

Dynamik der Verteilung von  
DNA-Reparaturfaktoren in lebenden Zellen  
nach fraktionierter Bestrahlung am  
Rasterionenmikroskop SNAKE

Diplomarbeit  
von  
Christoph Greubel

Physik Department E12  
Technische Universität München

September 2005



# Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die molekularbiologische Zellantwort auf bestrahlungsinduzierte Doppelstrangbrüche nach zweifach fraktionierten Ionenbestrahlung studiert. Für eine systematische Untersuchung wurde die markierende Bestrahlung mit sub-Mikrometer Auflösung am Rasterionenmikroskop SNAKE optimiert und verwendet. Damit ist es möglich, die beiden Bestrahlungsfraktionen retrospektiv zu unterscheiden und mit Hilfe von Immunofluoreszenztechnik die jeweiligen Zellantworten zu untersuchen. Zur Charakterisierung der Proteinverteilungen werden die Aufnahmen aus Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe eines neuentwickelten Algorithmus quantitativ ausgewertet.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Analyse der Verteilung des Proteins 53BP1 und des bei fraktionierter Bestrahlung auftretenden Konkurrenzeffekts. Bei Bestrahlung mit 100 MeV Sauerstoffionen und einer applizierten Energiedosis von jeweils etwa 15 Gy pro Fraktion konnte eine anfängliche Zunahme des Konkurrenzeffekts mit der Zeitspanne  $\Delta t$  zwischen den Bestrahlungen beobachtet werden. Dabei wurde die Proteinverteilung jeweils 30 *min* nach der zweiten Bestrahlung betrachtet. Das Maximum des Effekts ist bei einem Abstand der Bestrahlungen von  $\Delta t = 50 \text{ min}$  erreicht. Das Verhältnis  $\Xi_{53BP1}$  der Proteinmenge an den Schäden der Zweitbestrahlung zur Proteinmenge an den Schäden der Erstbestrahlung beträgt dort weniger als ein Fünftel ( $\Xi_{53BP1} = 0,179 \pm 0,025$ ). Mit zunehmendem  $\Delta t$  nimmt der Effekt wieder ab. Bei  $\Delta t = 4 \text{ h}$  beträgt das Proteinmengenverhältnis noch  $\Xi_{53BP1} = 0,44 \pm 0,06$ . In einem Energiedosisbereich von 10 Gy bis 17 Gy konnte keine Dosisabhängigkeit des Konkurrenzeffekts festgestellt werden.

Zusätzlich wurde der Einfluss einer solchen fraktionierten Bestrahlung auf das Signal des Doppelstrangbruchmarkers  $\gamma$ -H2AX und damit auf die Menge der phosphorylierten H2AX-Histone untersucht. Zur Bestrahlung wurden ebenfalls 100 MeV Sauerstoffionen und 55 MeV Kohlenstoffionen verwendet, wodurch eine Energiedosis zwischen 10 Gy und 17 Gy appliziert wurde. Mit zunehmendem Zeitabstand der Bestrahlungen nimmt die  $\gamma$ -H2AX-Menge an den Schäden der Erstbestrahlung im Vergleich zur Zweitbestrahlung ab. Bei einem Bestrahlungsabstand von  $\Delta t = 4 \text{ h}$  ist um die Schäden der Zweitbestrahlung etwa 50% mehr  $\gamma$ -H2AX vorhanden, als an den Schäden der

Erstbestrahlung. Das  $\gamma$ -H2AX-Verhältnis von Zweit- zu Erstbestrahlung beträgt für 100 MeV Sauerstoffionen  $\Xi_{\gamma-H2AX} = 1,36 \pm 0,15$  und für die verwendeten Kohlenstoffionen  $\Xi_{\gamma-H2AX} = 1,65 \pm 0,29$ . Eine Dosisabhängigkeit in dem Bereich zwischen 10 Gy und 17 Gy konnte nicht festgestellt werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>iii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Biologische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1 DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung . . . . .	3
2.2 Hier untersuchte Reparaturfaktoren . . . . .	5
2.2.1 $\gamma$ -H2AX . . . . .	5
2.2.2 53BP1 . . . . .	6
<b>3 Zellbestrahlungsexperimente an SNAKE</b>	<b>7</b>
3.1 Rasterionenmikroskop SNAKE . . . . .	7
3.1.1 Aufbau von SNAKE . . . . .	7
3.1.2 Adaption von SNAKE zur Bestrahlung lebender Zellen . . . . .	8
3.2 Probenpräparation . . . . .	10
3.3 Mikroskopie . . . . .	11
<b>4 Konkurrenzeffekte in der Proteinanlagerung an DNA-Schäden</b>	<b>15</b>
4.1 Wechselwirkung zwischen DNA-Reparaturvorgängen . . . . .	15
4.2 Experiment . . . . .	16
4.3 Qualitative Beobachtungen . . . . .	18
<b>5 Quantifizierung des Konkurrenzeffektes</b>	<b>21</b>
5.1 Konkurrenzparameter $\zeta$ eines Zellkerns . . . . .	21
5.1.1 Optimierung des Bestrahlungsmusters . . . . .	23
5.1.2 Entfaltung der Mikroskopaufnahmen . . . . .	24
5.1.3 Verbesserung der Statistik . . . . .	24
5.1.4 Abgrenzung von Untergrund, Erst- und Zweitbestrahlung und Bestimmung der Linienintensitäten . . . . .	30
5.2 Konkurrenzparameter $Z$ einer Probe . . . . .	32

---

5.3	Abschätzung der applizierten Energiedosis in einer Zelle . . . . .	33
<b>6</b>	<b>Durchgeführte Messungen</b>	<b>35</b>
6.1	Die Zeitparameter $\Delta t$ und $t_I$ im Experiment . . . . .	35
6.2	53BP1 . . . . .	37
6.2.1	Abhängigkeit des Konkurrenzparameters von der Zeitdauer zwischen Erst- und Zweitbestrahlung $\Delta t$ . . . . .	37
6.2.2	Abhängigkeit der Konkurrenz von der Dosis der beiden Bestrahlung	40
6.3	$\gamma$ -H2AX . . . . .	44
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>49</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>53</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Die Zellantwort auf ionisierende Strahlung stellt eine aktuelle Frage der modernen Molekularbiologie dar. Besonderes Augenmerk gilt hierbei dem Zellkern, der hierin befindlichen DNA sowie der Behandlung von erzeugten DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese sind eine ernsthafte Bedrohung für das Erbgut und damit den Fortbestand der Zelle. Im ungünstigsten Fall ist sogar der Fortbestand des gesamten Organismus in Gefahr, falls Mutationen auftreten, die zur unkontrollierten Zellteilung und damit zu Krebserkrankungen führen.

Zur Bekämpfung von soliden Tumoren, v.a. wenn sich diese in der Nähe von sensiblen Organen befinden und sich deswegen eine operative Entfernung verbietet, kann die zelltötende Wirkung von ionisierender Strahlung hingegen therapeutisch eingesetzt werden. Je nach verwendeter Strahlungsart kann zwar das umliegende, gesunde Gewebe unterschiedlich gut geschont werden, eine erhebliche Strahlenbelastung ist jedoch nicht zu vermeiden. Eine fraktionierte Bestrahlung, d.h. eine Aufteilung der Dosisapplikation auf mehrere Sitzungen im Abstand weniger Tage, ermöglicht eine Regeneration des weniger bestrahlten, gesunden Gewebes, das zudem oftmals weniger sensibel auf ionisierende Strahlung reagiert. Das Ziel der Strahlentherapie ist immer die ausnahmslose Abtötung aller Zellen im Bereich des Tumors.

Der Einfluss einer fraktionierten Bestrahlung auf die Zellantwort und die hierdurch eingeleitete DNA-Reparatur, sowie die Wechselwirkung dieser Prozesse kann auf molekularbiologischer Ebene mit Hilfe der Immunofluoreszenztechnik studiert werden. Diese Markierungsmethode erlaubt es, an DNA-Reparatur beteiligte Proteine zu identifizieren, sowie deren Aufgaben und gegenseitige Abhängigkeit zu untersuchen. Allerdings ist eine einfache, stochastische Bestrahlung mit einer Alpha- oder Gammaquelle in diesem Fall nicht mehr ausreichend, da dieses Vorgehen keinerlei Möglichkeit bietet, zwischen den verschiedenen Bestrahlungsfractionen und deren Antworten zu unterscheiden. Hierzu ist die Ionenmikrobestrahlung, wie sie am Rasterionenmikroskop

SNAKE des Garchinger Tandembeschleunigers durchgeführt werden kann, die Methode der Wahl. Eine Mikrobestrahlung bietet die Möglichkeit, die benötigte Information der Bestrahlungszeitpunkte durch ein entsprechendes Bestrahlungsmuster zu kodieren. Verwendet man hierzu einzelne hochenergetische Ionen, so kann die applizierte Energiedosis genau vorherbestimmt und durch Verwendung verschiedener Iontypen- und Energien über große Bereiche variiert werden. In der vorliegenden Arbeit wird diese experimentelle Methodik benutzt, um fraktionierte Bestrahlungen an lebenden HeLa-Zellen durchzuführen und die Zellantworten zu studieren.



# Kapitel 2

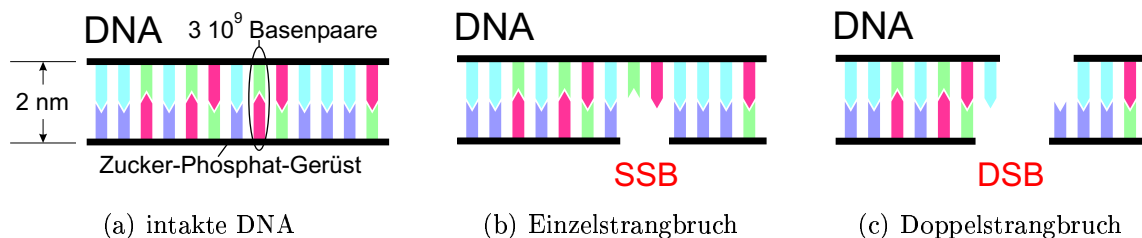
## Biologische Grundlagen

### 2.1 DNA–Schäden durch ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung, wie Röntgen-, Gamma- und Alphastrahlung oder die in dieser Arbeit verwendeten hochenergetischen Ionen, induzieren in Zellen verschiedene Schäden, indem sie chemische Bindungen direkt oder indirekt zerstören. Schwerwiegend für die betroffene Zelle ist es, wenn hiervon der Zellkern und somit die DNA betroffen ist, da diese die komplette Erbinformation beinhaltet.

Der Aufbau der DNA ist in Abb. 2.1a schematisch dargestellt. Sie ist doppelsträngig, wobei jeder Strang aus einem Zucker-Phosphat-Gerüst (schwarz) und einer Abfolge von vier verschiedenen Basen besteht, worin die Erbinformation kodiert ist [1]. Die beiden Hälften des Doppelstrangs sind komplementär in ihrer Basenabfolge, d.h. einer Base liegt immer die dazu komplementäre Base gegenüber. Das menschliche Genom besteht aus  $3 \cdot 10^9$  Basenpaaren. Die Gesamtlänge der DNA beträgt mehrere Meter.

In Abb. 2.1 sind zwei mögliche DNA-Schäden dargestellt. Wird nur eine Hälfte des Doppelstrangs beschädigt (Abb. 2.1b), so spricht man von einem Einzelstrangbruch (SSB, vom Englischen „single strand break“). Diesen zu reparieren ist für die Zelle relativ einfach, da keine Erbinformation verlorengegangen ist und der zweite unversehrte Strang als Vorlage zur Reparatur dienen kann.



**Abbildung 2.1:** Der Aufbau der DNA und zwei mögliche Schadensarten.

Deutlich schwerwiegender ist der in Abb. 2.1c skizzierte Schaden. Bei sogenannten Doppelstrangbrüchen (DSB) werden beide Stränge des DNA-Doppelstrangs durchtrennt, evtl. sogar einige Basenpaare abgetrennt oder zerstört. Nach einer einfachen Abschätzung für locker ionisierende Strahlung auf Grundlage eines linearen Zusammenhangs zwischen Energiedosis und Anzahl der DSBs werden im Zellkern pro Gray deponierter Energiedosis etwa 35 DSBs erzeugt [2]. Demzufolge induzieren Alphateilchen mit 5 MeV Energie und einem LET <sup>(1)</sup> in Wasser [3] von 90 keV/ $\mu\text{m}$  etwa 5 DSBs pro Zellkern; die an SNAKE meist zur Zellbestrahlung verwendeten 100 MeV Sauerstoffionen mit LET=430 keV/ $\mu\text{m}$  etwa 25 DSBs. Allerdings ist fraglich, ob die Abschätzung auch für diese dichtionisierenden Teilchen gültig ist. Vermutet wird, dass aufgrund der dichten Ionisationsspur die Zahl der DSBs noch größer ist.

Die beiden wichtigsten Reparaturmechanismen für DSB, die der Zelle zur Verfügung stehen, sind die nichthomologe Endverknüpfung („non-homologous end joining“) und die homologe Rekombination („homologous recombination“). Bei der nichthomologen Endverknüpfung werden die beiden Enden des DNA-Doppelstrangs einfach wieder miteinander verbunden. Die hierbei entstehenden Fehler aufgrund von verlorengegangenen Basenpaaren müssen, je nach betroffener Gensequenz, nicht unbedingt schwerwiegende Folgen für die Zelle besitzen. Sind keine Basenpaare verlorengegangen, so ist diese Art der Reparatur sogar fehlerfrei. Werden jedoch nicht zusammengehörige DNA-Enden, evtl. sogar von verschiedenen Chromosomen, miteinander verbunden, so hat dies normalerweise fatale Folgen für die Zelle.

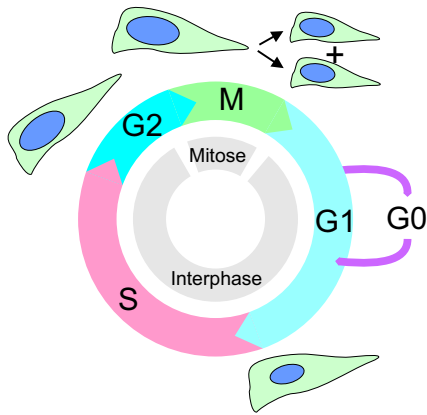
Im Gegensatz zur nichthomologen Endverknüpfung ist die homologe Rekombination meistens fehlerfrei, jedoch deutlich aufwändiger. Hierbei dient ein homologes DNA-Molekül als Vorlage, um die verlorengegangenen Basenpaare zu ergänzen und die beiden zusammengehörenden DNA-Enden wieder miteinander zu verbinden. Dieses intakte homologe DNA-Molekül stammt in der Regel vom Schwesterchromatid, welches jedoch nur in einem bestimmten Abschnitt des Zellzyklus (Abb. 2.2), zwischen der S-Phase und der Mitose, vorhanden ist.

Die Antwort der Zelle auf DNA-Schäden, v.a. Doppelstrangbrüche, umfasst nicht nur die Reparatur, sondern zudem die Regulation des Zellzyklus (Abb. 2.2), damit hinreichend Zeit für die Korrektur der Schäden zur Verfügung steht. Im Falle einer besonders schweren Schädigung kann die Zelle ihren eigenen Zelltod, die Apoptose, einleiten.

Diese Prozesse werden gesteuert durch das Zusammenspiel verschiedener Proteine, die sich in spezifischer Abfolge gegenseitig aktivieren oder die Rekrutierung an

---

<sup>(1)</sup>Der LET (**L**inear **E**nergy **T**ransfer) gibt die pro Weglänge im Target deponierte Energie an und ist mit dem spezifischen Energieverlust  $dE/dx$  des Projektils identisch.



Zellen vermehren sich durch Zellteilung. Dabei durchlaufen sie den Zellzyklus, der aus der eigentlichen Zellteilung (Mitose) und der Interphase besteht. Letztere ist in drei Phasen unterteilt:

- In der  $G_1$ -Phase wächst die Zelle und verdoppelt ihr Volumen.
- Die S-Phase (Synthese) dient zur Verdoppelung der Erbinformation (DNA).
- Die  $G_2$ -Phase dient zur Vorbereitung der Mitose.

Teilt sich eine Zelle nicht weiter, so geht diese aus der  $G_1$ -Phase in die  $G_0$ -Phase über. Der komplette Zellzyklus dauert bei Säugetierzellen in Kultur zwischen 12-24 Stunden.

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Zellzyklus.

bestimmte Orte, z.B. den DSBs, veranlassen. Die Identifizierung dieser hierbei beteiligten Proteine und v.a. das Verständnis deren Funktion in diesem Mechanismus bildet den Schlüssel zum Verständnis der Zellantwort auf Doppelstrangbrüche.

## 2.2 Hier untersuchte Reparaturfaktoren

Zwei an der Zellantwort auf DSBs beteiligte Faktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet. Dies war zum einen der Doppelstrangbruchmarker  $\gamma$ -H2AX und zum anderen das Protein 53BP1, dessen genaue Rolle in der Antwort auf DSBs noch diskutiert wird.

### 2.2.1 $\gamma$ -H2AX

$\gamma$ -H2AX ist die phosphorylierte Form des Histons H2AX. Histone sind relativ kleine Proteine, um welche die DNA herumgewickelt ist. Dies stellt die unterste Faltungsebene der DNA-Packung im Zellkern dar, welche notwendig ist, um die mehrere Meter lange DNA in dem nur wenige Mikrometer großen Zellkern organisiert unterzubringen.

Als Antwort auf einen Doppelstrangbruch werden an die H2AX-Histone in dessen Umgebung in einer etwa 1 Mbp<sup>(2)</sup> großen Region Phosphatgruppen angelagert. Dieses phosphorylierte Histon wird als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet. Es kann mittels Immunfluoreszenztechnik, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, markiert werden. Diese Anhäufung von  $\gamma$ -H2AX-Proteinen um den DSB ist so unter dem Fluoreszenzmikroskop als sogenann-

<sup>(2)</sup>Mbp: Megabasenpaare

ter Fokus sichtbar. Diese Focibildung geschieht innerhalb der ersten Minute nach Erzeugung von DSBs [4]. Damit stellt  $\gamma$ -H2AX einen schnellen und zuverlässigen Marker für Doppelstrangbrüche dar [5]. Vermutlich dient  $\gamma$ -H2AX als ein frühes Signal und ist für die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren notwendig [6].

### 2.2.2 53BP1

Das Protein „p53 Binding Protein 1“ (53BP1) kolokalisiert mit dem DSB-Marker  $\gamma$ -H2AX, bildet jedoch erst etwa 5 Minuten nach Bestrahlung erste Foci, deren Anzahl nach etwa 15-30 Minuten das Maximum erreicht [7]. Die exakte Funktion in der Zellantwort auf Doppelstrangbrüche ist noch nicht genau geklärt. Sicher ist, dass 53BP1 für die Einleitung des G<sub>2</sub>-Arrests mitverantwortlich ist [8]. Eine Zelle mit defektem Erbgut geht nicht in die Mitose, sondern verharrt in der G<sub>2</sub>-Phase. Hierdurch wird sichergestellt, dass das defekte Erbgut nicht weitergegeben wird.

Als wahrscheinlich gilt, dass 53BP1 an der Aktivierung von ATM beteiligt ist [7], wobei der Ablauf noch diskutiert wird. ATM spielt eine Schlüsselrolle in der Zellantwort auf DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung [9]. Sie aktiviert eine Reihe von Proteinen, welche hauptsächlich an Zellzyklus-Kontrollpunkten, aber auch an Apoptose und DNA-Reparatur beteiligt sind.

# Kapitel 3

## Zellbestrahlungsexperimente an SNAKE

### 3.1 Rasterionenmikroskop SNAKE

#### 3.1.1 Aufbau von SNAKE

Mit dem Rasterionenmikroskop SNAKE (Supraleitendes Nanoskop für Angewandte Kernphysikalische Experimente) ist es möglich, mit einem System von Mikroschlitzen [10] und einer supraleitenden Multipollinse [11], Ionenstrahlen auf eine Größe von weniger als einen Mikrometer zu fokussieren.

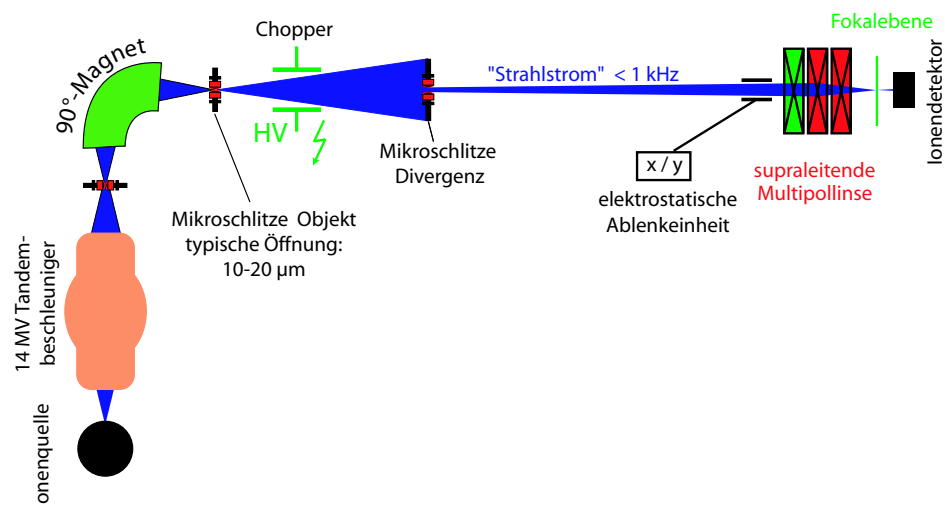


Abbildung 3.1: Schematischer Strahlverlauf zur Präparation des Mikrostrahls mittels einstufiger Abbildung am Rasterionenmikroskop SNAKE.

Abb. 3.1 zeigt schematisch den Strahlverlauf von SNAKE. Zur Präparation des Mikrostrahls wird der Ionenstrahl des Münchener 14 MV Tandembeschleunigers mittels der Objektschlitze auf eine Ausdehnung von typischerweise 10 – 20  $\mu\text{m}$  in X- und Y-Richtung beschnitten. Dieser räumlich derart eingeschränkte Strahl bildet das Objekt, welches mittels der supraleitenden Multipollinse verkleinert in die Fokalebene abgebildet wird. Hierbei beträgt der Verkleinerungsfaktor in X-Richtung 1/88, bzw. 1/24 in Y-Richtung [2]. Mit den Divergenzschlitzen kann die Ausleuchtung der Linse bestimmt werden. Dies ist von Bedeutung, da alle Abbildungsfehler hiermit skalieren.

Um bei Zellbestrahlungsexperimenten die applizierte Energiedosis zu kontrollieren, ist eine Einzelionenpräparation nötig. Hierzu wird zunächst der Strahlstrom mit Hilfe der Divergenzschlitze auf einen Ionenfluss von 500 – 1000 Teilchen pro Sekunde gedrosselt. Mittels eines Choppers und eines hinter der Fokalebene positionierten Ionen-detektors (siehe Abb. 3.1) können daran Einzelionen präpariert werden. Der Chopper befindet sich nach den Objektschlitzen und besteht aus zwei Metallplatten, wovon eine geerdet ist. An die andere Platte lässt sich Hochspannung anlegen. Durch das elektrische Feld zwischen den Platten wird der Strahl soweit abgelenkt, dass kein Ion mehr die Fokalebene und damit die Zellprobe erreicht. Zur Applikation eines einzelnen Ions schaltet man den Chopper frei. Sobald ein Ion im Detektor nachgewiesen wird, schließt eine geeignete Elektronik den Chopper, sodass keine weiteren Ionen die Probe erreichen. Die Wahrscheinlichkeit für Doppeltreffer ist durch die Flugdauer der Ionen vom Chopper bis zum Detektor und die Signalverarbeitungs- und -laufzeit vom Detektor zurück zum Chopper bedingt und liegt nach [12] bei 1 – 2‰.

Die in Abb. 3.1 und 3.2 eingezeichnete elektrostatische Ablenkeinheit kurz vor der supraleitenden Linse ermöglicht es, durch ein elektrisches Feld die Ionen abzulenken. Hiermit wird die Strahlposition definiert auf der Probe verändert und der Trefferpunkt eines Ions bestimmt. Je nach elektrischer Steifigkeit des Strahls kann dessen Position in X- und Y-Richtung um etwa  $\pm 400\mu\text{m}$  variiert werden. Die Ablenkeinheit wird mit einer Digital-Analog-Wandler-Karte über einen Rechner gesteuert. Zusammen mit der Einzelionenpräparation ermöglicht dies die Applikation von Iontreffern in Mustern, wie dies in Kapitel 4 Verwendung findet.

### 3.1.2 Adaption von SNAKE zur Bestrahlung lebender Zellen

Die Bestrahlung lebender Zellen erfordert einen speziell hierzu angepassten Bestrahlungsaufbau, der im Rahmen einer Doktorarbeit entwickelt und aufgebaut wurde [12]. Dieser ist in Abb. 3.2 dargestellt.

Um Zellen unter Atmosphärendruck bestrahlen zu können, wurde ein Strahlaustritt an Luft realisiert. Hierzu treten die Ionen am Ende des in Strahlrichtung verfahrba-

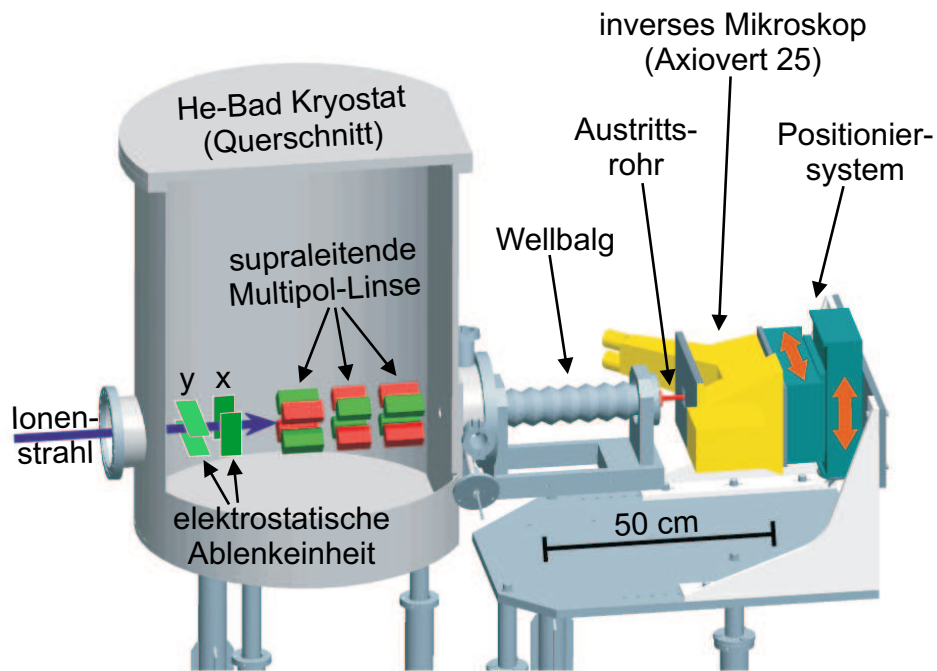
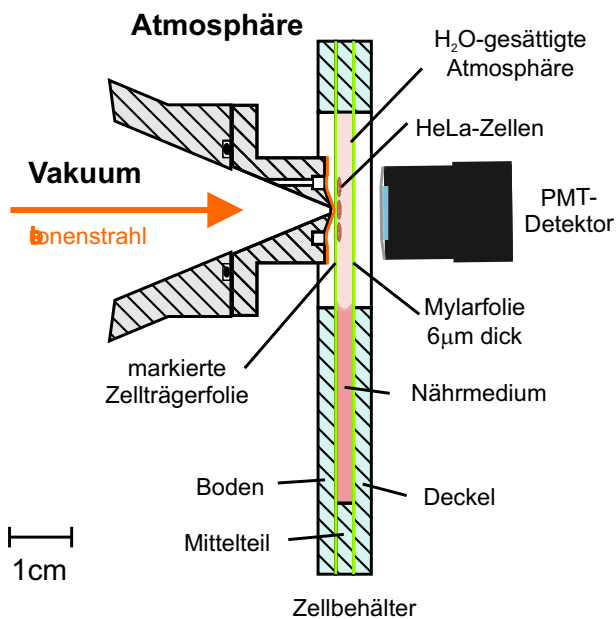
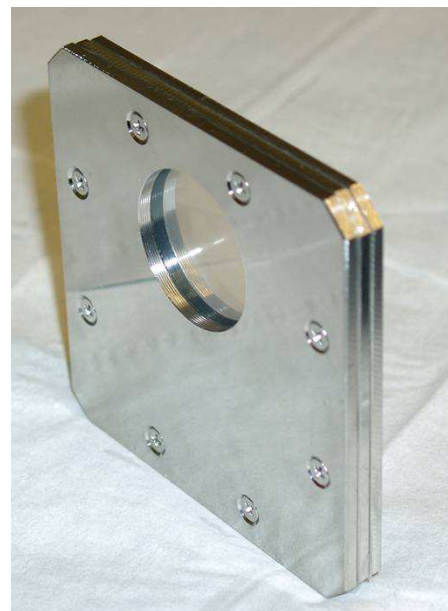


Abbildung 3.2: Zellbestrahlungsplatz an SNAKE.

ren Austrittsrohrs durch ein Loch mit  $1\text{ mm}$  Durchmesser, worüber eine  $7,5\ \mu\text{m}$  dicke Kaptonfolie gespannt ist, aus dem Vakuum aus.



(a) Schematisch: Strahlaustritt aus Vakuum, Zellbehälter in Bestrahlungsposition mit Ionendetektor



(b) Foto: Zellbehälter

Abbildung 3.3: Zellbehälter

Direkt hinter dem Strahlaustritt wird zur Bestrahlung der in Abb. 3.3 dargestellte Zellbehälter platziert. Deckel, Boden und Mittelteil des Behälters bestehen jeweils aus 3 mm starkem Edelstahlblech. Das Mittelteil besitzt ein zentrales Loch, während Deckel und Boden jeweils ein exzentrisches Loch aufweisen. Zwischen Mittelteil und Boden und Mittelteil und Deckel ist eine 6  $\mu\text{m}$  dicke Mylarfolie gespannt. Die Folie zwischen Mittelteil und Boden ist mit einem Koordinatensystem mikrostrukturiert [13]. Auf dieser Folie wachsen die zu bestrahlenden HeLa-Zellen an. Der Hohlraum zwischen den Folien dient zur Aufnahme des Nährmediums. Normalerweise befindet sich der Behälter in waagrechter Position, sodass die Zellen mit Medium bedeckt sind. Zur Bestrahlung wird der Zellbehälter senkrecht gestellt und das Medium befindet sich im unteren Teil des Behälters. Die Ionen werden dadurch nicht im Nährmedium gestoppt und können hinter dem Zellbehälter nachgewiesen werden. Durch das geschlossene Design bildet sich eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre, die das Austrocknen der Zellen verhindert.

Mit Hilfe des optischen Mikroskops hinter dem Austrittsrohr und dem Zellbehälter ist es möglich, die Zellen vor der Bestrahlung zu betrachten. Die markierte Zellträgerfolie erlaubt den Bestrahlungsort bei der späteren Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 3.2 oder auch einer eventuellen zweiten Bestrahlung, wie es in Kapitel 4 genutzt wird, zuverlässig wiederzufinden.

In dieser Bestrahlungsgeometrie, wobei die Ionen durch die Austrittsfolie und die Zellträgerfolie treten, wird gegenwärtig eine Strahlauffösung von 0,55  $\mu\text{m}$  in X und 0,40  $\mu\text{m}$  in Y-Richtung erreicht [13].

## 3.2 Probenpräparation

Für die bisherigen Zellbestrahlungsexperimente an SNAKE wurden ausschließlich HeLa-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden Anfang der 50er Jahre aus einem Zervix-Karzinom einer Patientin isoliert und sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde [14]. Etwa 24 Stunden vor der Bestrahlung werden die Zellen in den Zellbehältern ausgesät und ohne Deckel bis zur Bestrahlung im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% inkubiert. Zur Bestrahlung wird der Zellbehälter mit Deckel, wie oben beschrieben, in den Bestrahlungsaufbau eingebaut und bestrahlt. Danach wird die Probe meist noch eine bestimmte Zeit im Brutschrank inkubiert und anschließend fixiert. Die Fixierung geschieht mittels Paraformaldehyd. Hierdurch werden die Zellen abgetötet ohne die innere Struktur zu zerstören. Das Präparat stellt danach eine Momentaufnahme des Zustands zum Fixierungszeitpunkt dar.



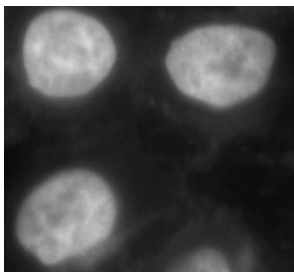
## Immunfluoreszenzmarkierung von Proteinen

Um verschiedene Proteine und deren räumliche Verteilung als Antwort auf durch Ionenbestrahlung induzierte DNA-Schäden sichtbar zu machen, werden diese mit Fluorochromen markiert. Diese Markierung geschieht in zwei Stufen. Ein primärer, proteinspezifischer Antikörper bindet direkt an das zu markierende Protein. Hieran lagern sich sekundäre Antikörper, welche mit dem Fluorochrom markiert sind, an. Teilweise können mehrere sekundäre Antikörper an einen primären binden, woraus eine Signalverstärkung resultiert.

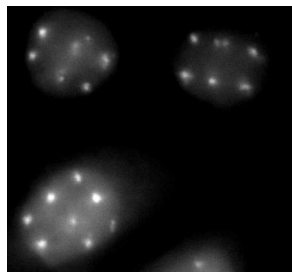
Mithilfe der Immunfluoreszenztechnik ist es möglich, unterschiedliche Proteine in einer Probe mit verschiedenen Fluorochromen zu markieren.

### 3.3 Mikroskopie

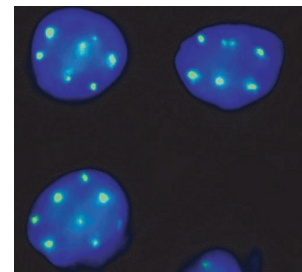
Die Untersuchung der bestrahlten Zellproben, die mit Immunfluoreszenztechnik präpariert wurden, erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Dabei werden die Fluorochrome zum Leuchten angeregt und können mit dem Auge durch das Binokular betrachtet oder mit einer Kamera aufgenommen werden. Speziell auf das jeweils verwendete Fluorochrom abgestimmte Anregungs- und Emissionsfilter im Strahlengang des Mikroskops stellen sicher, dass jeweils nur ein Fluorochrom angeregt wird und nur dessen Emissionslicht den Betrachter erreicht. Dadurch ist die Verwendung verschiedener Fluorochrome in einem Präparat möglich. Da die Farbinformation durch den gewählten Emissionsfilter festgelegt ist, wird zur Aufnahme der Bilder eine monochrome CCD-Kamera verwendet, welche eine höhere Lichtempfindlichkeit als Farbkameras besitzt.



(a) Mit DAPI angefärbte HeLa-Zellkerne.



(b) 53BP1-Foci an den Iontentrefferpunkten.



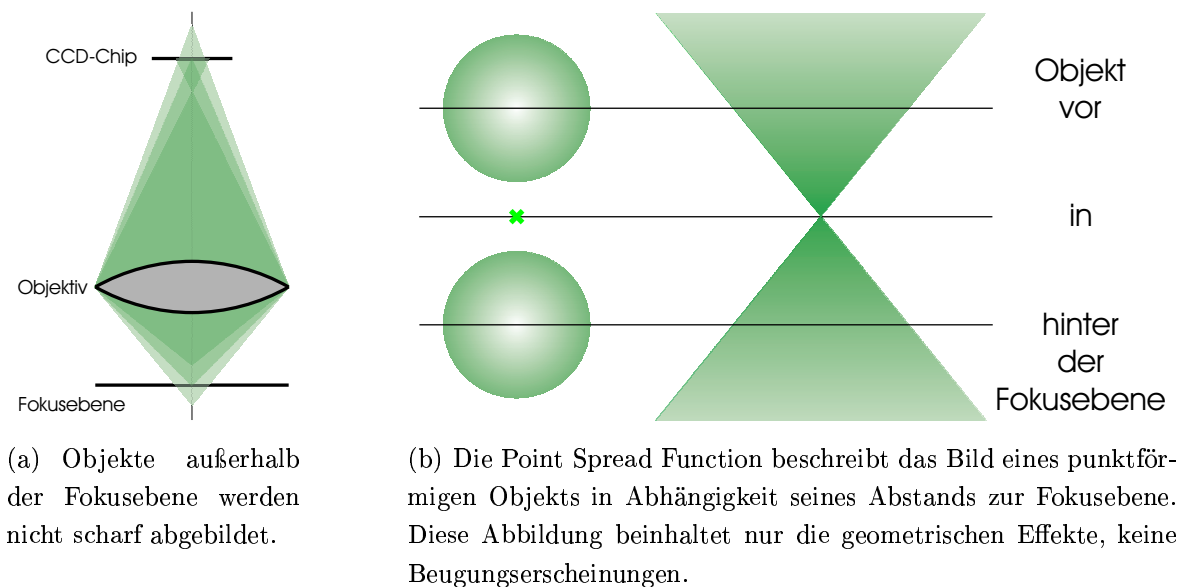
(c) Überlagerung der colorierten Einzelbilder.

**Abbildung 3.4:** Mikroskopaufnahme von HeLa-Zellkernen, welche mit einem Punktmuster (Punktabstand  $5\mu\text{m}$ ) bestrahlt wurden.

In Abb. 3.4 ist ein Beispiel für solche Aufnahmen zu sehen. Für jedes Fluorochrom wird eine eigene Graustufenaufnahme gemacht. Um die Zellkerne erkennen zu können, wurde die DNA mit DAPI angefärbt (Abb. 3.4a). Das Protein 53BP1 häuft sich um die durch Ionenbestrahlung induzierten Doppelstrangbrüche an (Abb. 3.4b). Zur anschaulicheren Darstellung können die Einzelbilder coloriert und überlagert werden (Abb. 3.4c), wobei diese Farbgebung willkürlich ist und nicht den Farben der Fluorochrome entsprechen muss.

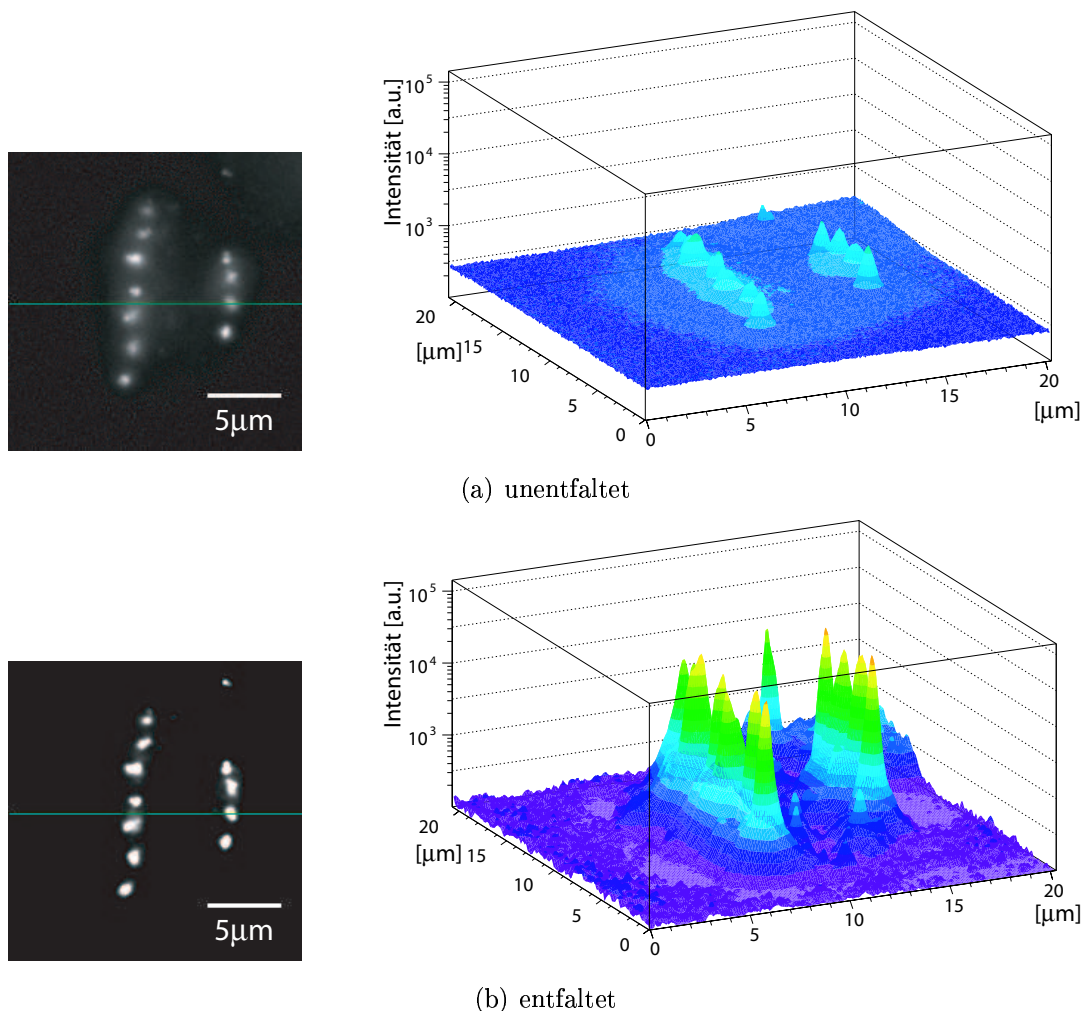
Die Tiefenschärfe des hochauflösenden Fluoreszenzmikroskops liegt unter  $1\ \mu\text{m}$  und ist damit deutlich kleiner als die Höhe der zu mikroskopierenden Zellkerne, welche bei etwa  $7\ \mu\text{m}$  liegt. Dies hat zur Folge, dass nur ein kleiner Teil des Objekts, der sich gerade in der Fokusebene befindet, wie in Abb. 3.5a dargestellt, scharf abgebildet wird. Objekte, die außerhalb der Fokusebene liegen, werden unscharf abgebildet und liefern einen verwaschenen Untergrund. Dieser Sachverhalt spiegelt sich in der sog. Point Spread Function (PSF) des jeweiligen Mikroskops wider, welche das Abbild eines punktförmigen Objekts in Abhängigkeit dessen Abstands zur Fokusebene beschreibt (Abb. 3.5b). Mathematisch kann das Mikroskopbild als ein Schnitt durch die Faltung des dreidimensionalen Objekts mit der dreidimensionalen Point Spread Function beschrieben werden.

Nimmt man einen Z–Stapel des Objekts auf, d.h. macht man verschiedene Aufnahmen, wobei man jeweils definiert die Tiefe der Fokusebene verändert, so kennt man die Faltung des Objekts mit der Point Spread Function. Bei bekannter PSF lässt sich das



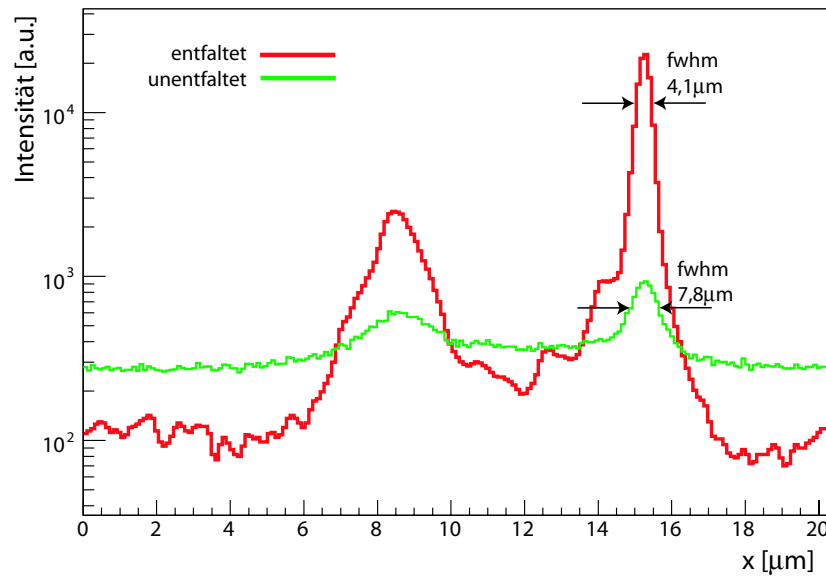
**Abbildung 3.5:** Mikroskopie von dreidimensionalen Objekten.

Objekt rechnerbasiert rekonstruieren, d.h. entfalten. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit das Softwarepaket Huygens verwendet [15].



**Abbildung 3.6:** Gegenüberstellung von unentfalteter und entfalteter Mikroskopaufnahme. Der gezeigte HeLa-Zellkern wurde mit einzelnen 100 MeV Sauerstoffionen in Form eines senkrechten Linienmusters bestrahlt. Die logarithmische Intensitätsskala umfasst in (a) und (b) den gleichen Bereich. Dargestellt ist das 53BP1-Signal.

In Abb. 3.6 sind die unentfaltete und die entfaltete Mikroskopaufnahme des 53BP1-Signals eines mit einem senkrechten Linienmuster bestrahlten HeLa-Zellkerns gegenübergestellt. Die Bestrahlungsrichtung entspricht der Blickrichtung des Mikroskops. Die Ionen haben überhalb und unterhalb der Fokusebene dieses Bildes ebenfalls Doppelstrangbrüche und damit als Antwort deutlich erhöhte Proteinkonzentrationen, d.h. Foci, induziert. Die Leuchtintensität dieser Foci trägt auch abseits der X,Y-Position, wie durch die PSF beschrieben, zum Signal des Bildes bei. In Abb. 3.6a



**Abbildung 3.7:** Intensitätsverlauf entlang der in Abb. 3.6 eingezeichneten grünen Linien. Deutlich sichtbar ist das geringere Signal zu Untergrund Verhältnis der unentfalteten Aufnahme und die größere Breite der Strukturen aufgrund der unscharf abgebildeten Objekte aus anderen Ebenen. (logarithmische Intensitätsskala)

erkennt man deutlich den hierdurch bedingten größeren Untergrund und die geringere Signalthöhe als im entfaltetem Bild (Abb. 3.6b).

Abb. 3.7 zeigt die jeweilige Intensität entlang der in Abb. 3.6 eingezeichneten grünen Linien. Das Signal zu Untergrund Verhältnis des entfaltetes Bildes beträgt über zwei Größenordnungen, während dies beim unentfalteten Bild lediglich ein Faktor 3 ist. Die in Z-Richtung ausgedehnten Strukturen des Objekts sind für die doppelt so große Breite des rechten Peaks in der unentfalteten Aufnahme verantwortlich.

# Kapitel 4

## Konkurrenzeffekte in der Proteinanlagerung an strahleninduzierte DNA–Schäden

### 4.1 Wechselwirkung zwischen DNA–Reparaturvor- gängen

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob und wie verschiedene DNA–Reparaturvorgänge an Doppelstrangbrüchen innerhalb eines Zellkerns miteinander wechselwirken und sich gegenseitig beeinflussen. Dazu werden z.B. in einem Zellkern mindestens zwei Orte zu den Zeiten  $t_1$  und  $t_2$  bestrahlt und die Zellantwort anhand der Verteilung von daran beteiligten Faktoren in Abhängigkeit verschiedener Parameter untersucht. Im Detail können diese die räumlichen Abstände  $\Delta x$  der Schadensorte sein, welche durch das applizierte Muster bestimmt werden, sowie die Anzahl und Dichte der DNA–Schäden, welche mit der verwendeten Ionensorte und –energie variieren.

Interessant ist insbesondere die Dynamik der Einleitung von DNA–Reparatur in Abhängigkeit des Zeitabstand  $\Delta t$  der Bestrahlungseignisse. Werden die Schäden nicht gleichzeitig, sondern mit einem zeitlichen Abstand  $\Delta t$  induziert, stellt sich die Frage, ob die beiden Schäden dennoch gleich behandelt werden. Denkbar ist, dass der erste Schaden die Zelle schon zur Vorbereitung der DNA–Reparatur veranlasst hat, so dass diese auf den zweiten Schaden viel schneller reagieren kann. Auch der umgekehrte Fall ist vorstellbar. Die Reparatur des ersten Schadens könnte die Zelle derart beschäftigen, dass diese den zweiten Schaden nicht adäquat versorgen kann und dieser unberücksichtigt bleibt.

Mit der in Kapitel 3.2 beschriebenen Methode der Immunofluoreszenzmarkierung betrachtet man räumliche Verteilungen von Proteinen. Es ist zu erwarten, dass unter-

schiedliche an der DNA-Reparatur beteiligte Proteine auch unterschiedliches Verhalten zeigen. Das betrachtete Protein ist somit ein entscheidender Parameter.

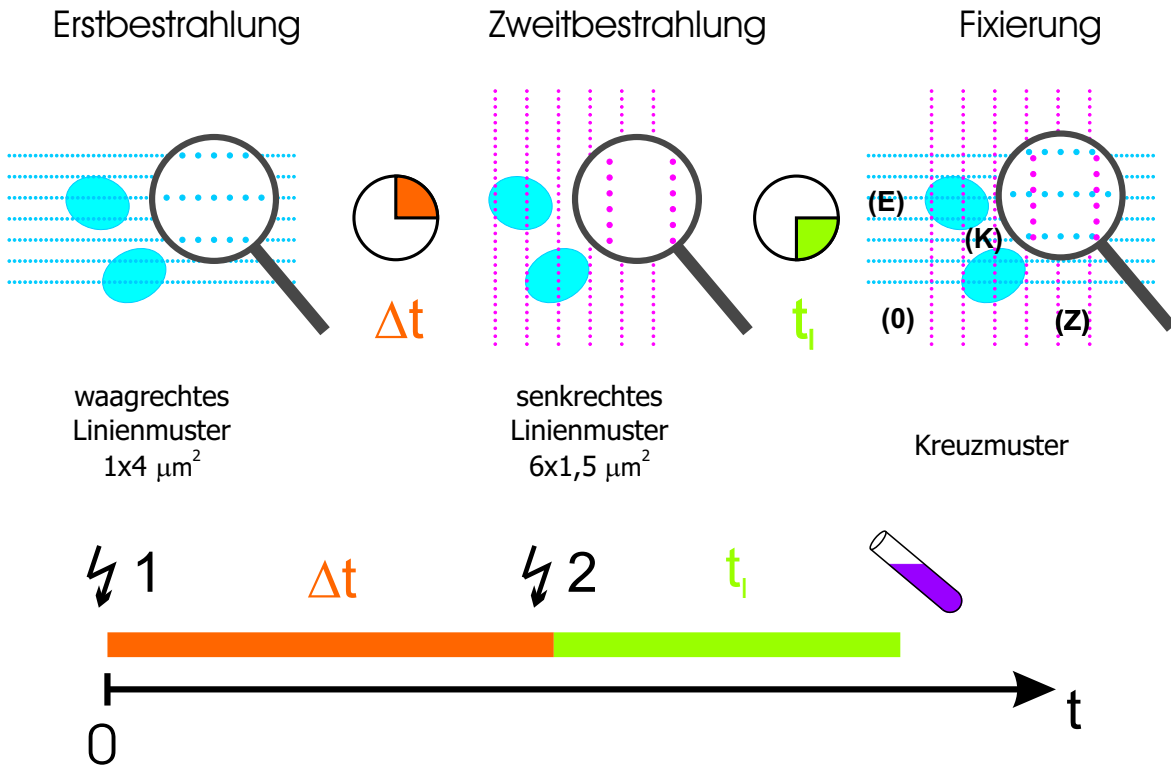
Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, wie die Zelle auf nicht gleichzeitig induzierte Doppelstrangbrüche reagiert. Untersucht wurden hierbei das als Reaktion auf Strahlenschäden phosphorylierte Histon  $\gamma$ -H2AX und das an der weiteren Antwort beteiligte Protein 53BP1. Zur Bestrahlung wurden Sauerstoffionen mit einer Energie von 100 MeV und Kohlenstoffionen mit 55 MeV verwendet.

## 4.2 Experiment

Zur Untersuchung dieser Fragestellung ist es notwendig, denselben Zellkern zweimal in entsprechendem Zeitabstand zu bestrahlen. Nach der Bestrahlung besteht die wesentliche Schwierigkeit darin, die Signale, welche die Zelle liefert, den beiden Bestrahlungsereignissen und damit Bestrahlungszeitpunkten zuzuordnen. Diese Schwierigkeit wird gelöst, indem die benötigte Zeitinformation durch ein geeignetes Bestrahlungsmuster aus Ionentreffern, die aufeinander senkrecht stehende Linien bilden, kodiert wird. An SNAKE ist es möglich, Ionentreffer mit einer Genauigkeit von  $0,5 \mu\text{m}$  (fwhm) zu setzen. Dies ist ausreichend, um zwischen den beiden aufeinander senkrecht stehenden Linienmustern innerhalb eines Zellkerns unterscheiden zu können und so die Ionentreffer den Bestrahlungszeiten zuzuordnen.

Der konkrete Versuchsablauf ist in Abb.4.1 dargestellt. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  werden die Zellen mit einzelnen Ionen, deren Trefferpunkte ein waagrechtes Linienmuster bilden, der Erstbestrahlung, bestrahlt. Bis zur Zweitbestrahlung lagern die Zellen im Brutschrank. Dort beginnen die Zellen die Reparaturantwort. Die Zweitbestrahlung, ein zur Erstbestrahlung senkrecht Linienmuster, wird nach einer Zeitspanne  $\Delta t$  appliziert. Danach werden die Zellen nochmals eine Zeitdauer  $t_I$  im Brutschrank inkubiert, bevor sie fixiert werden und die zur Anfärbung der Proteine notwendige cytochemische Behandlung erfahren. Wir definieren  $\Delta t$  als Zeitdifferenz zwischen Ende der Erst- und Ende der Zweitbestrahlung und  $t_I$  als Zeitdifferenz zwischen Ende der Zweitbestrahlung und dem Zeitpunkt der Fixierung.

Das Linienmuster der Erstbestrahlung besteht aus einzelnen Treffern, deren X-Abstand  $1 \mu\text{m}$  und Y-Abstand  $4 \mu\text{m}$  beträgt. Die Zweitbestrahlung, deren Y-Abstand  $1,5 \mu\text{m}$  und X-Abstand  $6 \mu\text{m}$  beträgt, steht, wie aus Abb.4.1 ersichtlich, oben und unten über die Erstbestrahlung über, ist jedoch in X-Richtung nicht so weit ausgedehnt wie diese. Auf der Probe ergeben sich somit vier Bereiche mit unterschiedlichen Bestrahlungen. Zellen im Kreuzbereich (K) haben sowohl Erst- als auch Zweitbestrahlung erfahren. Links und rechts des Kreuzbereichs reicht die Erstbestrahlung über die Zweit-



**Abbildung 4.1:** Skizze des Bestrahlungsablaufs: Doppelstrangbrüche in den waagrechtten Linien wurden zum Zeitpunkt  $t = 0$  verursacht, die Schäden in den vertikalen Linien zum Zeitpunkt  $t = \Delta t$ .

bestrahlung hinaus, dort wurden die Zellen nur einmal zum Zeitpunkt  $t \approx 0$  bestrahlt, Bereich (E). Analog dazu wurden die Zellen ober- und unterhalb des Kreuzbereichs nur einmal zum Zeitpunkt  $t \approx \Delta t$  mit vertikalen Linien bestrahlt, Bereich (Z). In den Ecken und abseits des bestrahlten Bereichs gibt es Zellen, die unbestrahlt sind. Dieser Bereich ist mit (0) markiert.

In der Erstbestrahlung wird als mittlere Bestrahlungsdichte ein Ion pro  $4 \mu\text{m}^2$  appliziert. Aus dem LET des verwendeten Ions ergibt sich die pro Volumen  $V$  deponierte Energie  $E$  zu:

$$\frac{E}{V} = \frac{LET}{4 \mu\text{m}^2} \quad (4.1)$$

Die Energiedosis  $D$  berechnet sich mit der Dichte von Wasser  $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$  zu:

$$D = \frac{LET}{\rho_{\text{H}_2\text{O}} \cdot 4 \mu\text{m}^2} \quad (4.2)$$

Die verwendeten Sauerstoffionen besitzen einen LET von  $430 \text{ keV}/\mu\text{m}$ . Somit wird durch die Erstbestrahlung eine Energiedosis von etwa  $17 \text{ Gy}$  appliziert.

Die insgesamt bestrahlte Fläche beträgt etwa  $0,2 \text{ mm}^2$ . Die zweifache Bestrahlung im Bereich (K) erfahren dabei etwa  $50 - 100$  Zellen.

### 4.3 Qualitative Beobachtungen

In einer früheren Diplomarbeit [13] wurde der Einfluss der beiden Zeitparameter  $\Delta t$  und  $t_I$ , bereits qualitativ untersucht. Hierzu wurden HeLa-Zellen nach dem oben beschriebenen Ablauf zweifach bestrahlt. Es wurden Sauerstoffionen mit einer Energie von 100 MeV verwendet. Die Zeitdauer  $\Delta t$  zwischen den Bestrahlungen wurde von null Minuten bis zwei Stunden variiert, die Inkubationszeit  $t_I$  betrug zwischen 20 und 150 Minuten.

Abb.4.2 zeigt Aufnahmen dieser Zeitserie. Oberhalb der eingezeichneten roten Linie befindet sich jeweils der Kreuzbereich (K), darunter liegende Zellen wurden nur von der Zweitbestrahlung getroffen, Bereich (Z). Im blauen Farbkanal sind die mittels DAPI angefärbten Zellkerne zu erkennen. Im grünen Farbkanal ist das 53BP1-Signal dargestellt.

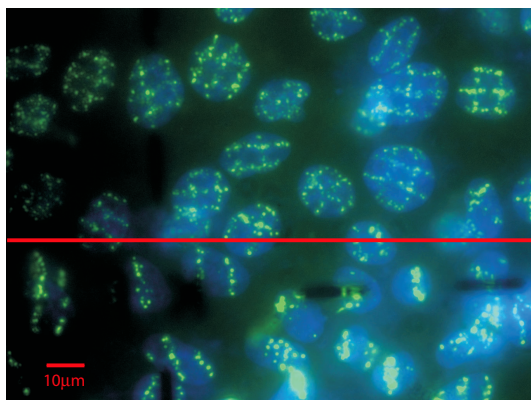
In Abb.4.2a und 4.2b erkennt man das bestrahlte Muster aus Abb.4.1 gut wieder. Im Kreuzbereich zeigen Erst- und Zweitbestrahlung vergleichbare Intensität.

In Abb.4.2c zeigt die Zellreaktion auf die Zweitbestrahlung anderes Verhalten. Im Kreuzbereich ist das 53BP1-Signal der Zweitbestrahlung kaum zu erkennen, während dieses im nur zweitbestrahlten Bereich (Z) deutlich ausgeprägt ist.

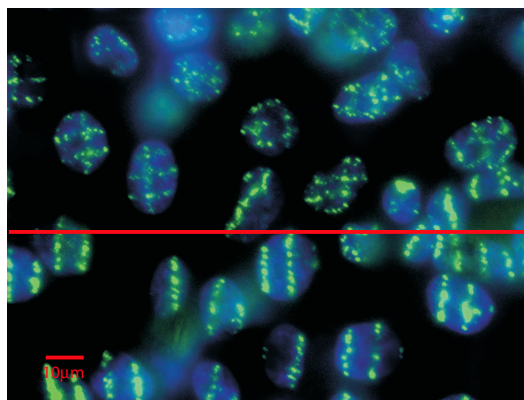
Dieser Effekt, dass die Erstbestrahlung innerhalb eines Zellkerns die Versorgung der Zweitbestrahlung mit dem Reparaturprotein, hier 53BP1, unterdrückt, wird im folgenden als Konkurrenz bezeichnet. In diesem Sprachgebrauch bedeutet stärkere Konkurrenz eine stärkere Unterdrückung und damit ein geringeres Signal der Zweitbestrahlung. Die Zellen in Abb.4.2c zeigen folglich ausgeprägte Konkurrenz bezüglich des Proteins 53BP1. Nur sehr wenige Zellen lassen noch senkrechte Linien erahnen.

In [13] ist die Abhängigkeit dieses bei 53BP1 beobachteten Effekts von  $\Delta t$  und  $t_I$  anhand der ersten Experimente qualitativ beschrieben. Demnach beobachtet man maximale Konkurrenz für  $\Delta t \approx 45-60 \text{ min}$ . Für kürzere  $\Delta t$  nimmt die zu beobachtende Konkurrenz ab, wie der Grenzfall  $\Delta t = 0$ , also gleichzeitige Bestrahlung und deshalb auch gleiche Antwort, erwarten lässt. Mit größer werdender Summe  $\Delta t + t_I$  nimmt der Effekt ebenfalls ab. Für  $\Delta t + t_I \gtrsim 2h$  ist keine Konkurrenz mehr zu beobachten.

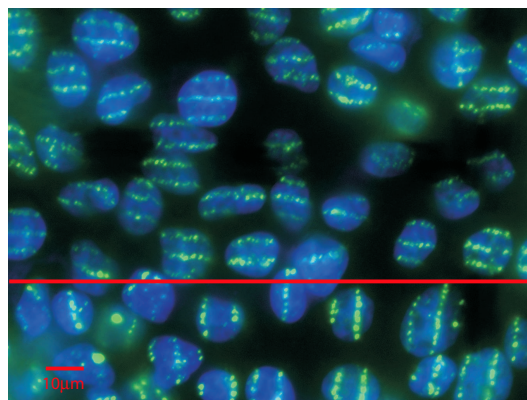




(a) 53BP1;  $\Delta t = 30 \text{ min}$ ;  $t_I = 150 \text{ min}$



(b) 53BP1;  $\Delta t = 120 \text{ min}$ ;  $t_I = 45 \text{ min}$



(c) 53BP1;  $\Delta t = 45 \text{ min}$ ;  $t_I = 20 \text{ min}$

**Abbildung 4.2:** Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen, welche mit 100 MeV Sauerstoffionen kreuzweise, wie im Text beschrieben, bestrahlt wurden. Zwischen der Bestrahlung der waagrechten Linien und der senkrechten Linien liegt eine Zeitspanne  $\Delta t$ . Unterhalb der roten Linie wurde nur die Zweitbestrahlung appliziert.



# Kapitel 5

## Quantifizierung des Konkurrenzeffektes

Der im vorherigen Kapitel beschriebene Konkurrenzeffekt wurde bisher lediglich qualitativ untersucht. Für ein grundlegendes Verständnis des Effekts und zur Abschätzung der Folgen dieser Proteinunterversorgung von Doppelstrangbrüchen für die betroffene Zelle ist eine quantitative Auswertung unerlässlich. Der erste Schritt besteht darin, eine Methodik zu entwickeln, die jedem Zellkern eine Größe zuordnet, welche die Unterversorgung der Zweitbestrahlung beschreibt. Damit ist es dann möglich, auch ein Ensemble von Zellen zu charakterisieren.

### 5.1 Konkurrenzparameter $\zeta$ eines Zellkerns

Die Quantifizierung verlangt die Bestimmung der an die DNA-Schäden der Erst- und Zweitbestrahlung angelagerten Proteinmenge, einer direkt schwer zugänglichen Größe. Mit der in Kapitel 3.2 beschriebenen Technik der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen macht man Proteinkonzentrationen unter dem Mikroskop sichtbar. Nimmt man für die Korrelation zwischen Proteinmenge und Fluoreszenzsignal einen linearen Zusammenhang an, so kann man die Mikroskopaufnahmen zur Bestimmung von Proteinmengen verwenden.

Allerdings gilt dieser Zusammenhang höchstens lokal. Innerhalb einer Aufnahme beobachtet man teilweise recht große Intensitätsunterschiede. So unterliegt die Anlagerung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern während der cytochemischen Aufarbeitung offensichtlich örtlichen Schwankungen innerhalb der Probe. In Abb. 4.2a zeigt das DAPI-Signal einen deutlichen Intensitätsgradienten von rechts nach links. Außerdem werden während der Mikroskopie die Fluorochrome durch das Anregungslicht mit der Zeit funktionell zerstört, was das Signal reduziert. Dieses Ausbleichen ist von der Be-

leuchtungshistorie der Probe abhängig und nur schwer zu kontrollieren. Folglich kann man zwar die Helligkeiten der Bestrahlungslinien bestimmen, diese sind jedoch nur vergleichbar, wenn sie am selben Ort, d.h. idealerweise im selben Zellkern, gemessen wurden. Anderenfalls ist kein Rückschluss auf die Proteinmenge möglich.

Als Konkurrenzparameter wird daher die normierte Differenz der Helligkeiten von Erst- und Zweitbestrahlung definiert:

$$\zeta := \frac{i_1 - i_2}{i_1 + i_2} = \frac{1 - \xi}{1 + \xi} \quad (5.1)$$

Die Größen  $i_1$  und  $i_2$  sind ein Maß für die Helligkeit der Erst- bzw. Zweitbestrahlung.  $\xi = i_2/i_1$  ist das Verhältnis daraus. Da die Größe  $\zeta$  nur vom Verhältnis der Linienhelligkeiten  $\xi$  abhängt, nicht aber von deren absoluter Größe, erlaubt diese die Konkurrenz von unterschiedlichen Zellen, auch aus verschiedenen Proben, zu vergleichen.

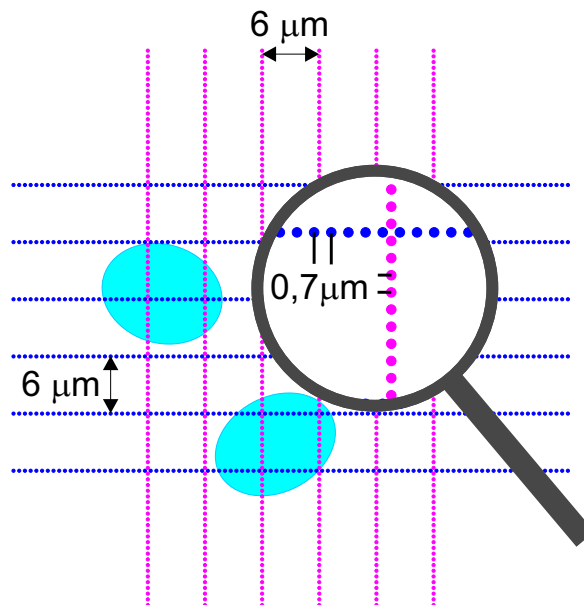
Setzt man die Linienhelligkeit als positive Größe voraus, so liegt  $\zeta$  zwischen  $-1$  und  $1$ . Dabei bedeutet  $\zeta = 0$  keine Konkurrenz, beide Bestrahlungen sind gleich hell.  $\zeta > 0$  bedeutet Konkurrenz, die Erstbestrahlung ist heller als die Zweitbestrahlung. Für maximale Konkurrenz, d.h.  $i_2 = 0$ , gilt  $\zeta = 1$ . Die in Gleichung 5.1 definierte Größe ist antisymmetrisch bezüglich Vertauschung von  $i_1$  und  $i_2$ , d.h. abgesehen vom Vorzeichen ist keine der beiden Größen gegenüber der anderen ausgezeichnet. Eine hellere Zweitbestrahlung liefert  $\zeta < 0$ .

Um die Konkurrenz in einer Zelle zu bestimmen, ist es nach Gleichung 5.1 notwendig, die Helligkeiten der Erst- und Zweitbestrahlung,  $i_1$  und  $i_2$ , zu quantifizieren. Das wesentliche Problem besteht darin, nur die Intensität einer Bestrahlungslinie anzugeben, da zur Intensität an jedem Punkt unter Umständen beide Bestrahlungslinien und der Untergrund, d.h. Intensität, welche nicht durch die Bestrahlung bedingt ist, beiträgt. Dies ist zum einen durch die in Kapitel 3.3 beschriebene unscharfe Abbildung von außerhalb der Fokusebene gelegenen Objekten bedingt und kann durch rechnerbasiertes Entfalten der Mikroskopaufnahmen gelöst werden (Kapitel 5.1.2). Zusätzlich ist die Antwort auf die Ionenbestrahlung räumlich nicht streng begrenzt, sondern besitzt eine gewisse Ausdehnung und zeigt zudem Intensitätsvariationen. In Kapitel 5.1.1 wird daher zuerst beschrieben, wie die Optimierung des Bestrahlungsmusters die Bestimmung des Untergrunds vereinfacht und die Vergleichbarkeit der Linienintensitäten verbessert. Durch Ausnutzen der Symmetrie des Bestrahlungsmusters und die dadurch mögliche Mittelung des Intensitätssignals über äquivalente Bereiche ist es möglich, die verschiedenen Bestrahlungslinien und den Untergrund zuverlässig gegeneinander abzugrenzen. Dies ist in Kapitel 5.1.3 beschrieben.

### 5.1.1 Optimierung des Bestrahlungsmusters

Zur Bestimmung der Intensitäten von Erst-, Zweitbestrahlung und Untergrund ist es notwendig, diese Bereiche gegeneinander abzugrenzen. Dies wird durch einen größeren Abstand der Bestrahlungslinien voneinander, als er in [13] verwendet wurde, erleichtert. Ein Abstand der Linien von  $6\ \mu\text{m}$  hat sich für die Auswertungen im Rahmen dieser Arbeit als sinnvoll erwiesen. Die  $6\ \mu\text{m}$  ergeben sich als Kompromiss zwischen zwei Anforderungen. Einerseits ist ein möglichst großer Linienabstand wünschenswert zur Bestimmung des Intensitätsverlaufs bis in Bereiche, in denen der Untergrund dominiert, um diesen mit kleiner Unsicherheit vom Messsignal abziehen zu können. Andererseits sollte jeder Zellkern von mindestens zwei Linien pro Bestrahlung getroffen werden, so dass die Dosis pro Zelle nicht zu stark schwankt.

Da die beiden Linienintensitäten verglichen werden, ist es vorteilhaft, im Unterschied zu [13], gleiche Geometrie der Erst- und Zweitbestrahlung zu verwenden. Dies bietet den weiteren Vorteil, dass man das bei großer Konkurrenz schwache Signal der Zweitbestrahlung, wie z.B. in Abb. 4.2c, nicht durch eine kleinere Dosis noch weiter vermindert. Für alle weiteren Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde das in Abb. 5.1 skizzierte Muster zur Bestrahlung verwendet. Erst- und Zweitbestrahlung bestehen aus demselben, jedoch um  $90^\circ$  gedrehten Linienmuster. Der Linienabstand beträgt  $6\ \mu\text{m}$ , der Punktabstand  $0,7\ \mu\text{m}$ . Gegenüber den Arbeiten aus [13], welche das Muster in Abb. 4.1 verwendeten, wurde die Dosis der Erstbestrahlung nicht geändert. Die



**Abbildung 5.1:** *Optimiertes Bestrahlungsmuster mit vergrößertem Abstand der Erstbestrahlungslinien und gleicher Geometrie der Erst- und Zweitbestrahlung.*

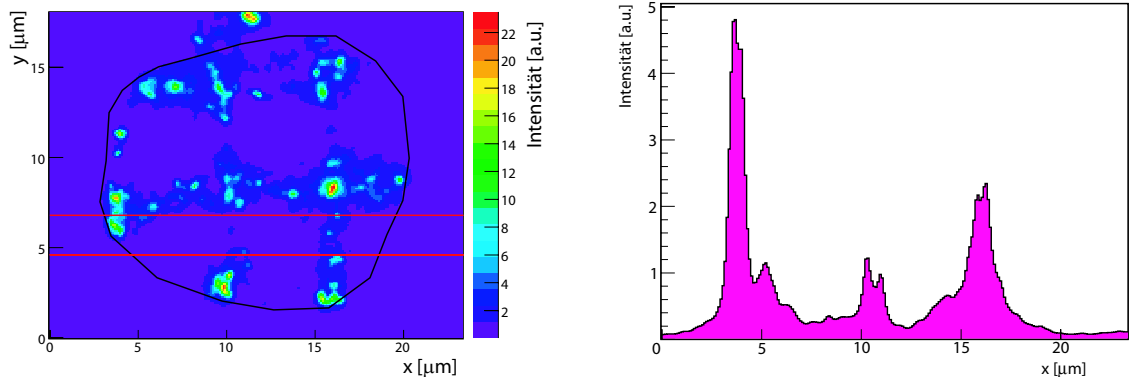
Energiedosis der Zweitbestrahlung wurde verdoppelt und ist damit identisch der der Erstbestrahlung.

### 5.1.2 Entfaltung der Mikroskopaufnahmen

Wie in Kapitel 3.3 dargelegt, liefert die Mikroskopaufnahme keinen Schnitt durch die Leuchtdichteverteilung des Objekts, sondern es trägt auch die Leuchtdichte außerhalb der Fokusebene bei, jedoch an anderer lateraler Position. Die an einem bestimmten Ort gemessene Leuchtintensität ist eine Überlagerung verschiedener Beiträge. Zur Signalstärke an der Erstbestrahlungslinie trägt auch die Zweitbestrahlung bei und umgekehrt. Um diesen Effekt zu minimieren, ist es notwendig, die Aufnahmen vor der Auswertung rechnerbasiert zu entfalten. Hierfür wurde die Entfaltungssoftware Huygens [15] verwendet.

### 5.1.3 Verbesserung der Statistik

Zur Bestimmung des Konkurrenzparameters  $\zeta$  müssen die Linienintensitäten vermessen werden. Obwohl immer der Begriff Bestrahlungslinien verwendet wird, so bestehen diese dennoch aus einzelnen Ionentreffern, was sich auch im Fluoreszenzbild widerspiegelt. Aus Abb. 5.2a ist ersichtlich, dass die Linien aus einzelnen, verschieden hellen Foci bestehen. Zusätzlich schwankt die Leuchtintensität aufgrund von Schwankungen der DNA-Dichte. Liegt z.B. ein Nukleolus auf der Bestrahlungslinie, so wird die Intensität dort gegen Null gehen. Nukleoli sind Untereinheiten des Zellkerns, die nur wenig DNA beinhalten, so dass dort auch nur wenige Doppelstrangbrüche induziert werden und sich entsprechende Reparaturproteine nicht anhäufen. Zusätzlich sind die



(a) farbkodiertes 53BP1-Signal.

(b) Linienprofil: Mittelung des Intensitätssignals des in (a) markierten Bereichs auf die X-Achse.

**Abbildung 5.2:** Mit 55MeV Kohlenstoffionen kreuzbestrahlte HeLa-Zelle.

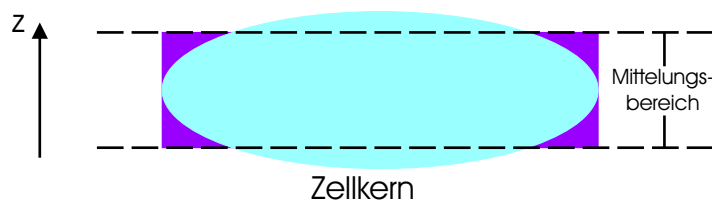
Foci nicht ortsfest. Sie zeigen eine diffusionsähnliche Bewegung [13] und können zu größeren Foci angehäuft werden, wodurch im Bereich der Bestrahlungslinien größere Lücken mit geringer Intensität entstehen.

In Abb. 5.2b ist die X-Projektion einer Fluoreszenzaufnahme von markierten 53BP1-Proteinen einer kreuzbestrahlten Zelle aufgetragen. Bei  $x = 4 \mu m$  und  $x = 16 \mu m$  sind deutlich die beiden Zweitbestrahlungslinien zu erkennen. Die dritte Linie bei  $x = 10 \mu m$  ist wesentlich schwächer ausgeprägt. Die Frage, welchen Bereich muss man den Bestrahlungslinien zuordnen und was muss man als Untergrund betrachten, ist aus diesem Schnitt nicht zu entscheiden. Die Abgrenzung der verschiedenen Bereiche — Erstbestrahlung, Zweitbestrahlung und Untergrund — ist jedoch Voraussetzung, um den Linien einen sinnvollen Intensitätswert zuzuordnen. Die Abgrenzung wird noch schwieriger, wenn man Proben betrachtet, die starke Konkurrenz zeigen, wie z.B. Abb. 4.2c. Rechnet man Intensität der Erstbestrahlung fälschlicherweise zur Zweitbestrahlung, so wird der Fehler aufgrund der deutlich helleren Erstbestrahlung recht groß und der Wert ist nicht mehr aussagekräftig.

Die Ursache für die in Abb. 5.2 nicht mögliche Abgrenzung liegt in dem kleinen betrachteten Gebiet und der damit verbundenen schlechten Statistik. Diese kann durch geschickte Mittelung deutlich verbessert werden.

### 5.1.3.1 Mittelung in Z-Richtung

Die Entfaltung liefert einen Z-Stapel von Bildern, welche die Leuchtdichteverteilung des Objekts in jeder Ebene widerspiegelt. Jedes Bild beschreibt aber eine andere Schnittebene durch das Objekt. Da die Strahlrichtung mit der Blickrichtung des Mikroskops identisch ist, liegt der Auftreffpunkt eines Ions und damit die induzierten Schäden in jedem Bild an derselben Stelle. Das Signal der Bestrahlungslinien ist in Z-Richtung korreliert, nicht jedoch die statistischen Schwankungen. Durch eine Mittelung über mehrere solcher Schnitte berücksichtigt man einen deutlich größeren Teil des Zellkerns und verbessert die Statistik.

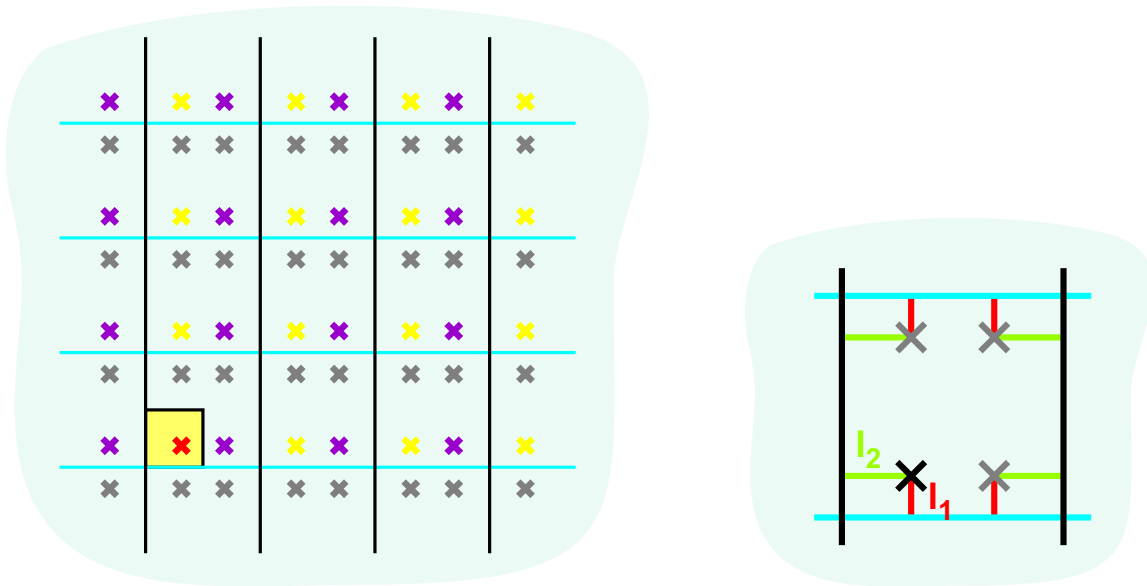


**Abbildung 5.3:** Mittelt man in Z-Richtung, d.h. über mehrere Schnitte, so verfälschen die violett gekennzeichneten Bereiche außerhalb des Zellkerns das Ergebnis.

Allerdings berücksichtigt man hierbei aufgrund der ellipsoidalen Form der Zellkerne, im Randbereich Intensitäten von außerhalb des Zellkerns, die deutlich geringer sind und das Ergebnis verfälschen, wie in Abb. 5.3 skizziert. Um diesen Fehler zu begrenzen, darf der Mittelungsbereich nicht zu groß gewählt werden. Bei der konkreten Auswertung wurde über alle Schnitte gemittelt, welche eine Verkleinerung des Zellkerns aufgrund der rundlichen Form nicht erkennen lassen. Dies sind im Mittel sechs Schnitte. Bei dem verwendeten Schnittabstand von  $0,25 \mu\text{m}$  entspricht das einer Höhe von  $1,5 \mu\text{m}$ .

Diese Mittelung in Z-Richtung wurde mit dem Bildbearbeitungs- und Analysewerkzeug ImageJ [16] durchgeführt. Für jede zu analysierende Zelle wurde eigens der Bereich zur Z-Mittelung bestimmt. Der Z-Stapel des zu untersuchenden Proteins und des Schadensmarkers  $\gamma\text{-H2AX}$  wurde mittels der Funktion „Z Projection“ und der Option „Average Intensity“ gemittelt.

### 5.1.3.2 Ausnutzung der Symmetrie des Bestrahlungsmusters



(a) Beispiel für äquivalente Punkte: Die gelben Punkte sind aufgrund der Gittersymmetrie gleichberechtigt zum roten Referenzpunkt. Die violetten und grauen Punkte unterscheiden sich nur durch eine Achsenspiegelung an einer der Bestrahlungslinien von den gelben Punkten und sind ebenfalls zu dem Referenzpunkt gleichberechtigt.

(b) alle gleichberechtigten Punkte besitzen zur nächstgelegenen Erst- und zur nächstgelegenen Zweitbestrahlungslinie gleichen Abstand  $l_1$  bzw.  $l_2$ .

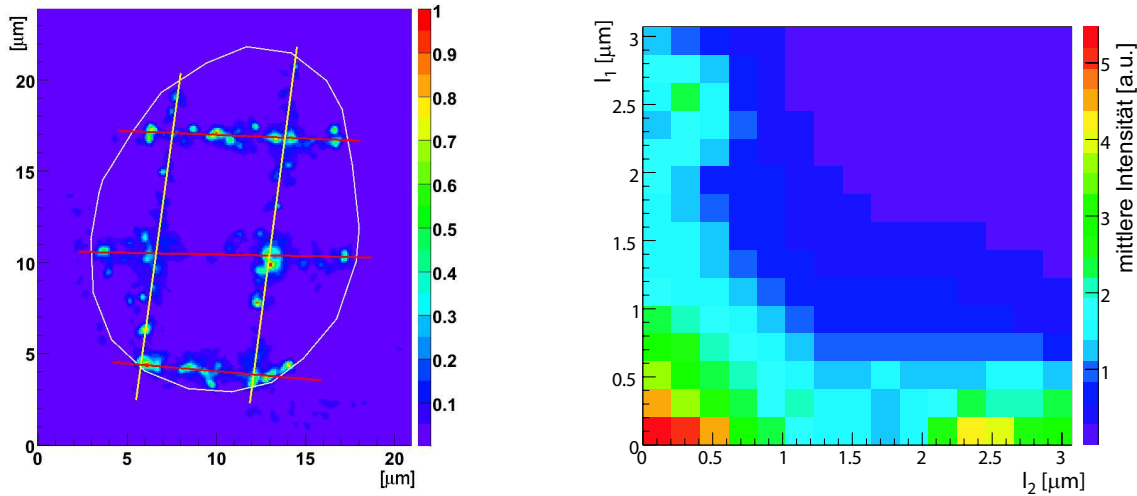
**Abbildung 5.4:** Aufgrund der Symmetrie des Bestrahlungsmusters existieren zu jedem Punkt viele äquivalente Punkte mit der selben Bestrahlungsumgebung.



Der zweite Schritt zur Verbesserung der Statistik nutzt die Symmetrien des Bestrahlungsmusters. Neben der Gittersymmetrie besitzt dies Paare aufeinander senkrecht stehender Symmetrieachsen.

Die Leuchtintensität an einem bestimmten Punkt ist von den in seiner Umgebung erfolgten Ionentreffern abhängig. Besitzen zwei Punkte diesbezüglich dieselbe Umgebung, so ist dort auch dieselbe Leuchtintensität zu erwarten. Aufgrund der Symmetrie gibt es viele solcher Punkte, wie in Abb. 5.4a dargestellt ist. Die gelben Punkte besitzen aufgrund der Gittersymmetrie dieselbe Umgebung wie der rote Referenzpunkt. Die Umgebung der violetten Punkte unterscheidet sich nur durch eine Achsenspiegelung von der Umgebung des Referenzpunktes. Da keine Vorzugsrichtung existiert, darf dies keinen Einfluss auf die Helligkeit an diesen Punkten haben. Analoges gilt für die grauen Punkte.

Jeder Punkt lässt sich durch Symmetrieoperationen in den in Abb. 5.4 gelb markierten Bereich abbilden. Beschränkt man sich nun auf ein Viertel der Einheitszelle, z.B. den gelb markierten Bereich, und mittelt dafür über diese gleichberechtigten Punkte aus den verschiedenen äquivalenten Bereichen, so mitteln sich Fluktuationen heraus und man kann die Linienform, v.a. Breite und Intensität besser beurteilen.



(a) farbkodiertes 53BP1-Signal mit eingezeichnetem Zellkernrand und markierten Bestrahlungslinien.

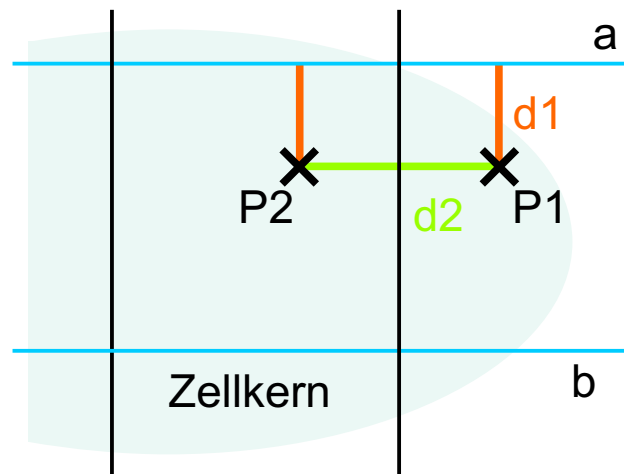
(b) Intensitätssignal nach Mittelung über alle äquivalenten Bereiche des nebenstehenden Zellkerns.

**Abbildung 5.5:** *Einbeziehung der Symmetrie des Bestrahlungsmusters.*

Für die konkrete Auswertung nutzt man aus, dass alle gleichberechtigten Punkte, wie in Abb. 5.4b dargestellt, jeweils den selben Abstand,  $l_1$  und  $l_2$ , zur nächstliegenden Erst- und nächstliegenden Zweitbestrahlungslinie besitzen. Dazu bestimmt man

durch visuelles Betrachten der Fluoreszenzsignale Geraden, welche die ursprünglichen Bestrahlungslinien möglichst gut beschreiben. Ein Beispiel hierfür ist in Abb. 5.5a dargestellt. Anhand dieser Referenzgeraden berechnet man für jeden Pixel  $l_1$  und  $l_2$  und mittelt die Intensität aller Pixel, welche in einem bestimmten  $l_1$ - $l_2$ -Bereich liegen und trägt diesen Mittelwert in den entsprechenden Bereich ein.

Dies ist in Abb. 5.5b dargestellt. Deutlich erkennt man die größere Intensität entlang der Achsen, d.h. bei kleinem  $l_1$  oder  $l_2$  nahe den Bestrahlungslinien. Die Erstbestrahlungslinie,  $l_1 = 0$ , wird auf die X-Achse abgebildet, die Zweitbestrahlungslinie auf die Y-Achse,  $l_2 = 0$ . Der Bereich in der rechten oberen Ecke repräsentiert die Pixel, welche etwa in der Mitte zwischen den Bestrahlungslinien liegen und deshalb geringe Intensität aufweisen.



**Abbildung 5.6:** Die Symmetrie ist durch den endlichen Zellkern verletzt.  $P_1$  und  $P_2$  sind nicht mehr gleichberechtigt.

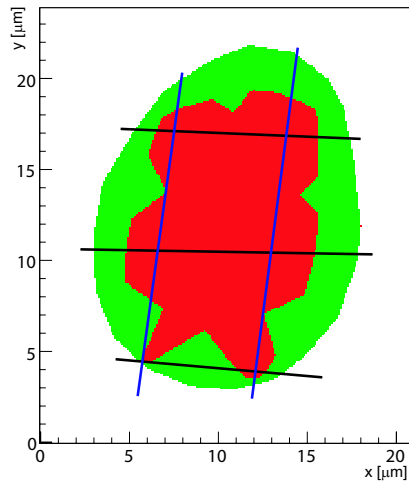
Bis jetzt wurde die begrenzte Ausdehnung des Zellkerns, welche die Symmetrie verletzt, außer Acht gelassen. Dies ist in Abb. 5.6 skizziert. Die Bestrahlungspunkte sind zwar um  $P_1$  und  $P_2$  gleich verteilt, allerdings gibt es außerhalb des Zellkerns keine DNA und damit keine Doppelstrangbrüche. Ein Teil der in  $P_2$  beobachteten Intensität ist durch die Erstbestrahlungslinie  $a$  bedingt. Der dazu korrespondierende Linienabschnitt für  $P_1$  liegt jedoch schon außerhalb des Zellkerns, so dass dieser keinen Beitrag zu der am Punkt  $P_1$  gemessenen Intensität liefert. Um solche Fälle auszuschließen werden nur Pixel berücksichtigt, deren Abstand  $l_R$  zum Zellkernrand größer ist als sowohl  $l_1$  als auch  $l_2$ .

$$l_R > l_1 \quad \text{und} \quad l_R > l_2 : \quad (5.2)$$

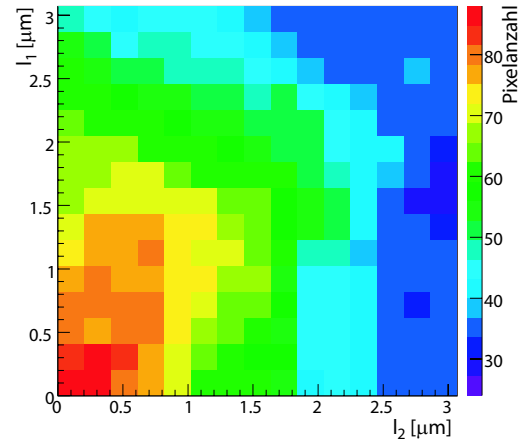
In Abb. 5.5b sind diese Randpixel bereits ausgeschlossen.

Die Bereiche des Beispielzellkerns aus Abb. 5.5a, welche die Bedingung aus Gleichung 5.2 nicht erfüllen und deshalb nicht weiter berücksichtigt werden, sind in Abb. 5.7a grün markiert. Der rot markierte Bereich geht in die weitere Auswertung ein.

Abb. 5.7b stellt die Pixelhäufigkeit in Abhängigkeit von  $l_1$  und  $l_2$  dar. Der dargestellte Wert gibt für jeden Bin die Anzahl der Rohdatenpixel an, die zur Bestimmung der mittleren Intensität in Abb. 5.5b herangezogen werden. Da die gewählte Binstgröße zwei auf zwei Rohdatenpixel beträgt, liegen jeweils maximal vier Pixel in demselben, bezüglich der Bestrahlungsumgebung, äquivalenten Bereich. Ein Viertel der Pixelhäufigkeit gibt die Anzahl dieser verschiedenen, äquivalenten Bereiche an, die berücksichtigt wurden und ist somit ein Maß für die Verbesserung der Statistik. Dieses liegt bei diesem Beispielzellkern zwischen 7 für die Bereiche abseits der Bestrahlungslinien und über 20 an den Kreuzungspunkten, was aus Abb. 5.7b in einer Pixelhäufigkeit zwischen 28 und über 80 resultiert.



(a) Aufgrund von Randeffekten werden die Pixel des grün markierten Bereichs des Beispielzellkerns für die Auswertung nicht weiter berücksichtigt.



(b) Anzahl der Rohdatenpixel (Pixelhäufigkeit), die zur Berechnung des Intensitätsmittels herangezogen werden, in Abhängigkeit von  $l_1$  und  $l_2$ . Diese nimmt mit zunehmendem Abstand von den Bestrahlungslinien wegen Bedingung aus Gleichung 5.2 ab.

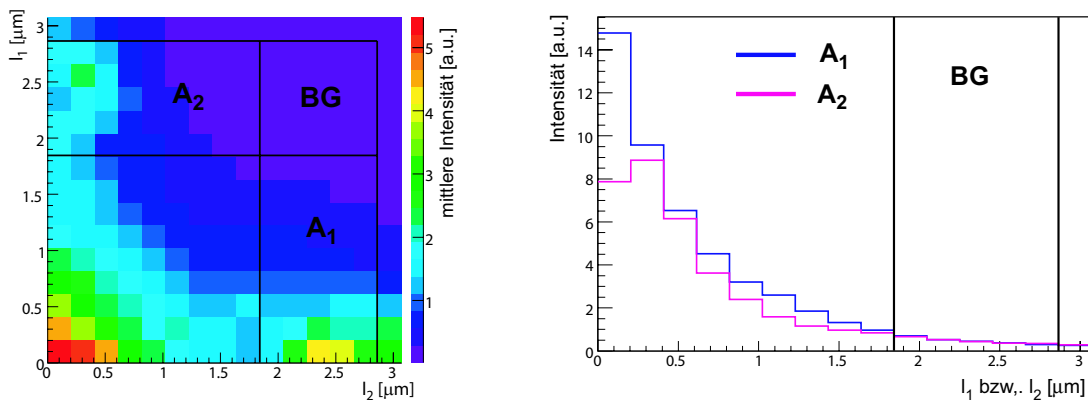
**Abbildung 5.7:** Auswirkungen der Nichtberücksichtigung der Randpixel aufgrund von Bedingung 5.2.

### 5.1.4 Abgrenzung von Untergrund, Erst- und Zweitbestrahlung und Bestimmung der Linienintensitäten

In dieser gemittelten Auftragung aller äquivalenten Probenbereiche ist es nun möglich, Subbereiche zu definieren, deren Intensität ausschließlich von Erst- bzw. Zweitbestrahlung herrührt. Um die Statistik zu verbessern, sind diese Bereiche möglichst groß zu wählen.

Für die Auswertung wurden die in Abb. 5.8a eingezeichneten Grenzen verwendet. Die beiden Bereiche  $A_1$  und  $A_2$  sind so definiert, dass die jeweils andere Bestrahlungslinie nur noch vernachlässigbare Beiträge zur Intensität liefert. Dies ist in Abb. 5.8b anhand des Beispielzellkerns gezeigt. Dort ist die Projektion des Bereichs  $A_1 + BG$  bzw.  $A_2 + BG$  auf die  $l_1$ - bzw.  $l_2$ -Achse geplottet. Für Abstände vom Kreuzungspunkt  $(0,0)$  von mehr als  $1,8 \mu\text{m}$  unterscheiden sich die beiden Signale kaum noch und sind nahezu konstant. Dieser Wert wurde als untere Grenze für den Abstand der Bereiche  $A_1$  bzw.  $A_2$  von der jeweils anderen Bestrahlungslinie gewählt. Er erweist sich auch für die anderen im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Zellkerne als sinnvoll. Er kann jedoch von verschiedenen Parametern, wie z.B. dem untersuchten Protein abhängen und bedarf deshalb stetiger Kontrolle.

Die Breiten dieser Linienprofile haben verschiedene Ursachen. Die Foci selbst besitzen eine gewisse Ausdehnung und liegen aufgrund ihrer Eigenbewegung und der endlichen Strahlaufösung nicht exakt auf einer Geraden. Diese Effekte wurden bereits



(a) Die Bereiche  $A_1$  bzw.  $A_2$  sind von der Erst- bzw. Zweitbestrahlung dominiert. Aus dem Bereich  $BG$  kann der Untergrund bestimmt werden.

(b) Linienprofile der Erst- und Zweitbestrahlung.

**Abbildung 5.8:** Abgrenzung der Erst- und Zweitbestrahlung und des Untergrunds gegeneinander.

in [13] näher untersucht. Der dritte Beitrag ist durch die nicht exakte Übereinstimmung der Referenzgeraden zur Abstandsbestimmung mit den wahren Bestrahlungslinien bedingt. Solange die Abweichung zwischen Referenzgerade und wahrer Bestrahlungslinie jedoch nicht so groß wird, dass die Intensität der Linie jenseits der oben festgelegten Grenze von  $1,8\ \mu\text{m}$  nicht mehr vernachlässigbar ist, hat diese Abweichung keinen Einfluss auf die Fläche unter der Kurve und damit auf die Intensität der Linie.

Als Grenze für den maximalen Abstand der Bereiche  $A_1$ ,  $A_2$  und  $BG$  von den Bestrahlungslinien wurde ein Wert von etwa  $2,9\ \mu\text{m}$  gewählt. Aufgrund der Unsicherheit bei der manuellen Festlegung der Referenzgeraden betragen deren Abstände nicht immer exakt  $6\ \mu\text{m}$ . Sind diese kleiner, so nimmt die Häufigkeit der Pixel im Bereich  $l_1 \approx 3\ \mu\text{m}$  bzw.  $l_2 \approx 3\ \mu\text{m}$  stark ab, so dass in der gemittelten Auftragung in Abb. 5.5b für einige Bins in diesem Bereich nur noch über wenige Punkte gemittelt wird oder sogar keine Punkte mit diesem  $l_1$  und  $l_2$  existieren. Deshalb wurden Pixel mit einem  $l_1$  oder  $l_2$ , das größer als  $2,9\ \mu\text{m}$  ist, nicht weiter berücksichtigt.

Man definiert die Linienintensitäten  $i_1$  und  $i_2$  wie folgt:

$$i_{1/2} = \int_{A_{1/2}} (I(l_1, l_2) - \overline{bg}) \, dl_1 \, dl_2 \quad (5.3)$$

$$\begin{aligned} A_1 &= \{(l_1, l_2) \mid l_1 \in [0\ \mu\text{m}, 1,84\ \mu\text{m}] \text{ und } l_2 \in [1,84\ \mu\text{m}, 2,86\ \mu\text{m}]\} \\ A_2 &= \{(l_1, l_2) \mid l_1 \in [1,84\ \mu\text{m}, 2,86\ \mu\text{m}] \text{ und } l_2 \in [0\ \mu\text{m}, 1,84\ \mu\text{m}]\} \end{aligned} \quad (5.4)$$

Wobei  $I(l_1, l_2)$  die gemittelte Intensität in Abhängigkeit der Linienabstände  $l_1$  und  $l_2$  ist, wie in Abb. 5.5b dargestellt. Die mittlere Intensität  $\overline{bg}$  des Untergrunds ist definiert durch:

$$\overline{bg} = \frac{\int_{BG} I(l_1, l_2) \, dl_1 \, dl_2}{\int_{BG} dl_1 \, dl_2} \quad (5.5)$$

$$BG = \{(l_1, l_2) \mid l_1 \text{ und } l_2 \in [1,84\ \mu\text{m}, 2,86\ \mu\text{m}]\} \quad (5.6)$$

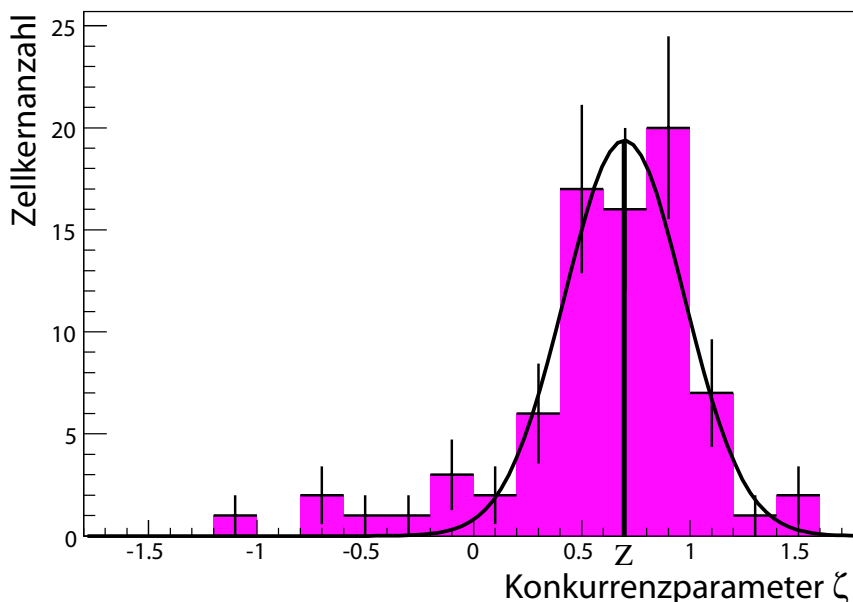
Mit der Definition 5.1 kann hieraus der Konkurrenzparameter  $\zeta$  berechnet werden. Die ungeraden Grenzen ergeben sich aufgrund des verwendeten pixelbasierten Binnings, wobei ein Pixel  $102,3\ \text{nm}$  breit ist.

Zur konkreten Auswertung wurde zuerst mit Hilfe eines selbst programmierten, auf dem Datenanalysesystem root [17] basierenden Programms anhand des DAPI-Signals der Zellkernrand markiert. Die zur Abstandsbestimmung verwendeten Referenzgeraden werden unter Zuhilfenahme des Signals des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ -H2AX oder des zu untersuchenden Proteins eingezeichnet. Dieses Programm berechnet weiter die Abstände  $l_1$  und  $l_2$  aller Pixel und nach dem oben beschriebenen Schema den Konkurrenzparameter  $\zeta$  für die analysierte Zelle.

## 5.2 Konkurrenzparameter $Z$ einer Probe

Im Experiment werden in einer Probe normalerweise viele Zellen auf einmal bestrahlt. Alle Zellkerne einer Probe besitzen somit gleiches  $\Delta t$  und  $t_I$ . Um einen Überblick über die vorkommenden Konkurrenzparameter und deren Häufigkeit in einer bestimmten Probe zu gewinnen, trägt man die Werte aller Zellkerne in ein Histogramm ein, wie dies in Abb. 5.9 dargestellt ist. Ist die Verteilung in guter Näherung gaußförmig, wie alle im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen  $\zeta$ -Verteilungen, so bestimmt man mit einem Gaußfit den Schwerpunkt  $Z$  der Verteilung und mit dessen Fehler die statistische Unsicherheit  $\delta Z$ .

Die Größe  $Z \pm \delta Z$  beschreibt, unter der Einschränkung, dass die  $\zeta$ -Verteilung gaußförmig ist, die Konkurrenz, welche eine Probe bezüglich eines bestimmten Proteins zeigt. Die anschaulichere Größe ist jedoch das Verhältnis der Intensitäten der Erst- und Zweitbestrahlung. Wendet man den Zusammenhang des Konkurrenzparameters  $\zeta$  einer Zelle und des Linienintensitätsverhältnisses  $\xi$  einer Zelle aus Gleichung 5.1 auch auf die ganze Probe an, so definiert man durch die Umkehrung von Gleichung 5.1 eine Größe  $\Xi$ , welche das Intensitätsverhältnis der Antworten auf Erst- und Zweitbestrahlung näherungsweise beschreibt, im Allgemeinen aber nicht mit dem Mittelwert der



**Abbildung 5.9:**  $\zeta$ -Spektrum:  $\Delta t = 50 \text{ min}$ ;  $t_I = 30 \text{ min}$ ; verwendete Ionensorte: Sauerstoff mit 100 MeV Energie.

$\xi$ -Verteilung identisch ist.

$$\Xi := \frac{1 - Z}{1 + Z} \quad (5.7)$$

Mittels linearer Fehlerfortpflanzung ergibt sich für den Fehler dieser Größe  $\delta\Xi$ :

$$\delta\Xi = \frac{2 \cdot \delta Z}{(1 + Z)^2} \quad (5.8)$$

Die direkte Bestimmung des Linienintensitätsverhältnisses durch Mittelung der  $\xi$ -Werte der einzelnen Zellen einer Probe ist problematisch. Aufgrund der Singularität der Größe  $\xi = i_2/i_1$  bei  $i_1 = 0$  treten viele große Ausreißer auf, deren Behandlung Probleme bereitet. Aus dem selben Grund sind die  $\xi$ -Verteilungen asymmetrisch. Die Beschreibung der Konkurrenz durch die Größen  $\zeta$  und  $Z$  hat sich im Rahmen dieser Arbeit als stabiler erwiesen.

### 5.3 Abschätzung der applizierten Energiedosis in einer Zelle

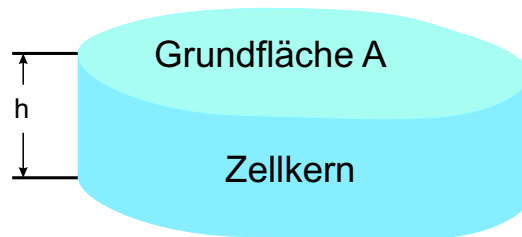
Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit der in Kapitel 4 beschriebenen Konkurrenzeffekte wird im Folgenden eine Methode zur retrospektiven Abschätzung der durch Erst- oder Zweitbestrahlung applizierten Energiedosis beschrieben.

Hierzu wird ein vereinfachtes Zellkernmodell mit beliebig geformter Grundfläche  $A$  und konstanter Höhe  $h$ , wie in Abb. 5.10 skizziert, angenommen.

Die Energiedosis  $D_1$  der Erstbestrahlung berechnet sich wie folgt:

$$D_1 = \frac{E_1}{m} = \frac{N_1 \cdot LET \cdot h}{\rho_{H_2O} \cdot A \cdot h} \quad (5.9)$$

Hierbei ist  $E_1$  die durch die Erstbestrahlung im Zellkern deponierte Energie, welche sich aus der Anzahl der Iontentreffer  $N_1$ , dem  $LET$ -Wert und der Zellkernhöhe berechnet. Die Masse  $m$  des Zellkerns ergibt sich aus dessen Volumen  $A \cdot h$  und der Dichte von Wasser  $\rho_{H_2O}$ .



**Abbildung 5.10:** Für die Dosisabschätzung verwendetes Zellkernmodell mit Grundfläche  $A$  und konstanter Höhe  $h$ .

Die Zellkernquerschnittsfläche  $A$  lässt sich aus der Zellkernmarkierung, welche in 5.1.4 verwendet wurde, bestimmen. Die Trefferanzahl  $N_1$  berechnet sich aus dem Abstand der Trefferpunkte  $d_1$  und der Gesamtlänge  $L_1$  der Erstbestrahlungslinien innerhalb des Zellkerns. Hierzu wurde die Länge der Referenzgeraden aus Abb. 5.5a innerhalb der Zellkernmarkierung bestimmt.

Somit lässt sich 5.9 folgendermaßen umschreiben:

$$D_1 = \frac{L_1 \cdot LET}{d_1 \cdot \rho_{H_2O} \cdot A} \quad (5.10)$$

Analog dazu kann die Energiedosis der Zweitbestrahlung abgeschätzt werden.

Diese Methode liefert nur Näherungswerte, da Zellkerne im Allgemeinen eine runde Form besitzen und die Höhe zum Rand hin abnimmt. Hierdurch wird der Energieeintrag durch Iontreffer in den Randbereichen überbewertet, da die Zellkernhöhe dort geringer ist als die mittlere Zellkernhöhe und das Modell die Spurlänge des Ions im Zellkern überschätzt. In der Mitte des Zellkerns ist dies genau umgekehrt.



# Kapitel 6

## Durchgeführte Messungen

In Kapitel 4 wurden an HeLa-Zellen beobachtete Konkurrenzeffekte in der Verteilung des Proteins 53BP1 auf zu unterschiedlichen Zeiten induzierte Doppelstrangbrüche beschrieben. Hierbei hängt die Versorgung der DNA-Schäden von der Bestrahlungsvorgeschichte ab, so dass eine erste Bestrahlung die Versorgung von etwa 45 *min* später induzierten Doppelstrangbrüchen nahezu komplett unterdrücken kann. Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente war die quantitative Untersuchung dieser Effekte. Die hierzu entwickelte Methodik zur Quantifizierung anhand der Fluoreszenzaufnahmen ist in Kapitel 5 beschrieben.

Betrachtet wurden das Protein 53BP1 und das als Reaktion auf Doppelstrangbrüche phosphorylierte Histon  $\gamma$ -H2AX. Im Mittelpunkt stand die Abhängigkeit der Konkurrenz vom Zeitparameter  $\Delta t$ , der die Zeitspanne zwischen den beiden Bestrahlungen angibt und von null Minuten bis vier Stunden variiert wurde. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit des Konkurrenzparameters von den Energiedosen der Erst- bzw. Zweitbestrahlung studiert.

Wie in Kapitel 4.2 näher beschrieben, wurden hierzu HeLa-Zellen zweimal bestrahlt, wobei die in Abbildung 5.1 skizzierte Geometrie verwendet wurde. In zwei Messreihen mit 100 MeV Sauerstoff bzw. 55 MeV Kohlenstoff betrug der zweite Zeitparameter, die Inkubationszeit  $t_I$ , immer eine halbe Stunde. Insgesamt wurden knapp 600 Zellkerne analysiert. Die genauen Parameter sind aus Tabelle 6.1 zu entnehmen.

### 6.1 Die Zeitparameter $\Delta t$ und $t_I$ im Experiment

In Kapitel 4.2 wurden die beiden Zeitparameter  $\Delta t$  und  $t_I$  durch die einfach zu bestimmenden Zeitpunkte, Ende der Erst- bzw. Zweitbestrahlung und Beginn der Fixierung, definiert. Zwar dauert die Bestrahlung etwa 6 – 7 Minuten, da jedoch die Probe bei der Erst- als auch der Zweitbestrahlung mit ähnlicher Geschwindigkeit und in gleicher

(a) Bestrahlungen mit 100 MeV $^{16}\text{O}$			(b) Bestrahlungen mit 55 MeV $^{12}\text{C}$		
$\Delta t$ [min]	$t_I$ [min]	Anzahl analysierter Zellkerne	$\Delta t$ [min]	$t_I$ [min]	Anzahl analysierter Zellkerne
0	30	14	10	30	30
11	30	12	17	30	21
30	30	48	37	30	26
50	30	88	43	30	29
61	30	35	60	30	27
92	31	49	63	30	20
124	30	52	73	30	16
242	30	49	103	30	26
			135	30	35
			246	32	16

**Tabelle 6.1:** Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Bestrahlungen, dabei wurde gleichzeitig das Protein 53BP1 und  $\gamma$ -H2AX untersucht.

Richtung von oben nach unten abgerastert wird, beträgt der Zeitunterschied zwischen der Applikation der beiden Bestrahlungen auch für jede Zelle in guter Näherung  $\Delta t$ . Allerdings variiert die Zeit zwischen Zweitbestrahlung und Fixierung für die Zellen einer Probe um diese 6 – 7 Minuten.

Für den Ablauf von biochemischen Prozessen ist die Temperatur von entscheidender Bedeutung. Sie bestimmt die Geschwindigkeit, mit welcher diese Vorgänge ablaufen. Da die Zellen, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, während der Bestrahlung nicht temperiert werden, kühlen diese vor und während der Bestrahlung bis auf Raumtemperatur ab. Die Bestrahlungsprozedur — Vorbereitung und Einbau der Zellbehälter, Auffinden des zu bestrahlenden Bereichs, die Bestrahlung selbst und der Ausbau der Probe — dauert etwa 20 min und läuft bis auf kleine Schwankungen von maximal  $\pm 4$  Minuten reproduzierbar ab. Aufgrund der geringeren Temperatur der Zellen am Bestrahlungsplatz trägt hauptsächlich die Verweildauer im Brutschrank zur Ausbildung der Zellantwort auf die Bestrahlung bei. Befinden sich die Zellen zwischen und nach der Bestrahlung lange genug, jeweils mindestens 10 – 15 min, im Brutschrank, so sind die beiden Zeitparameter  $\Delta t$  und  $t_I$  zur Charakterisierung der Proben geeignet.

Befinden sich die Zellen jedoch zwischen den Bestrahlungen nur noch kurz oder gar nicht mehr im Brutschrank, so hängt die Dynamik des DNA-Reparaturprozesses wesentlich von der Temperatur am Bestrahlungsplatz ab. Dies ist der Fall, wenn man das Verhalten bei kleinen  $\Delta t$ -Werten untersucht. Die dann nur noch schlecht definierte Temperatur kann beträchtliche systematische Fehler zur Folge haben.

Trotz dieser möglichen systematischen Fehler wurde auf die Betrachtung kurzer Zeiten nicht verzichtet. Für die Messwerte  $10 \text{ min} < \Delta t < 20 \text{ min}$  wurde den Proben zuerst die Erstbestrahlung appliziert und direkt im Anschluss die Zweitbestrahlung.

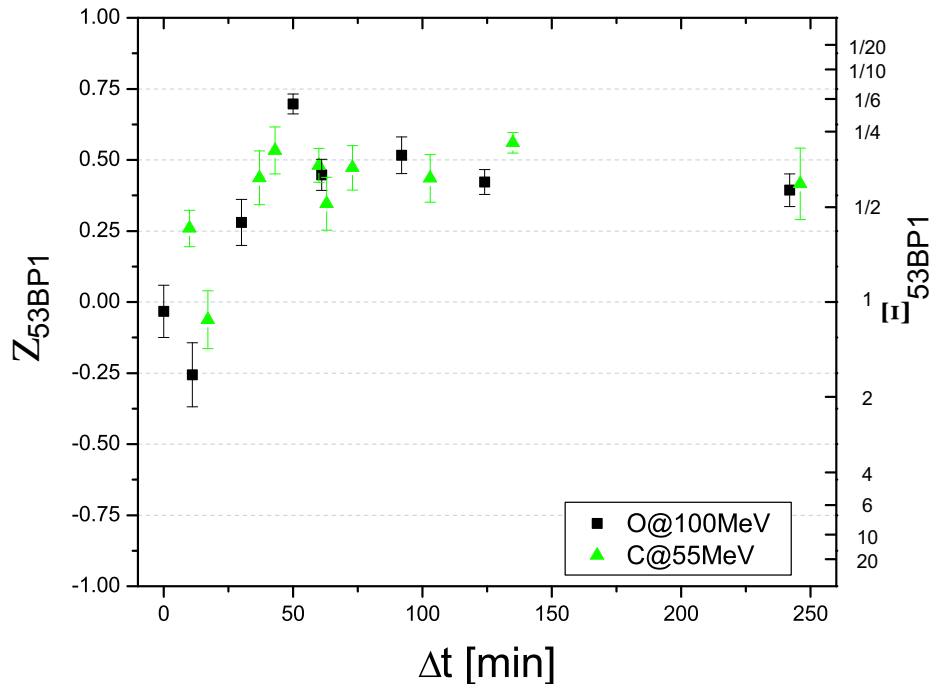
Bei der Interpretation sind jedoch die angesprochenen systematischen Probleme zu beachten.

Zusätzlich wurde mit Sauerstoffionen ein Messwert  $\Delta t = 0 \text{ min}$  aufgenommen. Hierzu wurde die Menge der Trefferpunkte beider Bestrahlungsmuster nach Y-Koordinaten sortiert und in dieser Reihenfolge appliziert, so dass alle Iontentreffer, die eine Zelle erfährt, innerhalb von etwa fünf Sekunden erfolgen. Da beide Bestrahlungen gleichzeitig appliziert werden, ist die Temperatur und damit die Geschwindigkeit, mit welcher Vorgänge in der Zelle zwischen den Bestrahlungen ablaufen, nicht von Bedeutung. Somit ist auch der oben diskutierte Fehler klein.

## 6.2 53BP1

### 6.2.1 Abhängigkeit des Konkurrenzparameters von der Zeitdauer zwischen Erst- und Zweitbestrahlung $\Delta t$

#### 6.2.1.1 Bestrahlung mit Sauerstoffionen bei 100 MeV



**Abbildung 6.1:** Verlauf des Konkurrenzparameters  $Z_{53BP1}$  und des Linienintensitätsverhältnis  $I_{53BP1}$  für HeLa-Zellen in Abhängigkeit von  $\Delta t$  bei konstanter Inkubationszeit  $t_I = 30 \text{ min}$ . Die durch Erst- und Zweitbestrahlung applizierte Energiedosis betrug für die Sauerstoffionen jeweils etwa 15 Gy und für die Kohlenstoffionen jeweils etwa 11 Gy.

Abbildung 6.1 zeigt den Verlauf des Konkurrenzparameters  $Z_{53BP1}$  für das Protein 53BP1 in Abhängigkeit der Zeitdauer  $\Delta t$  zwischen Erst- und Zweitbestrahlung. Die Fehlerbalken beziehen sich auf den statistischen Fehler, wie in Kapitel 5.2 beschrieben.

Die schwarzen Messpunkte wurden nach Bestrahlung mit Sauerstoffionen bestimmt. Abgesehen von dem Wert bei  $\Delta t = 11 \text{ min}$  steigt der Konkurrenzparameter von Null beginnend bis zum Maximum bei  $\Delta t = 50 \text{ min}$  an. Jenseits davon nimmt dieser mit zunehmendem  $\Delta t$  leicht, aber dennoch signifikant ab.

Der Wert bei  $\Delta t = 11 \text{ min}$  beträgt  $Z = -0,26 \pm 0,11$ . Der negative Wert kann auch mit den in Kapitel 6.1 besprochenen Temperierungsproblemen nicht erklärt werden. Ein Verdrehen der Probe und damit ein Vertauschen von Erst- und Zweitbestrahlung, was diesen negativen Wert erklären würde, kann ausgeschlossen werden. Im Folgenden wird dieser Wert als Ausreißer betrachtet.

Werden die beiden Bestrahlungen, also waagrechte und senkrechte Linienmuster, gleichzeitig appliziert, so werden auch die hierdurch induzierten Doppelstrangbrüche gleichmäßig mit 53BP1 versorgt. Bei der Bestrahlung und folglich auch bei der Antwort hierauf ist keines der beiden Muster ausgezeichnet. Der Konkurrenzparameter für  $\Delta t = 0$  ist mit Null verträglich.

Vergrößert man  $\Delta t$ , so wird die Zweitbestrahlung immer weniger mit 53BP1 versorgt, der Konkurrenzparameter steigt bis  $\Delta t = 50 \text{ min}$  auf  $Z = 0,70 \pm 0,04$  an. Dies entspricht einer Zweitbestrahlungsintensität, welche weniger als ein Fünftel der Erstbestrahlungsintensität beträgt (siehe rechte Skala in Abb. 6.1).

Ist die Zeitspanne zwischen den Bestrahlungen größer als eine Stunde, so lagert sich wieder mehr 53BP1 an die DNA-Schäden der Zweitbestrahlung an. Bei  $\Delta t \approx 4 \text{ h}$  ist der Konkurrenzparameter schon auf  $0,39 \pm 0,06$  abgefallen, d.h. die Zweitbestrahlung besitzt etwa 50 % der Intensität der Erstbestrahlung.

## Modell

In [13] wird dieses Verhalten mit einem begrenzten Vorrat an 53BP1 erklärt. Die gesamte Menge des vorhandenen Proteins bindet innerhalb von etwa 45-60 *min* an die Doppelstrangbrüche der Erstbestrahlung, so dass der Zweitbestrahlung mit zunehmendem Zeitabstand  $\Delta t$  nur noch geringe Mengen an 53BP1 zu Verfügung stehen. Eine Umlagerung oder Nachproduktion dieses Proteins, welche deutlich langsamer abläuft als der Prozess der erstmaligen Anlagerung, ermöglicht die bei  $\Delta t \gtrsim 1 \text{ h}$  zunehmend bessere Versorgung der Zweitbestrahlung.

Dieses Modell beschreibt zwar die gemessenen Daten, ist jedoch nicht mit der in [18] mittels FRAP <sup>(1)</sup> gemessenen Verweildauer des Proteins an DNA-Schäden verträglich. Hiernach gibt es zwei Verweildauern an Doppelstrangbrüchen. Die kürzere beträgt 2,2 s und tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 66% auf. Die längere Verweildauer von 42,0 s ist mit einer Häufigkeit von 34% etwas seltener. Hiermit ist die Aufrechterhaltung der Ungleichverteilung von 53BP1 an den Schäden der Erst- und Zweitbestrahlung über einen Zeitraum von 30 min, welcher als Inkubationszeit gewählt wurde, nicht zu erklären.

Der Konkurrenzeffekt ließe sich durch die begrenzte Menge eines anderen Faktors, welcher für die Rekrutierung von 53BP1 an die Doppelstrangbrüche verantwortlich ist und eine deutlich größere Verweilzeit an DNA-Schäden besitzen muss, erklären. Das 53BP1-Signal würde demnach lediglich die Verteilung dieses Faktors widerspiegeln.

### Vergleich mit früheren Daten

Ein Vergleich mit in [13] gemachten qualitativen Beobachtungen zeigt eine gute Übereinstimmung bei der Lage des Maximums. Hierfür wurde  $\Delta t = 40 \pm 20 \text{ min}$  angegeben, was mit dem hier gemessenen Maximalwert bei  $\Delta t = 50 \text{ min}$  gut vereinbar ist.

Allerdings wurde dort ein deutlich stärkerer Abfall nach dem Maximum festgestellt, bei  $\Delta t \approx 2 \text{ h}$  wurde kaum noch Konkurrenz beobachtet. Dies konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. In obiger Messreihe ist der Konkurrenzparameter bei  $\Delta t = 242 \text{ min}$  lediglich auf  $Z = 0,39 \pm 0,06$  abgefallen. Mögliche Gründe hierfür sind das veränderte Bestrahlungsmuster und die längere Inkubationszeit.

In [13] wurde das in Abbildung 4.2 dargestellte Muster verwendet. Der Punktabstand der Zweitbestrahlung betrug  $1,5 \mu\text{m}$ , damit war die Zweitbestrahlungsdosis nur halb so groß wie in obiger Messreihe. Nimmt man an, dass die umgelagerte 53BP1-Menge genauso groß ist, so verteilt sich diese auf halb so viele Schadensorte, die damit doppelt so hell erscheinen. Dies könnte zu einer Überschätzung der Zweitbestrahlungshelligkeit in [13] geführt haben.

In obiger Versuchsreihe betrug die Inkubationszeit immer  $t_I = 30 \text{ min}$ , während in [13]  $t_I = 45 \text{ min}$  benutzt wurde. Für die Umlagerung des Proteins stand folglich 50%

---

<sup>(1)</sup>Mit FRAP (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hoto**b**leaching) kann die Beweglichkeit von Proteinen gemessen werden. Hierzu werden in lebenden Zellen die Fluorochrome markierter Proteine in einem kleinen Probenvolumen durch einen kräftigen Laserpuls ausgebleicht, wodurch das Fluoreszenzsignal weitestgehend zerstört wird. Die Rückkehr des Fluoreszenzsignals durch Proteinaustausch des Probenvolumens mit der Umgebung gibt Aufschluss über die Verweildauer des betrachteten Proteins in diesem Volumen und damit über die Beweglichkeit und mögliche Bindungen des Proteins.

mehr Zeit zur Verfügung, was zusätzlich zu einer stärkeren Antwort auf die Zweitbestrahlung führen könnte.

### 6.2.1.2 Bestrahlungen mit Kohlenstoffionen bei 55 MeV

Es wurde zusätzlich eine Messreihe mit 55 MeV Kohlenstoffionen durchgeführt. Hierbei wurde durch Erst- und Zweitbestrahlung jeweils eine Dosis von etwa 11 Gy appliziert. Die Daten sind in Abbildung 6.1 als grüne Messpunkte eingezeichnet. Sie zeigen ein etwas anderes Verhalten als die Sauerstoffmessungen. Die ersten beiden Messwerte bei  $\Delta t = 10 \text{ min}$  und  $\Delta t = 17 \text{ min}$  sind trotz des geringen Zeitabstands im Rahmen des statistischen Fehlers nicht verträglich zueinander. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf die in Kapitel 6.1 diskutierte mangelnde Temperierung zurückzuführen. Diese beiden Proben zeigen deutlich weniger Konkurrenz, als die restlichen Proben mit größerem  $\Delta t$ . Man beobachtet einen Anstieg bis etwa  $\Delta t \approx 40 \text{ min}$ , anschließend ist keine signifikante Änderung mehr erkennbar.

Der maximale Konkurrenzparameter beträgt nur etwa 80% des Maximalwerts der Versuchsreihe mit Sauerstoffionen. Dies könnte in der um etwa 30% geringeren Energiedosis der Bestrahlungen begründet sein, wodurch weniger Doppelstrangbrüche erzeugt werden und weniger 53BP1 bzw. weniger des für die Rekrutierung von 53BP1 verantwortlichen Faktors an die Erstbestrahlung gebunden wird. Für die Doppelstrangbrüche der Zweitbestrahlung steht mehr ungebundenes 53BP1 bzw. mehr des oben erwähnten Faktors zur Verfügung. Dies hat einen geringeren Konkurrenzparameter zur Folge. Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Maximum zeitlich eng begrenzt ist und deshalb zwischen zwei Messpunkten liegt.

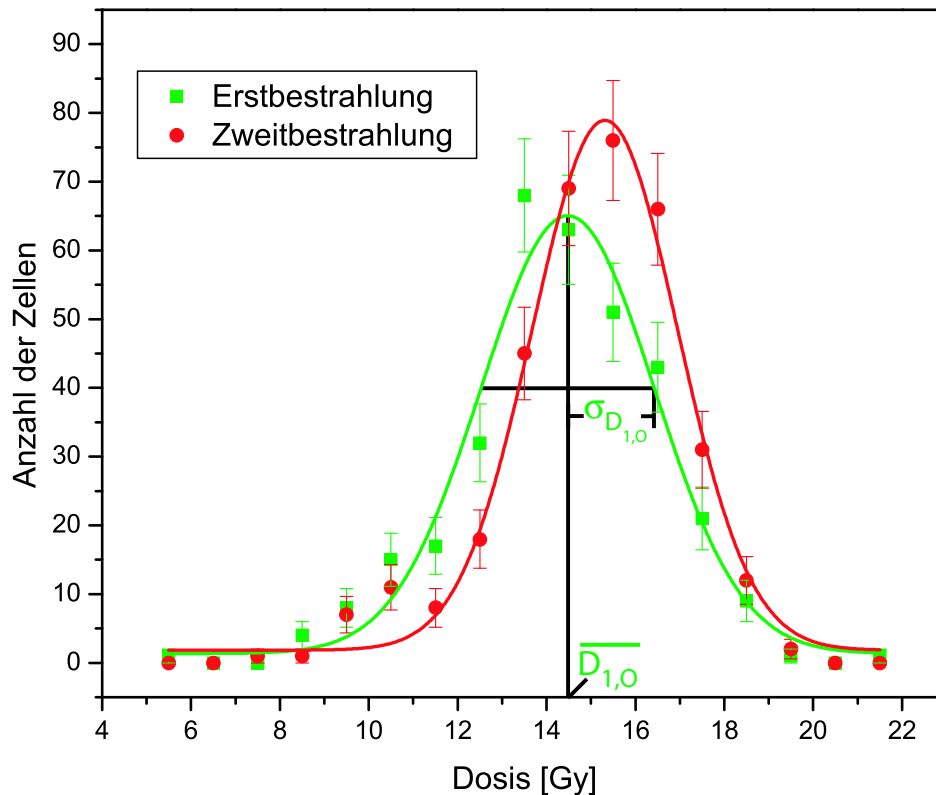
Für  $\Delta t > 1 \text{ h}$  unterscheiden sich die beiden Messreihen nicht mehr signifikant voneinander.

## 6.2.2 Abhängigkeit der Konkurrenz von der Dosis der beiden Bestrahlung

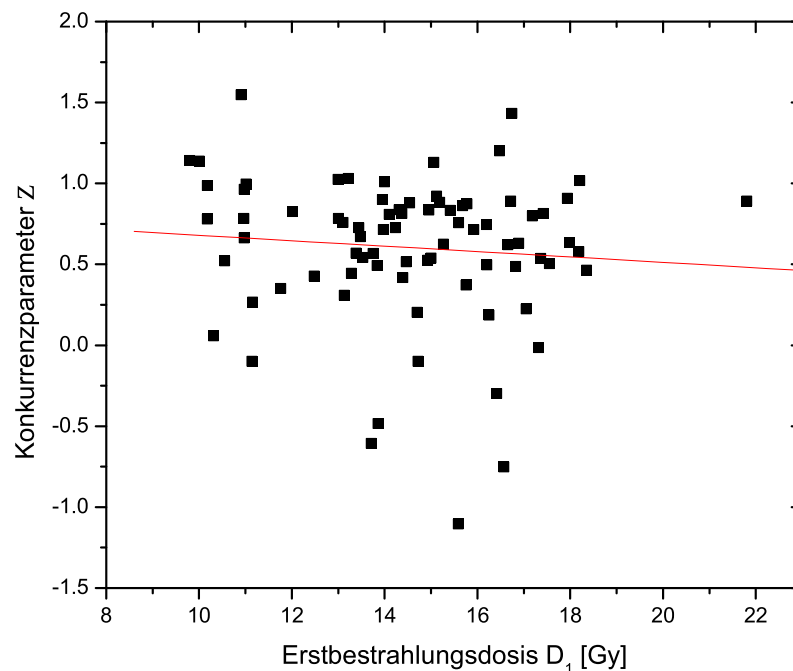
Das in Kapitel 6.2.1.1 beschriebene Modell legt eine Abhängigkeit des beobachteten Konkurrenzparameters  $\zeta$  von der durch Erstbestrahlung und durch Zweitbestrahlung applizierten Dosis nahe. Je größer die Erstbestrahlungsdosis  $D_1$  ist, desto mehr Doppelstrangbrüche werden induziert. Damit wird ein größerer Teil des 53BP1-Vorrats bzw. des für die 53BP1 Rekrutierung verantwortlichen Faktors gebunden, so dass für die durch die Zweitbestrahlung induzierten Schäden nur noch ein geringerer Teil übrig bleibt. Die bei  $\Delta t > 1 \text{ h}$  zunehmend bessere Versorgung der Zweitbestrahlung wird auf eine Nachproduktion oder Umlagerung des 53BP1 bzw. des für dessen Rekrutierung

verantwortlichen Faktors zurückgeführt. Bei beiden Prozessen ist eine Abhängigkeit von der Zweitbestrahlungsdosis  $D_2$  denkbar.

Die in einem Zellkern applizierte Energiedosis ist von dessen Größe und der Anzahl der Ionentreffer abhängig. Da die Form des Kerns und dessen Lage bezüglich des Bestrahlungsmusters von Zelle zu Zelle variiert, variiert auch die applizierte Dosis. Die Verteilung der Erst- und Zweitbestrahlungsdosis aller analysierten Zellen der Sauerstoffmessreihe ist in Abbildung 6.2 aufgetragen. Hierzu wurden für jede analysierte Zelle, wie in Kapitel 5.3 beschrieben, die Dosen  $D_{1,O}$  und  $D_{2,O}$  bestimmt. Der Mittelwert liegt bei  $\overline{D_{1,O}} = 14,5 \text{ Gy}$  bzw.  $\overline{D_{2,O}} = 15,3 \text{ Gy}$ , die Breite beträgt  $\sigma_{D_{1,O}} = 2 \text{ Gy}$  bzw.  $\sigma_{D_{2,O}} = 1,6 \text{ Gy}$ , somit variiert die Dosis um etwa  $\pm 15 \%$ . Für die Messreihe mit 55 MeV Kohlenstoffionen ergeben sich aufgrund des geringeren LET-Wertes in Wasser von  $310 \text{ keV}/\mu\text{m}$  gegenüber  $430 \text{ keV}/\mu\text{m}$  für 100 MeV Sauerstoffionen geringere Werte. Die Dosismittelwerte betragen  $\overline{D_{1,C}} = 11,0 \text{ Gy}$  bzw.  $\overline{D_{2,C}} = 12,2 \text{ Gy}$ , die Breiten  $\sigma_{D_{1,C}} = 1,4 \text{ Gy}$  bzw.  $\sigma_{D_{2,C}} = 1,3 \text{ Gy}$ . Die unterschiedlichen Mittelwerte für Erst- und Zweitbestrahlung sind wahrscheinlich durch nicht exakt gleichen Linienabstand der Erst- und Zweitbestrahlung bedingt.



**Abbildung 6.2:** Verteilung der Erst- und Zweitbestrahlungsdosis  $D_1$  bzw.  $D_2$  der Messreihe mit Sauerstoffionen.

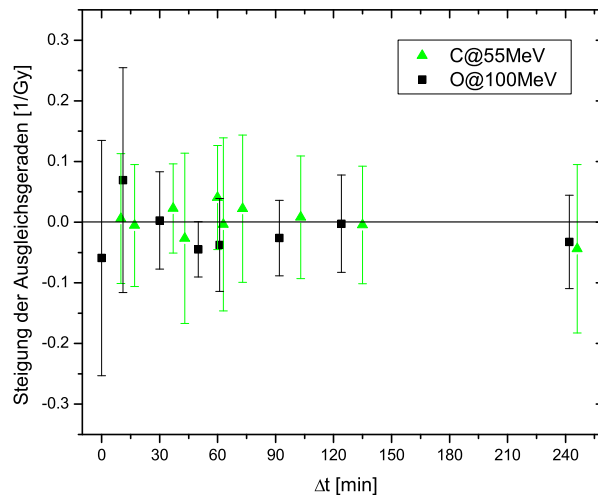


**Abbildung 6.3:** Korrelation zwischen Erstbestrahlungsdosis  $D_1$  und Konkurrenzparameter  $\zeta$  für das Protein 53BP1 aufgetragen für die Zellen der Probe:  $\Delta t = 50 \text{ min}$ ,  $t_I = 30 \text{ min}$ ,  $O@100 \text{ MeV}$ .

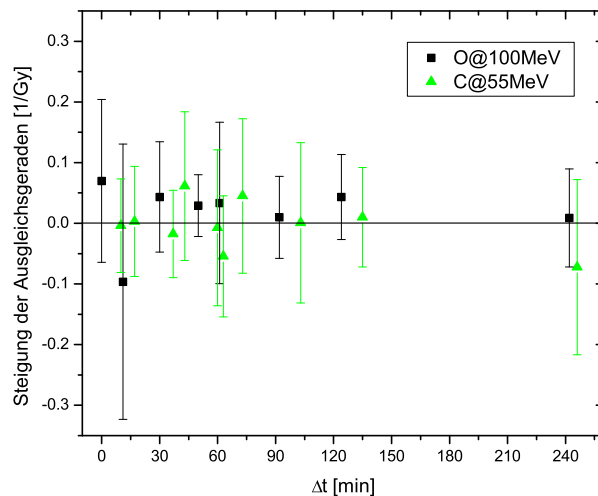
Diese Variation der beiden Bestrahlungsdosen kann verwendet werden, um die Abhängigkeit des Konkurrenzparameters von diesen zu studieren. In Abbildung 6.3 ist für die Probe  $\Delta t = 50 \text{ min}$  die Abhängigkeit des Konkurrenzparameters  $\zeta$  von der Dosis der Erstbestrahlung  $D_1$  dargestellt. Jede analysierte Zelle dieser Probe wurde entsprechend dem gemessenen  $\zeta$  und  $D_1$  als Punkt markiert. Der lineare Fit an diese Datenpunkte liefert eine Steigung von  $-0,04 \pm 0,05$ , ist also mit Null verträglich. So wurde mit allen Proben beider Messreihen, und zwar mit Erst- und Zweitbestrahlungsdosis, verfahren. In Abbildung 6.4 sind die so bestimmten Steigungen als Maß der Dosisabhängigkeit mit statistischem Fehler über  $\Delta t$  aufgetragen. Alle diese Messwerte sind mit Null verträglich.

In dem betrachteten Dosisbereich  $D_{1/2,O} \approx (15 \pm 2) \text{ Gy}$  für die verwendeten Sauerstoffionen bzw.  $D_{1/2,C} \approx (11,5 \pm 1,5) \text{ Gy}$  für die Kohlenstoffmessreihe ist weder eine signifikante Abhängigkeit der Konkurrenz von der Dosis der Erstbestrahlung noch von der Dosis der Zweitbestrahlung erkennbar.





(a) Abhängigkeit des Konkurrenzparameters von der Erstbestrahlungsdosis  $D_1$  für die verschiedenen Proben.



(b) Abhängigkeit des Konkurrenzparameters von der Zweitbestrahlungsdosis  $D_2$  für die verschiedenen Proben.

**Abbildung 6.4:** Steigungen der Ausgleichsgeraden (vgl. Abb. 6.3) als Maß der Dosisabhängigkeit des Konkurrenzparameters für das Protein 53BP1 für die Proben beider Messreihen.

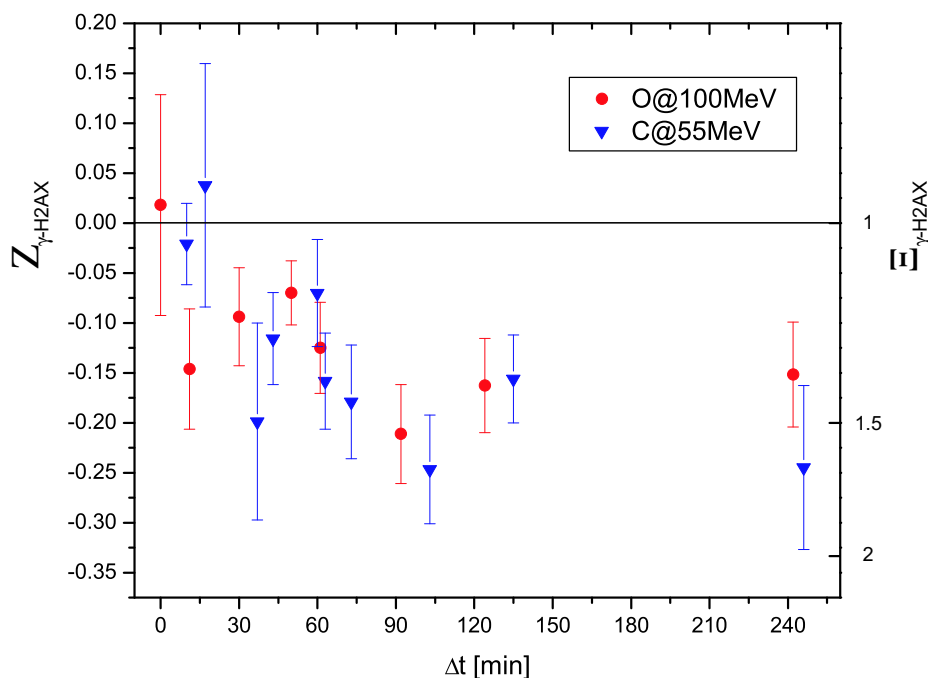
In [13] wurde die Erstbestrahlungsdosis deutlich stärker auf etwa  $2\text{ Gy}$  vermindert, indem das Linienmuster durch ein Punktmuster ersetzt wurde. Dies führte zur Auslöschung der Konkurrenz bei fast allen Proben. Nur jene Probe, welche bei Erstbestrahlung mit Linien, d.h.  $D_1 \approx 15\text{ Gy}$ , maximale Konkurrenz zeigte, ließ auch bei

dieser Erstbestrahlung mit dem Punktmuster noch Konkurrenz erkennen, diese war jedoch schwächer ausgeprägt.

Um eine Dosisabhängigkeit nachzuweisen, muss die Dosis deutlich stärker variiert werden, als das hier durch die zufällige Lage des Zellkerns bezüglich des Linienmusters geschehen ist.

### 6.3 $\gamma$ -H2AX

Neben dem Protein 53BP1 ist das als Antwort auf Ionenbestrahlung um die induzierten Doppelstrangbrüche phosphorylierte Histon  $\gamma$ -H2AX betrachtet worden. Es wurde ebenfalls die in Kapitel 5 beschriebene Auswertemethodik verwendet, um die Entwicklung der Linienhelligkeiten zu analysieren.



**Abbildung 6.5:** Verlauf des Konkurrenzparameters  $Z_{\gamma-H2AX}$  und des Linienintensitätsverhältnisses  $\Xi_{\gamma-H2AX}$  für HeLa-Zellen in Abhängigkeit von  $\Delta t$  bei konstanter Inkubationszeit  $t_I = 30 \text{ min}$ . Die durch Erst- und Zweitbestrahlung applizierte Dosis betrug für die Sauerstoffionen jeweils etwa 15 Gy und für die Kohlenstoffionen jeweils etwa 11 Gy.

In Abbildung 6.5 sind die Konkurrenzparameter  $Z_{\gamma-H2AX}$  gegen die Zeitdauer  $\Delta t$  zwischen beiden Bestrahlungen aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug jeweils  $t_I = 30 \text{ min}$ .

Das  $\gamma$ -H2AX zeigt ein komplett anderes Verhalten als das Protein 53BP1. Sowohl die Messreihe mit Sauerstoffionen, rote Messpunkte, als auch jene mit Kohlenstoffionen,

blaue Messpunkte, lassen von  $Z_{\gamma\text{-H2AX}} = 0$  beginnend einen leichten, aber signifikanten Abfall mit  $\Delta t$  erkennen.

Werden die beiden Bestrahlungen gleichzeitig induziert, beträgt also  $\Delta t = 0 \text{ min}$ , so sind die Antworten auf senkrechte und waagrechte Bestrahlungslinien, wie zu erwarten, gleich ausgebildet und  $Z_{\gamma\text{-H2AX}}$  ist mit Null verträglich. Mit zunehmender Zeitspanne  $\Delta t$  zwischen den Bestrahlungen ist die Antwort auf die Erstbestrahlung zunehmend schwächer ausgeprägt, der Konkurrenzparameter ist kleiner Null und nimmt ab. Beträgt  $\Delta t \approx 4 \text{ h}$ , so ist der Konkurrenzparameter auf  $Z_{\gamma\text{-H2AX},O} = -0,15 \pm 0,05$  bzw.  $Z_{\gamma\text{-H2AX},C} = -0,24 \pm 0,08$  abgefallen. Damit ist das Fluoreszenzsignal der Zweitbestrahlung um etwa 50% heller als das der Erstbestrahlung. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Bestrahlungen mit Sauerstoffionen und Kohlenstoffionen ist aus dieser Messung nicht zu erkennen.

Zur Erklärung dieses Verhaltens gibt es zwei vereinfachte Szenarien. Der Konkurrenzparameter  $Z$  ist ein Maß für die relative Helligkeit der Bestrahlungslinien. Postuliert man keine Wechselwirkung zwischen der Phosphorylierung des Histons H2AX um die Schäden der Erst- und Zweitbestrahlung, so entwickeln sich auch die Linienhelligkeit unabhängig voneinander. Da die Inkubationszeit immer eine halbe Stunde beträgt, stellt die Zweitbestrahlung eine Helligkeitsreferenz dar. Folglich entspricht der Verlauf von  $Z_{\gamma\text{-H2AX}}$  der zeitlichen Entwicklung der Helligkeit der (Erst-)Bestrahlungslinien und der Menge des vorhandenen  $\gamma\text{-H2AX}$ . Demnach reduziert sich die Zahl der phosphorylierten H2AX-Histone mit der Zeit, was Ausdruck der fortschreitenden Reparatur sein kann.

Dies entspricht qualitativ den Beobachtungen von [19], wonach sich die  $\gamma\text{-H2AX}$ -Menge zwischen 30 *min* und 90 *min* nach Bestrahlung deutlich reduziert. Nach Gamma-Bestrahlung von Hamster CHO-Zellen mit einer Energiedosis von 200 Gy wurde mittels Elektrophorese <sup>(2)</sup> in diesem Zeitraum eine Abnahme um 60% beobachtet. Dieser Wert ist deutlich größer als die hier beobachtete von 20-30%, was durch die unterschiedliche Bestrahlungsart und -dosis bedingt sein könnte.

Schließt man hingegen eine Wechselwirkung nicht aus und betrachtet in erster Ordnung die Helligkeit der Bestrahlungslinien als zeitlich konstant, so bedeutet dies, dass um die Doppelstrangbrüche der Zweitbestrahlung deutlich mehr H2AX-Histone phosphoryliert werden als um die Erstbestrahlung.

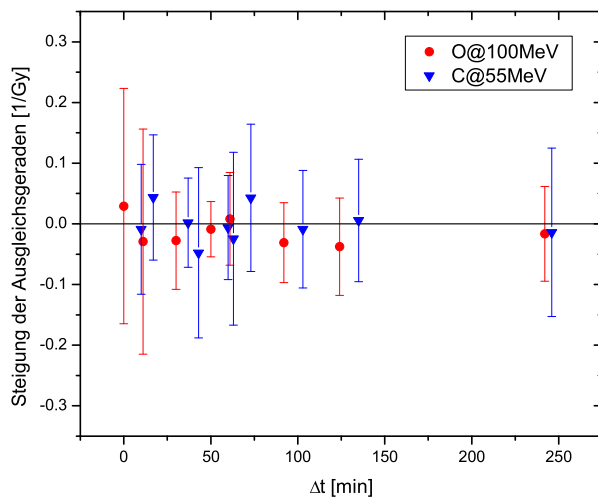
Vorstellbar ist auch eine Kombination beider Erklärungen. Da mit den hier vorgestellten Experimenten keine absoluten Proteinmengen bestimmt wurden, kann zwischen diesen Szenarien nicht unterschieden werden.

---

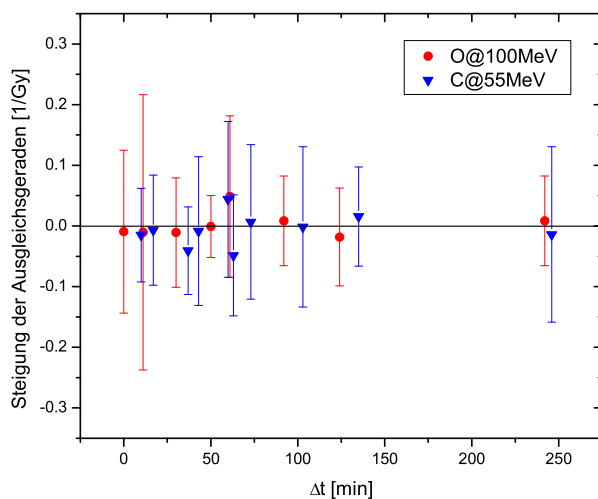
<sup>(2)</sup>Mittels Elektrophorese ist es möglich, ein Molekülgemisch durch ein elektrisches Feld in Abhängigkeit der Molekülgröße und -ladung aufzutrennen.

Zur weiteren Charakterisierung des beobachteten Effekts wurden diese Daten auf eine mögliche Dosisabhängigkeit überprüft. Die applizierten Dosen und deren Verteilung wurde bereits in Kapitel 6.2.2 diskutiert und betragen für die Sauerstoffmessreihe  $D_{1/2,O} \approx (15 \pm 2) Gy$  bzw.  $D_{1/2,C} \approx (11,5 \pm 1,5) Gy$  für die Kohlenstoffmessung. Hierzu wurde, wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben, für jede Zelle einer Probe die durch Erst- bzw. Zweitbestrahlung applizierte Dosis bestimmt und der Konkurrenzparameter der einzelnen Zellen  $\zeta$  gegen beide Dosen separat aufgetragen. Die Steigung des linearen Fits an diese Datenpunkte als Maß der Dosisabhängigkeit ist für die verschiedenen Proben in Abbildung 6.6 gegen die Zeitspanne  $\Delta t$  aufgetragen.

In dem betrachteten Dosisbereich ist aus den gemessenen Daten keine Dosisabhängigkeit zu erkennen.



(a) Abhängigkeit des Konkurrenzparameters von der Erstbestrahlungsdosis  $D_1$  für die verschiedenen Proben.



(b) Abhängigkeit des Konkurrenzparameters von der Zweitbestrahlungsdosis  $D_2$  für die verschiedenen Proben.

**Abbildung 6.6:** Steigungen der Ausgleichsgeraden (vgl. Abb. 6.3) als Maß der Dosisabhängigkeit des Konkurrenzparameter für  $\gamma$ -H2AX für die Proben beider Messreihen.



# Kapitel 7

## Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten Konkurrenzeffekte sowie deren Abhängigkeit von  $\Delta t$  für die Verteilung des Proteins 53BP1 an HeLa-Zellen reproduzieren und quantitativ charakterisieren. Allerdings ist mit dem momentanen Bestrahlungsaufbau an SNAKE der Bereich kurzer Zeitdauern  $\Delta t$  bzw.  $t_I$  nicht zugänglich. Wie in Kapitel 6.1 diskutiert, bedingt das Abkühlen der Zellen während der Bestrahlung systematische Unsicherheiten. Um verlässliche Messungen für Zeitparameter unter 20 Minuten durchzuführen, ist eine Temperierung der Zellen auf 37°C während der Bestrahlung unerlässlich. Die Realisierung könnte im Rahmen einer Adaptierung des Rasterionemikroskops SNAKE an die Erfordernisse der Lebendzellbeobachtung direkt am Bestrahlungsaufbau erfolgen. Diese Umrüstung wird zur Zeit im Rahmen einer Doktorarbeit durchgeführt.

Die Untersuchung kurzer Zeiten verlangt zudem eine schnellere Applikation der Bestrahlungen. Mit der derzeit erreichten Bestrahlungsgeschwindigkeit von 60 – 70 Ionen Treffern pro Sekunde dauert eine Bestrahlung je nach Muster und Größe des bestrahlten Bereichs zwischen fünf und zehn Minuten. Somit können die Zeitparameter von Zelle zu Zelle je nach Lage auf der Probe beträchtliche relative Abweichungen aufweisen. Die derzeitige Bestrahlungsgeschwindigkeit ist durch die geringe Länge der Ablenkplatten, die damit benötigten hohen Ablenkspannungen und die Anstiegszeiten der momentan verwendeten Netzgeräte begrenzt. Durch Verwendung längerer Ablenkplatten können die benötigten Spannungen verringert und die Bestrahlungsgeschwindigkeit um etwa eine Größenordnung erhöht werden.

Die in Kapitel 6.2 dargestellten, quantitativen Erkenntnisse bezüglich  $\Delta t$  stellen lediglich den ersten Schritt zur vollständigen Charakterisierung des Konkurrenzeffekts bei 53BP1 dar. In Kapitel 6.2.2 wurde die Dosisabhängigkeit des Effekts untersucht. Die Dosisvariation erwies sich als zu gering, um eine Abhängigkeit davon nachzuweisen. Hierzu ist es notwendig, weitere Messungen mit einer applizierten Dosis von weni-

gen Gray durchzuführen. Dies lässt sich durch eine Variation des Bestrahlungsmusters realisieren. Der Einfluss des zweiten Zeitparameters, der Inkubationszeit  $t_I$ , wurde quantitativ noch nicht untersucht. Dieser würde Aufschluss darüber bringen, wie lange die beobachtete Unterversorgung der DNA-Schäden der Zweitbestrahlung mit 53BP1 Bestand hat und könnte damit einen weiteren Hinweis zur Bedeutung dieses Effekts liefern.

Die Konsequenzen dieser Beobachtung für die so bestrahlten Zellen sind noch gänzlich unbekannt. Hier ist die Frage zu klären, ob die geringere Versorgung der Zweitbestrahlung mit 53BP1 Folgen für die Zellantwort auf Doppelstrangbrüche besitzt, indem z.B. die Rekrutierung anderer Reparaturfaktoren beeinflusst wird. Hiervon könnte die Kinase ATM betroffen sein, welche eine Schlüsselrolle in der Zellantwort auf ionisierende Strahlung spielt [9] und mit 53BP1 wechselwirkt [7]. Ein anderer Kandidat ist MDC1, das nach [7] einen möglichen Parallelweg zu 53BP1 zur Aktivierung von ATM darstellt. Denkbar ist, dass dieser Parallelweg verstärkt genutzt wird, falls nur eine geringere Menge an 53BP1 zur Verfügung steht. Eine verstärkte MDC1 Rekrutierung an den Schadensorten der Zweitbestrahlung wäre ein starkes Indiz für diese These. Hierzu wurden bereits Messungen durchgeführt, die allerdings noch nicht ausgewertet sind.

Falls dieser Konkurrenzeffekt die Zellantwort auf Bestrahlungsschäden wesentlich beeinträchtigt, hat dies auch Folgen für die weitere Existenz der Zelle, welche sich im Zellüberleben nach Ionenbestrahlung äußert. Demnach könnte eine zweifache Bestrahlung im Abstand von etwa 45 – 60 Minuten mit einer Dosis von jeweils 15 Gy ein geringeres Zellüberleben zur Folge haben, als eine einzelne Bestrahlung mit etwa 30 Gy. Ein derartiger Einfluss auf das Zellüberleben könnte einen Ansatz bieten, um in der Radioonkologie Fortschritte zu erzielen. Durch eine optimierte Einteilung der Fraktionierungen wäre eine Verbesserung des Therapieergebnisses denkbar. Voraussetzung hierfür ist, dass diese Konkurrenzeffekte nicht nur bei HeLa – Zellen zu beobachten sind. Dies sollte in Experimenten mit anderen Zelllinien und primären, humanen Zellen geklärt werden.



# Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995.
- [2] A. Hauptner, S. Dietzel, G. A. Drexler, P. Reichart, R. Krücken, T. Cremer, A. A. Friedl, G. Dollinger, *Radiat Environ Biophys* **42** (2004) 237–245.
- [3] SRIM 2003 (The Stopping and Range of Ions in Matter), URL <http://www.srim.org>.
- [4] E. P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W. M. Bonner, *J Cell Biol* **146** (1999) 905–916.
- [5] F. di Fagagna, P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. v. Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter, S. P. Jackson, *Nature* **426** (2003) 194–198.
- [6] T. T. Paull, E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, W. M. Bonner, *Curr Biol* **10** (2000) 886–895.
- [7] T. A. Mochan, M. Venere, R. A. DiTullio Jr., T. D. Halazonetis, *DNA Repair* **3** (2004) 945–952.
- [8] B. Wang, S. Matsuoka, P. B. Carpenter, S. J. Elledge, *Science* **298** (2002) 1435–1438.
- [9] E. U. Kurz, S. P. Lees-Miller, *DNA Repair* **3** (2004) 889–900.
- [10] O. Schmelmer, *Ein Rasterionenmikroskop für hochenergetische Ionen*, Doktorarbeit, TU München, 2001.
- [11] G. Datzmann, *Aufbau und Charakterisierung des Hochenergie Rasterionenmikroskops SNAKE*, Doktorarbeit, TU München, 2002.
- [12] A. Hauptner, *Mikroskopisch genaue Zellbestrahlung mit hochenergetischen Ionen*, Doktorarbeit, TU München, 2005.

- [13] V. Hable, *Untersuchung der Dynamik von DNA-Reparaturproteinen nach Bestrahlung lebender Zellen am Rasterionenmikroskop SNAKE*, Diplomarbeit, TU München, 2004.
- [14] Wikipedia, die freie Enzyklopädie, URL <http://de.wikipedia.org>.
- [15] Scientific Volume Imaging b. v., URL <http://www.svi.nl>.
- [16] ImageJ, URL <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>.
- [17] root, URL <http://root.cern.ch>.
- [18] S. Bekker-Jensen, C. Lukas, F. Melander, J. Bartek, J. Lukas, *J Cell Biol* **170/2** (2005) 201–211.
- [19] E. P. Rogakou, D. D. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, W. M. Bonner, *J Biol Chem* **273/10** (1998) 5858–5868.

# Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Reiner Krücken für die freundliche Aufnahme in den Lehrstuhl E12, das Interesse an den Zellbestrahlungen an SNAKE und die selbstverständliche Unterstützung der Fristverlängerung dieser Arbeit, als mich meine rechte Hand im Stich ließ, danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Günther Dollinger für die Betreuung dieser Arbeit, v.a. den scharfen Blick beim Betrachten von Mikroskopbildern und der riesigen Anzahl von Ideen und Anregungen, welche diese Arbeit entscheidend bereichert haben. Er hat in jeder Situation Zeit gefunden, aktuelle Ergebnisse und Probleme zu diskutieren und so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Speziell möchte ich dem immer offenen Ohr am Schreibtisch nebenan, Andreas Hauptner, danken für die unschätzbare Möglichkeit jede Idee, jedes Problem und jede Vision instantan diskutieren zu können. Das Aufzählen weiterer Einzelheiten, wie die Einweisungen in die Geheimnisse des „Linslerls“, das aufmerksame Lesen dieser Arbeit, die vielen Tipps, Anmerkungen und Anregungen beschreibt seinen Beitrag zu dieser Arbeit nur unvollständig. Vielmehr war er mit seiner lockeren Art und seinem Humor für ein fruchtbares Arbeitsklima verantwortlich und konnte über so manches Tief hinweghelfen.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Volker Hable. Er hat mich durch die Weitergabe seines Erfahrungsschatzes v.a. im Umgang mit und der Auswertung von Mikroskopbildern vor der „Neuerfindung des Rades“ bewahrt. Unvergessen sind die fünf Strahlzeiten mit ihm, seine Fähigkeit die Arbeit v.a. die Mikroskopierschichten mit Gaudi und Blödeleien aufzulockern, um danach wieder konzentriert ans Werke zu gehen.

Vielen Dank an Andi Bergmaier für die Hilfe beim Layout und den letzten Feinheiten dieser Arbeit, trotz akuten Babystresses, das Erdulden von Probevorträgen und die anschließende gnadenlose aber konstruktive Kritik und das schnelle Lösen so mancher Rechnerprobleme. Unvergessen sind sowohl die sogenannten „Fachgespräche“ als auch die wirklichen Fachgespräche beim Nachmittagskaffee und die spontane gruppenübergreifende Weihnachtsfeier mit ihm.

Ganz besonderer Dank gilt Anna Friedl für die kurzfristige Durchsicht dieser Arbeit und die konstruktiven Anmerkungen. Erwähnenswert ist ihre Geduld, wenn ich einmal wieder nicht in der Lage war, den fein säuberlich ausgearbeiteten Bestrahlungsplan zu verstehen, und ihre Flexibilität, wenn es darum ging, diese Fehler durch das „übern Haufen werfen“ des Plans wieder auszubügeln. Ich gelobe Besserung.

Danken möchte ich auch Guido Drexler für die interessanten, informativen, unterhaltsamen, auf jeden Fall kurzweiligen Gespräche während so mancher „öden“ Mikroskopierschicht. Er trägt nicht zuletzt durch seine fast unmenschlichen Mikroskopierschichten zum Erfolg dieses Projekts bei.

Danken möchte ich auch allen weiteren Beteiligten seitens der Biologie für die gute, konstruktive und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön an die E12-Werkstatt Ralf Lang und Michi Klöckner für die meist sehr kurzfristige Anfertigung von diversen Teilen. Ebenso möchte ich allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern am Münchener Tandembeschleuniger danken für die freundliche Aufnahme und das entspannte Arbeitsklima. Exemplarisch erwähnen möchte ich den hauseigenen Schokoriegeldealer Fritz Haftlmeier und das mittlerweile nicht mehr ganz so heimliche SNAKE-Oberhaupt Sigi Koschartz.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, v.a. meinen Eltern. Nicht zuletzt durch ihre finanzielle Unterstützung haben sie es mir ermöglicht, mich voll auf mein Studium zu konzentrieren. Sie haben mich in meinem Weg bestärkt und mir das Gefühl vermittelt, stolz auf mich zu sein.

## Danke