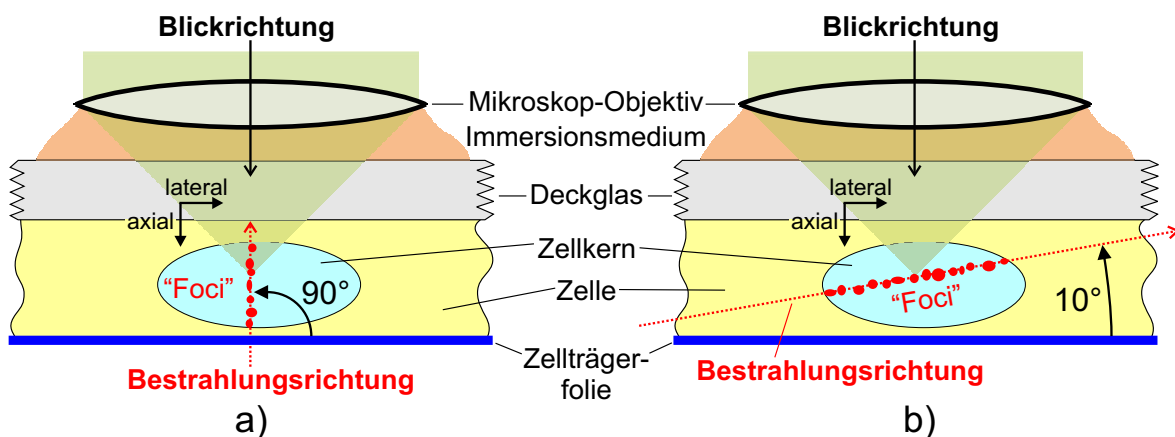


## 5.3 Untersuchung der Schädigungsstruktur entlang von Ionenspuren

In den beiden vorigen Kapiteln wurde Ionenbestrahlung mit mikroskopischer Auflösung dazu verwendet, um (strahlen-)biologische Fragestellungen gezielt bearbeiten zu können. Von grundlegender Bedeutung ist daher, sich über die Struktur der Schädigung durch Ionenbestrahlung insbesondere in Zellkernen klar zu werden. Aus diesem Grund wurde als weiterer Schwerpunkt der Bestrahlungsexperimente die Untersuchung der Schädigungsstruktur im Rahmen dieser Arbeit begonnen. Die theoretischen Betrachtungen hierzu sind Gegenstand des Kapitels 2.

Die primäre Schadensstruktur aufgrund von Ionenbestrahlung stellt eine dreidimensionale Verteilung von Ionisations- bzw. Anregungsprozessen sowie von erzeugten Radikalen dar. In den hier beschriebenen Experimenten werden ausschließlich DNA-Doppelstrangbrüche als biologischer Endpunkt untersucht. Bei der räumlichen Verteilung dieser Doppelstrangbrüche kann in Bezug auf die Ionenspur zwischen der radialen Verteilung und der in diesem Kapitel untersuchten Verteilung entlang der Spur unterschieden werden. Die Art der Fragestellung bestimmt dabei die verwendete Bestrahlungs- bzw. Untersuchungsgeometrie.

Bei den in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Experimenten wurden die bestrahlten und präparierten Zellen in der Weise untersucht, dass Richtung der Ionenspur und Blickrichtung im Fluoreszenzmikroskop entgegengesetzt gerichtet sind. Diese zeitlich separierten Vorgänge von Bestrahlung und Fluoreszenzanalyse sind in Abbildung 5.8 a) in kombinierter Geometrie ersichtlich. Die höhere laterale Auflösung des optischen Mikroskops



**Abbildung 5.8:** Unterschiedliche Geometrien bezüglich Bestrahlung und nachfolgender, mikroskopischer Untersuchung: a) „Konventionelle“ Geometrie b) Blickrichtung nahezu senkrecht auf die Ionenspur.

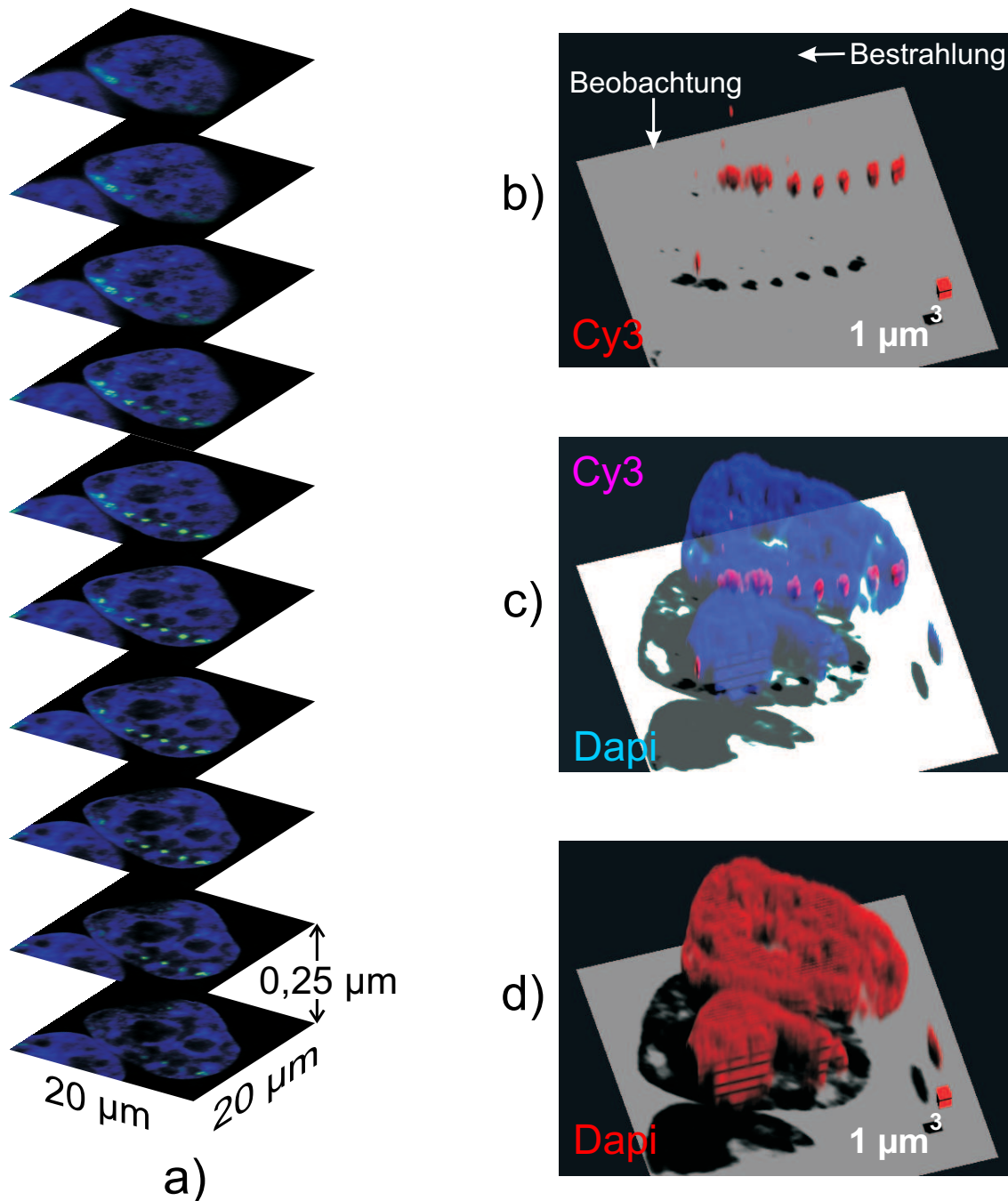
(vgl. Kap. 4.5) erlaubt dabei die Untersuchung der strahlungsinduzierten Foci in der Schnittebene senkrecht zum Ionendurchgang und damit relativ zum Einschussort des Ions mit hoher Genauigkeit. Dies ist vor allem für die in Kapitel 5.1 vorgestellte Auswertung der Dynamik von geschädigtem Chromatin von Bedeutung.

Soll jedoch die Verteilung von DNA–Doppelstrangbrüchen längs der Ionenspur untersucht werden, so ist diese Geometrie von Nachteil. Insbesondere wenn, wie in Kapitel 2.2 erläutert, die Anzahl von Foci entlang des Ionendurchgangs ermittelt werden soll, ist eine gute optische Auflösung in dieser Richtung notwendig, um nahe beieinander liegende Foci trennen zu können. Daher werden für solche Untersuchungen Zellen unter einem spitzen Winkel zur Zellträgerfolie bestrahlt [70, 47]. In dieser Arbeit gelang die Durchführung einer derartigen Bestrahlung mit der in Kapitel 3.9 gezeigten, modifizierten Bestrahlungsanordnung. Der Winkel zwischen Bestrahlungsrichtung und Zellträgerfolie betrug  $10^\circ$ . Bei der nachfolgenden Mikroskopie können dann die Ionenspuren unter nahezu senkrechtem Winkel (unter  $80^\circ$ ) zur Strahlrichtung mit guter lateraler Auflösung entlang der Spuren beobachtet werden (siehe Abb. 5.8 b).

Die Aufnahme eines z–Stapels liefert neben der lateralen Intensitätsverteilung des Fluoreszenzsignals auch die Bildinformation der dritten Dimension. Diese kann benützt werden, um die Verteilung von Reparaturproteinen entlang der Ionenspuren in allen drei Raumrichtungen zu rekonstruieren. Abbildung 5.9 a) zeigt für die Bestrahlung von HeLa–Zellen mit 24 MeV  $^{12}\text{C}$ –Ionen unter  $10^\circ$ –Geometrie exemplarisch die Aufnahme eines z–Bildstapels an einem Zellkern mit einem Ionendurchgang. Die Zeitdauer zwischen Bestrahlung und Fixierung betrug 45 min. In dieser Darstellung sind die Fluoreszenzsignale des Reparaturproteins 53BP1 (Farbstoff Cy3, grün) und des Chromatins (Farbstoff DAPI, blau) bereits überlagert. Aus dem Bildstapel mit insgesamt 37 Bildern sind nur die 10 Bilder, die den Ionendurchgang enthalten, gezeigt.

Unter Zuhilfenahme des Render–Programms „SFP renderer“ [66] können, getrennt für die einzelnen Signalkanäle der Fluoreszenzaufnahmen, dreidimensionale Strukturen mit Licht– bzw. Schatteneffekten plastisch visualisiert werden. Dazu werden durch Setzen einer Intensitätsschwelle Oberflächen definiert. Da die dadurch entstehende Objektgröße von der gewählten Schwelle abhängt, sind auf diese Weise erhaltene Abbildungen primär nicht geeignet, um daraus geometrische Größen (Breiten bzw. Abstände) zu extrahieren. Für das Ermitteln von Foci–Anzahlen sind sie jedoch ebenso geeignet wie zweidimensionale Aufnahmen aus einem z–Bildstapel.

In Abbildung 5.9 b) und d) erkennt man für den bestrahlten HeLa–Zellkern die Render–Darstellungen des markierten Reparaturproteins 53BP1 und des angefärbten Chromatins, d.h. des ganzen Zellkerns. Die Darstellung in rot unterstreicht die jeweilige Bildentstehung durch den Schwellenwert. Der Würfel in der rechten unteren Ecke be-



**Abbildung 5.9:** Dreidimensionale Visualisierung von Ionenspuren. a) z-Bildstapel eines HeLa-Zellkerns mit einem  $24 \text{ MeV } ^{12}\text{C}$ -Ionendurchgang: Reparaturprotein 53BP1 (Farbstoff Cy3, grün) bzw. Chromatin (Farbstoff DAPI, blau). b) Render-Darstellung des Reparaturproteins 53BP1. d) Render-Darstellung des angefärbten Chromatins. Im Vordergrund erkennt man einen Teil des Nachbar-Zellkerns. c) Überlagerung von b) und d) mittels Bildbearbeitungssoftware.

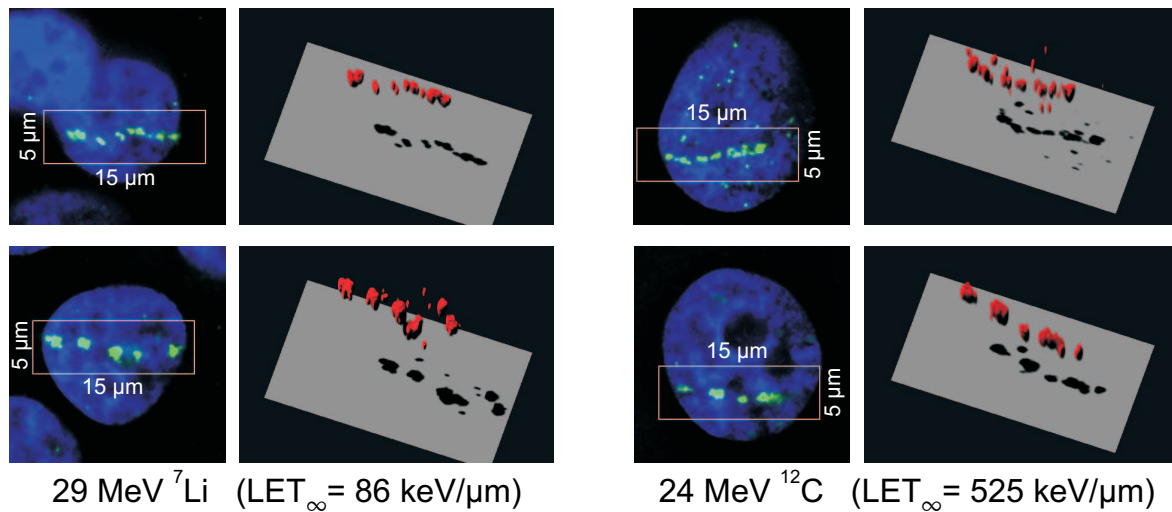
sitzt eine Kantenlänge von 1  $\mu\text{m}$ . Nach Zuordnen wenigstens einer der beiden Render-Abbildungen in einen anderen Farbkanal (hier: DAPI-Bild in blauen Kanal) können mittels Bildbearbeitung beide Abbildungen überlagert werden. Wie in Abbildung 5.9 c) gezeigt, erkennt man so die räumliche Verteilung des Reparaturproteins 53BP1 (rot) entlang der Ionenspur innerhalb des Zellkerns (blau).

Die dargestellte Bestrahlungs- und Analysetechnik eignet sich, um die Anzahl an Schädigungsereignissen entlang von Ionenspuren für unterschiedliche Strahlarten und damit verschiedene  $LET$ -Werte zu untersuchen. Darüberhinaus können die experimentellen Resultate mit den in Kapitel 2.2 präsentierten Monte-Carlo-Simulationsrechnungen (PARTRAC) [22] verglichen werden. Dort wurde die erwartete Anzahl der DNA-Doppelstrangbruch-Cluster pro  $\mu\text{m}$  Ionenspur berechnet und in Abbildung 2.9 (rechts) eingetragen. Im Experiment sollte jedem dieser Cluster ein Fluoreszenz-Fokus entsprechen.

In den durchgeführten Bestrahlungsexperimenten wurden Ionenspuren in HeLa-Zellkernen für  ${}^7\text{Li}$ - bzw.  ${}^{12}\text{C}$ -Ionen mit einer ursprünglichen Strahlenergie von 35 MeV bzw. 55 MeV untersucht. Durch die bei  $10^\circ$ -Schrägbestrahlung effektiv große Materieschicht (siehe Kap. 3.9) beim Übertritt in den Zellbehälter werden die Ionen bis zum Erreichen des Zellkerns auf 29 MeV ( ${}^7\text{Li}$ ) bzw. sogar nur 24 MeV ( ${}^{12}\text{C}$ ) abgebremst. Dies führt zu  $LET_\infty$ -Werten von 86 keV/ $\mu\text{m}$  für die  ${}^7\text{Li}$ - bzw. 525 keV/ $\mu\text{m}$  für die  ${}^{12}\text{C}$ -Bestrahlung innerhalb des Zellkerns. Die physikalische Schädigungsdichte unterscheidet sich damit um den Faktor 6,0.

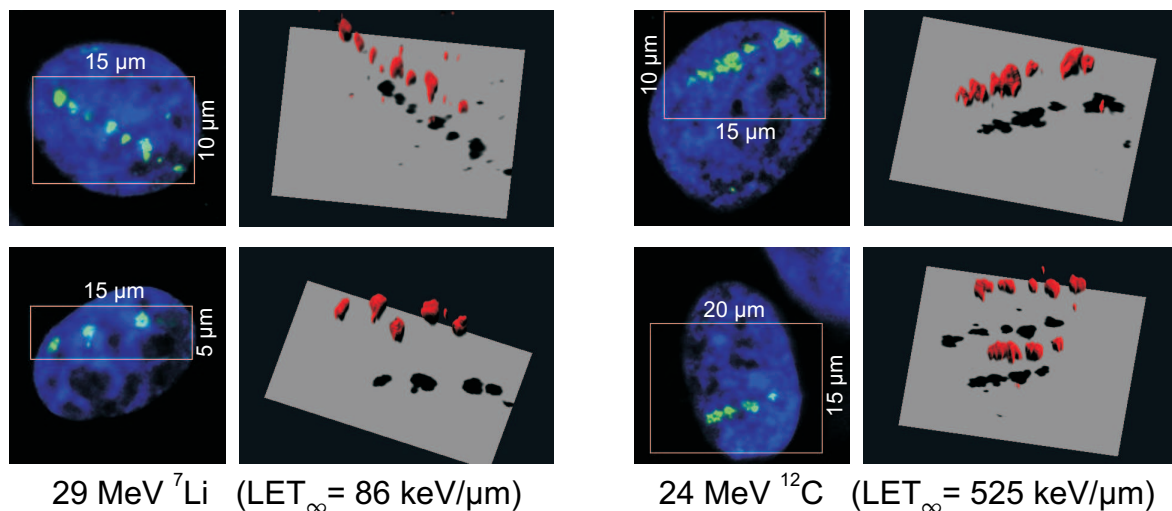
Um für diese beiden Strahlarten zu einer theoretischen Vorhersage der Foci-Anzahlen pro Spurlänge zu gelangen, werden in Abbildung 2.9 Ionen mit einem jeweils dazu ähnlichen  $LET_\infty$ -Wert betrachtet. Aus Abbildung 2.5 erkennt man, dass 29 MeV  ${}^7\text{Li}$ -Ionen denselben  $LET_\infty$ -Wert besitzen wie 5,5 MeV  ${}^4\text{He}$ -Teilchen. Die Anzahl an strahlungsinduzierten Foci sollte dementsprechend zwischen 1 und 1,5 pro  $\mu\text{m}$  Wegstrecke betragen (siehe Abb. 2.9 rechts). 24 MeV  ${}^{12}\text{C}$ -Ionen sind aufgrund ihres  $LET_\infty$ -Wertes vergleichbar mit 72 MeV  ${}^{16}\text{O}$ -Ionen. Abbildung 2.9 liefert dazu eine Focianzahl von 3 bis 4 pro  $\mu\text{m}$  der Ionenspur.

Die experimentellen Ergebnisse der durchgeführten Bestrahlungen unter  $10^\circ$ -Geometrie sind exemplarisch in den Abbildungen 5.10 bzw. 5.11 zu sehen. Abbildung 5.10 zeigt jeweils zwei Beispiel-Zellkerne, welche mit einzelnen 29 MeV  ${}^7\text{Li}$ -Ionen (links) bzw. 24 MeV  ${}^{12}\text{C}$ -Ionen (rechts) bestrahlt und nach 15 min zum 53BP1-Nachweis präpariert wurden. Jeder Zellkern ist einmal als Schnittbild (grün: 53BP1, blau: Chromatin) dargestellt. Das Signal des Reparaturproteins 53BP1 aus dem jeweils mit Längenangaben versehenen Bereich ist rechts neben dem Schnittbild in einer Render-Darstellung visualisiert. Man erkennt das generell unterschiedliche Erscheinungsbild der Ionenspu-



**Abbildung 5.10:** *53BP1-Signal einzelner Ionendurchgänge (links: 29 MeV  ${}^7\text{Li}$  bzw. rechts: 24 MeV  ${}^{12}\text{C}$ ) in HeLa-Zellkernen 15 min nach der Bestrahlung.*

ren, welches sich in einem Teil der Zellkerne als kleine Foci mit feinkörniger Struktur (oben) bzw. in anderen Zellkernen als große, möglicherweise bereits verschmolzene Foci (unten) äußert. Daraus ersieht man die Notwendigkeit, den Begriff „Fokus“ für experimentell erhaltene Proteinverteilungen sinnvoll zu definieren. Darüberhinaus ist für eine quantitativ signifikante Analyse die Auswertung einer hinreichend großen Anzahl von Zellen wichtig. Beides kann im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Stattdessen soll eine qualitative Bewertung der erhaltenen Ionenspuren und ein grober



**Abbildung 5.11:** *53BP1-Signal einzelner Ionendurchgänge (links: 29 MeV  ${}^7\text{Li}$  bzw. rechts: 24 MeV  ${}^{12}\text{C}$ ) in HeLa-Zellkernen 2 h nach der Bestrahlung. Der Zellkern rechts unten weist zwei Ionentreffer auf, von denen nur einer in der Ebene des linken Schnittbildes liegt.*

Vergleich mit den theoretischen Vorhersagen gegeben werden.

Auffallend in Abbildung 5.10 ist, dass trotz des erheblichen Unterschieds im  $LET_{\infty}$ -Wert (Faktor 6,0) kein offensichtlicher Unterschied zwischen den  ${}^7\text{Li}$ - und  ${}^{12}\text{C}$ -Spuren zu erkennen ist. Dies weist auf eine Sättigung in der Anzahl der erzeugten Foci hin. Die beobachtete Verteilung des Reparaturproteins ist vermutlich durch die Zellkernarchitektur, d.h. durch die Anordnung der 30-nm-Fasern (siehe Abb. 2.8) vorgegeben. Die Betrachtungen aus Kapitel 2.2 legen nahe, dass in den dichter ionisierenden  ${}^{12}\text{C}$ -Spuren pro Schadensort (Fokus) eine größere Anzahl einzelner DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt wird als in den  ${}^7\text{Li}$ -Spuren. Ausgedrückt durch den dort eingeführten Cluster-Faktor erwartet man  $F_{\text{Cluster}}(24 \text{ MeV } {}^{12}\text{C}) > F_{\text{Cluster}}(29 \text{ MeV } {}^7\text{Li})$ . Eventuell könnten diese beiden Faktoren durch eine quantitative Analyse der Signalstärken in den Fluoreszenzaufnahmen experimentell bestimmt werden.

Für beide Ionenarten kann man aus den in Abbildung 5.10 dargestellten Zellkernen eine mittlere Focianzahl von ca. 0,8 pro  $\mu\text{m}$  Wegstrecke abschätzen. Dieser Wert liegt insbesondere für den  ${}^{12}\text{C}$ -Strahl deutlich unter den oben genannten, erwarteten Werten von 3 bis 4 pro  $\mu\text{m}$  der Ionenspur. Eine Erklärungsmöglichkeit liegt darin, dass das Chromatin der untersuchten HeLa-Zellkerne, anders als im Modell-Zellkern der Simulationsrechnungen angenommen [18], auf höherer Organisationsebene diskrete, verdichtete Strukturen einnimmt. Der dadurch größere, mittlere Abstand zwischen diesen Strukturen könnte dann zu der experimentell beobachteten Foci-Verteilung entlang der Ionenspuren führen.

In Abbildung 5.11 sind für die gleichen Strahlarten ebenfalls bestrahlte Beispiel-Zellkerne gezeigt, die Zeitdauer zwischen Bestrahlung und 53BP1-Präparation beträgt hier jedoch 2 Stunden. Durch die längere Zeitdauer, welche die Zellen nach der Bestrahlung für eine DNA-Reparaturantwort zur Verfügung haben, wird die ursprüngliche Foci-Anordnung durch die Dynamik des biologischen Systems (siehe Kap. 5.1) verändert. Insbesondere kann von einer Zusammenlagerung ursprünglich getrennter Foci ausgegangen werden [47]. Aus den in Abbildung 5.11 gezeigten Beispielen kann eine Foci-Anzahl von ca. 0,5 pro  $\mu\text{m}$  Ionenspur abgeschätzt werden. Dieser Rückgang der Anzahl verglichen mit den Bestrahlungsproben von Abbildung 5.10 bestätigt einen Ballungsprozess der Foci.

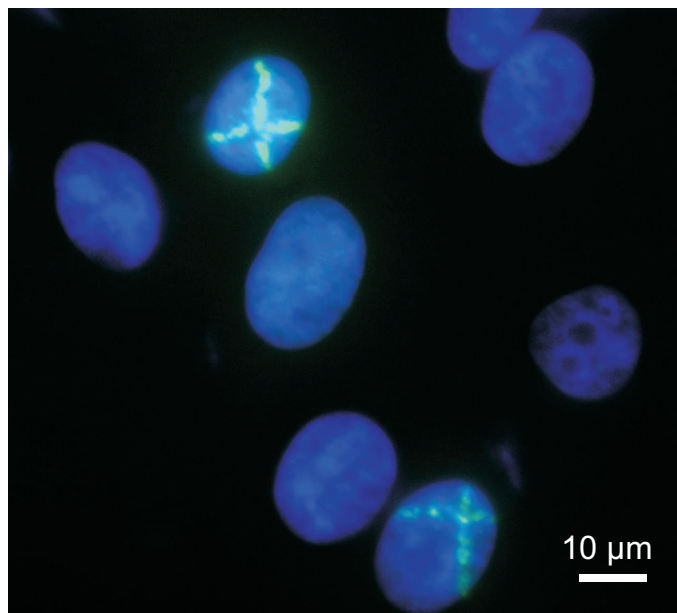
## 5.4 Gezielte Bestrahlung einzelner Zellkerne

Für die in Kapitel 5.1 und 5.2 dargestellten Experimente bzw. Auswertungen wurde die Fähigkeit des Bestrahlungsaufbaus am Rasterionenmikroskop SNAKE verwendet, einzelne Ionen mit einer Genauigkeit von ca. 0,5  $\mu\text{m}$  relativ zueinander positionieren

zu können. Die Bestrahlungen fanden jedoch ohne Rücksicht auf die Lage der Zellen statt. Für eine Reihe von Experimenten kann hingegen die gezielte Bestrahlung eines Zellkerns (z.B. Bystander-Effekte [6, 7]) bzw. bestimmter Bestandteile daraus (z.B. ausgewählter Chromosomenterritorien) wesentlich sein. Die zur Visualisierung von Zellkernen erforderliche Phasenkontrast-Technik ist im Bestrahlungsaufbau integriert (siehe Kap. 3.5).

In einem ersten Testexperiment wurde daher versucht, ausgesuchte Zellkerne gezielt mit einzelnen 55 MeV  $^{12}\text{C}$ -Ionen zu bestrahlen. Dazu wurden die Mittelpunkte der Zellkerne manuell mit den Mikrometerschrauben des Probenstisches an der Position des Ionenstrahls einjustiert. Zur eindeutigen, retrospektiven Verifizierung der Bestrahlung wurden mit Hilfe der Scaneinheit mehrere Iontentreffer in kreuzförmiger Anordnung appliziert. Der ausgewählte Zellkernmittelpunkt sollte im Zentrum dieses Kreuzes liegen. Das Ergebnis des durchgeführten Experiments ist in Abbildung 5.12 ersichtlich. Man erkennt zwei Zellkerne (oberer bzw. unterer Bildrand), welche ein von der Bestrahlung verursachtes  $\gamma$ -H2AX-Signal (Farbstoff: FITC) für vorhandene DNA-Doppelstrangbrüche aufweisen. Die Zeitdauer zwischen Bestrahlung und Fixierung der Zellen betrug ca. 45 min.

Aus diesem ersten Test lässt sich eine absolute Bestrahlungsgenauigkeit von besser als  $5\ \mu\text{m}$  ableiten. Die bestehende Limitierung ist einerseits in der Verwendung eines



**Abbildung 5.12:** Gezielte Bestrahlung zweier HeLa-Zellkerne mit 55 MeV  $^{12}\text{C}$ -Ionen. Die Kreuze wurden jeweils auf den Zellkern-Mittelpunkt einjustiert. (blau: Zellkerne, grün:  $\gamma$ -H2AX)

nur schwachvergrößernden (10 fach) Objektivs bei der Einjustierung der Zellkerne zu suchen. Andererseits wird bei der manuellen Probenpositionierung nur eine begrenzte Genauigkeit erreicht. Beide Einschränkungen können zukünftig behoben werden. Die mechanische Stabilität des Aufbaus sowie die Stabilität der Lage des Ionenstrahls, welche in gleicher Weise die Bestrahlungsgenauigkeit von regelmäßigen Mustern (siehe Abb. 3.12) beeinflussen, erlauben eine absolute Bestrahlungsgenauigkeit von deutlich besser als  $1\ \mu\text{m}$ .



# Kapitel 6

## Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein an das Rasterionenmikroskop SNAKE angepasster Bestrahlungsaufbau realisiert werden. Damit sind Bestrahlungen von Proben unter Atmosphärendruck bei einer Auflösung von besser als  $1\ \mu\text{m}$  mit einzelnen Ionen möglich. Für die Bestrahlung lebender Zellen wurden geeignete Probenbehälter entwickelt und in mehreren Experimenten eingesetzt. Mittels Immunofluoreszenz-Methoden und optischer Mikroskopie wurden dabei Proteine untersucht, die an der Reparatur von erzeugten DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind. Zudem ist durch eine Änderung der Bestrahlungsgeometrie eine Bestrahlung unter flachen Winkeln zum Wachstumssubstrat der Zellen möglich. So konnte als ein Schwerpunkt dieser Arbeit eine Untersuchung der Schädigungsstruktur in HeLa-Zellkernen entlang der Spuren von hochenergetischen Ionen begonnen werden. Dabei sind beim Vergleich mit theoretischen Vorhersagen für einen modellierten Zellkern signifikante Unterschiede aufgetreten. Insbesondere ist bei den bisher verwendeten Strahlarten durch die hohen *LET*-Werte eine Sättigung der Schädigungsstruktur beobachtet worden, welche wahrscheinlich die tatsächliche Zellkernarchitektur der HeLa-Zellen widerspiegelt. Hier sollten die Untersuchungen auf leichtere Ionen mit niedrigerem *LET*-Wert ausgedehnt werden. Es ist zu erwarten, dass dann eine Schädigungsstruktur mit weniger Foci pro Einheit der Spurlänge entsteht, wobei die Foci-Anzahl mit dem *LET*-Wert skalieren sollte. Diese Experimente könnten einen hilfreichen Einblick sowohl in die räumliche Organisation des Chromatins als auch in deren Bedeutung bei der Erzeugung von DNA-Strahlenschäden geben. Bezüglich der Schadensdichte entlang von Ionenspuren wäre die Einführung eines speziellen *RBE*-Wertes denkbar, welcher direkt die Anzahl der DSB-Cluster und damit die Anzahl beobachtbarer Foci pro Spurlänge beschreibt. Für das breite Spektrum an Ionenstrahlen des Münchener Tandembeschleunigers, welches vor allem im Bereich leichter Ionen das Übergangsgebiet zwischen locker und dicht ionisierender Strahlung abdeckt, könnten die jeweiligen *RBE*-Werte experimentell ermittelt werden. Darüber-

hinaus würde sich hier ein Vergleich zur Überlebensrate d.h. Koloniebildungsfähigkeit der bestrahlten Zellen anbieten. So könnte geklärt werden, welcher Zusammenhang zwischen der Anzahl von erzeugten DNA-Schadens-Foci und dem Effekt der Zellinaktivierung besteht.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Bestrahlungsaufbaus wurden weitere Experimente durchgeführt und im Rahmen zweier Diplomarbeiten ausgewertet. Insbesondere dabei zeigten sich methodische sowie apparative Verbesserungsmöglichkeiten. Eine bedeutende Einschränkung stellt die bisherige Vorgehensweise dar, bei welcher die Fluoreszenzuntersuchung nur an fixierten Zellen stattfindet, die nach der Bestrahlung in vielen Arbeitsschritten präpariert werden müssen. Durch die Fixierung der Zellen wird dabei eine Momentaufnahme festgehalten, das Studium von dynamischen Zellvorgängen ist nur mit Hilfe vieler Bestrahlungsproben möglich. Durch die bisher fehlende Proben temperierung auf 37°C am Bestrahlungsplatz wird zudem für kurze Zeitdauern bis zur Fixierung die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse in Frage gestellt. Eine Untersuchung sehr schneller Prozesse (< 5 min) nach der Bestrahlung ist aufgrund der momentanen Trennung von Bestrahlungs- und Beobachtungsvorgang überhaupt nicht durchführbar. Diese Probleme können beseitigt werden, wenn die Fluoreszenzuntersuchung an lebenden Zellen durchgeführt wird. Dazu müssen gentechnisch veränderte Zellen verwendet werden, welche die zu untersuchenden Proteine bereits bei deren Synthese mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren (z.B. mit GFP = „green fluorescent protein“). Die dazu notwendigen biochemischen Methoden sollen von den beteiligten Arbeitsgruppen der LMU-München vor Ort etabliert und den Bestrahlungsexperimenten zugänglich gemacht werden. Zur Durchführung der Experimente muss darüberhinaus der Bestrahlungsaufbau mit einem hochwertigen Fluoreszenzmikroskop kombiniert und eine zellkompatible Umgebung mit entsprechender Temperierung geschaffen werden. Letztgenannte Aufgabe ist Gegenstand einer aktuellen Doktorarbeit. Die genannten Verbesserungen erlauben dann lückenlose Zeitreihen-Studien an den jeweils selben Zellen. Durch die gleichbleibenden Randbedingungen wird dann die quantitative Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen wesentlich erleichtert.

Für zukünftige Studien, bei denen Zellen bzw. Zellkerne gezielt mit einer definierten Anzahl von Iontentreffern bestrahlt werden sollen, reicht das bisher praktizierte Bestrahlen mit regelmäßigen Mustern nicht mehr aus. Die Zellen müssen dazu individuell bestrahlt werden. Um dabei eine ausreichende Statistik bei der quantitativen Auswertung zu erhalten, muss die Anzahl bestrahlter Zellen bzw. Zellkerne hinreichend groß sein. Das Auffinden dieser in der Probe sowie das Ausrichten des Ionenstrahls sollten dann automatisiert erfolgen. Durch Bilderkennung und automatische Ansteuerung von Probenpositionierung bzw. Strahlableitung ist von anderen Gruppen bereits eine Rate

von mehreren tausend, gezielt bestrahlten Zellen pro Sekunde erreicht worden.

Bei den bisherigen Bestrahlungsexperimenten wurden aus Gründen der Praktikabilität stets HeLa-(Tumor)Zellen untersucht, deren Zellteilungsprogramm verglichen mit gesunden Zellen außer Kontrolle geraten ist. Um für die Zellantwort nach Einfluss ionisierender Strahlung Aussagen machen zu können, welche für genetisch intakte Organismen relevant sind, sollten in den Experimenten auch primäre humane Zellen etabliert werden. Ein noch wesentlich größerer Schritt würde in Bestrahlungsexperimenten an kompletten Gewebeproben bestehen. Damit könnte man das vereinfachte Modellsystem einzelner, isolierter Zellen verlassen und die in einem gesamten Organismus stattfindenden Wechselwirkungen zwischen den Zellen mit einbeziehen.



# Literaturverzeichnis

- [1] M. Folkard, B. Vojnovic, K.M. Prise, A.G. Bowey, R.J. Locke, G. Schettino, B.D. Michael, *Int. J. Radiat. Biol.* **72** (1997) 375.
- [2] M. Folkard, B. Vojnovic, K.J. Hollis, A.G. Bowey, S.J. Watts, G. Schettino, K.M. Prise, B.D. Michael, *Int. J. Radiat. Biol.* **72** (1997) 387.
- [3] G. Randers-Pehrson, C.R. Geard, G. Johnson, C.D. Elliston, D.J. Brenner, *Radiat. Res.* **156** (2001) 210.
- [4] K.D. Greif, *Mikro-Ionenstrahl-Apparatur zur Exposition lebender Zellen*, Doktorarbeit, Georg-August-Universität zu Göttingen, 2002.
- [5] M.C. Heiß, *Entwicklung und Erprobung eines Aufbaus zur gezielten Bestrahlung einzelner biologischer Zellen an der Schwerionen-Mikrosonde der GSI*, Doktorarbeit, Technische Universität Darmstadt, 2004.
- [6] K.M. Prise, O.V. Belyakov, M. Folkard, B.D. Michael, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 793.
- [7] C. Mothersill, C. Seymour, *Mut. Res.* **568** (2004) 121.
- [8] G.J. Feldman, R.D. Cousins, *Phys. Rev. D* **57** (1998) 3873.
- [9] I.N. Bronstein, K.A. Semendjajew, G. Musiol, H. Mühlig, *Taschenbuch der Mathematik*, Verlag Harri Deutsch, 1993.
- [10] L. Tartier, C. Spenlehauer, H.C. Newmanand, M. Folkard, K.M. Prise, B.D. Michael, J. Menissier de Murcia, Gilbert de Murcia, *Mutagenesis* **18** (2003) 411.
- [11] J.F. Ziegler, J.P. Biersack, [www.srim.org](http://www.srim.org).
- [12] IAEA (International Atomic Energy Agency), TECDOC-799, Atomic and molecular data for radiotherapy and radiation research, Seite 440, [www.iaea.org](http://www.iaea.org).

- [13] ESTAR, (stopping–power and range tables for electrons), National Institute of Standards and Technology, physics.nist.gov.
- [14] A.A. Friedl, A. Kraxenberger, F. Eckardt-Schupp, *Electrophoresis* **16** (1995) 1865.
- [15] F. Kraxenberger, K.J. Weber, A.A. Friedl, F. Eckardt-Schupp, M. Flentje, P. Quicken, A.M. Kellerer, *Radiat Environ Biophys* **37** (1998) 107.
- [16] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, 1995.
- [17] W. Friedland, P. Jacob, H.G. Paretzke, T. Stork, *Radiat. Res.* **150** (1998) 170.
- [18] W. Friedland, P. Jacob, P. Bernhardt, H.G. Paretzke, M. Dingfelder, *Radiat. Res.* **159** (2003) 401.
- [19] W. Friedland, P. Jacob, H.G. Paretzke, M. Merzagora, A. Ottolenghi, *Radiat Environ Biophys* **38** (1999) 39.
- [20] P. Bernhardt, *Strukturierte Targets in der Modellierung von strahlungsinduzierten DNS Schäden*, Doktorarbeit, Fakultät für Physik, TU München, 2002.
- [21] A.A. Friedl, P. Quicken, A.M. Kellerer, Analyse räumlich korrelierter DNA–Schäden zur Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit dicht–ionisierender Strahlung, Abschlussbericht, St.Sch.4153, Bundesamt für Strahlenschutz.
- [22] W. Friedland, persönliche Mitteilung.
- [23] A. Chatterjee, H.J. Schaefer, *Radiat Environ Biophys* **13** (1976) 215.
- [24] M. Krämer, *Nucl. Instr. and Meth. B* **105** (1995) 14.
- [25] J. Kiefer, *Biologische Strahlenwirkung*, 2. Auflage, Birkhäuser Verlag, 1989.
- [26] J. Chen, A.M. Kellerer, H.H. Rossi, *Radiat Environ Biophys* **33** (1994) 181.
- [27] G. Hinderer, G. Dollinger, G. Datzmann, H.-J. Körner, *Nucl. Instr. and Meth. B* **130** (1997) 51.
- [28] G. Datzmann, *Aufbau und Charakterisierung des Hochenergie–Rasterionenmikroskops SNAKE*, Doktorarbeit, Fakultät für Physik, TU München, 2002.
- [29] G. Dollinger, *Kohlenstofffolien als Stripper für schwere Ionen*, Doktorarbeit, Fakultät für Physik, TU München, 1990.

- [30] K. Shima, N. Kuno, M. Yamanouchi, H. Tawara, Atomic Data and Nuclear Data Tables **51** (1992) 173.
- [31] O. Schmelmer, G. Dollinger, G. Datzmann, C. Goeden, H.-J. Körner, Nucl. Instr. and Meth. B **158** (1999) 107.
- [32] O. Schmelmer, *Ein Rasterionenmikroskop für hochenergetische Ionen*, Doktorarbeit, Fakultät für Physik, TU München, 2001.
- [33] P. Reichart, *Dreidimensionale Wasserstoffmikroskopie mittels Proton-Proton-Streuung*, Doktorarbeit, Fakultät für Physik, TU München, 2004.
- [34] D.C. Carey, K.L. Brown, F. Rothacker, Third-Order Transport, A Computer Program for Designing Charged Particle Beam Transport Systems, SLAC-R-95-462, Fermilab-Pub-95/UC-414.
- [35] G. Datzmann, persönliche Mitteilung.
- [36] P. Hartung, persönliche Mitteilung.
- [37] W. Posselt, *Aufbau eines Nachchoppers am Garching Tandembeschleuniger*, Diplomarbeit, Fakultät für Physik, TU München, 1984.
- [38] R. Lutter, G. Datzmann, P. Reichart.
- [39] V. Hable, *Untersuchung der Dynamik von DNA-Reparaturproteinen nach Bestrahlung lebender Zellen am Rasterionenmikroskop SNAKE*, Diplomarbeit, Fakultät für Physik, TU München, 2004.
- [40] A.A. Friedl, persönliche Mitteilung.
- [41] G.A. Drexler, persönliche Mitteilung.
- [42] Gehrckens, [www.gehrckens.de](http://www.gehrckens.de).
- [43] F. Zernike, Science Magazine **121** (1955) 345.
- [44] P. Sigmund, K.B. Winterbon, Nucl. Instr. and Meth. **119** (1974) 541.
- [45] C. Trautmann, persönliche Mitteilung.
- [46] E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner, J. Cell Biol. **146** (1999) 905.
- [47] J.A. Aten, J. Stap, P.M. Krawczyk, C.H. van Oven, R.A. Hoebe, J. Essers, R. Kanaar, Science Magazine **303** (2004) 92.

- [48] T.A. Mochan, M. Venere, R.A. DiTullio Jr., T.D. Halazonetis, *DNA Repair* **3** (2004) 945.
- [49] C.T. Carson, R.A. Schwartz, T.H. Stracker, C.E. Lilley, D.V. Lee, M.D. Weitzman, *EMBO J.* **22** (2003) 6610.
- [50] M.R. Lieber, Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (2003) 712.
- [51] R.D. Johnson, M. Jasin, *EMBO J.* **19** (2000) 3398.
- [52] K. Rothkamm, I. Krüger, L.H. Thompson, M. Löbrich, *Mol Cell Biol* **23** (2003) 5706.
- [53] K.K. Khanna, S.P. Jackson, *Nat Genet* **27** (2001) 247.
- [54] D. Ristic, M. Modesti, R. Kanaar, C. Wyman, *Nucleic Acids Res.* **31** (2003) 5229.
- [55] Ensembl Genome Browser, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).
- [56] R.T. Abraham, *Nat Cell Biol* **4** (2002).
- [57] T.A. Mochan, M. Venere, R.A. DiTullio Jr., T.D. Halazonetis, *Cancer Res.* **63** (2003) 8586.
- [58] C. Lukas, F. Melander, M. Stucki, J. Falck, S. Bekker-Jensen, M. Goldberg, Y. Lerenthal, S.P. Jackson, J. Bartek, J. Lukas, *EMBO J.* **23** (2004) 2674.
- [59] S. Tashiro, J. Walter, A. Shinohara, N. Kamada, T. Cremer, *J. Cell Biol.* **150** (2000) 283.
- [60] D.S. Shin, L. Pellegrini, D.S. Daniels, B. Yelent, L. Craig, D. Bates, D.S. Yu, M.K. Shivji, C. Hitomi, A.S. Arvai, N. Volkmann, H. Tsuruta, T.L. Blundell, A.R. Venkitaraman, J.A. Tainer, *EMBO J.* **22** (2003) 4566.
- [61] ATTO-TEC GmbH, [www.atto-tec.de](http://www.atto-tec.de).
- [62] A. Hauptner, S. Dietzel, G.A. Drexler, P. Reichart, R. Krücken, T. Cremer, A.A. Friedl, G. Dollinger, *Radiat Environ Biophys* **42** (2004) 237.
- [63] dianova, [www.dianova.de](http://www.dianova.de).
- [64] H. Haken, H.C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*, 4.Auflage, Springer Verlag, 2003.



- [65] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch, H. Heinz, Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Broschüre, Carl Zeiss Jena GmbH.
- [66] Scientific Volume Imaging, [www.svi.nl](http://www.svi.nl).
- [67] V. Hable, G. Dollinger, C. Greubel, A. Hauptner, R. Krücken, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, R. Löwe, Nucl. Instr. and Meth. B (2005).
- [68] T. Cremer, C. Cremer, Nat. Gen. **2** (2001) 292.
- [69] C. Greubel, *Dynamik der Verteilung von DNA-Reparaturfaktoren in lebenden Zellen nach fraktionierter Bestrahlung am Rasterionenmikroskop SNAKE*, Diplomarbeit, Fakultät für Physik, TU München, 2005.
- [70] B. Jakob, M. Scholz, G. Taucher-Scholz, Radiat. Res. **159** (2003) 676.



# Publikationsliste

1. DER 0°-SPEKTROGRAPH AM RASTER-IONENMIKROSKOP SNAKE  
**A. Hauptner**, Diplomarbeit, TU München, 1999.
2. PARTICLE-INDUCED X-RAY EMISSION USING HIGH ENERGY IONS WITH RESPECT TO MICROPROBE APPLICATION  
O. Schmelmer, G. Dollinger, G. Datzmann, **A. Hauptner**, H.-J. Körner, P. Maier-Komor, P. Reichart, Nucl. Instr. and Meth. B **179** (2001) 469.
3. THE MUNICH MICROPROBE SNAKE: FIRST RESULTS USING 20 MEV PROTONS AND 90 MEV SULFUR IONS  
G. Datzmann, G. Dollinger, C. Goeden, **A. Hauptner**, H.-J. Körner, P. Reichart, O. Schmelmer, Nucl. Instr. and Meth. B **181** (2001) 20.
4. DESIGN OF THE MUNICH MICROPROBE FACILITY FOR SINGLE ION IRRADIATION OF CELLS  
**A. Hauptner**, G. Datzmann, G. Dollinger, H.-J. Körner, P. Reichart, O. Schmelmer, Radiation Research **158** (2002) 376.
5. SENSITIVE 3D HYDROGEN MICROSCOPY BY PROTON PROTON SCATTERING  
P. Reichart, G. Dollinger, A. Bergmaier, G. Datzmann, **A. Hauptner**, H.-J. Körner, Nucl. Instr. and Meth. B **197** (2002) 134.
6. THREE-DIMENSIONAL HYDROGEN MICROSCOPY USING A HIGH-ENERGY PROTON PROBE  
G. Dollinger, P. Reichart, G. Datzmann, **A. Hauptner**, H.-J. Körner, Appl. Phys. Lett. **82** (2003) 148.
7. THE MUNICH ION MICROPROBE: CHARACTERISTICS AND PROSPECT  
G. Dollinger, G. Datzmann, **A. Hauptner**, R. Hertenberger, H.-J. Körner, P. Reichart, B. Volckaerts, Nucl. Instr. and Meth. B **210** (2003) 6.

8. SENSITIVE 3D HYDROGEN MICROSCOPY USING HIGH ENERGY PROTONS AT SNAKE  
P. Reichart, G. Dollinger, G. Datzmann, **A. Hauptner**, R. Hertenberger, H.-J. Körner, Nucl. Instr. and Meth. B **210** (2003) 135.
9. MICROIRRADIATION OF CELLS WITH ENERGETIC HEAVY IONS  
**A. Hauptner**, S. Dietzel, G. A. Drexler, P. Reichart, R. Krücken, T. Cremer, A. A. Friedl, G. Dollinger, Radiat. Environ. Biophys. **42** (2004) 237.
10. THE MUNICH MICROPROBE SETUP FOR SINGLE-ION IRRADIATION OF CELLS  
**A. Hauptner**, G. Dollinger, G. Datzmann, H.-J. Körner, R. Krücken, P. Reichart, Radiation Research **161** (2004) 98.
11. 3D HYDROGEN MICROSCOPY WITH SUB-PPM DETECTION LIMIT  
P. Reichart, G. Dollinger, A. Bergmaier, G. Datzmann, **A. Hauptner**, H.-J. Körner, R. Krücken, Nucl. Instr. and Meth. B **219–220** (2004) 980.
12. THREE-DIMENSIONAL HYDROGEN MICROSCOPY IN DIAMOND  
P. Reichart, G. Datzmann, **A. Hauptner**, R. Hertenberger, C. Wild, G. Dollinger, Science **306** (2004) 1537.
13. MICROIRRADIATION OF CELLS WITH ENERGETIC HEAVY IONS  
G. Dollinger, V. Hable, **A. Hauptner**, R. Krücken, P. Reichart, A.A. Friedl, G. Drexler, T. Cremer, S. Dietzel, Nucl. Instr. and Meth. B **231** (2005) 195.
14. METHODS FOR QUANTITATIVE EVALUATION OF DYNAMICS OF REPAIR PROTEINS WITHIN IRRADIATED CELLS  
V. Hable, G. Dollinger, C. Greubel, **A. Hauptner**, R. Krücken, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, R. Löwe, Nucl. Instr. and Meth. B (2006) in press.
15. IRRADIATION OF LIVING CELLS WITH SINGLE IONS AT THE ION MICROPROBE SNAKE  
**A. Hauptner**, T. Cremer, M. Deutsch, S. Dietzel, G.A. Drexler, C. Greubel, V. Hable, R. Krücken, R. Löwe, H. Strickfaden, G. Dollinger and A.A. Friedl, Acta Phys. Pol. A (2006) accepted for publication.

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich dem Leiter des Instituts E12 Herrn Prof. R. Krücken herzlich für das große Interesse danken, das er dem Projekt der Zellbestrahlung entgegengebracht hat. Seine Unterstützung hat die erfolgreiche Durchführung der Zellbestrahlungsexperimente ermöglicht und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. G. Dollinger für die langjährige Betreuung seit Beginn meiner Diplomarbeit. Als „Urheber“ der Ionenmikrosonde SNAKE hat er auch das Projekt der Zellbestrahlung ins Leben gerufen. Seine Ideen und wissenschaftlichen Beiträge haben die Experimente stets bereichert und zu neuen Erkenntnissen geführt.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei meinen SNAKE-Kollegen V. Hable und C. Greubel für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Bestrahlungsexperimenten. In zahlreichen Strahlzeiten konnten gemeinsam mit ihnen viele Daten gewonnen werden. Durch ihre aufwändigen, quantitativen Auswertungen haben sie außerdem wesentlich dazu beigetragen, aus „lustigen“ Zellbestrahlungen „echte“ Wissenschaft zu machen. Gedankt sei auch den ehemaligen SNAKE-Mitstreitern Dr. P. Reichart, Dr. G. Datzmann und Dr. O. Schmelmer für die langjährige, gute Zusammenarbeit.

Großer Dank für ihren Einsatz gilt den Kollaborateuren aus der Biologie, insbesondere Frau Dr. A. Friedl und Herrn Dr. G. Drexler. Nur durch die Zusammenarbeit mit ihnen war eine erfolgreiche Durchführung der Zellbestrahlungen möglich. Dabei haben sie sich weder vom Tag- und Nacht-Strahlzeit- bzw. Mikroskopierbetrieb noch von der Experimentdurchführung zusammen mit Physikern abschrecken lassen. Für weitere Unterstützung möchte ich mich bei I. Baur, R. Löwe, M. Deutsch, H. Strickfaden, Dr. S. Dietzel und Prof. T. Cremer bedanken. Für die reibungslose, gemeinsame Nutzung des Zelllabors danke ich insbesondere den Herren Dr. W. Assmann und M. Schubert.

Herrn Dr. W. Friedland danke ich herzlich für die Bereitstellung von PARTRAC-Simulationsdaten. Diese haben das 2. Kapitel dieser Arbeit über Strahlenschädigung sehr bereichert. Frau Dr. C. Trautmann möchte ich für die Überlassung von Makrofol-Kernspurdetektoren und des dazu notwendigen Ätzrezepts danken.

Weiterer Dank gilt den Mitgliedern der ERD-Gruppe. Vor allem mit Herrn Dr. A. Bergmaier konnte ich viele interessante Diskussionen führen, die glücklicherweise nicht immer physikalische Themen zum Inhalt hatten. Großes Lob gebührt ihm außerdem für den leckeren Kaffee, den er regelmäßig zubereitet hat. Gedankt sei auch den ehemaligen ERD-Mitarbeitern Dr. L. Görgens und Dr. P. Neumaier, meinem langjährigen Zimmerkollegen. In jüngster Zeit haben mich vor allem die beiden ERD-Knaben T. Lauf und M. Huber am Mittagstisch erheitert. Kurzweilige wie auch lehrreiche Unterhaltungen waren stets mit den Betreibern des benachbarten GAMS-Experiments Dr. K. Knie, Dr. G. Korschinek und Dr. G. Rugel sowie mit Herrn „Projektleiter“ Dr. F. Grüner möglich.

Herzlicher Dank für die tatkräftige Unterstützung gilt auch allen E12-Mitarbeitern, insbesondere den Herren R. Lang und M. Klöckner aus der E12-Werkstatt, sowie Frau S. Winkler für die Entwicklungsarbeit zur Herstellung der mikrostrukturierten Folien und Frau K. Nacke für die Mithilfe bei deren Serienproduktion. Gedankt sei außerdem Herrn L. Maier für die freundliche Hilfe beim Posterdrucken. Die Zentralwerkstatt unter Leitung der Herren M. Pfaller und M. Reither hat sich durch die präzise und schnelle Fertigung vieler Zellbehälter verdient gemacht.

Große Anerkennung gebührt Herrn S. Koschartz für die eigenständige Ausführung vieler Tätigkeiten an SNAKE sowie für das Bespannen unzähliger Zellbehälter. Nicht umsonst ist er wegen seiner Sorge um SNAKE schon mehrfach als dessen eigentliches Oberhaupt bezeichnet worden.

Darüberhinaus sei auch allen anderen Mitarbeitern des Tandembeschleunigers für die Bereitstellung unterschiedlichster Ionen-Strahlen herzlichst gedankt, insbesondere den Herren W. Carli und H. Welzenbach für ihr Interesse am SNAKE-Projekt. Für die Konstruktion von Teilen für den Bestrahlungsaufbau möchte ich mich bei Herrn P. Hartung herzlich bedanken. F. Haftlmeier und G. Obermaier aus der Beschleuniger-Werkstatt haben durch das Anfertigen von mechanischen Teilen ebenfalls zum Erfolg des Bestrahlungs-Projekts beigetragen. Herr R. Lutter war stets hilfsbereit bei der Lösung von Scan- und Rechnerproblemen.

Allen anderen Mitarbeitern und Kollegen sei für die kleinen und großen Dinge des Alltags ebenfalls gedankt.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für die große Unterstützung danken, die sie mir während des Studiums und der Promotionszeit entgegengebracht haben.