

Untersuchung der Dynamik von
DNA-Reparaturproteinen nach Bestrahlung
lebender Zellen am Rasterionenmikroskop
SNAKE

Diplomarbeit

von

Volker Hable

Physik Department E12

Technische Universität München

November 2004

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Dynamik der Reparaturvorgänge von DNA-Schäden in biologischen Zellen nach Schwerionenbestrahlung untersucht. Dazu wurden lebende HeLa-Zellen am Rasterionenmikroskop SNAKE mit 100 MeV Sauerstoff-Ionen des Münchner 14 MV Tandembeschleuniger bestrahlt. Die dort installierte Bestrahlungseinrichtung ermöglicht es, Zellkernen eine definierte Anzahl von Ionen und somit eine definierte Dosis mikroskopisch genau zu applizieren. Die erreichbare Strahlaufösung konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels einer 50 Hz-Pulsung in x auf $0.55 \mu\text{m}$ fwhm und in y auf $0.40 \mu\text{m}$ verbessert werden. Durch die Entwicklung mikrostrukturierter Zellträgerfolien wurde das Auffinden der bestrahlten Zellen deutlich erleichtert und somit erstmals Experimente zur gezielten Bestrahlung einzelner Zellkerne ermöglicht.

Die schwersten Schäden, die hochenergetische Ionen in Zellkernen bewirken, sind Doppelstrangbrüche der DNA. Zu deren Reparatur stehen der Zelle verschiedene Mechanismen zur Verfügung. An der Reparatur direkt oder indirekt beteiligte Proteine wie γ -H2AX, 53BP1, Rad51 und Mdc1 werden an Doppelstrangbrüchen angehängt und bilden sogenannte Foci aus. Ihre Funktion und Dynamik wurde in dieser Arbeit untersucht. Mittels biochemischer Prozesse wurden diese Proteine nach der Bestrahlung angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop in einer Fokuserie abgebildet. So gewonnene und rechnergestützt entfaltete, dreidimensionale Bilder lieferten die Grundlage für eine quantitative Auswertung der Proteinverteilungen, um so die Dynamik der Reparaturproteine zu studieren.

In Zeitreihenstudien wurde in der Zellkernmitte innerhalb der ersten 2–4 Stunden nach Bestrahlung ein Anwachsen der Focigröße (fwhm) von $1.2 \mu\text{m}$ auf $1.5 \mu\text{m}$ bei γ -H2AX und von $0.8 \mu\text{m}$ auf $1.1 \mu\text{m}$ bei 53BP1 beobachtet. In den folgenden zwei Stunden fällt sie wieder in etwa auf den Anfangswert ab, und bleibt über 24 Stunden nahezu konstant. Am Zellkernrand wächst die Größe der γ -H2AX-Foci von ebenfalls $1.2 \mu\text{m}$ innerhalb der ersten Stunde um knapp $0.1 \mu\text{m}$ an und fällt daraufhin auf ca. $0.8 \mu\text{m}$ ab.

Des Weiteren wurde die Bewegung der geschädigten DNA im Zellkern untersucht. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sind mit dem Modell einer Diffusion verträglich.

Die Diffusionskonstante ließ sich zu $(7 \cdot 10^{-7} \pm 4 \cdot 10^{-7}) \mu m^2/s$ bestimmen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellkernmitte und -rand erkennbar.

Darüber hinaus wurde durch markiertes Bestrahlen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten festgestellt, dass in Zellkernen, die gerade Doppelstrangbrüche reparieren, neu hinzukommende Strahlenschäden eine Unterversorgung von Protein 53BP1 erleiden. Dieser Effekt tritt auf, wenn die Zeitdauer zwischen den beiden Bestrahlungen unter einer Stunde liegt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
1 Einleitung	1
2 Biologische Grundlagen von Zellbestrahlungsexperimenten	3
2.1 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf Zellen	3
2.2 Hier untersuchte Reparaturfaktoren	6
2.2.1 γ -H2AX	7
2.2.2 Rad51	8
2.2.3 53BP1	8
2.2.4 MDC1/NFDB1	9
3 Aufbau und Durchführung der Zellbestrahlungsexperimente an SNAKE	11
3.1 Strahlführung und -präparation	11
3.2 Strahlauflösung	14
3.2.1 Bestimmung der Strahlauflösung	14
3.2.2 Verbesserung der Strahlauflösung mittels einer passiven 50 Hz-Korrektur	16
3.3 Zellbehälter	18
3.4 Ablauf biophysikalischer Experimente an SNAKE	20
3.5 Gezielte Bestrahlung einzelner Zellkerne	25
4 Untersuchung der Dynamik von Reparaturproteinen	29
4.1 Zeitliche Änderung der Linienbreite	32
4.2 Zeitliche Änderung der Streuung	36
5 Konkurrenzprozesse nach zeitlich getrennten Bestrahlungsereignissen	43
5.1 Symptomatik der Konkurrenzeffekte bei 53BP1	43

5.2	Modell zur Erklärung des Konkurrenzverhaltens	47
5.3	Auswirkungen der Konkurrenzprozesse auf die DNA-Reparatur	49
5.4	Korrelation zwischen Focizahl und vorhandener Menge an 53BP1	52
6	Ausblick	57
	Literaturverzeichnis	59
	Danksagung	61

Kapitel 1

Einleitung

Zelluläre Reaktionen auf durch ionisierende Strahlung erzeugte Schäden stellen ein hochaktuelles Gebiet der modernen Biologie dar. Die schwersten der so erzeugten Schädigungen sind bekanntermaßen Doppelstrangbrüche (DSB) der DNA im Zellkern (s. Kap. 2.1). Aus der Untersuchung der Dynamik der Proteine, die der Zelle zur Reparatur dieser Schäden zur Verfügung stehen, erhofft man sich ein tieferes Verständnis für die komplexen Vorgänge der DSB-Reparatur, das neue Erkenntnisse zur Tumorbildung und der kontrovers diskutierten Schädlichkeit sehr geringer Dosen radioaktiver Strahlung ($< 3 \text{ mSv/a}$) erwarten lässt. Erst in jüngerer Zeit sind eine ganze Anzahl von Proteinen identifiziert worden, die mit DSB-Reparaturprozessen in unmittelbarem Zusammenhang gebracht werden. Durch Antikörper, die an diese Proteine binden und damit deren Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglichen, ist man in der Lage, die Dynamik dieser Proteine zu studieren.

Die Untersuchung der Dynamik von DNA-Reparaturproteinen liefert jedoch nicht nur strahlenbiologisch relevante Ergebnisse. Vielmehr kann man mit gezielt gesetzten Doppelstrangbrüchen Chromatinbewegungen im Allgemeinen studieren. Dabei dient der über die Reparaturproteine sichtbar gemachte Strahlenschaden als Markierung eines Punktes im Zellkern, dessen räumliche und zeitliche Dynamik unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann.

Solche Experimente erfordern eine räumlich definierte Bestrahlung des Zellkerns. Die bei strahlenbiologischen Experimenten häufig verwendete flächige Bestrahlung mit Hilfe einer radioaktiven Quelle erfüllt diese Bedingung nicht. Stattdessen wird eine Mikrobestrahlung benötigt. Ein dabei häufig gegangener Weg besteht in einer UV-Laser-Bestrahlung. Bei dieser Methode wird die zu applizierende Dosis mittels eines UV-Laserpulses in den Zellkern gebracht. Der entscheidende Nachteil dieser Methode besteht darin, dass DSB bei UV-Laserbestrahlung direkt gar nicht auftreten. Vielmehr muss der Zellkern erst auf chemischem Wege gegen UV-Licht sensibilisiert werden [1].

Mit der Effizienz dieser Sensibilisierung kommt jedoch ein großer Unsicherheitsfaktor bei der Quantifizierung der erzeugten DSB ins Spiel.

Deshalb wurde am Münchner Tandembeschleuniger der direkte Weg beschritten, Zellen gezielt mit einem Ionen-Mikrostrahl zu bestrahlen [2]. Dies hat den Vorteil, dass über die Ionensorte und -energie die Zahl der pro Ion erzeugten DSB um vier Größenordnungen gezielt variiert werden kann [3]. Die Grundlage liefert das Rasterionenmikroskop SNAKE (Supraleitendes Nanoskop für angewandte kernphysikalische Experimente) [4]. Dieses ist mittels einer supraleitenden Multipollinse in der Lage, einen Ionenstrahl auf Submikrometerauflösung zu fokussieren. Für Zellbestrahlungsexperimente wurde SNAKE um eine Einzelionenpräparation ergänzt, die es erlaubt, einen Zellkern mit einer definierten Anzahl von Ionen zu bestrahlen, und somit den Vorteil der gezielten Variation der im Zellkern erzeugten DSB nutzbar macht. Außerdem wurde ein Strahlaustritt an Luft realisiert und eine Bestrahlungsstation aufgebaut, mit der Zellen unter Lebendbedingungen bestrahlt werden können. Der Aufbau wurde im Rahmen einer Doktorarbeit realisiert und ist im Detail in [2] beschrieben. Eine Übersicht des Aufbaus wird in Kapitel 3 gegeben. Zu Beginn dieser Arbeit stand bereits der Versuchsaufbau und eine erste Zellbestrahlung war erfolgreich durchgeführt worden [2, 3].

In den beiden folgenden Kapiteln soll zunächst ein kurzer Einblick sowohl in die zugrunde liegende Biophysik als auch in die Methodik, die im Laufe dieser Arbeit noch weiter verbessert wurde, gegeben werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin, erste Experimente zu biophysikalischen Fragestellungen durchzuführen. Dazu wurden notwendige methodische Weiterentwicklungen durchgeführt, insbesondere erste Möglichkeiten zur quantitativen Auswertung des gewonnenen Bildmaterials entwickelt. Dabei stand einerseits die Untersuchung der zeitlichen und räumlichen Dynamik von Reparaturproteinen im Vordergrund (s. Kap. 4), andererseits wurden erstmals mittels Ionenbeschuss Konkurrenzeffekte in Zellen festgestellt, die während der Reparatur von Strahlenschäden einer zweiten Bestrahlung ausgesetzt wurden (s. Kap.5).

Kapitel 2

Biologische Grundlagen von Zellbestrahlungsexperimenten

2.1 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf Zellen

Ionisierende Strahlung kann in Zellkernen verschiedene DNA-Schäden induzieren. Diese können zum Zelltod oder bei weiterer Teilung der geschädigten Zelle zu Mutationen führen. Vermehren sich mutierte Zellen in einem Organismus weiter, kann dies für den Organismus tödlich sein [5]. Um das zu verhindern, verfügt die Zelle über diverse Reparaturmechanismen, um die Integrität der Zelle nach einem Schadensereignis wieder herzustellen.

Eine mögliche Schadensart stellen sogenannte Einzelstrangbrüche (SSB, vom Englischen „single strand break“) dar, bei denen ein Strang der DNA-Doppelhelix gebrochen ist oder gar ein Stück fehlt (s. Abb. 2.1 a). Solche Schäden können von der Zelle jedoch ohne Informationsverlust repariert werden, da die verschiedenen Basen als einzelne Bausteine der DNA immer in der gleichen Paarung⁽¹⁾ gegenüberliegen (in Abb. 2.1 durch die Farbgebung gekennzeichnet). Somit kann eine verlorengegangene Base jeweils mit Hilfe der Komplementärbase richtig ersetzt werden. Dies ist ein Vorgang, den jede menschliche Zelle täglich ca. 5 000mal aufgrund thermisch verlorengegangener Basen durchführt [5].

Einen erheblich schwerer zu reparierenden Schaden stellen hingegen zwei gegenüberliegende Brüche dar, die als Doppelstrangbruch (DSB) bezeichnet werden (Abb. 2.1 b), da in diesem Fall Erbinformation kodierende Basenpaare verloren gehen können. Die wichtigsten Mechanismen, die der Zelle zur Reparatur eines solchen Schadens zur Verfü-

⁽¹⁾Adenin – Thymin und Guanin – Cytosin

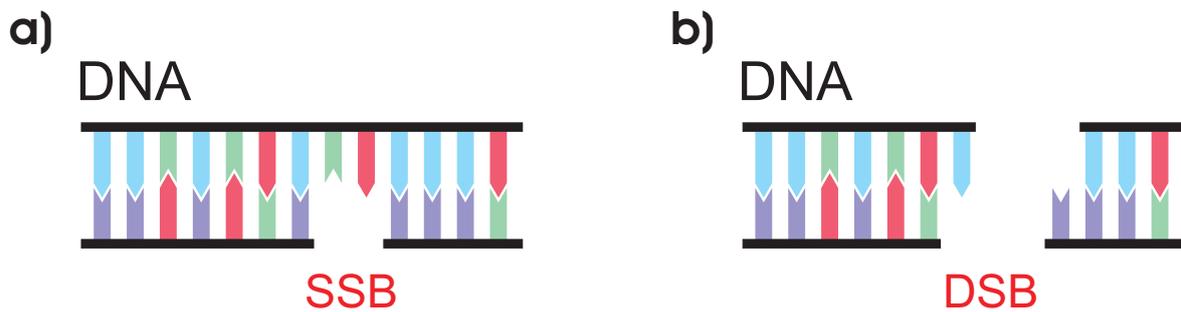


Abbildung 2.1: Die beiden Hauptmechanismen der DNA-Schädigung.

gung stehen, sind die nichthomologe Endenverknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ) und die homologe Rekombination, deren jeweilige Häufigkeit und Bedeutung in Säugetierzellen widersprüchlich diskutiert wird [6, 7]. Beim NHEJ werden die gebrochenen Enden der Helix wieder verbunden, womit evtl. verlorengegangene Basenpaare nicht wiederhergestellt werden können. Dies muss jedoch nicht zwangsweise kritische Folgen für die Zelle haben. Für einen Doppelstrangbruch, bei dem zwar gegenüberliegende Stellen der Helix gebrochen sind, jedoch anders als in Abb. 2.1 b keine Basenpaare „herausgeschlagen“ wurden, ist die Reparatur via NHEJ sogar fehlerfrei. Fatale Folgen für die Zelle hat es aber in der Regel, wenn nach dem Auftreten mehrerer Doppelstrangbrüche falsche Fragmente zusammengefügt werden, insbesondere wenn diese zu unterschiedlichen Chromosomen gehören.

Die homologe Rekombination stellt eine aufwändigere Methode der Zelle dar, einen DSB zu reparieren. Dabei dient ein intaktes homologes DNA-Molekül (in der Regel das Schwesterchromatid⁽²⁾), das die gleiche Erbinformation wie das geschädigte enthält, als Vorlage zur Replikation der verlorengegangenen Erbinformation [6]. Wie Abb. 2.3 b zeigt, spaltet sich bei der homologen Rekombination nach einem DSB (Abb. 2.3 a) der Doppelstrang der homologen DNA in zwei Einzelstränge auf. Diese lagern sich so an, dass jeder der defekten Einzelstränge mit einem intakten Strang paart, entlang dem er (analog zur Reparatur eines SSB) gegenüber jeder Base die Komplementärbase nachbildet. Nach Vollendung dieser Replikation (Abb. 2.3 c) werden die beiden Doppelstränge wieder getrennt und die Reparatur ist abgeschlossen (d).

Findet der Doppelstrangbruch in einer Phase des Zellzykluses statt, in der noch kein Schwesterchromatid vorhanden ist, kann auch die homologe DNA des anderen Elters als Vorlage dienen. Diese ist immer in der Zelle vorhanden, beinhaltet aber nicht zwangsweise genau die gleiche Information wie die zerstörte DNA. Außerdem kann sie

⁽²⁾Durch DNA-Replikation gebildete Kopie des Chromosoms. Dieses existiert jedoch nur in der Zeit von der Replikation während der S-Phase des Zellzykluses (s. Abb.2.2) bis zur Zellteilung in der M-Phase.

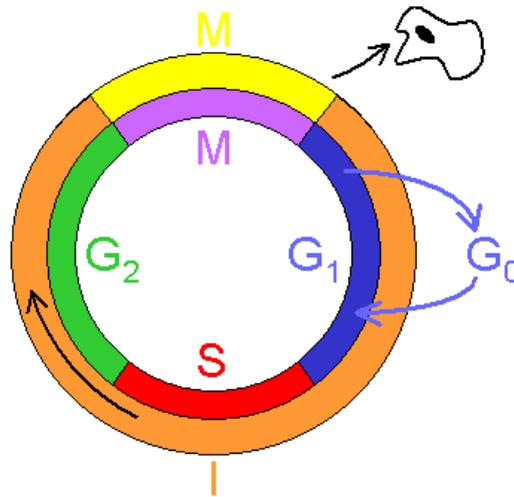


Abbildung 2.2: Die Phasen des Zellzyklus [5, 8]:

In der G₁-Phase (*G*=gap, engl. Lücke) wächst die Zelle und verdoppelt ihre Masse. Verlaufen ebenfalls in der G₁-Phase durchgeführte Überprüfungen zum eigenen Zustand und zur Umgebung positiv, geht die Zelle in die S-Phase (*S*=Synthese) über, in der die DNA verdoppelt wird. In der folgenden G₂-Phase überprüft die Zelle, ob die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen wurde. Verlaufen auch diese Tests positiv, geht die Zelle in die M-Phase (*M*=Mitose), in der die eigentliche Zellteilung stattfindet. Alle nicht zur M-Phase gehörenden Phasen werden auch als Interphase bezeichnet. Der gesamte Zellzyklus dauert in einer typischen Säugetierzelle ca. 24 Stunden. Abweichend vom eben beschriebenen Verhalten können Zellen von der G₁-Phase in die G₀-Phase übergehen. In dieser Ruhephase nehmen die Zellen nicht weiter am Zellzyklus teil.



Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der homologen Rekombination.

sich im Gegensatz zum Schwesterchromatid, das immer nahe an dem geschädigten liegt, in ganz anderen Territorien des Zellkerns befinden. Wie sich in diesem Fall homologe und geschädigte DNA trotz der räumlichen Trennung finden, ist noch völlig unklar [7]. Ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt ist die Frage, ob jeder DSB am Schadensort behoben wird oder ob die beschädigte DNA in eine Art „Reparaturfabrik“ gebracht wird [7]. Bekannt sind jedoch eine große Anzahl von Proteinen, die direkt oder indirekt an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind. Solche Proteine kumulieren in der Regel an der Schadensstelle, bilden also sogenannte „Foci“. Aus Untersuchungen solcher Foci in Säugetierzellen, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit geschehen sind, wurde vielfach gefolgert, dass sie an den Stellen auftreten, an denen man einen Schaden erwartet. Deshalb gibt es hier, im Gegensatz zu Untersuchungen an Hefezellen, wo weniger Foci beobachtet werden, als Schadensorte zu erwarten sind, keine Anhaltspunkte für die Existenz von Reparaturfabriken [7]. Aufgrund der geringen Auflösung der verwendeten Methoden kann man jedoch die Existenz vieler solcher Fabriken pro Zellkern mit einem nur kleinen Einzugsgebiet nicht ausschließen.

Die Beobachtung der räumlichen und zeitlichen Dynamik solcher Foci kann jedoch nicht nur über relevante Fragen der Zellreparatur, wie z. B. dem Vorhandensein von Reparaturzentren Auskunft geben. Vielmehr hat man durch die Markierung bestimmter Territorien im Zellkern mittels gezielter Ionenbeschuss und anschließender Beobachtung der Foci eines Proteins, bei dem es sicher ist, dass es fest an die geschädigte DNA bindet (insb. γ -H2AX, siehe nächsten Abschnitt), ein mächtiges Werkzeug, um ganz allgemein Bewegungen innerhalb des Zellkerns zu untersuchen. Solche Chromatinbewegungen stellen einen wichtigen Punkt der aktuellen Zellforschung dar [9]. Aus diesem Grund wurde der Untersuchung der Dynamik von Proteinen ein großer Teil dieser Arbeit gewidmet (s. Kap. 4).

2.2 Hier untersuchte Reparaturfaktoren

Aus der oben erwähnten Vielzahl an Proteinen, die in die Zellantwort auf DNA-Schäden involviert sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit γ -H2AX, 53BP1, Rad51 und MDC1/NFDB1 untersucht, die im Folgenden kurz eingeführt werden sollen. Es soll noch darauf hingewiesen werden, dass die im folgenden gemachten Aussagen für Säugetierzellen gelten, da sich hier die Reparaturmechanismen und dabei verwendeten Proteine von z. B. Hefezellen unterscheiden.

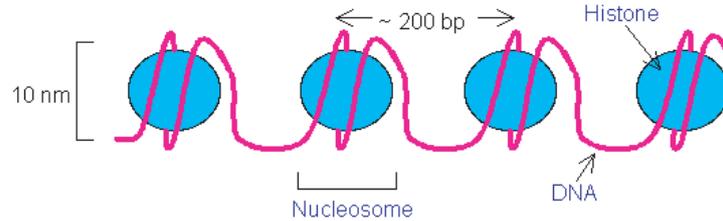


Abbildung 2.4: Perlenkettenstruktur auf unterster DNA-Faltungsebene (bp = Basenpaar; aus [10]).

2.2.1 γ -H2AX

γ -H2AX nennt man ein phosphoryliertes H2AX-Histon. Histone sind relativ kleine Proteine (102 – 135 Aminosäuren bei den Nucleosomen-Histonen, zu denen auch das H2AX gehört), die auf unterster Faltungsebene für eine geordnete Verpackung der DNA verantwortlich sind. Wäre das Erbgut ohne eine solche Ordnung im Zellkern verteilt, wäre eine Zellteilung ohne Verheddern oder gar Reißen der Chromosomen nicht möglich, so dass den Histonen existentielle Bedeutung zukommt. Durch einen hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren können die Histone die negativ geladene DNA binden. Entfaltet man die höheren Organisationsebenen des Chromatins, bleibt eine Perlenkettenstruktur übrig (Abb. 2.4). Eine solche „Perle“ (Nucleosom) besteht aus zwei Wicklungen der DNA (typisch 166 Nucleotidpaare) um einen Histonekern. Verbunden werden die Nucleosomen über ein Stück „Linker-DNA“, das aus bis zu 80 Nucleotidpaaren bestehen kann [5].

Tritt an der DNA ein Doppelstrangbruch auf, wird an H2AX-Molekülen in Schadensnähe eine Phosphatgruppe angelagert [11]. Diese Phosphorylierung, die der Zelle vermutlich als Warnsignal dient und weitere Reaktionen veranlasst, wird an bis zu mehreren tausend H2AX-Molekülen pro DSB an der Bruchregion durchgeführt. [12]. Ein so markiertes H2AX wird als γ -H2AX bezeichnet. Der Phosphorylierungsprozess läuft innerhalb der ersten drei Minuten nach der Bestrahlung [13] und an allen Doppelstrangbrüchen ab. Werden nach der Fixierung bestrahlter Zellen primäre Antikörper in die Zelle gebracht, die sich an das γ -H2AX anlagern, und diese mittels Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt, erhält man einen zuverlässigen Marker für Doppelstrangbrüche [14]. Deshalb wurde γ -H2AX auch bei den meisten Experimenten an SNAKE genutzt, um die bestrahlten Bereiche zu markieren.

2.2.2 Rad51

Das Reparaturprotein Rad51 spielt eine Hauptrolle bei der homologen Rekombination (s. Kap. 2.1) [6]. Seine enorme Bedeutung zeigt sich z. B. darin, dass Mäuse, die kein Rad51 produzieren können, nicht lebensfähig sind [15]. Auch das Rad51 akkumuliert an die geschädigten Bereiche der DNA, bildet dort also Foci aus. Im Gegensatz zum γ -H2AX, das an jedem DSB einen Fokus bildet, lagert sich das Rad51 nur in solchen Zellen an die Schadensorte an, die sich in der S- oder G2-Phase des Zellzyklus (s. Abb. 2.2) befinden [3]. Dieser Umstand zeigt die Wichtigkeit eines zuverlässigen Markers wie dem γ -H2AX, da nur mit einem solchen überprüft werden kann, ob in der Zelle kein Schaden entstanden ist oder ob trotz vorhandener DSB das zu beobachtende Protein keine Foci bildet.

2.2.3 53BP1

Erste Hinweise, dass das „p53 Binding protein 1“ (53BP1) in die Reaktion von Zellkernen auf Doppelstrangbrüche involviert ist, lieferte im Jahr 2000 die Beobachtung, dass es nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung Foci bildet, die sehr gut mit denen des γ -H2AX kolokalisieren [14, 16]. Die Anlagerung an die DSB beginnt ca. 5 min nach Bestrahlung und nach 15–30 min sind alle Foci ausgebildet [16]. Damit ist die Reaktionszeit zwar länger als beim γ -H2AX, aber deutlich kürzer als z. B. bei Rad51. Man geht davon aus, dass ein Fokus noch 100 - 1000 BP1-Moleküle enthält, also viel mehr als sich direkt an den Enden des Doppelstrangbruchs anlagern können. Stattdessen stellte man fest, dass das Molekül an γ -H2AX binden kann, das großflächig den Schadensort umgibt (s. o.) [16]. Allerdings ist das Vorhandensein von γ -H2AX für die anfängliche Foci-Bildung nicht notwendig, sehr wohl jedoch für den längerfristigen Verbleib an der Schadensstelle, wie in Versuchen mit Mäusezellen, denen H2AX fehlt, festgestellt wurde [16].

Die genaue Rolle, die das 53BP1 in der zellinternen Signalgebung bei DSB spielt, ist noch nicht ganz klar. Sicher ist jedoch, dass es Auswirkungen auf sogenannte „Zellzyklus-Checkpoints“ hat [16]. Solche Checkpoints sorgen z. B. dafür, dass Zellen, die DNA-Schäden aufweisen, in der G2-Phase des Zellzyklus verweilen (G2-Arrest) und nicht in die Mitose gehen. Somit erhält die Zelle mehr Zeit, sich wieder zu reparieren und es wird verhindert, dass die Zelle ihr beschädigtes Erbgut durch Zellteilung weitergibt [17].

Mit Sicherheit vorhanden sind auch Wechselwirkungen mit der Kinase⁽³⁾ ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) [16], die eine Schlüsselrolle in der Zellantwort auf Doppelstrangbrüche spielt. Neben vielen anderen Proteinen, die hauptsächlich für Checkpoints aber auch Apoptose⁽⁴⁾ verantwortlich sind, aktiviert ATM mittels Phosphorylierung (teils indirekt) auch einige Reparatur-Proteine wie z. B. Rad51 [17]. Allerdings werden die Wechselwirkungen zwischen 53BP1 und ATM noch widersprüchlich diskutiert [16]. In [18] berichtet eine Gruppe von Beobachtungen, dass durch ATM aktivierte Proteine (MDC1/NFDB1, s. Kap. 2.2.4) nötig seien, damit 53BP1-Foci nach einer DNA-Schädigung gebildet werden. Von anderen Gruppen konnten diese Abhängigkeiten jedoch nicht nachgewiesen werden [16]. Diese Gruppen fanden stattdessen, dass 53BP1 seinerseits ATM aktiviert. Wie weitere Experimente zeigten, lagert sich in Zellen, in denen die 53BP1-Produktion gehemmt ist, deutlich mehr MDC1/NFDB1 an die DSB an, das dann die Aktivierung des ATM übernimmt. Fehlen beide, wird die Aktivierung von ATM blockiert. Somit lässt sich schlussfolgern, dass es mit 53BP1 und MDC1/NFDB1 (mindestens) zwei unabhängige Wege gibt, ATM zu aktivieren [16]. Auch ein Modell, das die Aktivierung von ATM durch 53BP1 mit einer Rückkopplung des ATM zurück auf das 53BP1 kombiniert, wird diskutiert. Auch die Art und Weise, auf die das 53BP1 das ATM aktiviert, ist noch nicht verstanden [16].

2.2.4 MDC1/NFDB1

Auch das gerade schon als alternativer Weg zur ATM-Aktivierung diskutierte MDC1/NFDB1 wechselwirkt mit verschiedenen DNA-Reparatur- und Checkpoint-Proteinen und wird bei DNA-Schäden und während der Mitose phosphoryliert. Strahlungsinduzierte Foci kolokalisieren sehr gut mit denen des γ -H2AX und 53BP1, nicht jedoch mit denen des Rad51 [19]. In Zellen, deren H2AX-Produktion unterdrückt wurde, zeigen sich keine MDC1/NFDB1-Foci, umgekehrt wird aber auch berichtet, dass Zellen, deren MDC1/NFDB1-Produktion unterdrückt wurde, eine reduzierte Phosphorylierung von H2AX zeigen [19]. Auch beim MDC1/NFDB1 wird vermutet, dass es sich wie das 53BP1 direkt an γ -H2AX anlagert, was jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte [19].

Man nimmt an, dass MDC1/NFDB1 und 53BP1 zusammen mit einem weiteren Protein Namens BRCA1 den Kern einer Familie von Mittler-Proteinen bzgl. Zellzyklus-Checkpoints bilden [19].

⁽³⁾Enzyme, welche die Übertragung eines Phosphatrestes von ATP (Adenosintriphosphat) auf andere Proteine bewirken [8].

⁽⁴⁾Programmierter Zelltod, der z. B. durch irreparable DNA-Schäden ausgelöst werden kann.

Kapitel 3

Aufbau und Durchführung der Zellbestrahlungsexperimente an SNAKE

Im Folgenden wird ein knapper Überblick über die Methodik der Zellbestrahlungsexperimente an SNAKE gegeben. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in [2]. Hier wird der Versuchsaufbau kurz beschrieben und die Vorgehensweise bei der Zellbestrahlung dargestellt. Nach der eigentlichen Bestrahlungsprozedur werden die Zellproben so aufbereitet, dass die im letzten Kapitel beschriebenen Foci unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden können. Die biologische Aufbereitung, die Mikroskopie und die daran anschließende Bildverarbeitung wird eingehend dargestellt. Neben der Vorstellung der zum Beginn dieser Arbeit schon bestehenden Versuchsaufbauten und Methoden werden in diesem Kapitel auch methodische Verbesserungen am Experiment, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, beschrieben.

3.1 Strahlführung und -präparation

Grundlage für die Zellbestrahlungsexperimente bildet das am Münchner Tandembeschleuniger aufgebaute Rasterionenmikroskop SNAKE [4]. Dieses ist mittels einer supraleitenden Multipollinse in der Lage, einen Strahl hochenergetischer Ionen auf Submikrometergröße zu fokussieren. Abb. 3.1 zeigt eine Übersichtsskizze der Strahlführung. Nach Durchlaufen des 14 MV Tandembeschleunigers wird der Ionenstrahl hinter einem 90°-Analysiermagneten, der nur Ionen mit der gewünschten magnetischen Steifigkeit passieren lässt, mittels Objektschlitzen auf ca. 20 μm Durchmesser beschnitten. Knapp 6 m hinter den Objektschlitzen befinden sich Divergenzschlitze, mittels derer die Winkelakzeptanz eingestellt werden kann. Diese werden bei den Zellbestrahlungs-

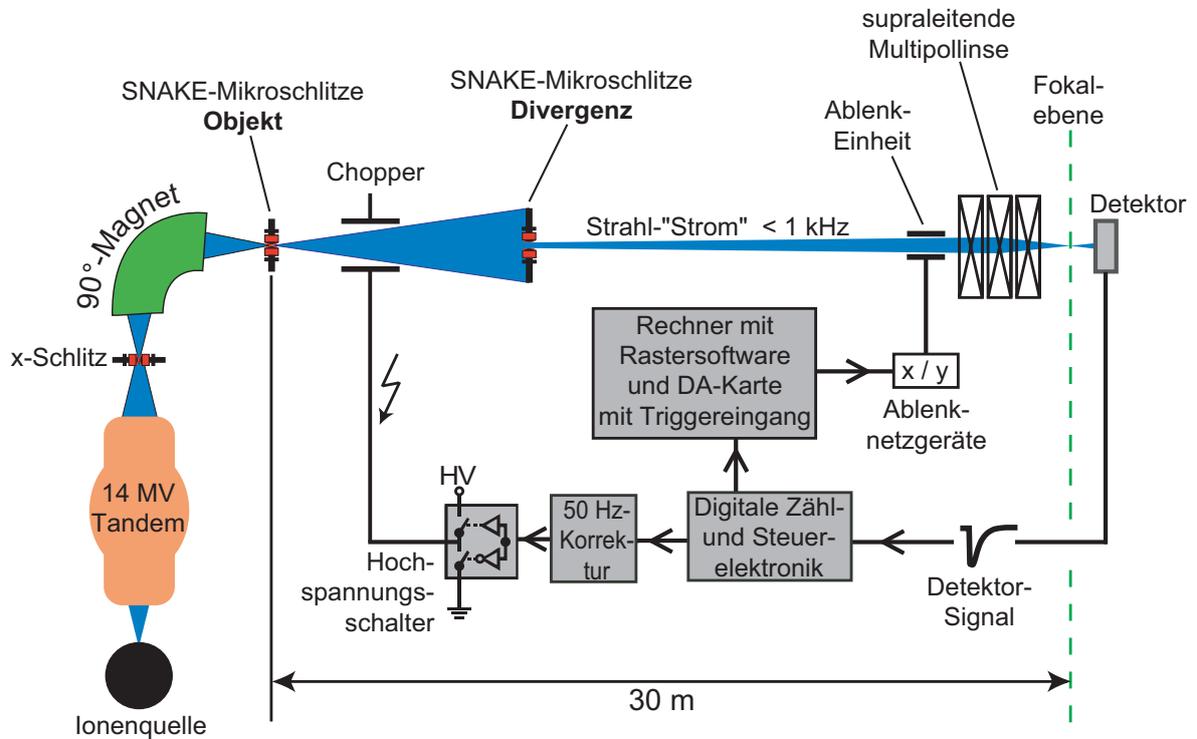


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Strahlführung bei SNAKE.

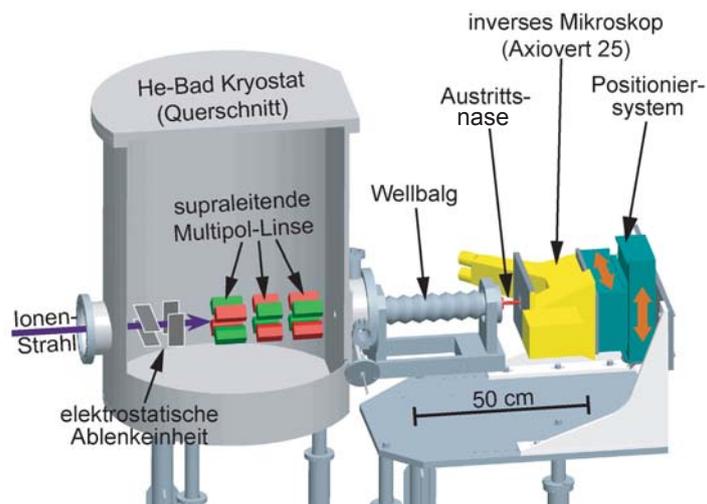


Abbildung 3.2: CAD-Zeichnung des Zellbestrahlungsplatzes [2].

experimenten typischerweise $50\ \mu\text{m}$ weit geöffnet, was zu einer Strahldivergenz von ca. $\pm 8\ \mu\text{rad}$ führt. Die Öffnung der Objektschlitze wird mittels der schon erwähnten kurz-brennweitigen supraleitenden Multipollinse, die aus einem Quadrupoltriplett besteht, allerdings als Duplett verwendet wird, verkleinert in der in Abb. 3.1 eingezeichneten Fokalebene abgebildet. Im gegenwärtigen Betriebsmodus beträgt der Verkleinerungsfaktor $1/88$ in x -Richtung und $1/24$ in y [3]. Abb. 3.2 zeigt eine CAD-Zeichnung des die Linse beinhaltenden Helium-Bad-Kryostaten und des eigentlichen Zellbestrahlungsplatzes. Dieser liegt im Gegensatz zur gesamten Strahlführung an Luft, so dass die Ionen an der in Abb. 3.2 eingezeichneten Austrittsnase durch eine $7.5\ \mu\text{m}$ dicke Kaptonfolie an die Atmosphäre treten. Auf dem Tisch des Mikroskops, an den die in Abb. 3.1 eingezeichnete Fokalebene gelegt wurde, werden die zu bestrahlenden Proben angebracht. Mit der eingezeichneten elektrostatischen Ablenkeinheit kann der Strahl in x und y je nach elektrischer Steifigkeit der verwendeten Ionen um jeweils ca. $\pm 300\ \mu\text{m}$ abgelenkt werden. Zwischen den Objekt- und Divergenzschlitzen erkennt man in Abb. 3.1 durch einen Hochspannungsschalter angesteuerte Ablenkplatten, die als Chopper bezeichnet werden. Mit diesem können die für die Zellbestrahlungen nötigen Einzelionen präpariert werden. Dazu liegt am Chopper eine Hochspannung an, die den Strahl in y -Richtung so weit ablenkt, dass er den Experimentierplatz nicht erreicht. Erst durch ein manuelles Triggersignal wird die Spannung ausgeschaltet, so dass ein Ion den Chopper passieren kann und die Probe hinter der Linse erreicht. Nachdem das Ion die Probe durchdrungen hat, wird es von einem dahinter angebrachten Detektor, der in den Objektivrevolver des Mikroskops integriert ist, registriert. Dieser schickt ein Signal an einen Zähler, der wiederum den Hochspannungsschalter dazu veranlasst, den Chopper für Ionen zu sperren. Nun kann die Steuerungssoftware für die Ablenkeinheit den nächsten Bestrahlungspunkt anfahren. Daraufhin sendet sie ein Signal an den Hochspannungsschalter, der den Chopper für das nächste Ion öffnet.

Die auf diese Weise erzeugten Bestrahlungsmuster stellen in der Regel rechtwinklige Punktmatrizen mit frei definierbarem x - und y -Abstand der Punkte zueinander dar. Um auch komplexere Muster erzeugen zu können, wurde in der Steuerungssoftware eine Funktion implementiert, mit der beliebige Punkte, die in einer externen Datei als Tabelle aus x - und y -Koordinate gespeichert sind, angefahren werden können. Die Umwandlung eines Graustufenbildes, das zuvor in ein Rasterformat gebracht wurde, in eine solche Tabelle wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals durchgeführt. Abb. 3.3 zeigt die Mikroskopaufnahme (10-fache Vergrößerung) einer als Kernspurdetektor verwendeten Polycarbonat-Folie, die mit einem solchen Muster bestrahlt wurde. Diese Folie wurde nach der Bestrahlung in alkoholischer Natronlauge geätzt. Bei dem Ätzprozess löst sich die Folie an den Stellen, an denen ein Ion durchgegangen ist, schneller auf,

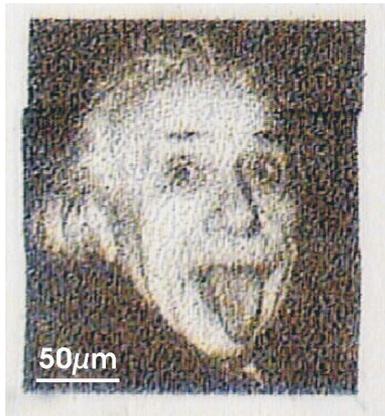


Abbildung 3.3: Albert Einstein aus über 40 000 einzelnen 55 MeV Kohlenstoffionen auf einer Polycarbonat-Folie erzeugt.

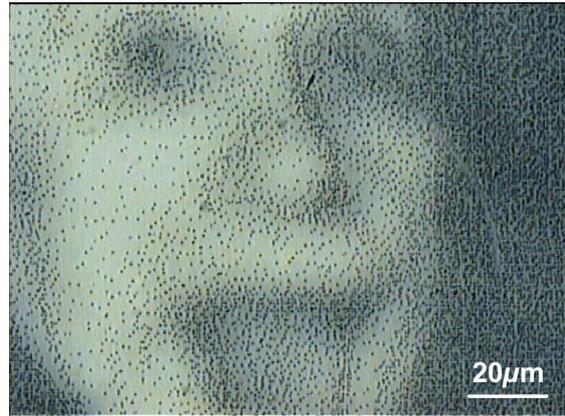


Abbildung 3.4: Vergrößerter Ausschnitt von Abb. 3.3. Man erkennt einzelne Ioneneinschläge.

so dass nach einer Stunde Ätzzeit unter dem Mikroskop an jedem Einschussort eine Ätzgrube zu sehen ist. Die einzelnen Gruben erkennt man bei 40-facher Vergrößerung (Abb. 3.4).

3.2 Strahlauflösung

3.2.1 Bestimmung der Strahlauflösung

Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Qualität der Bestrahlung liegt in der erreichbaren Strahlauflösung, da sie die Untergrenze der gezielt zu bestrahlenden Strukturen festlegt. Für die Bestrahlung von Substrukturen eines Zellkerns, dessen Durchmesser ca. $10 \mu\text{m}$ beträgt, ist eine Strahlauflösung von ca. $1 \mu\text{m}$ oder besser wünschenswert. Zur Bestimmung der Strahlauflösung wurde ein Kernspurdetektor am eigentlichen Zellbestrahlungsplatz (also unmittelbar hinter dem $7.5 \mu\text{m}$ dicken Austrittsfenster an Luft) angebracht und von dem Ionenstrahl mit einem Punktgitter mit $5 \mu\text{m}$ Gitterkonstanten abgerastert. Abb. 3.5 zeigt eine Mikroskopaufnahme eines solchen Kernspurdetektors nach dem im letzten Absatz beschriebenen Ätzprozess. Um aus diesem Bild die Strahlauflösung zu bestimmen, wurden die Koordinaten der Mittelpunkte der Ätzgruben bestimmt⁽¹⁾ und daran horizontal und vertikal jeweils zueinander parallele Ausgleichsgeraden angepasst. Der Abstand eines jeden Punktes zu diesen Ausgleichsgeraden wurde in das Histogramm Abb. 3.6 eingetragen. An diese Daten wurde eine

⁽¹⁾Unter Zuhilfenahme des Freeware-Programms ImageJ [20]

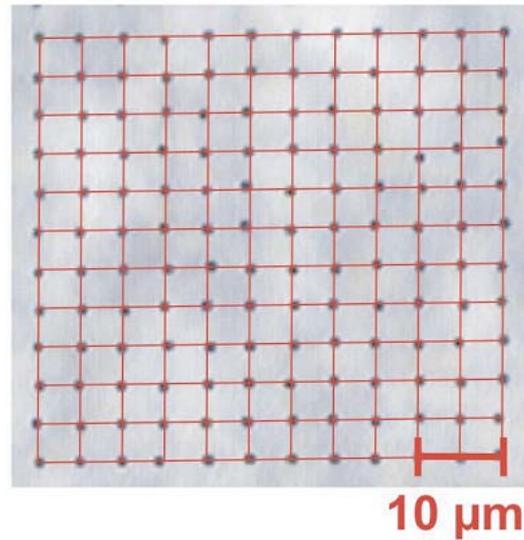


Abbildung 3.5: 5 μm -Punktgitter von 100 MeV Sauerstoff-Ionen auf einem Kernspurdetektor mit eingezeichneten Ausgleichsgeraden zur Demonstration der Bestrahlungsgenauigkeit.

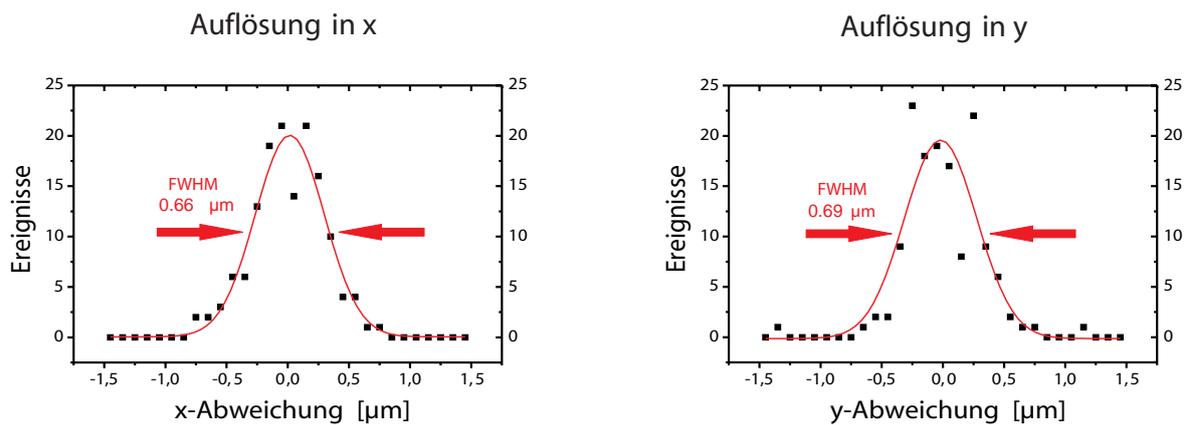


Abbildung 3.6: Statistische Auswertung der Punktgitterbestrahlung. Die erzielte Strahlauflösung beträgt 0.66 μm fwhm in x und 0.69 μm in y .

Gaußfunktion gefittet. Daraus ergibt sich eine Halbwertsbreite (fwhm) von $0.66 \mu\text{m}$ in x bzw. $0.69 \mu\text{m}$ in y . Diese Auflösung stellt die bei der Zellbestrahlung erreichbare Bestrahlungsgenauigkeit dar, da alle Randbedingungen identisch sind.

3.2.2 Verbesserung der Strahlaufösung mittels einer passiven 50 Hz-Korrektur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Schaltung entwickelt, die die Auflösung weiter verbessern konnte. Angriffspunkt für die Verbesserung stellen parasitäre, fluktuierende Magnetfelder dar, die auf der Flugstrecke der Ionen von den Objektschlitzen zum Experiment auf den Strahl einwirken. Diese lassen den Ionenstrahl räumlich oszillieren und limitieren somit die Auflösung. Die Hauptkomponente dieser Oszillationen hat eine Frequenz von 50 Hz mit einer Amplitude von ca. $1 - 2 \mu\text{m}$, schwächer ausgeprägt treten ganzzahlige harmonische Vielfache davon auf. Die Oszillation ist phasenstarr mit dem elektrischen Wechselstromnetz gekoppelt [4]. Durch eine aktive 50 Hz-Gegensteuerung mit Luftspule werden die Amplituden deutlich reduziert aber nicht gänzlich eliminiert. Deshalb wurde eine passive Strahlkorrektur aufgebaut, die sich die oben beschriebene, zur Einzelionenpräparation nötige Unterbrechung des Strahls mittels eines Choppers zunutze macht. Die Steuerung des Choppers kann jetzt mit der auch in Abb. 3.1 eingezeichneten Korrekturschaltung verbunden werden, so dass Ionen immer nur in einem sowohl in der Phasenlage zur 50 Hz-Netzfrequenz als auch in der Länge frei wählbaren Zeitfenster den Chopper passieren können. Bei beliebig kleinem Zeitfenster sollten also alle durchgelassenen Ionen durch die netzgekoppelten parasitären Einstreuungen die gleiche Auslenkung erfahren, womit das Oszillationsproblem gelöst wäre. Dies würde aber zu einer unakzeptabel kleinen Zählrate am Experiment führen, so dass in der Größe des Zeitfensters ein Kompromiss gefunden werden musste. Ein praktikabler Wert des Zeitfensters liegt bei 2 ms mit 50 Hz Wiederholrate, mit dem bei den in Abschnitt 3.1 genannten Schlitzöffnungen eine Zählrate von ca. 40 Hz erreicht wird.

Die Schaltung wird im Folgenden kurz beschrieben: Im linken Teil von Abb. 3.7 erkennt man den „zero-crossing detector“ aus [21], der für die positive Halbwelle des am Eingang (im Schaltplan mit A gekennzeichnet) anliegenden 50 Hz-Signals, das mittels eines Trafos aus der Netzspannung gewonnen wird, einen logischen 1-Wert und für die negative eine logische 0 ausgibt (siehe B im Schaltplan). Danach durchläuft das Signal einen 74LS221N-IC, der zwei monostabile Multivibratoren (Monoflops) enthält. Der erste davon triggert auf die positive Flanke des Wechsels von 0 auf 1 und gibt dann an seinem Ausgang 1 aus, bevor er nach einer am Potentiometer R11 wählbaren Zeit wieder auf 0 zurück geht (siehe C). Somit lässt sich an diesem Potentiometer die Phase

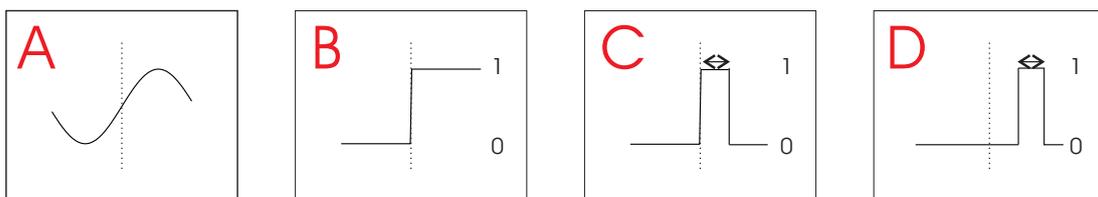
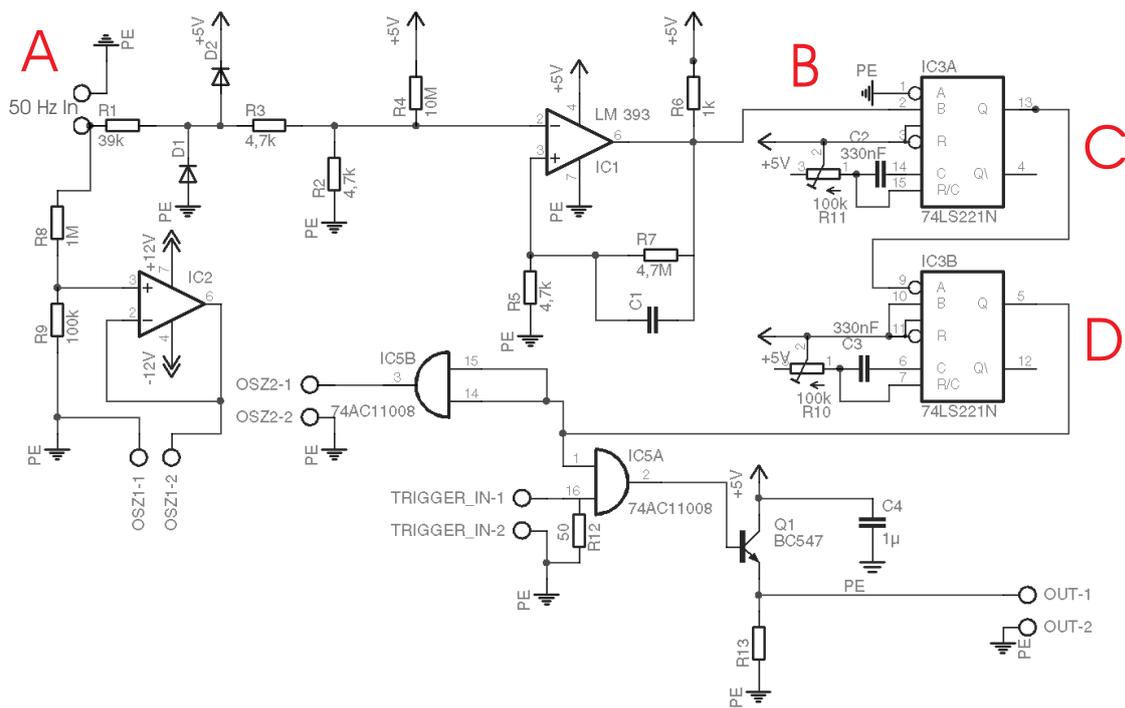


Abbildung 3.7: Schaltplan der passiven 50 Hz-Korrektur und Signalverlauf.

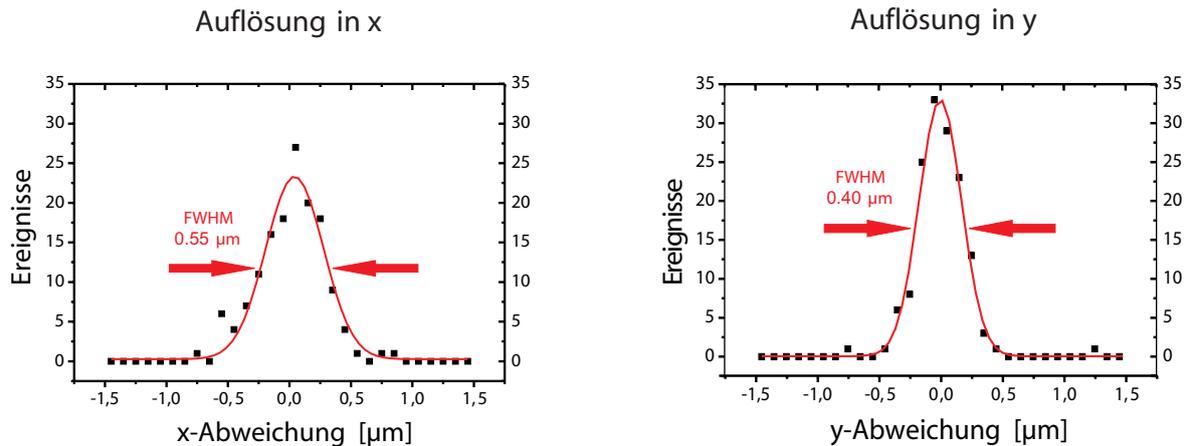


Abbildung 3.8: Strahlaufösung mit passiver 50 Hz-Korrektur (Zeitfenster 2 ms).

des Chopper-Zeitfensters regeln, denn auf die negative Flanke dieses Pulses triggert dann der zweite Monoflop. Auch dessen Pulslänge und somit die des Zeitfensters lässt sich über das Poti R10 regeln (D). Die Wertebereiche der Potentiometer und die für die Zeitregelung benötigten Kondensatoren (C2 und C3) wurden so gewählt, dass sowohl Phase als auch Länge des Zeitfensters um eine ganze Schwingungslänge des 50 Hz-Signals variiert werden können.

Im Folgenden wird das Signal noch über eine logische UND-Schaltung mit dem Ausgangssignal der Choppersteuerung verbunden und über einen Ausgangstransistor an den Chopper geschickt. Weiterhin sind noch zwei Oszilloskopausgänge vorhanden, mit denen zum einen das analoge 50 Hz-Netz-Signal und zum anderen das Ausgangssignal (D) überprüft werden können.

Zum Test der Schaltung wurde die Strahlaufösung analog zu Abschnitt 3.2.1 einmal mit und einmal ohne die Korrektur bestimmt. Das Ergebnis ohne die Schaltung wurde in Abb. 3.6 schon gezeigt. Aus Abb. 3.8 lässt sich mit der Korrekturschaltung eine Auflösung von $0.55 \mu\text{m}$ in x und $0.40 \mu\text{m}$ in y herauslesen. Dies zeigt, dass die Auflösung weiter verbessert werden konnte. Dass der Zugewinn in x schwächer ausfällt als in y , war zu erwarten, da die supraleitende Linse in x stärker verkleinert als in y (s. o.) und sich somit in dieser Richtung die Strahloszillationen weniger stark bemerkbar machen.

3.3 Zellbehälter

Neben dem in Kap. 3.1 beschriebenen Versuchsaufbau stellen die für die Zellbestrahlungsexperimente an SNAKE entwickelten Zellbehälter einen wichtigen Teil der Experimentausstattung dar. Aufgabe der Behälter ist es, die Zellen und das Zellkulturmedium während der Wachstumsphase und der Bestrahlung aufzunehmen. Aufgrund

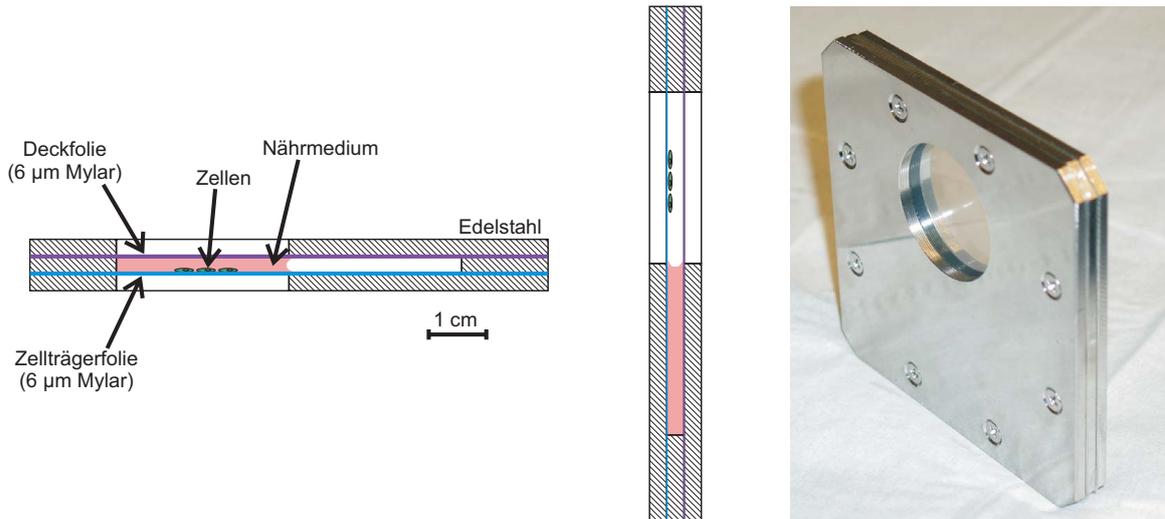


Abbildung 3.9: Für die Bestrahlungsexperimente an SNAKE konstruierte Zellbehälter.

des bei den bisherigen Experimenten hinter den Zellen positionierten Detektors (s. Kap. 3.1), ergibt sich eine weitere Anforderung an die Behälter: Sie müssen so konstruiert sein, dass sichergestellt werden kann, dass die Ionen von ihnen und ihrem Inhalt nicht absorbiert werden. Dies steht im Gegensatz zu der Forderung, dass die Zellen von Nährmedium umgeben sein sollten. Das in Abb. 3.9 gezeigte Design verbindet beide Eigenschaften. Zwischen zwei Edelstahlplatten ist eine $6\ \mu\text{m}$ dicke Mylarfolie eingespannt, auf der die Zellen wachsen. Die für die Experimente an SNAKE genutzten HeLa-Zellen⁽²⁾ wachsen adhärent, haften also im Gegensatz zu in Suspension wachsenden Zellen an der Folie. Die obere Stahlplatte hat eine zentrische Bohrung von 66 mm Durchmesser, die untere eine exzentrische mit 33 mm Durchmesser. Als Deckel dient wieder eine Kombination aus Folie und Stahlplatte mit exzentrischer Bohrung. Der durch die 66-mm-Bohrung und die Folien eingeschlossene Hohlraum wird mit Nährmedium gefüllt, das im waagrechten Zustand die Zellen umgibt. Zur Bestrahlung hingegen wird der Behälter aufgestellt, wodurch das Medium nach unten abfließt (s. mittleres Bild in Abb. 3.9). Somit hat das Ion neben der Luft nur die beiden Folien und die Zellen zu durchdringen. Wie Rechnungen zeigen, erreichen in diesem Fall alle Ionen den Detektor. Durch das am Boden stehende Nährmedium befinden sich die Zellen während der Bestrahlung in gesättigter Atmosphäre. Durch diese trocknen die Zellen

⁽²⁾Die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Diese Zellen werden u. a. aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit als Standardzellen für zell- und molekularbiologische Experimente verwendet. Diese ist auch bei den Zellbestrahlungsexperimenten an SNAKE wichtig, da die Abkühlung auf Zimmertemperatur während der Bestrahlung den Zellen nicht schaden darf. Der Name geht auf die Initialen der Patientin Henrietta Lacks zurück, aus deren Zervix-Karzinom die Zelllinie isoliert wurde [22].

in der für die Bestrahlung benötigten Zeit (max. 20 min) nicht aus und zeigen keine Stresssymptome, wie in Versuchen festgestellt wurde.

Um die mit Hilfe des in Abb. 3.2 eingezeichneten Mikroskops zur Bestrahlung ausgewählten Zellen bei der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kap 3.4) leicht wiederzufinden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zellträgerfolie mit einem Koordinatensystem im Mikrometermaßstab versehen. Dabei sollten die Markierungen nicht größer als $20\ \mu\text{m}$ sein, damit sie unter dem bei der Mikroskopie üblicherweise verwendeten Objektiv mit 63-facher Vergrößerung nicht den gesamten Kameraausschnitt ausfüllen und beim Betrachten durch die Folie nicht das Anregungs- und Emissionslicht über Gebühr schwächen. Überlegungen, die Folien mit Aluminium strukturiert zu bedampfen, wurden wegen des aufwändigen Vakuumprozesses aufgegeben. Stattdessen wurden im institutseigenen Reinraum Versuche angestellt, ob Strukturen dieser Größenordnung noch auf einer aluminisierten Mylarfolie mittels Photolithographie und anschließendem Ätzen erzeugt werden können. Als die gestellten Anforderungen mit dieser Methode erreicht werden konnten, wurde das Layout für die zur Folienproduktion nötigen Belichtungsmasken erstellt und diese gefertigt⁽³⁾.

Als Muster wurden Zweiergruppen von $15\ \mu\text{m}$ hohen alphanumerischen Zeichen im Abstand von $300\ \mu\text{m}$ verwendet. Das erste Zeichen der Zweiergruppe bezeichnet die x -Koordinate, das zweite die y -Koordinate, gezählt wird 1, 2...9, A, B...Z. Somit kommt man auf eine markierte Fläche von ca. $1\ \text{cm}^2$, was ausreichend groß ist. Diese Koordinatenpaare wurden mit einem gestrichelten Gitternetz verbunden, das gleichzeitig als Längenreferenz dient. Um testen zu können, bis zu welcher Größe die Striche noch ätzbar sind, wurden drei Muster mit unterschiedlichen Strichlängen und -dicken auf die Maske geschrieben, die so angeordnet sind, dass je nach Orientierung der Folie beim Einbau in den Zellbehälter ein Muster ausgewählt werden kann. Auch das feinste Muster (Strichlänge $10\ \mu\text{m}$, -breite $3\ \mu\text{m}$) erwies sich als noch praxistauglich. Darüber hinaus ist ein Gitter mit $20\ \mu\text{m}$ Länge und $4\ \mu\text{m}$ Breite (s. Abb 3.10) und eines mit $20\ \mu\text{m}$ und $5\ \mu\text{m}$ vorhanden. Im Experiment wurde meistens das in Abb. 3.10 gezeigte Muster verwendet.

3.4 Ablauf biophysikalischer Experimente an SNAKE

Ca. 36 Std. vor Beginn der Bestrahlungsexperimente werden HeLa-Zellen in die Zellbehälter (ohne Deckel) ausgesät und bis zur Bestrahlung im Zellkulturschrank bei 37°C

⁽³⁾Bei ML&C GmbH, Jena

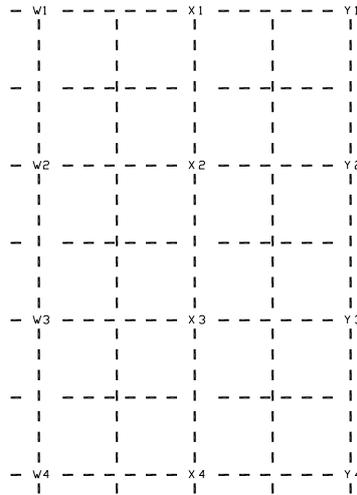


Abbildung 3.10: Ausschnitt aus dem Zellfolien-Layout. Man erkennt die zweistelligen Koordinaten im Abstand von $300\ \mu\text{m}$ und die gestrichelten Verbindungslinien mit einer Strichlänge von $20\ \mu\text{m}$.

und 5% CO_2 -Gehalt inkubiert. Zur Bestrahlung wird der Zellbehälter mit dem Deckel verschlossen und vertikal vor dem Strahlaustrittsfenster eingespannt. Die zu bestrahlenden Zellen werden mittels des im Versuchsaufbau integrierten Mikroskops an die zuvor durch einen Szintillatorkristall (CsI(Tl)) ermittelte Strahlposition gebracht. Dann wird der im Mikroskoprevolver integrierte Detektor hinter die Deckfolie des Zellbehälters positioniert und die Zellen werden gemäß den Anforderungen des jeweiligen Experiments bestrahlt. In der Regel werden dabei Punktmuster von ca. $0.25\ \text{mm}^2$ Größe abgerastert (analog dem Kernspurdetektor in Abb. 3.5). Dazu wurden bis jetzt entweder $100\ \text{MeV}$ Sauerstoffionen oder $55\ \text{MeV}$ Kohlenstoffionen verwendet. Erstere haben einen LET-Wert (= stopping power) von $405\ \text{keV}/\mu\text{m}$, was bei einer angenommenen Zellkerngröße von $700\ \mu\text{m}^3$ einer Dosis von $0.66\ \text{Gy}$ pro Ion und Zellkern entspricht, zweitere einen LET-Wert von $296\ \text{keV}/\mu\text{m}$ entsprechend einer Dosis von $0.49\ \text{Gy}$ pro Ion und Zellkern. Nach einer einfachen Abschätzung, der eine lineare Abhängigkeit zwischen Dosis und Zahl der erzeugten DSB zugrunde liegt, erzeugt ein einzelnes $100\ \text{MeV}$ Sauerstoffion in einem Zellkern im Mittel 23 Doppelstrangbrüche [3], ein $55\ \text{MeV}$ Kohlenstoffion 17. Diese Werte sind jedoch eher als Anhaltspunkt für die zu erwartende Größenordnung zu sehen, da eine zu vermutende gesteigerte biologische Wirksamkeit der dicht ionisierenden Strahlung in dem linearen Modell nicht berücksichtigt wird. Die dadurch zu erwartende Überhöhung ist jedoch nicht genau bekannt. Nach der Bestrahlung werden die Zellen (wieder ohne Zellbehälterdeckel) für eine bestimmte Inkubationszeit im Brutschrank gelagert. Innerhalb dieser Zeit beginnen die in Kap. 2.1 vorgestellten DNA-Reparaturvorgänge. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Zellen mittels

Farbstoff	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
DAPI	345	455
FITC/Alexa488	480	522
Cy3	522	567
Cy5	614	667

Tabelle 3.1: Anregungs- und Emissionswellenlängen der in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome.

Paraformaldehyd fixiert. Das Formaldehyd besitzt die Eigenschaft, bei dieser Abtötung möglichst wenig an der Struktur der Zellen zu ändern. Somit stellt das auf diese Weise erhaltene Präparat eine eingefrorene Momentaufnahme der Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung dar. Damit später die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar sind, wird die DNA mit dem Farbstoff DAPI blau angefärbt. Um die in Kap. 2.2 behandelten Proteine beobachten zu können, muss in der Regel zunächst das Präparat mittels Triton, das die Zellmembran „anverdaut“, permeabilisiert werden. Nun können für das zu beobachtende Protein spezifische primäre Antikörper in das Präparat gebracht werden, die an das Protein binden. Zuletzt werden noch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte sekundäre Antikörper in die Probe gebracht, die ihrerseits an die primären binden. Diese Farbstoffe haben genau definierte Anregungs- und Emissionswellenlängen, die in Tabelle 3.1 zusammengefasst sind. Damit man pro Präparat nicht nur auf ein angefärbtes Protein beschränkt ist, verfügt ein Fluoreszenzmikroskop über sehr schmalbandige Anregungs- und Emissionsfilter. Diese ermöglichen die Betrachtung eines Proteins, ohne ein Störsignal eines weiteren Proteins zu erhalten, das mit einem anderen Farbstoff gefärbt ist. Durch eine am Mikroskop angebrachte CCD-Kamera können Bilder der Probe aufgenommen werden. Aufgrund der höheren Lichtempfindlichkeit werden dazu Schwarz-Weiß-Kameras verwendet, da eine Farbinformation durch die nahezu monochromatischen Filter nicht nötig ist. Zu Anschauungszwecken kann diese nachträglich mit Hilfe von Bildbearbeitungssoftware wieder eingefügt werden, ebenso können verschiedene Kanäle überlagert werden (s. Abb. 3.11). Zur Gewinnung solcher 2D-Bilder werden die Zellbehälter auf den Mikroskoptisch gelegt, wobei das Objektiv über das Immersionsöl direkt in Kontakt zur Zellträgerfolie steht. Aufgrund der im Vergleich zur Zellkernhöhe (ca. $10\ \mu\text{m}$) geringen Tiefenschärfe des Objektivs von etwa $300\ \text{nm}$ ergibt sich zusätzlich die Möglichkeit, in die Tiefe und somit 3D-aufgelöste Bilder zu erhalten. Dazu wird zunächst auf die oberste Ebene des Zellkerns (oder etwas darüber) scharf gestellt und dann der Fokus sukzessiv in typischerweise $0.25\text{-}\mu\text{m}$ -Schritten bis zur untersten Zellkernebene verschoben und

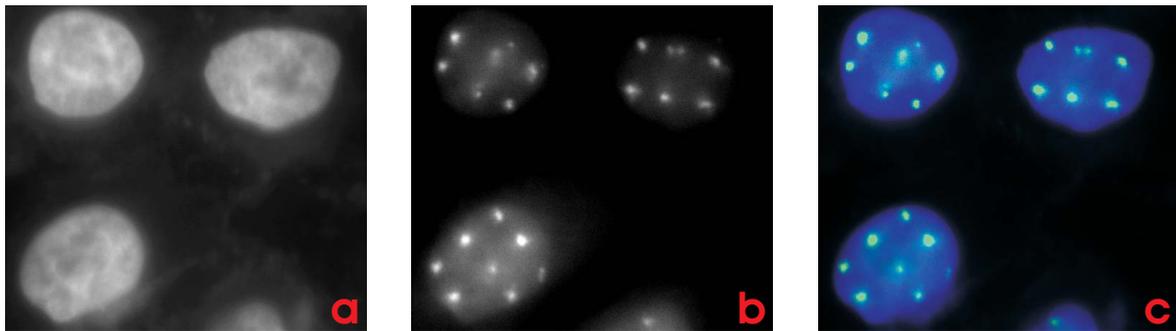


Abbildung 3.11: Mikroskopie einer mit Punktmuster bestrahlten Probe (Punktabstand $5\ \mu\text{m}$). a: Zellkerne im DAPI-Kanal, b: 53BP1 im FITC-Kanal, c: nachträgliche Überlagerung beider Kanäle.

jeweils eine Aufnahme gemacht. So erhält man einen sogenannten z-Stack, der eine Serie von Bildern darstellt, von denen jedes einer Ebene im Kern entspricht. Exakte Tiefeninformationen lassen sich bei der Mikroskopie direkt aus den Zellbehältern mit dieser Methode jedoch nicht erhalten, da die Zellträgerfolie aufgrund ihrer Elastizität der z-Bewegung des Objektivs etwas mitfolgt [3]. Deshalb wurde ein Verfahren entwickelt, den bestrahlten Bereich der Zellträgerfolie mithilfe eines dafür angefertigten LötKolbenaufsatzes herauszubrennen und auf einen Objektträger anzubringen. Dies hat weiterhin den Vorteil, dass sich die Präparate mittels eines auf der Probe aufgetragenen und mit dem Objektträger verklebten Deckglases luftdicht verschließen lassen und somit zumindest bedingt lagerungsfähig sind.

Durch die im Vergleich zur Zellkernhöhe kleine Tiefenschärfe enthält jedes Bild einen unscharfen Hintergrund von Ebenen des Zellkerns, die sich nicht im Fokus befinden. Dies lässt sich mathematisch über die sogenannte Point-Spread-Funktion (PSF) des Mikroskops beschreiben. Diese gibt an, wie ein einzelner Punkt in Abhängigkeit von seiner z-Position bezüglich der Fokusebene abgebildet wird und gleicht in ihrer Form zweier übereinander stehender Kegeln (s. Abb. 3.12). Das Mikroskopbild eines ausgedehnten Objektes ergibt sich aus der Linearkombination der Abbilder seiner einzelnen Punkte [23]. Somit stellt jedes Bild eines Objekts mathematisch eine Faltung des Objekts mit der PSF dar. Folglich könnte ein 2-dimensionales Gebilde in der Fokusebene unter Vernachlässigung von Beugungseffekten exakt dargestellt werden, während bei jedem in z ausgedehnten Objekt durch die nicht punktförmige PSF der außerhalb der Fokusebene liegenden Bereiche Artefakte hinzugefügt werden. In einem 2D-Bild kann a priori nicht bestimmt werden, ob ein ausgedehntes Objekt eine echte Größe besitzt oder nur aufgrund seiner Lage außerhalb der Fokusebene ausgedehnt erscheint. Bei einem z-Stack hingegen, der in der Höhe einen ganzen Zellkern umspannt, muss das Objekt in einer Ebene im Fokus sein. Mit dieser Zusatzinformation lässt sich das Ori-

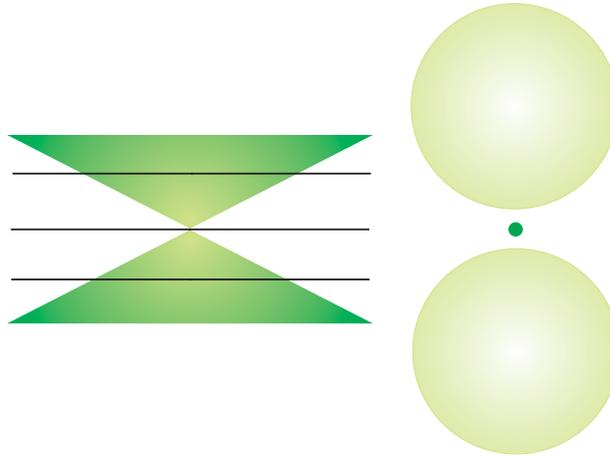


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Point-Spread-Function eines Mikroskops: Die mittlere der drei eingezeichneten Ebenen entspricht der Fokusebene, in der ein Punkt abgesehen von Beugungseffekten als Punkt abgebildet wird (angedeutet durch den Punkt rechts). Punkte außerhalb der Fokusebene werden als Schnitte durch den Kegel abgebildet. Statt der rechts gezeigten lichtschwächeren Kreise erhält man aufgrund von Beugungseffekten in Wirklichkeit Kreisringe, die mit diesem einfachen Modell nicht erklärt werden.

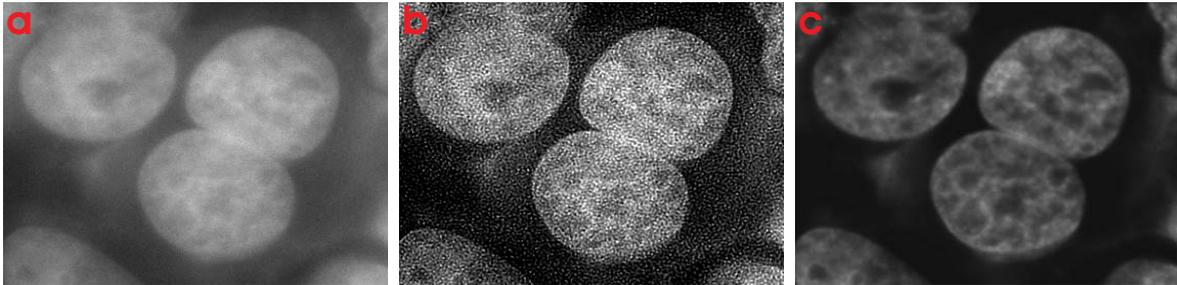


Abbildung 3.13: Dekonvolution eines DAPI-Bildes.

a) zeigt eine Ebene des originalen Ausgangsstacks, b) stellt eine 2D-Dekonvolution dieser Ebene mit den dafür typischen granularen Artefakten dar und c) zeigt die selbe Ebene des 3D-entfalteten Stacks, in der die Substrukturen des Zellkerns – sogenannte Nucleoli mit geringer DNA-Dichte – deutlich sichtbar werden.

nalbild bei genauer Kenntnis der PSF aus einem z-Stack mittels eines Dekonvolutions- (= Entfaltungs-) Algorithmuses auf iterativem Wege weitestgehend wieder rekonstruieren. Dies zeigt Abb. 3.13 c) im Vergleich zur 2D-Entfaltung im Bild b). Deshalb kann es selbst dann nützlich sein, z-Stacks zu produzieren, wenn man an einer Tiefeninformation gar nicht interessiert ist. Beide Bilder wurden mittels des Softwarepakets Huygens [24] in 40 Iterationen mit dem „Classic Maximum Likelihood“-Algorithmus prozessiert. Dieser Algorithmus wird für den Großteil aller anfallenden Dekonvolutionsaufgaben empfohlen [23]. Mit auf diese Art geschärften z-Stacks lässt sich die Tiefenaufklärung

noch etwas anschaulicher darstellen, als es mittels der Bildfolge im z-Stack möglich ist. Dazu werden mittels geeigneter Software aus den z-Stacks 3-dimensionale Modelle errechnet. Beispiele dafür zeigt Abb. 3.14. Es muss aber bedacht werden, dass solche Darstellungen nur als Anschauungsmodelle gedacht sind. Für quantitative Auswertungen z. B. der Linienbreite sind sie nicht geeignet, da die Transparenz der Modelle dadurch erreicht wird, dass ein Graustufenschwellwert festgelegt wird, unterm dessen alle Informationen verworfen werden. Somit hängt auch die im Bild gesehene Linienbreite von diesem Schwellwert ab.

3.5 Gezielte Bestrahlung einzelner Zellkerne

Alle in den folgenden Kapiteln vorgestellten Experimente wurden auf die eben beschriebene Art durchgeführt. Jedoch wurde neben der Bestrahlung ausgedehnter Punktmuster im Rahmen dieser Arbeit auch damit begonnen, erste Versuche zur gezielten Bestrahlung einzelner Zellkerne durchzuführen. Auch hierzu wird zunächst ein Cäsiumiodidkristall am eigentlichen Zellbestrahlungsort angebracht, mit dessen Hilfe über das am Versuchsaufbau angebrachte Positionierungsmikroskop die genaue Strahlposition bestimmt wird. Der Strahlfleck wird an einem mit dem Mikroskop verbundenen Monitor mittels eines Fadenzuggenerators markiert. Anschließend wird der Zellbehälter mit den Proben eingebaut und über das Monitorbild ein Zellkern an die Position des Fadenzuges gebracht und die ausgewählte Zelle mit einem kreuzförmigen Muster bestrahlt.

In Abb. 3.15 erkennt man neben den Zellen im Phasenkontrast und dem das Zielgebiet definierenden Fadenzug auch die Markierung „ML“ auf der Zellfolie (aufgrund der geringen Vergrößerung und der schlechten Qualität der Kamera nicht sehr deutlich). Ohne diese in Kap. 3.3 beschriebene Markierung wäre die Durchführung solcher Zielbestrahlungen nicht möglich, da sich die einzelnen bestrahlten Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht wiederfinden ließen. Mit Hilfe der markierten Folie kann der bestrahlte Bereich über die Koordinaten entweder bei Durchlichtbeleuchtung wie in Abb. 3.16 a oder über das von den DAPI-gefärbten Zellkernen emittierte blaue Licht, das bei Anregung mit UV-Licht durch die Folie scheint (Abb. 3.16 b), wiedergefunden werden. Ändert man nun den Fokus geringfügig, sieht man die Zellkerne, während die Markierung verschwunden ist (c). Schaltet man nun das Mikroskop auf den Kanal des Farbstoffes FITC um, mit dem das Protein 53BP1 (s. Kap. 2.2.3) analog zum letzten Abschnitt als Marker für die bestrahlten Bereiche angefärbt wurde (Abb. 3.16 d, nachträglich mit dem DAPI-Signal überlagert), sieht man an den Kreuzen in den Zellkernen, dass es mit dieser Methode gelungen ist, einzelne Zellkerne gezielt zu bestrahlen. Die

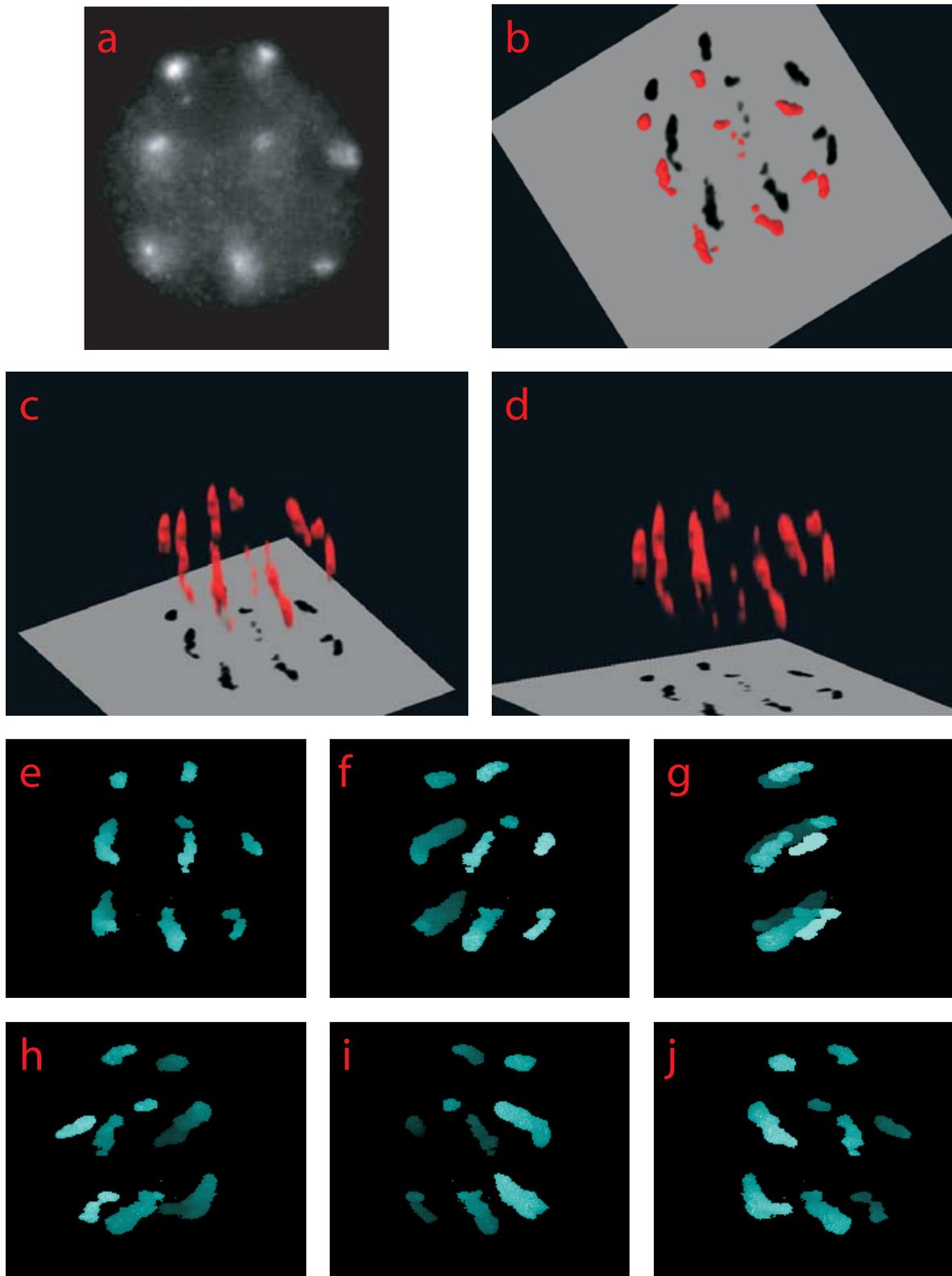


Abbildung 3.14: 3-dimensionale Anschauungsmodelle von Ionenspuren im Zellkern.

a: Original γ -H2AX-Aufnahme, b–d: Mit dem „SVI SFP-Renderer“ generierte Darstellung der Ionenspuren, e–j: Ausschnitte eines mittels ImageJ erstellten, um die y -Achse frei drehbaren Objekts.



Abbildung 3.15: *Phasenkontrastaufnahme am Bestrahlungsplatz bei 10-facher Vergrößerung.*

Entfernung der Kreuze von der Zellkernmitte zeigt, dass die Bestrahlungsgenauigkeit bei ca. $2\ \mu\text{m}$ liegt. Diese ist in der geringen Mikroskopvergrößerung beim Zielen und in dem mechanischen Positionieren begründet.

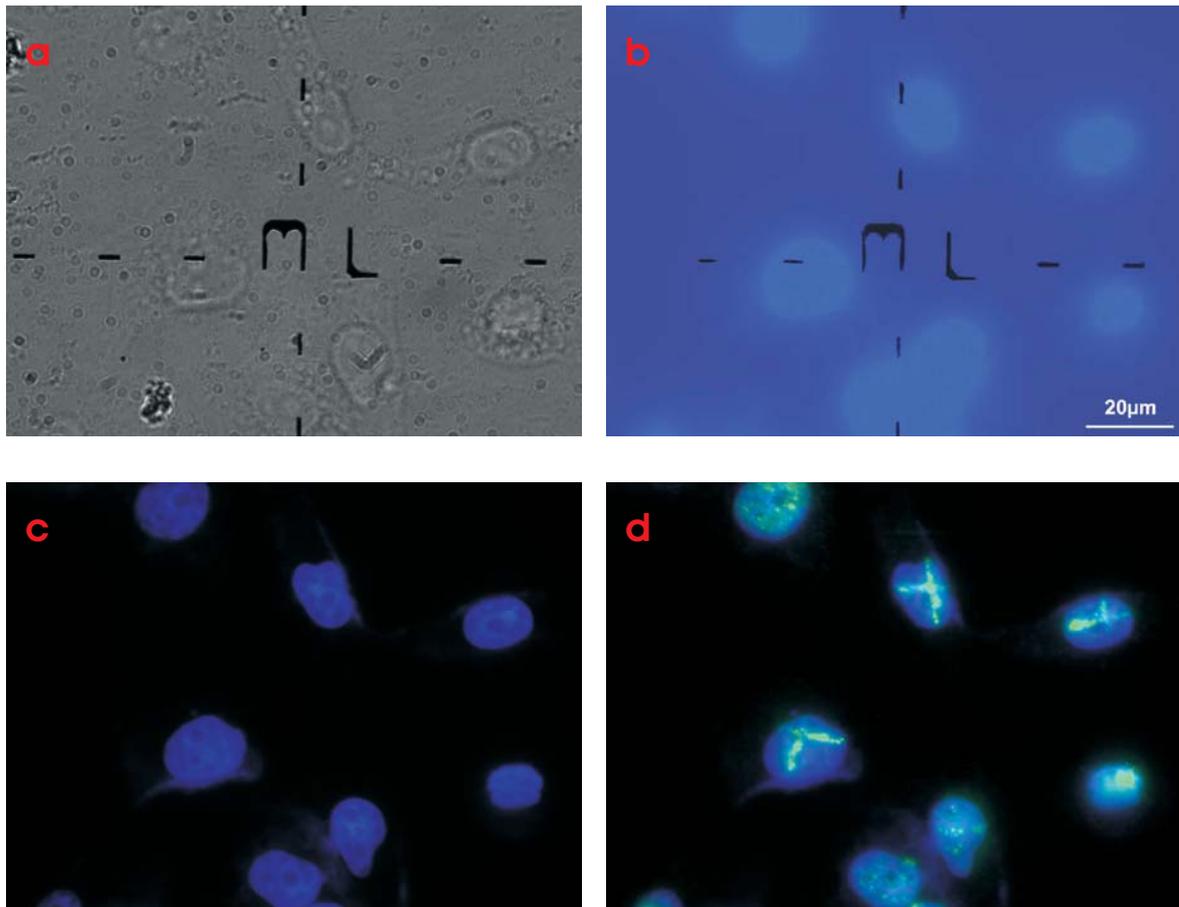


Abbildung 3.16: Mikroskopie gezielt bestrahlter Zellkerne auf strukturierter Zellträgerfolie.

a: Durchlichtbeleuchtung, auf Folie fokussiert.

b: DAPI-Fluoreszenz, auf Folie fokussiert.

c: DAPI-Fluoreszenz, auf Zellkern fokussiert.

d: DAPI + FITC: Man erkennt die Bestrahlung.

Kapitel 4

Untersuchung der Dynamik von Reparaturproteinen

Wie schon in Kap. 2 erwähnt, beschäftigt sich einer der Hauptteile dieser Arbeit mit der Untersuchung der Dynamik strahleninduzierter Ansammlungen von Proteinen. Dabei gibt es zwei verschiedene zu beobachtende Effekte: Zum einen kleinskalige Bewegungen, die eine Veränderung der Größe der einzelnen Foci bewirken, zum anderen größerskalige Bewegungen, die ein „Wandern“ der Foci zur Folge haben. Diese Effekte wurden sowohl in z -Ebenen, die sich in der Mitte eines Zellkerns befinden, als auch in Ebenen am oberen oder unteren Rand untersucht. Grund für einen evtl. zu erwartenden Unterschied sind Studien, die besagen, dass Chromosomen mit hoher Gen-Dichte eher in inneren Regionen des Zellkerns angesiedelt sind, während sich Gen-arme eher an der Peripherie des Zellkerns aufhalten [9]. Des weiteren gibt es Anzeichen, dass kleine Chromosomen mehr im Zentrum, große eher in der Peripherie gefunden werden [25].

Als Ausgangsbasis für diese Untersuchungen dient eine im August 2004 durchgeführte Zeitreihe. Dazu wurden HeLa-Zellen mit 100 MeV Sauerstoff-Ionen bestrahlt und die Inkubationszeit im Brutschrank zwischen Bestrahlung und Fixierung zwischen 10 min

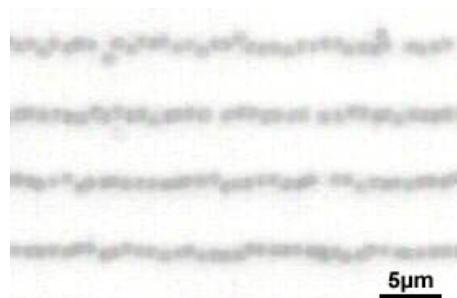


Abbildung 4.1: Zur Untersuchung der Foci-Dynamik verwendetes Linienmuster auf einem Kernspurdetektor.

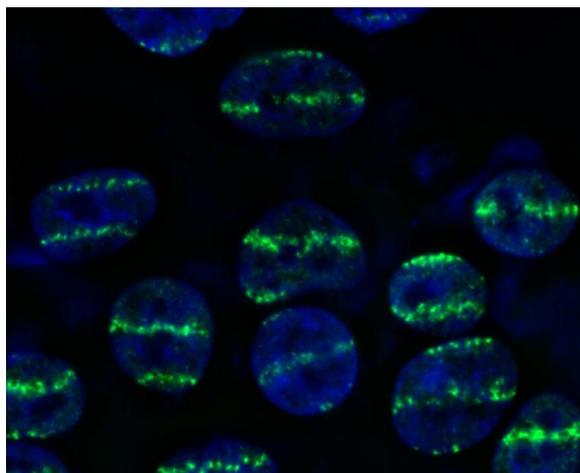


Abbildung 4.2: γ -H2AX 0.5 h nach einer Linienbestrahlung.

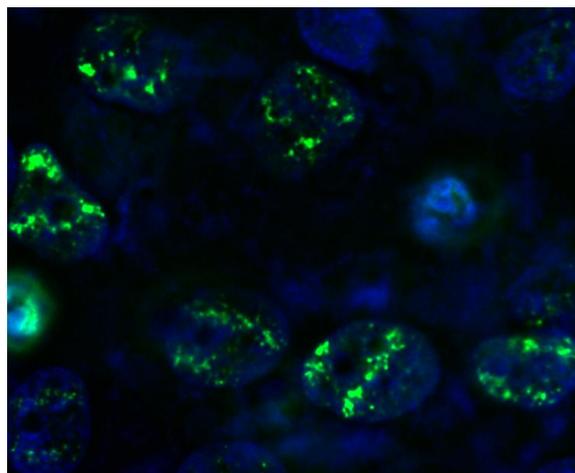


Abbildung 4.3: Stärker streuende Foci 15 h nach einer Linienbestrahlung.

und 15 Std. variiert. Bestrahlt wurden die Zellen mit einem Linienmuster (x -Abstand der Punkte einer Linie $1 \mu\text{m}$, y -Abstand der Linien $6 \mu\text{m}$, s. Abb. 4.1), da sich hier das Wandern der Foci deutlich in Form einer mit der seit der Bestrahlung vergangenen Zeit größer werdenden Streuung um die bestrahlte Linie bzw. einem „Verschmieren“ der Linie zeigt. Abb. 4.2 und 4.3 zeigen diesen Effekt in aus γ -H2AX-Foci gebildeten Linien (Verwendeter Farbstoff: Cy3). Dieses Verhalten soll im Rahmen dieser Arbeit quantitativ erfasst werden. Darüber hinaus sind in den Abbildungen noch Drehungen des gesamten Zellkerns zu beobachten, die jedoch nicht Gegenstand der im Folgenden dargestellten Untersuchung sind.

Zur Auswertung wurde die jeweils zu untersuchende Linie aus einer Ebene eines entfalteten z -Stacks mittels eines Bildbearbeitungsprogrammes ausgeschnitten und die Grauwerte eines jeden Pixels in einem ASCII-File gespeichert. Dieses wurde anschließend in die Datenanalysesoftware ROOT eingelesen (Abb. 4.4). Dort wurde für jede Pixelreihe ein Schnitt senkrecht zur bestrahlten Linie gelegt (was für $y = 105$ exemplarisch durch die rote Linie angedeutet ist), entlang diesem die Helligkeitswerte⁽¹⁾ bestimmt und in ein Diagramm eingetragen. In dieses wurde eine Gaußfunktion mit einem Polynom 1. Ordnung als Untergrund gefittet. Diese Prozedur wurde mittels eines Makros automatisiert, jedoch wurden alle Fits manuell überprüft und Fehlanpassungen verworfen. Ebenso wurden Schnitte verworfen, die keine signifikante Erhöhung (Differenz von Maximum und Untergrund in 16 Bit-Bildern kleiner als 1 000, wie z. B. bei

⁽¹⁾Es wird ein linearer Zusammenhang zwischen Helligkeit und Anzahl der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle angenommen. Die Zahl der Farbstoffmoleküle ist wiederum proportional zur Zahl der Reparaturproteine, an die sie sich durch die Antikörper anlagern.

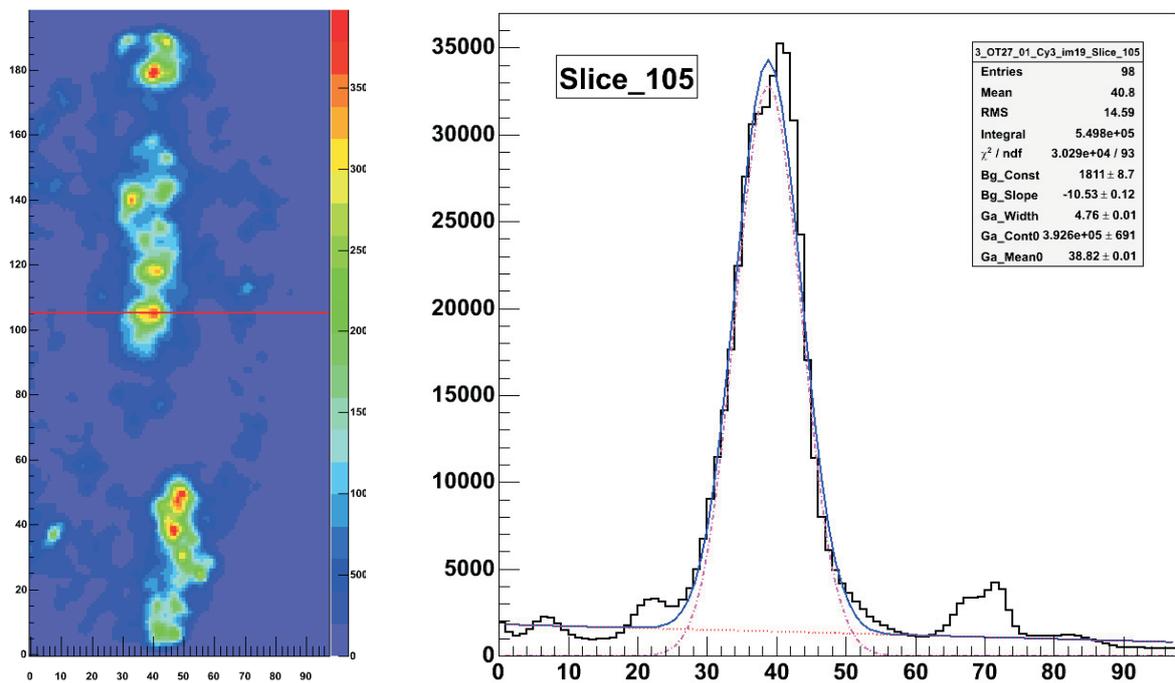


Abbildung 4.4: Analyse der Linienbestrahlungen mittels ROOT.

Links: Falschfarbencodierte Darstellung der Helligkeitswerte einer Linienbestrahlung. Die Einheit der Achsenbeschriftungen sind Bildpixel ($1 \text{ Pixel} \equiv 0.102 \mu\text{m}$).

Rechts: Helligkeit entlang des mit der roten Linie markierten Schnitts parallel zur x-Achse für $y = 105$ und Gauß-Fit.

$y = 60$ bis $y = 70$ in Abb. 4.4) aufweisen. Somit ergab jede bestrahlte Linie abhängig von ihrer Länge und der Anzahl der verworfenen Schnitte ca. 90–120 Gauß-Fits. Aus diesen wurden dann jeweils die Halbwertsbreite, die Auskunft über die erwähnten kleinskaligen Bewegungen gibt, und die Lage des Maximums, mit dessen Hilfe man die größerskaligen Bewegungen untersuchen kann, herausgelesen.

4.1 Zeitliche Änderung der Linienbreite

Zunächst sollen die kleinskaligen Bewegungen untersucht werden. Dazu werden die Halbwertsbreiten der Gauß-Fits mehrerer Linien gemittelt. Dieser Wert gibt eine durchschnittliche Linienbreite an. Dass der Ausdruck „Linienbreite“ und der schon öfter gebrauchte Begriff „Linienbestrahlungen“ gerechtfertigt ist, zeigt das in Abb. 4.4 zu erkennende Verschmelzen mehrerer Foci zu einer Linie. Diese Linienbreite ist natürlich direkt mit dem durchschnittlichen Foci-Durchmesser korreliert, unter der naheliegenden Annahme, dass es sich bei den Foci um 2D-Gaußverteilungen handelt, wären die beiden Größen sogar identisch. Um jedoch dieses Modell nicht postulieren zu müssen, wird im Folgenden bei der Nennung absoluter Zahlenwerte der Begriff „Linienbreite“ verwendet und der Ausdruck „Focidurchmesser“ für noch geplante Untersuchungen des Foci-Durchmessers mittels 2D-Gauß-Fits an Punktbestrahlungen mit mehreren μm Abstand reserviert.

Trägt man die durchschnittliche Linienbreite der in der Zeitreihe vorhandenen Proben gegen die Inkubationszeit an, lassen sich die kleinskaligen Bewegungen untersuchen. Dies wurde in Abb. 4.5 getan. Den gezeigten Datenpunkten liegen die Halbwertsbreiten der nicht verworfenen Gauß-Fits von mindestens zehn γ -H2AX-Spuren pro Zeitwert zu Grunde. Somit stellt jeder Punkt den Mittelwert von ca. 1 000 Fits dar. Die eingezeichneten Fehlerbalken beziehen sich auf den statistischen Fehler σ/\sqrt{N} dieses Mittelwerts. Bis zu ca. 2 Std. erkennt man in der Zellkernmitte (schwarzer Graph) einen steilen Anstieg der Linienbreite auf $1.4 \mu\text{m}$, danach fällt sie wieder auf ca. $1.1 \mu\text{m}$ ab und bleibt in etwa auf diesem Niveau. Ein ähnliches Verhalten wird auch am Zellkernrand (rot) beobachtet, jedoch beginnt hier der Abfall schon nach 30 min. Des Weiteren liegt die Absolutbreite der Linien am Rand ca. 300 nm unter dem Wert in der Zellkernmitte. Zusätzlich sind in Abb. 4.5 noch die Daten einer vorangegangenen Strahlzeit (April 2004) eingetragen (grüner Graph). Im Gegensatz zu den aktuellen Daten stammen hier alle verwendeten Spuren aus der gleichen Ebene eines Z-Stacks, die die Zellen mehrheitlich am oberen Rand schneidet (abhängig von der Höhe des einzelnen Zellkerns). Dieser älteren Zeitreihe liegen nur die Zeiten 1 h, 4 h und 24 h zugrunde, so dass Zeitwerte, die in die Anstiegsphase fallen, fehlen. Mit einer um etwa 100 nm größeren Breite als die

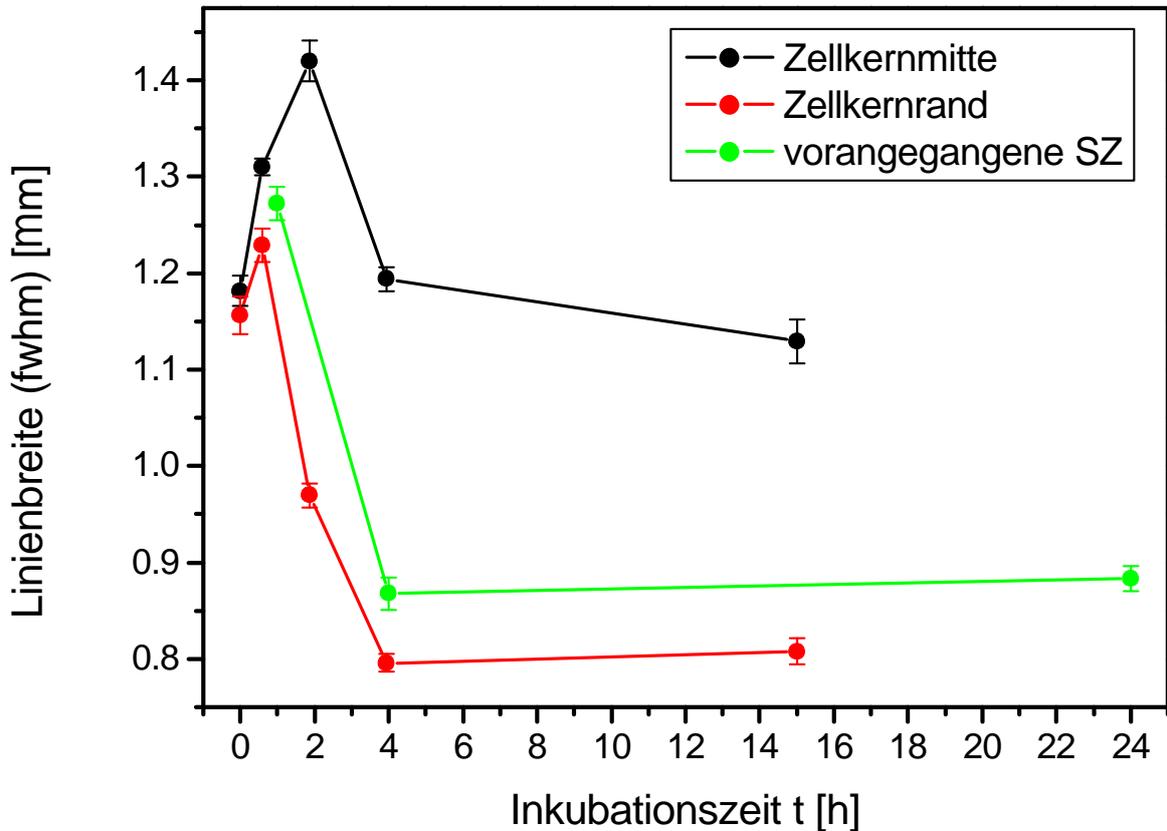


Abbildung 4.5: Linienbreite (fwhm) von γ -H2AX in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Schwarz: z -Ebene in Zellkernmitte, rot: Auswertung der selben Spuren aus einer z -Ebene nahe des Zellkernrandes, grün: Daten einer früheren Strahlzeit (siehe Text).

Spuren am Zellkernrand stimmen diese Daten sehr gut mit denen der August-Strahlzeit überein.

Da das beobachtete Zeitverhalten der Linienbreiten also durchaus reproduzierbar ist, soll es im Folgenden noch genauer analysiert und interpretiert werden. Der erste auffällige Punkt ist, dass man schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt ein γ -H2AX-Signal sieht. Zwischen dem Bestrahlungsende und der Fixierung der Probe, die gar nicht im Brutschrank inkubiert wurde, lagen (7 ± 2) min, die für den Ausbau der Probe aus dem Bestrahlungsplatz und Transport in das Zelllabor benötigt wurden. Gemäß der in Kap. 2.2.1 gemachten Angabe von einer Focibildung 3 min nach der DNA-Schädigung, würde man dieses Ergebnis zwar erwarten, es darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass die Zellen während der Bestrahlungsprozedur auf Zimmertemperatur abkühlen. Deshalb erwartet man verlangsamte Vorgänge in der Zelle. Somit kann durch dieses Experiment eine Obergrenze der abkühlungsbedingten Verzögerung in der γ -H2AX-Antwort auf DSB um den Faktor 3 ermittelt werden. Genauere Untersuchungen

der Vorgänge innerhalb der ersten 10 Minuten nach der Bestrahlung können aufgrund der schon erwähnten Ausbau- und Transportzeiten nicht durchgeführt werden. Dazu ist eine für die Zukunft geplante Lebendzellmikroskopie direkt am Strahlplatz von Nöten.

Die nächste Auffälligkeit stellt der anfängliche Anstieg der Linienbreite dar. Dieser könnte so interpretiert werden, dass die Zelle die bis zu mehreren tausend H2AX-Moleküle (siehe Kap. 2.2.1) eines Fokus nicht gleichzeitig phosphorylieren kann und somit die Foci anfangs wachsen. Auch der steile Abfall bis zu 4 Std. nach Bestrahlung ist diskussionswürdig. Eine mögliche Interpretation ergibt sich, wenn man bedenkt, dass ein zur Bestrahlung verwendetes 100 MeV Sauerstoff-Ion in erster Näherung ca. 23 DSB erzeugt (vgl. Kap. 3.4): Einige dieser Doppelstrangbrüche könnten nach 4 Std. schon repariert sein und deshalb würde die Markierung durch das γ -H2AX wieder aufgehoben werden. Diese Annahme erklärt jedoch nicht, warum nach zunächst steilem Abfall dann bis über 24 h nach Bestrahlung Foci mit nahezu konstantem Durchmesser zu sehen sind.

Die naheliegendste Interpretation [26], die auch diesen Effekt erklären würde, stellen Chromatinclusterungen dar. Dabei würde die Zelle zur Erleichterung der Reparatur das Chromatin in Nähe der DSB kompakter machen. Diese Annahme könnte auch den beobachteten Unterschied zwischen Zellkernmitte und -rand erklären: Die Chromosomen mit der höheren Gen-Dichte in der Mitte lassen sich nicht so stark komprimieren wie die Gen-ärmeren am Rand.

Eine weitere Interpretation bezieht sich auf die Existenz der in Kap. 2.1 diskutierten Reparaturfabriken mit einem sehr kleinen Einzugsgebiet. Sollten diese existieren, wäre ein solches Abnehmen der Linienbreite der zu erwartende Effekt, da in diesem Falle alle DSB eines Fokus an dieser Fabrik kumulieren würden. Ob der Rückgang der Linienbreite wirklich auf das Vorhandensein mehrerer DSB pro Ionenspur beruht, wird sich in einer Folgestrahlzeit zeigen. Da dort die Verwendung eines Strahls mit geringerem LET geplant ist, bei dem ein Ion im Mittel einen DSB induziert, dürfte in diesem Falle kein Rückgang der Linienbreite zu sehen sein. Sollte der Abfall der Linienbreite tatsächlich mit einer abgeschlossenen Reparatur einzelner DSB zu tun haben oder auf eine Verlagerung aller DSB in eine Reparaturfabrik zurückzuführen sein, ließe sich aus dem am Zellkernrand eher beginnenden Abfall der Linienbreite erkennen, dass der Zellkernrand gegenüber der Mitte bevorzugt behandelt wird. Widersprüchlich dazu scheinen jedoch aufgrund der größeren Foci in der Zellkernmitte pro DSB mehr H2AX-Moleküle phosphoryliert zu werden als am Rand.

In den zur Auswertung der Linienbreiten verwendeten Proben wurde nicht nur das γ -H2AX angefärbt, sondern zusätzlich 53BP1 mittels Alexa488 markiert. Eine Gegenüberstellung der Auswertung der Linienbreite in der Zellkernmitte von γ -H2AX und

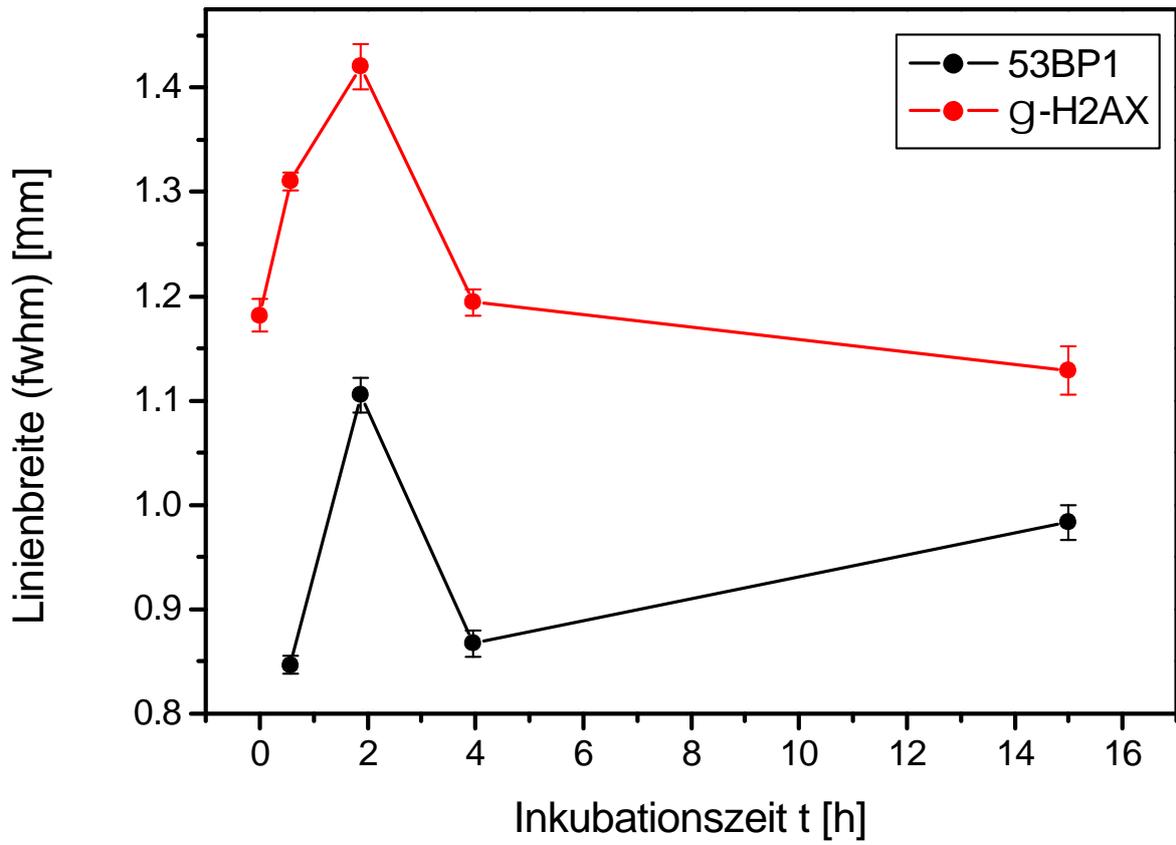


Abbildung 4.6: Vergleich der Linienbreite zwischen 53BP1 (schwarz) und γ -H2AX (rot).

53BP1 aus den selben bestrahlten Linien (mit Ausnahme des 0.5 h-Wertes aufgrund eines Datenverlusts), zeigt Abb. 4.6. In der sofort nach der Bestrahlung fixierten Probe konnte sich noch kein 53BP1-Signal ausbilden, was mit den in Kap. 2.2.3 zitierten Literaturangaben übereinstimmt. Der An- und wieder Abstieg innerhalb der ersten 4 Std. nach Bestrahlung ist auch hier wieder sichtbar. Im Unterschied zur γ -H2AX-Kurve liegt beim 53BP1 der 15-Stunden-Wert jedoch wieder über dem 4-Stunden-Wert. Ein deutlicher Unterschied zum γ -H2AX findet sich im Absolutwert der Linienbreite, der innerhalb der ersten 4 Std. konstant 300 nm unter dem des γ -H2AX liegt. Interessant ist dieser Sachverhalt, weil man aufgrund der Eigenschaft des 53BP1, an das γ -H2AX zu binden, eher ein gegenteiliges Verhalten oder zumindest gleich große Foci erwarten würde. Möglicherweise hat aber der Anstieg der Linienbreite bis 15 Std. gerade mit dieser Eigenschaft zu tun, da die Literatur von einer anfangs γ -H2AX-unabhängigen Foci-Bildung berichtet (Kap. 2.2.3, [16]).

4.2 Zeitliche Änderung der Streuung

Wie schon erwähnt, wurde von den Gauß-Fits senkrecht zu den bestrahlten Linien nicht nur die Halbwertsbreite ausgewertet, sondern auch die Lage des Maximums, so dass eine Streuung der Foci um die bestrahlte Linie, die Aufschluss über die gröberskaligen Bewegungen geben soll, bestimmt werden konnte. Dazu wurde für jede ausgewertete Linie die im Gauß-Fit bestimmte x -Koordinate gegen die „Schnitt-Nummer“ (= y -Koordinate in Abb. 4.4) aufgetragen. Im Beispiel-Fit der Abb. 4.4 ergibt sich also für den Schnitt 105 als Lage des Maximums 38.8. Durch das so entstehende Diagramm wurde eine Ausgleichsgerade gelegt und für jeden Datenpunkt die Abweichung von dieser Linie bestimmt. Diese Abweichungen aller Schnitte aller für eine Inkubationszeit der Zeitreihe ausgewerteten Linien⁽²⁾ wurden in ein Histogramm eingetragen. Wie in Abb. 4.7 ersichtlich, stimmt die Verteilung sehr gut mit einer Gauß-Funktion überein.

⁽²⁾Die selben, die für die Auswertung im letzten Abschnitt verwendet wurden.

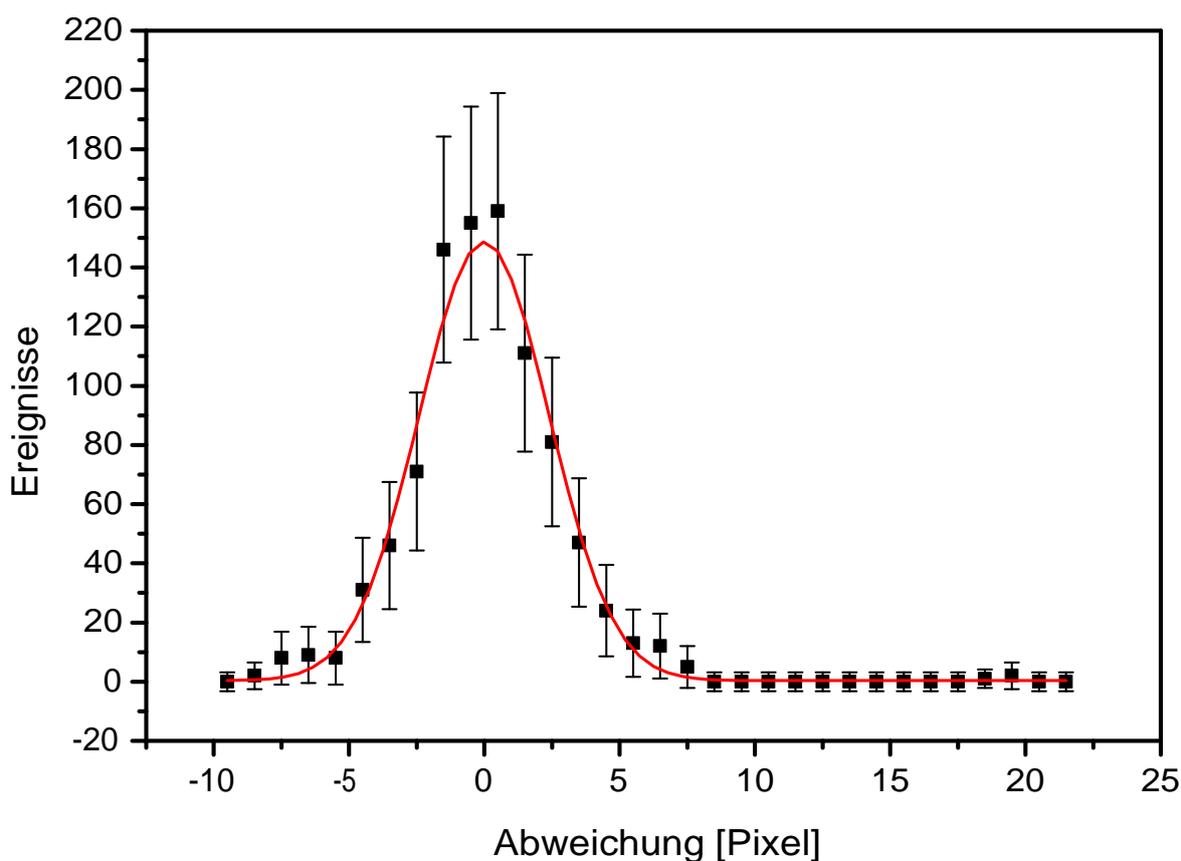


Abbildung 4.7: Abweichung der Gauß-Maxima von der Ausgleichsgeraden in einer sofort nach Bestrahlung fixierten Probe ($1 \text{ Pixel} \equiv 0.102 \mu\text{m}$). Die durchgezogene Linie beschreibt einen Fit mit einer Gauß-Funktion an die Datenpunkte.

Diese Übereinstimmung gilt nicht nur für den gezeigten 0 h-Wert. Der Determinationskoeffizient R^2 liegt nur bei dem 15 h-Wert mit 0.71 deutlich unter 0.9, der Durchschnitt aller Zeiten liegt bei 0.87. Die Fehlerbalken in Abb. 4.7 beziehen sich auf den statistischen Fehler \sqrt{N} , jedoch wurde dabei berücksichtigt, dass 1 Pixel ca. 100 nm entspricht, weshalb sich bei einem Abstand der einzelnen Ionentreffer von 1 μm ein Fokus über 10 Schnitte erstreckt, die folglich statistisch nicht unabhängig sind. Der somit den Fehlerbalken zugrunde liegende Wert $\delta := \sqrt{10 \cdot N}$ ist konservativ gewählt, da ein Ioneneinschuss auch zwei oder mehrere Foci bilden kann und in diesem Falle weniger als 10 Schnitte statistisch abhängig sind. Die Gauß-Fits wurden mittels der Methode der geringsten Quadrate durchgeführt [27], wobei jeder Datenpunkt mit $1/\delta^2$ gewichtet wurde [28]. Um dabei Datenpunkten mit Null Ereignissen keine unendliche Gewichtung zuteil werden zu lassen, wurde für diese der gleiche Fehler $\delta = \sqrt{10}$ angenommen wie für Datenpunkte mit einem Ereignis. Die aus diesen Gauß-Fits ablesbare Standardabweichung soll als Maß für die Streuung der einzelnen Foci um die bestrahlte Linie dienen.

Dazu muss jedoch noch als Korrektur die Strahlaufösung quadratisch abgezogen werden. Hierzu wurde ein Kernspurdetektor, wie ihn Abb. 4.1 zeigt, mit dem gleichen Linienmuster bestrahlt und genauso wie für die Zellen dargestellt ausgewertet. So wurde die Streuung σ des Ionenstrahls zu $(0.174 \pm 0.019) \mu\text{m}$ ermittelt. Dieser Wert entspricht einer vollen Halbwertsbreite von $0.409 \mu\text{m}$ und stimmt somit gut mit dem in Kap. 3.2.2 für die y -Auflösung ermittelten Wert überein, dem eine andere Strahlzeit zugrunde liegt. Die so korrigierte Standardabweichung als Maß für die Streuung ist für γ -H2AX-Linien aus der Zellkernmitte und dem Zellkernrand (wieder auf z bezogen) gegen die Inkubationszeit in Diagramm 4.8 angetragen. Die Fehlerbalken beinhalten den in den Gauß-Fits ablesbaren Fehler des σ , der über das Gaußsche Fehlerfortpflanzungsgesetz mit den $0.019 \mu\text{m}$ Ungenauigkeit der ermittelten Strahlaufösung verknüpft ist. In der Abbildung fällt auf, dass im Gegensatz zu den im letzten Abschnitt betrachteten kleinkaligen Bewegungen kein signifikanter Unterschied zwischen Zellkernmitte und -rand feststellbar ist.

Die gaußverteilten Histogramme (Abb. 4.7) lassen auf einen „random walk“-Prozess und somit auf eine Diffusion der Foci im Zellkern schließen. Unter dieser Annahme ergibt sich aus der Lösung der Diffusionsgleichung

$$c(\vec{r}, t) \propto e^{-\frac{\vec{r}^2}{4Dt}} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} c = \text{Konzentration} \\ D = \text{Diffusionskonstante} \end{array}$$

für die im Experiment untersuchte Streuung σ :

$$\sigma = \sqrt{2Dt}$$

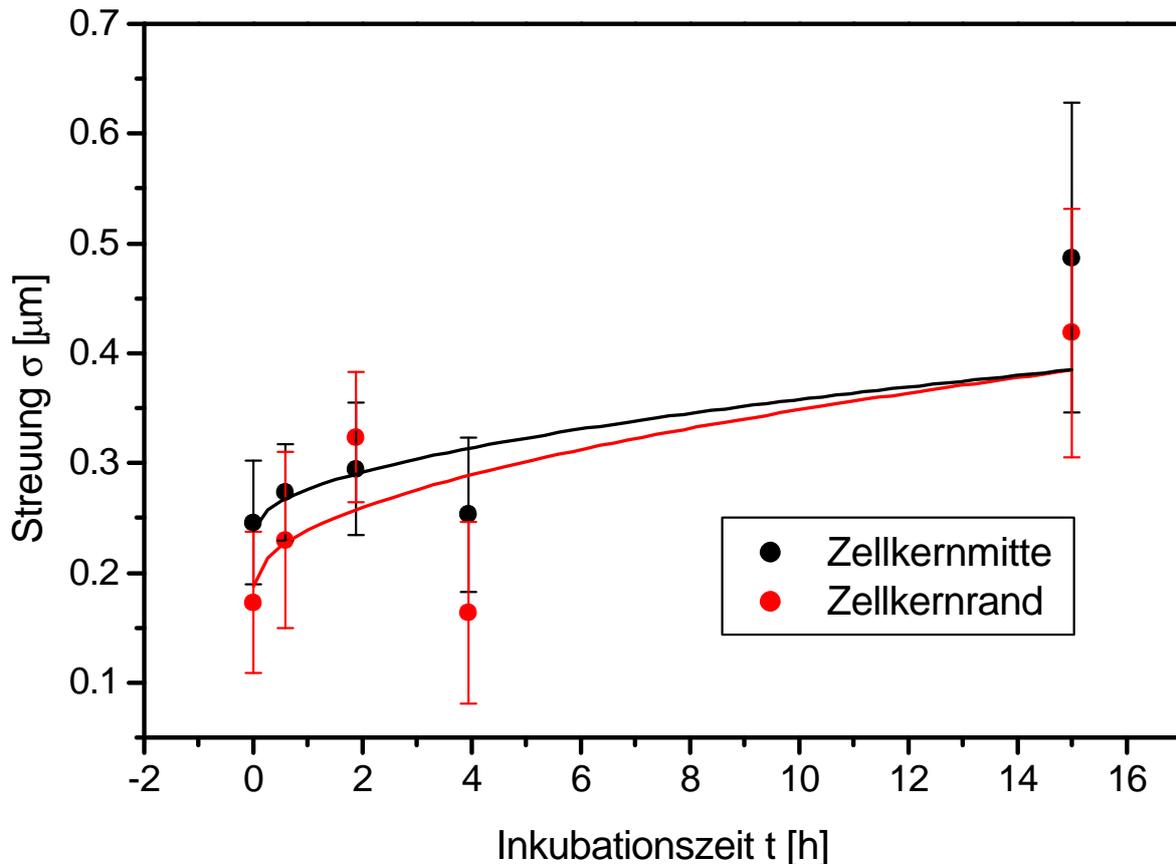


Abbildung 4.8: Streuung der Linienschwerpunkte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die durchgezogenen Linien beschreiben einen Fit mit einer Wurzelfunktion an die Datenpunkte.

Um zu überprüfen, ob dieser Sachverhalt für die gemessenen Daten zutrifft, wurden sie in Abb. 4.8 mit einer Wurzelfunktion angefitet. Insbesondere am Zellkernrand weicht der Fit relativ stark von den Daten ab ($R^2 = 0.42$). Aber auch in der Zellkernmitte drückt die geringe gemessene Streuung bei 4 h den Wert von R^2 auf 0.52. Aufgrund dieser Abweichungen vom Modell einer Diffusion abzulassen, würde aber den gaußverteilten Histogrammen nicht gerecht werden. Stattdessen ist es näherliegend, dass die Diffusionskonstanten von Zellkern zu Zellkern variieren, und die den Daten zugrunde liegende Statistik von zehn Zellkernen pro Zeit daher zu gering ist⁽³⁾. Wegen des hohen Aufwands der Auswertung, insbesondere der manuellen Kontrolle der Fits durch die Linienquerschnitte, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine größere Statistik durchgeführt werden. Auch Versuche einer Automatisierung dieser Kontrollen mit Hilfe des

⁽³⁾Deshalb wäre auch für diese Untersuchungen eine Lebendzellbeobachtung wünschenswert, da sich damit das zeitliche Verhalten *einer* Zelle untersuchen ließe und somit Schwankungen der Diffusionskonstanten zwischen verschiedenen Zellkernen nicht in das Ergebnis eingehen würden.

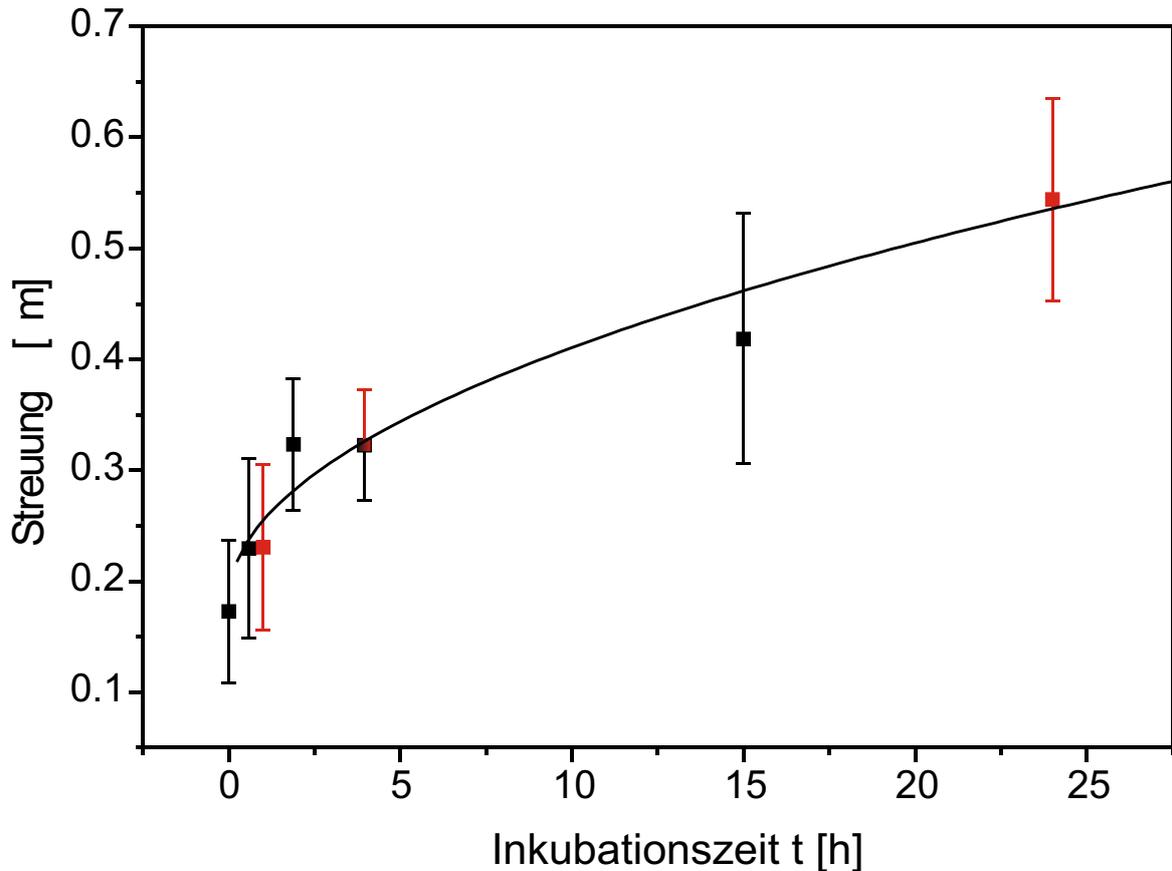


Abbildung 4.9: Streuung der Schwerpunkte am Zellkernrand (aus Daten zweier Strahlzeiten).

ROOT-Makros wurden wieder verworfen. Jedoch standen noch die Daten der im letzten Kapitel erwähnten älteren Strahlzeit zur Verfügung. Abb. 4.9 zeigt noch einmal die Daten des Zellkernrandes aus Abb. 4.8 um diese Daten ergänzt (im Bild rot markiert). Für den zweifach vorhandenen 4 h-Wert wurde analog zu Abb. 4.7 ein Histogramm aus den Daten beider Strahlzeiten gebildet und dessen σ bestimmt, so dass diesem Datenpunkt in Abb. 4.9 knapp 1 500 Querschnitte zugrunde liegen. Diese höhere Statistik bei 4 Std. und die beiden zusätzlichen Datenpunkte konnten die Fitqualität deutlich verbessern, wie der Anstieg des Determinationskoeffizienten R^2 von 0.42 auf 0.94 zeigt. Dies bestärkt die Vermutung, dass sich die Daten bei einer höheren statistischen Genauigkeit besser durch eine Wurzelfunktion beschreiben lassen, und somit die Streuung der Foci um die bestrahlten Linien diffusionsbedingt zunimmt. Für eine gerichtete Bewegung gibt es keine Anzeichen. Aus dem Datenfit lässt sich die Diffusionskonstante zu $D = (2.6 \cdot 10^{-3} \pm 1.4 \cdot 10^{-3}) \mu\text{m}^2/\text{h} = (7 \cdot 10^{-15} \pm 4 \cdot 10^{-15}) \text{cm}^2/\text{s}$ bestimmen.

Dieser Wert ist um mehr als eine Größenordnung geringer, als der aus den in [29] veröffentlichten Diagrammen ablesbare Wert von ca. $0.15 \cdot 10^{-12} \text{cm}^2/\text{s}$ für die Diffusion

individueller subchromosomaler Foci in HeLa-Zellkernen. Auch der dort ablesbare Wert von $0.04 \cdot 10^{-12} \text{cm}^2/\text{s}$ für die relative Diffusion der Foci innerhalb des gleichen Chromosomenterritoriums liegt noch fast eine Größenordnung über dem in dieser Arbeit ermittelten Wert für die Diffusion der DSB. Dieser Unterschied liegt vermutlich nicht nur an den mit ca. 300 nm deutlich kleineren in [29] beobachteten Foci. Bevor Überlegungen angestellt werden, weshalb die DNA-Schäden langsamer diffundieren als rein biochemisch markierte Foci [29] in intakten Zellkernen, muss jedoch sowohl beachtet werden, dass der in [29] ermittelte Wert von D sehr nah an der in diesem Experiment erreichbaren Auflösungsgrenze liegt (weshalb dort weiterführende Auswertungen mit Neuroblastoma-Zellen durchgeführt wurden, die höhere Diffusionskonstanten aufwiesen), als auch, dass, um den in dieser Arbeit ermittelten Wert von D mit Absolutwerten der Diffusionskonstanten im Chromatin vergleichen zu können, evtl. noch einige Faktoren berücksichtigt werden müssen: So wurde nur die Streuung des intensivsten Fokus in einem Schnitt untersucht. Man erkennt jedoch z. B. im rechten Bild von Abb. 4.4 noch ein Nebenmaximum, das durch den Gauß-Fit nicht erfasst ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses ebenfalls einen strahleninduzierten Fokus darstellt und somit in die Berechnung der Streuung mit aufgenommen werden müsste. Eine mögliche Dynamik der Linie als Gesamtheit kann mit der gegenwärtigen Auswertetechnik ebenfalls nicht erfasst werden. Ob diese Faktoren das Ergebnis jedoch um eine Größenordnung verändern, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr geklärt werden. Um dies beantworten zu können, wird die Auswertetechnik weiter verbessert werden müssen. Die genauesten Resultate werden sich jedoch auch bei diesen Beobachtungen erst dann erreichen lassen, wenn man durch eine Lebendzellmikroskopie die Veränderungen in einer Probe bewerten kann und nicht auf Mikroskopaufnahmen verschiedener fixierter Proben angewiesen ist.

Auch bei der Streuung der Foci wurde in der Zellkernmitte neben dem γ -H2AX auch 53BP1 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.10 aufgetragen. Abgesehen von der schon im letzten Abschnitt gemachten Feststellung, dass in der 0 h-Probe noch keine Foci erkennbar sind, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zum γ -H2AX. Somit scheint auch das 53BP1, wenn es einmal an die DSB rekrutiert wurde, stabil an die geschädigte DNA zu binden und nur derer Diffusionsbewegung im Chromatin zu unterliegen. Dieses Verhalten deckt sich mit der Literaturaussage, dass γ -H2AX- und 53BP1-Foci kolokalisieren (Kap. 2.2.3).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass deutliche Unterschiede zwischen den im letzten Abschnitt beobachteten kleinskaligen Bewegungen, die ein komplexes Zeitverhalten aufweisen, und den größerskaligen Bewegungen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Diffusionsbewegung darstellen, gezeigt wurden.

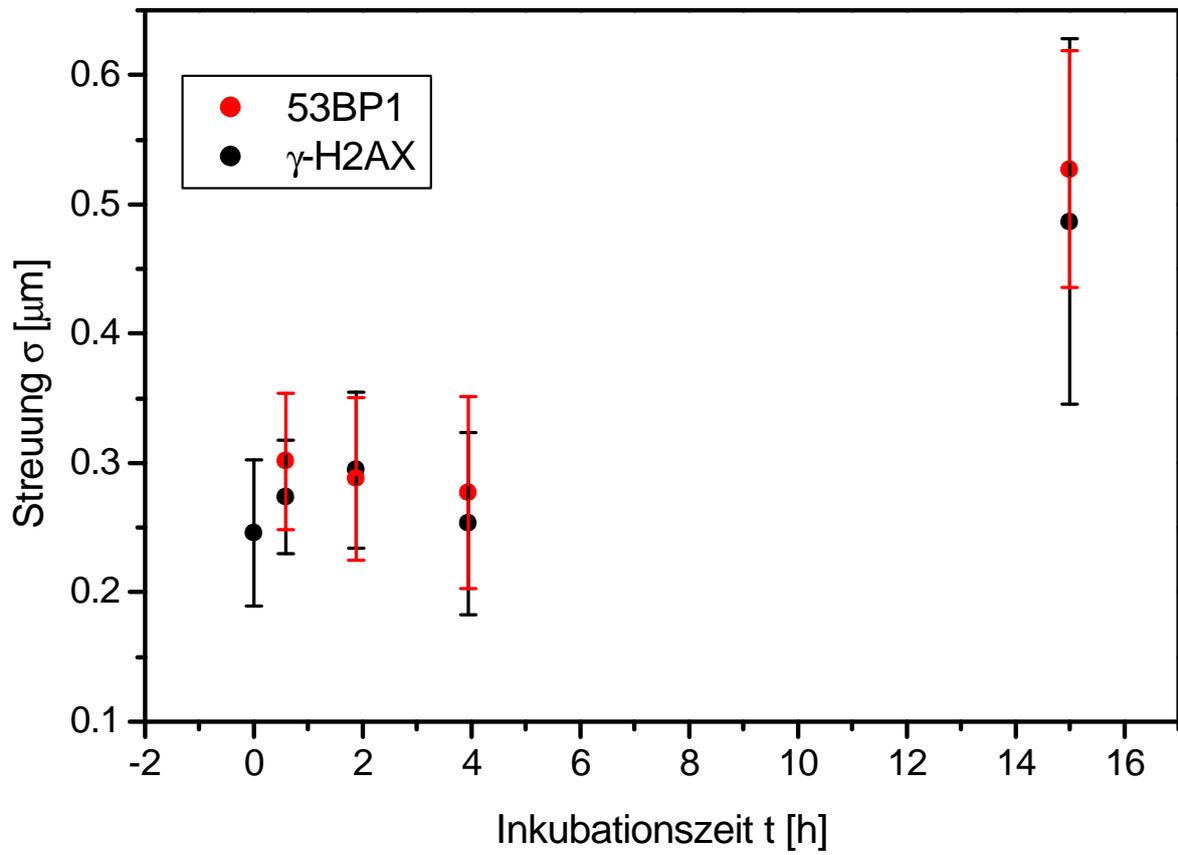


Abbildung 4.10: Vergleich der Streuung bei γ -H2AX (schwarz) und 53BP1 (rot).

Kapitel 5

Konkurrenzprozesse der Proteinanlagerung nach zeitlich getrennten Bestrahlungseignissen

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit ein in einer Zelle schon vorhandener Strahlenschaden die Reparaturantwort auf einen neu hinzukommenden Schaden beeinträchtigt. Als Ausgangsbasis für solche Experimente dienen HeLa-Zellen, die mit 100 MeV Sauerstoff-Ionen zunächst in waagrechten Linienmustern analog zum letzten Kapitel bestrahlt werden. Nach dieser Vorbestrahlung (ca. 10 Gy pro Zellkern) werden die Zellen für eine Zeit Δt im Brutschrank inkubiert, bis sie ein zweites Mal bestrahlt werden. Bei der zweiten Bestrahlung kommt ein senkrechtes Linienmuster zur Anwendung, so dass die Zellen letztlich eine kreuzförmige Bestrahlung erfahren. Dabei stehen sowohl die Linien der Erstbestrahlung seitlich als auch die der Zweitbestrahlung oben und unten über. Abb. 5.1 zeigt eine Skizze des Bestrahlungsmusters mit der im Folgenden verwendeten Nomenklatur für die so entstehenden Bestrahlungsbereiche. Nach einer weiteren Inkubationszeit t_I ab der zweiten Bestrahlung werden die Zellen fixiert. Im Folgenden werden die Effekte, die bei Zellen, die einer solchen Kreuzbestrahlung unterzogen wurden, zu beobachten sind, beschrieben und ein Modell zur Erklärung aufgestellt.

5.1 Symptomatik der Konkurrenzeffekte bei 53BP1

Abb. 5.3 und 5.4 zeigen Zellkerne, die mit dem in Abb. 5.1 und 5.2 gezeigten Muster bestrahlt wurden. Im γ -H2AX-Kanal (Farbstoff: Cy3) beider Abbildungen erkennt man deutlich die bestrahlten Kreuze, ebenso im 53BP1-Kanal (Farbstoff: FITC) der Probe,

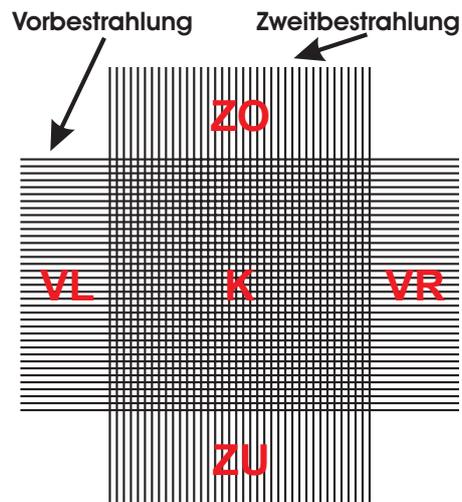


Abbildung 5.1: Skizze des Bestrahlungsmusters für die Untersuchung der Konkurrenzprozesse mit den Bestrahlungsbereichen K (Kreuzbereich), VL/VR (Vorbestrahlung links bzw. rechts überstehend), ZO/ZU (Zweitbestrahlung unten bzw. oben überstehend).

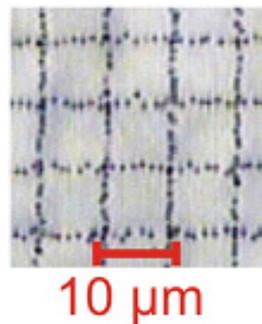


Abbildung 5.2: Kreuzförmige Bestrahlung eines Kernspurdetektors mittels $100\text{ MeV }^{16}\text{O}$ -Ionen.

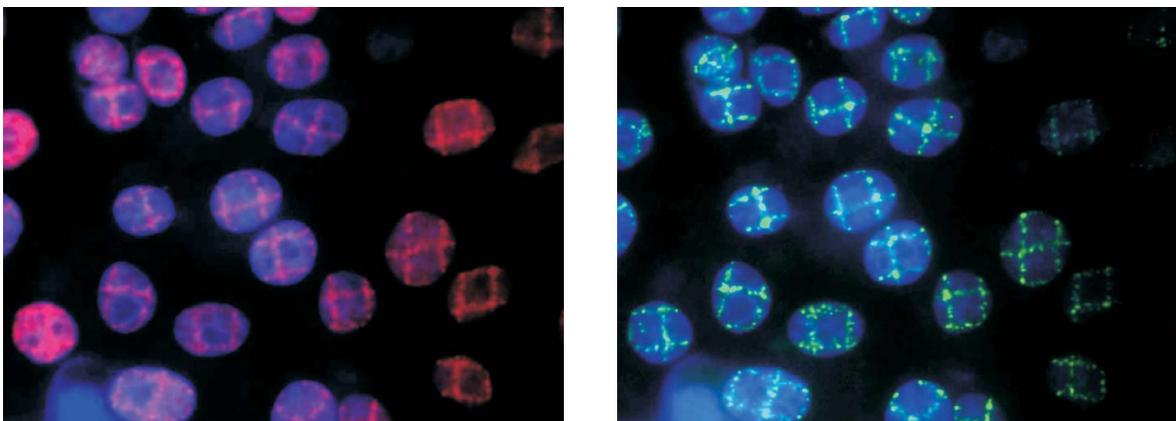


Abbildung 5.3: Kreuzbestrahlung mit $\Delta t = 0$ und $t_I = 0.5\text{ h}$ (links $\gamma\text{-H2AX}$, rechts 53BP1).

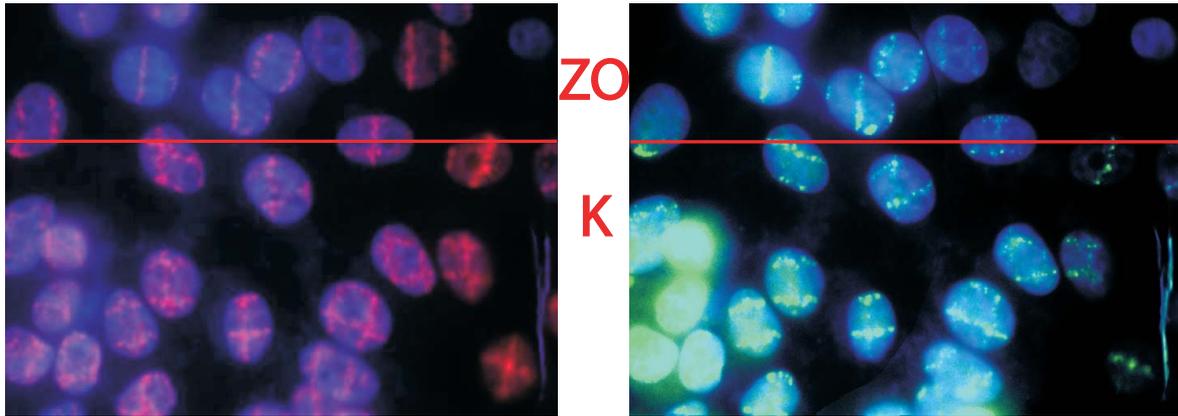


Abbildung 5.4: Konkurrenzzprozesse bei Kreuzbestrahlung mit $\Delta t = 1.5 h$ und $t_I = 0.5 h$ (links γ -H2AX, rechts 53BP1). Die rote Linie zeigt die Grenze zwischen dem Kreuzbereich und der oben überstehenden Zweitbestrahlung (vgl. Abb. 5.1)

bei der die zweite unmittelbar auf die erste Bestrahlung folgte (Abb.5.3). Liegen jedoch 90 min zwischen den beiden Bestrahlungen (Abb. 5.4), lässt sich entlang der zweiten Bestrahlung nur eine stark unterdrückte Foci-Bildung von 53BP1 feststellen. Dass diese Nichtausbildung auf die Vorbestrahlung der entsprechenden Zellkerne zurückzuführen ist, wird im oberen Bildteil deutlich: Dort erkennt man auch im 53BP1 senkrechte Linien. Das γ -H2AX-Bild zeigt, dass es sich hierbei um den Bereich des Bestrahlungsmusters handelt, in dem die senkrechten Linien der Zweitbestrahlung oben überstehen. Somit sind diese Zellkerne von der Vorbestrahlung nicht betroffen, was eindeutig eine Korrelation zwischen Foci-Unterdrückung und Vorbestrahlung aufzeigt.

Auch bei diesen Experimenten wird wieder die Wichtigkeit eines zuverlässigen Markers für die Reaktion der Zelle auf Doppelstrangbrüche, wie ihn das γ -H2AX darstellt, deutlich (vgl. Kap 2.2.1 und 2.2.2). Durch diesen kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass durch die Vorbestrahlung der Stoffwechsel der Zellen so weit zum Erliegen kommt, dass keine Reaktion mehr auf die Zweitbestrahlung stattfindet. Näherliegend ist daher ein Modell, das davon ausgeht, dass nach einer gewissen Zeitkonstanten das gesamte 53BP1 an die Schadensorte gebunden ist und bis zur Fixierung nicht wieder freigegeben bzw. nachproduziert werden kann.

Genauere Aussagen zu diesen Konkurrenzzprozessen, insbesondere zu den Zeitkonstanten, erhält man aus einer Zeitreihe, die sowohl die Zeit zwischen den Bestrahlungen Δt als auch die Inkubationszeit nach der zweiten Bestrahlung t_I variiert. Die Ergebnisse einer solchen Zeitreihe werden in Abb. 5.5 zusammengefasst. Die einzelnen Bilder zeigen jeweils das 53BP1 (Farbstoff: Alexa488) mit dem DAPI-Kanal überlagert. Als Bildausschnitt ist jeweils der Übergang zwischen Kreuz- und ZU-Bereich gewählt.

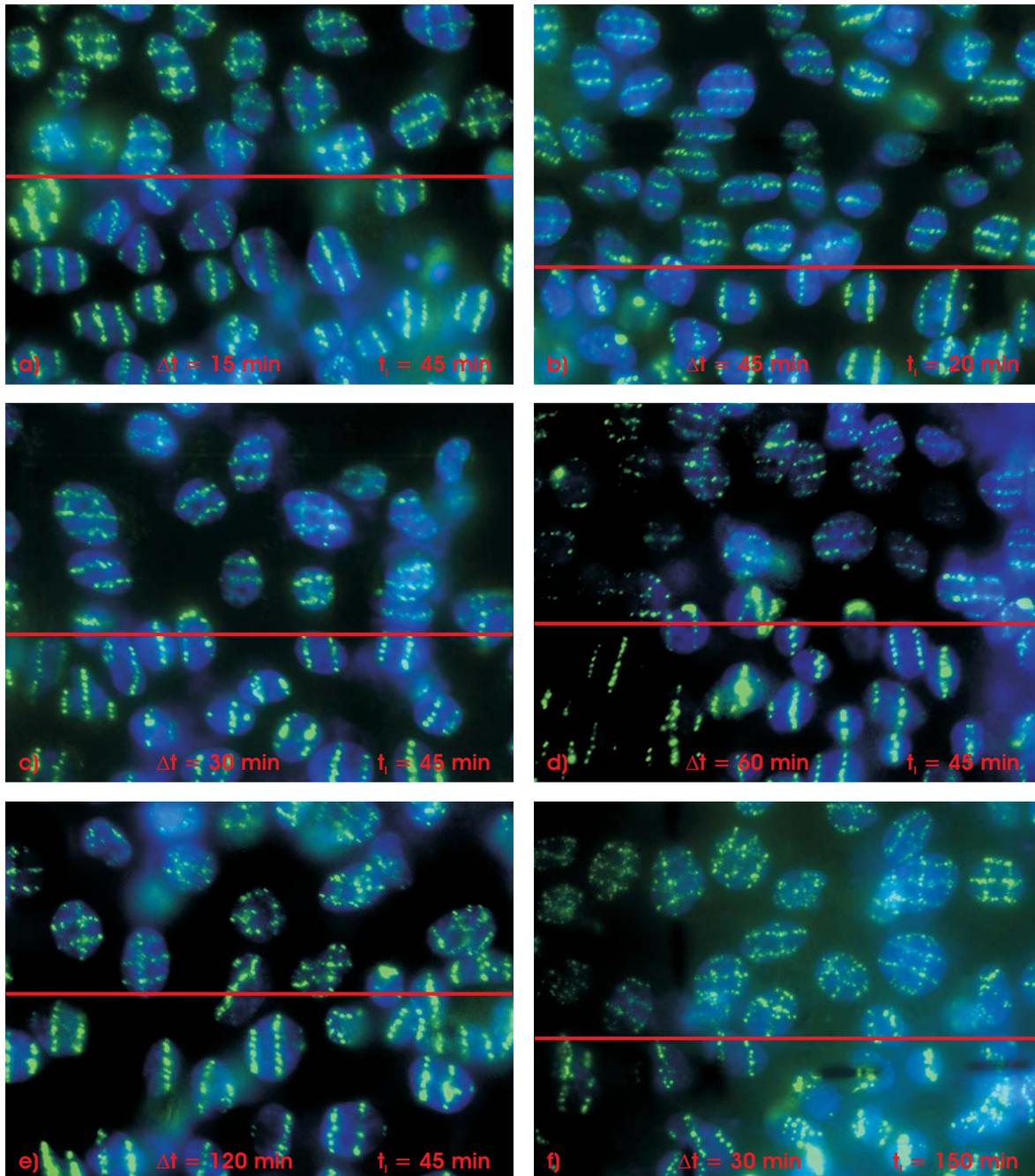


Abbildung 5.5: Untersuchung von Konkurrenzprozessen in 53BP1 anhand einer Zeitreihe. Oberhalb der roten Linien befindet sich jeweils der Kreuz- und unterhalb der ZU-Bereich (vgl. Abb. 5.1).

Abb. 5.5 a) macht in Übereinstimmung mit Abb. 5.3 deutlich, dass bei sehr kurzem Δt keine Konkurrenzeffekte beobachtbar sind. Um diese erste Zeitkonstante, nach der Konkurrenzeffekte sichtbar werden, genauer bestimmen zu können, wurde für diese Probe der Bestrahlungsvorgang so geplant, dass anhand der Koordinaten auf der Zellfolie (siehe Kap. 3.3) jedem Ort ein Δt von 0–15 min zugeordnet werden kann. Dazu wurde das Steuersignal der Ablenkeinheit und die Zählrate am Experiment mitprotokolliert. Der in Abb. 5.5 a) exemplarisch gezeigte Ausschnitt entspricht $\Delta t = 15 \text{ min}$, Konkurrenzeffekte sind nirgends in der Probe sichtbar. Jedoch muss beachtet werden, dass die Zellen für die 15 min am Bestrahlungsort auf Zimmertemperatur abgekühlt waren, was Vorgänge in der Zelle verlangsamen kann. Folglich kann keine definitive Aussage gemacht werden, ob auch bei Optimalbedingungen für Zellkulturen das Δt , ab dem Konkurrenzeffekte zu sehen sind, über 15 min liegt. Alle anderen gezeigten Proben wurden zwischen den Bestrahlungen im Brutschrank aufbewahrt.

In Abb. 5.5 b) erkennt man sehr deutlich Konkurrenzeffekte. Bei der dort gezeigten Probe lag die Zeit zwischen den Bestrahlungen bei 45 min, die Inkubationszeit wurde mit 20 min so gewählt, dass das 53BP1 gerade noch Zeit hatte, Foci auszubilden (s. Kap. 2.2.3). Dass die beobachtete Unterdrückung der Focibildung mit der Vorbestrahlung zu tun hat und nicht auf eine zu kurze Inkubationszeit nach der zweiten Bestrahlung zurückzuführen ist, zeigen auch hier wieder die deutlich ausgeprägten senkrechten Spuren unterhalb des vorbestrahlten Bereichs.

Die Abb. 5.5 c) und d) zeigen Proben mit $\Delta t = 30$ bzw. 60 min und $t_I = 45 \text{ min}$. Hier sind sowohl Zellkerne sichtbar, die Konkurrenzeffekte aufweisen, als auch solche, in denen Kreuze erkennbar sind.

Bei der Probe aus Abb. 5.5 e) wurde Δt mit 2 h sehr lang gewählt, die Inkubationszeit beträgt auch hier 45 min. Konkurrenzeffekte lassen sich nicht beobachten, ebenso in Abb. 5.5 f). Hier wurde t_I mit 150 min sehr lang gewählt, während Δt mit 30 min in einem Bereich liegt, der bei kürzeren Inkubationszeiten Konkurrenz aufweist. Auch diese beiden Bilder belegen, dass die beobachteten Konkurrenzeffekte nicht auf ein Absterben der Zelle nach der Erstbestrahlung zurückzuführen sind, da sich in diesem Falle auch nach längeren Zeiten keine Foci entlang der Zweitbestrahlung ausbilden dürften.

5.2 Modell zur Erklärung des Konkurrenzverhaltens

Das in der Zeitreihe beobachtete Verhalten lässt sich mit folgendem Modell beschreiben: 53BP1 beginnt nach der Erstbestrahlung damit, sich an die hierbei entstandenen Schäden anzulagern. Nach einer gewissen Zeitkonstanten ab der Erstbestrahlung, im

Folgenden als T_1 bezeichnet, ist der gesamte im Zellkern vorhandene Vorrat an 53BP1 an die Schadensorte gebunden. Liegt also die Zeit zwischen den Bestrahlungen Δt sehr weit unter T_1 , so ist noch so viel 53BP1 im Zellkern vorhanden, das sich an die Schadensorte der Zweitbestrahlung anlagern kann, dass keine verminderte Focibildung an den Orten der Zweitbestrahlung beobachtet wird. Dieser Fall $\Delta t \ll T_1$ trifft auf Abb. 5.3 und 5.5 a) zu. Ist jedoch Δt größer als T_1 , so ist zum Zeitpunkt der Zweitbestrahlung der gesamte 53BP1-Vorrat der Zelle an die Schadensorte gebunden. In diesem Fall kann die Zelle das 53BP1 bis zum Zeitpunkt der Fixierung weder nachproduzieren noch umlagern, so dass sich an die DSB der Zweitbestrahlung gar kein 53BP1 anlagert (Abb. 5.5 b)). Zwischen diesen beiden Extremfällen liegt ein Bereich, in dem für die Schäden der Zweitbestrahlung nur noch eine geringe Menge an 53BP1 zur Verfügung steht, weswegen an den senkrechten Linien der Zweitbestrahlung ein schwaches 53BP1-Signal sichtbar ist (evtl. Abb. 5.5 c)).

Die Abb. 5.5 e) und f) zeigen jedoch, dass T_1 nicht die einzige Zeitkonstante sein kann, die das Verhalten der kreuzbestrahlten Zellen prägt. Es muss noch eine weitere Zeitkonstante T_2 geben, nach der das 53BP1 nachproduziert oder teilweise umgelagert wird. Dabei fällt auf, dass sowohl ein langes Δt als auch eine lange Inkubationszeit t_I ein Anlagern von 53BP1 an die Orte der Zweitbestrahlung bewirken. Folglich wird der Umlagerungs- bzw. Nachproduktionsprozess nicht erst durch die Zweitbestrahlung initialisiert, da in diesem Falle bei der Kombination aus langem Δt und kurzer Inkubationszeit, wie sie Abb. 5.5 e) zeigt, deutliche Konkurrenzeffekte auftreten müssten. Vielmehr ist unabhängig vom Zeitpunkt der Zweitbestrahlung nach der Zeit T_2 ab der Erstbestrahlung wieder so viel 53BP1 verfügbar, dass an schon entstandene oder noch entstehende Schäden einer Zweitbestrahlung eine merkliche Anlagerung sichtbar wird. Somit ergibt sich $\Delta t + t_I > T_2$ als Bedingung, dass zu längeren Zeiten hin wieder verminderte Konkurrenz erkennbar wird, bzw. $\Delta t + t_I \gg T_2$ als Bedingung dafür, dass gar kein Intensitätsunterschied zwischen den Linien der Erst- und Zweitbestrahlung sichtbar ist. Insgesamt ergibt sich als Bedingung für die Beobachtung maximaler Konkurrenzeffekte im 53BP1:

$$\begin{aligned} \Delta t &> T_1 \\ \text{und} \quad t_{ges} := \Delta t + t_I &< T_2 \end{aligned} \tag{5.1}$$

Dieser Zusammenhang wird in Abb. 5.6 grafisch veranschaulicht. Zusätzlich muss natürlich noch $t_I > \text{ca. } 20 \text{ min}$ gelten, damit sich an den Orten der Zweitbestrahlung überhaupt Foci ausbilden können (vgl. Kap. 2.2.3).

Unter Annahme dieses einfachen Modells lässt sich T_1 anhand der Abb. 5.5 a) und b) (mit der weiter oben gemachten Einschränkung aufgrund von Temperatureffekten) auf $(40 \pm 20) \text{ min}$ festlegen. T_2 wird durch Abb. 5.4 und 5.5 e) zu $(120 \pm 30) \text{ min}$ bestimmt.

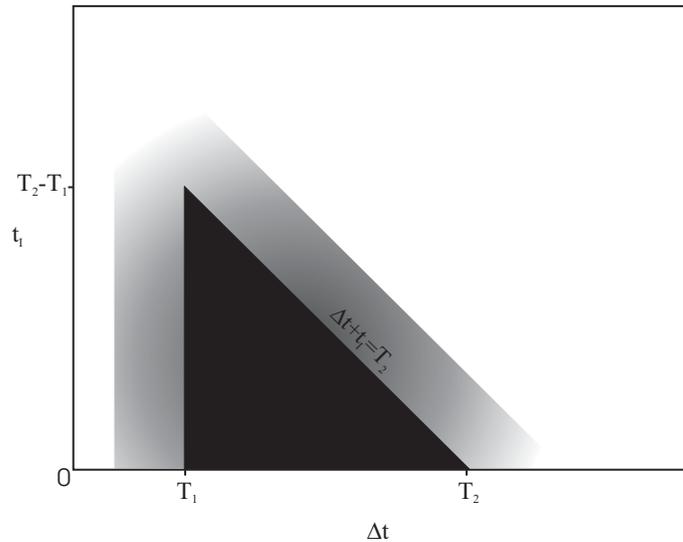


Abbildung 5.6: Schemazeichnung zum Modell für die Konkurrenzeffekte. An der x -Achse ist Δt aufgetragen, an der y -Achse t_I . Der schwarze Bereich zeigt die Zeitkombinationen, in denen nach (5.1) maximale Konkurrenzeffekte erwartet werden, also an die Schadensorte der Zweitbestrahlung kein 53BP1 angelagert wird. Dies setzt ab $\Delta t > T_1$ ein. Ebenso wird deutlich, dass die Summe aus Δt und t_I für vollständige Konkurrenz maximal T_2 betragen darf. Dass schwächere Konkurrenzeffekte auch schon außerhalb des durch (5.1) definierten Bereichs auftreten, soll durch die unterschiedlichen Graustufen außerhalb des Dreiecks angedeutet werden.

Für eine genauere Bestimmung der Zeitkonstanten und evtl. eine feinere Abstimmung dieses Modells⁽¹⁾ sind jedoch quantitative Auswertungen der Daten und eine feinere Abstufung der untersuchten Zeiten nötig. Ein sinnvoller Weg bestünde darin, für jede Probe den Quotienten der Helligkeit der Erst- und Zweitbestrahlung gegen Δt und t_I aufzutragen. Eine solche Auswertung war jedoch u. a. aufgrund schlecht angesprochener Antikörper im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, soll jedoch (evtl. im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit) noch durchgeführt werden.

5.3 Auswirkungen der Konkurrenzprozesse auf die DNA-Reparatur

Die Entdeckung der Konkurrenzprozesse im 53BP1 wirft die Frage auf, inwieweit durch diese die Reparatur von Doppelstrangbrüchen beeinträchtigt wird. Eine wichtige Aufgabe des 53BP1 besteht nach Kap. 2.2.3 in der Aktivierung von ATM. Wie dort darge-

⁽¹⁾Denkbar wäre z. B., dass die Zweitbestrahlung die Umorganisation oder Nachproduktion des 53BP1 zwar nicht initialisiert (siehe weiter oben), sie jedoch beschleunigen könnte.

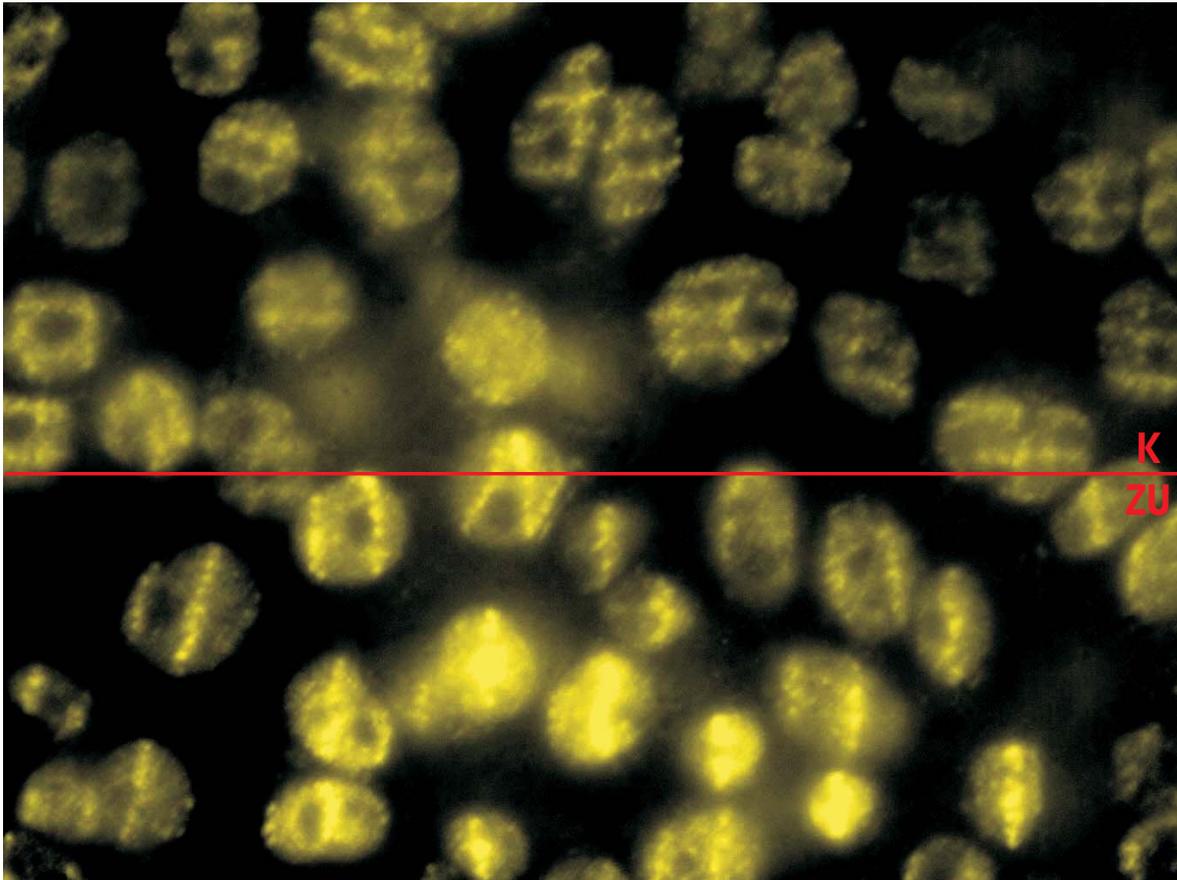


Abbildung 5.7: *MDC1/NFDB1 in einer kreuzbestrahlten Probe ($\Delta t = 60 \text{ min}$, $t_I = 45 \text{ min}$).*

legt, verfügt die Zelle jedoch mit dem MDC1/NFDB1 über einen alternativen Weg zur ATM-Aktivierung. Die in der Literatur beschriebenen Experimente dazu beziehen sich allerdings immer auf Zellen, die so verändert wurden, dass sie kein 53BP1 produzieren. Um Auskunft darüber zu erhalten, ob dieser Alternativweg auch an Schadensorten, die aufgrund der Konkurrenzeffekte nicht mit 53BP1 versorgt werden, in Kraft tritt, wurden erste Experimente durchgeführt, in denen auch das MDC1/NFDB1 im Zellkern mittels Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurde. Abb. 5.7 zeigt den MDC1-Kanal von Abb. 5.5 d). Da die Aufnahme wohl aufgrund der Antikörpereigenschaften einen hohen Untergrund und keine so scharfen Konturen wie die 53BP1-Bilder aufweist, wurde auf eine Überlagerung mit dem DAPI-Kanal verzichtet. In der Abbildung sind sowohl die waagrecchten Linien der Vorbestrahlung als auch die senkrechten der Zweitbestrahlung zu erkennen. Folglich deutet im MDC1/NFDB1 bei den dort untersuchten Zeiten (in Abb. 5.7 $\Delta t = 60 \text{ min}$ und $t_I = 45 \text{ min}$, zusätzlich noch $\Delta t = 30 \text{ min}$ und $t_I = 45 \text{ min}$) nichts auf die im 53BP1 beobachteten Konkurrenzeff-

fekte hin. Anzeichen, dass sich das MDC1/NFDB1 vornehmlich oder gar ausschließlich an die Schäden anlagert, die aufgrund der Konkurrenz kein 53BP1 zur Verfügung haben, lassen sich nicht finden. Eine umfangreichere Zeitreihe für die Untersuchung von MDC1/NFDB1 ist in Planung. Der für die weiteren Abläufe in der Zelle entscheidendste Aspekt ist jedoch, ob ATM aktiviert wird, unabhängig vom verwendeten Weg. Dies wird in weiteren Experimenten mithilfe eines erst seit kurzem erhältlichen Antikörpers für aktiviertes ATM [30] untersucht werden.

Die zweite in Kap. 2.2.3 aufgeführte Funktion des 53BP1 besteht darin, geschädigte Zellen im G2-Arrest zu halten. Da G2-Arrest jedoch typischerweise schon bei 0.4 Gy eintritt [31], kann man sicher sein, dass die mit 10 Gy vorbestrahlten Zellen in den Arrest eintreten, unabhängig davon, ob das 53BP1 auf die Zweitbestrahlung noch reagieren kann. Ob die Konkurrenzeffekte auch bei Vorbestrahlungen unter 0.4 Gy auftreten und somit den gewünschten Verbleib der Zelle in der G2-Phase gefährden könnten, muss noch ermittelt werden. Zusätzlich zu den bisher diskutierten Vorbestrahlungen mit 10 Gy Dosis existieren von jeder in Abb. 5.5 gezeigten Probe Daten von Kreuzbestrahlungen mit einer Vorbestrahlungsdosis von ca. 2 Gy. Da weder Ionensorte noch Energie während der Bestrahlung einer Probe verändert werden können, ist die pro Ion auf einen Zellkern übertragene Dosis nicht variabel. Somit liegt die einzige Möglichkeit, die Dosis zu variieren, in einer Änderung der Anzahl der Ionendurchgänge pro Zellkern. Deshalb wurde der x -Abstand der Punkte einer Linie auf $4 \mu\text{m}$ und der Linienableitungsabstand auf $10 \mu\text{m}$ vergrößert, so dass ein Zellkern im Mittel von drei Ionen getroffen wurde, was in etwa den erwähnten 2 Gy entspricht. Abb. 5.8 zeigt diesen Niederdosisbereich der selben Probe, die in Abb. 5.5 b) dargestellt ist. Der Bildausschnitt wurde wieder so gewählt, dass der Bereich der Zweitbestrahlung oben über den Kreuzbereich heraussteht. Insbesondere in der Bildmitte erkennt man eine etwas verminderte Focibildung im vorbestrahlten Bereich, innerhalb der weiter rechts gelegenen Zellkerne sind die senkrechten Linien jedoch deutlich sichtbar. Diese Effekte sind jedoch nur in dieser Probe mit $\Delta t = 45 \text{ min}$ und $t_I = 20 \text{ min}$ zu erkennen, die auch bei der 10 Gy-Hochdosisvorbestrahlung den deutlichsten Konkurrenzeffekt aufweist. Bei allen anderen Proben ist keine Verminderung der Helligkeit der senkrechten Linien im vorbestrahlten Bereich sichtbar. Somit scheinen die 2 Gy in etwa der Grenze zu entsprechen, ab der die Konkurrenz ins Gewicht fällt. Sollten weitere Experimente diese Vermutung bestätigen, wäre der für den G2-Arrest kritische Dosisbereich von $\leq 0.4 \text{ Gy}$ von dem Konkurrenzverhalten des 53BP1 nicht mehr betroffen.

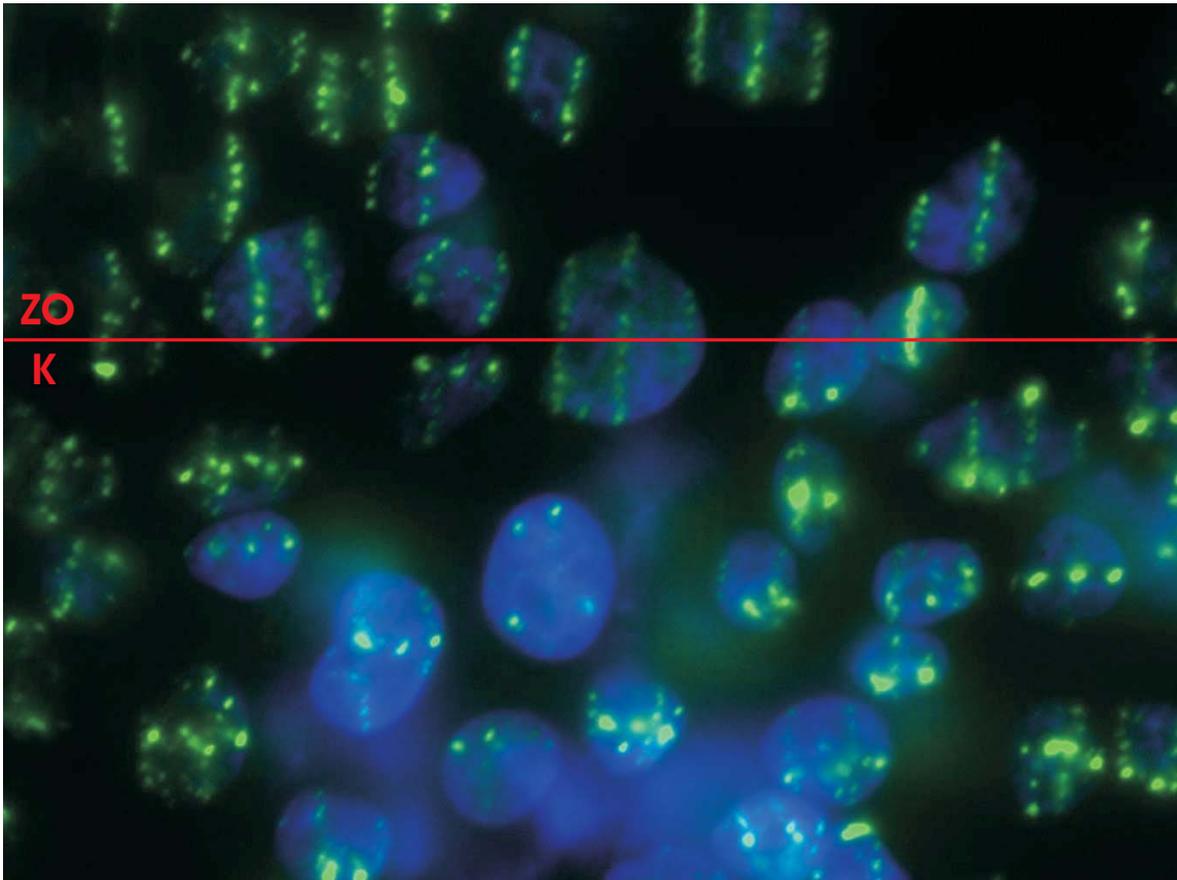


Abbildung 5.8: Konkurrenzeffekte im 53BP1 in einer Probe mit ca. 2 Gy Vorbestrahlung ($\Delta t = 45 \text{ min}$, $t_I = 20 \text{ min}$).

5.4 Korrelation zwischen Focizahl und vorhandener Menge an 53BP1

Beim Betrachten der vorangegangenen Bilder dieses Kapitels fällt auf, dass die Helligkeit der einzelnen 53BP1-Foci mit zunehmender Focizahl pro Zellkern abnimmt. Da davon ausgegangen werden kann, dass die Helligkeit zur Anzahl der Farbstoffmoleküle und diese wiederum zur Zahl der Proteinmoleküle proportional ist, bedeutet eine höhere Helligkeit eines Fokus auch mehr 53BP1. Dieser Effekt tritt unabhängig von Δt und t_I und somit von den weiter oben beschriebenen Konkurrenzprozessen auf. Besonders deutlich wird dieses Verhalten bei Aufnahmen des Bereichs des Bestrahlungsmusters, in dem die Linien der 2 Gy-Niederdosisvorbestrahlung seitlich über die senkrechten Linien der Zweitbestrahlung herausragen (Abb. 5.9). Dort erkennt man beim 53BP1, das mit dem Farbstoff Cy5 angefärbt wurde, dass die Foci der Zellkerne 1–4, die nur von der Niederdosisbestrahlung betroffen sind, deutlich heller leuchten und eine größere Aus-

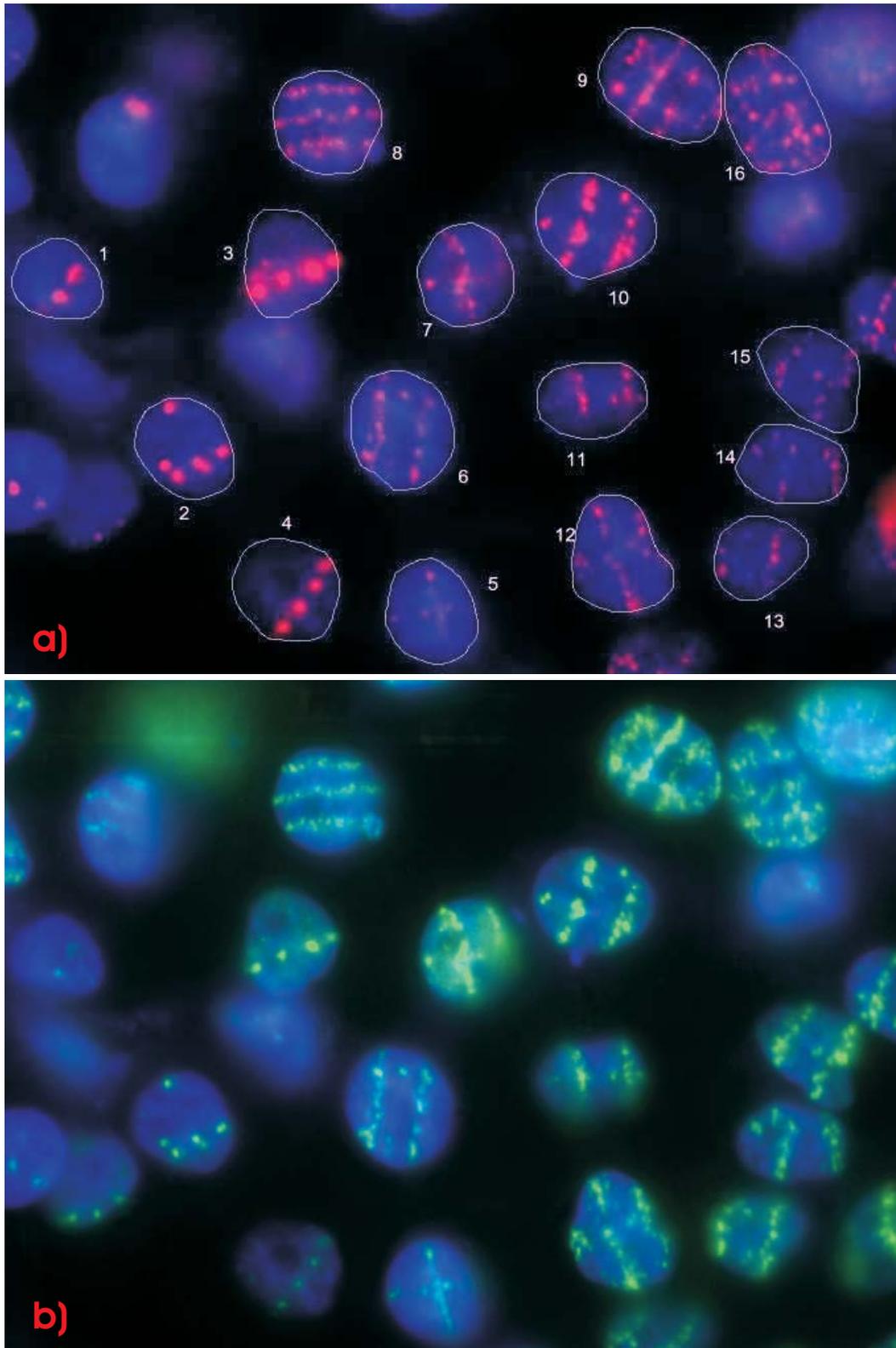


Abbildung 5.9: Oben: Ungleichmäßige Anlagerung von 53BP1 in Abhängigkeit der Focizahl. Unten: γ -H2AX zum Vergleich.

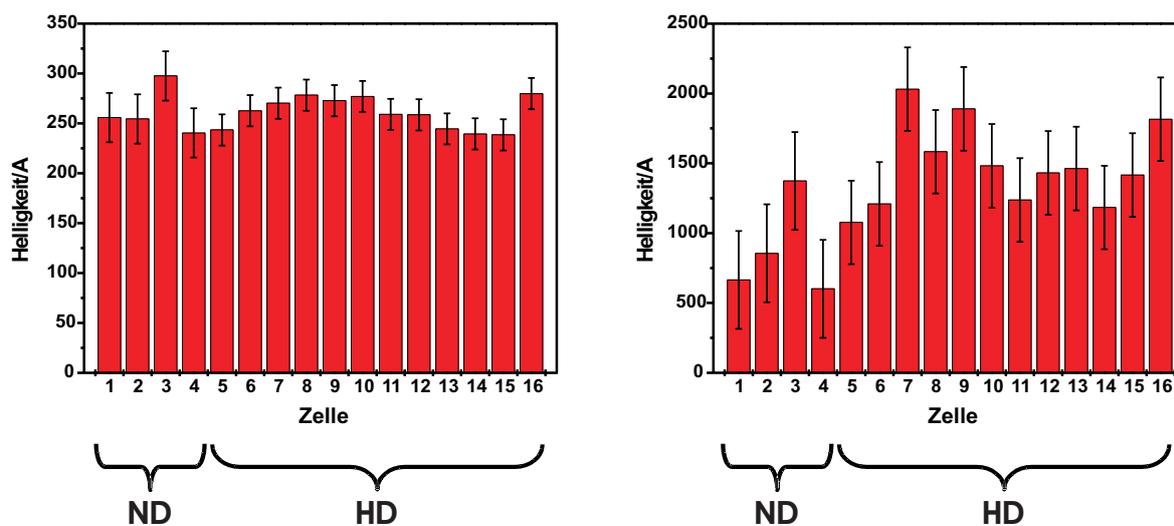


Abbildung 5.10: Auf die Zellkernfläche normierte Helligkeit im 53BP1 (links) und γ -H2AX (rechts).

dehnung aufzuweisen scheinen als die restlichen. Dies legt die Vermutung nahe, dass zumindest in dem betrachteten Dosisbereich von $> 2 Gy$ ein in der Zelle vorhandener Vorrat an 53BP1 vollständig auf die Foci verteilt wird. Auch beim γ -H2AX (Abb. 5.9 b), Farbstoff: Cy3) schwankt die Helligkeit der einzelnen Foci merklich. Allerdings ist hier keine Korrelation zur Focizahl festzustellen. So bildet die Zelle 4 aus dem Niederdosisbereich nur sehr lichtschwache Foci aus, während z. B. die Zellen 7 und 9 aus dem Hochdosisbereich sehr hell leuchten.

Um die Gesamtmenge des 53BP1 und des γ -H2AX pro Zellkern quantitativ zu erfassen, wurde aus dem Original-Graustufenbild die Gesamthelligkeit⁽²⁾ eines jeden in Abb. 5.9 a) markierten Zellkerns ermittelt und auf die Querschnittsfläche des Zellkerns (die aus dem DAPI-Bild bestimmt wurde) normiert. Da der für das 53BP1 verwendete Antikörper nicht-phosphosensitiv ist, sich also auch an nicht aktiviertes, ungebundenes 53BP1 anlagert, wird auf diese Weise die im Zellkern vorhandene Gesamtmenge bestimmt. Die auf dem beschriebenen Weg ermittelte normierte Helligkeit jedes Zellkerns ist im Diagramm Abb. 5.10 eingetragen. Dort lässt sich im 53BP1 kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen mit Niederdosisbestrahlung (1–4) und den zusätzlich noch hochdosisbestrahlten ausmachen. Die eingezeichneten Fehlerbalken geben die Streuung σ der vier Niederdosis und zwölf Hochdosiswerte um ihren jeweiligen Mittelwert an. Im rechten Diagramm ist zum Vergleich die selbe Auswertung für das γ -H2AX

⁽²⁾Also die Summe der Graustufenwerte jedes Bildpixels im Zellkern. Da bei der Mikroskopie eine 12-Bit-Kamera verwendet wird, liegt der Wert eines einzelnen Pixels zwischen 0 (schwarz) und 4095 (weiß).

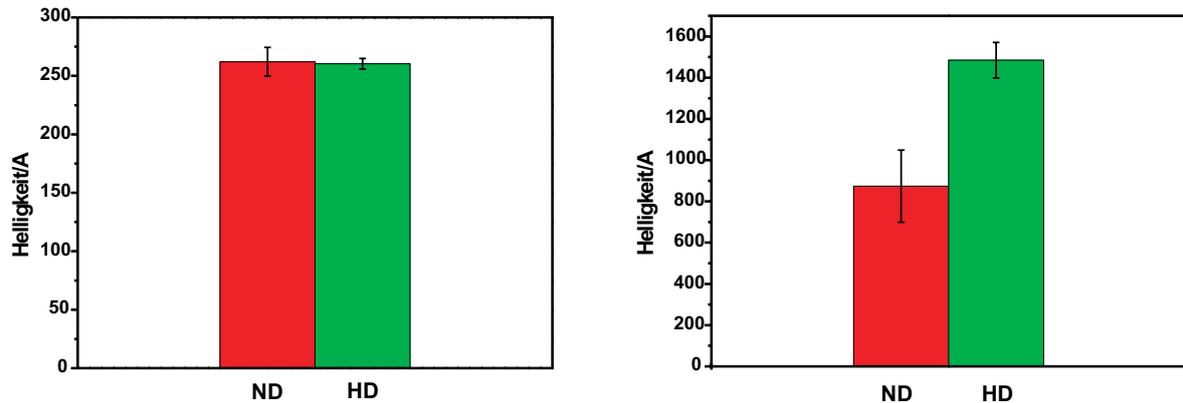


Abbildung 5.11: Mittelung der Werte aus Abb. 5.10 für Niederdosis (rot) und Hochdosis (grün). Links: 53BP1, rechts: γ -H2AX.

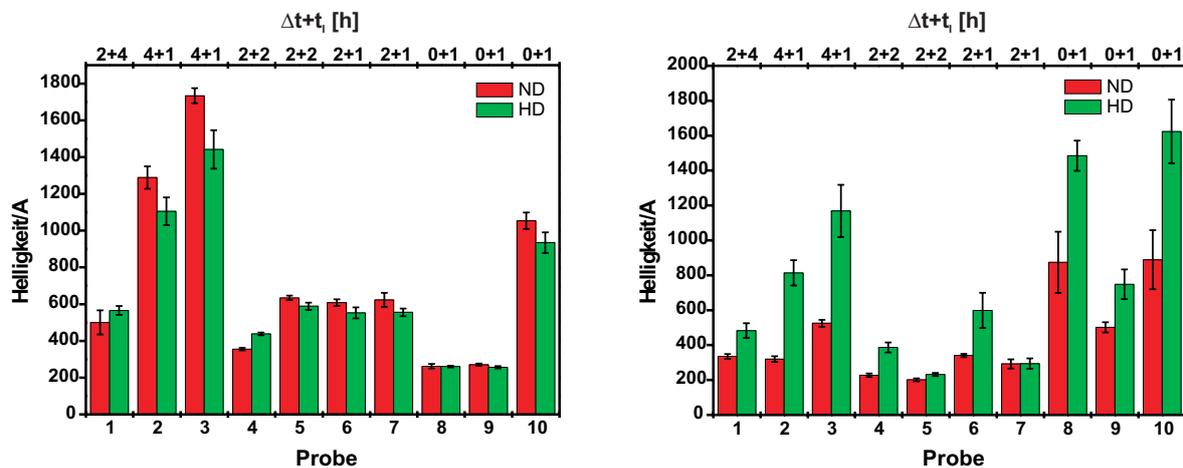


Abbildung 5.12: Gemittelte Helligkeit unterschiedlicher Proben. Links: 53BP1, rechts: γ -H2AX.

zeigt. Hier sind auch innerhalb eines Dosisbereichs deutlich stärkere Schwankungen der Helligkeit auszumachen. Trotzdem lässt sich dort ein signifikanter Trend feststellen, dass die Helligkeit mit der Dosis – wenn auch nicht linear – ansteigt, wie die jeweiligen Mittelwerte aus den vier bzw. zwölf Zellkernen für den Nieder- und Hochdosisbereich (Abb. 5.11) demonstrieren. Die hier eingetragenen Fehlerbalken geben die Unsicherheit des Mittelwerts σ/\sqrt{N} an. Diese am Beispiel der in Abb. 5.9 gezeigten Probe demonstrierte Auswertung wurde für neun weitere Proben mit unterschiedlichen Bestrahlungszeiten durchgeführt. Abb. 5.12 zeigt die jeweiligen Ergebnisse analog zu Abb. 5.11, die sich dort in Probe 8 wiederfindet. Auch hier zeigt sich wieder das selbe Bild: Keine signifikanten Unterschiede zwischen Hoch- und Niederdosis im 53BP1, (nicht linearer) Anstieg der Helligkeit mit der Dosis im γ -H2AX. Für die verschiedenen Proben ist das Δt zwischen Niederdosisvorbestrahlung und Hochdosisbestrahlung

sowie die Inkubationszeit t_I von der Zweitbestrahlung bis zur Fixierung, die zusammen t_{ges} bilden, angegeben. Dadurch lässt sich die weiter oben gemachte Aussage, dass dieser Effekt der Gesamtproteinmenge unabhängig von diesen Zeiten und somit vom beobachteten Konkurrenzeffekt ist, bestätigen. Des Weiteren liegen die Zeiten in einem Bereich, in dem man nach (5.1) keine Konkurrenz erwartet. Anzumerken sei noch, dass ein Vergleich der absoluten Helligkeiten der Proben zueinander nicht sinnvoll ist, da die Helligkeit der Fluoreszenz unterschiedlicher Proben sehr stark schwankt. Dies liegt vermutlich an der nicht exakten Reproduzierbarkeit der Fixier- und Färbevorgänge. Deshalb lassen sich quantitative Auswertungen der Helligkeit immer nur innerhalb einer Probe – oder noch besser: einer Mikroskopaufnahme – durchführen. Um absolute Helligkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten vergleichen zu können, ist eine Lebendzellbeobachtung nötig, die es erlaubt, Aufnahmen ein und derselben Probe zu verschiedenen Zeitpunkten zu machen.

Ein Vergleich der relativen Helligkeiten in Abhängigkeit der Zeit ist jedoch möglich und liefert ein wichtiges Ergebnis: Auch bei im Vergleich zu T_2 aus dem vorangegangenen Teil dieses Kapitels langem t_{ges} ist die Gesamthelligkeit der zweifach bestrahlten Zellen nicht höher als die der einfach bestrahlten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass gegenüber den nur einfach bestrahlten Zellen nicht mehr 53BP1 vorhanden ist. Folglich ist anzunehmen, dass sich entweder seit der Erstbestrahlung kein weiteres 53BP1 im Zellkern gebildet hat oder dass zwar eine Nachproduktion stattfindet, deren Kapazität aber schon durch die Erstbestrahlung völlig ausgeschöpft ist, so dass die Produktionsmenge nicht als Antwort auf den bei der Zweitbestrahlung hinzukommenden deutlich größeren Schaden weiter gesteigert werden kann. Die Frage, ob eine solche Nachproduktion stattfindet, ließe sich klären, wenn neben der Menge an 53BP1 in den nieder- und hochdosisbestrahlten Zellkernen auch die Menge in unbestrahlten Zellkernen bestimmt würde. Das bei der Auswertung verwendete Bildmaterial enthält solche Kerne jedoch nicht, und vorhandene Bilder unbestrahlter Zellen sind aufgrund der oben erwähnten Unmöglichkeit von Quervergleichen zwischen unterschiedlichen Proben zur Klärung dieser Frage nicht geeignet. In der folgenden Strahlzeit werden diese Daten jedoch produziert werden.

Kapitel 6

Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass sich der Zellbestrahlungsaufbau am Rasterionenmikroskop SNAKE etabliert hat und mit den Dynamikuntersuchungen und der Entdeckung der Konkurrenzeffekte im 53BP1 erste biophysikalische Resultate geliefert hat. In nur drei Strahlzeiten wurden mehr Daten gesammelt, als im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet werden konnten. So steht eine Untersuchung der Streuung entlang der Ionenspur noch an. Die dazu nötigen z-Stacks einer Punktbestrahlung mit $8\ \mu m$ Abstand sind bereits vorhanden. Nun soll entlang einer Spur durch den Zellkern für jede Ebene des Stacks der Schwerpunkt des Fokus bestimmt werden. Hieraus lässt sich ähnlich zu Kap. 4.2 die Abweichung der Foci zur geraden Ionenspur bestimmen. Eine solche Auswertung mehrerer Spuren für verschiedene Zeiten kann weitere Hinweise auf eine vorliegende Diffusion auf großskaliger Ebene liefern. In einem solchen Falle kann eine Diffusionskonstante mit genauer definierter Tiefenabhängigkeit als in Kap. 4.2 und ein radiales Profil der Dynamik ermittelt werden. Ebenfalls soll, wie schon in Kap. 4.2 erwähnt, die Methodik zur Auswertung der Streuung der Linienbestrahlungen weiter verbessert werden.

Des weiteren steht, wie schon in Kap. 5 erwähnt, eine quantitative Auswertung der vorhandenen Kreuzbestrahlungen noch an. Ergänzend werden in einer folgenden Strahlzeit weitere Kreuzbestrahlungen durchgeführt werden. Mit diesen soll überprüft werden, ob die Aktivierung von ATM durch die Konkurrenzeffekte im 53BP1 beeinträchtigt wird. Darüber hinaus wäre eine genauere Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Konkurrenzeffekte interessant (s. Kap 5.3).

Längerfristig sollen für die Zellbestrahlungen nicht nur die beiden in Kap. 3.4 erwähnten Ionen und Energien zum Einsatz kommen, sondern mittels des breiten am Münchner Tandembeschleuniger verfügbaren Ionenspektrums die Abhängigkeit zwischen applizierter Dosis und der Anzahl der erzeugten Doppelstrangbrüche pro Zellkern sowohl für dicht als auch locker ionisierende Strahlung bestimmt werden. Diesbezüg-

lich existieren zwar diverse theoretische Modelle, experimentelle Daten sind jedoch nur unvollständig vorhanden [32].

Auch Verbesserungen und Ergänzungen an der Methodik sind geplant. Zum einen soll die gezielte Bestrahlung einzelner Zellkerne (s. Kap. 3.5) verbessert werden. Dazu soll die manuelle Positionierung des zu bestrahlenden Zellkerns in den Strahl entfallen und stattdessen der Strahl mittels der elektrostatischen Ablenkeinheit auf den gewünschten Zellkern gelenkt werden. Um dies zu realisieren, muss für den gesamten Bildausschnitt des Positionierungsmikroskops eine Karte erstellt werden, die jedem Punkt einen Spannungswert für die x - und y -Ablenkplatte zuordnet.

Zum Anderen ist – wie des öfteren in dieser Arbeit erwähnt – eine Lebendzellmikroskopie am Bestrahlungsplatz von Nöten. Diese ermöglicht Zeitreihen ein und derselben Zelle aufzunehmen, was systematische Fehler bei Zeitreihen fixierter Zellen (z. B. durch unterschiedlich starke bzw. lange Abkühlung während der Bestrahlung oder kleine Variationen während des Fixier- und Färbevorgangs) ausschließt. Dazu muss statt des Positionierungsmikroskops ein z -Stack-fähiges Fluoreszenzmikroskop am Bestrahlungsplatz angebracht werden. Des weiteren müssen Lebendzellbedingungen geschaffen werden, d. h. ein Teil des Versuchsaufbaus muss von einer Kammer umgeben sein, in der 37°C und 5% CO_2 -Gehalt herrschen. Für die Zellbehälter muss ebenfalls ein neues Design entworfen werden, da das jetzige mit der gesättigten Atmosphäre nicht darauf ausgelegt ist, die Zellen über Stunden hinweg von der Austrocknung zu bewahren. Darüber hinaus muss eine Alternative zur Zellträgerfolie gefunden werden, da diese bei der Aufnahme von z -Stacks der Objektivbewegung folgen würde und somit die erlangte z -Information fehlerbehaftet wäre (vgl. Kap. 3.4 und [3]). Ein massiveres Zellträgermaterial (z. B. Glas) wäre jedoch für die Ionen nicht mehr durchlässig, was eine Positionierung des zur Einzelionenpräparation nötigen Detektors hinter der Probe ausschließt. Eine Alternative dafür zu konstruieren, die die Strahlauflösung nicht negativ beeinflusst, wie es z. B. bei Durchflugsdetektoren mit einer Folie im Strahlengang wäre, dürfte den anspruchsvollsten Schritt bei der Adaption von SNAKE für eine Lebendzellmikroskopie darstellen.

Auch die biologische Methodik für eine Lebendzellmikroskopie unterscheidet sich deutlich von der hier benutzten. Denn hier reicht es nicht aus, die für das jeweilige Experiment relevanten Proteine nachträglich anzufärben. Stattdessen wird die Zelle auf gentechnischem Wege so verändert, dass sie in die Moleküle des zu untersuchenden Proteins einen Farbstoff (z. B. GFP = Green fluorescent Protein) einbaut.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Walter, *Dynamics of DNA-repair factors and chromosomes studied by laser-UVA-microirradiation and laser-photobleaching*, Doktorarbeit, LMU München, 2003.
- [2] A. Hauptner, Doktorarbeit, TU München, 2005.
- [3] 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.
- [4] G. Datzmann, *Aufbau und Charakterisierung des Hochenergie Rasterionenmikroskops SNAKE*, Doktorarbeit, TU München, 2002.
- [5] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995.
- [6] M. Modesti, R. Kanaar, *Genome Biol* **2** (2001) reviews1014.1–1014.5.
- [7] A. A. Friedl, BNU Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz **2004-637** (2004).
- [8] Wikipedia, die freie Enzyklopädie, URL <http://de.wikipedia.org/>.
- [9] D. L. Spector, *Annu Rev Biochem.* **72** (2003) 573–608.
- [10] Molecular Biology Web Book,
URL <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3D4.htm>.
- [11] R. T. Abraham, *Nature Cell Biol* **4** (2002) E277–E279.
- [12] E. P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W. M. Bonner, *J Cell Biol* **146** (1999) 905–916.
- [13] T. T. Paull, E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, W. M. Bonner, *Curr Biol* **10** (2000) 886–895.

- [14] 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.
- [15] F. Pâques, J. E. Haber, *Microbiol Mol Biol Rev* **63** (1999) 349–404.
- [16] T. A. Mochan, M. Venere, R. A. DiTullio Jr., T. D. Halazonetis, *DNA Repair* **3** (2004) 945–952.
- [17] E. U. Kurz, S. P. Lees-Miller, *DNA Repair* **3** (2004) 889–900.
- [18] B. Wang, S. Matsuoka, P. B. Carpenter, S. J. Elledge, *Science* **298** (2002) 1435–1438.
- [19] M. Stucki, S. P. Jackson, *DNA Repair* **3** (2004) 953–957.
- [20] ImageJ, URL <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>.
- [21] P. Horowitz, W. Hill, *The Art of Electronics*, Cambridge University Press, 2nd edition, 1989.
- [22] Ärztezeitung online,
URL <http://www.aerztezeitung.de/docs/2001/05/17/091a1004.asp>.
- [23] Deconvolution Recipes, 1997 – 2003.
- [24] Scientific Volume Imaging b. v., URL <http://www.svi.nl/>.
- [25] M. Cremer, J. von Hase, T. Volm, A. Brero, G. Kreth, et al., *Chromosome Res* **9** (2001) 569–584.
- [26] A. A. Friedl, mündliche Mitteilung.
- [27] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, *Numerical Recipes*, Cambridge University Press, 1986.
- [28] Microcal Software, Inc., Northampton, USA, *Origin User's Manual*, 1997.
- [29] H. Bornfleth, P. Edelmann, D. Zink, T. Cremer, C. Cremer, *Biophys J* **77** (1999) 2871–1886.
- [30] C. J. Bakkenist, M. B. Kastan, *Nature* **421** (2003) 499–506.
- [31] B. Xu, S. Kim, D. Lim, M. B. Kastan, *Mol Cell Biol* **4** (2001) 1049–1059.
- [32] J. A. Aten, mündliche Mitteilung.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Reiner Krücken für die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl E12, sein Interesse an den Biologieexperimenten an SNAKE und für seine spontane Hilfe, als mich die diversen Fit-Algorithmen vollends verwirrt hatten, bedanken.

Im Besonderen danke ich Herrn Prof. Günther Dollinger für die kompetente und unterstützende Betreuung meiner Arbeit. Seine Tür stand stets offen und er hatte immer Zeit für meine Fragen und Probleme, was alles andere als selbstverständlich ist. Mit seiner Motivation und den daraus resultierenden Ideen sowie seinem scharfen Blick für Zusammenhänge und Auffälligkeiten in den Mikroskopbildern brachte er das Experiment zielstrebig weiter.

Ganz herzlicher Dank gilt Andreas Hauptner für die freundschaftliche Zusammenarbeit und seine riesige Geduld und Hilfsbereitschaft, die ich hoffentlich nicht zu sehr überbeansprucht habe. . . Es macht wenig Sinn, dabei Einzelaspekte wie das aufmerksame Lesen meiner Arbeit und die vielen Verbesserungsvorschläge, die reichlichen Tipps beim Elektronikbasteln oder die ausführlichen Erklärungen z. B. zum Experimentieraufbau oder zur Statistik hervorzuheben. Vielmehr waren es die Gewissheit, sich auf jemanden verlassen zu können, und sein Humor, die ein hervorragendes Arbeitsklima geschaffen hatten.

Vielen Dank auch Christoph Greubel, der ebenfalls zu dem lockeren und humorvollen Arbeitsklima in der SNAKE-Truppe beigetragen hat und sich sofort nach Beginn seiner Diplomarbeit und überstandener erster Strahlzeit in die Auswertungen eingeklinkt hat und diese nicht nur mit seinen Programmierkenntnissen weitergebracht hat. Danke auch für die spitzfindige Suche nach den letzten „cut and paste-Leichen“ und sonstigen Fehlern in dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön auch an Andi Bergmaier für seine Hilfe bei allen Linuxproblemen und sonstigen Wehwehchen und das aufmerksame Probelesen und die Verbesserungsvorschläge der meisten Kapitel dieser Arbeit. Nicht zu vergessen auch die ganzen Blödeleien aber auch konstruktiven Gespräche, die den Arbeitsalltag immer aufgelockert haben. Ebenso will ich Patrick Reichart für die gute Einarbeitung u. a. in die Scannerei, sowie für die Unterstützung bei den ersten Strahlzeiten danken.

Den schon erwähnten und allen anderen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern am Münchner Tandembeschleuniger möchte ich für das wunderbar entspannte und kollegiale Arbeitsklima dort danken. Besonders erwähnen will ich dabei noch Mario Schubert u. a. für das spontane „Verleihen“ von ca. 50 GB Festplattenspeicher, natürlich das heimliche SNAKE-Oberhaupt Sigi Koschartz und die Rechnergruppe Rudi Lutter, Klaus Steinberger und Otto Schaile.

Ebenso will ich unseren Biologen Anna Friedl und Guido Drexler für die gute Zusammenarbeit, die Versorgung mit Informationen und Papers, das Korrekturlesen dieser Arbeit in wirklich rekordverdächtiger Zeit sowie die kurzweiligen Gespräche in langen Mikroskopiernächten danken. Vielen Dank auch an die AG Cremer, insbesondere Steffen, 2x Claudia, Simone und Katrin, für den genialen Crashkurs in Zellhandling.

Vielen Dank auch an Sonja Winkler für das Belichten der bedruckten Zellfolien und die Hilfe bei der Erstellung der dafür benötigten Masken. Danke auch an die E12-Werkstatt Ralf Lang und Michi Glöckner für das oft gehörte „Ich schieb’s wo dazwischen, dann kannst Du’s morgen abholen“.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für alles, was sie für mich während des Studiums getan haben, für die starke Unterstützung nicht nur finanzieller Art, die mir das Studium erst ermöglicht hat, und dafür, dass sie mir das schöne Gefühl gegeben haben, stolz auf meine Arbeit zu sein.