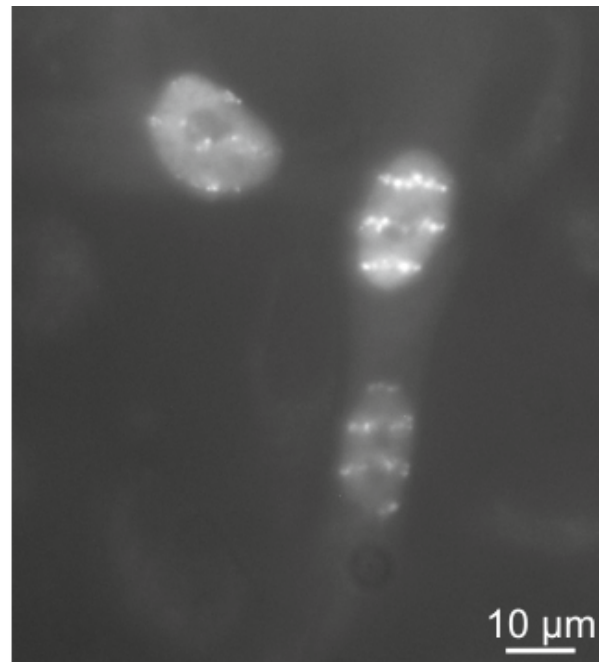
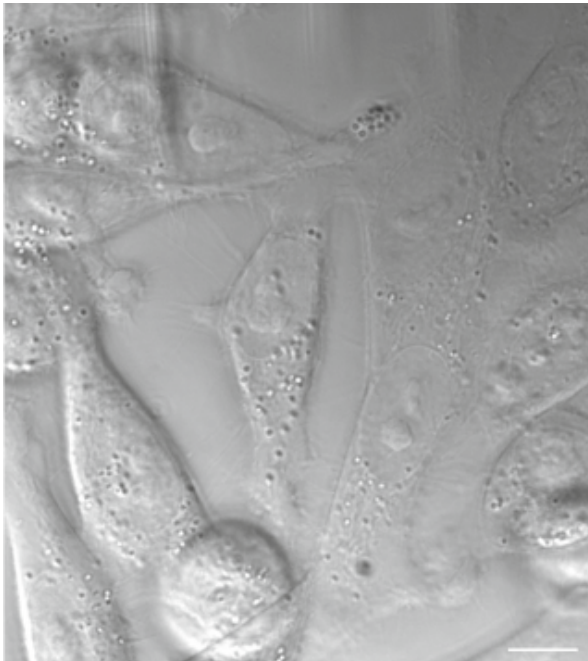


## **Echtzeitbeobachtung schneller Reaktionskinetiken in lebenden Zellen nach Ionenmikrobestrahlung**

Dissertation von Volker Hable





Universität der Bundeswehr München  
Fakultät für Luft- und Raumfahrttechnik  
Institut für Angewandte Physik und Messtechnik

## **Echtzeitbeobachtung schneller Reaktionskinetiken in lebenden Zellen nach Ionenmikrobestrahlung**

Dipl.-Phys. Volker Hable

Vollständiger Abdruck der bei der  
Fakultät für Luft- und Raumfahrttechnik  
der Universität der Bundeswehr München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

eingereichten Dissertation

Vorsitzender: Prof. Dr. Roger Förstner

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günther Dollinger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Cremer
3. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Herwig Paretzke

Diese Dissertation wurde am 21.09.2010 bei der Universität der Bundeswehr München, 85577 Neubiberg eingereicht und durch die Fakultät für Luft- und Raumfahrttechnik am 06.10.2010 angenommen.

Tag der Prüfung: 03.05.2011



# Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt den Aufbau einer Lebendzellmikroskopieumgebung am Rasterionenmikroskop SNAKE, welches am Münchner 14 MV Tandembeschleuniger installiert ist. An dessen Zellbestrahlungsplatz können lebende Zellen mit Protonen und Schwerionen unter Lebendbedingungen mit einer Genauigkeit von ca.  $0,5\ \mu\text{m}$  und mit genau definierter Dosis bestrahlt werden.

Die nach der Bestrahlung im Zellkern ablaufenden Reparaturvorgänge können durch eine mikroskopische Betrachtung der an der Reparatur beteiligten Proteine analysiert werden. Hierfür ist die Markierung dieser Proteine mittels Fluoreszenzfarbstoffen nötig. Dazu werden die Zellen auf gentechnischem Wege so verändert, dass an Proteine, die an der Reparatur der ioneninduzierten Schäden beteiligt sind, Fluoreszenzproteine (z. B. GFP, green fluorescent protein) angehängt werden. Mikroskopische Proteinanlagerungen an die Schadensorte, sogenannte Foci, können mit dem im Rahmen dieser Arbeit realisierten Aufbau unmittelbar nach und sogar während der Bestrahlung „online“ analysiert werden. Ein kommerziell erhältliches Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200M) wurde hierzu am Bestrahlungsplatz angebracht. An dessen Probentisch befinden sich die Zellen während der Bestrahlung und der nachfolgenden Mikroskopie unter optimalen Umgebungsbedingungen in neu entwickelten Zellkulturgefäßen.

Erste Experimente an dem neuen Aufbau dienten der Untersuchung von Kinetiken (= zeitlicher Ablauf der Focibildung) der Proteine Mdc1, 53BP1 und Rad52. Nach Applizierung einer mittleren Dosis von  $4,4\ \text{Gy}$  mit  $55\ \text{MeV}$  Kohlenstoffionen mit einem linearen Energietransfer  $LET = 310\ \text{keV}/\mu\text{m}$  beginnt Mdc1 nach  $T_0 = 17 \pm 2\ \text{s}$  mit der Anlagerung an die Schadensorte. Dies geschieht mit einer Zeitkonstante  $\tau = 98 \pm 11\ \text{s}$ . Wird die selbe Dosis mit  $20\ \text{MeV}$  Protonen appliziert ( $LET = 2,65\ \text{keV}/\mu\text{m}$ ), läuft die Focibildung langsamer ab ( $T_0 = 73 \pm 16\ \text{s}$ ,  $\tau = 1050 \pm 270\ \text{s}$ ). Eine höhere Bestrahlungsdosis durch Erhöhung der pro Punkt applizierten Protonen beschleunigt die Kinetik. Die Zeitkonstanten des Proteins 53BP1 weisen keine solch ausgeprägte Abhängigkeit von der Bestrahlungsart auf. Für alle Bestrahlungsbedingungen liegt hier  $T_0$  in der Größenordnung von  $100\ \text{s}$  und  $\tau$  in der Größenordnung von  $300\ \text{s}$ . Das nur qualitativ betrachtete Reparaturprotein Rad52 zeigt eine deutlich langsamere Kinetik, die allerdings wieder stark von der Dosis und vom LET der Strahlung abhängt. Während bereits

ca. zehn Minuten nach Bestrahlung mit 4,7 Gy mit 55 MeV Kohlenstoffionen erste Foci sichtbar werden, dauert deren Erscheinen nach Applizierung von 5,7 Gy durch 20 MeV Protonen (117 Protonen pro Punkt) ca. drei Stunden. Eine Erhöhung der pro Punkt applizierten Protonenzahl auf 256 (und somit der Dosis auf 12 Gy) verkürzt diese Zeit auf ca. eine Stunde. Eine weitere Verdopplung von Protonenzahl und Dosis führt zu einem Sichtbarwerden der Foci nach weniger als zehn Minuten.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Erzeugung und Reparatur von Strahlenschäden in der DNA</b>	<b>5</b>
2.1 Das DNA-Molekül . . . . .	5
2.2 Einzel- und Doppelstrangbrüche . . . . .	6
2.3 Reparatur von Doppelstrangbrüchen . . . . .	8
2.4 Wichtige Reparaturproteine . . . . .	11
2.4.1 $\gamma$ -H2AX – ein zuverlässiger Doppelstrangbruch-Marker . . . . .	12
2.4.2 Mdc1, 53BP1 und ATM – Signalkaskade für Zellzyklus-Checkpoints	13
2.4.3 Rad51, Rad52 und RPA – Schlüsselrollen bei der homologen Re- kombination . . . . .	15
<b>3 Mikroskopische Untersuchung von Reparaturproteinen</b>	<b>17</b>
3.1 Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	17
3.2 Immunofluoreszenz . . . . .	21
3.3 Markierung mittels Fluoreszenzproteinen . . . . .	23
3.4 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	25
3.4.1 Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops . . . . .	25
3.4.2 Optische Auflösung . . . . .	29
3.4.3 Helligkeit des Abbildes . . . . .	36
3.4.4 Schärfentiefe und optischer Schnitt . . . . .	37
3.4.5 Fluoreszenzmikroskopie jenseits des Beugungslimits . . . . .	46
3.5 Phasenkontrastmikroskopie . . . . .	48
<b>4 Bestrahlungsaufbau</b>	<b>53</b>
4.1 SNAKE Beamline . . . . .	53
4.2 Lebendzellumgebung am Bestrahlungsplatz . . . . .	55
4.2.1 Mikroskopie . . . . .	57

---

4.2.2	Zellbehälter . . . . .	68
4.2.3	Einzelionenpräparation . . . . .	72
4.2.4	Strahlaustrittsnase . . . . .	77
4.3	Experimentdurchführung . . . . .	79
4.3.1	Handhabung der Zellen . . . . .	79
4.3.2	Strahlpräparation . . . . .	80
4.3.3	Bestrahlung . . . . .	80
4.3.4	Mikroskopie . . . . .	83
4.4	Charakterisierung des Versuchsaufbaus . . . . .	84
4.4.1	Strahlaufösung . . . . .	84
4.4.2	Zielgenauigkeit . . . . .	86
<b>5</b>	<b>Erste Lebendzelleexperimente an SNAKE</b>	<b>89</b>
5.1	Reparaturproteinkinetiken . . . . .	89
5.1.1	Quantitative Analyse . . . . .	91
5.1.2	Kinetik des Proteins Mdc1 . . . . .	96
5.1.3	Kinetik des Proteins 53BP1 . . . . .	107
5.1.4	Kinetik des Proteins Rad52 . . . . .	115
5.2	Auswirkung der Überexprimierung von 53BP1 auf den Konkurrenzeffekt	118
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>121</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>135</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>139</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

Die Wirkung ionisierender Strahlung auf lebende Organismen und insbesondere den Menschen stellt ein umfangreiches Forschungsgebiet dar. Jeder Mensch ist permanent einer natürlichen Strahlendosis ausgesetzt, welche sich aus Strahlung von Radionukliden in Gesteinen und deren Zerfallsprodukten wie dem Gas Radon sowie der Höhenstrahlung zusammensetzt und ca. 2 mSv pro Jahr beträgt.

Eine im Mittel gleich große Strahlenbelastung ist künstlichen Ursprungs. Diese stammt zum größten Teil von medizinischen Anwendungen zur Diagnostik und Therapie. Um Vor- und Nachteile einer medizinischen Anwendung richtig abwägen zu können, müssen aufgrund der Strahlenbelastung zu erwartende Nebenwirkungen genau bekannt sein.

Fragestellungen wie der Zusammenhang zwischen applizierter Ganzkörperdosis und der Wirkung auf den Menschen, die von einem leicht erhöhten Krebsrisiko bis hin zum sicheren Tod aufgrund akuter Strahlenkrankheit reicht, können durch makroskopische, epidemiologische Betrachtungen beantwortet werden. Die dafür zugrundeliegenden Daten stammen hauptsächlich von den Atombombenabwürfen über Hiroshima und Nagasaki während des zweiten Weltkriegs [1, 2].

Für eine Reihe von Problemstellungen sind solche epidemiologische Betrachtungsweisen jedoch nicht ausreichend. Als Beispiel sei hier die Tumorthherapie mittels ionisierender Strahlung angeführt. Dabei wird dem Tumor eine Strahlendosis verabreicht, die ein Absterben der Tumorzellen bewirkt. Da diese Bestrahlung typischerweise von außerhalb des Körpers durchgeführt wird und die Strahlung somit gesundes Gewebe durchdringt, wird auch dieses in Mitleidenschaft gezogen. Sowohl das Tumor- als auch das gesunde Gewebe haben die Fähigkeit, Strahlenschäden innerhalb gewisser Grenzen zu reparieren. Je genauer dieses Reparaturpotential und somit die Strahlensensitivität des Gewebes bekannt ist, desto exakter kann eine Bestrahlungsplanung mit dem Ziel, den Tumor bei weitestgehender Schonung des gesunden Gewebes vollständig zu zerstö-

ren, durchgeführt werden. Jedoch kann auch Jahre nach der Bestrahlung als Spätfolge der Strahlenbelastung des gesunden Gewebes ein sogenannter Sekundärtumor entstehen.

Um solche Effekte zu verstehen, ist eine mikroskopische Betrachtungsweise vonnöten. So laufen die Vorgänge, die zum Absterben des Gewebes oder zu strahleninduziertem Krebs führen, genauso wie die Reparaturmechanismen auf molekularbiologischer Ebene in den Zellen des bestrahlten Gewebes ab. Dabei wurde vor vier Jahrzehnten der Zellkern als strahlensensitivster Bereich der Zelle identifiziert [3]. Eine zentrale Rolle bei der strahleninduzierten Schädigung des Zellkerns spielen sogenannte Doppelstrangbrüche [4]. Bei diesem gefährlichsten Erbgutschaden wird die DNA im Zellkern vollständig durchtrennt. Besagte Reparaturmechanismen sind zwar meistens in der Lage, Doppelstrangbrüche zu reparieren, eine fehlerbehaftete Reparatur (insb. sogenannte Chromosomenaberrationen) kann jedoch zur Entartung der Zelle und zu Krebs im Organismus führen.

Eine große Zahl an Proteinen, die an den Reparaturprozessen beteiligt sind, konnte bereits identifiziert werden. Viele davon bilden an den Schadensorten Cluster und können auf biochemischen und gentechnischen Wegen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Über diesen Umweg lassen sich die Schadensorte innerhalb des Zellkerns visualisieren. Doch die genaue Funktion der einzelnen Proteine sowie die komplexen Abhängigkeiten der Proteine untereinander sind in vielen Fällen noch nicht verstanden.

Durch das gezielte Setzen wohldefinierter Schäden im Zellkern und einer anschließenden mikroskopischen Beobachtung der am Schadensort kumulierten Proteine können weitere Ergebnisse gewonnen werden. So liefert die räumliche Dynamik der Proteincluster, man spricht auch von Foci, Erkenntnisse darüber, ob die geschädigte DNA in eine Art „Reparaturfabrik“ gebracht wird oder ob der Schaden vor Ort repariert wird. Auch eine gezielte Immobilisierung der Schäden, um ein Auseinanderwandern der Enden der gebrochenen DNA zu verhindern, ist denkbar. Eine systematische Analyse der Kinetik, also der zeitlichen Anlagerung der Proteine an die Schäden, liefert Einblicke in die Abhängigkeiten der Proteine voneinander.

Da die Ausdehnung der Foci im Submikrometerbereich liegt und sich auch die Bewegungen der Foci auf dieser Längenskala abspielen, ist zur quantitativen Analyse eine gezielte Bestrahlung mit Submikrometer-Genauigkeit und exakt definierter Dosis sowie eine mikroskopische Beobachtung mit einer Auflösung nahe des Beugungslimits  $d_{min} \approx 200$  nm vonnöten.

Die genannten Anforderungen an die Bestrahlung erfüllt das Rasterionenmikroskop SNAKE (Supraleitendes Nanoskop für angewandte kernphysikalische Experimente) am

---

Münchener 14 MV Tandembeschleuniger [5]. Dort können lebende Zellen mit einer Genauigkeit von ca. 500 nm bestrahlt werden [6]. Der Vorteil eines Ionenmikrostrahls wie SNAKE gegenüber anderen Mikrobestrahlungstechniken wie den häufig benutzten UV-Lasern liegt darin, dass sich nicht nur der Bestrahlungsort, sondern über die Wahl von Ionensorte und -energie auch der LET (linear energy transfer, die pro Weglängeneinheit übertragene Energie  $dE/dx$ ) und damit die Doppelstrangbruchdichte entlang einer Ionenspur präzise einstellen lässt. Eine Einzelionenpräparation erlaubt es, an SNAKE die Zahl der applizierten Ionen exakt vorzugeben, sodass nahezu jede gewünschte Dosis verabreicht werden kann.

An SNAKE wurden bereits u. a. Grundlagenexperimente zur Focidynamik [7, 8] sowie zum Einfluss früherer Bestrahlungen auf räumlich und zeitlich getrennt zugefügte spätere DNA-Schädigungen [9] durchgeführt. Gemeinsam ist diesen Experimenten, dass die Zellen nach einer definierten Zeitspanne ab Bestrahlung fixiert (also abgetötet) wurden und erst im Anschluss die Reparaturproteine angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert wurden. Diese häufig verwendete Immunofluoreszenzmethode hat jedoch zwei Nachteile: Jede Zellprobe repräsentiert einen Zeitpunkt nach der Bestrahlung, sodass nur statistische Auswertungen möglich sind. Zum anderen lassen sich Vorgänge, die auf kürzerer Zeitskala ablaufen als die Zeit, die zwischen Bestrahlung und Fixierung verstreicht (ca. 5 min), nicht erfassen.

Diese Limitierungen lassen sich mit einer Lebendzellmikroskopie direkt am Bestrahlungsplatz, wie sie im Rahmen dieser Arbeit an SNAKE entwickelt wurde, umgehen. Um Reparaturvorgänge nach der Bestrahlung „online“ beobachten zu können, müssen die Zellen auf gentechnischem Wege so verändert werden, dass Reparaturproteine mit einem Fluoreszenzprotein markiert sind. Ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop direkt am Bestrahlungsplatz ermöglicht es, Kinetik und Dynamik der fluoreszenzmarkierten Reparaturproteine unmittelbar nach der Bestrahlung zu analysieren. Des Weiteren ist dafür Sorge zu tragen, dass die Zellen während der Bestrahlung und des Mikroskopievorgangs optimale Wachstumsbedingungen vorfinden.

Diese Anforderungen werden von der an SNAKE realisierten Lebendzellmikroskopieumgebung erfüllt, sodass die präzise, definierte Dosisapplikation eines Ionenmikrostrahls mit den vielfältigen Möglichkeiten einer Online-Mikroskopie der bestrahlten Zellen zu einem universellen Werkzeug für strahlen- und molekularbiologische Grundlagenforschung kombiniert werden konnte.

Die vorliegende Arbeit ist wie folgt gegliedert: Kapitel 2 befasst sich mit biologischen Grundlagen zum DNA-Aufbau, möglichen DNA-Schäden und deren Reparatur. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Proteine und deren Funktion werden hier

ebenfalls vorgestellt. Kapitel 3 erläutert allgemein die physikalischen Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie sowie die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.

Der Aufbau der im Rahmen dieser Arbeit realisierten Lebendzellmikroskopie an SNAKE wird detailliert in Kapitel 4 beschrieben und charakterisiert. Kapitel 5 präsentiert die ersten biologischen Ergebnisse, die an dem neuen Versuchsaufbau gewonnen wurden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Kinetik von Reparaturproteinen.

# Kapitel 2

## Erzeugung und Reparatur von Strahlenschäden in der DNA

Energetische Ionen führen als direkt ionisierende Strahlung in Materie durch Coulombwechselwirkung zu Ionisation und angeregten Atomzuständen und können so zur Schädigung des bestrahlten Materials führen.

Hier sollen die Folgen solcher Schäden im Zellkern, der das Erbgut eines Organismus, die DNA, enthält, betrachtet werden. Der Zellkern stellt den strahlensensitivsten Bereich einer Zelle dar [3]. Schäden im Kern können aber auch gravierende Auswirkungen auf die ganze Zelle und auch auf den die Zelle enthaltenden Organismus haben. So können Erbgutschäden, die nicht nur durch ionisierende Strahlung sondern auch durch thermische Einflüsse, Radikale oder bei der Zellteilung entstehen können, zu Mutationen führen, die in einem Organismus z. B. Krebs auslösen können. Aus diesem Grund verfügt die Zelle über ausgeklügelte DNA-Reparaturmechanismen oder auch die Möglichkeit eines programmierten Zelltodes, der sogenannten Apoptose [10].

### 2.1 Das DNA-Molekül

Die DNA ist ein langes Kettenmolekül (Polymer). Dessen „Rückgrat“ besteht aus einem Zucker-Phosphat-Gerüst. Der Zucker (Desoxyribose) enthält fünf Kohlenstoffatome (mit 1' bis 5' bezeichnet, s. a. Abb 2.1), ist also eine Pentose. Am 5'-Kohlenstoff hängt eine Phosphatgruppe. Über eine Phosphodiester-Bindung ist diese Phosphatgruppe mit dem 3'-Kohlenstoff der benachbarten Desoxyribose verbunden, was zu besagter Kettenform führt. Während sich am 5'-Ende einer solchen Kette immer eine Phosphatgruppe befindet, wird das 3'-Ende von einer OH-Gruppe abgeschlossen. Dadurch weisen die Enden des Strangs unterschiedliche chemische Eigenschaften auf, der Strang ist also gerichtet, man spricht von einer chemischen Polarität. Am 1'-Kohlenstoffatom

ist eine der vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin gebunden. Aufgrund der beschriebenen geometrischen Anordnung liegen alle Basen auf der selben Seite des Strangs. An einen solchen Strang lagert sich ein zweiter, entgegengesetzt gerichteter, an. Die (Wasserstoffbrücken-)Bindungsstellen zwischen beiden Strängen befinden sich an den Basen (gestrichelt in Abb. 2.1 eingezeichnet). Dabei kann nur Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin binden. Somit sind die beiden Einzelstränge komplementär zueinander. Der so gebildete Doppelstrang liegt normalerweise als schraubenförmige Doppelhelix vor.

Die Einheit aus einer Base, einem Zuckermolekül und einem Phosphatrest wird als Nukleotid bezeichnet. Neue Nukleotide können nur am 3'-Ende eines DNA-Strangs angehängt werden, der Einzelstrang wächst also immer von 5' nach 3'.

## 2.2 Einzel- und Doppelstrangbrüche

Einen möglichen Schaden des DNA-Moleküls stellen sogenannte Einzelstrangbrüche (SSBs, engl: single strand breaks, s. Abb. 2.2(a)) dar. Dabei ist ein Strang der Doppelhelix gebrochen und anhängende Basen können beschädigt oder verloren sein. Da jedoch das gegenüberliegende Gerüst mit den angehängten Basen intakt ist, kann diese Form von Schaden einfach und ohne Informationsverlust behoben werden, indem die Komplementärbasen zu den noch vorhandenen Basen sowie das Zucker-Phosphat-Gerüst wiederhergestellt werden.

Im Gegensatz dazu stellen sogenannte Doppelstrangbrüche (DSBs, s. Abb. 2.2(b)) den wahrscheinlich gefährlichsten DNA-Schaden dar [4]. Ein Doppelstrangbruch entsteht dann, wenn beide Stränge in einem Abstand von weniger als zehn Basenpaaren gebrochen werden [11, 12]. Hierbei können beide Basen eines oder mehrerer Basenpaare verlorengegangen sein. Mögliche Ursachen für Doppelstrangbrüche sind oxidierende Stoffe, Replikationsfehler oder eben ionisierende Strahlung. Dabei gilt für locker ionisierende Strahlung wie Röntgen ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der produzierten Doppelstrangbrüche und der applizierten Dosis von ca. 35 DSB/Gy ( $1 \text{ Gy} \equiv 1 \text{ J/kg}$ ) [13, 14]. Bei Schwerionenbestrahlung kann die Zahl der generierten Doppelstrangbrüche aufgrund der hohen Ionisierungsdichte im zentralen Bereich der Ionisationsspur größer sein, was zu einem erhöhten RBE-Faktor<sup>(1)</sup> führt [5, 15, 16]. Da es keine zuverlässige Methode zur Bestimmung der DSB-Zahl entlang einer Ionenspur

---

<sup>(1)</sup>Relative biologische Wirksamkeit, gibt den Quotienten aus der Dosis einer Vergleichsquelle (z. B. 200 keV Röntgen) und der nötigen Dosis der zu vergleichenden Strahlung an, um den gleichen biologischen Effekt (oft Zellüberleben, hier Zahl der generierten DSBs) zu erzielen.

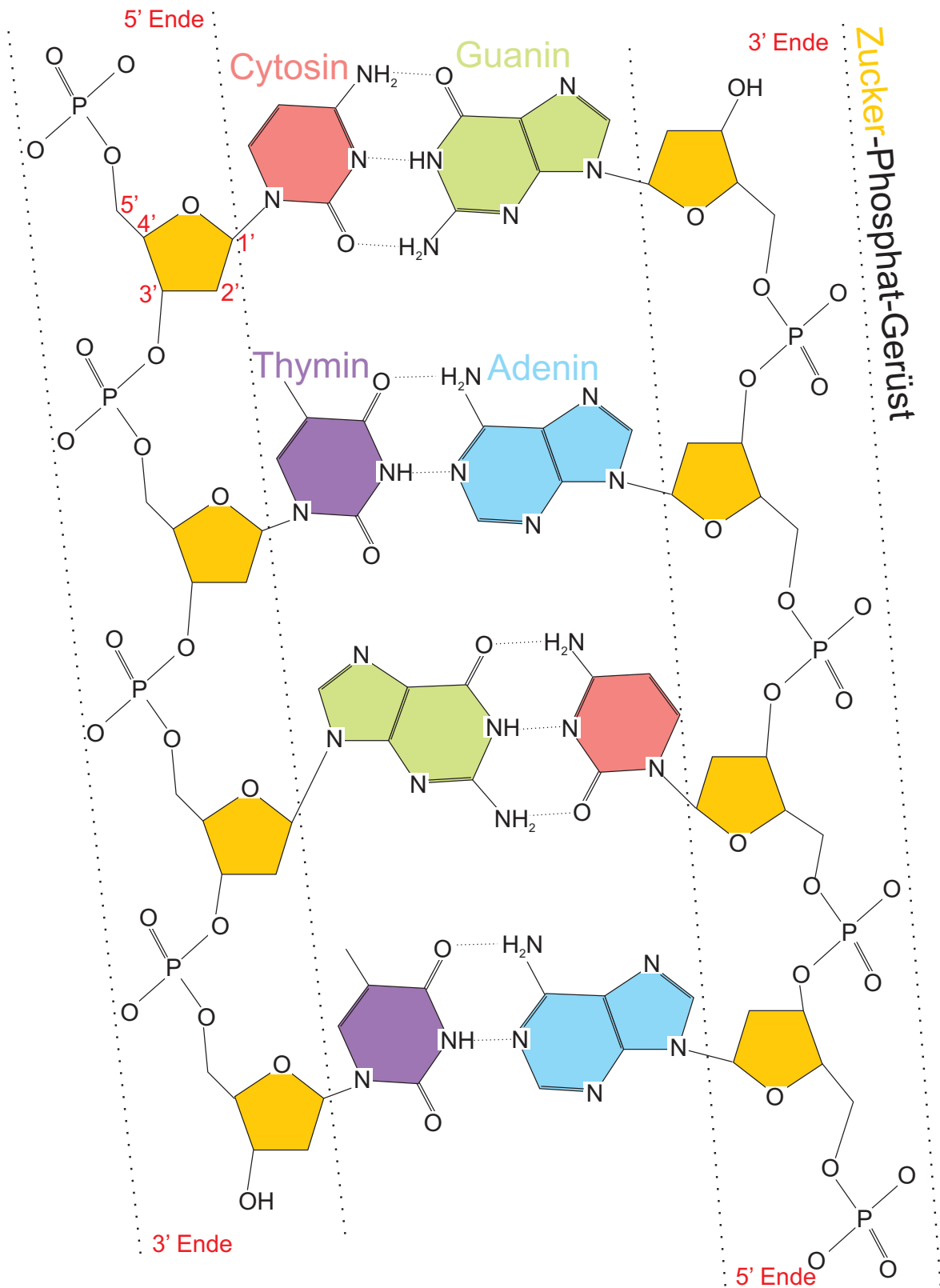
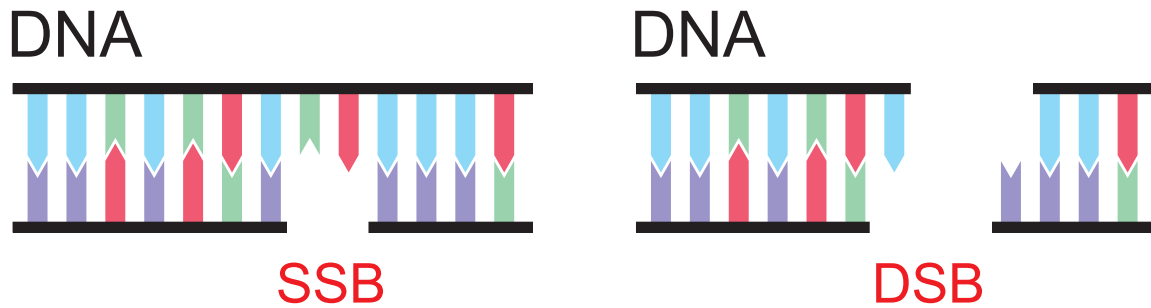


Abbildung 2.1: Kurzer Abschnitt eines DNA Doppelstrangs.



(a) Bei einem Einzelstrangbruch wird das Zucker-Phosphat-Gerüst (schwarz) aufgebrochen und einzelne Basen können verlorengehen. Da die jeweiligen Komplementärbasen noch vorhanden sind, können die Basen leicht wieder rekonstruiert werden.

(b) Da bei einem Doppelstrangbruch beide Stränge und somit das ganze Molekül gebrochen sind, sind komplexere Reparaturmechanismen vonnöten.

**Abbildung 2.2:** Einzel- und Doppelstrangbrüche.

gibt, existieren für den RBE-Faktor für Doppelstrangbrüche nur grobe Werte, die z. B. für Schwerionenbestrahlung an SNAKE einen Wert von bis zu 3 prognostizieren [17].

Unreparierte Doppelstrangbrüche können in der Zelle zu Apoptose, Nekrose oder permanentem Zellzyklusarrest führen [10, 18]. Zellzyklusarrest bedeutet, dass sich die Zelle nicht weiter teilt, sondern in ihrer momentanen Phase des Zellzyklus (s. Abb. 2.3) verharret. Fehlerhaft reparierte Doppelstrangbrüche können Mutationen und Chromosomenaberrationen und in Folge dessen Karzinogenese bedingen [18].

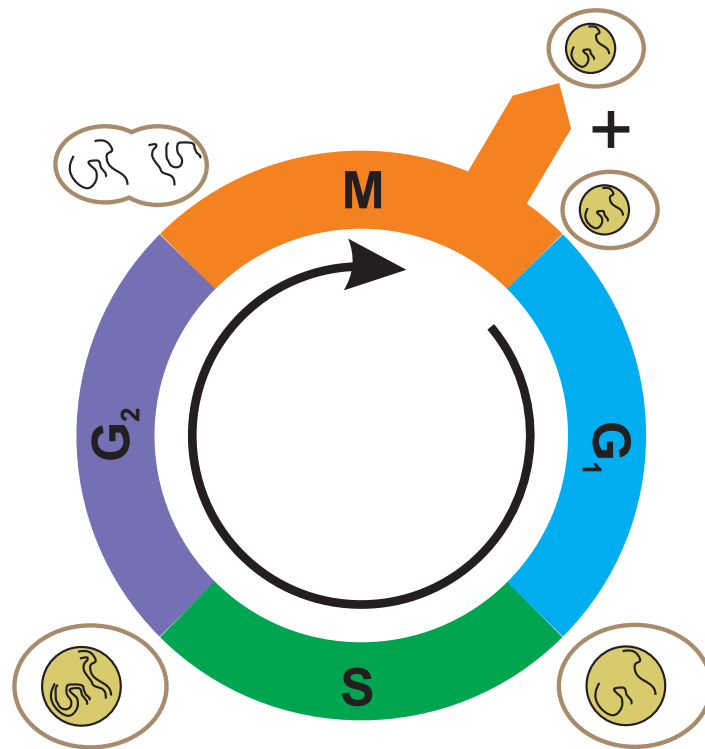
## 2.3 Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Da bei einem Doppelstrangbruch kein intakter Strang als Matrize für die Reparatur zur Verfügung steht, sind komplexere Reparaturmechanismen als für Einzelstrangbrüche vonnöten. Die Zelle kennt zwei verschiedene DSB-Reparaturwege: Die nicht-homologe Endenverknüpfung (NHEJ, engl: non-homologous end-joining) und die homologe Rekombination (HR).

Beim NHEJ werden die gebrochenen Enden wieder zusammengefügt und mittels DNA-Ligation verbunden [10, 11]. Dabei werden verlorene Basen nicht ersetzt, es kommt also evtl. zu Informationsverlust [11]. Dennoch bedeutet diese einfache Reparatur für die Zelle bzw. den Organismus in den meisten Fällen keine Beeinträchtigung [10].

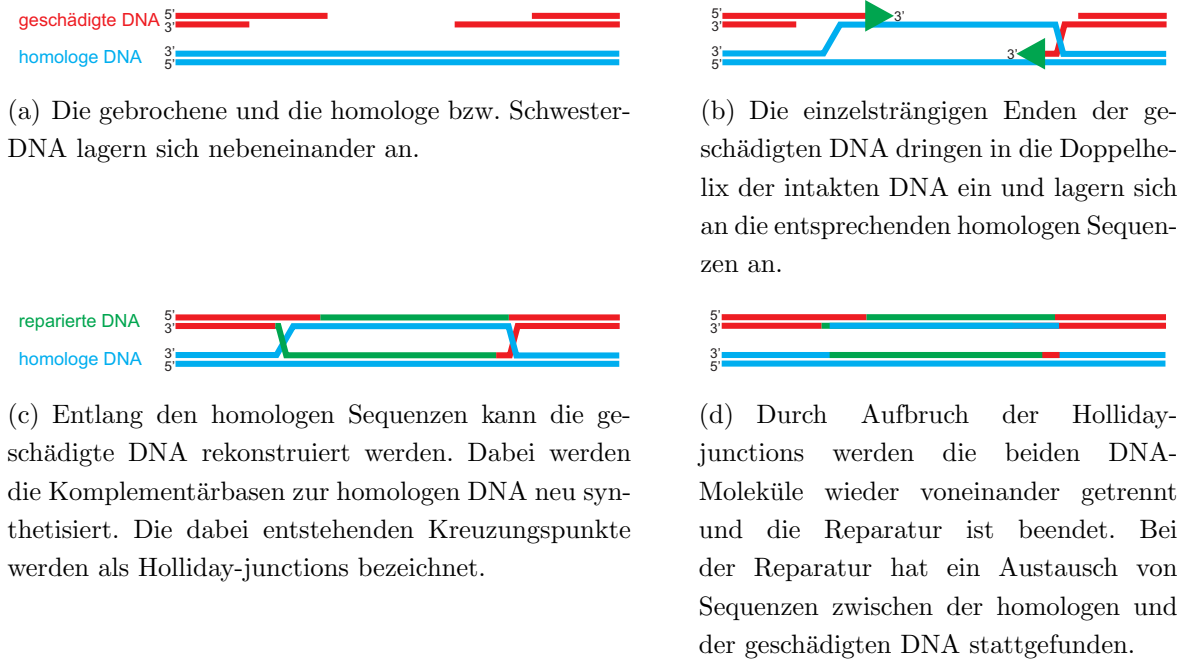
Eine deutlich aufwendigere Reparaturmethode stellt die homologe Rekombination dar (s. Abb. 2.4). Diese hat das Ziel, alle verlorene Informationen wiederherzustellen, indem DNA mit der gleichen Erbinformation als Vorlage zur Erneuerung





**Abbildung 2.3:** Der Zellzyklus:

Eine typische Säugetierzelle, hier schematisch mit Zellkern und zwei Chromosomen dargestellt, durchläuft im Schnitt alle 24 Stunden die vier Phasen des Zellzyklus [10]. In der  $G_1$ -Phase ( $G = \text{gap}$ , engl. Lücke) wächst die Zelle und verdoppelt ihre Masse. Verlaufen ebenfalls in der  $G_1$ -Phase durchgeführte Überprüfungen des eigenen Zustands und der Umgebung, sogenannte Checkpoints, positiv, geht die Zelle in die S-Phase ( $S = \text{Synthese}$ ) über, in der die DNA verdoppelt wird. In der folgenden  $G_2$ -Phase überprüft die Zelle, ob die DNA-Replikation in der S-Phase vollständig abgeschlossen wurde. Verlaufen auch diese Tests positiv, geht die Zelle in die M-Phase ( $M = \text{Mitose}$ ), in der die eigentliche Zellteilung stattfindet, über. Alle nicht zur M-Phase gehörenden Phasen werden auch als Interphase bezeichnet. Abweichend vom eben beschriebenen Verhalten besteht auch die Möglichkeit, dass die Zelle von der  $G_1$ -Phase in die  $G_0$ -Phase übergeht. In dieser Ruhephase findet über Wochen, Jahre oder gar dauerhaft keine Zellteilung mehr statt.



**Abbildung 2.4:** Das Prinzip der homologen Rekombination.

der verlorenen Basen verwendet wird. Tritt der Schaden in der späten S-, der G<sub>2</sub>- oder frühen M-Phase des Zellzyklus (s. Abb. 2.3) auf, also in Phasen, in denen die DNA schon repliziert wurde, dient die replizierte Schwester-DNA als Vorlage. In den anderen Zellzyklusphasen, in denen keine exakte Kopie der gebrochenen DNA vorhanden ist, müsste dazu die sogenannte homologe DNA verwendet werden. Diese bezeichnet die Erbinformation des gleichen Chromosoms des anderen Elternteils, welche zu jeder Zeit im Zellkern vorhanden ist.

Während die homologe Rekombination bei Bakterien und Hefen den üblichen Reparaturweg darstellt, überwiegt beim Menschen wie bei allen Säugern bei strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen – im Gegensatz zu Doppelstrangbrüchen, die durch Replikationsfehler entstehen [18] – das NHEJ [10]. Dies lässt sich damit erklären, dass in Hefe fast die gesamte DNA Sequenzen enthält, die Proteine codieren. Somit ist eine zuverlässige Reparatur mittels HR zu bevorzugen, um gefährliche Mutationen zu verhindern. Im Genom höherentwickelter Lebewesen ist der Anteil codierender Sequenzen deutlich geringer, sodass die Gefahr von Mutationen von Haus aus reduziert ist und die Vorteile einer schnelleren Reparatur mittels NHEJ offensichtlich überwiegen [10, 19].

Insbesondere in Zellzyklusphasen, in denen auf die DNA des homologen Chromosoms zurückgegriffen werden muss, ist die homologe Rekombination bei Säugern nahezu vollständig unterdrückt [11, 18]. Da mehrzellige Eukaryoten<sup>(2)</sup> einen großen Anteil

<sup>(2)</sup>Lebewesen mit Zellkern und Zellmembran.

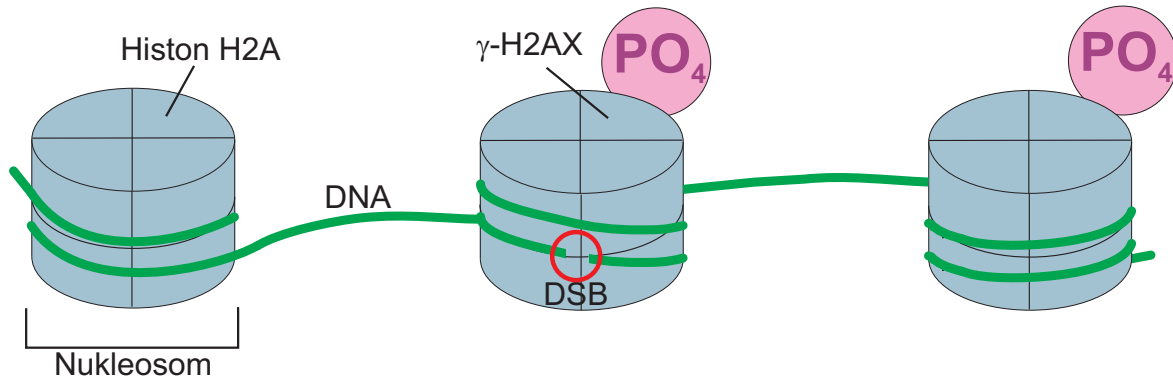
sich wiederholender DNA haben (beim Menschen ca. 40 %) [11], ist die Suche nach der homologen DNA mit Schwierigkeiten und Unsicherheiten verbunden, was einen Grund für die weitere Unterdrückung in diesen Zellzyklusphasen darstellen dürfte. Die Verwendung der Schwester-DNA gestaltet sich deutlich einfacher, da sich diese in direkter Nachbarschaft des Ursprungs-Chromosoms befindet (schematisch im Zellkern in Abb. 2.3 nach der S-Phase dargestellt). So haben in der späten S- und der G<sub>2</sub>-Phase beide Mechanismen einen signifikanten Anteil an der DSB-Reparatur [18].

Noch unklar ist, wie die Zelle entscheidet, welcher Reparaturweg eingeschlagen wird [11]. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Zelle immer zunächst die Reparatur mittels NHEJ versucht und nur im Falle des Scheiterns auf die homologe Rekombination zurückgreift [20, 21]. Damit diese These mit den experimentellen Beobachtungen verträglich ist, muss noch gefordert werden, dass bei mehrzelligen Eukaryoten während der G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>- und frühen S-Phase trotz erfolglosem Reparaturversuch mittels NHEJ die homologe Rekombination unterdrückt wird. Ein anderer Erklärungsversuch geht von NHEJ und HR als konkurrierenden Reparaturwegen aus. Dabei wird von einer Konkurrenz zwischen Ku-Proteinen, die sich an die Enden des DSB anlagern und NHEJ einleiten, und des Proteins Rad52 (s. a. Kap. 2.4.3), welches die homologe Rekombination einleitet, ausgegangen. Allerdings zeigten Experimente [22], dass sich Rad52 nicht wie die Ku-Proteine an die DNA-Enden sondern an einzelsträngige DNA (ssDNA, engl: single-stranded DNA) anlagert. Dies deutet nicht auf eine Konkurrenzsituation zwischen diesen beiden Proteinen hin. Auch andere Experimente lieferten einer Konkurrenz zwischen beiden Reparaturwegen widersprechende Ergebnisse [20].

## 2.4 Wichtige Reparaturproteine

An der zellulären Antwort auf Doppelstrangbrüche ist neben den erwähnten Ku-Proteinen und dem Rad52 eine große Anzahl weiterer Proteine beteiligt. Deren Aufgabenspektrum reicht von der Erkennung und Signalisierung von Doppelstrangbrüchen bis hin zur eigentlichen Reparatur. Dabei sind die genaue Funktion sowie die komplexen Abhängigkeiten voneinander bei vielen dieser Proteine noch nicht verstanden. Eine Auswahl solcher Reparaturfaktoren, denen eine besondere Bedeutung in den zellulären Abläufen zukommt und die häufig Gegenstand von Zellbestrahlungsexperimenten an SNAKE sind, soll im Folgenden kurz besprochen werden.

Eine Eigenschaft, die allen hier betrachteten Proteinen gemeinsam ist, stellt die Ausbildung von Protein-Clustern an den Schadensorten dar. Diese Proteinanlagerungen, die mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden sichtbar gemacht werden können (s. Kap. 3), werden als Foci bezeichnet.



**Abbildung 2.5:**  $\gamma$ -H2AX [8]: Die DNA ist in ihrer niedrigsten Faltungsebene um Histone gewickelt. Nach einem Doppelstrangbruch lagert sich an umgebende H2AX-Histone eine Phosphatgruppe an. So phosphoryliertes H2AX wird als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet.

### 2.4.1 $\gamma$ -H2AX – ein zuverlässiger Doppelstrangbruch-Marker

Das Doppelhelix-DNA-Molekül ist nicht zufällig im Zellkern verteilt, sondern folgt einer gewissen Ordnung mit mehreren Faltungsebenen. Ohne eine solche Ordnung wäre eine Zellteilung ohne unerwünschte DNA-Schäden nur schwer realisierbar.

Auf der untersten Faltungsebene spielen sogenannte Histone eine elementare Rolle. Dies sind relativ kleine Proteine (102–135 Aminosäuren [10]), die aufgrund ihres hohen Anteils an positiv geladenen Aminosäuren die negativ geladene DNA binden können. Diese Bindung geschieht in Form der in Abb. 2.5 skizzierten Perlenkettenstruktur. Dabei wickelt sich der DNA-Strang in 1,65 Windungen, was 146 Nukleotiden entspricht [10], um einen Histonkern, bestehend aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4, und bildet mit diesem ein sogenanntes Nucleosom mit einem Durchmesser von ca. 11 nm [10]. Zwischen den einzelnen Nucleosomen befindet sich die sogenannte Linker-DNA mit einer Länge von maximal 80 Nukleotiden. In ca. 10% der Fälle ist das Histon H2A durch die Isoform<sup>(3)</sup> H2AX ersetzt.

Tritt ein DNA-Doppelstrangbruch auf, werden die in Schadensnähe befindlichen H2AX-Histone an einer spezifischen Stelle phosphoryliert, es wird also eine Phosphatgruppe ( $\text{PO}_4$ ) angelagert [23]. Das Gebiet der Phosphorylierung erstreckt sich auf mehrere Megabasen um den Doppelstrangbruch [24, 25] und betrifft somit mehrere tausend H2AX-Moleküle [26]. Die phosphorylierten H2AX-Histone werden als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet. Die Phosphorylierung von H2AX zu  $\gamma$ -H2AX beginnt unmittelbar nach der Bestrahlung [25] und dient der Zelle vermutlich als Markierung der DSB-Orte. Da sie an allen Doppelstrangbrüchen auftritt, wird mittels Immunofluoreszenz (s. Kap. 3.2) sichtbargemachtes  $\gamma$ -H2AX als zuverlässiger Doppelstrangbruch-Marker eingesetzt [27].

<sup>(3)</sup>Eng verwandtes Protein, das sich oft nur in wenigen Aminosäuren unterscheidet.

Da es sich bei der Bildung von  $\gamma$ -H2AX nur um die Modifikation eines vorhandenen Proteins handelt, kann es in lebenden Zellen nicht durch Fluoreszenzproteine markiert und somit in Lebendzellexperimenten, wie sie Inhalt dieser Arbeit sind, nicht als Doppelstrangbruch-Marker verwendet werden.

### 2.4.2 Mdc1, 53BP1 und ATM – Signalkaskade für Zellzyklus-Checkpoints

Das Auftreten von Doppelstrangbrüchen erfordert eine Reihe von zellulären Reaktionen. Zu deren Veranlassung muss die Information über das Vorhandensein eines Schadens zunächst an die zuständigen Reparaturfaktoren weitergegeben werden. Diese Aufgabe übernehmen in höheren Eukaryoten sogenannte Protein-Kinasen [28]. Kinasen leiten Signale weiter, indem sie einen Phosphatrest von ATP (Adenosintriphosphat) auf andere Proteine übertragen und diese somit aktivieren. Eine Kinase, die eine Schlüsselrolle in der Zellantwort auf ionisierende Strahlung spielt, stellt das Protein ATM (ataxia-telangiectasia mutated) dar [24, 29]. ATM aktiviert zahlreiche Proteine, die für Zellzyklus-Checkpoints in  $G_1/S$ -, S-, und  $G_2/M$ -Phase verantwortlich sind [24]. Solche Checkpoints veranlassen eine geschädigte Zelle, in ihrer momentanen Phase des Zellzyklus zu verbleiben und sich nicht zu teilen bzw. DNA zu replizieren, bevor der Schaden repariert ist. Darüber hinaus aktiviert ATM auch für die Apoptose relevante Proteine und (teils indirekt) einige unmittelbar an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligte Proteine wie z. B. Rad51 (s. Kap. 2.4.3) [24].

Zwei der ATM-aktivierten Zellzyklus-Checkpoint-Faktoren sind die Proteine Mdc1 (auch als NFB1 bezeichnet [24]) und 53BP1 (Kurzform für „p53 binding protein 1“) [23, 29–31]. Dessen Relevanz für Zellzyklus-Checkpoints wird z. B. daraus ersichtlich, dass Zellen, deren 53BP1-Exprimierung unterdrückt wurde<sup>(4)</sup>, keinen zuverlässigen  $G_2$ -Arrest besitzen, sodass einige dieser Zellen trotz Strahlenschäden in Mitose gehen. Der Anteil der Mitosen ist jedoch geringer als in Zellen mit mutantem ATM [28].

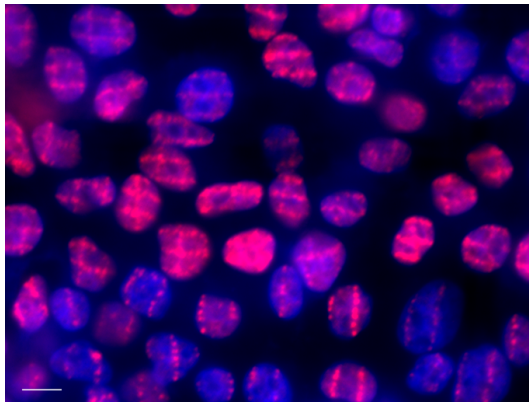
Sowohl Mdc1 als auch 53BP1 bilden Foci an Doppelstrangbrüchen, die sowohl untereinander [30] als auch mit denen des  $\gamma$ -H2AX kolokalisieren [23, 25, 28, 30, 32]. Beide Proteine interagieren mit  $\gamma$ -H2AX [28, 33]. In Zellen, die das Histon H2AX nicht aufweisen, können keine Mdc1-Foci beobachtet werden [30], während sich 53BP1 in solchen H2AX-defizienten Zellen zwar kurzfristig an die Schadensorte anlagert, jedoch keine dauerhafte Bindung eingeht [28]. Die Vermutung einer direkten Bindung des 53BP1 an  $\gamma$ -H2AX konnte jedoch widerlegt werden [34].

---

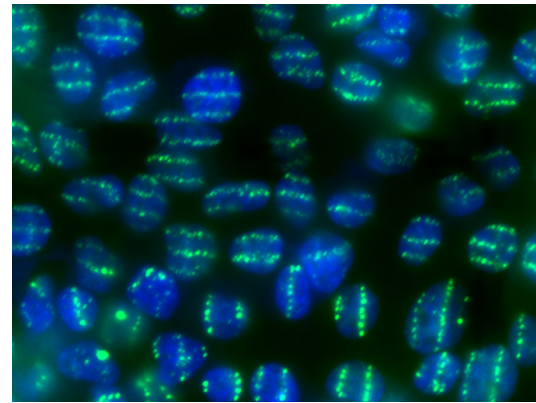
<sup>(4)</sup>Ein solches „Knock-Down“ von Proteinen stellt eine Standardmethode in der modernen Zellbiologie dar.

Einige Experimente ließen jedoch Zweifel daran aufkommen, dass Mdc1 und 53BP1 in der Signalkaskade ausschließlich „downstream“ von ATM angesiedelt sind, sondern lieferten Hinweise darauf, dass ATM selbst von Mdc1 und 53BP1 aktiviert wird [29, 30]. Dabei scheinen Mdc1 und 53BP1 zwei unterschiedliche, voneinander unabhängige Wege der ATM-Phosphorylierung darzustellen [29]. So hat die Unterdrückung von 53BP1 keine Auswirkungen auf die Aktivierung von ATM, führt aber zu einer vermehrten Anlagerung von Mdc1 an die Doppelstrangbrüche, welches offensichtlich das fehlende 53BP1 kompensieren kann [29].

So scheint eine Rolle von Mdc1 und 53BP1 sowohl up- als auch downstream von ATM am naheliegendsten [28]. Dabei würde ATM durch diese Proteine aktiviert, wobei jedoch auch eine Art Rückkopplung des ATM auf Mdc1 und 53BP1 vorhanden wäre.



(a)  $\gamma$ -H2AX-Foci zeigen das kreuzförmige Bestrahlungsmuster mit unten überstehender Zweitbestrahlung.



(b) 53BP1 zeigt im Kreuzbereich fast ausschließlich Foci an den waagrechten Erstbestrahlungsorten. An der senkrechten Zweitbestrahlung sind nur im überstehenden – also nicht vorbestrahlten – Bereich Foci zu erkennen.

**Abbildung 2.6:** 53BP1-Konkurrenzeffekt nach kreuzförmiger Bestrahlung. Zwischen waagrechter Erst- und senkrechter Zweitbestrahlung liegen 45 min, zwischen Zweitbestrahlung und Fixieren der Zellen 30 min. Maßstabsbalken 10  $\mu$ m.

Ein das 53BP1 betreffender Effekt, der an SNAKE erstmals beobachtet wurde, soll hier noch erwähnt werden. Dieser tritt bei sequentieller Bestrahlung von Zellproben auf. Hierbei bildet 53BP1 Foci an den Schäden einer ersten Bestrahlung. Folgt nun im Abstand einer halben bis ganzen Stunde eine zweite Bestrahlung, findet an den durch diese Bestrahlung erzeugten Schadensorten nur eine stark verminderte Anlagerung von 53BP1 statt. Dieser Effekt kann mittels Ionenmikrobestrahlung untersucht werden, indem die erste Bestrahlung in einem waagrechten und die zweite in einem senkrechten Linienmuster appliziert wird (s. Abb. 2.6). Dieser „Konkurrenzeffekt“ scheint z. B. auch

das Reparaturprotein Rad51 (s. nächsten Abschnitt), nicht jedoch Mdc1 zu betreffen. Eine ausführliche Diskussion des Effekts, quantitative Auswertungen sowie Abhängigkeiten von der Zeit zwischen den Bestrahlungen sowie zwischen zweiter Bestrahlung und Fixierung der Zellen finden sich in [7, 9, 35–37].

### 2.4.3 Rad51, Rad52 und RPA – Schlüsselrollen bei der homologen Rekombination

An die einzelsträngigen, überstehenden Enden der DNA an einem Doppelstrangbruch (ssDNA) lagert sich das Protein RPA (replication protein A) an. Dieses entfernt sekundäre Strukturen der DNA und verhindert, dass sich die überstehende ssDNA mit sich selbst verbindet, also z. B. eine Art Schleife bildet.

RPA unterbindet jedoch auch den für die homologe Rekombination entscheidenden Austausch von DNA-Strängen mit der Schwester-DNA [38, 39]. Treibende Kraft dieses Austauschs ist das Protein Rad51, dem somit die zentrale Rolle bei der homologen Rekombination zukommt [19].

Eine Mittlerrolle zwischen den ssDNA-Enden und dem Rad51 spielt das Protein Rad52 [40], welches sowohl mit dem RPA-ssDNA-Komplex als auch mit Rad51 wechselwirkt, kaum jedoch mit freiem RPA [39]. Mit der RPA-ssDNA bildet das Rad52 den Rad52-RPA-ssDNA-Komplex, der für die Anlagerung von Rad51 an die ssDNA sorgt [39, 40]. Die Rad52-Konzentration in menschlichen Zellen ist über den Zellzyklus nicht konstant. In der G<sub>1</sub>-Phase, in der homologe Rekombination unterdrückt ist, ist nur eine sehr geringe Konzentration vorhanden, die mit der S-Phase stetig ansteigt, bis sie in der G<sub>2</sub>-Phase ihr Maximum erreicht [41].

Auch das Protein Rad51 zeigt Zellzyklusabhängigkeiten: Focibildung an strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen kann nur in Zellen, die in der S- und in der G<sub>2</sub>-Phase geschädigt wurden, beobachtet werden [42]. Rad51 bildet auch spontan in der S- und G<sub>2</sub>-Phase Foci, wobei allerdings noch nicht klar ist, ob die spontanen Foci eine Anlagerung an nicht strahleninduzierten DSBs oder ein Rad51-Reservoir darstellen [42]. Nach DSB-Induktion durch ionisierende Strahlung kann eine Umlagerung der vorhandenen Foci zu den Orten der DNA-Schädigung beobachtet werden.

Der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Konkurrenzeffekt konnte an SNAKE auch bei dem Protein Rad51 beobachtet werden.





# Kapitel 3

## Mikroskopische Untersuchung von Reparaturproteinen

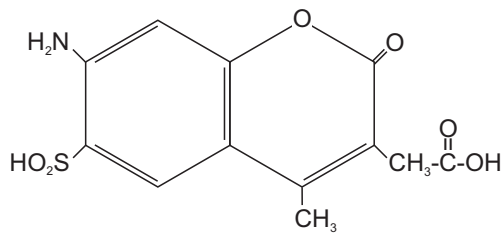
Die räumliche Verteilung von Proteinen wie z. B. den im letzten Kapitel vorgestellten Reparaturproteinen im Zellkern wird häufig mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wird das zu untersuchende Protein mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) markiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop spiegelt dann die Intensität des Fluoreszenzsignals die relative Proteinkonzentration an der entsprechenden Stelle wider. Bevor in Kapitel 4 die im Rahmen dieser Arbeit installierte Mikroskopieumgebung detailliert beschrieben wird, sollen hier die nötigen physikalischen Grundlagen diskutiert werden. Dazu werden zunächst einige Eigenschaften der Fluorochrome erläutert. Im Anschluss werden die Techniken zur Fluoreszenzmarkierung dargestellt sowie Aufbau und Funktionsweise eines Fluoreszenzmikroskops näher betrachtet.

### 3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

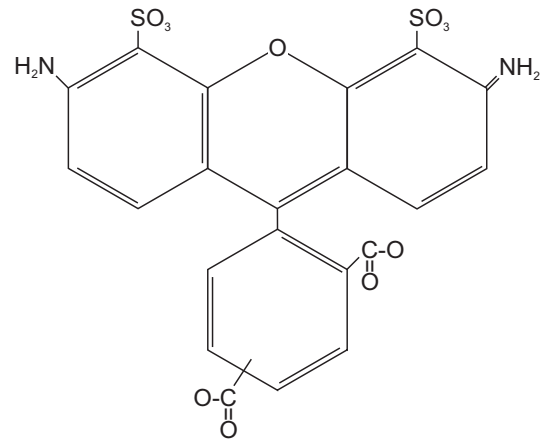
Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Regel organische Moleküle mit mehreren aromatischen Ringsystemen und deshalb delokalisierten  $\pi$ -Elektronen [43] (s. Abb 3.1). Deren Wellenfunktion ist nicht an ein einzelnes Kohlenstoffatom gebunden, sondern über den gesamten aromatischen Ring ausgedehnt [44]. Bei Beleuchtung kann das Molekül, welches auch als Fluorophor bezeichnet wird, durch Absorption eines Photons vom Grundzustand  $S_0$  in einen angeregten Zustand übergehen (s. Abb. 3.2). Dabei wird ein Elektron in ein energetisch höher liegendes Orbital transferiert. Dies geht meistens mit einer Vibrations- oder Rotationsanregung des Moleküls einher. Die Lebensdauer des angeregten Zustands liegt im Nanosekundenbereich [45]. Danach geht das System unter Aussendung eines Fluoreszenz-Photons wieder in den Grundzustand über. Hierbei geht jedoch nur die Energie der elektronischen Anregung in das Photon über.

Farbstoff	$\lambda_{ex}$ [nm]	$\lambda_{em}$ [nm]
DAPI	358	463
Alexa 488	493	520
FITC	495	517
Cy 3	549	562
Cy 3,5	578	591
Texas Red	596	613
Cy5	646	664
Fluoreszenzprotein	$\lambda_{ex}$ [nm]	$\lambda_{em}$ [nm]
CFP	434	474
eGFP	488	509
GFP	489	509
eYFP	514	526
mRFP	585	608

**Tabelle 3.1:** Absorptions- und Emissionsmaxima einer kleinen Auswahl der über 250 verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffe und -proteine. Da die Werte u. a. vom pH-Wert abhängen, können sie je nach Quelle (hier: <http://www.zeiss.de>) um mehrere Prozent variieren.



(a) Farbstoff Alexa 350 mit einem Maximum des Anregungsspektrums von 343 nm und des Emissionsspektrums von 441 nm.



(b) Im Farbstoff Alexa 488 sind mehr konjugierte Doppelbindungen enthalten, Anregungs- und Emissionswellenlänge steigen auf 493 nm bzw. 520 nm.

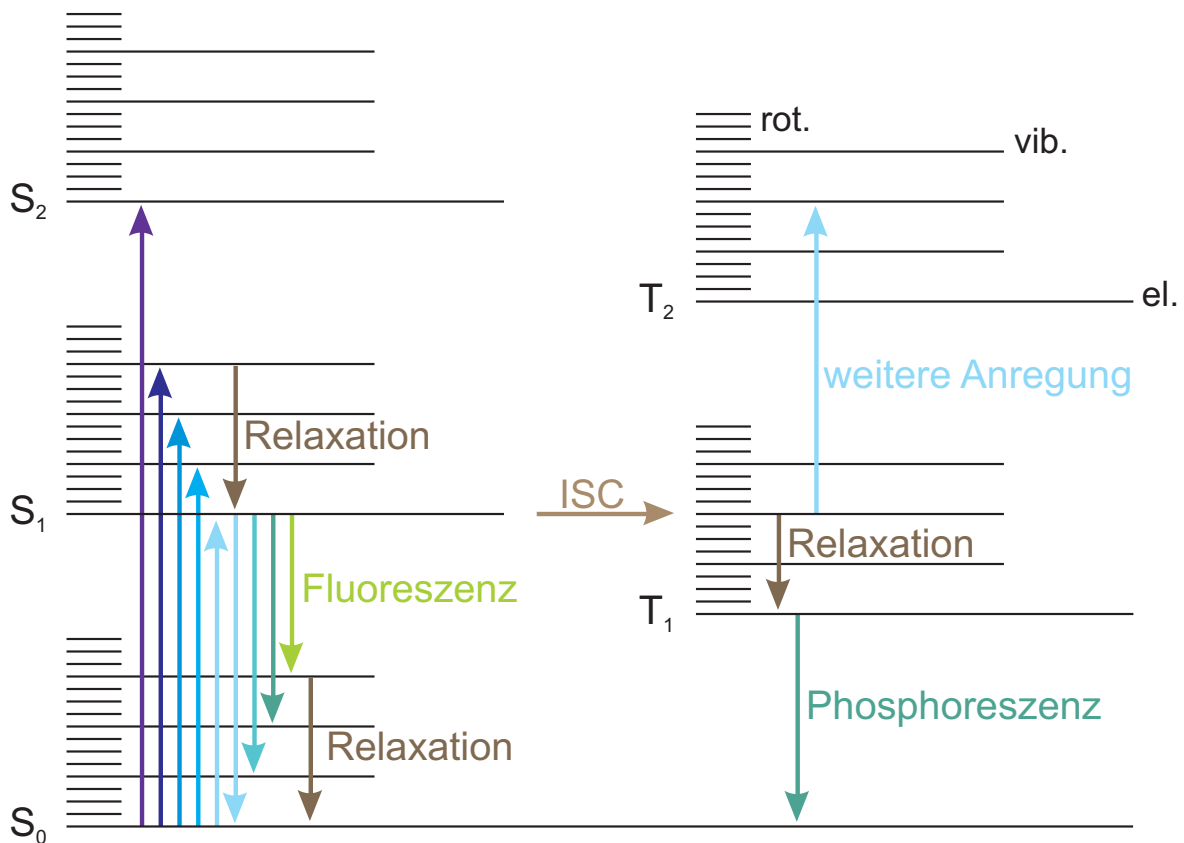
**Abbildung 3.1:** Typische Strukturen von Fluoreszenzfarbstoffen: In den aromatischen Ringssystemen wechseln sich Doppel- und Einfachbindungen ab, man spricht von konjugierten Doppelbindungen. Die Zahl dieser Bindungen bestimmt Anregungs- und Emissionswellenlänge des Farbstoffes sowie seine Quanteneffizienz. Eine größere Zahl an Bindungen bedeutet hierbei längere Wellenlängen und eine höhere Effizienz.

Die Relaxation der Schwingungs- bzw. Rotationsanregung erfolgt strahlungslos. Dies hat zur Folge, dass das Fluoreszenzlicht eine längere Wellenlänge als das Anregungslicht aufweist. Dieser als Stokes Shift bezeichnete Wellenlängenunterschied ermöglicht es bei der Mikroskopie, das emittierte Fluoreszenzlicht von reflektiertem Anregungslicht über optische Filter zu trennen. Maxima der Anregungs- und Emissionsspektren von an SNAKE häufig genutzten Farbstoffen und Fluoreszenzproteinen finden sich in Tabelle 3.1.

Neben den eben beschriebenen Übergängen zwischen Singulettzuständen kann das angeregte Fluorophor durch das sogenannte Intersystem Crossing in einen Triplettzustand übergehen [45, 46]. Diese sind sehr langlebig (im Bereich von Mikrosekunden), da eine Abregung in den Singulett-Grundzustand einen verbotenen Übergang darstellt. Dieser kann entweder strahlungslos oder unter Emission von Licht erfolgen. Aufgrund der langen Zeitspanne zwischen Absorption und Emission spricht man nicht mehr von Fluoreszenz sondern von Phosphoreszenz. Während das Molekül im Triplettzustand verbleibt, kann es durch weitere Photonen in höherenergetische Triplettzustände angeregt werden. Diese weisen noch längere Lebensdauern auf [45]. Solange sich das Fluorophor im Triplettzustand befindet, steht es nicht für die Fluoreszenzmikroskopie zur Verfügung, was das Fluoreszenzsignal der Probe abschwächt.

Ein großes Problem für die Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch, dass die Triplettzustände chemisch sehr reaktiv sind. Solche Reaktionen können zu einer irreversiblen Zerstörung des Moleküls führen. Man spricht von Ausbleichen bzw. Bleaching. Eine wichtige Rolle spielt dabei in der Probe vorhandener molekularer Sauerstoff. Ein im angeregten Triplettzustand befindliches Fluorophor kann seine Anregungsenergie an ein Sauerstoffmolekül abgeben. Dessen Grundzustand ist ein Triplettzustand, durch den Energieübertrag geht es in einen angeregten Singulettzustand über. Der Triplettzustand des Fluorophors ist somit gelöscht, was für die Fluoreszenzmikroskopie als positiv zu bewerten ist [46]. Allerdings ist Sauerstoff im Singulettzustand sehr reaktiv und kann eine Reihe von chemischen Verbindungen mit organischen Molekülen eingehen [45]. Solche Reaktionen können ihrerseits wiederum Fluorophore verändern, was zum Ausbleichen führt. Des Weiteren kann Sauerstoff im Singulettzustand in lebenden Zellen durch chemische Reaktionen mit organischen Molekülen die Zellen so weit schädigen, dass sie absterben. Man spricht von Phototoxizität. Die photoinduzierte Schädigung ist bei Untersuchungen an lebenden Zellen ein ernstes Problem und nicht ausschließlich auf den eben beschriebenen Mechanismus zurückzuführen.

Im Mittel können Fluoreszenzfarbstoffe 10 000–40 000 An- und Abregungszyklen durchlaufen, bis sie zerstört sind [45]. Dieser Wert steht auch in Zusammenhang mit der Quanteneffizienz des jeweiligen Farbstoffes. Denn je mehr Anregungen zur gewollten



**Abbildung 3.2:** Physik der Fluoreszenzfarbstoffe: Das Farbstoff-Molekül wird durch Lichtabsorption vom Grundzustand  $S_0$  in einen elektrisch angeregten Zustand (z. B.  $S_1$ ) gebracht (nach oben gerichtete Pfeile). Die Energie des anregenden Photons muss mindestens der Energiedifferenz zwischen  $S_0$  und  $S_1$  entsprechen. Ist sie etwas höher, werden innerhalb des  $S_1$ -Zustandes höhere Energieniveaus durch Rotations- und Vibrationsanregungen des Moleküls (mit „rot.“ bzw. „vib.“ bezeichnet) besetzt. Diese Anregungen relaxieren strahlungslos. Beim Übergang vom niedrigsten Energieniveau innerhalb des  $S_1$ -Zustands in den  $S_0$ -Zustand wird ein als Fluoreszenzlicht bezeichnetes Photon emittiert. Dessen Wellenlänge ist eine farbstoffspezifische Größe und liegt bei für die Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Fluorophoren im sichtbaren Spektralbereich. Da sich das Molekül nach der Emission des Fluoreszenzphotons nicht zwingend im energetisch niedrigsten Zustand befindet, sondern auch hier Vibrations- oder Rotationsanregungen möglich sind, hat das Fluoreszenzlicht keine scharf definierte Wellenlänge sondern überdeckt ein Spektralband der Größenordnung 50 nm FWHM. Neben dem beschriebenen „gewollten“ Verhalten kann anstelle der strahlenden Abregung vom  $S_1$ -Zustand auch ein eigentlich verbotener Übergang in einen gleichenergetischen Triplettzustand (z. B.  $T_1$ ) erfolgen (Intersystem Crossing, hier mit „ISC“ bezeichnet). Auch hier tritt zunächst Relaxation der Vibrations- und Rotations-Niveaus auf, bevor ein strahlender Übergang zu  $S_0$  erfolgt. Da dieser ebenfalls verboten ist, ist die Lebensdauer des Triplett-Zustands deutlich höher als die der angeregten Singulettzustände wie  $S_1$ , sodass hier nicht mehr von Fluoreszenz sondern von Phosphoreszenz die Rede ist. Durch Absorption weiterer Photonen ist auch eine Anregung in noch höhere Triplettzustände möglich.

Abregung über das Aussenden eines Fluoreszenzphotons führen, desto seltener kommen schädigende Tripletzustände vor. Gute Farbstoffe haben eine Quantenausbeute von ca. 90%, das Fluoreszenzprotein GFP (s. Abschnitt 3.3) erreicht 80% [45]. Längere Wellenlängen weisen meist eine höhere Quanteneffizienz sowie geringeres Bleichen auf (vgl. Abb. 3.1). Unabhängig von der Wellenlänge bieten moderne Farbstoffe wie Alexa eine mehrfach höhere Photostabilität als herkömmliche Farbstoffe wie FITC, Rhodamin oder Texas Red [45].

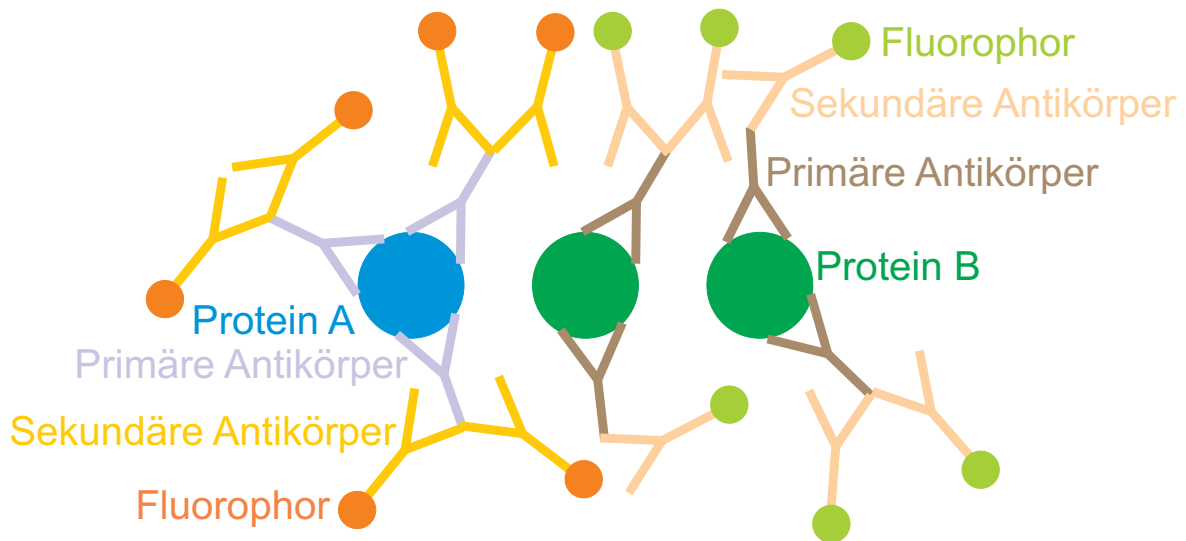
Zur Markierung von Proteinen mit Fluorophoren gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Methoden. Zum einen die Immunofluoreszenz an fixierten, also abgetöteten Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, zum anderen die Markierung mittels direkt an das interessierende Protein gekoppelten Fluoreszenzproteinen wie dem GFP (green fluorescent protein) in der lebenden Zelle. Letztere macht Lebendzelleexperimente, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt werden, erst möglich. Beide Methoden sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

## 3.2 Immunofluoreszenz

Die Immunofluoreszenzmethode (auch Immunfluoreszenz genannt) zum Sichtbarmachen von Proteinverteilungen erfordert ein Fixieren der Zellen, sie werden also abgetötet. Dieser Vorgang sollte die Morphologie möglichst nicht oder nur wenig verändern, sodass das Präparat den Zustand der Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung konserviert. Paraformaldehyd erfüllt diese Anforderung und wird bei den an SNAKE durchgeführten Zelleexperimenten i. d. R. zum Fixieren verwendet [47]. Nach der Fixierung werden in einer Reihe von biochemischen Prozessen die zu untersuchenden Reparaturproteine angefärbt.

Bei der sogenannten direkten Immunofluoreszenz werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper in die Zelle eingebracht. Um diesen Vorgang zu ermöglichen, wird die Zellmembran mittels des Tensids Triton permeabilisiert. Die kommerziell erhältlichen Antikörper wurden daraufhin entwickelt, spezifisch an das zu untersuchende Protein (POI, protein of interest) zu binden. Zur Gewinnung der Antikörper wird das POI einem Tier einer bestimmten Spezies, oft Maus oder Kaninchen, gespritzt und dann die vom Immunsystem des Tieres gebildeten Antikörper isoliert.

Bei Zelleexperimenten an SNAKE wird die indirekte Immunofluoreszenz zur Proteinmarkierung verwendet. Dabei sind nicht die an das POI bindenden primären Antikörper mit Fluorophoren versehen sondern sekundäre Antikörper, die ihrerseits an die primären binden (s. Abb. 3.3). Diese Bindung geschieht an der Region des primären Antikörpers, die spezifisch für die Tierart ist, aus der der Antikörper isoliert wurde. Der

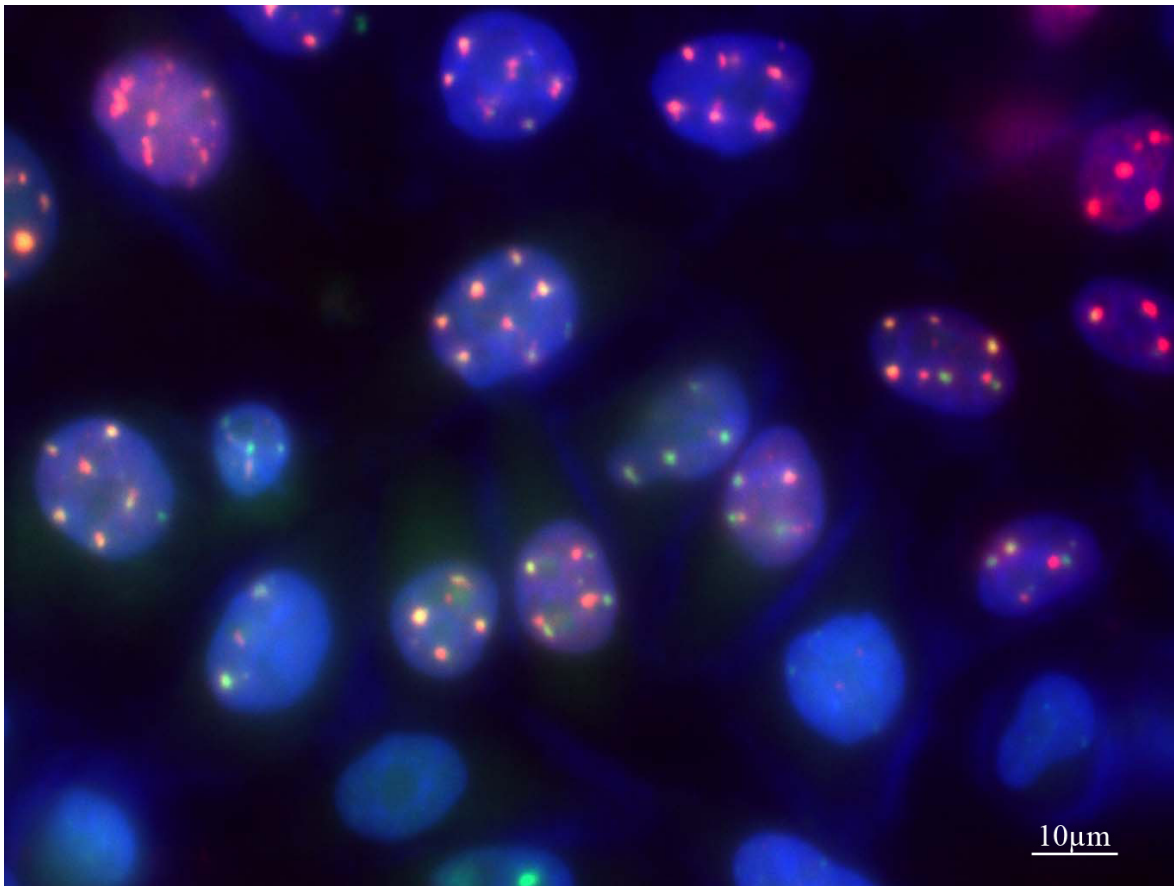


**Abbildung 3.3:** Bei der indirekten Immunfluoreszenz binden proteinspezifische primäre Antikörper, welche z. B. aus einer Maus gewonnen wurden, an das zu markierende Protein. Sekundäre Antikörper, die in diesem Fall an Maus-Antikörper binden, sind mit Fluorophoren versehen und zeigen so unter dem Fluoreszenzmikroskop den Ort des markierten Proteins. Soll nun ein weiteres Protein mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, wird dieses mit einem primären Antikörper aus einer anderen Spezies (z. B. Kaninchen) markiert. Zur Farbmarkierung kommt nun ein kaninchenspezifischer sekundärer Antikörper mit dem gewünschten Fluorophor zum Einsatz.

zweistufige Prozess der indirekten Immunfluoreszenz hat zwei Vorteile: Nicht für jedes zu untersuchende Protein muss ein eigener Fluoreszenzantikörper entwickelt werden, sondern nur für die primären Antikörper jeder Spezies. Des Weiteren ergibt sich durch die Tatsache, dass mehrere sekundäre Antikörper an einen primären binden können, eine Signalverstärkung. Eine mögliche Verwendung von tertiären Antikörpern, also das Einbringen eines weiteren Antikörpers zwischen primären und fluoreszierendem Antikörper, kann diesen Effekt noch verstärken.

Um die gesamten Kerne der fixierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, können diese z. B. mittels des direkt an die DNA bindenden blau emittierenden Farbstoffes DAPI markiert werden.

Abb. 3.4 zeigt die Mikroskopaufnahme einer fixierten Zellprobe, in der sowohl der Doppelstrangbruchmarker  $\gamma$ -H2AX (rot) als auch das Protein 53BP1 (grün) mittels Immunfluoreszenz markiert wurden. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Deutlich erkennbar ist die Focibildung beider Proteine an den durch Ionenmikrobestrahlung im  $5\ \mu\text{m}$ -Raster applizierten DNA-Schäden.



**Abbildung 3.4:** Mittels Immunofluoreszenz gefärbte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Blau: DAPI-gefärbte Zellkerne, rot: mit dem Farbstoff Cy3 gefärbtes  $\gamma$ -H2AX, grün: FITC-gefärbtes 53BP1. Die Probe wurde 6 h nach Bestrahlung mit 100 MeV Sauerstoff-Ionen fixiert. Eine Anlagerung beider Reparaturfaktoren an die matrixförmig applizierten Ionen-treffer sowie eine weitestgehende Kolokalisierung ist erkennbar. Dabei erscheint das aus rot und grün überlagerte Signal gelblich.

### 3.3 Markierung mittels Fluoreszenzproteinen

Die eben beschriebene Immunofluoreszenzmethode, die lange Zeit die einzige Möglichkeit zur fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung von Proteinen darstellte, hat durch die Notwendigkeit des Fixierens einen großen Nachteil: Jede Probe stellt eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Fixierung dar. Somit sind dynamische Vorgänge nicht direkt einer Untersuchung zugänglich. Sie können nur über statistische Auswertungen mit mehreren Proben mit unterschiedlichen Zeiten zwischen dem einen Vorgang einleitenden Ereignis (z. B. Bestrahlung) und Fixierung erfasst werden. Dabei kann nur mit Mittelwerten gearbeitet werden, individuelle Eigenschaften einzelner Zellen können nicht untersucht werden.

Dieser Zustand änderte sich, als in der Quallenart *Aequorea victoria* ein Gen entdeckt wurde, das ein natürlich fluoreszierendes Protein codiert, und dieses in den 90er Jahren erstmals zur Markierung anderer Proteine in lebenden Zellen verwendet werden konnte. Dieses GFP (green fluorescent protein) genannte Protein besitzt ein Fluorophor, welches analog zu den schon besprochenen Farbstoffen eine aromatische Ringstruktur aufweist [48], sodass die in Abschnitt 3.1 betrachteten physikalischen Zusammenhänge auch hier gelten.

Das Maximum des Anregungsspektrums von GFP liegt bei 475 nm, das Emissionsmaximum bei 503 nm [48]. Das Fluorophor des GFP befindet sich in der Mitte des fassförmigen Proteins. Diese Lage kommt dem Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie zugute, da das Fluorophor somit von Radikalen und molekularem Sauerstoff etwas abgeschirmt ist, was das Ausbleichen vermindert (vgl. Kap. 3.1).

Durch gezielte Mutationen konnten Varianten des GFP mit höherer Fluoreszenzleistung (eGFP, enhanced GFP) sowie anderen Anregungs- und Emissionswellenlängen wie das gelbe YFP und das blaue CFP geschaffen werden. Durch die Entdeckung ähnlicher Proteine in Korallen konnte das Spektrum in den roten Bereich erweitert werden [10]. Eine Weiterentwicklung des roten Korallenproteins DsRed stellt das auch an SNAKE genutzte mRFP (monomeric red fluorescent protein) dar [49].

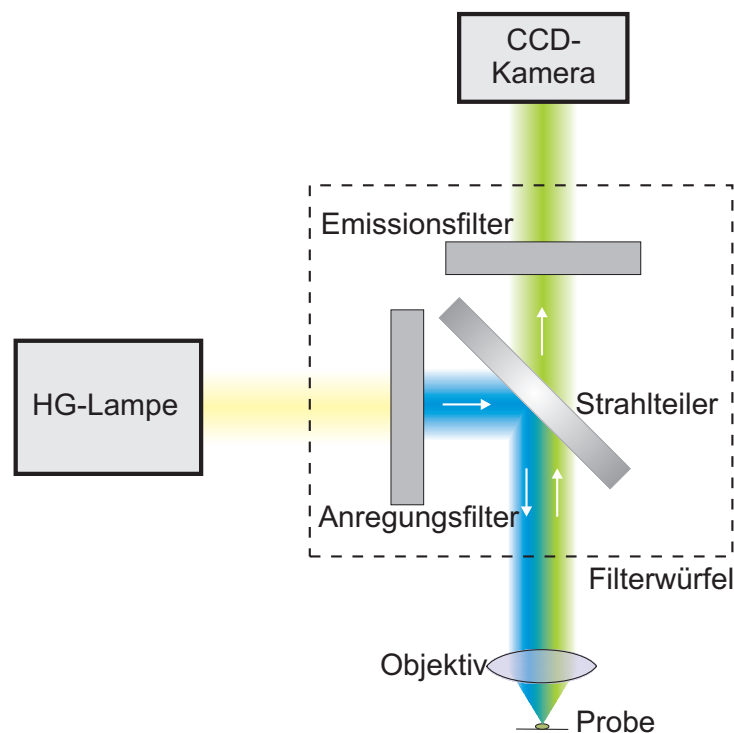
Um das in der Quallenart entdeckte GFP zur Markierung eines POI verwenden zu können, wird das GFP-Gen zusammen mit der das POI codierenden DNA-Sequenz in ein Plasmid eingebracht, sodass ein sogenanntes Fusionsgen aus POI und GFP entsteht. Ein Plasmid ist ein kleines ringförmiges DNA-Molekül, das in Zellen eingebracht werden kann (Transfektion). Man spricht dabei auch von einem Plasmidvektor (im Unterschied zu z. B. viralen Vektoren, mit denen sich ebenfalls fremdes Erbgut in eine Zelle bringen lässt). Der Plasmidvektor enthält oft auch ein Gen für Antibiotika-Resistenz, sodass bei Zugabe von Antibiotika in die Nährlösung nur Zellen überleben, bei denen die Transfektion erfolgreich war [50]. Bei der Zellteilung geht die Information des Plasmidrings in die Tochterzelle über, und somit exprimiert im Idealfall die gesamte von der Ursprungszelle abstammende Zellkolonie zusätzlich zum ohnehin in der Zelle endogen vorhandenen POI auch noch ein Hybridprotein, bei dem das GFP an das POI fusioniert ist. Dass sich dieses funktionell oft genauso verhält wie das ursprüngliche POI, kann in Zellen nachgewiesen werden, in denen die Expression des „natürlichen“ POI unterdrückt ist und das GFP-markierte Protein die Aufgaben des POI erfolgreich übernimmt [10].



## 3.4 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Im Folgenden soll allgemein auf die Grundlagen der Mikroskopie fluoreszenzmarkierter Proben eingegangen werden. Dabei stehen für den im Rahmen dieser Arbeit installierten Mikroskopaufbau relevante Themen im Vordergrund, sodass z. B. das weitläufige Feld Linsenfehler und deren Korrektur, die Bestandteil des Namens kommerziell erhältlicher Objektive ist, ausgespart wurde. Hierfür sei auf gängige Lehrbücher der Optik [51–53], auf [54] sowie auf die sehr umfangreiche Artikelsammlung zu Thema Mikroskopie unter <http://micro.magnet.fsu.edu/primer> verwiesen.

### 3.4.1 Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops



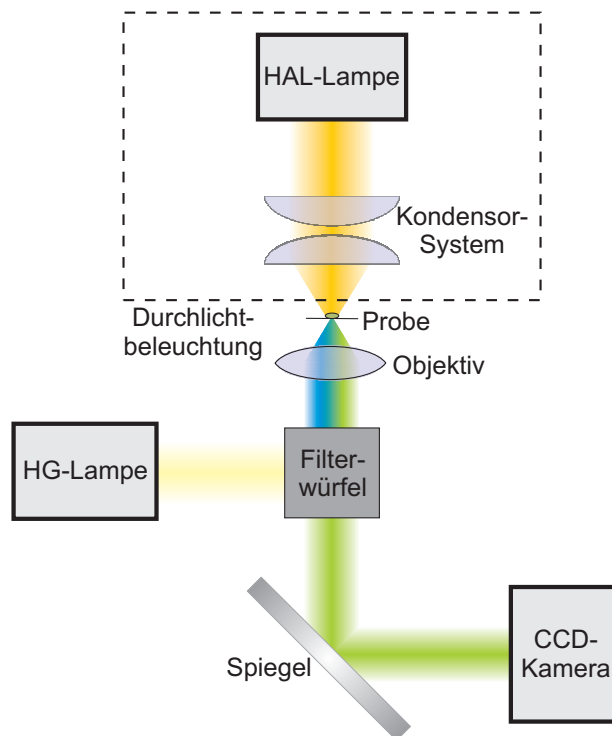
**Abbildung 3.5:** Strahlengang eines Epifluoreszenzmikroskops. Das durch einen Bandpassfilter und einen dichroitischen Teilerspiegel auf die Anregungswellenlänge des zu untersuchenden Farbstoffs angepasste Licht beleuchtet die Probe durch das Objektiv. Das von der Probe emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv aufgenommen und über den für diesen Spektralbereich transparenten Strahlteiler und einen Emissionsfilter auf eine CCD-Kamera abgebildet. Die beiden Bandpassfilter und der Teilerspiegel sind häufig gemeinsam in einem Filterwürfel-Modul untergebracht.

Abb. 3.5 zeigt schematisch den Strahlengang eines Epifluoreszenzmikroskops. Bei diesem am häufigsten zum Einsatz kommenden Typ des Fluoreszenzmikroskops wird

die Probe durch das Objektiv beleuchtet, man spricht von Aufsichtbeleuchtung. Dabei passiert das meist von einer Weißlicht-Beleuchtungsquelle kommende Licht einen als Anregungsfilter bezeichneten schmalbandigen Bandpassfilter, der nur den für die Anregung des jeweiligen Farbstoffes nötigen Bereich des Spektrums passieren lässt. Für Anregungsfilter typische Bandbreiten liegen zwischen 10 und 50 nm. Somit wird die Anregung anderer in der Probe vorhandener Farbstoffe unterdrückt. Ein dichroitischer Teilerspiegel lenkt den Strahl durch das Objektiv des Mikroskops auf die Probe. Dort regt das Licht die Fluorochrome an. Das von der Probe emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht gelangt über das Objektiv wieder auf den Teilerspiegel, der diesen Spektralbereich jedoch nicht mehr reflektiert sondern passieren lässt. Ein auf das Spektrum des Fluoreszenzlichts angepasster zweiter Bandpassfilter filtert noch vorhandene Streulichtanteile oder das Fluoreszenzsignal anderer, trotz Anregungsfilter angeregter Farbstoffe heraus. Vom Emissionsfilter gelangt das Signal über weitere Optiken im Mikroskop entweder zum Okular oder auf eine CCD-Kamera. Diese ist bei aufrechten Mikroskopen wie dem in Abb. 3.5 gezeigten typischerweise oben am Mikroskop in der Nähe des Okulars angebracht. Bei inversen Mikroskopen (s. Abb. 3.6) kann sich der Kameraanschluss seitlich, vorne oder an der Bodenplatte des Mikroskops befinden. Man spricht entsprechend von Side-, Front-, und Baseport. Letzterer hat den Vorteil, dass auf den in Abb. 3.6 eingezeichneten Ablenkspiegel verzichtet werden kann. Jedoch muss die Stellfläche des Mikroskops eine entsprechende Aussparung für die Kamera aufweisen.

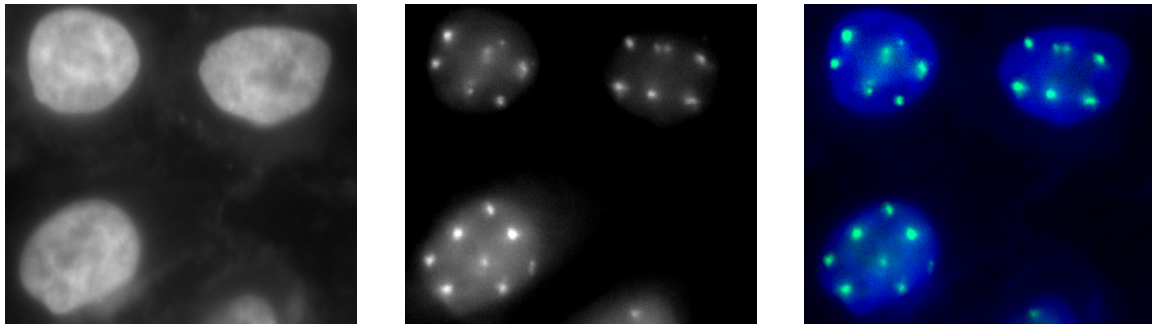
Als Kamera finden in der Regel Schwarz-Weiß-Modelle Verwendung, da diese eine höhere Quanteneffizienz und ein im Infrarotbereich erweitertes Spektrum (typischer Wert: 20% der maximalen Empfindlichkeit bei 900 nm [55]) aufweisen. Bei Farbkameras hingegen wird das Spektrum bei 700 nm von einem steilflankigen Sperrfilter beschnitten. Im Vergleich zu Single Chip Farbkameras bieten S/W-Kameras aufgrund der fehlenden Farbfiltermaske auch eine gesteigerte Ortsauflösung [55]. Die fehlende Farbinformation der Kamera kann hingegen kompensiert werden, da diese schon in der Kenntnis des verwendeten Emissionsfilters enthalten ist und mittels Bildbearbeitungssoftware nachträglich in die Bilddaten eingefügt werden kann (s. Abb. 3.7). Auch Abb. 3.4 ist solch eine Überlagerung von Einzelkanälen.

Meistens sind Anregungs- und Emissionsfilter sowie Teilerspiegel in einem Modul zusammengefasst. Da ein Mikroskop in der Regel mehrere solcher Filterwürfel in linear oder revolverförmig angeordneten Einschüben aufnehmen kann, ist insbesondere bei motorisierten Geräten ein schnelles Umschalten zwischen verschiedenen Farbstoffen gewährleistet. Filterwürfel werden für alle gängigen Farbstoffe als Einheit verkauft. Bei der Filterwahl sollte jedoch der geplante Einsatzbereich berücksichtigt werden: Enthalt-



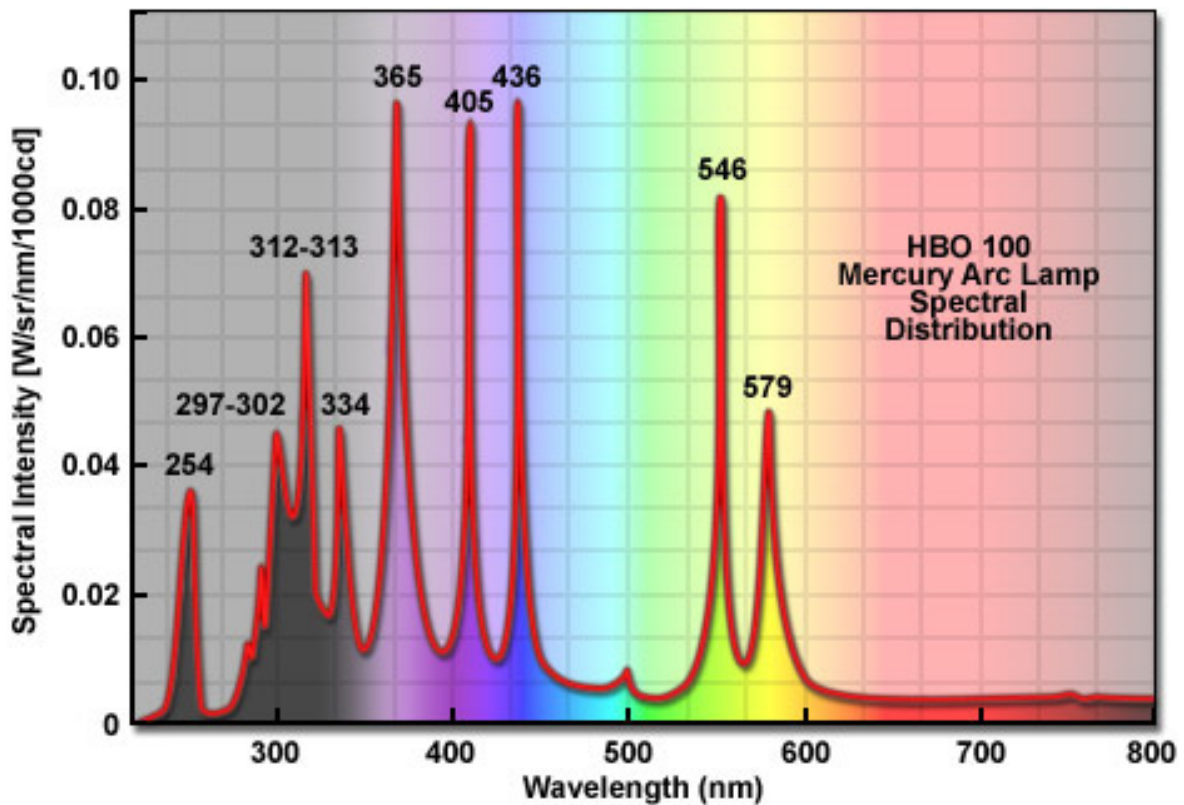
**Abbildung 3.6:** Beim inversen Mikroskop befindet sich das Objektiv unterhalb der Probe, was insbesondere bei der Mikroskopie lebender Zellen in Petrischalen von Vorteil ist. Zusätzlich zum Aufsichtstrahlengang, der sich im Prinzip nicht von dem in Abb. 3.5 gezeigten unterscheidet, ist auch eine Durchlichtbeleuchtung eingezeichnet. Diese wird für die nicht-fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der gesamten Zelle benötigt. Die hierfür notwendige Beleuchtungsquelle (i. d. R. eine Halogenlampe) ist zusammen mit der notwendigen Optik an einem Galgen über dem Mikroskop befestigt.

ten die zu untersuchenden Proben sehr viele verschiedene Fluoreszenzmarkierungen, sollten die Filter sehr schmalbandig ausgelegt sein, um die einzelnen Farbstoffe frei von Übersprechen aus anderen Kanälen aufnehmen zu können. Enthält die Probe hingegen nur einen Farbstoff, besteht die Aufgabe des Filters lediglich darin, Emission von Anregungslicht zu trennen. Folglich können diese breitbandiger ausgelegt sein, sodass ein größerer Teil des farbstoffspezifischen Anregungs- und Emissionsspektrums genutzt werden kann, was die Lichtausbeute und somit insbesondere bei schwachen Signalen die Bildqualität erhöht. Da die Lichtausbeute ein kritischer Punkt ist, soll die erwähnte Weißlichtquelle eine möglichst hohe Intensität aufweisen. Deshalb stellen Quecksilberdampflampen die Standardbeleuchtung für Fluoreszenzmikroskopie dar. Viele Fluorochrome sind von ihrer Anregungswellenlänge auf die in Abb. 3.8 erkennbaren stark ausgeprägten Spektrallinien von Quecksilber hin optimiert [56]. Aufgrund des ebenfalls in Abb. 3.8 ersichtlichen hohen UV-Anteils von ca. 50% ist das Licht einer

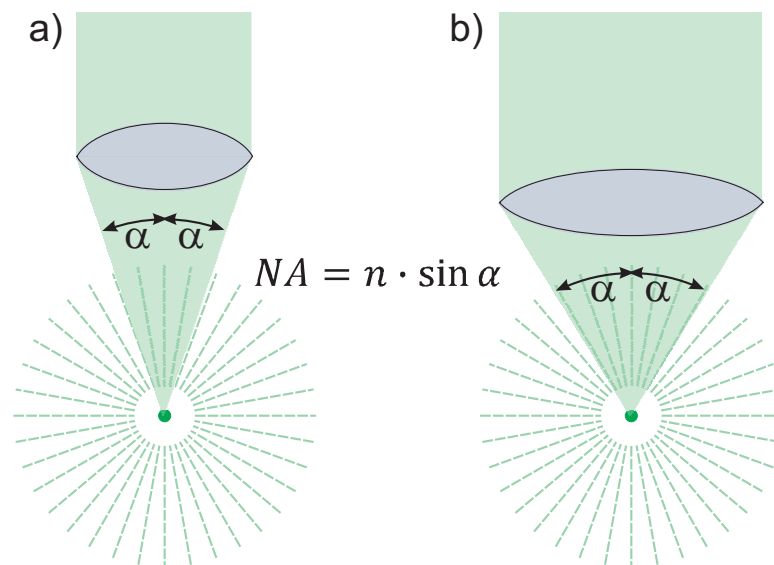


(a) DAPI-gefärbte Zellkerne. (b) Der Doppelstrangbruchmarker  $\gamma$ -H2AX zeigt ioneninduzierte DNA-Schäden an. (c) RGB-Überlagerung (merge) von (a) und (b).

**Abbildung 3.7:** Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird i. d. R. für jeden Farbstoff mittels passender Anregungs- und Emissionsfilter eine eigene Schwarz-Weiß-Aufnahme gemacht. Diese können dann nachträglich mit entsprechender Bildbearbeitungssoftware als Kanäle eines RGB-Farbbildes definiert werden.



**Abbildung 3.8:** Spektrum einer Quecksilberdampfampe mit den deutlich sichtbaren Spektrallinien und einem hohen UV-Anteil. Die Abbildung ist aus [56] entnommen.



**Abbildung 3.9:** Definition der numerischen Apertur (NA). Je höher diese ist, desto mehr Licht kann das Objektiv aufnehmen.

Quecksilberdampfampe aber nur bedingt für Lebendzellmikroskopie geeignet, da es Stoffwechselfvorgänge innerhalb des Zellkerns stören kann und somit zusätzlich zu den im Abschnitt 3.1 beschriebenen Mechanismen eine weitere Ursache für Phototoxizität darstellt (s. z. B. [57] und insbesondere die zugehörigen Supplemental Data). Neuartige LED-Lichtquellen sind ein erfolgversprechender Ansatz, dieses Problem zu lösen, und werden erfolgreich am SNAKE-Lebendzell-Aufbau eingesetzt (s. Kap. 4.2.1.4).

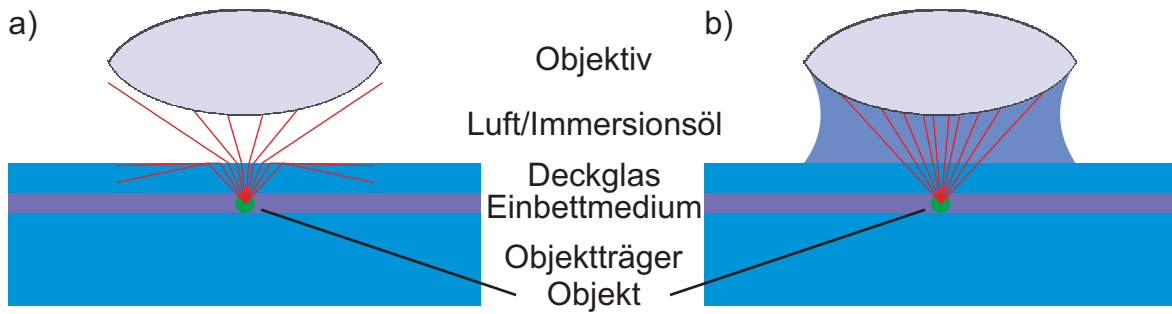
### 3.4.2 Optische Auflösung

Um die feinen Strukturen innerhalb eines Zellkerns analysieren zu können, ist eine möglichst hohe Auflösung des Mikroskops vonnöten. Diese wird wesentlich von der numerischen Apertur (NA) des verwendeten Objektivs bestimmt, sodass zunächst auf diese Größe genauer eingegangen werden soll. Definiert ist sie als:

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad (3.1)$$

Hierbei bezeichnet  $n$  den Brechungsindex des Mediums zwischen Präparat und Objektivlinse,  $\alpha$  definiert den halben Öffnungswinkel des Objektivs, wie er in Abb. 3.9 definiert ist.

Die Abbildung zeigt, je größer die numerische Apertur eines Objektivs desto mehr Licht einer isotrop abstrahlenden punktförmigen Lichtquelle kann es aufnehmen. Für ein Luftobjektiv, wie es in Abb. 3.9 gezeigt ist (d. h.  $n = 1$ ), kann die numerische Apertur höchstens 1 betragen. In der Praxis werden Werte bis 0,95 erreicht, was einem

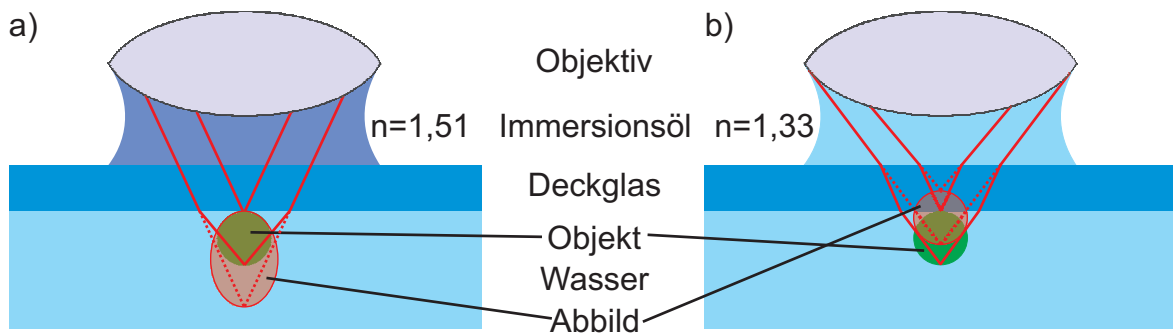


**Abbildung 3.10:** Das Licht (rote Strahlen) eines mit einem Deckglas bedeckten Präparats wird beim Austritt aus dem Deckglas von der optischen Achse weggebrochen. Dies kann durch ein Immersionsmedium zwischen Deckglas und Objektiv verhindert werden. Der Brechungsindex des Mediums entspricht idealerweise dem des Deckglases.

halben Öffnungswinkel von  $\alpha \approx 72^\circ$  entspricht [58]. Wie in Abb. 3.9 (b) ersichtlich, geht eine Vergrößerung der numerischen Apertur mit einer Vergrößerung des Objektivdurchmessers und/oder einer Verringerung des Arbeitsabstands einher. Der Arbeitsabstand ist als Distanz zwischen Probe und Objektivlinse definiert.

Bis jetzt wurde nur der Fall betrachtet, dass sich zwischen dem Objekt und der Objektivlinse Luft befindet. Für fixierte Proben ist jedoch der in Abb. 3.10 gezeigte Fall realistischer: Die Probe ist zwischen einem Objektträger und einem Deckglas eingebettet, damit sich das Präparat luftdicht konservieren lässt. Das Deckglas hat typischerweise eine Dicke von  $170\ \mu\text{m}$ <sup>(1)</sup>. Bei hochwertigen Objektiven ist diese fester Bestandteil der berechneten Optik, sodass von einer Abweichung von dieser Norm dringend abgeraten werden muss, um nicht mit Abbildungsfehlern konfrontiert zu werden. Abb. 3.10 (a) zeigt, dass die vom Objekt ausgehenden Strahlen beim Austritt aus dem Deckglas aufgrund des Snelliusschen Gesetzes vom Lot weggebrochen werden. Um dies zu verhindern und somit einen größeren Teil des von der Probe emittierten Lichts „einfangen“ zu können, kann wie in Abb. 3.10 (b) dargestellt zwischen Objektiv und Deckglas ein Medium eingebracht werden, dessen Brechungsindex dem des Deckglases entspricht ( $n = 1,51$ ). Man spricht in diesem Fall von einem Immersionsobjektiv, das Medium wird Immersionsöl genannt. Gemäß Gleichung (3.1) lassen sich so numerische Aperturen größer eins erzielen, in der Praxis werden Immersionsobjektive bis  $NA \approx 1,45$  angeboten, mit speziellen Ölen lässt sich sogar  $NA = 1,6$  erreichen [58]. Darüberhinaus verhindert das Immersionsöl Reflexionen an den Grenzflächen beim Übergang aus dem Deckglas bzw. in die Objektivlinse, deren Brechzahl ebenfalls näherungsweise der des Immersionsöls entspricht. Dies steigert die Gesamttransmission.

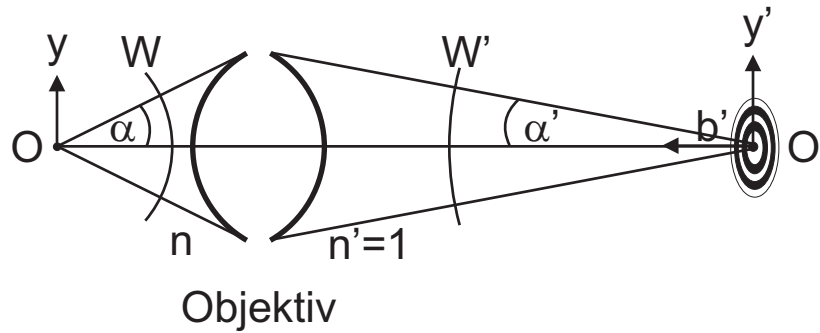
<sup>(1)</sup>Der eben eingeführte Begriff des Arbeitsabstands ist in diesem Fall als Abstand Objektivlinse – Deckglas definiert.



**Abbildung 3.11:** Bei Mikroskopie mit einem Ölimmersionsobjektiv und gewöhnlichem Immersionsöl werden die von einem Objekt (grün) ausgehenden Lichtstrahlen (rot) an der Grenzfläche zum Deckglas gebrochen. Dadurch scheinen Objektpunkte weiter hinter dem Deckglas zu liegen als dies der Fall ist (gestrichelter Strahlengang). Da dieser Effekt mit dem Abstand zwischen Objektpunkt und Deckglas zunimmt, erscheint das Objekt entlang der optischen Achse gedehnt. Ein sphärisches Objekt wird als Oval wahrgenommen (rot-transparent). Bei Verwendung eines Wasserimmersionsobjektives werden die Lichtstrahlen an der Grenzfläche vom Deckglas zum Wasserimmersionsöl ein weiteres Mal gebrochen. Dies führt zu einem Parallelversatz der Strahlen, der zwar die scheinbare Position des Objekts in Richtung Objektiv verschiebt, die Form aber nicht verändert.

Aus dem selben Grund sollte das Einbettmedium ebenfalls einen Brechungsindex von  $n = 1,51$  aufweisen, sodass auch an der Grenzfläche Einbettmedium – Deckglas keine Reflexionen auftreten. Darüberhinaus wirken gebräuchliche Einbettmedien als Radikalfänger, um das in Abschnitt 3.1 beschriebene Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermindern.

Ein solches Einbettmedium kann jedoch nur für fixierte Zellen verwendet werden. Für Untersuchungen an lebenden Zellen müssen sich diese in Nährflüssigkeit befinden, die wie reines Wasser einen Brechungsindex von  $1,33$  aufweist. Somit lässt sich an der Grenzfläche Nährmedium – Deckglas Brechung nicht verhindern. Die Folgen werden in Abb. 3.11 (a) verdeutlicht: Bei Mikroskopie mit einem normalen Immersionsobjektiv und Immersionsöl mit  $n = 1,51$  wird ein sphärisches Objekt als ein entlang der optischen Achse gedehntes Oval abgebildet. Deshalb empfiehlt sich in diesem Fall insbesondere bei Proben mit einer Dicke von mehr als  $10\ \mu\text{m}$  die Verwendung eines sogenannten Wasserimmersionsobjektives [59]. Mit einem solchen Objektiv, das für Wasser sowohl als Einbett- als auch Immersionsmedium konzipiert ist, treten die axialen Verzerrungen nicht auf (s. Abb. 3.11 (b)). In der Praxis wird statt Wasser als Immersionsmedium meistens spezielles Wasserimmersionsöl eingesetzt. Dieses hat ebenfalls einen Brechungsindex von  $n = 1,33$ , weist jedoch eine höhere Viskosität auf und verdunstet nicht. Die numerische Apertur eines Wasserimmersionsobjektives liegt aufgrund des



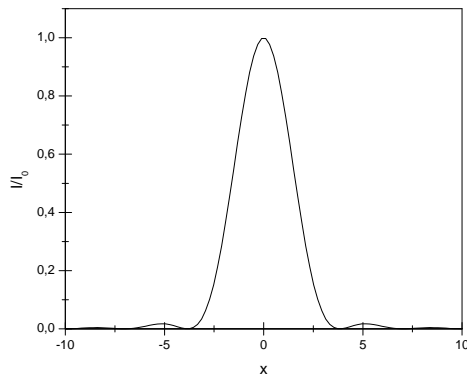
**Abbildung 3.12:** Geometrie der Beugung am Objektiv: Ein punktförmiges selbstleuchtendes Objekt  $O$  wird von einem Objektiv, welches für das Licht ein Hindernis gleich einer runden Blende darstellt, in dem Punkt  $O'$  abgebildet. Zwischen Objekt und Objektiv kann sich Immersionsmedium mit Brechungsindex  $n$  befinden, bildseitig beträgt der Brechungsindex typischerweise  $n' = 1$ . Der Abstand von der optischen Achse wird objektseitig mit  $y$  und bildseitig mit  $y'$  bezeichnet. Der Abstand der Bildebene von  $O'$  entlang der optischen Achse  $b'$  sei für Betrachtungen zur lateralen Auflösung gleich  $0$ , was einer idealen Fokussierung entspricht. Durch die punktförmige Lichtquelle und den großen halben Öffnungswinkel  $\alpha$  des Objektivs unterscheidet sich diese Geometrie von der üblicherweise zur Erklärung von Beugungseffekten an einer runden Blende herangezogenen, bei der eine ebene Welle eines unendlich weit entfernten Strahlers auf eine Blende/Linse trifft.

Das von  $O$  ausgesandte Licht breitet sich als Kugelwelle aus. Eine solche Wellenfront um  $O$  als Zentrum ist mit  $W$  bezeichnet. Eine derartige Wellenfläche lässt sich auch als eine Fläche gleicher Phase ansehen. Dies gilt auch für die Kugelfläche  $W'$  um  $O'$ , denn der optische Weg von  $O$  zu einem beliebigen Punkt auf  $W'$  ist für alle Punkte auf  $W'$  gleich. Am Punkt  $O'$ , an dem nach der geometrischen Optik das punktförmige Abbild von  $O$  zu erwarten wäre, treffen alle gemäß dem Huygensschen Prinzip von  $W'$  ausgesandten Elementarwellen phasengleich an, da der optische Weg zu  $O'$  für alle Punkte auf  $W'$  gleich lang ist. Deshalb ist  $O'$  der Ort der maximalen Helligkeit des Abbildes. Von einem Punkt in der Umgebung um  $O'$  ( $y' \neq 0$ ) sind die Entfernungen und somit die optischen Weglängen zu den Punkten auf  $W'$  nicht mehr gleich groß. Folglich treffen die Elementarwellen hier nicht mehr phasengleich ein, sodass es zu Interferenzerscheinungen kommt.

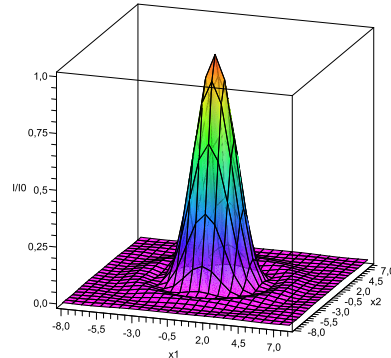
geringeren Brechungsindex etwas unter dem von Öobjektiven. Trotzdem weisen erstere bei der Mikroskopie lebender Zellen eine höhere laterale und axiale Auflösung und einen höheren Kontrast auf [59].

Zur Diskussion der Auflösung eines Objektivs wird die in Abb. 3.12 gezeigte Geometrie betrachtet. Eine punktförmige Lichtquelle wird von einem aberrationsfreien Objektiv abgebildet. Beugungsbedingt ist dieses Abbild nicht mehr punktförmig. Vielmehr wird gemäß der Kirchhoffschen Formel für die Beugung seine Intensität  $I$  durch





(a) Graph von Gleichung (3.2) (erstellt mit der Software Origin 7.5, Fa. OriginLab, Northampton, USA)



(b) 3D-Plot der rotationssymmetrischen Verteilung (erstellt mit der Software Maple 11, Fa. Maplesoft, Waterloo, Ontario, Kanada)

**Abbildung 3.13:** *Beugungsbedingte Intensitätsverteilung im Abbild einer punktförmigen Lichtquelle.*

folgende in Abb. 3.13 graphisch dargestellte Gleichung beschrieben [54]:

$$I(x) = I_0 \cdot \left( \frac{2 \cdot J_1(x)}{x} \right)^2 \quad (3.2)$$

Dabei ist  $J_1(x)$  die Besselfunktion erster Ordnung und  $x$  ein dimensionsloses Maß für den Abstand vom zentralen Maximum, welches folgendermaßen definiert ist:

$$x = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot NA' \cdot y' \quad (3.3)$$

mit  $\lambda$  = Wellenlänge des Lichts,  $NA' = n' \cdot \sin \alpha'$  = bildseitige numerische Apertur des Objektivs und  $y'$  = Abstand von der optischen Achse in der Bildebene (vgl. Abb. 3.12). Diese als Airy-Muster bezeichnete Beugungsfigur entspricht einem hellen runden Fleck am Ort des zentralen Maximums (Airy-Scheibe), welcher von dunklen und hellen Ringen, deren Intensität mit steigendem Abstand zur Airy-Scheibe abnimmt, umgeben ist. Dabei entfallen 84% der Gesamtintensität auf die Airy-Scheibe [51]. Die erste Nullstelle von Gleichung (3.2) und somit das erste Beugungsminimum liegt bei  $x_1 = 1,22\pi$ . Für den Ort  $y'_1$ , an dem das erste Minimum beobachtet werden kann, gilt also nach (3.3):

$$y'_1 = \frac{1,22 \lambda}{2 \cdot NA'} \quad (3.4)$$

Das gängigste Auflösungskriterium nach Rayleigh besagt, dass zwei solcher punktförmigen Objekte gerade noch getrennt wahrgenommen werden können, wenn das

Maximum des Beugungsmusters des einen im ersten Minimum des anderen liegt (s. Abb. 3.14(a)). In diesem Fall ist der Abstand der beiden Bilder  $d'_{min}$  gerade  $y'_1$ . Da in der Regel aber nicht der Abstand der Bilder sondern der Objekte von Interesse ist, muss (3.4) noch in die Objektebene zurückprojiziert werden. Hierzu nutzt man die Abbesche Sinusbedingung, welche eine notwendige Bedingung für eine fehlerfreie Abbildung ist und deshalb in obigem idealen Beispiel erfüllt ist:

$$\frac{n \cdot \sin \alpha}{n' \cdot \sin \alpha'} = \frac{NA}{NA'} = \frac{y'}{y} = M \quad (3.5)$$

mit der Konstante  $M =$  Vergrößerung des Objektivs, und typischerweise  $n' = 1$ , wobei gestrichene Größen wieder die Bildseite bezeichnen. Die Sinusbedingung in Gleichung (3.4) eingesetzt ergibt:

$$d'_{min} = y'_1 = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \cdot M \quad (3.6)$$

Mit  $y'/y = M$  erhält man als Auflösungsgrenze nach Rayleigh:

$$d_{min, Rayleigh} = y_1 = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad (3.7)$$

Man erkennt, dass die erzielbare Auflösung einzig von der Wellenlänge und der numerischen Apertur abhängt. Die Objektivvergrößerung spielt hingegen keine Rolle. Es gibt neben dem Rayleigh-Kriterium noch weitere Auflösungskriterien, die zu einem anderen Vorfaktor führen. Die wichtigsten werden im Folgenden noch knapp eingeführt, da in der Literatur häufig nur die Formel, nicht jedoch die jeweiligen Voraussetzungen eines Auflösungskriteriums angegeben wird.

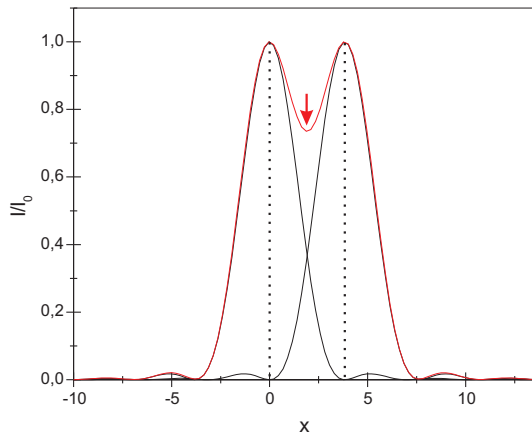
Ein realistischeres Kriterium, das unter gleichen Voraussetzungen eine etwas bessere Auflösung liefert als das von Rayleigh, stellt das Sparrow-Limit dar [51]. Hierbei geht es um die vollständige Verschmelzung der beiden Airy-Scheiben, also um das Verschwinden des Minimums der Summenfunktion (s. Abb. 3.14(b)). Diese Definition führt zu [60]:

$$d_{min, Sparrow} = \frac{0,47 \cdot \lambda}{NA} \quad (3.8)$$

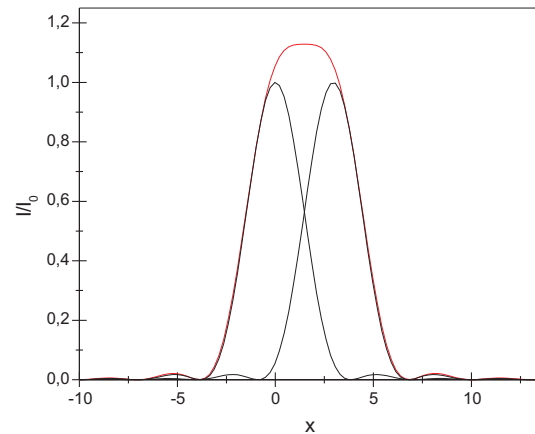
Ein ebenfalls häufig als Auflösungskriterium herangezogener Wert ist die Halbwertsbreite der Beugungsfigur, zurückgerechnet in das Objekt [61]:

$$d_{min, FWHM} = \frac{0,51 \cdot \lambda}{NA} \quad (3.9)$$

Den beugungsbedingten Zusammenhang zwischen Auflösungsvermögen, numerischer Apertur und Wellenlänge fand schon Ernst Abbe (1840–1905) [52]. Da seine



(a) Beim Rayleighkriterium gelten die Abbilder zweier gleichartiger Leuchtpunkte als aufgelöst, wenn das Hauptmaximum (Zentrum der Airy-Scheibe) des einen im ersten Minimum des anderen liegt. Die rot eingezeichnete Summenfunktion weist in diesem Fall noch ein deutliches Minimum auf (roter Pfeil).



(b) Nach dem Sparrow-Kriterium sind die Abbilder gerade dann nicht mehr auflösbar, wenn das Minimum der Summenfunktion vollständig verschwunden ist.

**Abbildung 3.14:** Illustration der Auflösungskriterien nach Rayleigh und Sparrow.

Betrachtungen sehr anschaulich sind, werden sie im folgenden kurz skizziert und führen zur letzten hier vorgestellten Formel für das Auflösungsvermögen. Ein mit parallelem Licht beleuchteter Doppelspalt mit Spaltabstand  $d$  stelle das Objekt dar. Am Doppelspalt kommt es zu Interferenzerscheinungen, die die aus Lehrbüchern bekannte und leicht durch geometrische Überlegungen zum Gangunterschied herleitbare Bedingung für ein Interferenzmaximum liefern:

$$d \cdot \sin \theta = \pm k \cdot \lambda \quad (k \in \mathbb{N}_0) \quad (3.10)$$

Hierbei steht  $\theta$  für den Beobachtungswinkel zur optischen Achse. Unter  $\theta = 0$  lässt sich das zentrale Maximum beobachten. Dieses liefert jedoch keinerlei Information über den Abstand  $d$  der beiden Spalte. Um diesen aus Gleichung (3.10) bestimmen zu können, muss mindestens der Winkel  $\theta_1$ , unter dem das Maximum erster Ordnung ( $k = 1$ ) auftritt, bekannt sein. Somit muss das betrachtende Objektiv unter diesem Winkel abgestrahltes Licht noch aufnehmen können, um die Spalte auflösen zu können. Für den halben Öffnungswinkel des Objektivs muss also  $\alpha \geq \theta_1$  gelten und somit:

$$NA = n \cdot \sin \alpha \geq n \cdot \sin \theta_1 = \frac{\lambda}{d} \quad (3.11)$$

Daraus folgt für den minimalen auflösbaren Spaltabstand  $d_{min}$ :

$$d_{min, Abbe} = \frac{\lambda}{NA} \quad (3.12)$$

Aus diesen Überlegungen entwickelte Abbe seine Abbildungstheorie, die von einem Abbild als Überlagerung mehrerer Beugungsordnungen ausgeht. Durch zahlreiche Experimente, in denen er Gitter durch ein Mikroskop abbildete und über Blenden definiert einzelne Beugungsordnungen „abschaltete“, untermauerte er seine Theorien.

Für ein Immersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,3 beträgt die theoretisch erreichbare Auflösung bei der Beobachtung einer GFP-markierten Probe gemäß Rayleigh ca. 240 nm. Bildseitig entspricht dies bei einem Objektiv mit 63-facher Vergrößerung 15  $\mu\text{m}$ . Um tatsächlich Mikroskopbilder mit der Auflösung von 240 nm generieren zu können, muss das Nyquist-Kriterium [62] bzw. das äquivalente Shannon-Theorem [63] erfüllt sein. Dieses erfordert im konkreten Fall<sup>(2)</sup>, dass die kleinste auflösende Struktur von mindestens zwei Kamerapixeln erfasst wird [61, 65]. Für das Zahlenbeispiel bedeutet dies, dass die Pixelgröße der Kamera maximal  $7,5 \times 7,5 \mu\text{m}^2$  betragen darf, wenn alle Strukturen noch hinreichend genau abgetastet werden sollen. Durch kommerziell erhältliche vergrößernde oder verkleinernde Adapter vor der Kamera können eventuelle Fehlanpassungen korrigiert werden.

### 3.4.3 Helligkeit des Abbildes

Je höher die numerische Apertur eines Objektivs ausfällt, desto höher ist die damit erzielbare Bildhelligkeit, definiert als Photonenfluss pro Fläche und Zeit [66]. Dieser Sachverhalt lässt sich beim Betrachten von Abb. 3.9 leicht nachvollziehen: Ein Punkt des Objekts strahlt isotrop Licht ab. Je höher die numerische Apertur eines Objektivs ist, desto mehr kann es von diesem Licht „einsammeln“. Der konkrete Zusammenhang lautet für ein Objekt mit einer gegebenen Helligkeit [67, 68]:

$$\text{Bildhelligkeit} \propto (NA/M)^2 \quad (3.13)$$

Hierbei steht  $M$  wieder für die Vergrößerung des Objektivs. Je höher diese gewählt wird, auf desto mehr Kamerapixel verteilt sich das von einer gegebenen Fläche des Objekts abgestrahlte Licht, sodass jeder Pixel eine geringere Anzahl von Photonen registriert, was wiederum zu einer reduzierten Helligkeit führt.

Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ändert sich der Sachverhalt dahingehend, dass nicht mehr von einer festen Objekthelligkeit ausgegangen werden kann. Die Helligkeit des Fluoreszenzsignals hängt bis zur Sättigung der Fluorochrome, welche nur mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (s. Kap. 3.4.4.1), nicht jedoch bei konventioneller Beleuchtung mit einer Quecksilberdampflampe o.ä. erreicht wird [45], linear von

---

<sup>(2)</sup>Beide Theoreme besagen allgemein, dass beliebige Signale mit einer Maximalfrequenz  $f_{max}$  mindestens mit  $2 \cdot f_{max}$  abgetastet werden müssen, um sie aus den Daten wieder beliebig gut zu approximieren können [64].

der Beleuchtungsintensität ab. Diese wird bei der Epilfluoreszenz, bei der das Anregungslicht das Objektiv passiert, u.a. ebenfalls von der numerischen Apertur bestimmt. Hier bedeutet eine höhere numerische Apertur, dass ein höherer Prozentsatz des Anregungslichtes das Objekt erreicht. Somit wird sich eine Änderung der numerischen Apertur stärker auf die Bildhelligkeit auswirken als in dem durch Gleichung (3.13) beschriebenen Fall. Für Epilfluoreszenzmikroskopie gilt also [45, 66, 67]:

$$\text{Bildhelligkeit (Fluoreszenz)} \propto NA^4/M^2 \quad (3.14)$$

Neben numerischer Apertur und Objektivvergrößerung ist die erzielbare Bildhelligkeit noch von weiteren Faktoren abhängig. Dabei spielt neben der Empfindlichkeit der verwendeten Kamera und der Intensität der Lichtquelle die optische Güte aller im Strahlengang befindlichen Komponenten wie Objektiv, Filter, Umlenkspiegel etc. eine entscheidende Rolle. Denn an jeder Grenzfläche von Glas zu Luft treten durch Reflexion Verluste auf. Der Strahlengang eines Mikroskops kann bis zu 60 solcher Grenzflächen beinhalten [67]. Ein solcher Strahlengang hätte mit unbeschichteten Oberflächen eine Transmission von weniger als 9%, mit beschichteten Gläsern wird eine Transmission von über 50% erreicht [67]. Alleine in einem aufwendigen Objektiv mit bis zu 15 Linsenelementen können mit unbeschichteten Linsen 50% des Lichtes verloren gehen. Durch Mehrfachvergütung der Linsen lässt sich der Lichtverlust auf unter 10% reduzieren [67]. Einfachere Objektive ohne aufwendige Korrekturen weisen aufgrund der geringeren Linsenzahl eine höhere Transmission um die 98% auf.

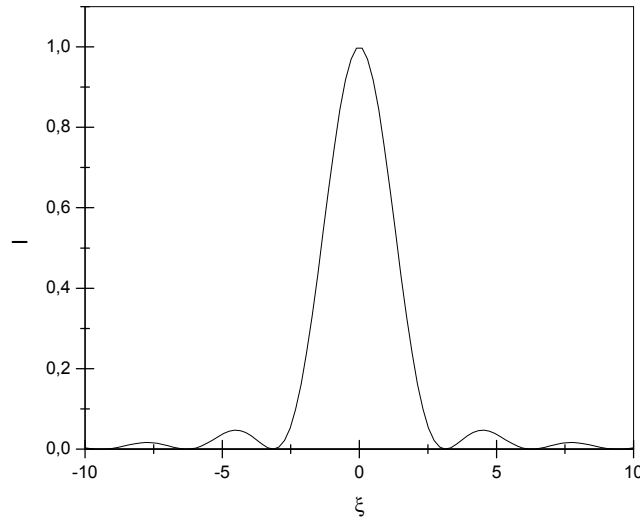
### 3.4.4 Schärfentiefe und optischer Schnitt

Die in Abschnitt 3.4.2 angestellten Betrachtungen zur lateralen Auflösung gehen immer davon aus, dass die Bildebene durch den geometrisch-optischen Bildpunkt  $O'$  hindurchgeht. Der in Abb. 3.12 mit  $b'$  bezeichnete Abstand zwischen Bildebene und  $O'$  beträgt also 0. Nun soll die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse untersucht werden. Durch Defokussieren ändert sich die in Abb. 3.13 gezeigte und durch Gleichung (3.2) beschriebene Beugungsfigur derart, dass die Intensität innerhalb der Airy-Scheibe abnimmt und dafür die Intensität im ersten Beugungsminimum nicht mehr vollständig auf 0 zurückgeht. Die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse (also im Zentrum der Airy-Scheibe) wird durch folgende Funktion beschrieben, deren Verlauf in Abb. 3.15 dargestellt ist [54]:

$$I(\xi) = \left( \frac{\sin \xi}{\xi} \right)^2 \quad (3.15)$$

mit

$$\xi = \frac{\pi n'}{2\lambda} \cdot b' \cdot \sin^2 \alpha' \quad (3.16)$$



**Abbildung 3.15:** Helligkeitsverlauf im Zentrum der Airy-Scheibe entlang der optischen Achse.

$b'$  bezeichnet wie oben erwähnt den Abstand vom idealen Bildpunkt  $O'$  entlang der optischen Achse. Alle anderen Bezeichnungen sind ebenfalls identisch zu den vorangegangenen Betrachtungen und in Abb. 3.12 definiert. (3.16) nach  $b'$  aufgelöst liefert:

$$b' = \frac{2\xi}{\pi} \cdot \frac{\lambda}{n' \cdot \sin^2 \alpha'} = \frac{2\xi}{\pi} \cdot \frac{n' \lambda}{NA'^2} \quad (3.17)$$

(3.15) ist so normiert, dass bei idealer Fokussierung die Intensität im Zentrum der Airy-Scheibe 1 beträgt. Die erste Nullstelle von Gleichung (3.15) liegt bei  $\xi = \pm \pi$  oder nach Gleichung (3.17) bei  $b' = \pm 2 n' \lambda / NA'^2$ . Dort ist die Abbildung bereits völlig unscharf [54]. Keine Bildverschlechterung ist merkbar, solange die Intensität im Zentrum der Airy-Scheibe über 80% beträgt [54, 61]. Aus Abb. 3.15 lässt sich ablesen, dass dies in etwa für  $|\xi| \leq \pi/4$  der Falls ist. Oder gemäß (3.17):

$$|b'| \leq \frac{1}{2} \cdot \frac{n' \lambda}{NA'^2} \quad (3.18)$$

Innerhalb eines Bereichs

$$t' = \frac{n' \lambda}{NA'^2} \quad (3.19)$$

kann also die Fokussierung geändert werden, ohne dass das Bild unscharf wird. Der Faktor 2 im Vergleich zur vorigen Formel erklärt sich dadurch, dass sich der Bereich von der maximal zulässigen Unter- bis zur maximal zulässigen Überfokussierung erstreckt.

$t'$  wird als die bildseitige wellenoptische Schärfentiefe bezeichnet. Zur Rückrechnung in den Objektraum wird der Tiefenmaßstab  $a'$  benötigt. Für diesen gilt:

$$a' = \frac{n'}{n} \cdot M^2 \quad (3.20)$$

Hieraus und aus der Abbeschen Sinusbedingung (3.5) ergibt sich für die wellenoptische Schärfentiefe im Objektraum  $t_w$ , die gelegentlich auch in Anlehnung an das englische „depth of focus“ Fokustiefe genannt wird:

$$t_w = \frac{t'}{a'} = \frac{n \lambda}{NA^2} \quad (3.21)$$

Analog zu (3.9) lässt sich auch für die axiale Beugungsfigur eine Halbwertsbreite angeben. Diese beträgt [61]:

$$t_{w, FWHM} = \frac{1,77 \cdot n \cdot \lambda}{NA^2} \quad (3.22)$$

Das Vorhandensein einer endlichen Schärfentiefe hat zwei Folgen. Zum einen ergibt sich daraus der Vorteil einer gewissen Einstelltoleranz und dass insbesondere bei Verwendung von Objektiven mit geringer numerischer Apertur nicht nur eine Ebene sondern auch „dicke“ Objekte komplett scharf abgebildet werden können. Auf der anderen Seite definiert  $t_w$  gleichzeitig die axiale Auflösung des Objektivs. Da  $n/NA = 1/\sin \alpha$  in der Praxis immer größer als 1 ist, ist die axiale Auflösung (3.21) immer schlechter als die laterale Auflösung (3.7).

Die Schärfentiefe eines Mikroskops ist jedoch nicht zwingend gleich  $t_w$ . Zum wellenoptischen Term können noch ein oder zwei weitere hinzukommen. Einer davon ist die geometrisch-optische Schärfentiefe. Dazu soll ein geometrischer Strahlengang wie in Abb. 3.12 unter Vernachlässigung von Beugungseffekten betrachtet werden. Wird das Mikroskop nicht exakt scharf auf O gestellt, ist also die bildseitige Einstellebene nicht mit der O' enthaltende Ebene identisch sondern entlang  $b'$  verschoben, wird das Abbild nicht mehr punktförmig sein sondern einen Unschärfekreis bilden. Da ein solcher Unschärfekreis erst ab einem gewissen Radius als Unschärfe wahrgenommen wird<sup>(3)</sup>, ergibt sich auch hier eine Toleranz, die zur geometrisch-optischen Schärfentiefe führt. Da im sogenannten Bereich der förderlichen Vergrößerung<sup>(4)</sup> die wellenoptische Tiefenschärfe die Verhältnisse hinreichend genau beschreibt, wird auf eine formelle Betrachtung

<sup>(3)</sup>Ein Kriterium besagt, dass ein Sehwinkel größer  $2'$  als Unschärfe erkannt wird [69].

<sup>(4)</sup>Die förderliche Vergrößerung gibt die Vergrößerung an, mit der alle beugungsbedingt auflösbaren Details gut zu erkennen sind. Eine höhere Vergrößerung bringt dann keinen Zugewinn an Informationen mehr, während eine kleinere Vergrößerung theoretisch auflösbare Details unterschlägt. Die förderliche Vergrößerung liegt im Bereich vom 500- bis tausendfachen der numerischen Apertur. Der Wert bezieht sich jedoch nicht auf die Objektivvergrößerung sondern auf die Gesamtvergrößerung, welche z. B. die Okularvergrößerung bzw. die Vergrößerung, die dadurch entsteht, dass vom CCD-Kamera-Chip aufgenommene Strukturen auf einen Computermonitor abgebildet werden, mit berücksichtigt.

der geometrisch-optischen Schärfentiefe verzichtet. Erst bei geringen Vergrößerungen dominiert der geometrisch-optische Term.

Bei der Betrachtung durch ein Okular kommt zu den beiden genannten Termen noch ein dritter, welcher die Akkommodationsfähigkeit des Auges beschreibt. Bei der immer häufigeren mikroskopischen Untersuchung mittels CCD-Kamera entfällt dieser Term. Bei einer Tiefenmessung durch Scharfstellen kann dieser dann unerwünscht, da die Messungsgenauigkeit vergrößernde Term trotz Verwendung eines Okulars eliminiert werden, indem in der Brennebene des Okulars eine Strichmarkierung angebracht ist, die gleichzeitig mit dem Objektdetail scharf gesehen werden muss [54]. Aus diesen Gründen wird auch hier auf eine genauere Betrachtung verzichtet.

Betrachtet man die wellenoptische Schärfentiefe für ein Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,3, ein Immersionsmedium mit Brechungsindex 1,5 und die Emissionswellenlänge von GFP, kommt man auf eine Schärfentiefe  $t_w \approx 450$  nm. Um ein Präparat vollständig scharf abbilden zu können, müsste es also dünner als dieser Wert sein. Jedoch hat z. B. der Kern einer in der Molekularbiologie häufig verwendeten HeLa-Zelle eine Dicke von ca. 5  $\mu\text{m}$ . Dies hat zur Folge, dass bis zu 90% der Bildintensität nicht aus der scharf gestellten Ebene sondern aus Ebenen über oder unter dieser stammen [70]. Dieses diffuse Signal überlagert das scharfe Bild und erhöht somit den Streulichtanteil und verringert den Kontrast [61, 70]. Feine Strukturen können evtl. nicht mehr aufgelöst werden, da sie schlicht überstrahlt werden.

Um diesem Problem des „fokusfernen“ Lichts Herr zu werden, werden sehr unterschiedliche Methoden angewandt, um sogenannte optische Schnitte zu generieren. Im Folgenden werden die drei Methoden konfokale Laser Scanning Mikroskopie, rechnerbasierte Dekonvolution und strukturierte Beleuchtung eingeführt.

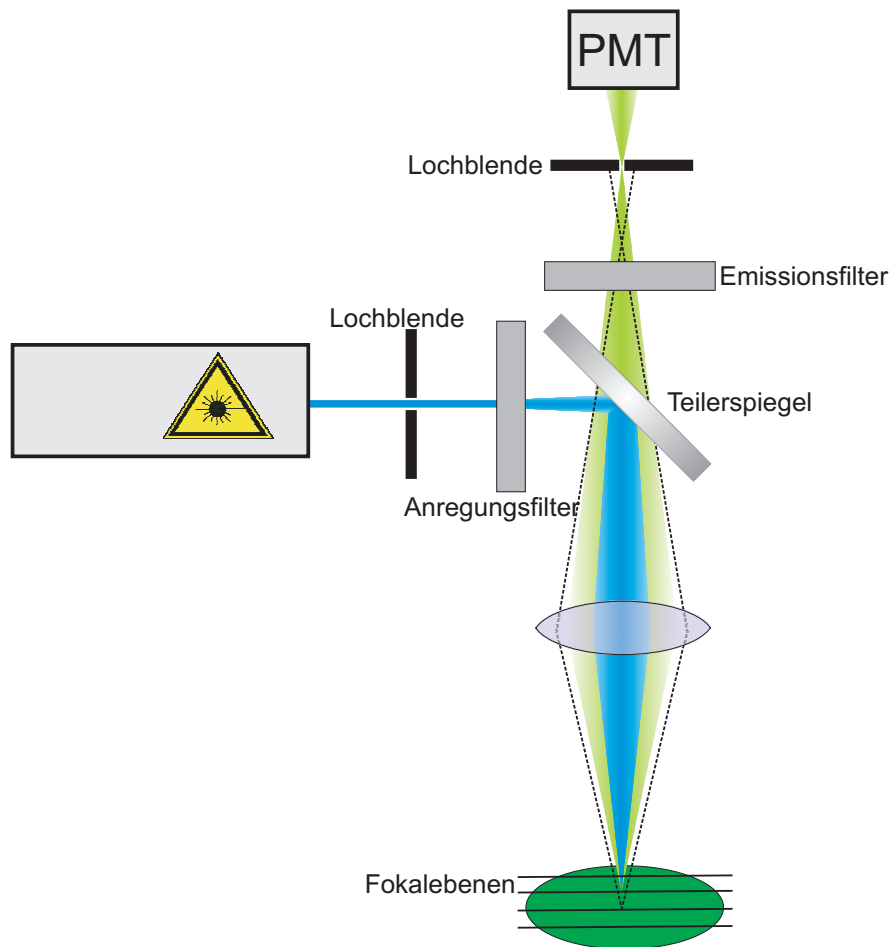
#### 3.4.4.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM, s. Abb. 3.16) dürfte die bekannteste der drei Methoden darstellen. Hierbei wird ein vom Objektiv auf einen Punkt<sup>(5)</sup> fokussierter Laserstrahl über die Probe gerastert. Dies geschieht in der Regel durch einen beweglichen, motorgetriebenen Ablenkspiegel oder bei fixem Strahl durch Bewegen des Probenstückes [71]. Analog zum konventionellen Fluoreszenzmikroskop gelangt das dabei erzeugte Fluoreszenzlicht über einen Emissionsfilter zum Detektor. Da die Ortsinformation jedoch schon in der Kenntnis der momentanen Position des Lasers enthalten ist, wird hier ein nicht ortsauflösender Photomultiplier als Detektor verwendet. Das Bild wird also nicht wie bei der konventionellen Mikroskopie für alle Ob-

---

<sup>(5)</sup>Eine wirklich punktförmige Beleuchtung ist natürlich auch in diesem Fall aufgrund der Limitierung durch Beugungseffekte nicht möglich.





**Abbildung 3.16:** Funktionsweise eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM): Ein Laserstrahl wird durch das Objektiv in die objektseitige Fokalebene abgebildet. In der bildseitigen Fokalebene befindet sich eine Lochblende. Da Licht aus anderen Fokalebenebenen entweder vor oder hinter die Lochblende fokussiert wird (gestrichelter Strahlengang), wird es durch diese nahezu vollständig unterdrückt.

jektpunkte gleichzeitig sondern seriell aufgenommen. Die entscheidende Besonderheit stellt jedoch eine sogenannte konfokale Blende (Lochblende, Pinhole) dar, die in einer zur Objektebene konjugierten Ebene angeordnet ist. Dies bedeutet, dass Licht aus der Objektebene exakt in die Lochblende fokussiert wird und diese somit passieren kann. Der Fokus von Signalen aus Ebenen über oder unter der Objektebene liegt hingegen hinter bzw. vor der Lochblende, sodass diese nur einen sehr geringen Anteil solcher Signale passieren lässt. Somit wird das fokusferne Licht aus anderen Ebenen weitestgehend unterdrückt und ein optischer Schnitt realisiert. Die Dicke des Schnitts kann über den Blendendurchmesser an die individuellen Bedürfnisse angepasst werden, wobei die wellenoptische Schärfentiefe ein unteres Limit vorgibt.

Dem Vorteil der gesteigerten Bildqualität gegenüber dem konventionellen Mikroskop steht jedoch der Nachteil der deutlich langsameren seriellen Bildakquise gegenüber. Deshalb stellt ein LSM für die sequentielle Aufnahme schneller Vorgänge in lebenden Zellen oft nicht die beste Wahl dar. Das Bemühen der Hersteller, die Vorteile des LSM mit der Geschwindigkeit herkömmlicher Mikroskope zu kombinieren, führte zu Produkten wie Linienscannern oder Spinning Disk Mikroskopen. Während bei ersteren der Laser nicht mehr punktförmig sondern in ganzen Zeilen über die Probe gerastert wird, dreht sich in letzteren eine Scheibe mit vielen Lochblenden, sodass mehrere Punkte gleichzeitig abgetastet werden. Gemeinsam ist beiden Konzepten, dass nun wieder segmentierte Detektoren vonnöten sind, wobei auch hier i. d. R. auf CCD-Chips zurückgegriffen wird.

#### 3.4.4.2 Rechnerbasierte Dekonvolution

Eine völlig andere Herangehensweise stellt die rechnerbasierte Dekonvolution (Entfaltung) dar. Hierbei werden die Anteile des fokusernen Lichts aus mit einem konventionellen Mikroskop gewonnenen Bilddaten nachträglich computergestützt herausgerechnet. Dafür muss die sogenannte Point-Spread-Funktion (PSF) bekannt sein. Diese stellt das dreidimensionale Abbild eines Punktes in Abhängigkeit seiner  $z$ -Position dar und enthält somit alle Informationen über Beugungseffekte des abbildenden Systems sowie über die Einflüsse von Licht außerhalb der Fokusebene. Das in der Bildebene sichtbare Abbild  $I(x, y)$  eines dreidimensionalen Objekts  $O(x_i, y_i, z_i)$  entsteht durch Addition der intensitätsgewichteten Verteilungen der einzelnen Punktbilder  $i$ . Mit  $M$  gleich dem Vergrößerungsfaktor des abbildenden Systems gilt also:

$$I(x, y) = \int \int \int O(x_i, y_i, z_i) \cdot PSF(x - Mx_i, y - My_i, z_i) dx_i dy_i dz_i \quad (3.23)$$

Das Abbild entspricht also einer Faltung des Objekts mit der PSF. Die Entfaltung versucht nun, aus dem Abbild und der bekannten PSF das ursprüngliche Objekt zu rekonstruieren.

Die dafür nötige PSF kann entweder gemessen oder aus Mikroskopparametern wie numerischer Apertur, Vergrößerung, Pixelgröße der Kamera, Anregungs- und Emissionswellenlänge, Brechungsindex des Immersions- und Einbettmediums mit hinreichender Genauigkeit berechnet werden. Da nur eine gemessene PSF auch mikroskop-spezifische Eigenarten berücksichtigen kann, wird bei der Entfaltung empfohlen, diese einer theoretisch berechneten vorzuziehen [72]. Beim Vergleich der mit der an SNAKE verwendeten Entfaltungssoftware Huygens (Fa. Scientific Volume Imaging, Hilversum, Niederlande) gewonnenen Entfaltungsergebnisse mit gemessener und berechneter PSF

konnte zumindest für die an SNAKE zur Verfügung stehenden Mikroskope kein qualitativer Unterschied festgestellt werden, sodass auf eine Messung der PSF in der Regel verzichtet wird. Trotzdem soll dieser Vorgang kurz beschrieben werden. Zur Messung der mikroskopspezifischen PSF wird das Abbild exakt gefertigter mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllter Latexkügelchen, sogenannter Beads, für verschiedene Fokusebenen aufgenommen. Daraus und aus der Kenntnis des Bead-Durchmessers kann von der Entfaltungssoftware die mikroskopspezifische PSF ermittelt werden. Dies gelingt umso genauer, je kleiner der Bead-Durchmesser ist [72]. Auf der anderen Seite bedeutet ein kleiner Durchmesser eine geringere Menge an Farbstoff, sodass das Signal-Untergrund-Verhältnis abnimmt, was für die PSF-Bestimmung nachteilig ist. Einen guten Kompromiss stellen Beads mit einem Durchmesser von 170 nm dar [72].

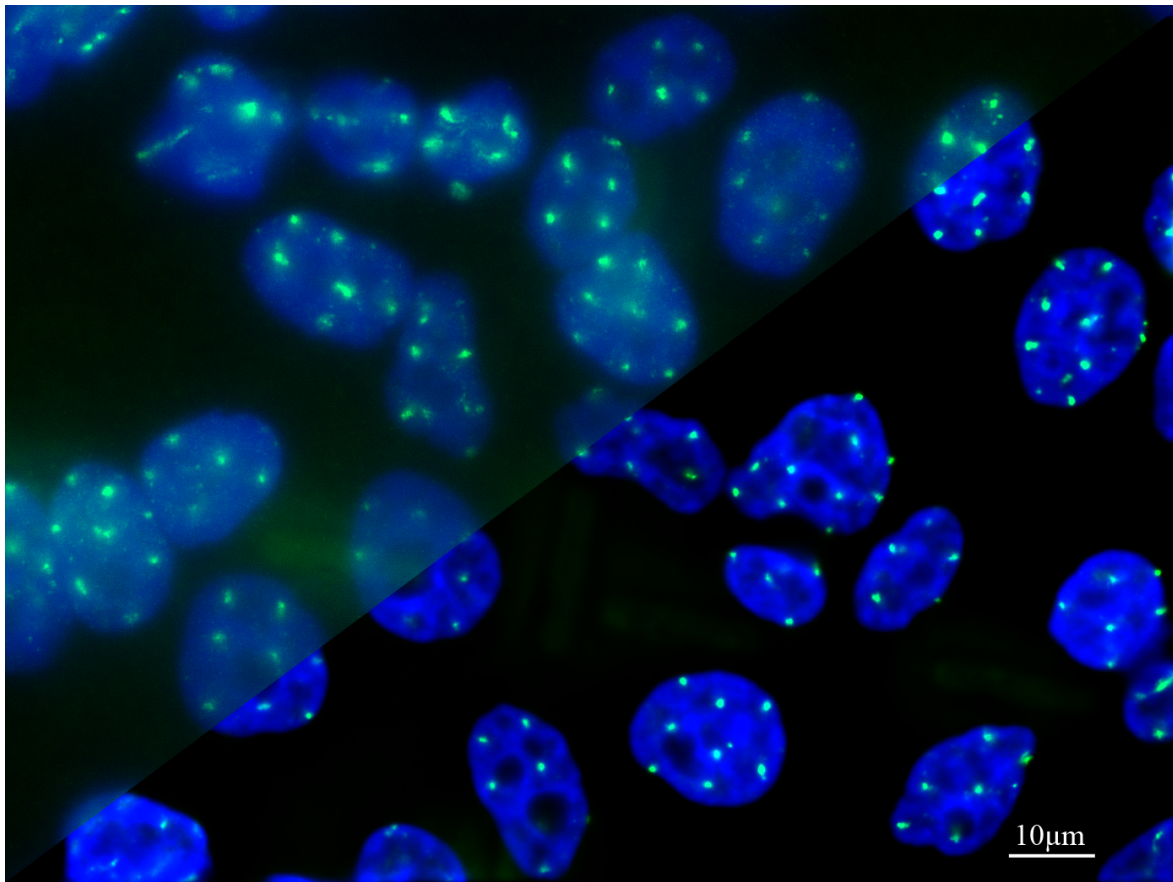
Bei der Dekonvolution wird nun ein Objekt gesucht, das gefaltet mit der PSF dem aufgenommenen Bild entspricht. Dazu gibt es verschiedene Algorithmen, die – meist auf iterativem Wege – das ursprüngliche Objekt „schätzen“. Die Software Huygens bietet dafür jeweils verschiedene Varianten des Tikhonov-Miller-Algorithmus, der mittels gewichteter Least-Square-Methode die beste Schätzung des Objekts auswählt, und der Maximum Likelihood Estimation (MLE). Bei der MLE dient nicht die Least-Square-Methode als Maß für die Qualität der Schätzung, sondern die sogenannte Kullback-Leibler-Divergenz [73, 74]. Diese berücksichtigt u. a. die Poisson-Natur des emittierten Fluoreszenzlichts und kann mit einem verrauschten Bildhintergrund besser umgehen.

Um die Stärken der rechnerbasierten Dekonvolution als Methode zur Generierung optischer Schnitte nutzen zu können, sollten als Rohdaten Aufnahmen mehrerer Fokusebenen vorliegen. Man spricht dann von einem Bildstapel oder z-Stack. Damit die gesamte Bildinformation in dem Bildstapel enthalten ist, muss auch hier das in Kap. 3.4.2 eingeführte Nyquist-Kriterium erfüllt sein. Innerhalb des Schärfentiefenbereichs  $t_w$  sollten also zwei Aufnahmen gemacht werden. Bei modernen Mikroskopen mit motorisiertem z-Trieb wird hierzu in der Steuerungssoftware ein Punkt unterhalb des Objekts als Startposition und einer oberhalb als Endposition sowie der Bildabstand  $\Delta z$  vorgegeben, die äquidistanten Aufnahmen werden dann automatisch generiert.

Abb. 3.17 zeigt eine Ebene aus einem unentfalteten Bildstapel und dieselbe Ebene aus dem entfalteten. Eine deutliche Unterdrückung des diffusen Signals aus außerfokalen Ebenen und eine gesteigerte Auflösung sind das Ergebnis der Entfaltung.

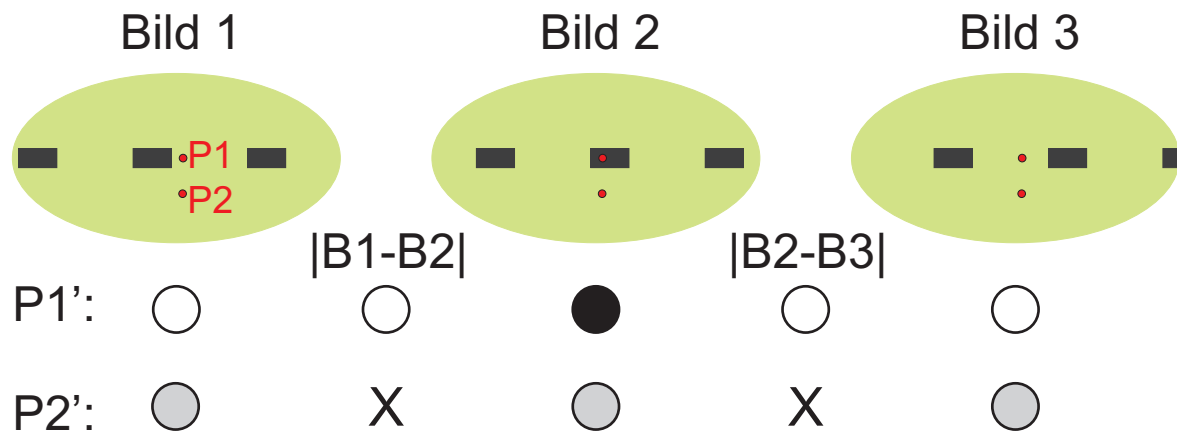
Da die PSF auch den Effekt der Beugungsverbreiterung enthält, kann auch diese zu einem gewissen Grad eliminiert werden. Deshalb werden häufig auch an einem konfokalen Mikroskop gewonnene Bilddaten entfaltet, auch wenn der Zugewinn durch die Dekonvolution hier geringer ausfällt.

Die rechnerbasierte Entfaltung stellt die preisgünstigste Methode zur Eliminierung



**Abbildung 3.17:** Mit einem  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  Matrixmuster an SNAKE bestrahlte Zellen, 15 min nach Bestrahlung fixiert. Blau: DAPI-gefärbte Zellkerne, grün:  $\gamma$ -H2AX. Die Fotomontage zeigt oben links eine Ebene aus dem Originalbildstapel, unten rechts dieselbe Ebene aus dem entfalteten Datensatz. Licht aus Ebenen unter- und oberhalb der Fokusebene, welches das scharf abgebildete Signal diffus überlagert, ist dort stark unterdrückt, sodass die Strukturen der Zellkerne aufgrund schwankender DNA-Dichte deutlich stärker zur Geltung kommen und die  $\gamma$ -H2AX-Foci deutlich schärfer und somit kleiner erscheinen.

von Signalen aus außerfokalen Ebenen dar, hat aber den Nachteil, dass das Ergebnis erst offline nach der rechenaufwendigen Prozedur verfügbar ist. Ist man nicht ohnehin an der dreidimensionalen Struktur der Probe interessiert, erhält man durch die nötige Aufnahme der z-Stacks einen weiteren Zeitverlust und sehr große Datenmengen (für ein Zellpräparat mit der an SNAKE zur Verfügung stehenden Mikroskopkamera ca. 100-200 MB pro Farbkanal). Insbesondere bei der Aufnahme lebender Zellen wird die durch den Bildstapel notwendige häufige Bildakquise aufgrund von Phototoxizitätseffekten zum Problem. Die schon erwähnte längere Aufnahmezeit des z-Stacks macht auch dieses Verfahren nicht zur ersten Wahl für die Beobachtung schnell ablaufender Vorgänge in lebenden Zellen.



**Abbildung 3.18:** Prinzip der strukturierten Beleuchtung: Ein Strichgitter im Beleuchtungsstrahlengang wird scharf in die Fokusebene abgebildet. Es werden drei Bilder aufgenommen, wobei das Gitter jeweils um  $1/3$  der Gitterkonstante verschoben wird. Das Abbild  $P1'$  eines Punktes  $P1$  in der Fokusebene ist nur in den Bildern zu sehen, in denen  $P1$  nicht im Schatten des Gitters liegt (Bild 1 und Bild 3). Das Abbild eines Punktes  $P2$ , der außerhalb der Fokusebene und der scharfen Abbildung des Gitters liegt, liefert zu allen drei Bildern den gleichen diffusen Beitrag fokusfernen Lichts. Dieser wird bei der Subtraktion der Bilder voneinander eliminiert, während  $P1'$  im Ergebnis zweier Subtraktionen erhalten bleibt, da davon nur der schwarze Schatten (Grauwert bzw. Intensität = 0) abgezogen wird.

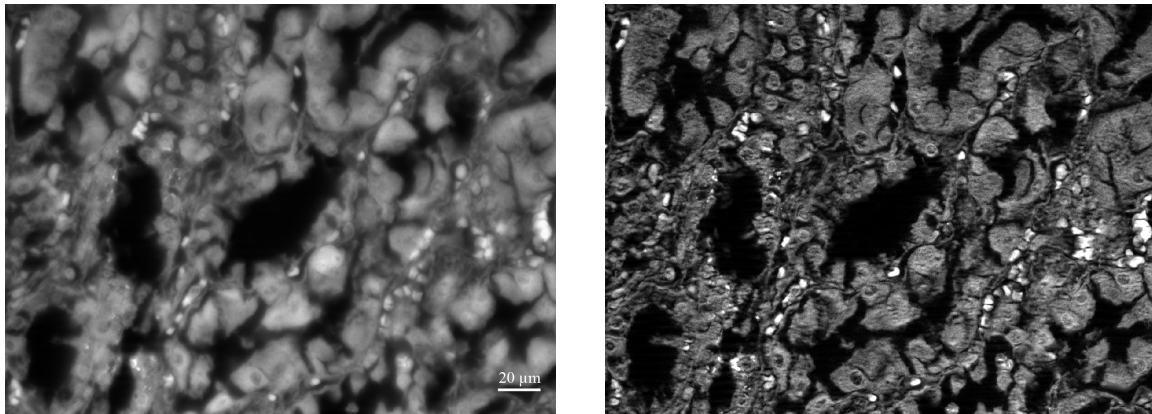
### 3.4.4.3 Strukturierte Beleuchtung

Als dritte Möglichkeit zur Generierung optischer Schnitte soll noch das Prinzip der strukturierten Beleuchtung am Beispiel des „Zeiss Apotome“ erläutert werden. Hierbei wird ein Strichgitter in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht, welches vom Objektiv scharf in die Objektebene abgebildet wird. Nun werden drei Mikroskopaufnahmen gemacht, wobei das Gitter jeweils um  $1/3$  der Gitterkonstante verschoben wird. Alle drei Aufnahmen enthalten Licht sowohl aus der Fokusebene als auch aus anderen Fokalebene. Dem Signal der Fokusebene ist jedoch die Struktur des Gitters aufgeprägt. Durch paarweise Subtraktion der Bilder erhält man die Intensitätsverteilung  $I_P$  [70]:

$$I_P = \frac{\sqrt{2}}{3} \cdot \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2 + (I_3 - I_2)^2} \quad (3.24)$$

Dadurch, dass die fokusfernen Anteile in allen drei Bildern gleich sind, sind sie nach der Subtraktion in  $I_P$  nicht mehr enthalten, während die Information aus der Fokusebene erhalten bleibt. Das Prinzip ist in Abb. 3.18 illustriert, den Vergleich einer Aufnahme mit und ohne Apotome zeigt Abb. 3.19.

Aufgrund der Einfachheit der Rechenoperation (3.24) kann das Ergebnis im Gegen-



(a) Ohne Apotome.

(b) Mit Apotome.

**Abbildung 3.19:** Aufnahme eines Nierenschnitts mit und ohne Apotome. Das Apotome generiert einen optischen Schnitt, in dem aufgrund der Eliminierung von fokuserfernem Licht die Verästelungen der Struktur deutlich feiner aufgelöst werden.

satz zur Entfaltung praktisch in Echtzeit betrachtet werden<sup>(6)</sup>. Die Aufnahme der drei Bilder nimmt weniger Zeit in Anspruch als das Abscannen der Probe mit einem konventionellen Laser-Scanning-Mikroskop oder gar die Aufnahme eines Bildstapels zur Entfaltung, der aus 50 und mehr Einzelaufnahmen bestehen kann. Somit ist diese Art der Generierung optischer Schnitte für die Beobachtung schneller Vorgänge zusammen mit den neuartigen konfokalen Konzepten wie Spinning Disk am geeignetsten. Auch die Belastung der Zellen durch die Beleuchtung fällt deutlich geringer aus als bei der Aufnahme eines z-Stacks. Dadurch, dass das Gitter jeweils ein Drittel des Lichts abschwächt, entspricht sie nur etwa der Belastung von zwei konventionellen Aufnahmen. Jedoch wurde an SNAKE die Beobachtung gemacht, dass bei sehr schwach fluoreszierenden Proben das Ergebnis ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis aufweist. Dies mag nach Subtraktion des fokuserfernen Lichtanteils, der wie schon erwähnt bis zu 90% der Gesamtintensität ausmacht, nicht verwundern, schränkt den Einsatzbereich aber dennoch etwas ein.

### 3.4.5 Fluoreszenzmikroskopie jenseits des Beugungslimits

Trotz der in Kapitel 3.4.2 und 3.4.4 erläuterten beugungsbedingten Limitierung der lateralen und axialen Auflösung wurden Methoden entwickelt, die eine lichtoptische Mikroskopie mit einer Auflösung im Bereich von 10 nm ermöglichen. Das Beugungslimit wird dabei nicht aufgehoben, vielmehr wird der Ursprungsort des beugungsverbreitert

<sup>(6)</sup>Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass beim Apotome zusätzlich noch Filteralgorithmen zum Einsatz kommen, die evtl. vorhandene Streifenartefakte des Gitters eliminieren.

abgebildeten Lichts mit hoher Genauigkeit rekonstruiert. Dazu wurden zwei unterschiedliche Prinzipien entwickelt. Das erste davon, die Lokalisationsmikroskopie, wird durch folgende Überlegung verdeutlicht: Ein einziges Fluoreszenzmolekül wird beugungsbedingt zwar als verbreiterte Airy-Scheibe abgebildet, deren Schwerpunkt lässt sich jedoch mit hoher Genauigkeit bestimmen. Ein zweites Molekül im Abstand von weniger als dem Radius der Airy-Scheibe kann gemäß Rayleigh nicht mehr aufgelöst werden; wenn jedoch sichergestellt werden kann, dass innerhalb eines Airy-Scheiben-Durchmessers immer nur (maximal) ein Molekül Licht emittiert, stellt das Rayleigh-Kriterium keine Limitierung mehr dar. Als Beispiel stelle man sich zwei Fluoreszenzmoleküle in einem Abstand zueinander von z. B. 50 nm vor. Zwei gleichartige Moleküle können mit einem gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskop nicht getrennt aufgelöst werden. Handelt es sich jedoch um zwei verschiedene Moleküle mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen, kann zunächst das erste Molekül angeregt und durch Schwerpunktbildung der Gesamtintensität dessen Ort bestimmt werden. Im Anschluss wird analog dazu der Ort des zweiten Moleküls bestimmt. Unter der Annahme hinreichend korrigierter chromatischer Aberrationen lässt sich so der Abstand der beiden Moleküle voneinander mit hoher Genauigkeit bestimmen.

In der Praxis gibt es verschiedene Ansätze, diese Idee umzusetzen. Bei SALM/SPDM [75] werden Farbstoffe mit einer sehr hohen (Laser-) Lichtintensität angeregt. Dadurch gelangen sie in einen reversiblen gebleichten Zustand. Stochastisch verteilt fällt ein Teil der Moleküle zurück in den Grundzustand. Von dort werden sie durch das Laserlicht in einen angeregten Zustand überführt, von dem sie über einen strahlenden Übergang wieder in den Grundzustand abgeregt werden. Dieser Vorgang wiederholt sich eine gewisse Zeit lang, bevor die Moleküle irreversibel gebleicht sind. Die bei den strahlenden Übergängen emittierten Photonen können von einem ortsauflösenden Detektor (z. B. CCD-Kamera) erfasst werden. Der Schwerpunkt des so entstehenden Abbildes des Moleküls lässt sich wieder sehr genau bestimmen. Wichtig ist nur, dass die Wahrscheinlichkeit für den Übergang vom reversibel gebleichten in den Grundzustand so gering ist, dass innerhalb der Fläche einer Airy-Scheibe immer nur maximal ein Molekül „blinkt“. Dann können Moleküle in einem Abstand von weniger als 20 nm noch klar getrennt werden [75]. Die Generierung eines hochaufgelösten Bildes aus der aufzunehmenden Zeitserie ist jedoch mit hohem Rechenaufwand verbunden, sodass die Daten nicht instantan verfügbar sind.

Viele herkömmliche Fluoreszenzfarbstoffe weisen einen für diese Art der Mikroskopie nötigen reversiblen Bleichzustand auf. Ein ähnliches Verfahren, das jedoch auf spezielle reversibel schaltbare Farbstoffe angewiesen ist, stellt die PALM (PhotoActivation Localization Microscopy) dar. Dabei sind alle Moleküle in einem dunklen Zu-

stand. Durch Beleuchtung mit sehr geringer Intensität im Nanowatt-Bereich werden auch bei dieser Methode stochastisch verteilt einzelne Moleküle in den fluoreszierenden Zustand geschaltet. Deren Licht wird wie eben beschrieben registriert und der Helligkeitsschwerpunkt bestimmt. Auch hier muss – in diesem Fall durch eine hinreichend geringe Intensität des Anregungslichts – Sorge getragen werden, dass innerhalb der Fläche einer Airy-Scheibe nur ein Molekül fluoresziert [76].

Das zweite Prinzip der optischen Nanoskopie stellt die Stimulated Emission Depletion-Mikroskopie (STED) dar [76, 77]. Hierbei sind im Gegensatz zur Lokalisationsmikroskopie die gerade fluoreszierenden Moleküle nicht stochastisch verteilt und es ist nicht nötig, dass innerhalb einer Airy-Scheibe jeweils nur ein Molekül Licht emittiert. Bei STED wird analog zum schon behandelten Laser-Scanning-Mikroskop ein Laser über die Probe gerastert und das Fluoreszenzlicht in einem Detektor (z. B. Photomultiplier) nachgewiesen. Da der Laserstrahl beim konventionellen LSM natürlich ebenfalls beugungsverbreitert ist, gilt auch hier das Beugungslimit (allerdings ist hier nicht die Wellenlänge des emittierten sondern des anregenden Lichts entscheidend, sodass auch ein konventionelles LSM einen geringen Vorteil hinsichtlich der lateralen Auflösung aufweist). Bei STED wird nun ein zweiter Laser mit einer größeren Wellenlänge dem Anregungsstrahl überlagert. Dieser ist durch eine helikale Phasenverzögerung so modifiziert, dass er in seinem Zentrum eine Nullstelle aufweist, sein Profil hat also die Form eines Doughnuts. Durch die größere Wellenlänge ist der STED-Strahl nicht in der Lage, die Farbstoffe zur Fluoreszenz anzuregen, wohl aber durch den Anregungslaser angeregte Fluorochrome durch stimulierte Emission sofort wieder abzuregen. Die dabei entstehenden Photonen sind spektral sehr scharf verteilt, sodass sie durch Filter leicht von der restlichen Fluoreszenz getrennt werden können. „Normale“ Fluoreszenz tritt nun aber nur noch innerhalb des Doughnuts auf. Durch Erhöhung der Intensität des STED-Strahls lässt sich dieser Bereich immer weiter eingrenzen. Rastern nun beide Laserstrahlen über die Probe, lässt sich der Ursprungsort detektierter Fluoreszenzphotonen theoretisch beliebig genau bestimmen. In der Praxis ist eine Auflösung von 16 nm möglich [76].

Eine laufende Diplomarbeit an SNAKE befasst sich mit der optischen Nanoskopie bestrahlter, fixierter Zellen, für den in dieser Arbeit geschaffenen Lebendzellaufbau spielen diese Techniken jedoch (noch?) keine Rolle.

### 3.5 Phasenkontrastmikroskopie

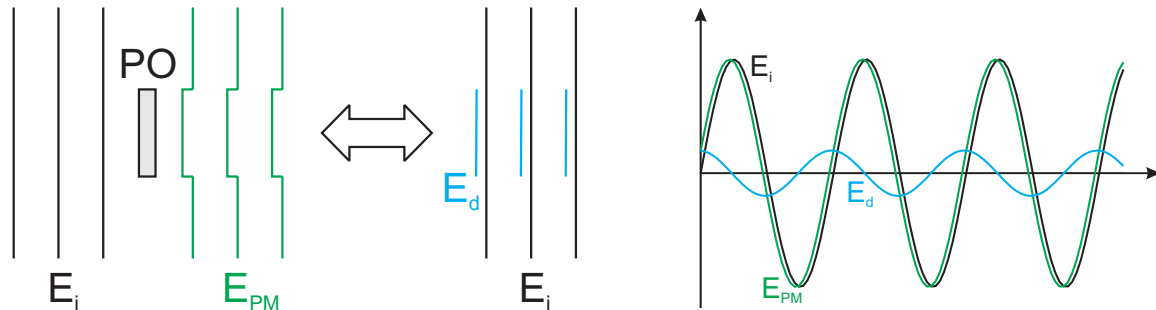
Neben der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Proteinverteilungen, Organellen oder sonstigen eingefärbten Substrukturen der Zelle ist es häufig erwünscht, die



Morphologie der gesamten Zelle ohne Anfärbung mikroskopisch untersuchen zu können. Da Zellen aber nahezu durchsichtig sind, lässt sich dies weder mit gängigen Durchlichtverfahren, die eine Absorption des Lichts durch das Objekt voraussetzen, noch mittels Auflichtverfahren, die das reflektierte Licht zur Bildgebung nutzen, bewerkstelligen. Eine Möglichkeit besteht in der Durchlichtmikroskopie in Kombination mit einer Einfärbung der Zelle. Dadurch wird die Zelle zu einem sogenannten Amplitudenobjekt. Sie schwächt also zumindest innerhalb eines gewissen Spektralbandes die Amplitude des transmittierten Lichts ab und ist somit unter dem Mikroskop sichtbar. Bei der Untersuchung lebender Zellen will man aber möglichst auf solche Farbstoffe, die eine toxische Wirkung zeigen können, verzichten. Die mikroskopische Beobachtung ungefärbter Zellen ist mittels Phasenkontrastmikroskopie [78, 79] möglich. Dieses Verfahren zur Mikroskopie von Phasenobjekten wurde 1932 von dem niederländischen Physiker Frits Zernike vorgeschlagen [54] und 1953 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [51]. Phasenobjekte, zu denen die meisten Zellen zählen, verändern im Gegensatz zu Amplitudenobjekten aufgrund eines vom Umgebungsmedium abweichenden Brechungsindex die Phase des transmittierten Lichts, nicht jedoch seine Amplitude.

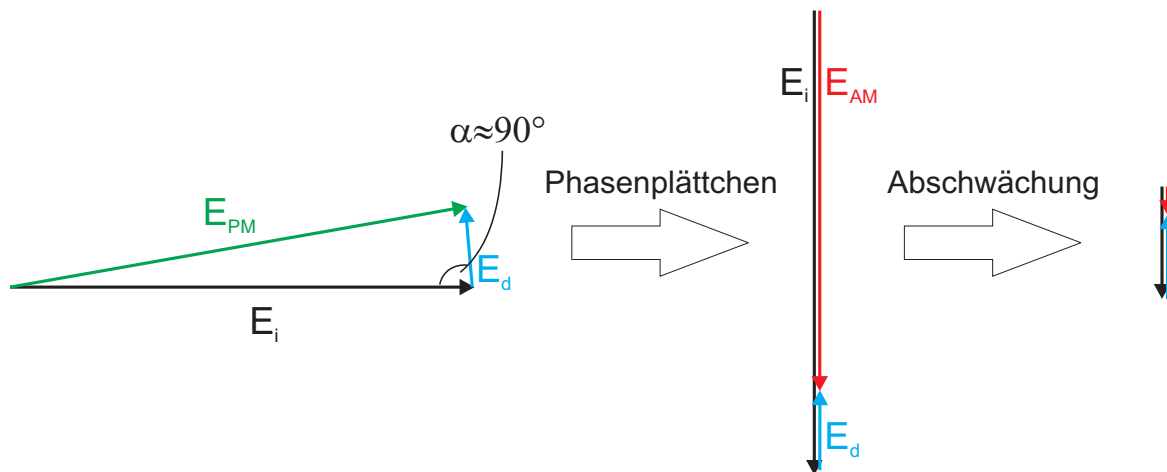
Abb. 3.20(a) zeigt eine ebene Welle  $E_i$ , welche auf ein Phasenobjekt trifft. Hinter dem Objekt läuft der Teil der Welle, der das Objekt durchdrungen hat, aufgrund der langsameren Lichtgeschwindigkeit innerhalb des Phasenobjektes der restlichen Welle hinterher. Diese nun phasenmodulierte Welle  $E_{PM}$  lässt sich vereinfacht als Superposition der einfallenden Welle  $E_i$  und einer örtlichen Störung  $E_d$  beschreiben.  $E_d$  wird als Beugungswelle bezeichnet. Bei einem reinen Phasenobjekt haben einfallende und phasenmodulierte Welle die gleiche Amplitude. Geht man zusätzlich davon aus, dass die Phasenverschiebung gering ist, ist die Amplitude von  $E_d$  sehr klein. Die Annahme einer nur kleinen Phasenverschiebung ist bei Zellproben aufgrund deren geringen Dicke und des geringen Brechungsindexunterschiedes zwischen Zelle und umgebenden Nährmedium (ca. 1,35 im Mittel für Zellen gegenüber 1,33 für das Nährmedium [59]) berechtigt. Wie das Zeigerdiagramm 3.20(c) zeigt, beträgt der Phasenunterschied zwischen  $E_i$  und der Beugungswelle  $E_d$  ungefähr  $\pi/2$ .  $E_d$  eilt der restlichen Welle also um ca.  $\lambda/4$  nach. Ziel der Phasenkontrastabbildung ist es, den Phasenunterschied zwischen  $E_d$  und  $E_i$  um weitere  $90^\circ$  auf  $\pi$  zu erhöhen. Dann wird bei Überlagerung der beiden Wellen eine Amplitudenmodulation entstehen. Das Abbild des Phasenobjektes ist dann sichtbar.

Im Phasenkontrastmikroskop befindet sich eine Ringblende vor der Durchlichtbeleuchtung. Von der Optik des Beleuchtungsstrahlengangs wird beim Fehlen eines Objekts diese Blende auf einen definierten Ring des Objektivs abgebildet. In diesem Ring ist ein Phasenplättchen in das Objektiv eingearbeitet, welches die gewünschte Verschiebung um  $\pi/2$  bewirkt. Wird nun ein Phasenobjekt in den Strahlengang eingebracht,



(a) Die einfallende ebene Welle  $E_i$  wird hinter einem Phasenobjekt PO zur phasenmodulierten Welle  $E_{PM}$ . Diese lässt sich als Überlagerung von  $E_i$  und der sogenannten Beugungswelle  $E_d$  beschreiben. Die Zeichnung ist einer Abbildung aus [51] nachempfunden.

(b) Einfallende und phasenmodulierte Welle haben die gleiche Amplitude und nur einen geringen Phasenversatz (hier ca.  $17^\circ$ ). Die Differenz der beiden Wellen entspricht der Beugungswelle  $E_d$ , welche eine deutlich geringere Amplitude aufweist und  $E_i$  um annähernd  $\lambda/4$  hinterherläuft.



(c) Das Zeigerdiagramm verdeutlicht die in (b) besprochenen Verhältnisse. Im Phasenplättchen im Objektiv des Phasenkontrastmikroskops wird die einfallende Welle um  $\lambda/4$  verschoben, sodass die Phasendifferenz zu  $E_d$  nun  $180^\circ$  beträgt. Dieser Sachverhalt stellt gemäß der Abbeschen Abbildungstheorie (s. Kap. 3.4.2) gerade ein Amplitudenobjekt dar, wobei  $E_i$  der nullten Beugungsordnung und die Beugungswelle den höheren mit  $E_i$  interferierenden Beugungsordnungen entspricht. Das Resultat ist also keine phasen- sondern eine amplitudenmodulierte Welle  $E_{AM}$ . Allerdings ist aufgrund der niedrigen Amplitude der Beugungswelle die Modulation von  $E_i$  durch  $E_d$  gering, sodass  $E_i$  zur Kontrastverstärkung im Phasenring des Objektivs auf ein  $E_d$  entsprechendes Niveau abgeschwächt wird.

**Abbildung 3.20:** Prinzip der Phasenkontrastmikroskopie.

gelangt von dem Objekt gebeugtes Licht außerhalb des Phasenrings in das Objektiv. Dieses gebeugte Licht entspricht der Beugungswelle  $E_d$ . In der Bildebene interferiert diese mit dem um  $\lambda/4$  verschobenen ungebeugten Licht in der gewünschten Weise. Zur Kontrastverstärkung ist auf den Phasenring im Objektiv noch ein absorbierendes Medium aufgebracht, welches das direkte ungebeugte Licht  $E_i$  so weit abschwächt, dass dessen Amplitude in der Größenordnung der Amplitude von  $E_d$  liegt.



# Kapitel 4

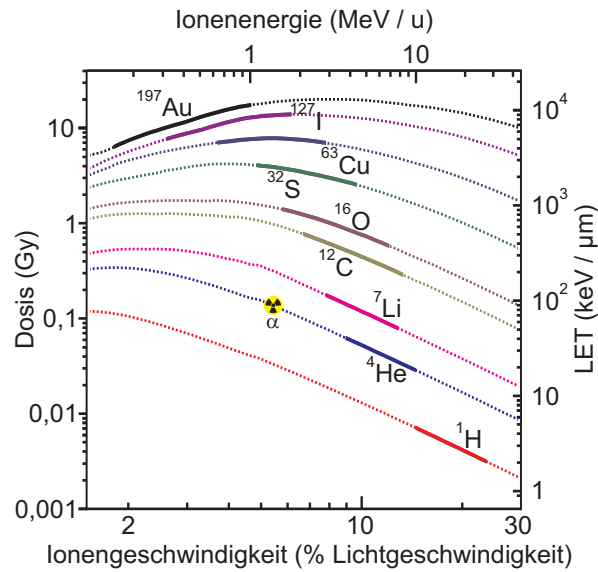
## Bestrahlungsaufbau

In diesem Kapitel soll die in dieser Arbeit entwickelte Experimentierumgebung für die Lebendzelleexperimente an SNAKE beschrieben werden. Zunächst wird auf die Strahlführung und den Aufbau des Rasterionenmikroskops SNAKE im Allgemeinen eingegangen. Dann folgt eine eingehende Betrachtung des Zellbestrahlungsplatzes und der dort installierten Lebendzellmikroskopie. Im Anschluss wird der Ablauf der Lebendzelleexperimente an SNAKE erläutert sowie die neue Experimentierumgebung charakterisiert.

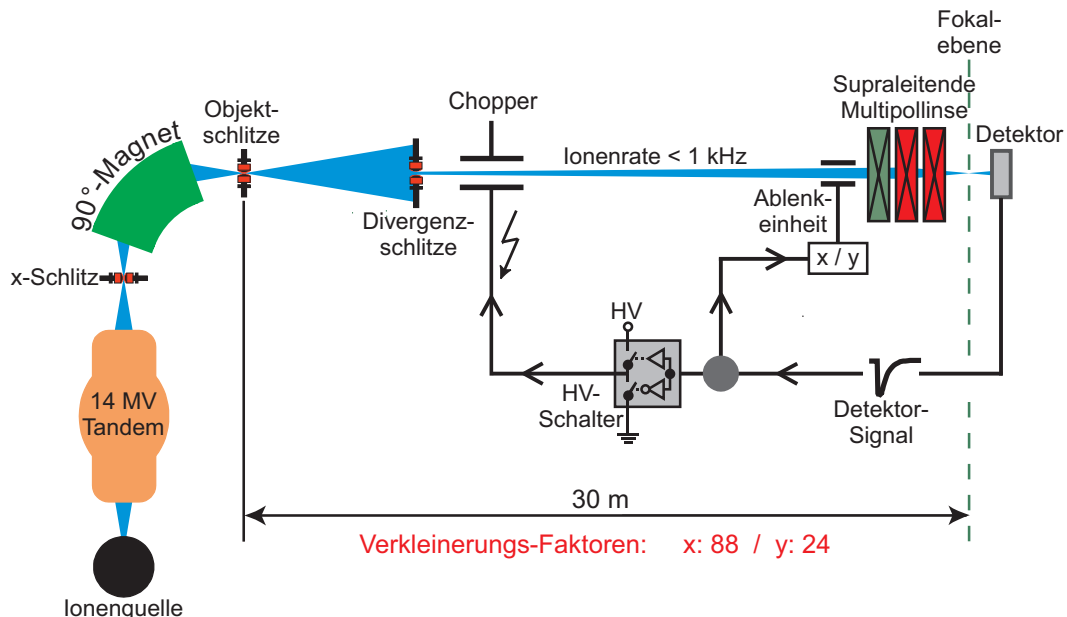
### 4.1 SNAKE Beamline

Das Rasterionenmikroskop SNAKE [80–82] am Münchner 14 MV-Tandembeschleuniger bietet die Möglichkeit, einen Ionenstrahl auf Strahlfleckgrößen von deutlich unter einem Mikrometer zu fokussieren. Der genaue Wert hängt von dem jeweiligen Einsatzbereich ab, der neben den Zellbestrahlungen noch Materialanalysen (wie z. B. hochauflösende Wasserstoffmikroskopie mittels Proton-Proton-Streuung [83]) und -modifikationen umfasst. Für Zellbestrahlungen, welche durch sehr geringen Strahlstrom und einer Bestrahlung an Luft charakterisiert sind, wurde er mit 100 MeV Sauerstoff-Ionen auf 550 nm in  $x$  und 400 nm in  $y$  (jeweils volle Halbwertsbreite) gemessen [6, 7]. Somit können auch Substrukturen eines Zellkerns, dessen Durchmesser typischerweise ca. 10  $\mu\text{m}$  beträgt, gezielt bestrahlt werden. Darüber hinaus prädestiniert das breite Ionenspektrum am Münchner Tandembeschleuniger SNAKE für Zellbestrahlungsexperimente: Durch Auswahl von Ionensorte und -energie lässt sich die pro Ion in der Zelle induzierte Dosis nahezu stufenlos innerhalb eines vier Größenordnungen umfassenden Bereichs von einigen mGy bis 10 Gy einstellen (s. Abb. 4.1) [17].

Die Strahlführung ohne Zwischenfokus, wie sie bei den Biologieexperimenten zum Einsatz kommt, ist in Abb. 4.2 skizziert. Einfach negativ geladene Ionen aus der Ionen-sputterquelle werden zum positiv geladenen Terminal in der Mitte des Van-de-Graaff-



**Abbildung 4.1:** An SNAKE verfügbares Ionenspektrum. Die gestrichelten Linien geben den LET-Wert  $dE/dx$  in Wasser und die pro Zellkern von einem Ion applizierte Dosis (berechnet für eine Zellkerndicke von  $7,5\ \mu\text{m}$  und ein Zellkernvolumen von  $715\ \mu\text{m}^3$ ) an, die durchgezogenen Bereiche markieren die an SNAKE verfügbaren Ionenenergien [5, 84].



**Abbildung 4.2:** SNAKE Strahlführung: Der Ionenstrahl wird mittels eines Schlitzsystems präpariert und von einer supraleitenden Multipollinse auf eine Strahlfleckgröße von ca.  $500\ \text{nm}$  fokussiert. Hinter den in der Fokalebene angebrachten Zellen registriert ein Detektor die Ionen. Dieser steuert einen als Beamswitch verwendeten Chopper zur Einzelionenpräparation und eine elektrostatische Ablenkeinheit, welche die laterale Position des Strahls definiert.

Beschleunigers hinbeschleunigt. Eine dort platzierte Kohlenstoff-Stripperfolie [85] lädt die Ionen (für Schwerionen i. d. R. mehrfach) positiv. Die positiven Ionen werden nun von dem Terminal abgestoßen, sodass die Terminalspannung ein zweites Mal genutzt werden kann. Die bei der Umladung statistisch verteilten Ladungszustände führen nach dem zweiten Durchlaufen der Beschleunigungsspannung zu verschiedenen Ionenenergien. Ein  $90^\circ$ -Analysiermagnet lässt nur Ionen mit der gewünschten magnetischen Steifigkeit (Quotient aus Impuls und Ladungszustand) passieren. Somit werden sowohl nicht erwünschte Ionenenergien als auch andere Ionensorten, die in der Quelle zusätzlich zum Nutzstrahl entstehen, herausgefiltert. In der Fokalebene des Analysiermagneten angebrachte Objektschlitze, die Teil eines für SNAKE entwickelten Mikroschlitzsystems [86] sind, beschneiden den Strahl auf einen Durchmesser von 10–20  $\mu\text{m}$ . Ein zweites Schlitzpaar limitiert die Divergenz des Strahls auf ca.  $\pm 10 \mu\text{rad}$ . Das Schlitzsystem verringert zusätzlich die relative Energieunschärfe  $\Delta E/E$  des Strahls auf unter  $10^{-5}$ . Eine supraleitende Multipollinse [87], die das Herzstück von SNAKE darstellt, bildet das von den Mikroschlitzen präparierte Objekt um einen Faktor 1/88 in  $x$  und 1/24 in  $y$  verkleinert in ihrer Fokalebene, wo sich der Zellbestrahlungsplatz befindet, ab.

## 4.2 Lebendzellumgebung am Bestrahlungsplatz

Die Anforderungen an die am Bestrahlungsplatz installierten Aufbauten sind für eine Onlinebeobachtung der Reparaturvorgänge nach Ionenbestrahlung in lebenden Zellen deutlich vielfältiger als für hier bereits durchgeführte „konventionelle“ Bestrahlungsexperimente<sup>(1)</sup> und sollen im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

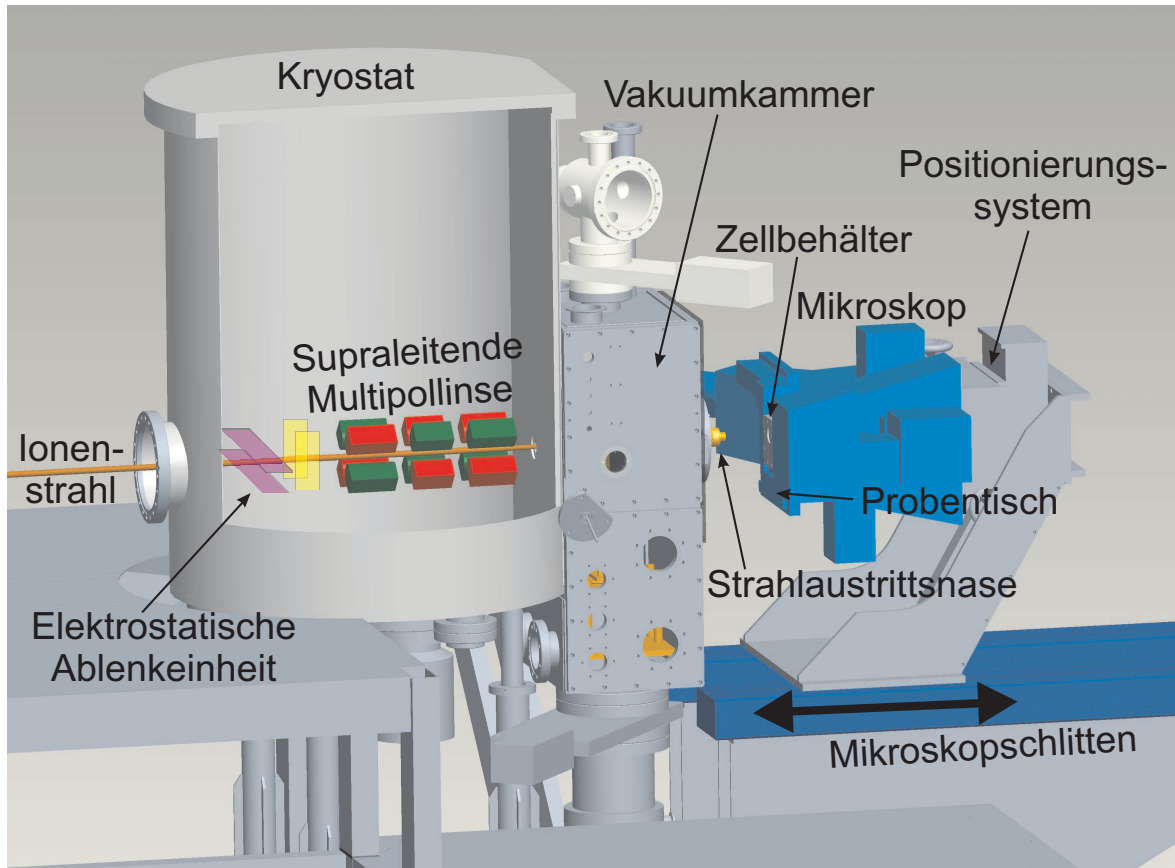
1. Um Prozesse wie Focibildung oder Dynamik GFP-markierter Reparaturproteine mit der nötigen Genauigkeit analysieren zu können, ist eine fluoreszenzmikroskopische Beobachtung mit einer optischen Auflösung nahe des Beugungslimits von ca. 250 nm nötig. Um diese zu erreichen, müssen die verwendeten Mikroskopkomponenten sowie das Substrat, auf dem die Zellen wachsen, höchste optische Qualität aufweisen. Ebenso ist eine präzise Abstimmung der einzelnen Komponenten aufeinander notwendig.
2. Da einige der untersuchten GFP-markierten Zelllinien ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal aufweisen, sind eine hohe Lichtempfindlichkeit bzw. -stärke der verwendeten Mikroskopkomponenten ebenso essentiell wie eine hohe Auflösung.

---

<sup>(1)</sup>Hier im Sprachgebrauch als Gegensatz zu den Lebendzellexperimenten für Immunofluoreszenzexperimente, bei denen an SNAKE nur die Bestrahlung stattfindet [5, 84].

3. Zur nachträglichen Analyse der Reparaturvorgänge im Zellkern ist eine Erfassung und Speicherung der Bilddaten mittels Kamera notwendig. Dabei ist eine computergesteuerte Aufnahme von Zeitserien hilfreich. An die verwendete Kamera sind bezüglich Auflösung und Lichtempfindlichkeit ebenso hohe Ansprüche zu stellen wie an die restlichen Mikroskopkomponenten.
4. Bei der Mikroskopie muss die in Abschnitt 3.1 bereits erwähnte Phototoxizität berücksichtigt werden, also das licht- und insb. UV-bedingte Absterben der Zellen. Dies beeinflusst die Wahl einer geeigneten Beleuchtungsquelle maßgeblich.
5. Nicht nur hinsichtlich der Phototoxizität müssen die Zellen für die Dauer der Beobachtung ideale Wachstumsbedingungen vorfinden. Auch eine konstante Umgebungstemperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  sowie permanenter Kontakt zu einem Nährmedium ist unbedingt notwendig. Des Weiteren darf der pH-Wert des Mediums 7,2 bis 7,4 nicht über- oder unterschreiten [47].
6. Da der Strahltransport unter Vakuumbedingungen geschieht, die Zellen jedoch bei Atmosphärendruck bestrahlt werden, muss ein Strahlaustritt vom Vakuum an Luft realisiert werden.
7. Um die mit SNAKE mögliche Strahlauflösung von ca.  $0,5\ \mu\text{m}$  bei der Zellbestrahlung tatsächlich zu erreichen, soll der Strahl bis zu den Zellen möglichst wenig Materie durchdringen. Diese Vorgabe führt dazu, dass das eben genannte Strahlaustrittsfenster aus einem möglichst dünnen Material bestehen soll, und beeinflusst zudem maßgeblich die Konstruktion der Zellkulturgefäße hinsichtlich Ioneneintritt und Menge des die Zellen umgebenden Nährmediums.
8. Um den prinzipiellen Vorteil der Ionenbestrahlung, dass die pro Ion applizierte Dosis genau bekannt ist, nutzen zu können, muss die Zahl der bestrahlenden Ionen zuverlässig einstellbar sein. Dafür sorgt eine für die Zellbestrahlungen entwickelte Einzelionenpräparation. Der dafür nötige Ionennachweis soll *hinter* den Zellen erfolgen, da ein Durchflugdetektor vor den Zellen die Strahlauflösung verschlechtern würde. Ein Nachweis der ohnehin am Strahlaustrittsfenster entstehenden Sekundärelektronen ist bei leichten Elementen mit geringem LET (vgl. Abb. 4.1) problematisch, da hier nur wenige Sekundärelektronen, bei hochenergetischen Protonen im Mittel weniger als ein Elektron pro Ion, erzeugt werden.
9. Zur Untersuchung der Morphologie der Zellen sowie zur Zielauswahl ist neben der Fluoreszenzmikroskopie auch eine Phasenkontrastmikroskopie vonnöten.



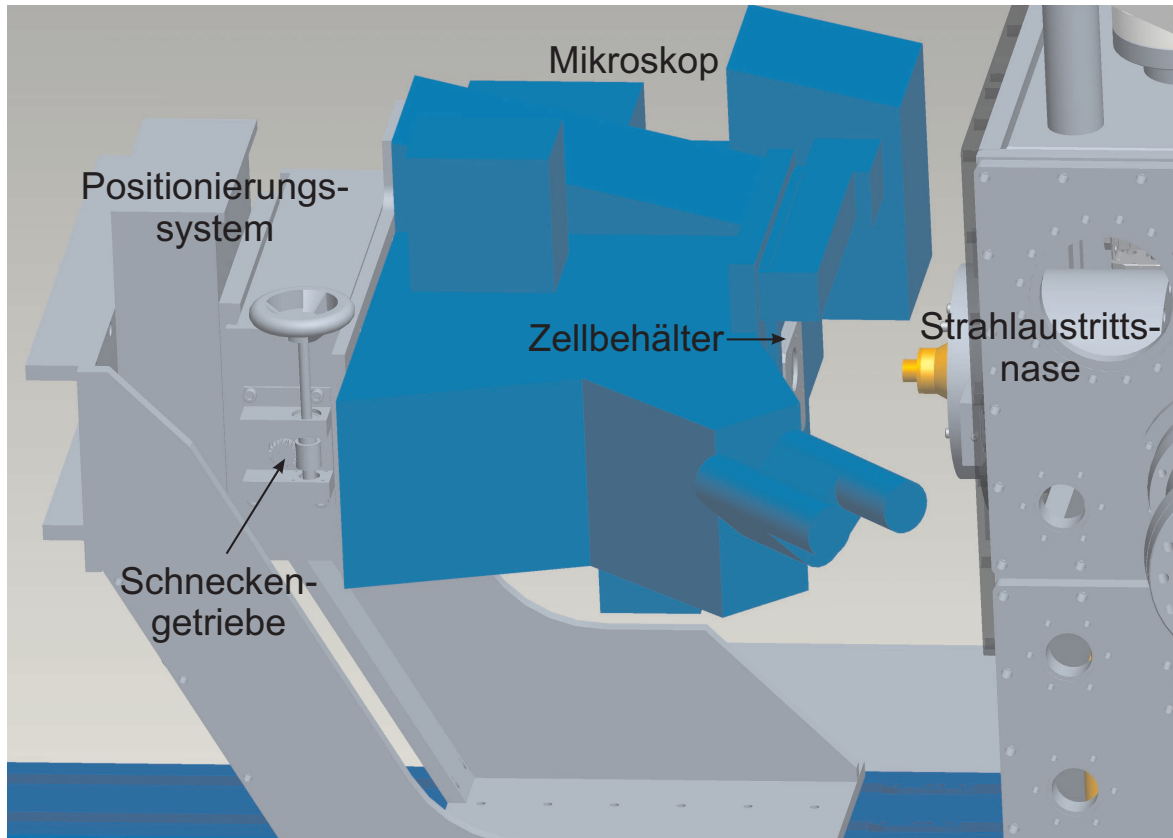


**Abbildung 4.3:** CAD-Zeichnung des SNAKE Bestrahlungsplatzes. In einem Heliumbadkryostaten befindet sich die supraleitende Multipollinse. Der von der Linse fokussierte Ionenstrahl verlässt an der Strahlaustrittsnase durch eine  $7,5\ \mu\text{m}$  dicke Kaptonfolie das Vakuum der Strahlführung und bestrahlt die Zellen, die in eigens entwickelten Zellkammern auf dem Probentisch eines um  $90^\circ$  gestürzt angebrachten Fluoreszenzmikroskops wachsen. Das Mikroskop kann durch einen motorisierten Schlitten entlang der Strahlachse verfahren werden.

Die Umsetzung dieser Anforderungen an den Bestrahlungs- und Beobachtungsaufbau wird in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben. Eine CAD-Zeichnung des Bestrahlungsplatzes ist in Abb. 4.3 und 4.4 zu sehen, die wesentlichen Prinzipien werden in Abb. 4.5 veranschaulicht.

### 4.2.1 Mikroskopie

Als erstes soll auf die neu installierte Mikroskopieumgebung eingegangen werden, welche die erforderlichen Anforderungen hinsichtlich Auflösung etc. erfüllt.

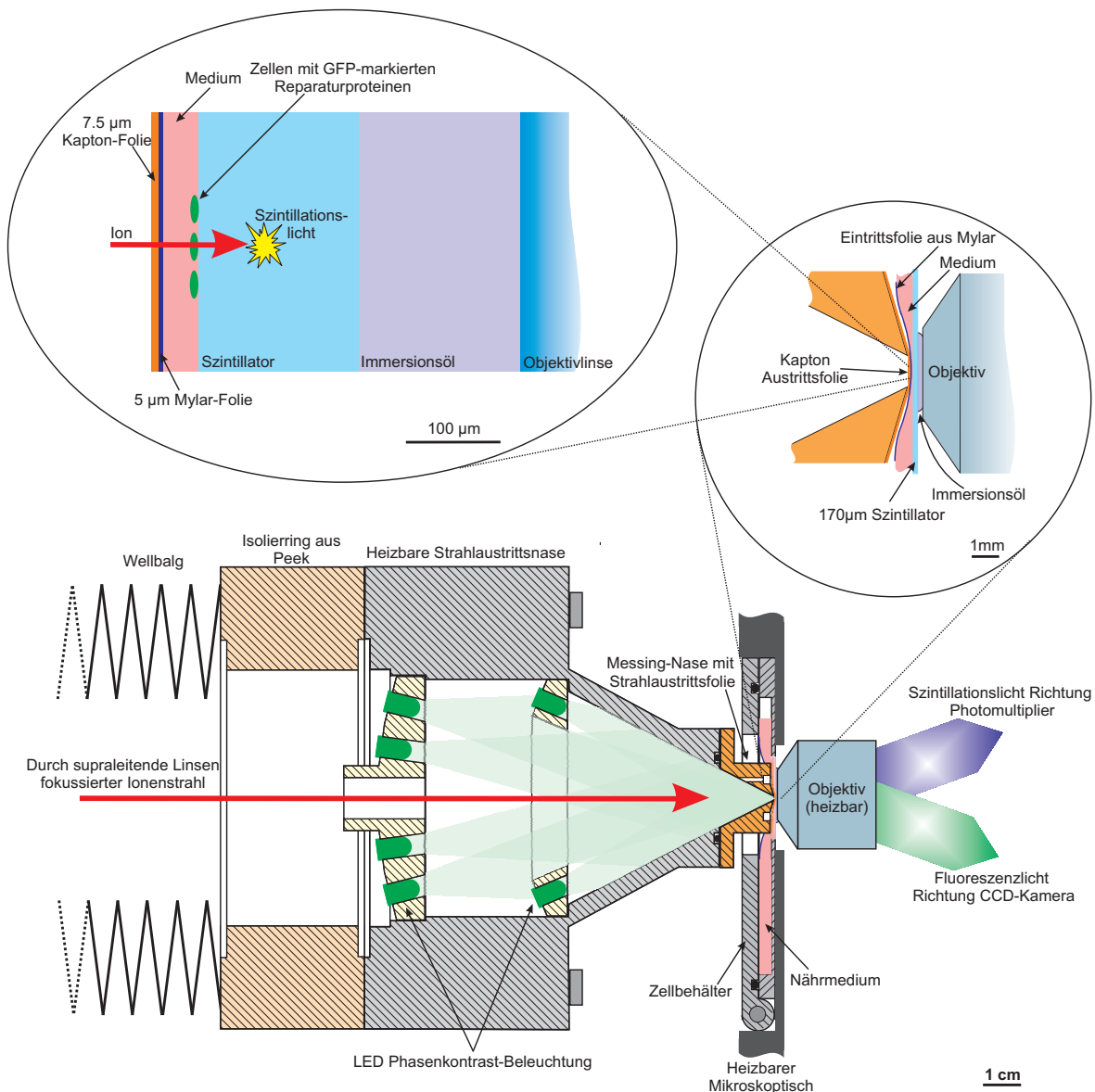


**Abbildung 4.4:** Der Großteil des Volumens der Strahlaustrittsnase ist in der für Wasserstoffmikroskopie [83] verwendeten Vakuum-Targetkammer [88] versenkt. Deutlich ist auch das Positionierungssystem bestehend aus zwei Lineartischen und Schneckengetrieben, die eine präzise Positionierung über zwei Handräder ermöglichen, zu erkennen.

#### 4.2.1.1 Stativ

Ein motorisiertes, inverses Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M (Fa. Carl Zeiss AG, Oberkochen) wurde um  $90^\circ$  gestürzt am Ende der SNAKE Strahlführung angebracht. Um das Sichtfeld des Mikroskops mittig zum Strahl ausrichten zu können, befindet es sich auf einem x-y-Positionierungssystem (Fa. Isel, Eichenzell). Durch die Nachrüstung von zwei selbsthemmenden Schneckengetrieben mit einer Untersetzung von 10 wurde dessen Präzision auf ca.  $1\ \mu\text{m}$  erhöht (s. Abb. 4.4). Die Mikroskophalterung selbst befindet sich auf zwei motorisierten Lineartischen, sodass das Mikroskop um ca. 1 m entlang der Strahlachse in  $1,6\ \mu\text{m}$ -Schritten verfahren werden kann.

Die Motorisierung des Mikroskops bietet die Möglichkeit, rechnerbasiert mittels der Zeiss Mikroskopsteuerungs-Software AxioVision Zeitserien der Proben aufzunehmen. Diese können, um den unterschiedlichen Geschwindigkeiten verschiedener Vorgänge in der Zelle gerecht zu werden, auch mehrere Zeitintervalle umfassen, sodass



**Abbildung 4.5:** Maßstabsgetreue Skizze des SNAKE Lebendzellsetups [89]: Das Mikroskop wird zur Zellbestrahlung so nahe an die beheizbare Strahlaustrittsnase gefahren, dass die Ionen vom Strahlaustritt bis zu den Zellen ca.  $30\ \mu\text{m}$  zurücklegen müssen. Die Zellen wachsen von Nährmedium umgeben auf einem  $170\ \mu\text{m}$  dicken Plastiksintillator an der Rückseite von neu entwickelten Zellbehältern. Bei der Bestrahlung werden die Ionen hinter den Zellen im Szintillator gestoppt. Das dabei emittierte Licht wird von dem Objektiv hinter dem Szintillator aufgenommen und über den Strahlengang des Mikroskops auf einen Photomultiplier geleitet. Die von dem Photomultiplier generierten elektrischen Signale werden für die Einzelionenpräparation weiterverarbeitet. Nach Bestrahlung kann in weniger als einer Sekunde von Ionendetektion auf Fluoreszenzmikroskopie umgeschaltet und die Reparaturvorgänge der bestrahlten Zellkerne beobachtet werden. Eine in die Strahlaustrittsnase integrierte Beleuchtung aus LED-Ringen ermöglicht in Kombination mit geeigneten Objektiven neben der Fluoreszenzmikroskopie auch die Visualisierung der Zellen mittels Phasenkontrast.

z. B. innerhalb der ersten Minute sekundlich eine Aufnahme gemacht wird, dann innerhalb der nächsten zehn Minuten alle 15 Sekunden und schließlich für drei Stunden jede Minute. Pro Zeitpunkt können Aufnahmen in verschiedenen Farbkanälen (also von verschiedenen Proteinen, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen markiert wurden) gemacht werden, Bildstapel aufgenommen werden und durch einen motorisierten Scanningtisch auch mehrere Bereiche der Probe untersucht werden. Ein softwarebasierter Autofokus sorgt auch bei langen Zeitserien, in denen es z. B. temperaturbedingt zu einer Verschiebung des Fokus kommen kann (man spricht von „z-Shift“, 1 °C bewirkt eine Verschiebung von bis zu 0,5 µm.), für durchgängig scharfe Aufnahmen.

Ein Apotome zur Unterdrückung von diffusem Licht aus Ebenen außerhalb des aktuellen Fokus (s. Kap. 3.4.4.3) ist ebenfalls vorhanden, wurde jedoch selten genutzt, da sich das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis der momentan noch sehr leuchtschwachen verwendeten GFP-Konstrukten durch das Apotome weiter verringert.

#### 4.2.1.2 Objektive

Um die teils sehr schwachen Signale der GFP-markierten Zellkerne effizient detektieren zu können, sollen möglichst lichtstarke Objektive zum Einsatz kommen. Voraussetzung hierfür ist eine hohe numerische Apertur (s. Kap. 3.4.3). Diese wird, wie in Kap. 3.4.2 gezeigt, insbesondere von Immersionsobjektiven, bei denen sich zwischen Linse und Präparat ein Medium mit Brechungsindex  $n > 1$  befindet, erreicht. Fast alle dieser Objektive sind so gefertigt, dass sie mit einem Deckglas von 170 µm Dicke zwischen Objektiv und Probe die geringsten Aberrationen aufweisen. Da jedoch, wie in Absatz 4.2.2 erläutert wird, am SNAKE Lebendzellaufbau kein Deckglas aus Glas verwendet werden kann, wird für die am häufigsten verwendete 63-fache Vergrößerung ein Zeiss „LCI Plan-Neofluar 63x/1.3 Imm Korr Ph3“ mit einer numerischen Apertur von 1,3 verwendet, welches mittels eines Korrekturrings eine optische Anpassung an den Brechungsindex und die Dicke des Zellsubstrats sowie an die Temperatur des Immersionsmediums erlaubt. Als Immersionsmedium eignen sich bei diesem Objektiv entweder Wasser bzw. spezielles Wasserimmersionsöl (z. B. Zeiss Immersol W, welches den gleichen Brechungsindex wie Wasser aber eine höhere Viskosität aufweist), oder (Immersions-)Glyzerin, wobei an SNAKE letzteres verwendet wird. Grund hierfür ist die nochmals etwas höhere Viskosität des Glyzerins gegenüber dem Wasserimmersionsöl, welche die Langzeitstabilität des gebildeten Meniskus zwischen Objektivlinse und Zellsubstrat etwas erhöht. Denn diese Stabilität ist beim Einsatz eines „liegenden“ Mikroskops nicht immer gegeben, und ein Abreißen des Ölfilms während des Mikroskopievorgangs verschlechtert Auflösung und Lichtstärke erheblich. Dies und das umständliche und unpräzise Auftragen des Immersionsmediums sind der Grund, warum im Laufe

dieser Arbeit auch immer häufiger ein 40-fach Luftobjektiv Zeiss „Plan-Apochromat 40x/0.95 Korr Ph3“ verwendet wurde. Dieses lässt sich ebenfalls mittels eines Korrekturringes auf das verwendete Zellsubstrat optimieren und weist mit 0,95 die maximale in der Praxis erreichbare numerische Apertur für Luftobjektive auf. Obwohl das LCI Plan-Neofluar bei optimalen Immersionsbedingungen sowohl theoretisch gemäß Formel (3.14) als auch in der Praxis die etwas höhere Lichtstärke aufweist, überzeugt das Plan-Apochromat durch sein unkompliziertes Handling und die konstante Qualität der damit erzielbaren Aufnahmen.

Des Weiteren stehen noch folgende Objektive zur Verfügung, die jedoch nicht für die Probenuntersuchung sondern nur zu Positionierungszwecken, der Strahlfokussierung etc. genutzt werden: Ein 40-fach Long Distance Objektiv Zeiss „LD Plan-Neofluar 40x/0,60 Korr Ph2“, welches mit einer numerischen Apertur von 0,6 deutlich lichtschwächer und deshalb für Fluoreszenzuntersuchungen weniger geeignet als das Plan-Apochromat ist, dafür durch seinen Arbeitsabstand von 2,9 mm auch noch die optische Strahlfokussierung auf einem 2 mm dicken CsI-Kristall erlaubt, ein „LD A-Plan 20x/0,30 Ph1“ mit 20-facher Vergrößerung und ein 2,5-fach vergrößerndes „Plan-Neofluar 2,5x/0,075“. Die Daten der verwendeten Objektive sind in Tabelle 4.1 noch einmal zusammengefasst.

#### 4.2.1.3 Kameras

Die Mikroskopbilder werden mit einer Zeiss AxioCam MRm Schwarz-Weiß-Kamera, deren technische Daten in Tabelle 4.2 zusammengefasst sind, aufgenommen. Die Kamera befindet sich am Sideport des Mikroskops, wobei ein Adapter mit einer Verkleinerung von 0,63 zwischen Kamera und Sideport angebracht ist, um das Verhältnis von Signalstärke zu Kamerarauschen bei den teils sehr schwachen GFP-Signalen zu erhöhen. Der Adapter bewirkt, dass mehr Licht auf einen Pixel des CCD-Chips trifft. Darüber hinaus wird das Gesichtsfeld der Kamera vergrößert. Allerdings sind die in Tabelle 4.1 eingetragenen Auflösungen mit dem Adapter nicht zu erreichen. Bei einer Pixelgröße von  $6,45 \mu\text{m} \times 6,45 \mu\text{m}$  liegt die Auflösung mit Adapter für ein 63-fach vergrößerndes Objektiv Nyquist-begrenzt (s. Kap. 3.4.2) bei 325 nm, für ein 40x-Objektiv bei 510 nm.

Für die in Abschnitt 4.3 beschriebene optische Strahlfokussierung und -positionierung ist über einen Umschaltspiegel noch eine Standard-Videokamera (MTV-12V6HC-EX) am selben Port montiert. Denn für diese Arbeiten ist eine Videokamera besser geeignet als die für die Aufnahme von Einzelbildern konzipierte AxioCam. Die Videokamera kann zur Strahlfokussierung an einen beliebigen Videomonitor angeschlossen werden, während die AxioCam ihre Daten an einen mit spezieller PCI-Karte ausgestatteten PC liefert. Eine bei kurzen Wellenlängen höhere Empfindlichkeit des

Objektiv	Vergrößerung	Immersion	Phasenkontrast
LCI Plan-Neofluar	63 x	Wasser / Glyzerin	Ph3
Plan-Apochromat	40 x	—	Ph3
LD Plan-Neofluar	40 x	—	Ph2
LD A-Plan	20 x	—	Ph1
Plan-Neofluar	2,5 x	—	—
Objektiv	NA	Auflösung	Schärfentiefe
LCI Plan-Neofluar	1,3	235 nm	393 nm <sup>(1)</sup>
Plan-Apochromat	0,95	321 nm	554 nm
LD Plan-Neofluar	0,6	508 nm	1,39 µm
LD A-Plan	0,3	1017 nm	5,56 µm
Plan-Neofluar	0,075	4067 nm	88,9 µm
Objektiv	Arbeitsabstand	Deckglasdicke	Max. Transmission
LCI Plan-Neofluar	0,17 mm	0,15 - 0,19 mm <sup>(2)</sup>	ca. 85% <sup>(3)</sup>
Plan-Apochromat	0,25 mm	0,13 - 0,21 mm <sup>(2)</sup>	k. A.
LD Plan-Neofluar	2,9 mm	0 - 1,5 mm <sup>(2)</sup>	ca. 89%
LD A-Plan	4,2 mm	0 - 2 mm	ca. 90%
Plan-Neofluar	9,3 mm	0,17 mm	ca. 98%
Objektiv	Einsatz/Bemerkungen		
LCI Plan-Neofluar	Höchste Auflösung und Lichtstärke, wg. Immersion aufwendig		
Plan-Apochromat	Hohe Auflösung und Lichtstärke, einfache Handhabung		
LD Plan-Neofluar	Für Strahlfokussierung und Positionierung		
LD A-Plan	Für Strahlfokussierung und Positionierung		
Plan-Neofluar	Für Strahlfokussierung und Positionierung		

**Tabelle 4.1:** Technische Daten der an SNAKE verwendeten Zeiss-Objektive. Die Angaben sind den jeweiligen Datenblättern entnommen. Lediglich die theoretische Auflösung (nach Rayleigh) und Schärfentiefe wurden gemäß den in Kapitel 3.4 eingeführten Formeln aus der numerischen Apertur NA für eine Wellenlänge von 500 nm berechnet. Zeiss unterteilt seine Phasenkontrastobjektive in drei Klassen, Ph1, Ph2 und Ph3, die sich in der Größe des Phasenringes und somit im idealen Beleuchtungswinkel unterscheiden, wobei der Beleuchtungswinkel mit höherer Klasse stumpfer wird. Um welche Klasse es sich handelt, ist für jedes Objektiv im Feld „Phasenkontrast“ angegeben.

Hinweise: (1) Für Wasserimmersion, also  $n = 1,33$ . (2) Über Korrekturring einstellbar.

(3) Für Phasenkontrastobjektiv k. A., deshalb hier der ca. 10% höhere Wert der DIC-Variante ohne lichtabschwächenden Phasenring.

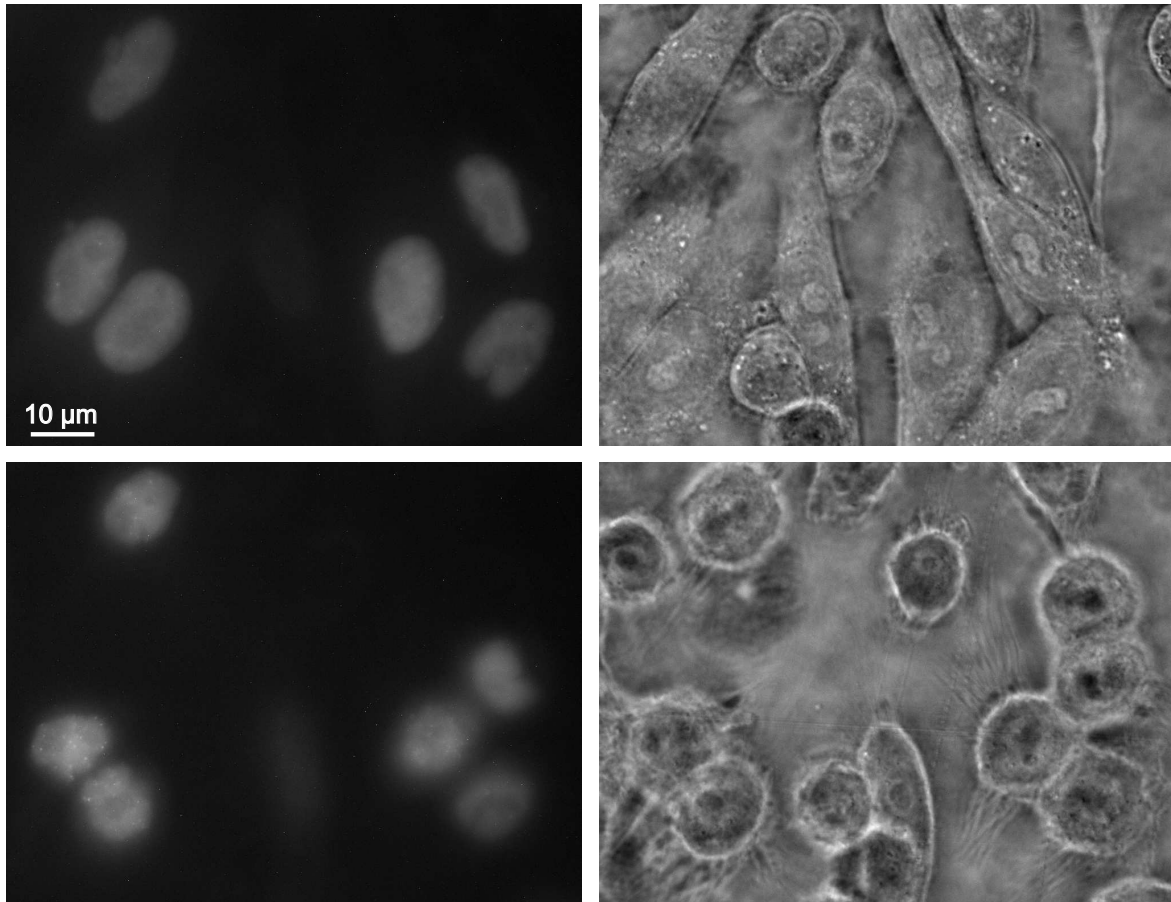
	<b>AxioCam MRm</b>	<b>MTV-12V6HC-EX</b>
<b>CCD-Chip</b>	Sony ICX 285	ICX429ALL (EXview)
<b>CCD-Kühlung</b>	Peltier, einstufig	k. A.
<b>Chip-Abmessungen</b>	8,9 mm x 6,7 mm	7,40 mm x 5,95 mm
<b>CCD Basisauflösung</b>	1388 x 1040 Pixel	752 x 582 Pixel
<b>Pixelgröße</b>	6,45 $\mu\text{m}$ x 6,45 $\mu\text{m}$	8,6 $\mu\text{m}$ x 8,3 $\mu\text{m}$
<b>Digitalisierung</b>	12 Bit	k. A.
<b>Spektrale Empfindlichkeit</b>	ca. 350 nm - 1000 nm	ca. 330 nm - 1000 nm
<b>Max. Quantenausbeute</b>	ca. 65%	k. A.
<b>Max. Livebildrate</b>	13 Bilder/s	50 Bilder/s
<b>Anschluss</b>	RJ45 an PCI-Karte	Composite Video

**Tabelle 4.2:** Technische Daten der an SNAKE verwendeten Kameras. Die Werte wurden den Datenblättern der Kameras und verwendeten CCD-Chips entnommen.

in der Videokamera verwendeten CCD-Chips ermöglicht auch die optische Positionierung des Ionenstrahls auf dem als Zellsubstrat verwendeten Plastiksziintillators (vgl. Kap. 4.2.2 sowie Abb. 4.5). Dessen schwaches Szintillationslicht hat eine Wellenlänge von 391 nm und ist mit der AxioCam, die bei dieser Wellenlänge nur noch 40% ihrer maximalen Empfindlichkeit aufweist, nicht mehr sichtbar. Die verwendete Videokamera erreicht bei dieser Wellenlänge noch über 50% ihrer maximalen Empfindlichkeit, was zusammen mit der integrierten Signalverstärkung ausreicht, um den Strahlfleck sichtbar zu machen.

#### 4.2.1.4 Lichtquellen

Für Fluoreszenzmikroskopie stehen mehrere Beleuchtungsquellen zur Verfügung. Die ersten Lebendzell-Experimente wurden mit einer Quecksilberdampfampe (Zeiss HBO 100) durchgeführt. Allerdings konnten damit die in Kap. 3.4.1 beschriebenen Probleme durch erhöhte Phototoxizität aufgrund des hohen UV-Anteils des Quecksilberspektrums deutlich nachvollzogen werden. Dies zeigt Abb. 4.6. Oben links sieht man eine Fluoreszenzaufnahme von HeLa-Zellkernen, deren Reparaturprotein Rad52 GFP-markiert ist. Da das Protein über den gesamten Zellkern verteilt ist, ist dessen Struktur jeweils deutlich erkennbar. Rechts oben wird der selbe Ausschnitt mittels Phasenkontrastmikroskopie abgebildet. Man erkennt die länglichen HeLa-Zellen, deren Anzahl höher ist als die der sichtbaren Kerne im linken Bild, da die Effizienz der GFP-Markierung i. d. R. unter 100% liegt. Die untere Hälfte der Abbildung dokumentiert das Absterben der Zellen nach 100 Belichtungen mit der Quecksilberlampe. Ein Ablösen der Zellen vom Substrat verändert deren Fokusposition, was sich in der deutlich



**Abbildung 4.6:** *Oben: Zellen, deren Reparaturprotein Rad52 GFP-markiert ist, zeigen im Fluoreszenz- und Phasenkontrast normale Morphologie. Bei Fluoreszenzmikroskopie sind nur die Zellkerne durch das darin verteilte Reparaturprotein sichtbar, der Phasenkontrast zeigt die gesamten Zellen.*

*Unten: Durch die toxische Wirkung des UV-Anteils der Mikroskopbeleuchtung hat sich das Erscheinungsbild der Zellen stark verändert.*

erkennbaren Unschärfe einiger Kerne zeigt. Auch die verminderte Größe der Zellkerne macht den schlechten Zustand der Zellen deutlich. Im Phasenkontrast erkennt man, dass sich die anfangs länglichen Zellen durch die Beleuchtung eine eher kugelförmige Gestalt angenommen haben. Auch die von den Zellen weglaufenden „Fäden“ deuten auf ein Absterben der Zellen hin.

Die Zahl der erzielbaren Aufnahmen, bevor die Zellen absterben, konnte durch einen zusätzlich zum Anregungsfilter in den Mikroskop-Strahlengang eingebrachten UV-Langpassfilter (3rd Millennium, Fa. Omega Optical, Brattleboro, VT, USA, Vertrieb durch Laser Components, Olching) deutlich erhöht werden. Der Filter sperrt ab  $\lambda_{cut} = 450 \text{ nm}$  und weist eine Blockung deutlich über OD5 auf. OD steht für „optical



density“ und  $ODx$  bedeutet:

$$ODx \Leftrightarrow -\log \frac{I}{I_0} = x \quad (4.1)$$

Die Kantensteilheit liegt bei 3%, d. h.  $OD5$  wird ab  $\lambda_{cut} - 0,03 \cdot \lambda_{cut}$  erreicht.  $\lambda_{cut}$  des Filters wurde so gewählt, dass die Anregung von GFP gerade noch möglich ist. Für die Anregung kurzwelligerer Farbstoffe wie DAPI muss der Filter entfernt werden. Die in [57] beschriebene Lösung für das Phototoxizitätsproblem, zusätzlich zur Verwendung von UV-Filtern die Quecksilber- durch eine Halogenlampe zu ersetzen, welche normalerweise für gewöhnliche Auflichtuntersuchungen ohne Fluoreszenz bzw. für Durchlichtbeleuchtung bestimmt ist, erwies sich an SNAKE als nicht praktikabel. Die Zahl der möglichen Aufnahmen wird zwar weiter gesteigert aber die damit erzielbaren Signale aus den vorliegenden GFP-Konstrukten sind so schwach, dass sie durch das Okular nicht erkennbar sind und die aufgenommenen Bilddaten selbst bei maximaler Belichtungszeit der AxioCam von 20 Sekunden ein für quantitative Auswertungen nicht tolerables Signal-zu-Untergrund-Verhältnis aufweisen. Eine weitere Erhöhung der erzielbaren Aufnahmen ohne diese Nachteile wird mit einer kommerziellen Fluoreszenzlichtquelle auf LED-Basis (Zeiss Colibri) erreicht. Deren nutzbare Helligkeit ist für GFP mit der einer Quecksilberlampe zu vergleichen<sup>(2)</sup>. Diese an SNAKE gewonnene subjektive Einschätzung wird von Messungen der Lichtleistung pro Fläche in der Fokusebene des Objektivs mittels eines Photodioden-basierten Radiometers bestätigt [90]. Aufgrund des schmalen Frequenzbandes der Leuchtdioden (typische FWHM-Werte sind 20-70 nm [91]) geht die UV-Belastung der Zellen bei der LED-Beleuchtung gegen Null. So wurden durch die Verwendung des Colibri an SNAKE lange Zeitserien mit kurzen Intervallen zwischen zwei Belichtungen möglich.

Die starke Verminderung der Phototoxizitätsprobleme durch den Colibri dokumentiert Abb. 4.7. Das große mittige Bild dort wurde 200 min nach Ionenbestrahlung des umrandeten Bereichs aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt wurden von diesem Bildausschnitt schon 102 Aufnahmen mit einer Belichtungszeit, die die Untergrenze der Beleuchtungszeit darstellt, von 442 ms aufgenommen. Ab dann wurde alle 10 min eine weitere Aufnahme mit gleicher Belichtungszeit gemacht. Trotz dieser häufigen Bildakquise mit dem Colibri erkennt man zwei Mitosen (Zellteilungen, Zellen mit „1“ und „2“ markiert), deren Verlauf in den Zeitserien über- und unterhalb der Übersichtsaufnahme dokumentiert ist. Bei einem durch die Beleuchtung negativ beeinflussten Stoffwechsel der Zellen wären keine Zellteilungen zu beobachten.

---

<sup>(2)</sup>Dabei ist natürlich nicht die über alle Wellenlängen aufintegrierte Helligkeit ausschlaggebend sondern die innerhalb des für die Anregung der Fluoreszenzproteine benötigten Frequenzbandes.

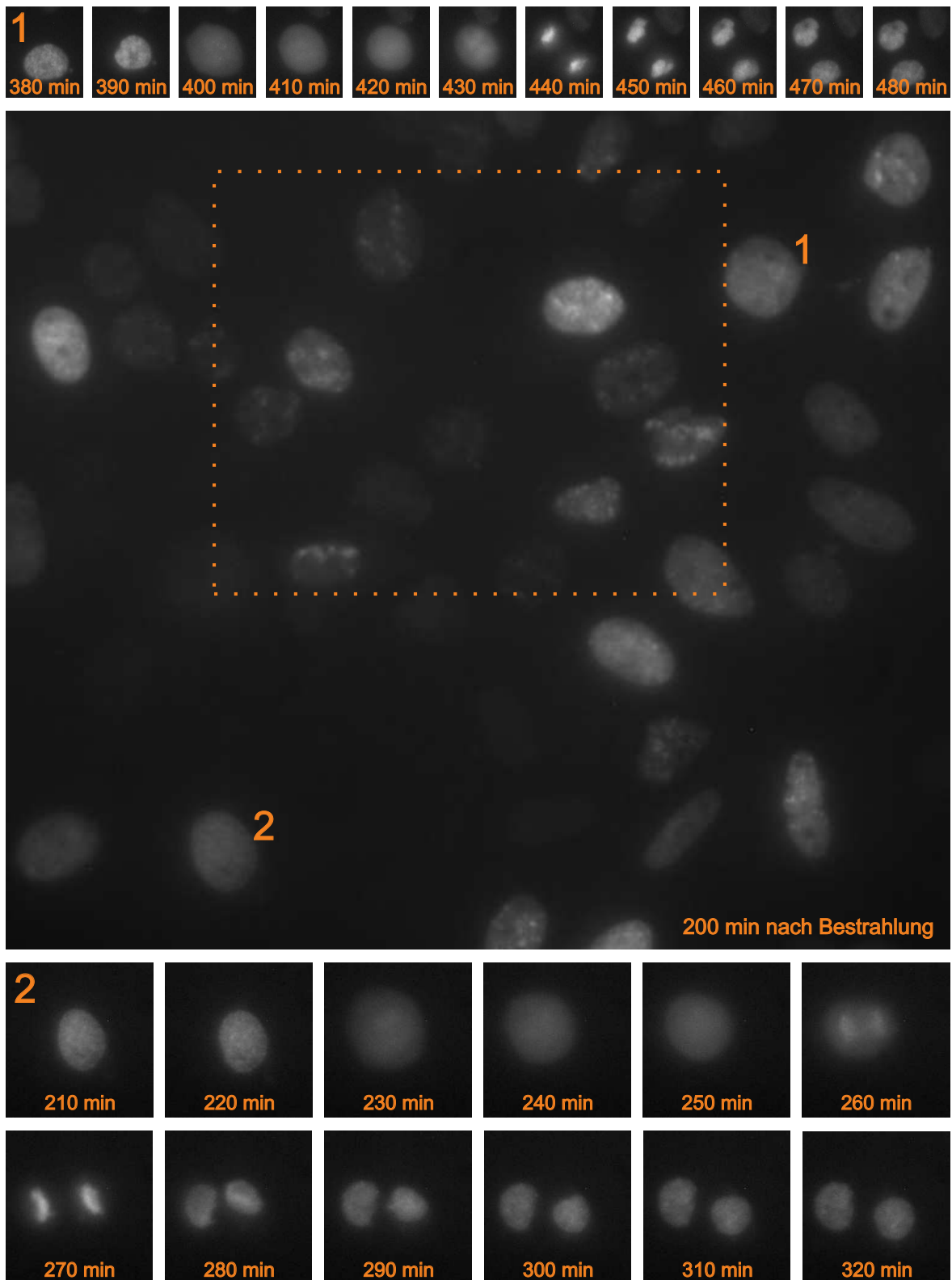


Abbildung 4.7: Mitosen zweier Zellen (1 und 2) in direkter Nähe zum bestrahlten Bereich (umrandet).

Weitere Vorteile der LED-Beleuchtung bestehen in einer zeitlich konstanteren Helligkeit als sie eine Quecksilberdampfampe bietet und einem gleichmäßig ausgeleuchteten Gesichtsfeld, welches mit der Quecksilberlampe – wenn überhaupt – nur bei sehr sorgfältiger Justage erreicht werden kann [91]. Ein großer Unterschied zu Quecksilberdampflampen ergibt sich auch in den Schaltzeiten: Während diese einige Minuten benötigen, um ihre volle Helligkeit zu entfalten und eine zeitlich möglichst stabile Ausleuchtung zu gewähren, und erst nach einer Mindestleuchtdauer von 30 Minuten wieder ausgeschaltet werden dürfen, um ihre Lebensdauer nicht zu verkürzen [56], können LEDs innerhalb von Mikrosekunden ein- und ausgeschaltet werden [68]. Dadurch kann bei LED-Beleuchtung auf einen mechanischen Shutter, wie er bei konventioneller Beleuchtung zum Einsatz kommt, verzichtet werden<sup>(3)</sup>. Dadurch werden störende Vibrationen während der Bildaufnahme verhindert und der Verschleiß verringert. Da die verwendeten Shutter Schaltzeiten im Bereich von 10 bis 100 ms aufweisen [68], verringert die LED-Beleuchtung die Lichtexposition der Probe insbesondere bei hellen Präparaten, die nur Belichtungszeiten von wenigen Millisekunden erfordern, signifikant, was sich wiederum günstig auf die mögliche Zahl der Aufnahmen, bevor Phototoxizitätseffekte oder Bleaching auftreten, auswirkt<sup>(4)</sup>. Die Lebensdauer einer LED von über 10000 Stunden übertrifft die einer Quecksilberlampe von 200–400 Stunden ebenfalls deutlich [91], insbesondere wenn man berücksichtigt, dass die LED nur während der Bildaufnahme, die Lampe hingegen kontinuierlich leuchtet. Als Preis für all diese Vorteile muss für jede Anregungswellenlänge ein eigenes LED-Modul erworben werden. Einige Farbstoffe/Fluoreszenzproteine bleiben außen vor, da es für ihre Anregung (noch) keine kommerziellen LEDs mit entsprechender Leuchtstärke gibt. Davon betroffen sind besonders Farbstoffe, die grünes Anregungslicht erfordern.

Neben den genannten Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie steht auch noch eine LED-Phasenkontrastbeleuchtung zur Verfügung. Diese ist in die Strahlaustrittsnase integriert und wird in Abschnitt 4.2.4 näher behandelt.

#### 4.2.1.5 Probentemperierung

Für aussagekräftige Lebendzelleexperimente ist einer Temperierung der Proben auf 37°C unabdingbar. Darum ist der schon erwähnte motorisierte Scanningtisch mit einem Heizeinsatz ausgestattet, der für die Dauer der Bestrahlung und den Beob-

---

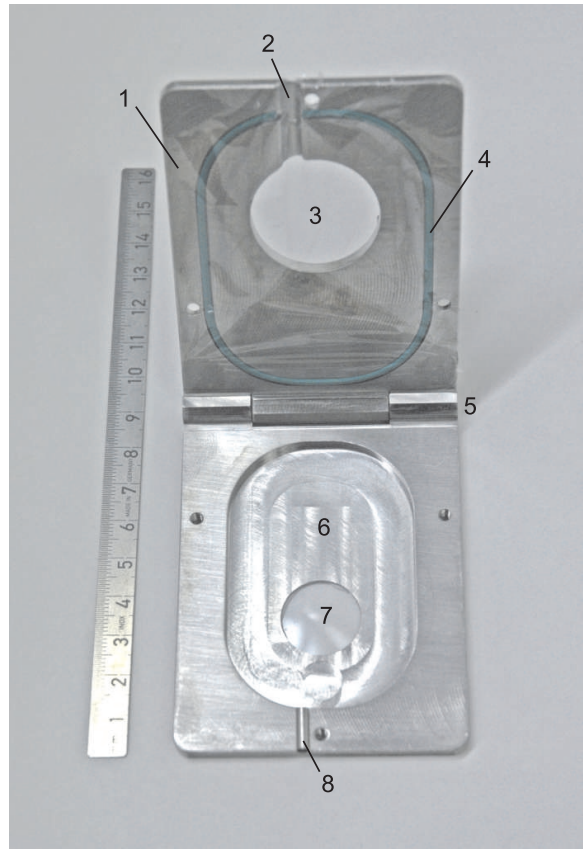
<sup>(3)</sup>Damit auch andere Beleuchtungsarten möglich sind, ist typischerweise ein Shutter trotzdem vorhanden, bleibt aber geöffnet.

<sup>(4)</sup>Nicht nur der UV-Anteil der Beleuchtung hat toxische Wirkung auf die Zellen. UV und IR zeigen den stärksten Effekt, gefolgt von grün und blau, während der Bereich von 550–650 nm die geringste Schädigung aufweist [68].

achtungszeitraum neu entwickelte Zellbehälter aufnimmt. Zunächst wurde ein kommerzieller Heizeinsatz (Fa. PeCon, Erbach) verwendet, an dessen Geometrie die Außenabmessungen der Zellbehälter angepasst sind. Aufgrund häufiger Defekte in der SNAKE-Arbeitsumgebung wurde der Heizeinsatz jedoch durch ein selbst konstruiertes Modell ersetzt. Eine an der Rückseite dieses Aluminiumeinsatzes aufgeklebte Kaptonheizfolie (Fa. Minco, Minneapolis, MN, USA) mit einem Widerstand von  $9,5 \Omega$  liefert mit 12 V betrieben eine Heizleistung von ca. 15 W. Ein in die Folie integrierter PT-100 Temperaturfühler übermittelt via einer Dreileiterschaltung, die unter der Voraussetzung identischer Zuleitungen den Einfluss von Leitungswiderständen auf die Messung kompensieren kann [92], den Ist-Wert der Temperatur an einen PID-Regler (Proportional-Integral-Differenzial-Regler, Fa. SURAN, Horb), welcher nach einmaliger automatischer Anpassung der Regelparameter an die thermische Trägheit des Systems auf die Solltemperatur von  $37^\circ\text{C}$  regelt. Dies geschieht durch An- und Ausschalten des Heizstroms über ein Relais. PID-Regler weisen von allen Standardreglern im industriellen Bereich das geringste Überschwingen und keine bleibende Regelabweichung auf [93]. Der Regler ist zusammen mit der 12 V-Versorgung in einem Gehäuse untergebracht. Dieses beherbergt auch einen zweiten Regler und eine 24 V-Versorgung für die Temperierung der Strahlaustrittsnase, welche die Zellbehälter ebenfalls berührt (s. Kap. 4.2.4). Ein Wärmeabfluss über das durch Immersionsöl mit dem Zellsubstrat in Kontakt stehende Objektiv wird mittels eines kommerziellen Objektivheizers (Fa. Bi-optechs, Butler, PA, USA und Fa. PeCon, Erbach) verhindert.

### 4.2.2 Zellbehälter

Die Zellbehälter, in denen die Zellen während der Bestrahlung und der Mikroskopie kultiviert werden, haben eine Reihe von Anforderungen zu erfüllen. Zum einen müssen sie dafür sorgen, dass die experimentellen Ergebnisse unter optimalen Wachstumsbedingungen für die Zellen gewonnen werden können, zum anderen können unzureichende optische Eigenschaften des Zellsubstrats die Qualität der erzielbaren Mikroskopaufnahmen limitieren. Darüber hinaus müssen die Zellbehälter an SNAKE noch die Möglichkeit eines Ionennachweises hinter den Zellen gewährleisten. Vor den Zellen sollen sie dem Strahl möglichst wenig Materie in den Weg stellen, um den Einfluss auf die Strahlauflösung so gering wie möglich zu halten. Keine bekannten kommerziellen Zellkammern erfüllen all diese Anforderungen, und auch an SNAKE für konventionellen Zellbestrahlungen entwickelte Zellbehälter mit Mylarfolie als Zellträger eignen sich aufgrund der optischen Eigenschaften der Folie nicht für hochauflösende Mikroskopie. Deshalb wurden die für das Lebendzellsetup verwendeten Zellkammern von Grund auf neu entwickelt. Abb. 4.8 zeigt ein Foto dieser Zellbehälter.



**Abbildung 4.8:** Lebendzellbehälter:

1: Mit Mylarfolie bespannter Deckel, 2: Druckausgleichskanal, 3: Eintrittsfenster, 4: O-Ring, 5: Scharnier, 6: Hohlraum für Nährmedium, 7: BC-418 Plastik-Szintillator, 8: Druckausgleichsröhrchen

In der Kammer wachsen die Zellen auf einem  $170\ \mu\text{m}$  dicken BC-418 Plastikszintillator, der, wie in Abschnitt 4.2.3 erläutert wird, dem Ionennachweis dient. Sowohl während der Bestrahlung als auch während der Bildakquise sind die Zellen von Nährmedium umgeben. Dies gewährleistet in Kombination mit der Temperierung auf  $37\ ^\circ\text{C}$  optimale Wachstumsbedingungen. Auch während langen Beobachtungszeiträumen (z. B. Zeitserien über Nacht) zeigen die Zellen ein normales Wachstumsverhalten und keine Anzeichen von Stress. So findet man außerhalb des Bestrahlungsfeldes auch nach langer Kultivierung am Bestrahlungsplatz weder neu gebildete Foci als Hinweis auf DNA-Schäden noch Anzeichen für eine erhöhte Apoptoserate (programmierter Zelltod bei irreparablen Schäden). Sogar erfolgreich absolvierte Zellteilungen nahe der bestrahlten Gebiete konnten beobachtet werden, wie Abb. 4.7 zeigt. Die dort gezeigte Probe war zum Zeitpunkt der Aufnahme des Übersichtsbildes schon seit neun Stunden am Be-

strahlungsplatz, da zuvor andere Bereiche der Probe bestrahlt und untersucht worden sind.

Dass der als Zellsubstrat dienende Plastikszintillator keine toxische Wirkung auf die Zellen hat, war ein entscheidendes Kriterium bei der Wahl des Szintillators und wurde schon im Vorfeld ausgiebig getestet und wird durch das Fehlen von Stresssymptomen der Zellen im Routinebetrieb des SNAKE Lebendzellaufbaus ebenfalls bestätigt. Des Weiteren muss bei der Wahl des Szintillators darauf geachtet werden, dass er gegen mindestens eine der drei gängigen Sterilisierungsmethoden (Hitze, Ethanol, Gammastrahlung) resistent ist. Eine Hitzesterilisation kommt bei einem Schmelzpunkt von  $70^\circ\text{C}$  [94] nicht in Frage. Eine Gammasterilisation wäre prinzipiell möglich, jedoch lässt sich nach Applizierung eines Vielfachen der zur Sterilisation verwendeten Gammadosis eine leichte bräunliche Färbung des Szintillators erkennen, sodass auf die Anwendung dieser Methode ebenfalls verzichtet wird. So wird an SNAKE zur Sterilisation der Lebendzellkammern Ethanol verwendet, welches den Szintillator nicht angreift oder schädigt [95].

Um optimale Bedingungen für hochauflösende Mikroskopie zu schaffen, werden die Zellen – im Gegensatz zu allen anderen großen Ionenmikrostrahlanlagen für Zellexperimente [96–99] und dem konventionellen Setup an SNAKE [5] – nicht auf der strahlzugewandten Seite sondern an der Rückseite der Behälter auf dem BC-418 Plastikszintillator, welcher über das Immersionsöl optisch an das Objektiv angekoppelt ist, kultiviert (s. Abb. 4.5). Dabei sind die optischen Eigenschaften des Szintillators, die idealerweise denen eines gewöhnlichen Deckglases entsprechen, für die bei der Mikroskopie erzielbaren Auflösung entscheidend. Die Dicke des Szintillators stimmt mit  $170\ \mu\text{m}$  mit der eines Deckglases überein. Der Brechungsindex des BC-418 beträgt  $n_s = 1,58$  [94] und liegt somit nur knapp 5% über dem Brechungsindex von Glas  $n_g = 1,51$ . Dieser Unterschied kann durch die Korrekturringe der verwendeten Objektive ausgeglichen werden, wobei das LCI Plan-Neofluar eine Anpassung von ca.  $\pm 10\%$  erlaubt, das Plan-Apochromat sogar ca.  $\pm 20\%$ . Diese Eigenschaften machen den verwendeten Szintillator zusammen mit der optischen Qualität seiner Oberfläche zu einem guten Deckglasersatz.

Die bisher genannten Eigenschaften sollten allen Plastikszintillatoren auf Polyvinyltoluen-Basis, welche den größten Teil der am Markt befindlichen Produkte darstellen, gleichermaßen zueigen sein [94, 100]. Das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen den verschiedenen Typen dieser Kategorie liegt in der Emissionswellenlänge<sup>(5)</sup>. Für diese gibt es im SNAKE-Lebendzellaufbau zwei Randbedingungen: Zum einen muss das Licht langwellig genug sein, um vom Objektiv noch transmittiert zu

---

<sup>(5)</sup>Auch in der Abfallzeit wie in der Lichtausbeute gibt es Unterschiede, diese sind jedoch so gering, dass sie für den einfachen Ionennachweis an SNAKE keinerlei Relevanz haben.

werden. Zum anderen muss beachtet werden, dass der Szintillator während der Mikroskopie auch von der Fluoreszenzbeleuchtung angeregt werden kann. Um einen unnötig hohen Bilduntergrund zu vermeiden, soll der Szintillator deshalb in einem Wellenlängenbereich emittieren, der möglichst weit von der Emissionswellenlänge des verwendeten Fluoreszenzproteins entfernt ist, damit der Emissionsfilter im Mikroskop dieses Licht möglichst effektiv unterdrücken kann. Um die Anzahl der verwendbaren Fluoreszenzproteine nicht von vornherein unnötig einzuschränken, ist ein Szintillator mit einer Emission außerhalb des sichtbaren Spektrums ideal.

Der verwendete BC-418 erfüllt mit seiner Emissionswellenlänge von 391 nm [94] beide Kriterien. Die absolute Transmission des verwendeten LCI Plan-Neofluar Objektivs beträgt in diesem Bereich noch ca. 70% [101]<sup>(6)</sup>. Die 391 nm können weder mit dem Auge noch mit der verwendeten Mikroskopkamera AxioCam MRm wahrgenommen werden, beeinflussen die Bildakquise also nicht. Auch Ausläufer des Szintillationsspektrums bereiten keine Probleme, denn bei 500 nm, wo der Emissionsfilter des Mikroskops für GFP, dem verwendeten Fluoreszenzprotein mit der kürzesten Wellenlänge, öffnet, beträgt die Lichtausbeute des BC-418 unter 1% [94]. Ein für Tests zur Verfügung gestandener BC-400 mit einem Emissionsmaximum von 423 nm und einem flacher abfallendem Spektrum strahlte hingegen bei Anregung durch die Fluoreszenzbeleuchtung so stark in das GFP-Band, dass damit keine sinnvolle Mikroskopie möglich ist.

Aus den 15 x 20 cm<sup>2</sup> messenden Szintillatorfolien werden mittels Wasserstrahlschneiden runde Scheiben mit einem Durchmesser von 24 mm geschnitten. Eine solche wird von außen in eine entsprechende Ausfräsung des Edelstahlbehälters geklebt und schließt dann bündig mit der Rückwand des Behälters ab. In einem zweiten Klebeschritt wird eine um den Szintillator verlaufende Nut mit einem Kleberwulst gefüllt, um den Behälter zusätzlich abzudichten. Das Loch, hinter dem in Abb. 4.8 der Szintillator zu sehen ist, hat einen Durchmesser von 19 mm. Da viele Standard-Kleber toxische Wirkung auf die Zellen zeigen [102], wurden Zellverträglichkeitstests mit verschiedenen UV-härtenden Klebern aus dem Medizinbereich (Vitalit-Serie der Firma Panacol, Oberursel) durchgeführt. Die Zellverträglichkeit war durchwegs gegeben, allerdings waren die Klebungen einiger Zellbehälter undicht, sodass Zellkulturmedium austrat. Deshalb findet jetzt das Silikon General Electric RTV 160 Verwendung, welches sich ebenfalls als zellverträglich und resistent gegen Ethanol und das Nährmedium erwies, aber offensichtlich bessere Dichtungseigenschaften aufweist. Allerdings ist damit der zweistufige Klebevorgang

---

<sup>(6)</sup>Da sich die der Aussage zugrundeliegende Transmissionskurve nicht auf das verwendete Phasenkontrastobjektiv sondern auf die DIC-Variante ohne lichtabschwächenden Phasenkontrastring bezieht, kann der Wert an SNAKE etwas geringer sein. Der typische Helligkeitsverlust durch einen Phasenkontrastring beträgt ca. 10%.

aufwendiger, da das RTV 160 eine Aushärtezeit von ca. 48 h hat [103] und nur in Kartuschen für Silikonpistolen geliefert wird. Dies erfordert ein Umfüllen in gewöhnliche Spritzen aus dem Medizinbedarf, um das Silikon ausreichend genau dosieren zu können. Des Weiteren lässt sich RTV 160 zum Austausch eines beschädigten oder verschlissenen Szintillators nur mit speziellen organischen Lösungsmitteln auf Basis chlorierter Kohlenwasserstoffe (z. B. Panasolve 210, Fa. Panacol, Oberursel) entfernen.

Das Strahleintrittsfenster im Deckel der Behälter besteht aus einer 5  $\mu\text{m}$  dicken Mylarfolie, welche normalerweise einen Abstand von ca. 4 mm zum Szintillator hat. Diese ist nicht straff gespannt sondern so lose, dass sie von der Strahlaustrittsnase ohne Kraftaufwand gerade bis zum Szintillator eingedrückt werden kann (s. Kap. 4.2.4 und Abb. 4.5).

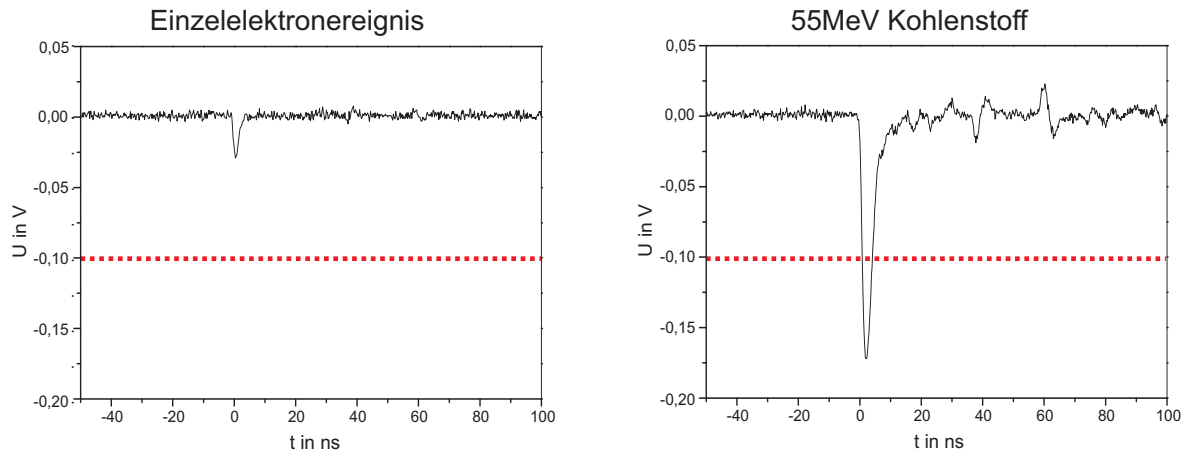
Das Hereindrücken der Folie geht mit einer Verkleinerung des Volumens des Behälters einher, sodass dieser nicht randvoll mit Nährmedium gefüllt sein darf. Aufgrund der Kompression der Luft würde der Druck im Behälter trotzdem ansteigen, was zu einer Wölbung des Szintillators und somit (z. B. bei langsamer Relaxation durch einen Druckausgleich aufgrund des nicht zu 100% luftdichten Behälters) zu Fokusproblemen während der Mikroskopie führen kann. Um dies von vornherein auszuschließen, gewährt ein Röhrchen, das in Einbauposition an der Oberseite des Behälters angebracht ist, zusammen mit einer entsprechenden Fräsung im Deckel (s. beides in Abb. 4.8) einen Druckausgleich schon während des Heranfahrens der Nase.

Um ein einfaches Handling der Behälter sicherzustellen, sind Deckel und Unterteil über ein Scharnier miteinander verbunden und können mittels nur dreier Schrauben geöffnet und verschlossen werden.

### 4.2.3 Einzelionenpräparation

Der Ansatz, die Zellen auf dem Plastiksintillator wachsen zu lassen, ermöglicht den für die Einzelionenpräparation notwendigen Ionennachweis anhand des beim Stoppen der Ionen im Szintillator emittierten Lichtes. Dieses wird vom Objektiv durch den Strahlengang des Mikroskops zu einem Photomultiplier (H8134P, ein R5610P im Mu-Metall-Gehäuse und mit fertig montierten Anschlusskabeln, Fa. Hamamatsu, Herrsching am Ammersee), welcher an einem der Kameraports des Mikroskops (Frontport) angebracht ist, geleitet (s. a. Abb. 4.5). Der Port verfügt über ein zur Kameramontage übliches C-Mount-Gewinde. Ein hierfür gefertigter Adapter verbindet dieses mit dem Photomultiplier und erlaubt dessen Fixierung und mittige Ausrichtung mit drei Madenschrauben. Dabei sitzt die aktive Fläche des Multipliers an der gleichen Position wie beim Anschluss einer Kamera deren CCD-Chip sitzen würde. Der Adapter ist lichtdicht, sodass kein Streulicht auf direktem Wege an den Photomultiplier gelangt.





**Abbildung 4.9:** Durch Einzelelektronenereignisse im Photomultiplier generierte Untergrundsignale (links) sind deutlich schwächer als Signale, die durch das Szintillationslicht gestoppter Ionen erzeugt werden (rechts ein für 55 MeV C typisches Signal), und können so problemlos durch Schwellensetzung eliminiert werden. Liegt die Schwelle mittig zwischen den beiden hier gezeigten Signalhöhen (rot gestrichelt), können auch bei Signalschwankungen im typischen Bereich von unter 20% Ionen- von den Untergrundsignalen getrennt werden.

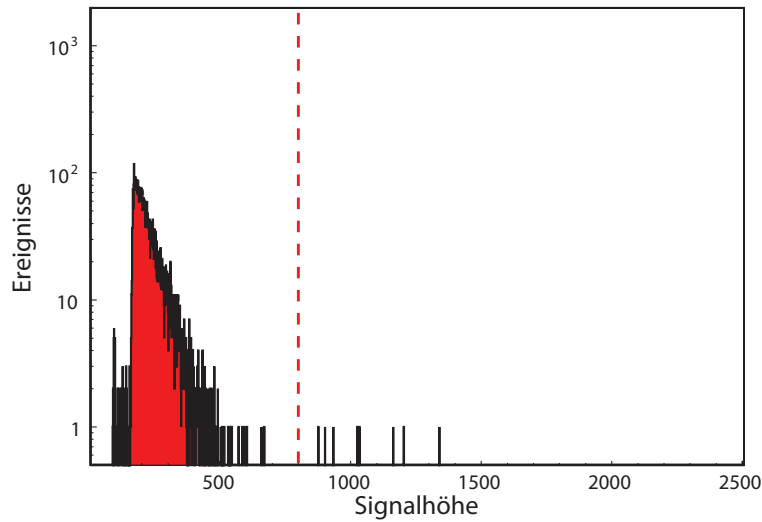
Um auch durch das Objektiv aufgenommenes Streulicht möglichst effizient zu unterdrücken und den Photomultiplier zu schützen, falls aufgrund eines Bedienfehlers das helle Anregungslicht der Mikroskopbeleuchtung auf den Frontport geleitet wird, ist in den Adapter ein Kurzpassfilter eingebaut, der nur das dunkelblaue Szintillationslicht passieren lassen soll. Da die in Kapitel 4.2.1 erwähnten steilflankigen 3rd-Millennium-Filter das Szintillatorlicht nur zu 64% transmittieren, wird hier ein Farbglass LC V 02 (Fa. Laser Components, Olching) verwendet, welches zwar eine deutlich flachere Flanke und selbst am Transmissionsminimum innerhalb des sichtbaren Spektralbereichs von 650 nm gerade eine Blockung von OD4 (s. Formel (4.1)) aufweist, dafür jedoch bei 390 nm eine Transmission von über 88% gewährleistet [104]. Zur weiteren Streulichtreduzierung bei der Bestrahlung wie auch zur Reduzierung des Bilduntergrunds bei der Mikroskopie wird i. d. R. während laufenden Lebendzelleexperimenten an SNAKE das Licht in der Experimentierhalle des Beschleunigerlabors abgeschaltet.

Die von dem Photomultiplier generierten Signale werden mittels eines Timing-Filter-Amplifiers verstärkt. Ein Diskriminator verwirft Einzelelektronensignale des Photomultipliers, sodass nur von Ionen generierte Signale zu einem TTL-Triggersignal für die Einzelionenpräparation weiterverarbeitet werden (s. Abb. 4.9). Das so aufbereitete Triggersignal steuert einen als Beamswitch verwendeten Chopper, der, nachdem die gewünschte Anzahl von Ionen (bei Experimenten mit Schwerionen i. d. R. eines) eine Stelle der Probe bestrahlt hat, den Strahl derart ablenkt, dass keine weiteren

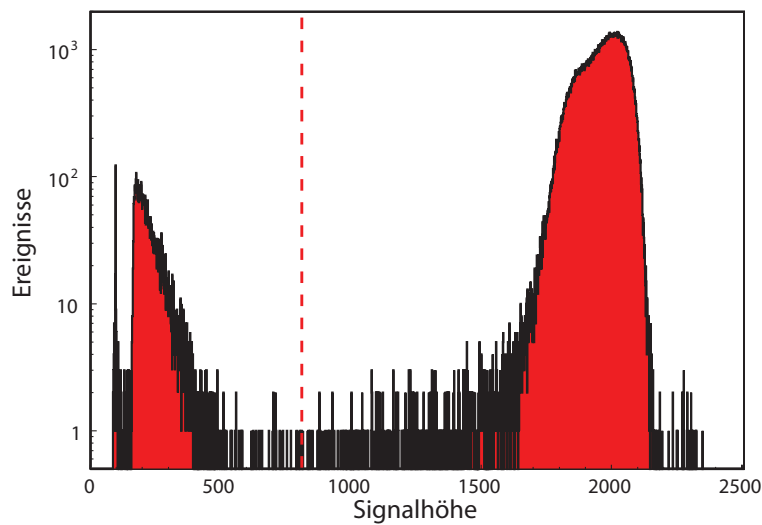
Ionen die Probe mehr erreichen (vgl. Abb. 4.2). Da ionengenerierte Signale mehr als die sechsfache Höhe von im Photomultiplier erzeugten spontanen Einzelektronenereignissen aufweisen (das in Abb. 4.9 gezeigte Ionensignal zählt zu den schwächeren) und die Signalhöhe jeweils um ca. 20% schwankt, liegt bei korrekter, in jeder Strahlzeit experimentell ermittelter Schwellenwahl die Wahrscheinlichkeit für „Ionen-Doppeltreffer“ aufgrund nicht detektierter Szintillatorsignale in der Größenordnung von  $10^{-4}$  (s. Abb. 4.10). Die Wahrscheinlichkeit, solche Doppeltreffer aufgrund von Signal- und Ionenlaufzeiten sowie der Chopper-Schaltzeit zu erhalten, wurde bei einer Teilchenrate von  $10^3 \text{ s}^{-1}$  auf  $1,4 \cdot 10^{-3}$  abgeschätzt [84]. Durch die Installation eines neuen, näher an SNAKE gelegenen Choppers konnten die Laufzeiten auf ca. 1/3 reduziert werden. Die in [84] durchgeführte Abschätzung liefert für die neue Anordnung eine Doppeltreffer-Wahrscheinlichkeit von  $6 \cdot 10^{-4}$ .

Neben Doppeltreffern ist auch der umgekehrte Fall möglich, nämlich dass auf ein hohes, nicht ionengeneriertes Signal getriggert wird und somit an einer Stelle ein Ion zu wenig appliziert wird. Solche hohen spontanen Ereignisse treten entweder durch zufällige Koinzidenz mehrerer Einzelektronenereignisse oder durch andere Effekte wie Höhenstrahlung erfahrungsgemäß alle paar Sekunden auf. Zur genaueren Abschätzung der Häufigkeit wurde ein Dunkelspektrum des Photomultipliers aufgenommen (Abb. 4.10(a)). Die Messung lief 5 Minuten und alle Umgebungsbedingungen entsprachen denen während der Bestrahlung, nur dass eben kein Strahl auf den Szintillator gelangte. Die Abszisse gibt die Energie der Ereignisse in willkürlichen Einheiten an, die Ordinate die Häufigkeit. Ein weiteres Spektrum (Abb. 4.10(b)) zeigt die gleiche Messung während einer fünfminütigen Bestrahlung. Für die eingezeichnete Schwelle bei 800 würden lediglich acht Ereignisse des Dunkelspektrums fälschlicherweise als Ionentreffer gewertet – bei über 250 000 echten Ereignissen während der Bestrahlung, sodass die Wahrscheinlichkeit, auf ein nicht ionengeneriertes Signal zu triggern, im konkreten Fall bei  $3 \cdot 10^{-5}$  lag.

Des Weiteren steuert das Detektorsignal auch die SNAKE-Scansoftware, die es erlaubt, den Strahl über eine elektrostatische Ablenkeinheit definiert abzulenken. Wurde ein Punkt mit der gewünschten Ionenzahl bestrahlt, fährt die Ablenkeinheit den nächsten zu bestrahlenden Punkt an. Danach wird automatisch der Chopper wieder geöffnet, bis auch dort die gewünschte Anzahl von Ionen erreicht ist. Durch den Kauf neuer schneller Netzgeräte für die Ablenkeinheit (Fa. TREK, Medina, NY, USA) können pro Sekunde ca. 1000 Positionen bestrahlt werden. Dieser Wert wird – eine hinreichend hohe Teilchenrate vorausgesetzt, die mit den „Standard-Ionen“ Kohlenstoff und Protonen aber erfahrungsgemäß vorhanden ist – durch die Zeitspanne, in der der Chopper während dem Anfahren der nächsten Position geschlossen ist, bestimmt. Diese sollte ohne



(a) Dunkelspektrum ohne Strahl.



(b) Spektrum mit 55 MeV Kohlenstoff-Strahl (Zählrate ca. 1 kHz).

**Abbildung 4.10:** Dunkelspektrum des Photomultipliers und Energiespektrum der Signale während Bestrahlung, jeweils über fünf Minuten gemessen (Signalhöhe in willkürlichen Einheiten). Rot gestrichelt ist eine sinnvolle Diskriminator-Schwelle eingezeichnet. Bei dieser Schwellenwahl könnten 99,997% der Dunkelereignisse von den ioneninduzierten Signalen getrennt werden. Umgekehrt ist die Anzahl der Ereignisse zwischen 500 und der Schwelle während Bestrahlung gegenüber dem Dunkelspektrum um 22 erhöht. Unter der Annahme, dass diese 22 Ereignisse Ionentreffern zuzuordnen sind (und nicht etwa ioneninduzierten Sekundäreignissen oder schlicht der statistischen Verteilung der Dunkelereignisse), bedeutet dies, dass ca. 0,01% der ionengenerierten Signale unterhalb der Schwelle liegen und somit nicht detektiert werden, was zu einer Wahrscheinlichkeit von Ionen-Doppeltreffern in der Größenordnung von  $10^{-4}$  führt.

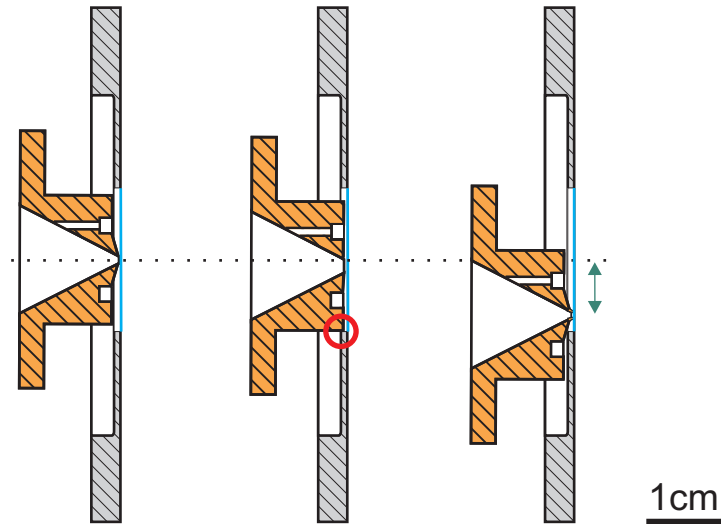
signifikante Verschlechterung der Strahlaufösung auf 300  $\mu\text{s}$  verkürzt werden können, wie folgende Abschätzung zeigt: Die langsameren, für die vertikale Strahlableitung zuständigen 4 kV-Netzgeräte benötigen gemäß Datenblatt 150  $\mu\text{s}$ , bis bei einem Sprung von 0 V auf 4 kV (was einer Strahlableitung von 0,7 mm entspricht) die Sollspannung auf 1% Genauigkeit erreicht ist. Dieser Wert liefert für einen Anstieg

$$\frac{U}{U_{\text{soll}}} = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.2)$$

die Zeitkonstante  $\tau = 33 \mu\text{s}$ . Mit dieser Anstiegszeit ist gemäß (4.2) nach 300  $\mu\text{s}$  die Sollspannung mit einer Genauigkeit von  $10^{-4}$  erreicht, was zu einer Ortsgenauigkeit von 70 nm führt. Eine systematische experimentelle Auswertung der Strahlaufösung für Schließzeiten des Choppers unter einer Millisekunde wurde jedoch bisher nicht durchgeführt. Höhere Priorität hat hier eine baldige Umstellung auf eine mit zeitgemäßer Soft- und Hardware kompatible D/A-Karte mit einer höheren Auflösung als die bisherigen 12 Bit.

Die maximal mögliche Ablenkung wird bei Lebendzelleexperimenten von der Größe der aktiven Fläche des Photomultipliers begrenzt. Es muss nämlich gewährleistet sein, dass die Ionen innerhalb des Gesichtsfeldes des Photomultipliers im Szintillator gestoppt werden, damit das dabei generierte Licht auch registriert wird. Da der Photomultiplier wie beschrieben analog einer Kamera am Mikroskop angebracht ist, verhalten sich maximales Scanfeld und Bildausschnitt auf der Kamera zueinander wie aktive Fläche des Photomultipliers und des CCD-Chips der Kamera (auch dem Photomultiplier ist wie der Kamera ein 0,63er-Adapter vorgeschaltet). Die runde aktive Fläche des Photomultipliers hat einen Durchmesser von 15 mm und erlaubt somit eine Strahlableitung, die über das Gesichtsfeld der Kamera, welches durch den 8,9 mm x 6,7 mm messenden Kamerachip definiert ist, hinausreicht. Durch ein linsenförmig geformtes Eintrittsfenster des Photomultipliers, welches 18 mm im Durchmesser misst, wird die effektive aktive Fläche des Photomultipliers zusätzlich etwas erhöht. Solange der gewählte Scanbereich bei Verwendung des 63x-Objektivs unter 200  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$  bleibt, sind selbst für einen nicht ganz mittig zum Gesichtsfeld positionierten Strahl (vgl. Abb. 4.13) keine Probleme zu erwarten.

Leichte schnelle Teilchen wie 20 MeV Protonen werden in dem Szintillator nicht gestoppt und generieren für einen zuverlässigen Nachweis zu wenig Licht. Deshalb wird zu deren Nachweis ein im Objektivrevolver hinter der Probe angebrachter Detektor verwendet, der für konventionelle Zellbestrahlungen entwickelt wurde [84]. Folglich kann bei Experimenten mit diesen Teilchen auch ein gewöhnliches Deckglas als Zellsubstrat verwendet werden. Nach der Bestrahlung muss nun das Objektiv eingeschwenkt werden, was den zeitlichen Abstand zwischen Bestrahlung und erster Mikroskopaufnahme



**Abbildung 4.11:** Links: Durch eine 19 mm Bohrung in der 1 mm starken Zellbehälter-Rückwand erreicht die Strahlaustrittsnase den Szintillator (blau). Mitte: Bei einer ebenen Strahlaustrittsfläche an der Nase führen schon kleinen Auslenkungen von der gepunktet eingezeichneten Mittelachse zu Kollisionen zwischen Zellbehälter-Rückwand und Nase im rot markierten Bereich. Rechts: Dies wird durch eine 1,5 mm hohen Erhebung verhindert, sodass die Nase innerhalb des grün markierten Bereichs positioniert und Zellen zur Bestrahlung ausgewählt werden können.

gegenüber der Schwerionenbestrahlung von unter einer Sekunde auf ca. fünf bis zehn Sekunden verlängert.

#### 4.2.4 Strahlaustrittsnase

Durch die in die SNAKE Targetkammer integrierte Strahlaustrittsnase verlassen die Ionen das Vakuum der Strahlführung (s. a. Abb. 4.4). Ein solcher Strahlaustritt ist nötig, da die Zellen, wie bereits in den zu Beginn dieses Kapitels formulierten Anforderungen geschildert, nur an Luft bestrahlt werden können. Der Aufbau der für den Lebendzellaufbau entwickelten Nase orientiert sich an einer für konventionelle Zellbestrahlungsexperimente bereits verwendeten [5, 84]. Beide besitzen einen zweiteiligen Aufbau bestehend aus einem Aluminium-Korpus und einer Messing-Spitze, an der die Ionen durch eine 1 mm Bohrung, die von einer 7,5  $\mu\text{m}$  dicken Kaptonfolie bedeckt ist, aus dem Vakuum austreten (s. a. Abb. 4.5).

Diese Bohrung befindet sich an einer gegenüber der Klebefläche für die Kaptonfolie um 1,5 mm erhöhten Stelle. Dadurch kann nahezu der ganze hinter der 1 mm starken Zellbehälter-Rückwand zugängliche Bereich des Szintillators erreicht werden (s. Abb. 4.11).

Strahlaustrittsfolie	Zellbehälterfolie	Nährmedium	Strahlaufweitung
7,5 $\mu\text{m}$ Kapton	5,0 $\mu\text{m}$ Mylar	30 $\mu\text{m}$ Wasser	295 nm
7,5 $\mu\text{m}$ Kapton	5,0 $\mu\text{m}$ Mylar	20 $\mu\text{m}$ Wasser	203 nm
5,0 $\mu\text{m}$ Kapton	5,0 $\mu\text{m}$ Mylar	20 $\mu\text{m}$ Wasser	175 nm
2,0 $\mu\text{m}$ Mylar	5,0 $\mu\text{m}$ Mylar	20 $\mu\text{m}$ Wasser	148 nm

**Tabelle 4.3:** Berechnete Strahlaufweitung (FWHM) von 55 MeV C am Targetort für verschiedene Streugeometrien. Eine Reduzierung der Mediumssäule wird bei auflösungskritischen Experimenten schon praktiziert. Eine mit einer 2,5  $\mu\text{m}$  dicken Mylarfolie bespannte Austrittsnase wurde ebenfalls schon erfolgreich getestet, wird im Routinebetrieb aber noch nicht verwendet.

Die Strahlaustrittsnase steht über einen evakuierten Wellbalg in Kontakt mit der Targetkammer. Durch den Wellbalg kann die Nase über vier Schrauben mittig zur Strahlachse positioniert werden. Entlang der Strahlachse ist die Nase nicht verschiebbar, der Abstand von der Nase zum Mikroskop wird daher durch ein Verfahren des Mikroskops, welches auf zwei schrittmotorgesteuerten Lineartischen steht, verändert. Für Zellbestrahlungen wird das Mikroskop so positioniert, dass sich die Strahlaustrittsnase ca. 30  $\mu\text{m}$  vor den Zellen befindet. Somit passieren die Ionen bis zu den Zellen gut 40  $\mu\text{m}$  Materie bestehend aus drei Schichten: 7,5  $\mu\text{m}$  Kaptonfolie, 5  $\mu\text{m}$  Mylarfolie und ca. 30  $\mu\text{m}$  Zellkulturmedium. Die daraus resultierende Strahlaufweitung lässt sich mittels der Monte-Carlo-Software TRIM [105] für 55 MeV Kohlenstoffionen auf knapp 300 nm FWHM berechnen, wobei das Nährmedium mit Wasser gleichgesetzt wurde. Ergebnisse für andere Geometrien finden sich in Tabelle 4.3. Eine in [84] berichtete Luftschicht zwischen den beiden Folien aufgrund der vakuumbedingten Einwölbung der Kaptonfolie kann nicht beobachtet werden. Grund hierfür könnte sein, dass sich die kaum gespannte Mylarfolie durch den Druck, den das Nährmedium von innen ausübt, der Form der Kaptonfolie anpasst.

Da die metallene Austrittsnase nur durch die beiden dünnen Folien vom Nährmedium getrennt ist, kann sie der beheizten Probe Wärme entziehen und führt so zu Inhomogenitäten in der Wärmeverteilung innerhalb der Zellkammern. Um dies zu verhindern, wird auch die Nase auf 37 °C temperiert. Dazu sind an der Aluminiumnase acht parallel geschaltene 56  $\Omega$ -Leistungswiderstände angebracht, sodass die Nase bei einer angelegten Spannung von 24 V mit gut 80 W beheizt wird. Die Temperaturregelung geschieht hier analog zu der in Abs. 4.2.1.5 beschriebenen Temperierung des Probenstisches. Die dafür nötige Temperaturmessung geschieht mit Hilfe eines PT100 an der Messingnase. Um die geheizte Nase von dem restlichen Versuchsaufbau (Target-

kammer und Kryostat) thermisch zu entkoppeln, ist zwischen Nase und dem Wellbalg ein Isolerring aus dem Kunststoff Peek (Polyetheretherketon) angebracht.

Wie bereits erläutert, soll am SNAKE Lebendzellaufbau auch die Möglichkeit gegeben sein, die zu untersuchenden Zellen mittels Phasenkontrast zu visualisieren. Eine dafür üblicherweise verwendete Durchlicht-Halogenleuchte, deren Licht von einer Ringblende so beschnitten wird, dass ungebeugtes Licht nur auf den Phasenring des Objektivs fällt (vgl. Kap. 3.5), würde zwangsweise den Ionen den Weg versperren. Deshalb wurde eine entsprechende ringförmige Beleuchtung aus grünen LEDs realisiert und in die Strahlaustrittsnase integriert. Für jede der Phasenkontrastklassen Ph1, Ph2 und Ph3 (vgl. Tabelle 4.1) ist ein eigener Ring vorhanden, sodass die Beleuchtung mit allen Phasenkontrastobjektiven der Fa. Zeiss kompatibel ist. Ph1 und Ph2 sind in einem „Doppelring“ untergebracht, welcher nur geringfügig modifiziert von der alten Strahlaustrittsnase für konventionelle Zellbestrahlung übernommen wurde. Der Ph3-Ring befindet sich weiter vorne in der Nase und wurde so konstruiert, dass das Licht der anderen LEDs durch diesen hindurchstrahlen kann (s. Abb. 4.5).

## 4.3 Experimentdurchführung

Nachdem die einzelnen Elemente des Versuchsaufbaus nun detailliert beschrieben sind, soll noch der Ablauf eines typischen Lebendzellexperimentes an SNAKE skizziert werden.

### 4.3.1 Handhabung der Zellen

Zwölf bis 72 Stunden vor der Bestrahlung werden die zu bestrahlenden Zellen mit den GFP-markierten Reparaturproteinen in die bereits beschriebenen Zellbehälter ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und unter  $CO_2$ -Begasung kultiviert. Am häufigsten werden an SNAKE die beiden menschlichen Tumor-Zelllinien HeLa und U2OS verwendet. Am Vorabend der Bestrahlung wird das Nährmedium der Zellen gewechselt. Dabei kommt ein Medium mit sogenanntem HEPES-Puffer zum Einsatz. Dieses sorgt auch ohne  $CO_2$ -Begasung für einen konstanten pH-Wert während der Bestrahlung und Beobachtung an SNAKE. Auf den in Zellkulturmedien üblichen pH-Wert-Indikator Phenolrot wird verzichtet, damit der Farbstoff kein Fluoreszenzlicht absorbieren kann. Im Zuge des Mediumwechsels wird u. a. zur weiteren Reduzierung der Phototoxizität noch das Antioxidationsmittel Trolox als Radikalfänger zugegeben.

### 4.3.2 Strahlpräparation

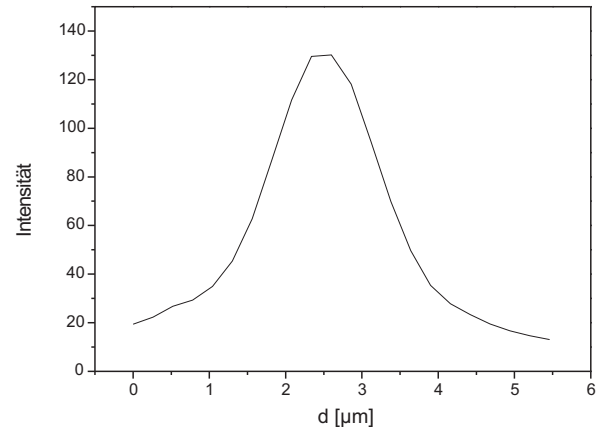
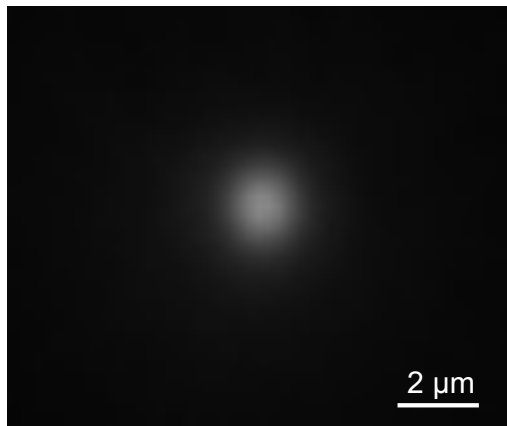
Zunächst wird der Strahl durch Variieren der Ströme durch die supraleitende Linse optisch auf Submikrometerdimensionen fokussiert. Dazu wird ein Szintillatorkristall mit einer hohen Lichtausbeute in die Bestrahlungsposition gebracht. So ist z. B. bei 55 MeV Kohlenstoff schon mit Teilchenraten von 500 Hz der Strahlfleck unter dem Mikroskop deutlich zu erkennen. Zur Feinfokussierung wird in der Regel das LD Plan-Neofluar 40x Objektiv verwendet, sodass gemäß Tabelle 4.1 theoretisch Strahlfleckgrößen bis ca. 500 nm bewertet werden können. Insbesondere die körnige Struktur des gewöhnlich als Szintillator genutzten Thallium-dotierten Caesiumiodid-Kristalls (CsI(Tl)) verhindert, dass diese Genauigkeit vollends erreicht wird. Darüberhinaus bedingt seine Dicke von 0,1 mm, dass Licht aus tieferen, außerfokalen Ebenen des Kristalls, in denen auch der Strahl durch Streuprozesse aufgeweitet ist, den Strahlfleck größer als tatsächlich erscheinen lässt. Erstgenannte Einschränkung konnte durch die Verwendung eines YAG-Einkristalls (Yttrium-Aluminium-Granat) anstelle des CsI-Kristalls behoben werden (s. Abb. 4.12(a)). Des Weiteren erwies sich der YAG als strahlenresistenter als der Caesiumiodid, der nach einigen Minuten Ionenbeschuss eine deutliche Verfärbung aufweist. Ebenfalls auf ihre Eignung als Szintillatormaterial zur Strahlfokussierung getestete Quantumwell-Strukturen aus InGaN (Abb. 4.12(b)), die aufgrund ihrer geringen Dicke von nur wenigen Mikrometern kaum Licht aus fokusfernen, tieferen Ebenen generieren, erwiesen sich für die Online-Kontrolle der Strahlfleckgröße während der Fokussierung als zu lichtschwach. Im Zuge der Strahlfokussierung wird auch die Kalibrierung der elektrostatischen Ablenkeinheit nachjustiert.

### 4.3.3 Bestrahlung

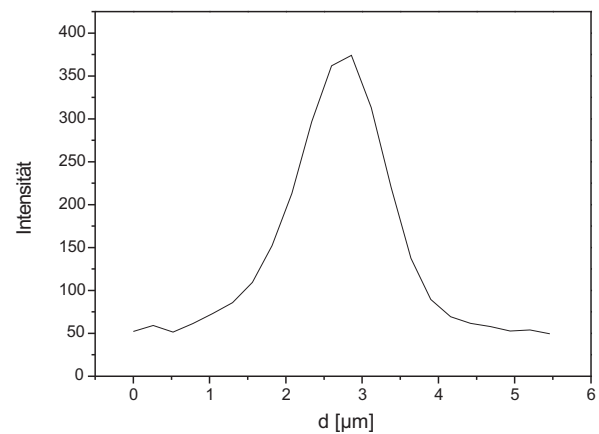
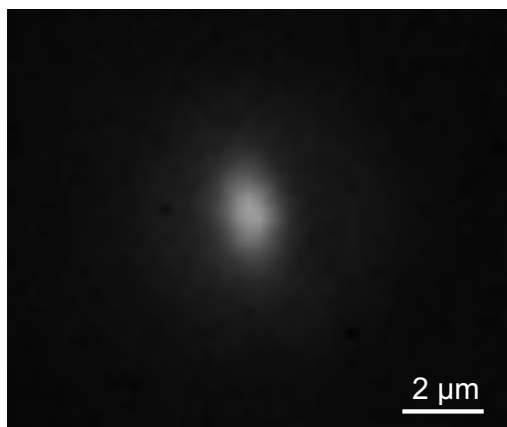
Die aus dem Brutschrank kommende Probe wird in den vorgewärmten Mikroskoptisch eingesetzt und mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie wird ein Bereich zur Bestrahlung ausgesucht. Kriterien hierfür sind ein hoher Anteil GFP-positiver Zellen, ausreichend helles GFP-Signal, genügend Zellen innerhalb des Gesichtsfeldes, aber auch kein zu dichter, mehrstöckiger Zellrasen, der weder der erzielbaren Qualität der Mikroskopaufnahmen noch der Zellmorphologie zuträglich ist.

Im Anschluss wird das Mikroskop soweit gegen die Strahlrichtung gefahren, dass sich die Strahlaustrittsnase ca. 30  $\mu\text{m}$  vor den Zellen befindet. Der Abstand zwischen Zellen und Nase wird gemessen, indem die in der Mikroskop-Software AxioVision angezeigten z-Positionen des Objektiv für die beiden Fälle „Zellen im Fokus“ und „Kapton- bzw. Mylarfolie im Fokus“ voneinander subtrahiert werden. Aufgrund der geringen



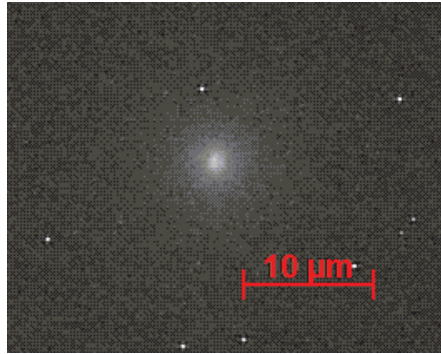


(a) YAG-Einkristall



(b) InGaN Multiquantumwell

**Abbildung 4.12:** Strahlfleck des fokussierten Ionenstrahls sowie der Helligkeitsverlauf entlang eines horizontalen Schnitts durch den Strahlfleck auf im Rahmen dieser Arbeit getesteten Szintillatormaterialien. Sowohl der YAG-Kristall als auch die InGaN-MQW-Strukturen weisen keine Körnigkeit auf, die den Strahlfleck optisch verbreitern würde. Der Multiquantumwell reduziert darüber hinaus aufgrund seiner Dicke von nur wenigen Mikrometern den Lichtanteil aus tieferen optischen Ebenen. Dies geht jedoch auf Kosten der Lichtausbeute, sodass eine Belichtungszeit von mehreren Sekunden nötig ist, um den Strahlfleck abzubilden.



**Abbildung 4.13:** Strahlfleck, wie er bei einer Teilchenrate von ca. 1 kHz auf dem als Zellsubstrat verwendeten BC-418 Plastiksintillator zu sehen ist. Zur Visualisierung wurde eine Videokamera mit Sony EXview CCD-Chip verwendet. Auf diese Weise kann unmittelbar vor der Bestrahlung die Strahlposition überprüft werden, was für eine gezielte Bestrahlung von Substrukturen eines Zellkerns unerlässlich ist. Beim Abrastern mehrerer Zellen ist eine mittige Strahlausrichtung ebenfalls von Nöten, wenn das gesamte Gesichtsfeld des Photomultipliers bestrahlt werden soll (vgl. Kap. 4.2.3). Die weißen Punkte sind von der Strahlenbelastung zerstörte Pixel des CCD-Chip (sog. hot pixels).

Tiefenschärfe der verwendeten hochauflösenden Objektive von deutlich unter einem Mikrometer kann die Distanz damit hinreichend genau bestimmt werden.

Unmittelbar vor der Bestrahlung wird jegliche Mikroskopbeleuchtung ausgeschaltet und der Lichtweg des Mikroskops auf den Frontport, an dem der Photomultiplier montiert ist, gelenkt. Die dazu nötigen Einstellungen können in der Mikroskopsoftware AxioVision als Parameter-Set hinterlegt werden, welches mit nur einem Mausklick ausgewählt werden kann.

Zurzeit werden bei den meisten Zellbestrahlungsexperimenten an SNAKE regelmäßige geometrische Punktmatrizen in die Zellen appliziert, aber auch kompliziertere Muster sind möglich [7]. Der Strahl wird mittels der elektrostatischen Ablenkeinheit über die Probe gerastert, wobei die Einzelionenpräparation gewährleistet, dass an jedem Punkt der Matrize oder des Musters die gewünschte Anzahl von Ionen appliziert wird. In der SNAKE-Scansoftware wird die Geometrie des Bestrahlungsmusters über Ausdehnung des bestrahlten Bereichs, Punktabstand in  $x$  und  $y$ , evtl. Offset etc. definiert.

Ein höherer Aufwand als bei solchen Musterbestrahlungen muss betrieben werden, wenn nicht innerhalb eines definierten Bereichs alle Zellen gleichmäßig bestrahlt werden sollen, sondern eine gezielte Bestrahlung von Substrukturen einzelner Zellkerne erforderlich ist. Während bei ersten Proof-of-concept-Lösungen die Probe manuell zum Strahl justiert werden musste [7, 106], wurde im Rahmen einer noch laufenden

Doktorarbeit [37] eine softwarebasierte Methode zur Zielbestrahlung entwickelt, die analog zur Musterbestrahlung den Strahl über die elektrostatische Scaneinheit an das Ziel lenkt. Dazu wird einmalig pro Strahlzeit mittels eines Szintillators (i. d. R. die zur Strahlfokussierung verwendeten YAG- und CsI(Tl)-Kristalle) die an den Ablenkplatten anliegende Spannung mit der unter dem Mikroskop sichtbaren Strahlauslenkung abgeglichen. Um evtl. Nichtlinearitäten des Umrechnungsfaktors zu begegnen, geschieht das für eine Reihe von Strahlpositionen. Da jedoch ein längerfristiges Driften des Strahls nicht ausgeschlossen werden kann, wird vor jeder Bestrahlung die Nullpunktposition des Strahls überprüft und eine evtl. auftretende Abweichung von der Software durch einen entsprechenden Offset korrigiert. Die Nullpunktposition wird optisch mit Hilfe des Plastiksintillators, auf dem die Zellen wachsen, bestimmt. Da die verwendete Mikroskopkamera, wie schon erwähnt, blind für das im nahen UV-Bereich angesiedelte Szintillatorlicht ist, wird dazu die im Abschnitt 4.2.1.3 beschriebene Videokamera verwendet (s. Abb. 4.13). Aus einer Phasenkontrast- oder Fluoreszenzaufnahme können dann die Zielpositionen ausgewählt werden, deren Koordinaten automatisch an die Scansoftware weitergereicht werden. Die eigentliche Bestrahlung geschieht dann analog zur Musterbestrahlung.

#### 4.3.4 Mikroskopie

Nach erfolgter Bestrahlung wird eine Zeitserienaufnahme gestartet. Dabei werden vom Mikroskop automatisch in definierten Zeitintervallen Fluoreszenzaufnahmen des bestrahlten Bereichs aufgenommen. Die dazu nötigen Parameter wie Dauer, Abstand zwischen zwei Aufnahmen, Belichtungszeit etc. werden schon vor der Bestrahlung festgelegt. Eine im Rahmen einer Studienarbeit [107] programmierten VBA-Erweiterung (Visual Basic for Applications) für AxioVision aktiviert das für die Mikroskopie benötigte Parameter-Set (Lichtweg zur CCD-Kamera, Mikroskopbeleuchtung etc.) und startet die Bildakquise, sobald die Scan-Steuerung von SNAKE das Ende der Bestrahlung per Triggersignal meldet. Somit können auch Zellreaktionen beobachtet werden, die innerhalb der ersten Sekunde nach der Bestrahlung ablaufen. Limitiert wird dieser Wert momentan von der Belichtungszeit, die bei den verwendeten GFP-Konstrukten im Bereich von hundert Millisekunden liegt.

Sollen sehr langsame Vorgänge in der Zelle beobachtet werden, bietet es sich an, für die Mikroskopie auf ein anderes Mikroskop auszuweichen und so den Strahlplatz an SNAKE für weitere Experimente freizugeben. Dafür wurde ein Zeiss Axio Observer.Z1 (Nachfolger des Axiovert 200M), welcher in einem separaten Raum für die mikroskopische Auswertung „konventionell“ bestrahlter Proben zur Verfügung steht, mit einem Objektivheizer und einer zweiten Ausfertigung des Heiztisches sowie einer Colibri LED-

Beleuchtung ausgestattet. Eine Umrechnungsformel von der in AxioVision angezeigten Tischposition des Axioverts auf die des Axio Observers, um dieselben Zellen dort weiter beobachten zu können, wurde ermittelt. Allerdings ergeben sich durch das für einen komfortablen Einbau der Zellbehälter in den Heizeinsatz nötige Spiel Unsicherheiten, die eine optische Nachkorrektur der Position nötig machen. Da vorhandene Foci als Anhaltspunkt für diese Korrektur gut geeignet sind, empfiehlt es sich, vor dem Umbau der Probe die Focibildung abzuwarten.

Eine Zellprobe, die gemäß dem eben beschriebenen Ablauf mit 55 MeV Kohlenstoffionen in einem Linienmuster bestrahlt wurde, zeigt Abb. 4.14. Die im linken Teil der Abbildung im Phasenkontrast sichtbaren Zellen wachsen auf dem Plastikszintillator in den neu entwickelten Kulturgefäßen und wurden direkt am Bestrahlungsplatz mittels der in der Strahlaustrittsnase integrierten Phasenkontrastbeleuchtung und dem LCI Plan-Neofluar 63x-Objektiv mikroskopiert. Deutlich erkennbar sind die länglichen HeLa-Zellen, ihre Zellkerne sowie weitere Substrukturen.

In der rechten Hälfte sind die selben Zellen ebenfalls am Bestrahlungsplatz im GFP-Fluoreszenzkontrast abgebildet. Durch das im gesamten Zellkern verteilte GFP-markierte Protein 53BP1 ist dessen Morphologie auch hier erkennbar. Es fällt auf, dass nicht alle im Phasenkontrast sichtbaren Zellen das GFP-53BP1 exprimieren. Darüber hinaus zeigt das GFP-Signal deutlich das applizierte Linienmuster. Die einzelnen 53BP1-Foci, die sich an den Trefferorten der Kohlenstoffionen gebildet haben, werden gut aufgelöst.

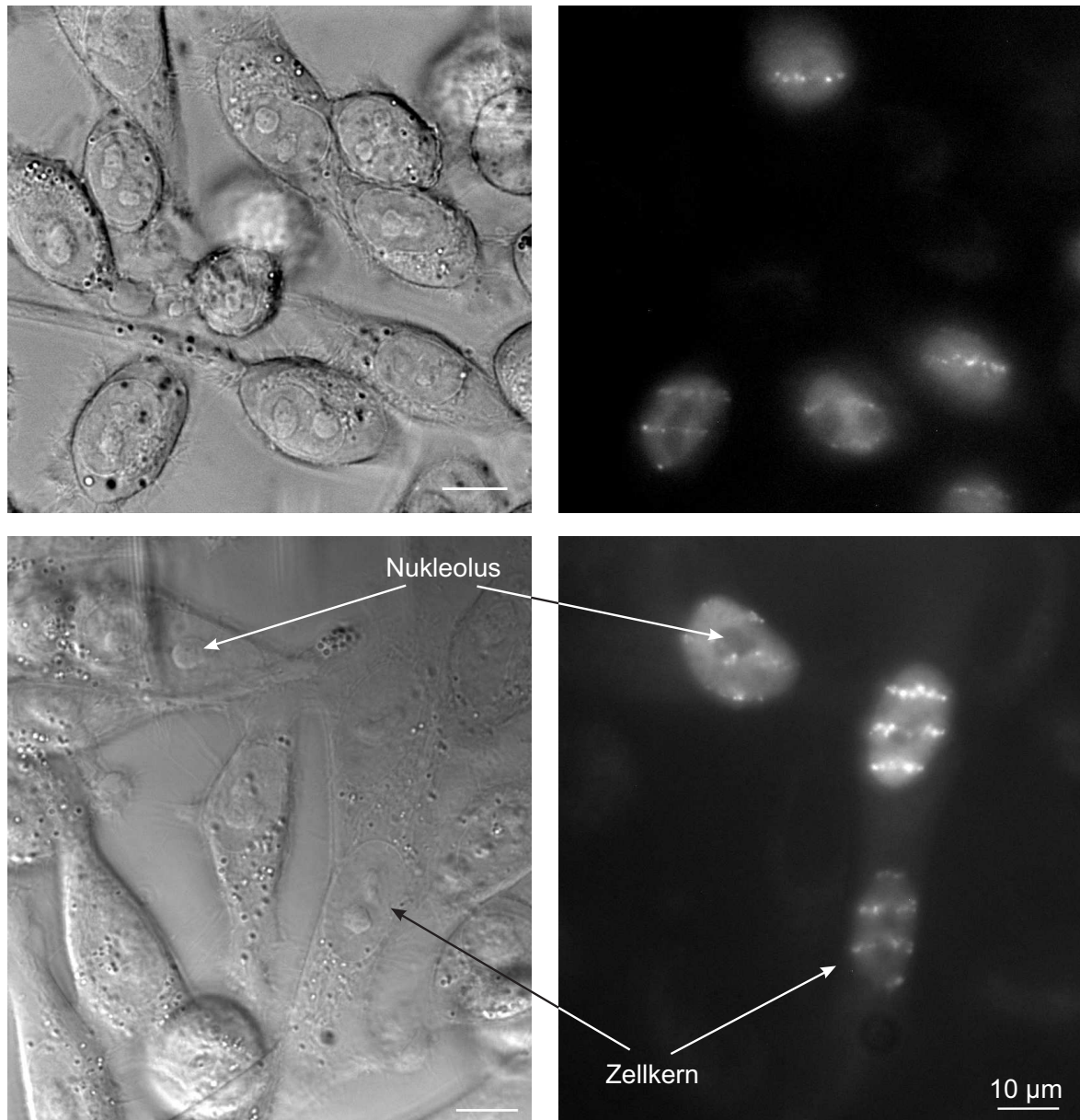
## 4.4 Charakterisierung des Versuchsaufbaus

Bevor im nächsten Kapitel die ersten am SNAKE Lebendzellaufbau gewonnenen biologischen Ergebnisse vorgestellt werden, soll noch der Versuchsaufbau bezüglich der Strahlauflösung und Zielgenauigkeit charakterisiert werden.

### 4.4.1 Strahlauflösung

Zur Messung der Strahlauflösung wurde ein Kernspurdetektor (Polycarbonat-Folie) in einen Zellbehälter geklebt. Der Zellbehälter wurde mit Wasser gefüllt und die Strahlaustrittsnase so positioniert, dass die Ionen analog zu Zellbestrahlungsexperimenten eine 30  $\mu\text{m}$  dicke Wassersäule durchdringen müssen, bevor sie den Kernspurdetektor erreichen. Dieser wurde nun mit einem 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$  Matrixmuster aus 55 MeV Kohlenstoffionen bestrahlt.

Die Polycarbonatfolie wurde anschließend in alkoholischer Natronlauge geätzt, so dass an den Orten der Ionentreffer unter dem Mikroskop sichtbare Ätzgruben entste-



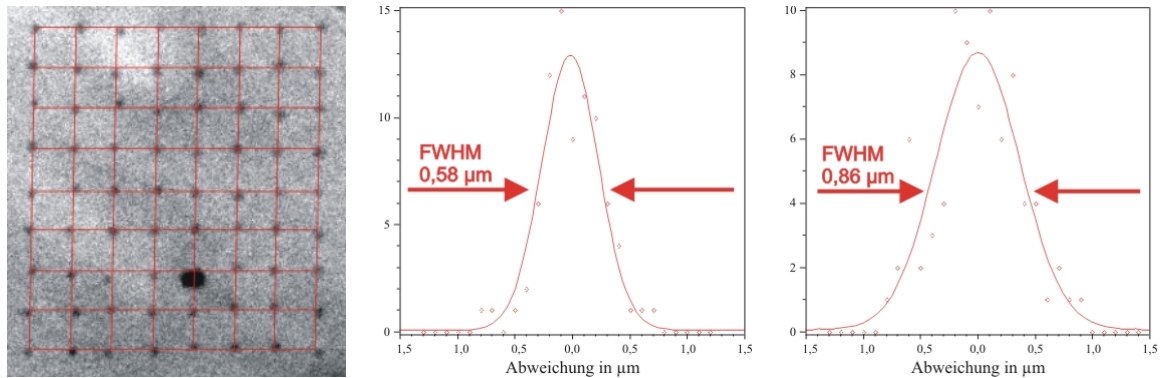
**Abbildung 4.14:** An SNAKE bestrahlte HeLa-Zellen mit GFP-markiertem Protein 53BP1 im Phasen- und Fluoreszenzkontrast [89]. Die gesamten Zellen sind nur im Phasenkontrast sichtbar, Zellkerne sowie Nukleoli (Orte im Zellkern mit geringerer DNA-Dichte) können mit beiden Techniken visualisiert werden.

hen [5]. Abb. 4.15(a) zeigt einen solchen geätzten Kernspurdetektor. Die Mittelpunktskoordinaten der Ätzgruben wurden ermittelt und aus ihrer Abweichung von den jeweiligen rot angedeuteten Ausgleichsgeraden die Strahlaufföschung bestimmt. Um realistische Werte zu erhalten, gilt die Bedingung, dass alle Ausgleichsgeraden parallel zueinander verlaufen müssen. Diese in [7] detailliert beschriebene Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels der Software Maple 11 (Fa. Maplesoft, Waterloo, Ontario, Kanada) automatisiert.

Die so am Lebendzellaufbau ermittelte Strahlaufföschung (FWHM) beträgt  $0,58 \mu\text{m}$  in  $x$  und  $0,86 \mu\text{m}$  in  $y$  (s. Abb. 4.15). Beide Werte liegen höher als von TRIM-Simulationen, die nur die Strahlaufstreuung im Material berücksichtigen (s. Tabelle 4.3), prognostiziert. Da eine Strahlaufweitung durch das zu durchdringende Nährmedium bzw. Wasser keine Vorzugsrichtung aufweisen würde, liegt der schlechtere  $y$ -Wert offensichtlich an einer nicht optimalen Fokussierung der Linse oder an Strahloszillationen, die durch parasitäre elektromagnetische Felder aus dem 50 Hz-Wechselstromnetz hervorgerufen werden [82]. Strahlauffösungen an Luft von weniger als  $0,5 \mu\text{m}$  konnten an SNAKE bis dato nur gemessen werden, wenn der Einfluss dieser Einstreuungen durch eine passive Korrektur, die den Chopper zur Einzelionenpräparation nur während eines zum 50 Hz-Wechselstromnetz phasenstarren Zeitfensters von 2 ms öffnet, vermindert wurde [7]. Da diese Korrekturmethode die Bestrahlungsdauer erhöht, wird sie im Routinebetrieb von SNAKE nicht verwendet und fand auch bei der in Abb. 4.15 gezeigten Auswertung keine Anwendung. Ohne diese Korrektur konnten an SNAKE auch im konventionellen Zellbestrahlungsbetrieb nur Auflösungen von knapp unter  $0,7 \mu\text{m}$  gemessen werden [7], sodass die geänderte Streugeometrie für den Lebendzellaufbau die Strahlaufföschung nicht signifikant verschlechtert. Methoden, um deren Einfluss weiter zu reduzieren, wurden bereits in Kap. 4.2.4 aufgezeigt. Durch die ebenfalls schon erwähnte Verwendung einkristalliner Sichtschirme zur Strahlfokussierung kann die Qualität des Fokus präziser beurteilt und somit eine exaktere Fokussierung erreicht werden. Eine im Rahmen einer Studienarbeit [108] entwickelte aktive Korrektur der Strahloszillationen auf Basis eines Funktionsgenerators, die nicht nur die 50 Hz-Grundschiwingung sondern auch höhere Ordnungen eliminiert, wird die Strahlaufföschung sowohl bei konventionellen als auch bei Lebendzellexperimenten weiter verbessern.

#### 4.4.2 Zielgenauigkeit

Neben der Strahlaufföschung, die der Präzision der applizierbaren geometrischen Muster entspricht, soll auch noch auf die Genauigkeit bei der gezielten Bestrahlung subzellulärer Strukturen eingegangen werden. Hierfür wurden in Zellen mit GFP-markiertem Mdc1 zufällig ausgewählte Nukleotide mittels der sogenannten Scratch-



(a) Kernspurdetektor mit rot angedeuteten Ausgleichsgeraden.

(b) Strahlauflösung in  $x$ .

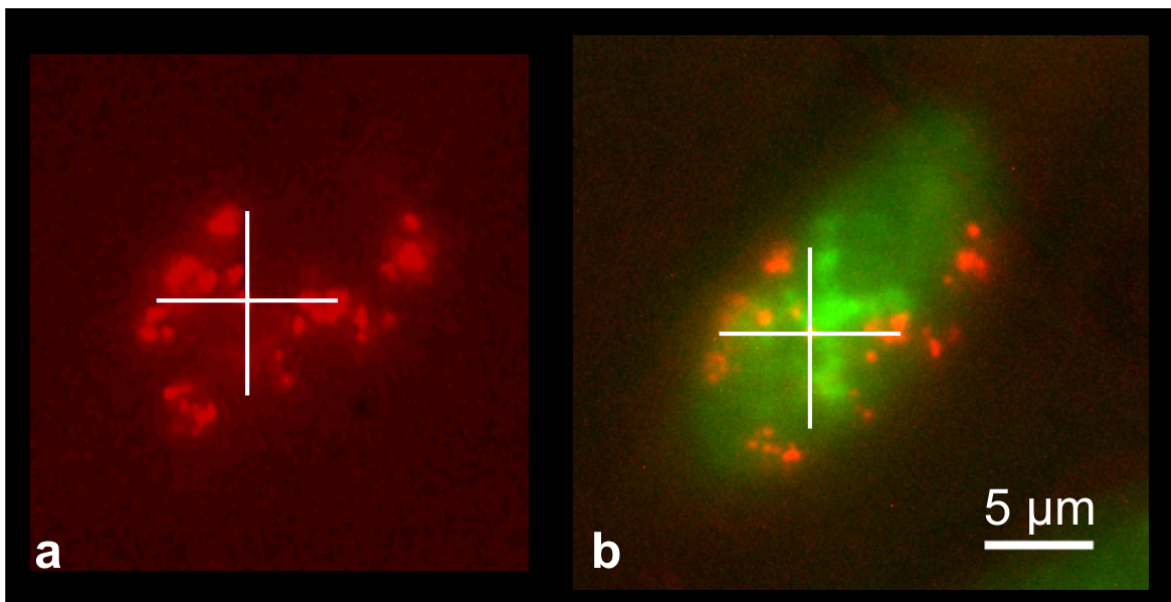
(c) Strahlauflösung in  $y$ .

**Abbildung 4.15:** Zur Bestimmung der Strahlauflösung wird ein Kernspurdetektor mit einem regelmäßigen Matrixmuster bestrahlt. Die  $x$ - und  $y$ -Abstände der sichtbaren Ionentreffer von der jeweiligen Ausgleichsgeraden werden ermittelt und in ein Histogramm eingetragen. Die Halbwertsbreite einer an diese Daten gefitteten Gauß-Funktion definiert die Auflösung des bestrahlten Musters.

Labeling-Technik [109] mit dem Farbstoff Texas Red [110] angefärbt. Die dadurch nach einigen Zellteilungen entstehenden kleinen Bereiche rot markierten Chromatins dienen als Ziel für die Bestrahlung (s. Abb. 4.16 (a)). Der in der Abbildung mit einem weißen Kreuz markierte rote Fleck sollte die Mitte einer Bestrahlung in Form eines  $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$  messenden Kreuzes darstellen.

Das Ergebnis der Bestrahlung ist in Abb. 4.16 (b) in Form eines Kreuzes aus grünen Mdc1-GFP-Foci ersichtlich. Dessen Mitte ist um ca.  $1,5 \mu\text{m}$  zu dem als Ziel ausgewählten Focus verschoben. Weitere Bestrahlungen zellulärer Substrukturen wiesen ebenfalls eine Zielgenauigkeit besser als  $2 \mu\text{m}$  auf.

Im Rahmen einer zukünftigen Doktorarbeit soll die Genauigkeit bei Zielbestrahlungen weiter erhöht werden. Einen möglichen Ansatzpunkt für Verbesserungen stellt die Verkürzung der Zeitspanne zwischen der Mikroskopaufnahme für die Auswahl des Ziels und der eigentlichen Bestrahlung dar. Diese beträgt momentan noch ca. eine Minute. Bei einer am SNAKE Lebendzellaufbau gemessenen Diffusionskonstante für Zellbewegungen auf dem Plastikszintillator von  $1,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$  [111] entspricht dies immerhin einem Versatz der Zellen zum anvisierten Bestrahlungspunkt um knapp  $0,5 \mu\text{m}$  (Sigma).



**Abbildung 4.16:** Gezielte Bestrahlung subnuklearer Strukturen [89]. (a) Zufällig ausgewählte Chromatinbereiche wurden mit dem Farbstoff Texas Red ( $\lambda_{em} = 613 \text{ nm}$ ) angefärbt. Einer dieser roten Punkte wurde als Ziel für die Bestrahlung ausgewählt (weißes Kreuz). (b) Überlagerung einer Mikroskopaufnahme des GFP- und des roten Kanals 15 min nach Bestrahlung. Das GFP-markierte Reparaturprotein Mdc1 zeigt das Bestrahlungsmuster. Dieses ist zum Zielpunkt um ca.  $1,5 \mu\text{m}$  nach rechts oben versetzt.



# Kapitel 5

## Erste Lebendzelleexperimente an SNAKE

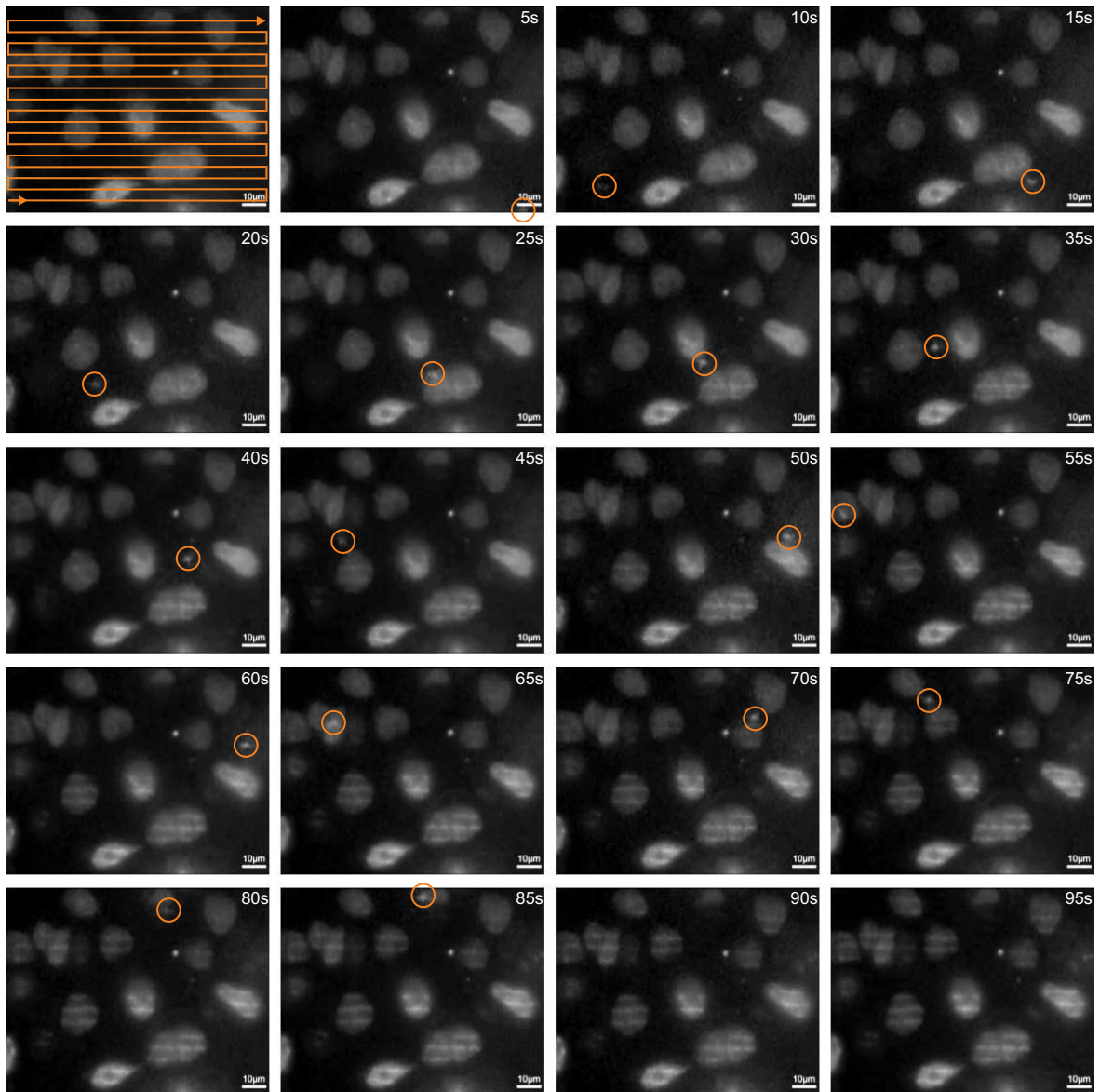
Nachdem nun der Versuchsaufbau im Detail beschrieben und charakterisiert ist, sollen im Folgenden die ersten biologisch relevanten Ergebnisse präsentiert werden. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf der Analyse von Proteinkinetiken, also dem zeitlichen Ablauf der Focibildung nach Bestrahlung.

### 5.1 Reparaturproteinkinetiken

Wie in Kap. 2.4 bereits beschrieben, sind an der Doppelstrangbruchreparatur zahlreiche Proteine beteiligt. Deren komplexe Abhängigkeiten voneinander sind häufig noch ungeklärt. Einen ersten Schritt bei der Ordnung dieses Systems stellt die systematische Katalogisierung der Proteinkinetiken dar. Denn es ist wahrscheinlicher, dass ein früher an den Schadensort akkumulierendes Protein ein später nachkommendes bedingt als umgekehrt.

Eine weitere Frage, die es zu klären gilt, ist die, ob schwere Schäden priorisiert behandelt werden. Auch hierbei kann die Untersuchung von Reparaturproteinkinetiken erste Lösungsansätze liefern. Hierfür wurden Zellen mit 55 MeV Kohlenstoffionen und mit 20 MeV Protonen bestrahlt. Bei der Bestrahlung mit Protonen wurde die Zahl der pro Punkt applizierten Protonen und somit die lokale Dosis variiert.

Da viele Proteine bereits innerhalb der ersten Sekunden mit der Anlagerung an die Schadensorte beginnen, können solche Kinetiken nur durch eine direkt am Bestrahlungsaufbau installierte Lebendzellmikroskopie, wie sie im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut wurde, untersucht werden. Immunofluoreszenz-Experimente sind hierfür ungeeignet, da die benötigte Zeit zum Probenausbau und zur Fixierung um ein vielfaches länger ist als die zu untersuchenden Prozesse. Die gleiche Einschränkung gilt auch für



**Abbildung 5.1:** Ionenmikrobestrahlung von *Mdc1-GFP* exprimierenden U2OS-Zellen. Der als Leuchtpunkt sichtbare Strahl rastert langsam wie im ersten Bild eingezeichnet linienförmig über die Probe, in den folgenden Bildern ist seine aktuelle Position mit einem Kreis markiert. Die Anlagerung von *Mdc1* an die Schadensorte kann bereits wenige Sekunden nach Bestrahlung der jeweiligen Stelle beobachtet werden.

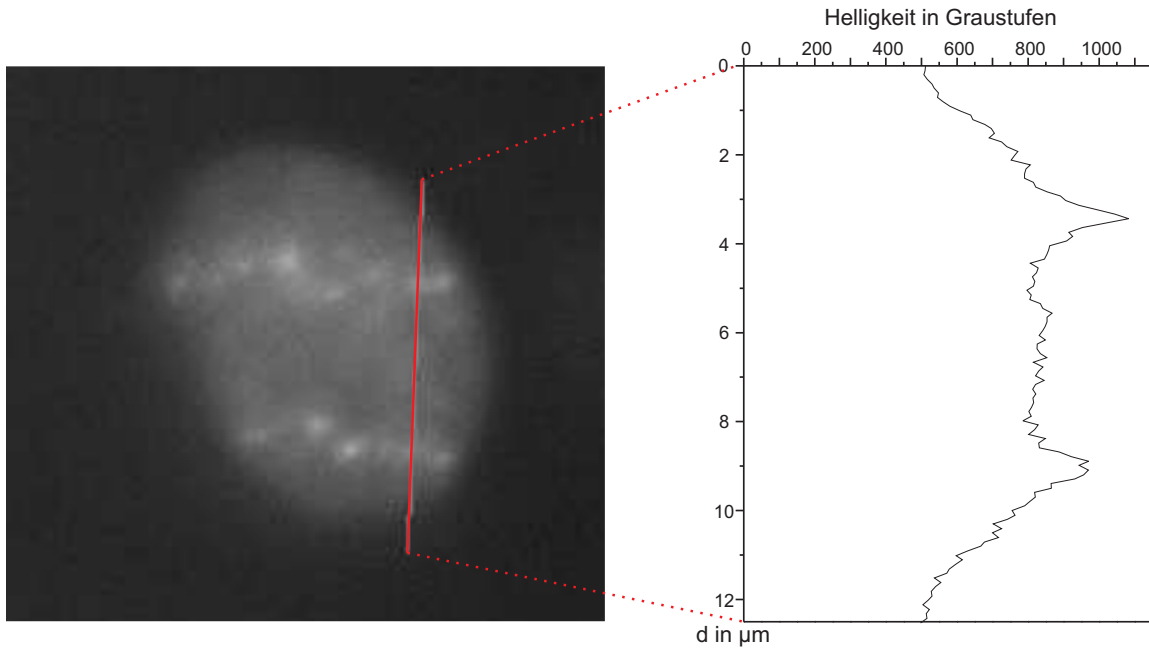
eine Lebendzelluntersuchung an einem räumlich vom Bestrahlungsaufbau getrennten Mikroskop.

Ein Beispiel für eine solch schnelle Kinetik ist die des Reparaturproteins *Mdc1* (s. Kap. 2.4.2). Ein an SNAKE entstandenes Video, welches unter <http://www.unibw.de/lrt2/zellbestrahlung/zellbestrahlung.wmv/view> herunterge-

laden werden kann, zeigt diesen Prozess eindrucksvoll. Ausschnitte des Videos im Abstand von fünf Sekunden sind in Abb. 5.1 zu einer Zeitserie zusammengefasst. Zu Demonstrationszwecken wurde bei der Generierung des Videos auf einen Einzelionennachweis verzichtet. Somit konnte das Licht des als Zellsubstrat dienenden Plastikszintillators statt auf den Photomultiplier auf die UV-sensitive Videokamera geleitet werden. Dies ermöglicht zusätzlich zur fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung der bestrahlten Zellen auch das Sichtbarmachen der momentanen Position des Strahls, welcher langsam über die Zellen rastert (in Abb. 5.1 jeweils mit einem Kreis markiert). Bei einem Strahlstrom von ca. 100 Ionen pro Sekunde und einer Bildrate der Kamera von 25 Hz wird dieser Leuchtpunkt im Mittel nur von vier Ionen generiert. Dies hat zur Folge, dass das Szintillatorsignal deutlich schwächer ist als das Fluoreszenzsignal und von diesem völlig überstrahlt wird. Des Weiteren blockt der Emissionsfilter des Mikroskops wie in Kap. 4.2.2 gefordert das Szintillatorsignal. Aus diesen Gründen wurden in dem Video zwei Spuren synchron überlagert: Die erste zeigt die Zellen während der Bestrahlung mit eingeschalteter Fluoreszenzbeleuchtung und GFP-Filter im Strahlengang. Die zweite zeigt das Szintillationslicht während einer völlig identischen Bestrahlung ohne Beleuchtung und Filter. Dieser nötige Kniff ändert nichts an der Tatsache, dass hier erstmals in Echtzeit eine Ionenmikrobestrahlung samt Zellreaktion mitverfolgt werden kann: Schon wenige Sekunden nach Bestrahlung ist eine Anlagerung von Mdc1 an die linienförmig applizierten Doppelstrangbrüche erkennbar.

### 5.1.1 Quantitative Analyse

Um genauere Aussagen über den zeitlichen Verlauf solcher Proteinkinetiken tätigen zu können, wurde eine quantitative Auswertemethode in Form eines Makros für die Open Source Bildbearbeitungs- und -analysesoftware ImageJ [112] entwickelt. Diese Methode ist in [111] und [113] im Detail beschrieben und wird im Folgenden kurz erläutert. Die grundlegende Annahme dabei ist, dass sich die Helligkeit eines Focus (gemessen in Graustufen der vorliegenden 16 Bit Bilddaten) proportional zur relativen Proteinmenge am entsprechenden Schadensort verhält. Als Rohdaten für eine solche Auswertung dienen anstelle einer Videoaufnahme mithilfe der höherauflösenden Axio-Cam Mikroskopkamera aufgenommene Zeitserien. Daraus wird ein einzelner Zellkern ausgeschnitten. Wie bereits dargelegt werden verschiedene Proteine, die durch GFP-Markierung in den jeweiligen Proben sichtbar gemacht wurden – namentlich Mdc1, 53BP1 und Rad52 – bei Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen und LET-Werten (einstellbar durch Variation von Ionenzahl und -art) verglichen. Um die Dosis exakt vorgeben zu können, wird für quantitative Experimente im Unterschied zu dem Demonstrationsvideo ein Einzelionennachweis durchgeführt. Des Weiteren wird der Strahl



**Abbildung 5.2:** Helligkeitsverlauf durch einen Zellkern und die Mittelpunkte zweier Foci knapp 4 min nach Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen. Selbst bei dieser kontrastreichen Zelle und einem Zeitpunkt, zu dem die Mdc1-Foci schon sehr stark ausgeprägt sind, liegen die Focimittelpunkte nur ca. 10–20% über dem Zellkernhintergrund.

deutlich schneller über die Probe gerastert, sodass die Bestrahlungsdauer meist weniger als drei Sekunden beträgt, was den Zeitfehler bei einer quantitativen Analyse verringert.

Um aus diesen Rohdaten zuverlässige Informationen über die Proteinkinetik zu bekommen, muss die Auswertemethodik folgende Anforderungen erfüllen:

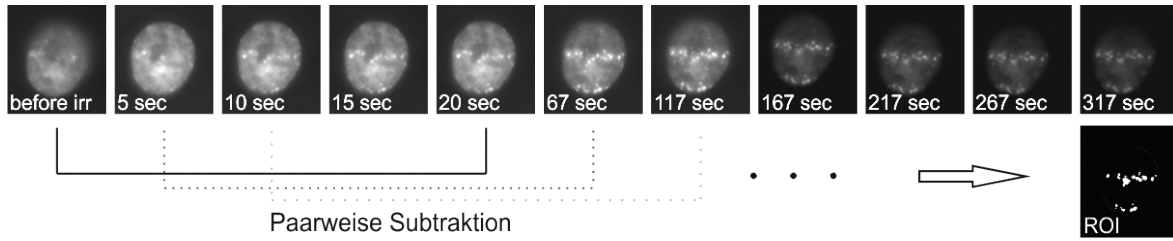
- Korrektur von Zellkernbewegungen.
- Helligkeitsmessung von Foci, die innerhalb des Zellkerns diffundieren [7, 8, 114].
- Funktionsfähigkeit auch bei geringem Signal-zu-Untergrund-Verhältnis der Mikroskopdaten (vgl. Abb 5.2).
- Korrektur des Ausbleichens der Probe (s. Kap. 3.1), welches unabhängig von Effekten im Zellkern eine Abnahme der absoluten Helligkeit der Foci bewirkt.

Zur Korrektur von Zellkernbewegungen wird für jede Aufnahme der Zeitserie automatisch der Zellkernmittelpunkt bestimmt. Die einzelnen Bilder der Zeitserie werden nun so verschoben, dass die Zellkernmittelpunkte jeweils deckungsgleich sind. Auch

Drehungen des Zellkerns werden von dem Makro eliminiert. Dazu wird der Helligkeitsverlauf entlang eines Ringes im Zellkern bestimmt. Die folgende Aufnahme wird so weit gedreht, dass die beiden Verläufe die geringste Abweichung voneinander aufweisen. Eine manuelle Überprüfung und Korrektur dieser Automatismen ist möglich.

Aus der so bearbeiteten Zeitserie, die nun keine Bewegungen des abgebildeten Zellkerns mehr aufweist, muss nun die „region of interest“ (ROI), innerhalb der die Helligkeit der Foci ausgewertet wird, bestimmt werden. Eine Auswertung der oder des hellsten Pixels des jeweiligen Focus reicht nicht aus. Denn diese wird, sobald mit der Proteinanlagerung nicht nur ein Hellerwerden der Foci sondern auch eine Größenzunahme einhergeht, dem Sachverhalt nicht gerecht. Deshalb erfasst der zur Auswertung entwickelte Algorithmus die Orte der Foci in ihrer Gesamtheit. Dazu werden die einzelnen Bilder der Zeitserie paarweise voneinander subtrahiert (z. B. Bild 5 – Bild 1, Bild 6 – Bild 2 usw., vgl. Abb. 5.3). Das Ergebnis zeigt die Pixel auf, an denen Veränderungen aufgetreten sind. All diese werden zur ROI hinzugefügt. Die ROI enthält also die Gesamtheit aller Orte, an denen in der zu untersuchenden Zeitserie Foci sichtbar sind. Um nicht auch Rauschartefakte in den Bildern der ROI zuzuordnen, muss das Ergebnis der Bildsubtraktion eine gewisse Schwelle überschreiten. Darüber hinaus muss ein Pixel bei einer Mindestanzahl (z. B. zwei) von Subtraktionen eine Veränderung aufweisen, um der ROI zugerechnet zu werden. Die Wahl dieser Mindestanzahl sowie der Schwelle beeinflussen die genaue Größe der ROI. Der Einfluss der ROI-Größe auf die den zeitlichen Verlauf der Kinetik beschreibenden Parameter wird in [111] diskutiert und mit weniger als 10% angegeben. Da die ROI wie beschrieben die über alle Zeitpunkte aufsummierten Fociflächen enthält, wird sie auch durch starke Focibewegungen vergrößert. Trotzdem bietet die so ermittelte ROI ein solideres Fundament für quantitative Helligkeitsauswertungen als eine händisch gewählte oder eben nur die Messung der jeweils hellsten Pixel.

Aufgrund der schon erwähnten Bleachingeffekte kann für eine aussagekräftige Auswertung der Entwicklung der Foci nicht die mittlere Pixelhelligkeit innerhalb der ROI  $I_{foci}$  in Abhängigkeit der Zeit ermittelt werden. Stattdessen muss eine Relativmessung durchgeführt werden, sodass die Bestimmung der Helligkeit einer Vergleichsfläche  $I_{control}$  vonnöten ist. Eine Bleaching-unabhängige Messgröße stellt dann die relative Intensität  $I_{rel} = I_{foci}/I_{control}$  dar. Als  $I_{control}$  eignet sich am besten die Gesamthelligkeit des Zellkerns  $I_{Zellkern}$ . Auch die Helligkeit einer unbestrahlten Fläche des gleichen Zellkerns wäre denkbar. Jedoch würde in diesem Fall eine evtl. Umlagerung des Proteins vom unbestrahlten Bereich zu den Foci bei der Quotientenbildung  $I_{foci}/I_{control}$  doppelt gewertet werden, da sie sowohl eine Abnahme von  $I_{control}$  als auch eine Zunahme von  $I_{foci}$  bewirkt.



**Abbildung 5.3:** Ausschnitte einer Zeitserie, die einen Zellkern mit GFP-markiertem Mdc1 nach Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoff zeigt. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Bestrahlungszeitpunkt. Eine Bleaching-bedingte Intensitätsabnahme ist erkennbar. Paarweises Subtrahieren der Bilder zeigt die Orte im Zellkern, an denen sich Foci bilden. Die über alle Subtraktionen aufsummierten Fociorte bilden die ROI, innerhalb der die Helligkeitsentwicklung ausgewertet wird.

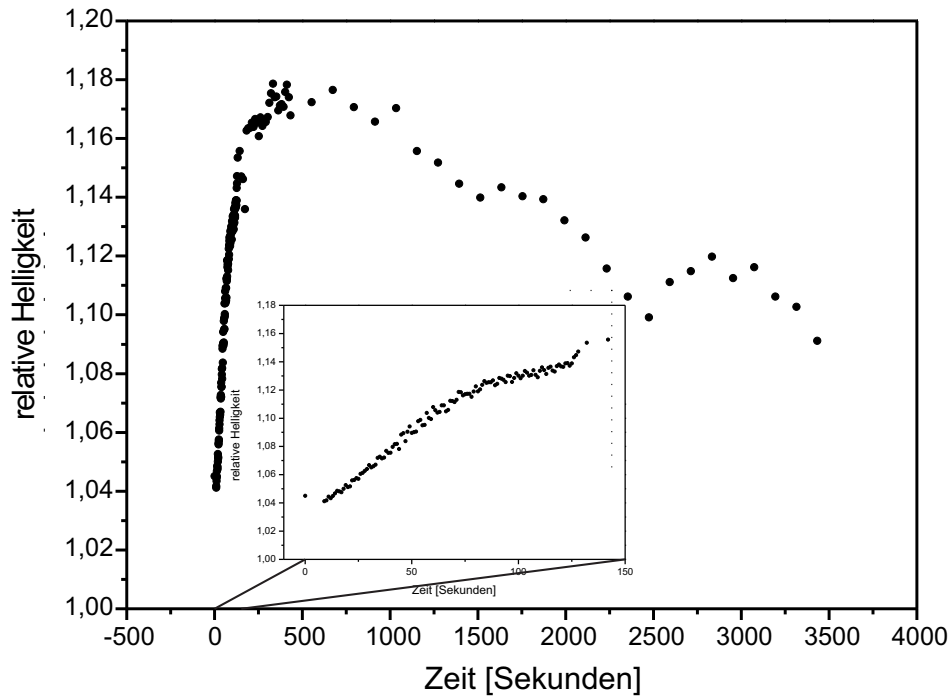
Abb. 5.4 zeigt exemplarisch für einen Zellkern die Helligkeitsentwicklung von Mdc1-Foci nach Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen. Um aus solchen Daten Zeitkonstanten zu quantifizieren, wird folgende Funktion angefitet, deren Verlauf in Abb. 5.5 dargestellt ist:

$$I_{rel}(t) = \begin{cases} I_0 & \text{für } t \leq T_0 \\ I_0 + I_1 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t-T_0}{\tau_1}}\right) \cdot e^{-\frac{t-T_0}{\tau_2}} & \text{für } t > T_0 \end{cases} \quad (5.1)$$

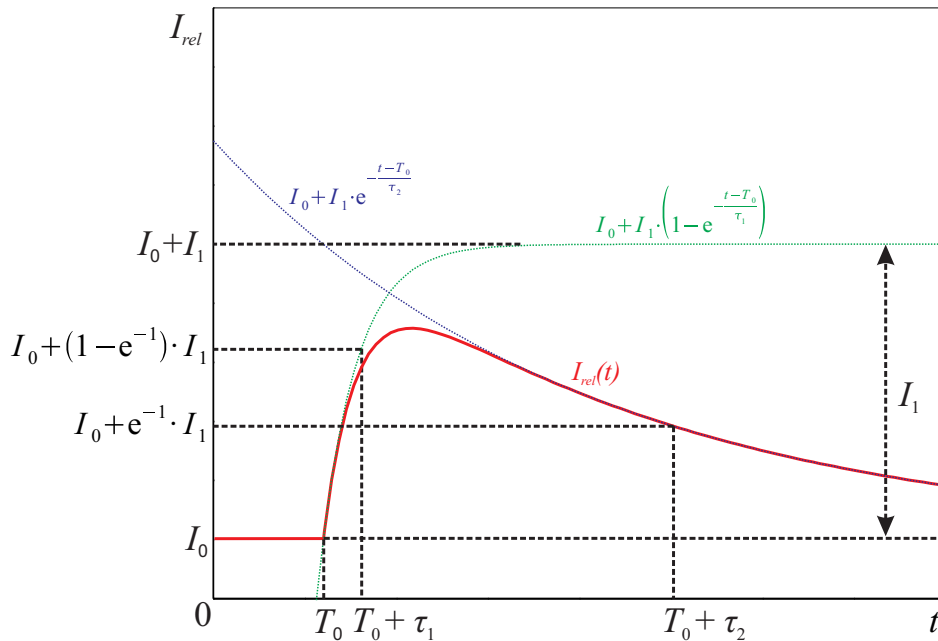
Dabei sind  $I_0$ ,  $I_1$ ,  $T_0$ ,  $\tau_1$  und  $\tau_2$  die Fitparameter. Der erste Teil der abschnittsweise definierten Funktion (5.1) beschreibt ein konstantes Verhältnis  $I_0$  von ROI-Helligkeit zur Gesamthelligkeit der Zelle in der Zeitspanne zwischen Bestrahlung zum Zeitpunkt  $t = 0$  und dem Einsetzen der Focibildung bei  $t = T_0$ . Das Helligkeitsverhältnis  $I_0$  ist im Falle eines homogen leuchtenden Zellkerns gleich eins. Abweichungen davon sind durch Inhomogenitäten der Helligkeitsverteilung im Zellkern, wie Nukleoli, bedingt und haben für die Kinetikauswertung keinerlei Bedeutung. Bei der in Abb. 5.4 gezeigten Kinetik setzt die Proteinanlagerung sehr früh ein,  $T_0$  beträgt also nur wenige Sekunden.

Ab  $t = T_0$  beginnt dann die Focibildung, ausgehend von der Anfangsintensität  $I_0$ . Dieser Vorgang wird von dem Term  $I_1 \cdot (1 - e^{-(t-T_0)/\tau_1})$  beschrieben. Dabei stellt  $I_1$  die Maximalintensität dar, die Geschwindigkeit des Anlagerungsprozesses wird von der Zeitkonstante  $\tau_1$  bestimmt. Konkurrierend zu dieser Anlagerung findet an den Foci ein Proteinabbau z. B. aufgrund von erfolgter Reparatur statt. Dieser weist eine größere Zeitkonstante  $\tau_2$  auf und wird von dem Term  $e^{-(t-T_0)/\tau_2}$  beschrieben. Beide Terme sind – einer anschaulicheren Darstellung wegen jeweils mit Vorfaktor  $I_1$  sowie dem Summanden  $I_0$  versehen – in Abb. 5.5 auch separat eingezeichnet.

Die für eine Quantifizierung des An- und Ablagerungsprozesses relevanten Parameter  $T_0$ ,  $\tau_1$  und  $\tau_2$  werden für jede Zelle einzeln ermittelt. Aus den so gewonnenen



**Abbildung 5.4:** Relative Focihelligkeit  $I_{rel} = I_{foci}/I_{Zellkern}$  eines mit 55 MeV Kohlenstoffionen bestrahlten Zellkerns. Die Bestrahlung erfolgte zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Der für  $t = 0$  eingetragene Datenpunkt stellt das Helligkeitsverhältnis kurz vor der Bestrahlung dar. Das Inlay zeigt den Anlagerungsprozess mit gespreizter Zeitachse.



**Abbildung 5.5:** Graph der Funktion (5.1) (rot) sowie der Proteinanlagerung (grün) und -abbau (blau) beschreibenden Terme.

Daten wird ein fehlergewichteter Mittelwert gebildet. Die auf diese Weise im Rahmen einer Diplomarbeit [115] gewonnenen Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

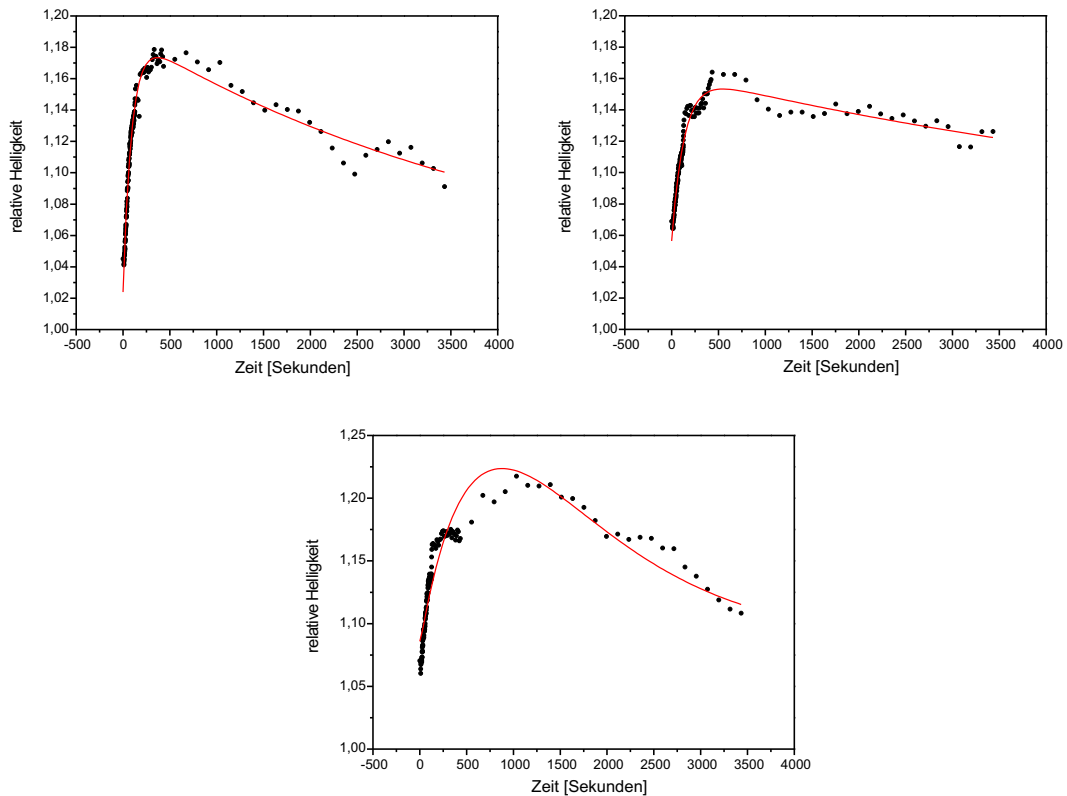
## 5.1.2 Kinetik des Proteins Mdc1

### 5.1.2.1 Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoff

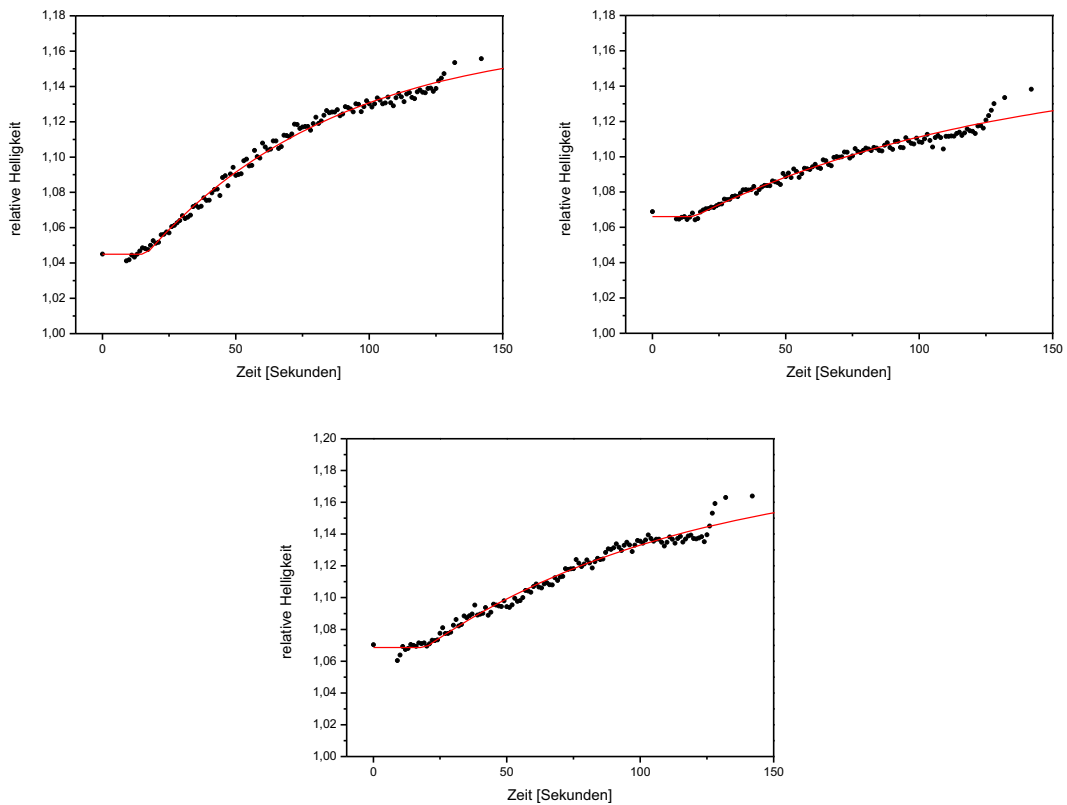
Der Helligkeitsverlauf, den das Protein Mdc1 nach Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen zeigt, ist exemplarisch für drei Zellen in Abb. 5.6 dargestellt. Die erste dieser Zellen ist die in Abb. 5.4 gezeigte. An die Daten ist die Funktion (5.1) angefitet. Während sich alle drei Zellen im Anstieg ähnlich verhalten (vergrößert in Teilabbildung 5.6(b) gezeigt), werden im weiteren Verlauf immer größere Unterschiede ersichtlich. Dieser Effekt muss nicht ausschließlich durch von Zelle zu Zelle schwankendes Verhalten bedingt sein, sondern kann auch mit dem verschlechterten Signal-zu-Untergrund-Verhältnis in Zusammenhang stehen, welches am Ende der Zeitserien aufgrund von Ausbleichen auftritt. Somit weist der den Abfall beschreibende Parameter  $\tau_2$  eine deutlich höhere Schwankungsbreite als  $\tau_1$  auf. Jedoch sind in der gewählten Modellfunktion die Parameter  $\tau_1$  und  $\tau_2$  nicht unabhängig voneinander, sodass der stärker schwankende Parameter  $\tau_2$  auch den Anstiegsparameter  $\tau_1$  beeinflusst. Diesem Umstand wird dadurch begegnet, dass an jede Zelle zunächst analog zu Abb. 5.6(a) die gesamte Funktion (5.1) gefittet wird. Daraufhin wird für die aus diesen Fits abgeleiteten Abfallparametern  $\tau_2$  ein Mittelwert gebildet. Zur von Schwankungen von  $\tau_2$  weitgehend unabhängigen Bestimmung von  $T_0$  und  $\tau_1$  wird die Fitfunktion (5.1) nochmals an den ansteigenden Teil des Helligkeitsverlaufs jeder Zelle gefittet, wobei  $\tau_2$  nicht mehr als Variable eingeht, sondern auf den eben bestimmten Mittelwert festgesetzt wird. Dieses Vorgehen wird detailliert in [115] beschrieben.

Um den Helligkeitsverlauf aller sieben ausgewerteten Zellen zu visualisieren, ist deren relative Intensität in Abb. 5.7 normiert gegen die Zeit aufgetragen. Die Normierung erfolgt derart, dass die höchste Intensität jeder Zelle eins beträgt, die Intensität vor Bestrahlung wird 0 gesetzt. Die so generierte Punktwolke dokumentiert ebenfalls die bei allen Zellen ähnliche Anstiegscharakteristik und die mit der Zeit wachsenden Abweichungen voneinander. Die eingezeichnete Kurve zeigt den Verlauf der Ausgleichsfunktion (5.1), wenn für die Parameter  $T_0$ ,  $\tau_1$  und  $\tau_2$  die gewichteten Mittelwerte der wie eben beschrieben zellweise bestimmten Werte eingesetzt werden. Diese Methode liefert aufgrund der weitestgehenden Entkopplung von  $\tau_1$  und  $\tau_2$  konsistentere Ergebnisse als ein direkter Fit von (5.1) an die Datenwolke [115].



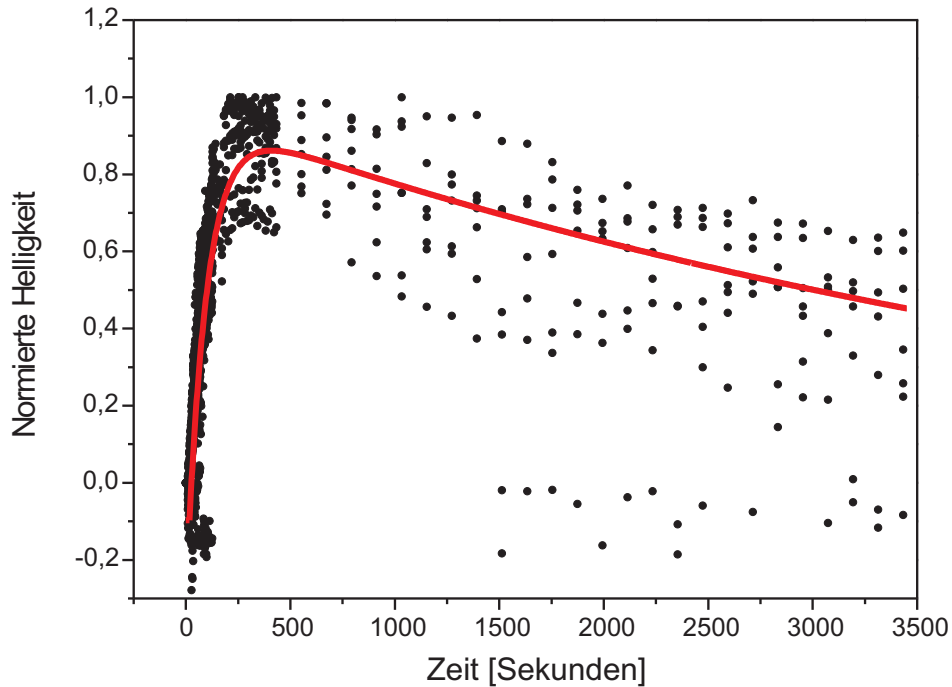


(a) Gesamtverlauf.



(b) Bereich der Focibildung der in (a) gezeigten Helligkeitsverläufe.

**Abbildung 5.6:** Helligkeitsverlauf der *Mdc1*-Foci dreier exemplarisch ausgewählter Zellen nach linienförmiger Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen. Die verabreichte Dosis beträgt 4,4 Gy. An die Daten ist Funktion (5.1) angefitet.

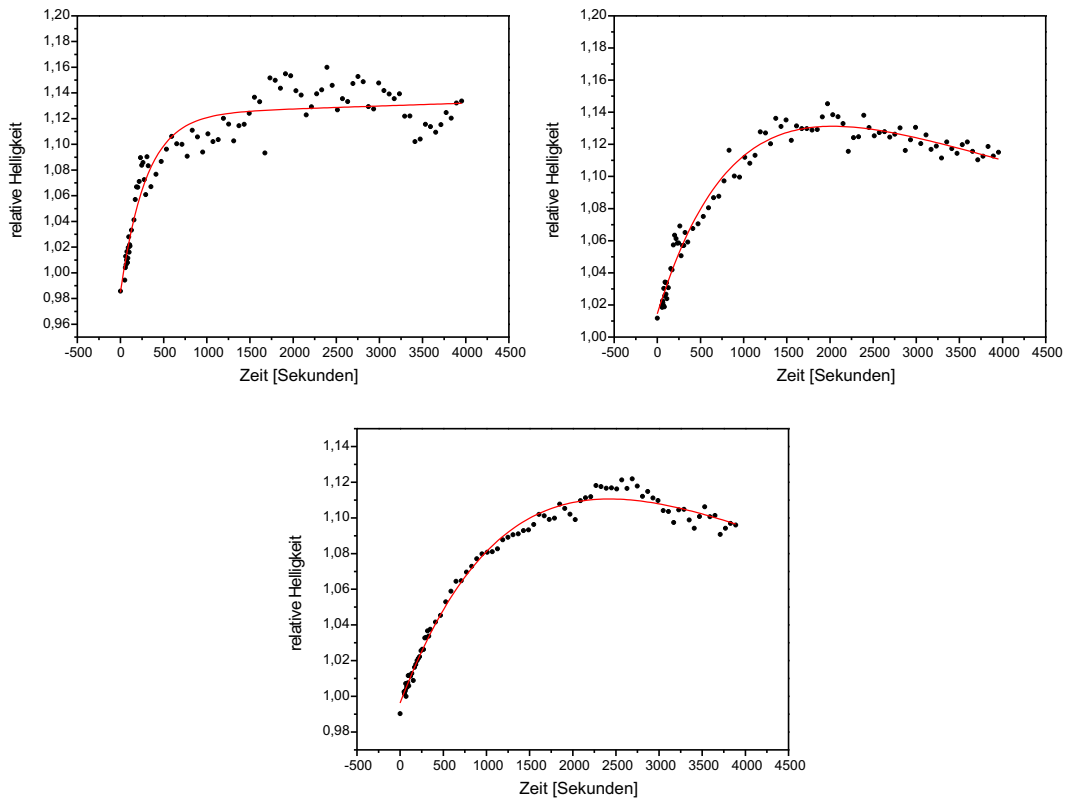


**Abbildung 5.7:** *Normierter Helligkeitsverlauf der Mdc1-Foci von sieben ausgewerteten Zellen nach Kohlenstoffbestrahlung. Ebenfalls eingezeichnet ist Funktion (5.1), wobei für die Parameter  $T_0$ ,  $\tau_1$  und  $\tau_2$  die gewichteten Mittelwerte der durch Anfitzen von (5.1) an die Verläufe der einzelnen Zellen ermittelten Werte verwendet werden.*

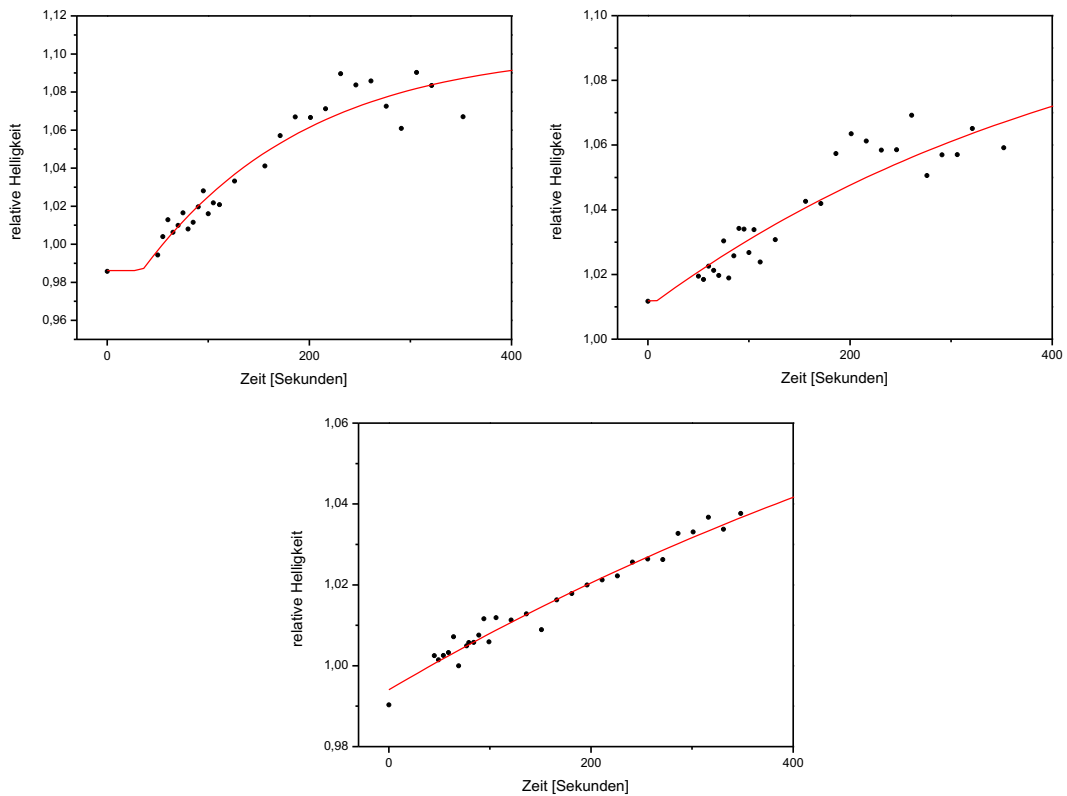
Als gewichtetes Mittel ergibt sich nach Applizierung von 4,4 Gy durch 55 MeV Kohlenstoffionen für den Zeitoffset  $T_0 = 17 \pm 2$  s, für die Anlagerungszeit  $\tau_1 = 98 \pm 11$  s und für die Abfallszeit  $\tau_2 = 5300 \pm 1200$  s. Die Fehlerangabe von  $T_0$  berücksichtigt nicht nur den statistischen Fehler des Mittelwerts sondern auch die durch die endliche Bestrahlungsdauer bedingten Fehler.

### 5.1.2.2 Bestrahlung mit 20 MeV Protonen

Wie bereits erwähnt, wurde die Kinetik nicht nur nach Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen sondern auch mit 20 MeV Protonen untersucht. Für eine Bestrahlung des selben Linienmusters, jedoch mit 128 Protonen pro Punkt, die in Summe knapp 10% mehr Dosis in dem Zellkern deponieren als ein Kohlenstoffion, sind die Verläufe analog zu den Abbildungen 5.6 und 5.7 in Grafik 5.8 und 5.9 gezeigt. Als Datengrundlage dienen hier 22 ausgewertete Zellen. Deutlich erkennbar läuft bei der Protonenbestrahlung die Proteinanlagerung langsamer ab,  $T_0$  ist mit  $73 \pm 16$  s ca. viermal länger als nach Kohlenstoffbestrahlung,  $\tau_1$  mit  $1050 \pm 270$  s zehnmal länger. Auch der durch  $\tau_2$  charakterisierte Abbau des Proteins scheint nach Protonenbestrahlung langsamer zu

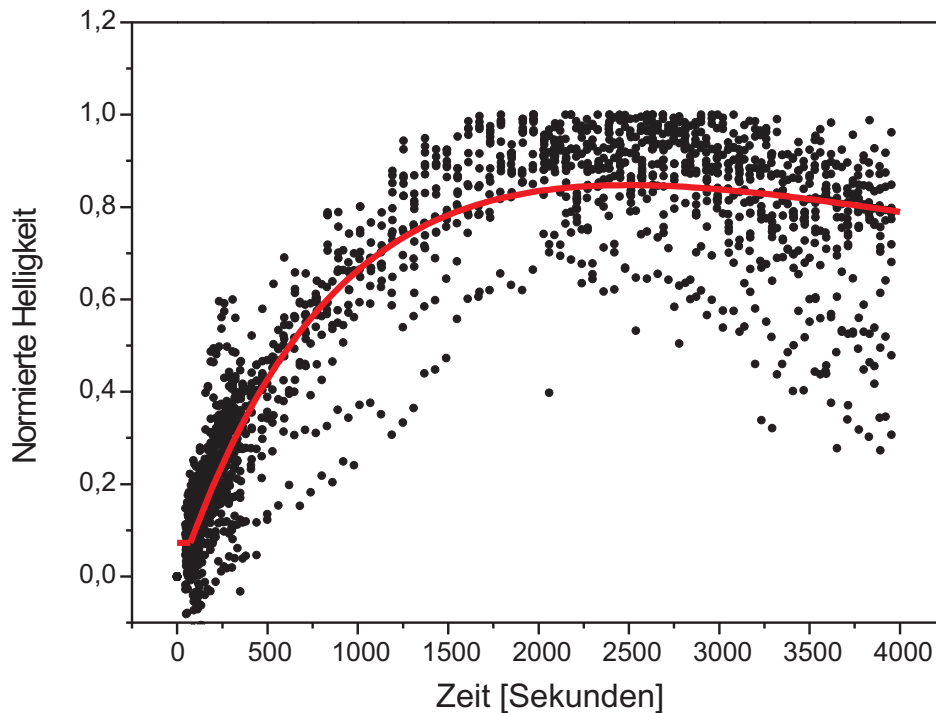


(a) Helligkeitsverlauf dreier ausgewählter Zellen.



(b) Bereich der Focibildung der in (a) gezeigten Helligkeitsverläufe.

**Abbildung 5.8:** *Mdc1*-Kinetik nach Bestrahlung mit 20 MeV Protonen. Die applizierte Dosis beträgt 4,8 Gy, wobei jeder Punkt des linienförmigen Bestrahlungsmusters mit 128 Protonen bestrahlt wurde.



**Abbildung 5.9:** *Mdc1-Kinetik nach Bestrahlung mit 20 MeV Protonen: Normierte Focihelligkeit aller 22 ausgewerteten Zellen.*

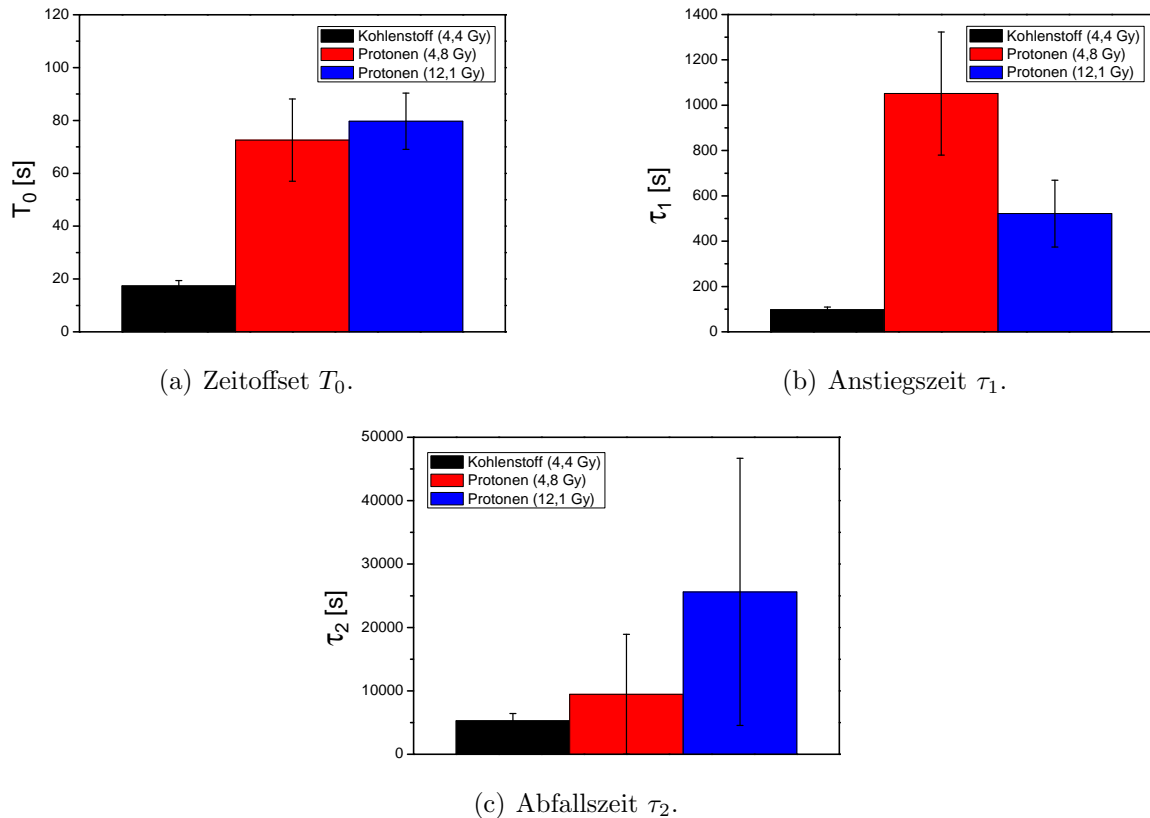
verlaufen als nach Kohlenstoffbestrahlung. Allerdings ist der Fehler aufgrund der starken Streuung dieses Parameters zu groß, um signifikante Aussagen treffen zu können. Gründe hierfür sind die zu kurze Beobachtungsdauer und das Ausbleichen des GFPs aufgrund der häufigen Bildakquise im Anstiegsbereich. Durch eine längere Beobachtungszeit und weniger häufige Belichtungen ließe sich  $\tau_2$  exakter bestimmen, jedoch auf Kosten der Genauigkeit der beiden Anlagerungsparameter  $T_0$  und  $\tau_1$ , auf denen das Hauptaugenmerk der Kinetikuntersuchungen liegt.

Die unterschiedlichen Kinetiken nach Kohlenstoff- bzw. Protonenbestrahlung wecken den Verdacht, dass die Kinetik von der Zahl der generierten Doppelstrangbrüche abhängen könnte. Um diese These genauer zu prüfen, wurden weitere Bestrahlungen mit 320 pro Punkt applizierten Protonen durchgeführt. Der Faktor 2,5 in der Protonenzahl und somit in der applizierten Dosis entspricht in etwa dem erwarteten RBE-Faktor des Kohlenstoffs gegenüber den Protonen hinsichtlich Doppelstrangbrucherzeugung [17].

Die Zeitoffsets  $T_0$  beider Protonenbestrahlungen sind im Rahmen der Messgenauigkeit gleich, die Zeitkonstante der Proteinanlagerung  $\tau_1$  halbiert sich jedoch bei der Bestrahlung mit 320 Protonen pro Punkt auf 520 s (wobei die Fehlerintervalle beider Messwerte beinahe noch überlappen). Allerdings liegt  $\tau_1$  damit noch einen Faktor 5

Ion	Ionen pro Punkt	Dosis [Gy]	$T_0$ [s]	$\tau_1$ [s]	$\tau_2$ [s]
55 MeV C	1	4,4	$17 \pm 2$	$98 \pm 11$	$5300 \pm 1200$
20 MeV H	128	4,8	$73 \pm 16$	$1050 \pm 270$	$9500 \pm 9500$
20 MeV H	320	12,1	$80 \pm 11$	$520 \pm 150$	$26000 \pm 21000$

**Tabelle 5.1:** Gewichtete Mittelwerte der Kinetik-Parameter Zeit-Offset  $T_0$ , Anstiegszeit  $\tau_1$  sowie Abfallszeit  $\tau_2$  des Proteins Mdc1 für verschiedene Bestrahlungsarten und -dosen.



**Abbildung 5.10:** Gewichtete Mittelwerte der Kinetik-Parameter des Proteins Mdc1 für verschiedene Bestrahlungsarten und -dosen.

über dem Wert der Kohlenstoffbestrahlung. Alle Ergebnisse zur Mdc1-Kinetik sind in Tabelle 5.1 und Abb. 5.10 noch einmal zusammengefasst.

### 5.1.2.3 Diskussion der Ergebnisse

Ein wichtiges Ergebnis der Kinetik-Untersuchungen stellt das Vorhandensein des Zeitoffsets  $T_0$  dar. Dieser wurde in bisherigen in der Literatur gefundenen Auswertungen nicht berücksichtigt [33, 116, 117]. Ein solcher Offset kann bedeuten, dass zu-

nächst von anderen Proteinen getriebene Vorgänge in der Zelle ablaufen müssen, bevor die Anlagerung des Mdc1 beginnt.

Einen anderen wichtigen Punkt stellt die gefundene Dosis- bzw. LET-Abhängigkeit dar, welche im Folgenden genauer betrachtet werden soll. Die beschleunigte Proteinanlagerung bei gesteigerter Protonenzahl bzw. bei Kohlenstoffbestrahlung kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass schwerere oder zahlreichere Schäden mit höherer Priorität behandelt werden. Ein solcher Effekt ist nicht unbedingt zu erwarten, vielmehr könnte man sich bei der akkumulierten Proteinmenge eher eine Dosis- bzw. LET-Abhängigkeit vorstellen als bei den Zeitkonstanten der Anlagerung. Deshalb sollen nun mögliche Einflussfaktoren auf die Kinetik diskutiert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Anlagerungsgeschwindigkeit durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins im Zellkern limitiert ist. Dann würde die Anlagerungskinetik die Zeit widerspiegeln, die das im Zellkern verstreute Protein benötigt, um an die Schadensorte zu gelangen. Dieser These widersprechen jedoch die an SNAKE gewonnenen Ergebnisse. Da die Schäden in allen betrachteten Bestrahlungsszenarien gleich im Zellkern verteilt sind (identische Linienmuster), kommt die von den Proteinen zum Schaden zurückzulegende Strecke zumindest bei Protonenbestrahlung nicht als entscheidender Faktor infrage. Eine Argumentation, dass bei kritischeren Schäden auch weiter vom Schadensort entfernte Proteine dorthin wandern würden, müsste zur umgekehrten Beobachtung führen, dass die schwereren/zahlreicheren Schäden eine längere Akkumulationszeit aufweisen.

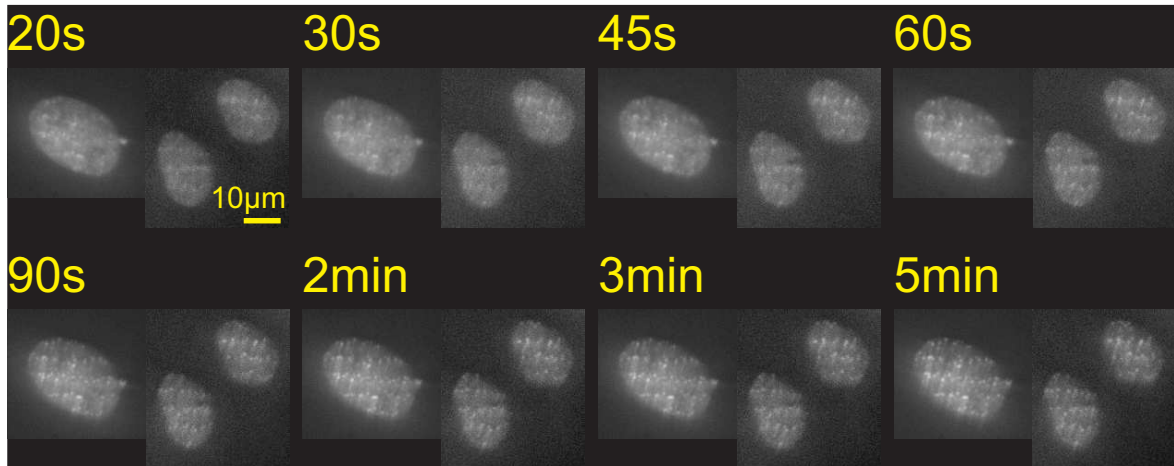
Ein weiterer Kandidat für eine die Kinetik beeinflussende Größe ist die Proteinmenge. So ist die Vorstellung naheliegend, dass sich an schwerere bzw. zahlreichere Schäden mehr Mdc1 anlagert. Bei einem begrenzten Mdc1-Pool innerhalb der Zelle könnte dieser nach Bestrahlung mit Kohlenstoff oder der höheren Protonendosis schneller aufgebraucht sein als nach der Protonen-Bestrahlung mit 4,8 Gy. Eine mögliche Nachproduktion des Mdc1, wenn der in der Zelle vorhandene Vorrat aufgebraucht ist, würde die Anlagerungsgeschwindigkeit verlangsamen und somit zu den hier gemachten Beobachtungen widersprechende Ergebnisse liefern. Ohne eine Nachproduktion des Proteins wäre unter der Annahme gleicher Anlagerungsraten  $dI/dt(t)$  pro Doppelstrangbruch die maximale Focihelligkeit bei einer hohen Anzahl von Schäden eher erreicht, als wenn nur wenige Doppelstrangbrüche mit Mdc1 zu versorgen wären. Dieser Umstand könnte trotz gleicher Anlagerungsraten als schneller ablaufende Kinetik fehlinterpretiert werden. Betrachtet man jedoch Bildmaterial bestrahlter Zellen, erkennt man auch bei voll ausgeprägten Foci einen starken GFP-Hintergrund in den Zellen (vgl. Abb. 5.2). Dieser deutet auf reichlich vorhandenes, noch nicht an Schäden gebundenes Mdc1 hin, sodass ein erschöpfter Mdc1-Pool als Ursache der unterschiedlichen Anlagerungskinetiken eher unwahrscheinlich ist. Sollten die gemessenen unterschiedlichen Anlagerungszeiten nur

ein Nebeneffekt eines je nach Bestrahlungsweise früher oder später erschöpften Mdc1-Vorrats in der Zelle sein, müssten die Kinetiken auch von der in der Zelle vorhandenen Menge an Mdc1 abhängen. Unter der Annahme einer konstanten Menge endogenen (also natürlichen, nicht GFP-markierten) Proteins würde die Helligkeit der Zelle die darin vorhandene Menge an Mdc1 widerspiegeln. Eine Abhängigkeit der Kinetik von der Gesamthelligkeit der Zelle konnte jedoch nicht gefunden werden [115]. Des Weiteren lässt sich die LET-Abhängigkeit des Zeitoffsets  $T_0$  über die Proteinmenge nicht erklären.

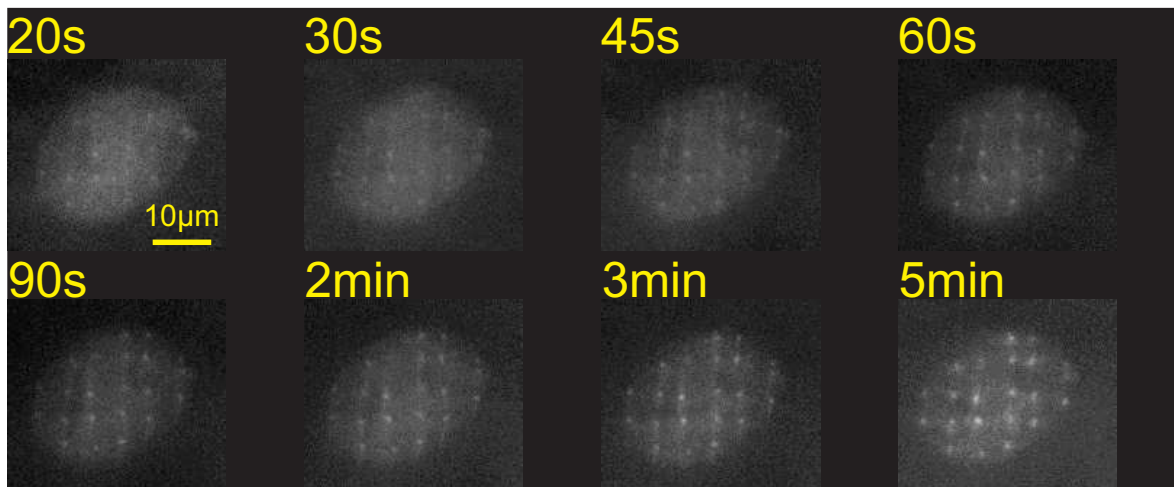
Die Diskussion um einen erschöpften Mdc1-Pool als Ursache für die unterschiedlichen Mdc1-Kinetiken steht auch im Zusammenhang mit einer weiteren Fragestellung: Was hat den entscheidenden Einfluss auf die Mdc1-Kinetik, die applizierte Punktdosis oder die im Zellkern deponierte Gesamtdosis? Bei den bisher präsentierten Ergebnissen wurden durch die weitestgehende Konstanthaltung der Bestrahlungsmuster lokale und Gesamtdosis gleichermaßen variiert. Sollte die verfügbare Menge an Mdc1 für die unterschiedlichen Kinetiken verantwortlich sein, müsste die Kinetik – zumindest unter der Annahme, dass sich das Mdc1 im gesamten Zellkernvolumen bewegen kann – von der Gesamtzahl der Doppelstrangbrüche im Zellkern und somit hauptsächlich von der applizierten Gesamtdosis abhängen.

Um dies zu überprüfen, wurde eine Probe mit 55 MeV Kohlenstoffionen an einer Position in einem  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ -Matrixmuster und an einer anderen Position in einem  $1\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ -Linienmuster bestrahlt. Die applizierte Gesamtdosis wurde also um einen Faktor 5 variiert (2,0 Gy bzw. 9,9 Gy), während der von einem Ion generierte lokale Schaden identisch ist. Eine quantitative Auswertung dieser Probe steht noch an und würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, erste Einblicke ermöglicht jedoch Abb. 5.11. Hier sind keine gravierenden Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Focibildung erkennbar, was einen Hinweis darauf gibt, dass die lokale Anzahl und Qualität der DNA-Schäden größeren Einfluss auf die Mdc1-Kinetik hat als die Gesamtanzahl der Schäden im Zellkern, was mit der Mdc1-Pool-These nicht verträglich ist.

Eine Abhängigkeit der Kinetik von der lokalen Schadensdichte ist auch mit der Beobachtung vereinbar, dass sich die Kinetik nach Kohlenstoffbestrahlung deutlich von der nach Bestrahlung mit 320 Protonen pro Punkt unterscheidet, obwohl die Zahl der induzierten Doppelstrangbrüche in etwa gleich sein sollte. Die Abweichung ließe sich dann folgendermaßen erklären: Während bei der Kohlenstoffbestrahlung die Doppelstrangbrüche hauptsächlich in einem engen Bereich um das Zentrum der Ionenspur auftreten (für 75 MeV Kohlenstoff liegen gut die Hälfte aller DSBs innerhalb eines Radius von einem Nanometer um die Spur und über 90% innerhalb eines Radius von 100 nm [17]), ist die Dichte der protonengenerierten Schäden durch die Strahlauflö-



(a) Linienförmige Bestrahlung (9,9 Gy).



(b) Matrixförmige Bestrahlung (2,0 Gy).

**Abbildung 5.11:** *Mdc1*-Kinetik nach linien- und matrixförmiger Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen. Die zeitlichen Verläufe der Focibildung beider Proben weisen keine gravierenden Unterschiede auf, sodass die Kinetik bei gleichartigen Bestrahlungen von der applizierten Gesamtdosis im betrachteten Rahmen weitgehend unabhängig zu sein scheint. Die Zeitangaben sind relativ zum Bestrahlungszeitpunkt.



sung begrenzt. Diese lässt sich für Protonen nicht auf die in Kapitel 4.4.1 beschriebene Methode mittels Kernspurdetektor bestimmen, da die Energiedeposition in der Polycarbonatfolie zu gering ist. Um eine Obergrenze zu erhalten, wurden in der mit 320 Protonen pro Punkt bestrahlten Probe die Durchmesser einiger Foci senkrecht zur Bestrahlungslinie gemessen. Dabei ergibt sich ein Mittelwert von ca. 2  $\mu\text{m}$  FWHM. Um die biologisch bedingte Ausdehnung der Foci zu kompensieren, wurde in einer mit einem Kohlenstoffion pro Punkt bestrahlten Probe der Focidurchmesser zu ca. 1  $\mu\text{m}$  bestimmt und quadratisch subtrahiert, sodass sich die Strahlaufösung mit Protonen zu ca. 1,7  $\mu\text{m}$  FWHM abschätzen lässt. Dieser Wert stellt freilich nur eine sehr grobe Abschätzung dar, schließlich kann die Focigröße u. a. auch eine LET-Abhängigkeit aufweisen. Sie macht jedoch deutlich, dass die Streuung der Protonen größer ist als die Doppelstrangbruchverteilung in der Kohlenstoffspur, sodass unter Annahme einer Abhängigkeit der Mdc1-Kinetik von der lokalen Doppelstrangbruchdichte die Abweichungen zwischen der Kohlenstoffbestrahlung und der RBE-korrigierten Protonenbestrahlung erklärbar sind.

Bislang konnte gezeigt werden, dass eine diffusionsbeschränkte Anlagerungskinetik sowie eine Abhängigkeit von einem begrenzten Mdc1-Pool im Zellkern unwahrscheinlich sind. Es bleibt jedoch die Frage offen, was die Kinetik bestimmt und weshalb eine solche Dosis- und LET-Abhängigkeit vorherrscht. Hier kann nur spekuliert werden. Es wäre natürlich möglich, dass die Zelle tatsächlich bei schweren Schäden mit einer hohen lokalen Doppelstrangbruchdichte reparaturrelevante Prozesse gezielt schneller ablaufen lässt als bei weniger kritischen Schäden. Ebenfalls wäre eine schadensinduzierte Veränderung der Chromatinstruktur denkbar, sodass sich Proteine leichter und somit schneller an die Doppelstrangbrüche anlagern können. Genauere Aussagen und Modellvorstellungen werden sich hier nur in enger Zusammenarbeit mit Molekular- und Strahlenbiologen finden lassen.

#### 5.1.2.4 Vergleich mit UV-Laser-Bestrahlung

Die an SNAKE gewonnenen LET- und dosisabhängigen Daten zeigen deutlich, wie wichtig eine definierte Dosisapplikation und eine wohlcharakterisierte Strahlqualität ist, wie sie ein Ionenmikrostrahl bietet. Die für solche Lebendzelluntersuchungen gebräuchliche Methode, Doppelstrangbrüche mittels eines in ein Laser-Scanning-Mikroskop eingekoppelten UV-Lasers zu erzeugen, kann offensichtlich nur weniger aussagekräftige Ergebnisse liefern. Denn hierbei werden die Zellen häufig zunächst mit UVsensitivierenden Substanzen wie BrdU behandelt [118]. Dies erschwert die Abschätzung des entstehenden Schadens, und der Prozess der DSB-Generierung weicht von

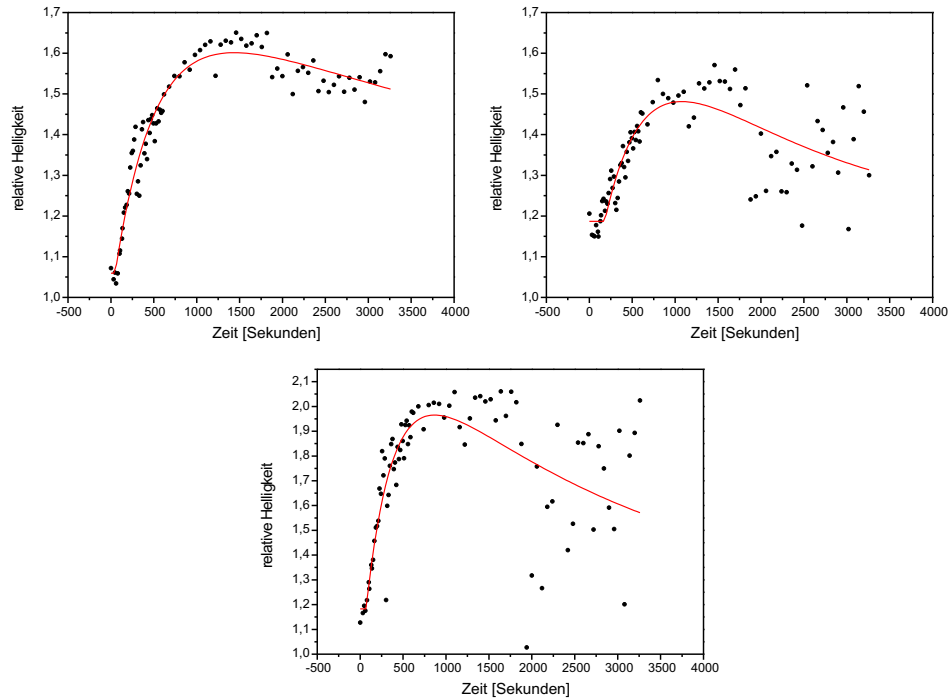
Bestrahlung	Ionen pro Punkt	Dosis [Gy]	$\tau$ [s]
55 MeV C	1	4,4	$148 \pm 3$
20 MeV H	128	4,8	$916 \pm 20$
20 MeV H	320	12,1	$557 \pm 17$
UV-Laser	—	?	$195,23 \pm 19,58$

**Tabelle 5.2:** Vergleich der an SNAKE gewonnenen Daten zur Mdc1-Kinetik mit Literaturwerten nach UV-Laser-Bestrahlung. Um die Daten vergleichen zu können, wurde an die SNAKE-Daten statt der komplexeren Funktion (5.1) eine einfache Anstiegsfunktion  $I = 1 - e^{-t/\tau}$ , wie sie in der Veröffentlichung der Laser-Daten verwendet wurde, angefitet.

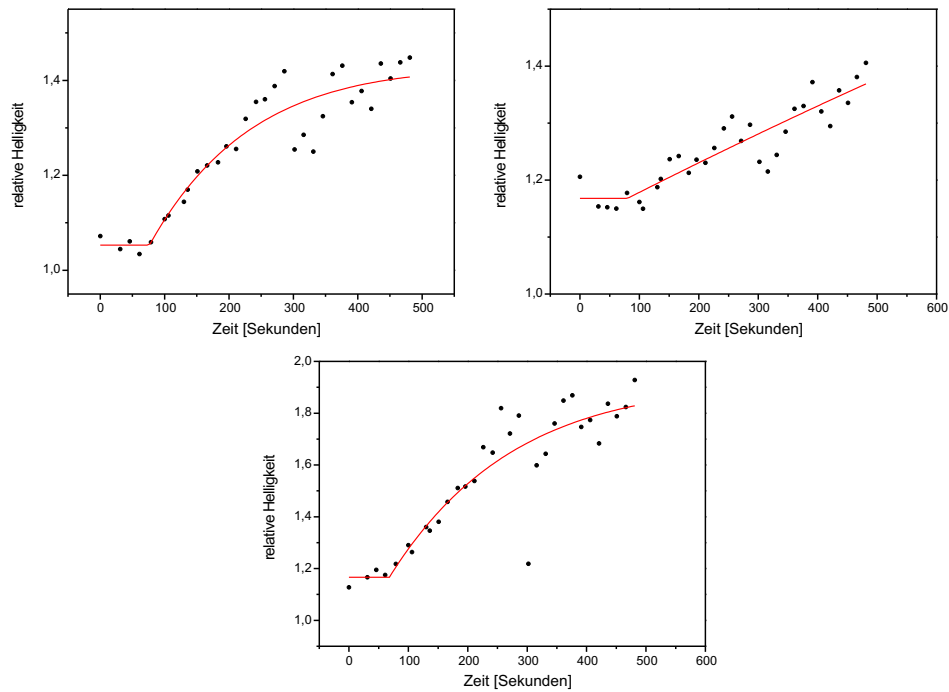
dem in der Natur vorkommenden Prozess mittels direkt ionisierender Strahlung ab. LET-abhängige Effekte lassen sich mit dieser Methode gar nicht nachstellen.

Dennoch sollen die an SNAKE gewonnenen Daten zur Mdc1-Kinetik mit in [33] veröffentlichten Daten nach Laser-Bestrahlung verglichen werden. In dieser Veröffentlichung liegt die Beobachtungszeit nur bei 700 Sekunden, sodass der Helligkeitsabfall noch nicht in Erscheinung tritt und folglich nur ein Anstieg  $I = 1 - e^{-t/\tau}$  entsprechend der grünen Kurve in Abb. 5.5 an die aus 18 Zellen gewonnenen und analog zu Abb. 5.7 normierten Daten gefittet wird. Auf die Berücksichtigung eines Zeitoffsets  $T_0$  wird ebenfalls verzichtet. Über die Methode der ROI-Bestimmung finden sich weder in der Veröffentlichung noch in den ergänzenden Informationen Angaben, es wird jedoch auf eine nicht näher definierte Bleaching-Korrektur hingewiesen. Die Daten liefern für die Proteinanlagerung an die lasergenerierten DNA-Schäden eine Zeitkonstante  $\tau = (195,23 \pm 19,58)$  s [33]. Um diesen Wert mit den an SNAKE gewonnenen Daten vergleichen zu können, wurde an die ersten 700 Sekunden der normierten Daten (Abb. 5.7 und 5.9) obige Funktion angefitet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 5.2. Die Kinetik nach Laserbestrahlung entspricht zumindest in diesem einfachen Modell am ehesten der Kinetik nach Kohlenstoffbestrahlung. Die in [33] beschriebene Auswertemethode wurde auch schon für die Bestimmung von Kinetiken nach Ionenbestrahlung verwendet [116], jedoch für keines der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine.

## 5.1.3 Kinetik des Proteins 53BP1

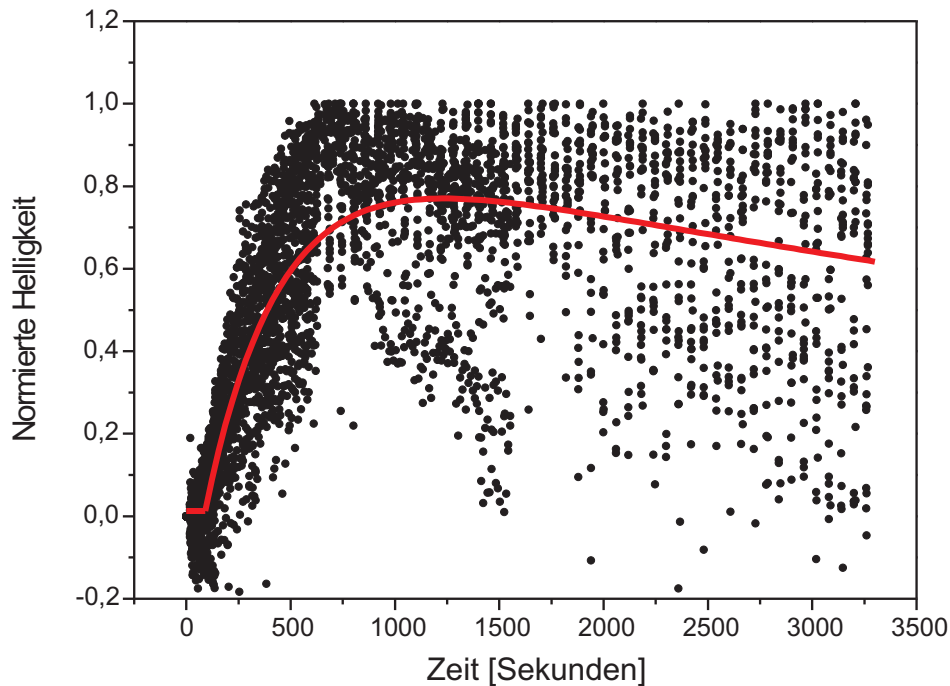


(a) Helligkeitsverlauf dreier ausgewählter Zellen.



(b) Bereich der Focibildung der in (a) gezeigten Helligkeitsverläufe.

**Abbildung 5.12:** 53BP1-Kinetik nach linienförmiger Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen. Die applizierte Dosis beträgt 6,4 Gy.

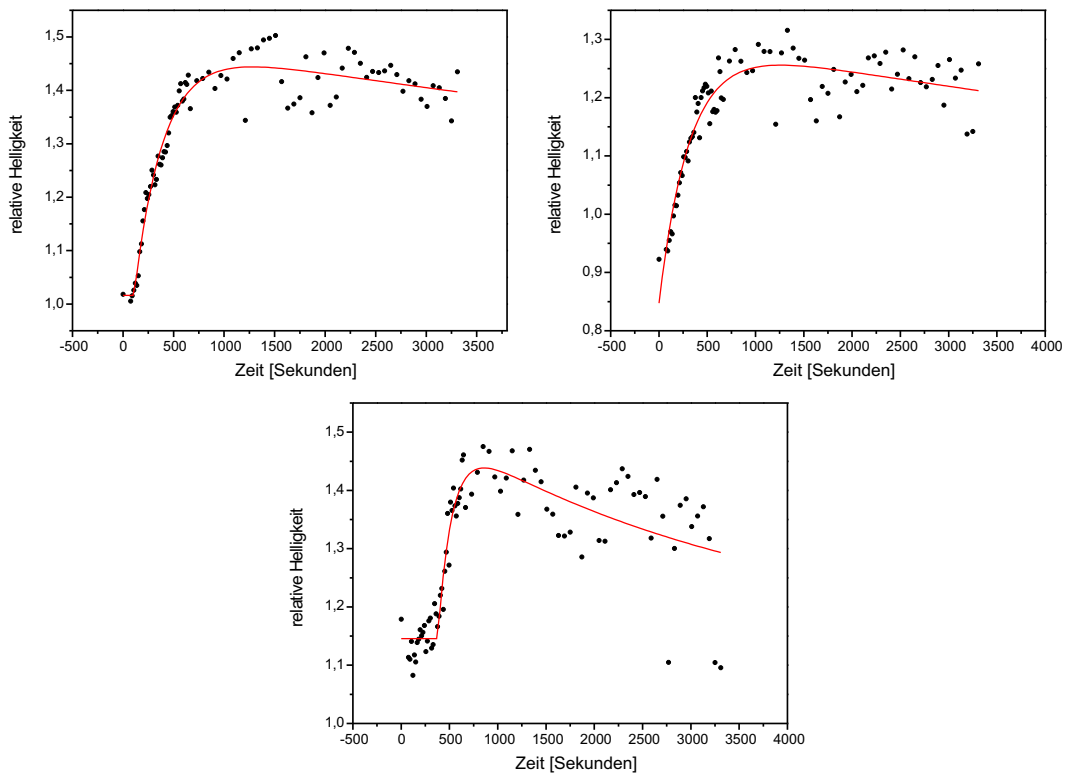


**Abbildung 5.13:** *53BP1-Kinetik nach linienförmiger Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen: Normierte Focihelligkeit aller 35 ausgewerteten Zellen.*

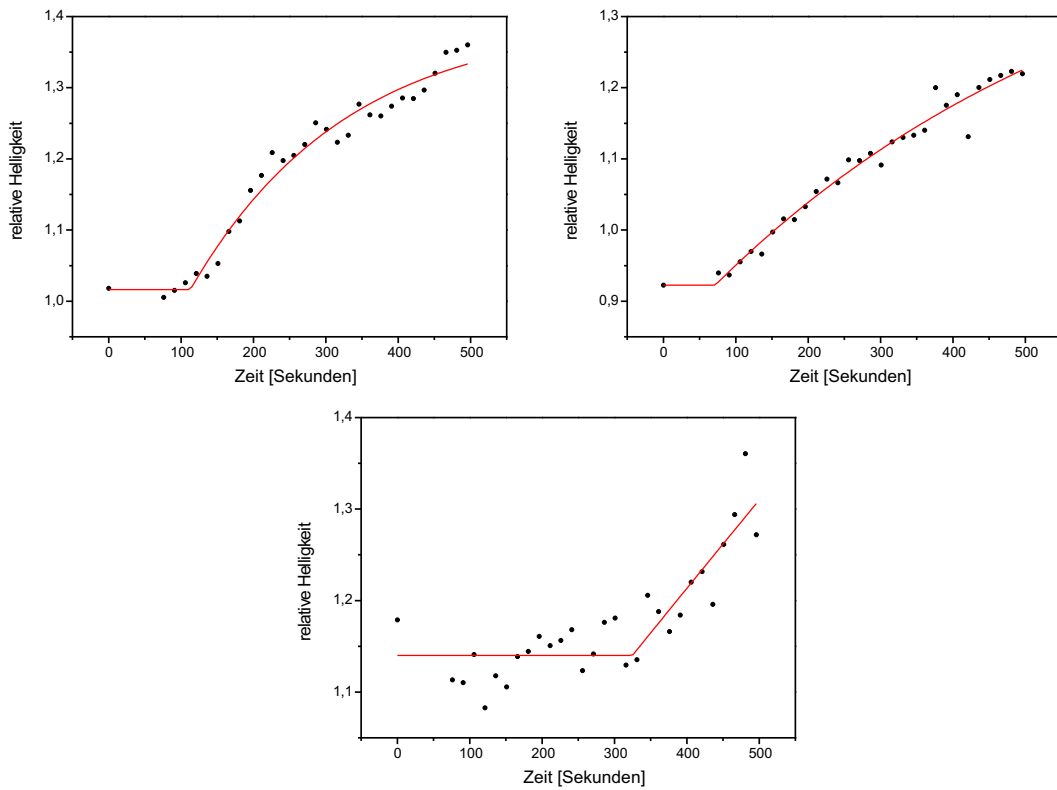
Auch für das Protein 53BP1 wurde die Kinetik nach linienweiser Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen und 20 MeV Protonen untersucht. Die Zahl der applizierten Protonen pro Punkt wurde variiert, sodass in einem Experiment annähernd die selbe Dosis wie mittels Kohlenstoffbestrahlung verabreicht wurde, in einem weiteren die halbe Dosis und in einem dritten die doppelte. Die Verläufe der Kohlenstoff- und Protonenbestrahlung mit einer Dosis von jeweils 6,4 bzw. 6,9 Gy<sup>(1)</sup> sind analog zum letzten Kapitel in den Abbildungen 5.12 bis 5.15 dargestellt. Aufgrund der zur Verfügung stehenden 53BP1-GFP-Zellen ist die Bildqualität der Ausgangsdaten schlechter als bei Mdc1, sodass die Daten erst nach Untergrundunterdrückung mittels des Rolling Ball Algorithmus [119] auswertbar wurden [115]. Trotz dieser bildbearbeitungstechnischen Verbesserung der Ausgangsdaten weisen z. B. die in Abb. 5.12 gezeigten ausgewerteten Helligkeitsverläufe einzelner Zellen deutlich stärkere und sehr wahrscheinlich nicht biologisch bedingte Streuungen auf als bei Mdc1.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.3 und Abb. 5.16 zusammengefasst. Bei Betrachtung fällt als erstes der gegenüber dem Mdc1 erhöhte Zeitoffset  $T_0$  auf. Bei Kohlen-

<sup>(1)</sup>Der Unterschied ist bedingt durch leicht abweichende Bestrahlungsmuster aufgrund von Anpassungen der Parameter in der SNAKE-Scansoftware an die unterschiedlichen elektrischen Steifigkeiten der beiden Ionenarten. Da die daran beteiligte D/A-Karte nur mit 12 Bit arbeitet, kann nicht jeder beliebige Ionenabstand realisiert werden.

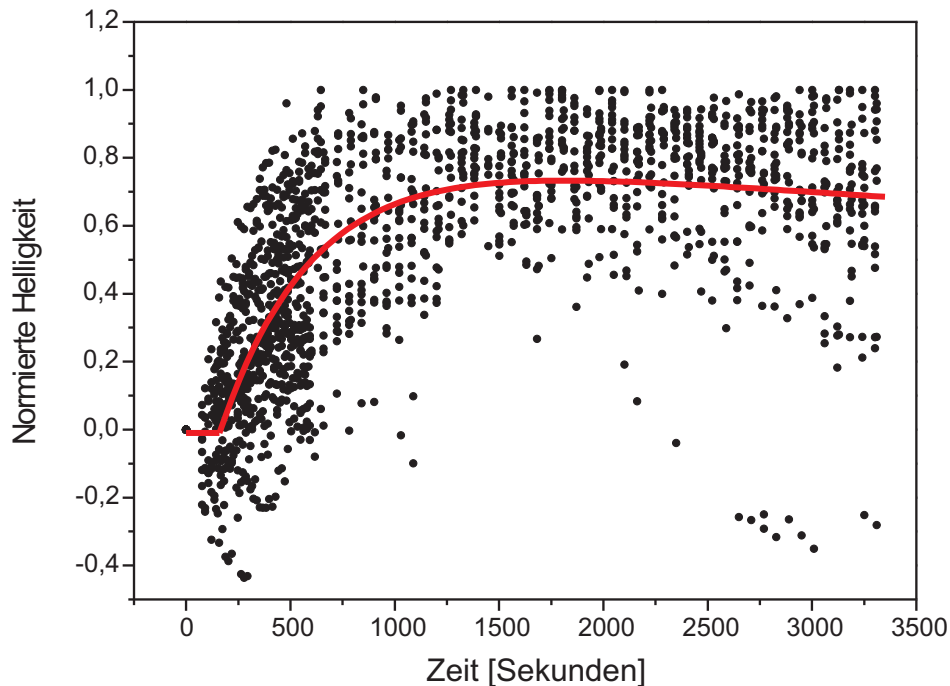


(a) Helligkeitsverlauf dreier ausgewählter Zellen.



(b) Bereich der Focibildung der in (a) gezeigten Helligkeitsverläufe.

**Abbildung 5.14:** *53BP1-Kinetik nach Bestrahlung mit 20 MeV Protonen. Die applizierte Dosis beträgt 6,9 Gy, wobei jeder Punkt des linienförmigen Bestrahlungsmusters mit 117 Protonen bestrahlt wurde.*



**Abbildung 5.15:** *53BP1-Kinetik nach Bestrahlung mit 20 MeV Protonen: Normierte Focihelligkeit aller 20 ausgewerteten Zellen.*

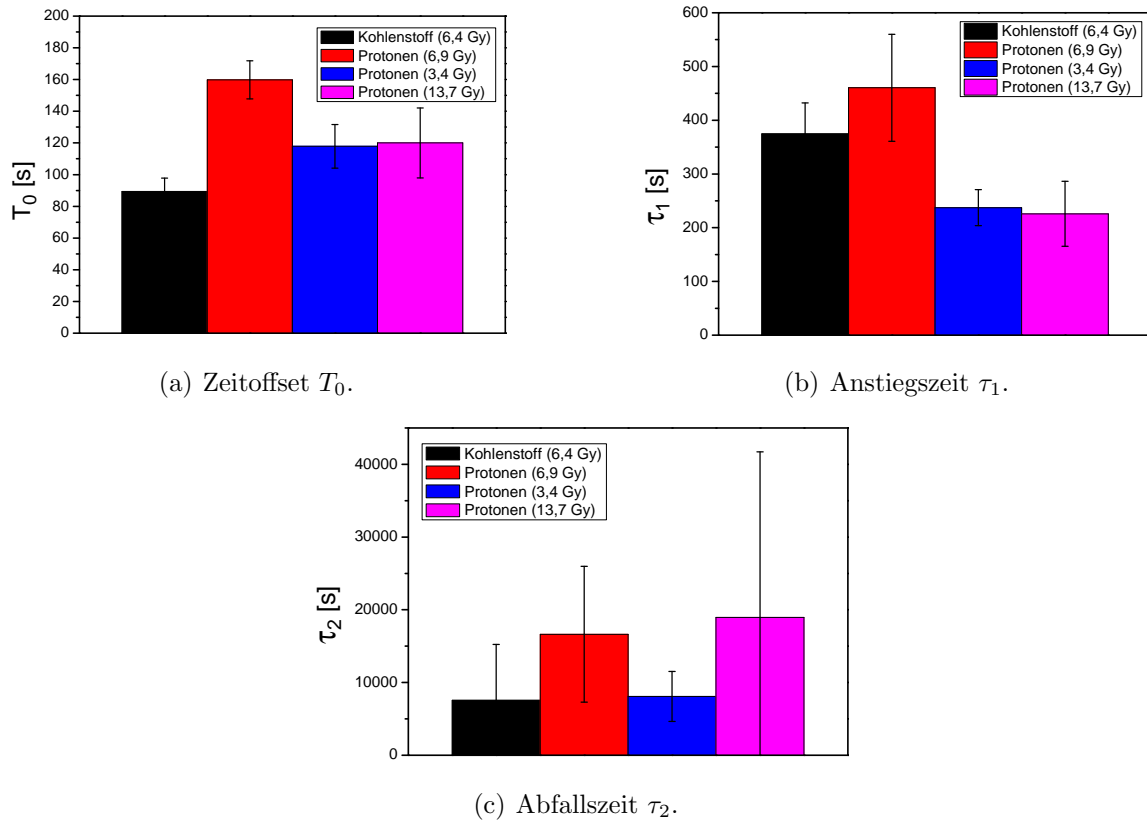
stoffbestrahlung beträgt diese Erhöhung einen Faktor fünf, bei Protonen 50–100%. Allerdings ist zu beachten, dass die Bestrahlungsdosen bei den Mdc1-Experimenten und der Untersuchung des Proteins 53BP1 nicht identisch sind. Die Anstiegszeit  $\tau_1$  des Proteins 53BP1 ist nach Kohlenstoffbestrahlung ca. einen Faktor vier länger, bei Protonenbestrahlung jedoch einen Faktor zwei kürzer. Dies liegt daran, dass keiner der die 53BP1-Kinetik beschreibenden Parameter eine eindeutige Dosis- oder LET-Abhängigkeit aufweist, im Rahmen der Fehler sind die Messungen mit einheitlichen Zeitkonstanten vereinbar. Dabei ist auch hier der Fehler für  $\tau_2$  aus den im letzten Abschnitt genannten Gründen und der schlechteren Bildqualität sehr groß. Wie schon dargelegt soll auf diesem Parameter jedoch nicht das Hauptaugenmerk der Kinetikbetrachtungen liegen.

### 5.1.3.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Erkenntnis, dass nicht alle Proteinanlagerungskinetiken in dem Maße von der lokalen Doppelstrangbruchdichte abhängen wie die des Mdc1, lässt weitere Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen zu. So sollte eine strahleninduzierte Veränderung der Chromatinstruktur, die ein schnelleres Diffundieren der Proteine an die

Ion	Ionen pro Punkt	Dosis [Gy]	$T_0$ [s]	$\tau_1$ [s]	$\tau_2$ [s]
55 MeV C	1	6,4	$89 \pm 8$	$380 \pm 60$	$7600 \pm 7700$
20 MeV H	117	6,9	$160 \pm 12$	$460 \pm 100$	$17000 \pm 9500$
20 MeV H	58	3,4	$118 \pm 14$	$240 \pm 40$	$8000 \pm 3500$
20 MeV H	234	13,7	$120 \pm 22$	$230 \pm 60$	$19000 \pm 23000$

**Tabelle 5.3:** Gewichtete Mittelwerte der Kinetik-Parameter Zeit-Offset  $T_0$ , Anstiegszeit  $\tau_1$  sowie Abfallszeit  $\tau_2$  des Proteins 53BP1 für verschiedene Bestrahlungsarten und -dosen.



**Abbildung 5.16:** Gewichtete Mittelwerte der Kinetik-Parameter des Proteins 53BP1 für verschiedene Bestrahlungsarten und -dosen.

Schadensorte erlaubt, die Anlagerungsgeschwindigkeit aller Proteine gleichermaßen beeinflussen.

Die Beobachtungen zum 53BP1 ließen sich jedoch mit der These einer gezielten Steuerung der Mdc1-Kinetik in Abhängigkeit der Doppelstrangbruchdichte am Schadensort vereinbaren. Wie in Kapitel 2.4.2 bereits erläutert, scheinen Mdc1 und 53BP1 unabhängige Wege der ATM-Aktivierung zu sein. Hierbei wird beobachtet, dass die Unterdrückung von 53BP1 nicht zu einer verminderten ATM-Aktivierung, wohl aber zu einer erhöhten Mdc1-Anlagerung am Schadensort führt [29]. Dies ließe zusammen mit

den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen folgende Schlussfolgerung zu: 53BP1 geht immer mit der gleichen Geschwindigkeit an den Schadensort. Das Mdc1 steht ihm als flexibler Partner bei der ATM-Aktivierung zur Seite und wird je nach Schwere des Schadens früher oder später „angefordert“. Da das Mdc1 zumindest bei schweren Schäden (Kohlenstoffbestrahlung) schneller Foci bildet als 53BP1, muss die Anforderung des Mdc1 schon stattfinden, bevor das 53BP1 am Schadensort angelangt ist, z. B. von einem Protein, das in der Kette von Reaktionen nach Auftreten eines ioneninduzierten Schadens vor dem 53BP1 liegt.

Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Mdc1-Kinetik in anderen Zellen untersucht wurde als die des Proteins 53BP1. GFP-markiertes Mdc1 stand nur in U2OS-Zellen<sup>(2)</sup> zur Verfügung, während GFP-markiertes 53BP1 nur in HeLa-Zellen<sup>(3)</sup> verfügbar war. Ob sich die Proteinkinetiken in diesen beiden menschlichen Tumorzelllinien unterscheiden, kann untersucht werden, wenn die Kollaborateure aus der Biologie in naher Zukunft Mdc1 in HeLa-Zellen erfolgreich mit GFP markiert haben.

### 5.1.3.2 Vergleich mit UV-Laser-Bestrahlung

Auch die an SNAKE gewonnenen Zeitkonstanten der 53BP1-Anlagerung sollen mit Literaturwerten nach Bestrahlung mit einem UV-Laser verglichen werden. Die Daten der zugrunde liegenden Veröffentlichung [117] wurden analog zur Vergleichsquelle für die Mdc1-Kinetik [33] gewonnen und mit folgender Fitfunktion beschrieben:

$$I = 1 - e^{-\omega t} - \omega t \cdot e^{-\omega t} \quad (5.2)$$

Die Beobachtungszeit betrug dabei eine viertel Stunde, sodass auch von den an SNAKE gewonnenen Daten nur dieser Zeitraum betrachtet und Funktion (5.2) angefitet wurde. Da die an SNAKE gewonnenen Kinetikverläufe des Proteins 53BP1 keine eindeutige Abhängigkeit von der Bestrahlungsart zeigen, wurden für den Vergleich mit der Laserbestrahlung nur die Kohlenstoffdaten verwendet. Das Ergebnis zeigt Tab. 5.4.

Bestrahlung	Dosis [Gy]	$\omega$ [min <sup>-1</sup> ]
55 MeV C	6,4	0,238 ± 0,004
UV-Laser	?	0,35 ± 0,01

**Tabelle 5.4:** Vergleich der an SNAKE gewonnenen Daten zur 53BP1-Kinetik mit Literaturwerten nach UV-Laser-Bestrahlung. Der Parameter  $\omega$  ist in Gleichung (5.2) definiert.

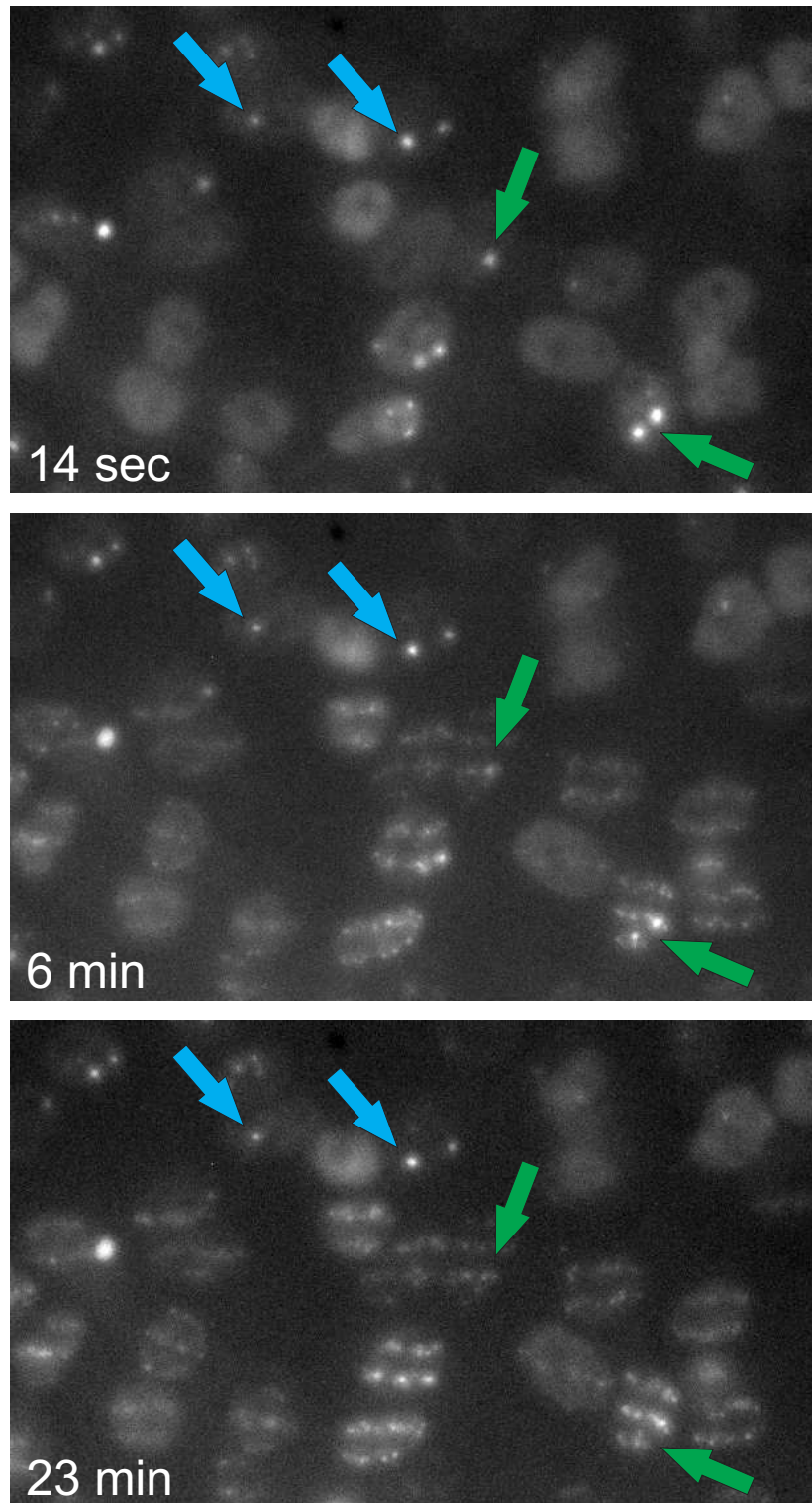
<sup>(2)</sup>Aus dem Osteosarkom (Knochenkrebs) eines 15-jährigen Mädchens etablierte Zelllinie.

<sup>(3)</sup>Aus dem Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs) der Patientin Henrietta Lacks etablierte Zelllinie.



### 5.1.3.3 Umlagerung des Proteins 53BP1 nach Bestrahlung

Bei der Untersuchung der 53BP1-Kinetik fällt noch ein weiterer Aspekt auf. Viele unbestrahlte Zellen weisen einzelne große, helle 53BP1-Foci auf (s. Pfeile in Abb. 5.17). Die Häufigkeit des Auftretens dieser Foci variiert sowohl zwischen den Proben als auch innerhalb verschiedener Bereiche einer Probe erheblich. Während sich in unbestrahlten Zellen (blaue Pfeile) weder Ort noch Intensität der Foci merklich ändern, verschwinden sie in bestrahlten Zellen (grüne Pfeile) langsam, während die strahleninduzierten Foci gebildet werden. Dieser Vorgang lässt auf eine Umlagerung des Proteins bei der Bildung strahleninduzierter Foci schließen. Die Theorie einer Umlagerung von 53BP1 wird auch von anderen Experimenten gestützt. Dazu wurden Zellen an SNAKE bestrahlt und anschließend 53BP1 mittels Immunofluoreszenz angefärbt. Aus den Mikroskopdaten wurde die auf die Fläche normierte Gesamthelligkeit unbestrahlter und bestrahlter Zellen bestimmt. Die normierten Helligkeiten der Zellen innerhalb einer Mikroskopaufnahme stimmen unabhängig von einer Bestrahlung sehr gut überein, sodass eine strahleninduzierte (Nach-)Produktion von 53BP1 zumindest innerhalb der betrachteten Zeiträume von bis zu sechs Stunden sehr unwahrscheinlich ist [7, 9].



**Abbildung 5.17:** Einige Kerne von Zellen mit GFP-markiertem 53BP1 zeigen im unbestrahlten Zustand große helle Foci. In Zellen, die mit 55 MeV Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, nimmt deren Helligkeit im Zuge der strahleninduzierten Focibildung ab, was auf eine Umlagerung des 53BP1 schließen lässt (grüne Pfeile). In unbestrahlten Zellen bleibt Größe und Helligkeit dieser Foci hingegen weitestgehend konstant (blaue Pfeile). Die Zeitangaben in den Bildern sind relativ zum Bestrahlungszeitpunkt.

### 5.1.4 Kinetik des Proteins Rad52

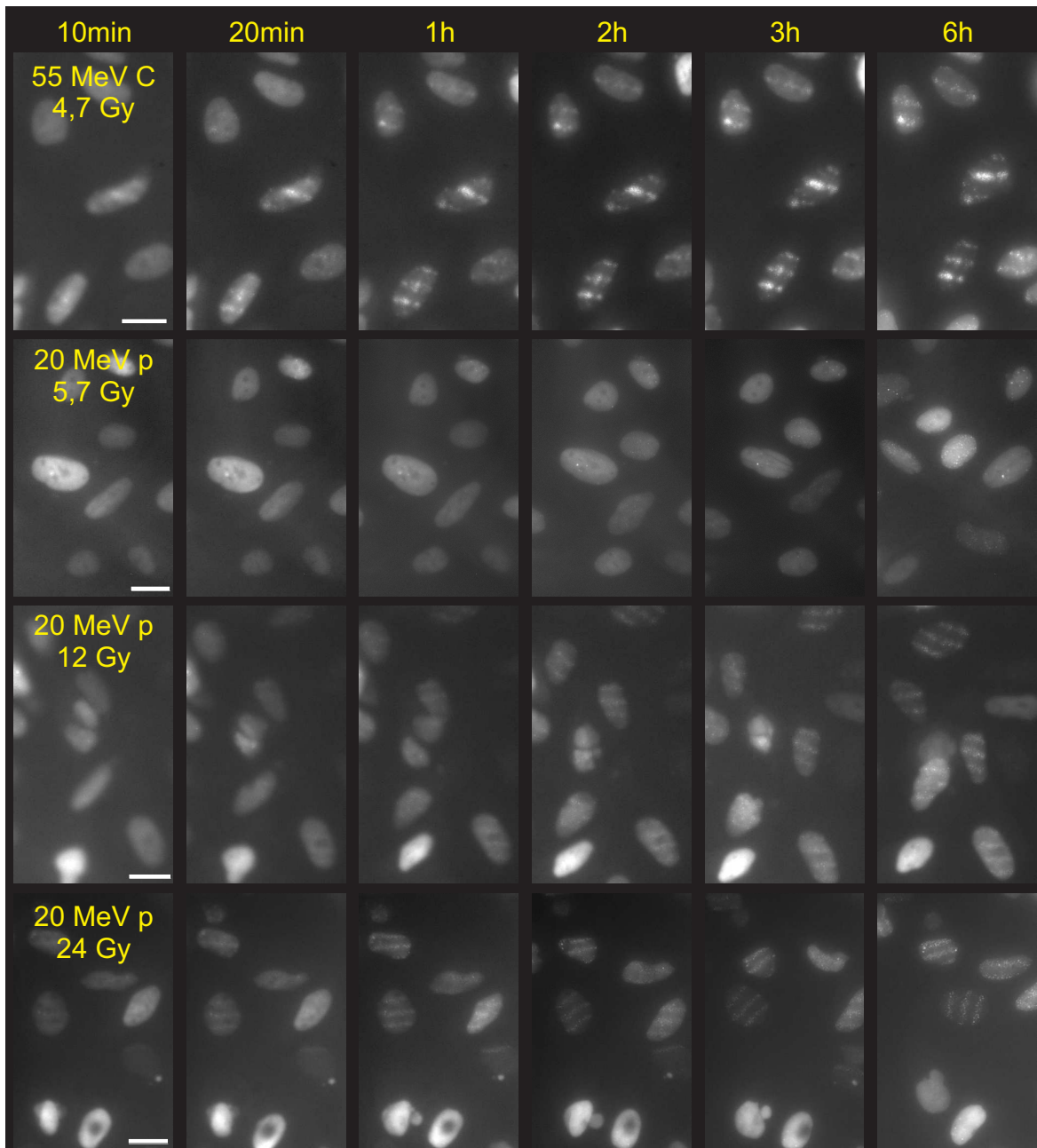
Das Reparaturprotein Rad52 zeigt eine deutlich langsamere Kinetik als die beiden bisher untersuchten Proteine. Deshalb muss die auszuwertende Zeitserie über einen längeren Zeitraum gehen, sodass die vom Auswertalgorithmus zu korrigierenden Zellbewegungen ausgeprägter sind. Auch das sehr starke Hintergrundsignal im Zellkern und die im Vergleich zu Mdc1 oder 53BP1 deutlich kleineren Foci führen dazu, dass mit der in [111, 113] entwickelten Auswertemethode die Foci-ROI der an SNAKE bestrahlten Rad52-GFP-Zellen nicht bestimmbar ist. Somit werden im Folgenden nur qualitative Betrachtungen angestellt.

Auch für Rad52 wurde die Kinetik nach Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen sowie 20 MeV Protonen untersucht. Die Dosis der Protonenbestrahlung wurde auch hier wieder variiert. Einen Vergleich dieser Bestrahlungsmodalitäten anhand von Zeitserien zeigt Abbildung 5.18. Zehn Minuten nach Bestrahlung mit 4,7 Gy Kohlenstoffionen sind erste Foci zu erkennen, nach 20 Minuten sind diese deutlich ausgeprägt. Wird eine ähnliche Dosis mittels 20 MeV Protonen appliziert, lassen sich erst nach mehreren Stunden sehr schwache Foci erahnen. Eine sukzessive Erhöhung der pro Punkt applizierten Protonen beschleunigt die Rad52-Kinetik sowie die Intensität der Foci signifikant. Die Zeiten  $t$ , ab denen Foci erkennbar sind, sind noch einmal in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

Genauere Aussagen kann jedoch erst eine quantitative Auswertung liefern. Hierfür muss entweder der bestehende Algorithmus verbessert oder ein neuer entwickelt werden. Denn der Zeitpunkt, ab dem Foci mit dem Auge sichtbar werden, kann neben den Zeitkonstanten der Anlagerungskinetik auch von der maximalen relativen Focihelligkeit abhängen. Ist diese sehr niedrig, können sich bildende Foci lange nicht vom Zellkernhintergrund getrennt werden. Da die Bestrahlungsart in Abb. 5.18 auch Einfluss auf die Intensität der Foci hat, können diese beiden, den Zeitpunkt des Sichtbarwerdens von

Bestrahlung	Ionen pro Punkt	Dosis [Gy]	$t$ (ca.)
55 MeV C	1	4,7	10 min
20 MeV H	117	5,7	3 h
20 MeV H	256	12	1 h
20 MeV H	512	24	< 10 min

**Tabelle 5.5:** Zeit  $t$ , ab der Rad52-Foci mit dem Auge sichtbar sind, für verschiedene Bestrahlungsarten und -dosen. Um eine ähnliche Kinetik wie nach Bestrahlung von 4,7 Gy mit 55 MeV Kohlenstoff appliziert zu erhalten, müssen mit 20 MeV Protonen mehr als 20 Gy appliziert werden.



**Abbildung 5.18:** Dosis- und LET-abhängige Kinetik von Rad52: Bei Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoff (4,7 Gy, ein Ion pro Punkt) sind nach 10–20 min deutliche Foci sichtbar. Wird die gleiche lokale Dosis mit 117 20 MeV Protonen pro Punkt appliziert (aufgrund eines etwas anderen Linienmusters 5,7 Gy Gesamtdosis), lassen sich erst 3 h nach Bestrahlung erste Foci erahnen. Eine Erhöhung der pro Punkt applizierten Protonenzahl beschleunigt die Kinetik deutlich, bei 512 Protonen/Punkt (entspricht 24 Gy) sind schon nach 10 min deutlich Foci zu erkennen. Maßstabsbalken jeweils 20  $\mu\text{m}$ .

Foci bestimmenden Faktoren schlecht voneinander getrennt werden. Dies ist ein generelles Problem bei der Beurteilung von Anlagerungskinetiken anhand des Zeitpunktes, ab dem Foci erkennbar sind, wie sie jedoch häufig in der Literatur verwendet wird.

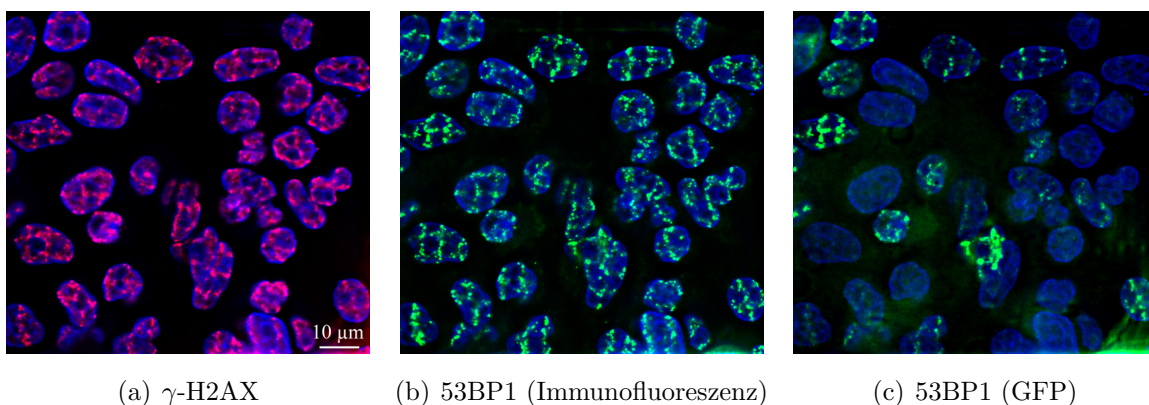
Trotzdem belegen die in Abb. 5.18 gezeigten Daten eindeutig eine LET- und Dosisabhängigkeit der Rad52-Anlagerungskinetik.

## 5.2 Auswirkung der Überexprimierung von 53BP1 auf den Konkurrenzeffekt

Wie in Abschnitt 3.3 erläutert, wird das GFP-markierte POI (protein of interest) typischerweise zusätzlich zum ohnehin in der Zelle vorhandenen POI hergestellt. Dies hat zur Folge, dass eine größere Menge des jeweiligen Proteins als in unmarkierten Zellen vorhanden ist. Dieser Sachverhalt kann evtl. zelluläre Reaktionen beeinflussen.

In einem Experiment wurde der Einfluss der GFP-Markierungsbedingten Erhöhung der Proteinmenge auf den Konkurrenzeffekt des Proteins 53BP1 bei sequentieller Bestrahlung (s. Kap 2.4.2) untersucht. Dazu wurden an SNAKE HeLa-Zellen mit GFP-markiertem 53BP1 analog zu den im Rahmen von [37] laufenden Experimenten zum Konkurrenzeffekt bestrahlt und anschließend fixiert. 53BP1 sowie  $\gamma$ -H2AX wurden mittels Immunofluoreszenz angefärbt und zusammen mit dem GFP am Fluoreszenzmikroskop untersucht. In zwei getrennten Experimenten konnte in Proben mit GFP-markiertem 53BP1 kein Konkurrenzeffekt festgestellt werden (s. Abb. 5.19).

Vergleichsproben mit „normalen“ HeLa-Zellen wiesen hingegen analog zu Abb. 2.6 den Konkurrenzeffekt auf. Dieser Sachverhalt kann ein Hinweis darauf sein, dass die in den verwendeten GFP-markierten Zellen um einen Faktor von ca. 1,5 bis 2,5 [120] größere Menge an vorhandenem 53BP1 auch eine Versorgung der durch die Zweitbestrahlung induzierten DNA-Schäden mit 53BP1 erlaubt. Allerdings sei erwähnt, dass in den im Rahmen von [37] durchgeführten Experimenten aus noch nicht geklärten



**Abbildung 5.19:** Zellen mit GFP-markiertem Protein 53BP1 zeigen keinen Konkurrenzeffekt. Immunofluoreszenzaufnahmen des 53BP1 zeigen keine signifikante Unterschiede zum  $\gamma$ -H2AX und somit keine Unterdrückung der Anlagerung an die Schäden der Zweitbestrahlung (senkrechte Bestrahlungslinien). Dies gilt auch für Zellen, die GFP nur schwach exprimieren (s. GFP-Kanal der fixierten Zellen (c)).

Gründen gelegentlich ebenfalls kein oder nur sehr geringer Konkurrenzeffekt festgestellt werden konnte. Dies betraf dann allerdings alle Proben einer Strahlzeit.





# Kapitel 6

## Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Realisierung einer Lebendzellmikroskopie-Einrichtung am Rasterionenmikroskop SNAKE ein universeller Versuchsaufbau geschaffen werden, der präzise Zellbestrahlungen unter klar definierten Verhältnissen mit der Möglichkeit einer hochauflösenden mikroskopischen Untersuchung der Reparaturvorgänge in lebenden Zellen kombiniert.

In ersten biologisch relevanten Experimenten wurde die Kinetik der Reparaturproteine Mdc1, 53BP1 und Rad52 untersucht. Die hierbei entdeckte starke Abhängigkeit von Bestrahlungsdosis und Ionensorte demonstriert deutlich, wie wichtig eine wohldefinierte Dosisapplikation, wie sie ein Ionenmikrostrahl bietet, für solche Experimente ist. Ein mögliches Modell, das die in dieser Arbeit gefundenen Abhängigkeiten der Anlagerungskinetik erklären kann, geht von der Doppelstrangbruchdichte am Schadensort als entscheidenden Faktor aus. Erste Experimente, in denen die lokale Doppelstrangbruchdichte am Schadensort konstant gehalten wurde, die pro Zellkern applizierte Dosis jedoch variiert wurde (s. Abb. 5.11), zeigen keine mit dem Auge erkennbare Abhängigkeit der Kinetik von der Gesamtdosis und können somit das Modell stützen. Eine quantitative Auswertung dieser Experimente steht jedoch noch aus und wird den nächsten Prüfstein für dieses Modell darstellen.

Um möglichst viele der an der Doppelstrangbruchantwort beteiligten Proteine hinsichtlich ihrer für die Anlagerung an die Schadensorte benötigten Zeit ordnen zu können, um daraus Hinweise auf ihre funktionalen Abhängigkeiten zu erlangen, müssen die Kinetiken weiterer Proteine quantitativ untersucht werden. Dies erfordert die Etablierung neuer Zelllinien, in denen die zu untersuchenden Proteine fluoreszenzmarkiert sind. Dabei wäre es wünschenswert, immer den gleichen Zelltyp (z. B. HeLa) zu verwenden, um sichergehen zu können, dass die Ergebnisse vollständig miteinander vergleichbar sind. Eine kurz vor der Vollendung stehende HeLa-Zelllinie mit GFP-markiertem Mdc1 wird diese Anforderung dann auch für den Vergleich Mdc1–53BP1 erfüllen.

Auch eine Modifizierung der Analysemethode dahingehend, dass die bereits vorhandenen Bilddaten zur Kinetik des Reparaturproteins Rad52 ebenfalls auswertbar werden, sollte angestrebt werden. So ließe sich auch für dieses Protein die Abhängigkeit der Kinetik von LET und Dosis unabhängig von der Fociintensität bestimmen.

Das Spektrum möglicher Experimente an dem neuen Lebendzellaufbau an SNAKE ist vielfältig und keinesfalls auf Kinetik-Auswertungen beschränkt. Schon seit längerem ist die Untersuchung der Dynamik strahleninduzierter Foci ein Thema der Biologieexperimente an SNAKE [7, 8]. Bisherige Untersuchungen waren jedoch aufgrund der Limitierungen der Immunfluoreszenzmethode zum Anfärben der Proteine auf statistische Auswertungen beschränkt. In lebenden Zellen ist hingegen eine präzisere, die individuellen Eigenschaften jeder Zelle berücksichtigende Analyse möglich. Eine solche wurde bereits von einer anderen Gruppe vorgenommen [114]. Die darin erlangten Ergebnisse weichen jedoch mehr als eine Größenordnung von den an SNAKE gemachten Beobachtungen ab. Grund hierfür kann sein, dass die Auswertung der Dynamik in [114] anhand der absoluten Position der Foci durchgeführt wurde. Bei diesem Ansatz besteht jedoch trotz entsprechender Korrekturen immer die Gefahr, Bewegungen oder Verformungen des gesamten Zellkerns fälschlicherweise als Focidynamik zu werten. Deshalb wurde an SNAKE kürzlich eine Diplomarbeit begonnen, die die quantitative Analyse von Proteindynamiken nach Ionenmikrosbestrahlung und Lebendzellmikroskopie anhand von Relativkoordinaten zum Ziel hat. Dabei wird mit 30 Protonen pro Punkt bestrahlt, sodass pro Ionenspur nur ca. drei Doppelstrangbrüche auftreten und eine evtl. das Ergebnis verfälschende Interaktion der Doppelstrangbrüche ausgeschlossen werden kann. Die 30 Protonen haben sich als idealer Kompromiss zwischen geringer DSB-Zahl und hinreichender Intensität der Foci erwiesen. Eine das erste Mal in Lebendzellexperimenten an SNAKE zum Einsatz kommende Entfaltung der Bilddaten soll eine genaue Trennung der einzelnen Foci einer Spur ermöglichen. Die eigentliche Analyse der Dynamik soll dann anhand der Relativkoordinaten der im  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ -Matrixmuster induzierten Foci erfolgen.

Bereits im Einleitungskapitel dieser Arbeit wurden in den 1970er Jahren durchgeführte Experimente erwähnt, die den Zellkern als radiosensitivsten Bereich der Zelle identifizierten. Ob die Strahlenempfindlichkeit innerhalb des Zellkerns ebenfalls eine Ortsabhängigkeit aufweist oder überall gleich ist, ist bis jetzt unbekannt. Denkbar wäre z. B. eine Abhängigkeit der Strahlensensitivität von der DNA-Dichte, die in den Nukleoli deutlich geringer ist als in anderen Bereichen des Zellkerns. Da im Zentrum des Zellkerns Gen-reichere Chromosomen angesiedelt sind als in den Randbereichen [121], sind auch Unterschiede in der Radiosensitivität zwischen diesen beiden Bereichen möglich. Ebenfalls denkbar wäre das Vorhandensein besonders strahlenempfindlicher Chro-

mosomen, z. B. solcher, deren Gene auch für Reparaturvorgänge notwendige Proteine codieren.

Mithilfe gezielter Ionenmikrobestrahlung ließe sich die Strahlenempfindlichkeit verschiedener Bereiche im Zellkern oder auch von Organellen in der Zelle systematisch untersuchen. Zu diesem Zwecke soll in einer bald zu beginnenden Doktorarbeit die gezielte Bestrahlung zellulärer Substrukturen an SNAKE weiter optimiert werden. Dazu ist es nötig, die Ursachen für die momentane Diskrepanz zwischen Strahlauflösung und Zielgenauigkeit auszumachen (s. Kap. 4.4.2). Die Zeitspanne zwischen Zielauswahl und Bestrahlung wurde schon als Ansatz für Verbesserungen genannt. Ob noch weitere Faktoren wie Strahldrift oder optischer Versatz aufgrund der unterschiedlichen Fokalebene der zu bestrahlenden Strukturen und des Szintillators, der zur Bestimmung der Strahlposition genutzt wird, hinzukommen, können Experimente mit sich nicht bewegenden Targets zeigen. Eine hochauflösende UV-sensitive Mikroskopkamera würde die Strahlpositionierung und Zielauswahl mit höherer Genauigkeit ermöglichen. Eine grundlegende Optimierung der Arbeitsabläufe ist ebenfalls unumgänglich, wenn der für Biologieexperimente nötige Durchsatz erreicht werden soll.

Eine andere mit der Zielbestrahlung in Zusammenhang stehende Weiterentwicklung für SNAKE wäre ein orts aufgelöster Ionennachweis. Damit ließen sich die bestrahlten Punkte einer Zellprobe genau rekonstruieren. Dies wäre hilfreich, um den Erfolg einer gezielten Bestrahlung zellulärer Substrukturen auch in Experimenten beurteilen zu können, in denen der tatsächliche Bestrahlungsort nicht durch Focibildung erkennbar wird. Bei der quantitativen Auswertung der Rad52-Kinetik könnten die Informationen eines orts aufgelösten Ionennachweis evtl. zur Generierung einer ROI verwendet werden, bevor die Focibildung einsetzt.

Da an Einzelzellen gewonnene Ergebnisse nicht unbedingt auf Zellen im Gewebeverbund oder Organismus zutreffen müssen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Bestrahlung im Labor gezüchteter und kommerziell erhältlicher Hautgewebe technisch umgesetzt. Diese methodische Weiterentwicklung steht zwar bisher nicht in Zusammenhang mit der Lebendzellmikroskopie, etabliert sich aber ebenfalls zu einer in jeder Strahlzeit zum Einsatz kommenden Standardmethode. So wurde z. B. gezeigt, dass der RBE-Faktor von 1 ns-Protonenpulsen hinsichtlich Mikronukleibildung in diesen Geweben gegenüber kontinuierlicher Protonenbestrahlung keine signifikante Abweichung aufweist [122]. Mit der Verfügbarkeit von Zellen mit GFP-markierten Proteinen im Gewebeverbund ist jedoch eine dahingehende Modifikation des momentanen Versuchsaufbaus denkbar, dass auch Vorgänge in Geweben online am Bestrahlungsplatz beobachtet werden können.

Die knappe und keinesfalls vollständige Aufzählung in diesem Kapitel zeigt auf,

welche neuartigen Experimente mit der Zellbestrahlungseinrichtung am Rasterionenmikroskop SNAKE in den nächsten Jahren durchgeführt werden können. Ein wichtiger Schritt hierzu war die Etablierung der Lebendzellmikroskopieumgebung im Rahmen dieser Arbeit.

# Literaturverzeichnis

- [1] V. Beir, National Academy Press, Washington DC (1990).
- [2] T. Straume, G. Rugel, A.A. Marchetti, W. Rühm, G. Korschinek, J.E. McAninch, K. Carroll, S. Egbert, T. Faestermann, K. Knie, R. Martinelli, A. Wallner, C. Wallner, *Nature* **424** (2003) 539–542.
- [3] T.R. Munro, *Radiat. Res.* **42** (1970) 451–470.
- [4] K.K. Khanna, S.P. Jackson, *Nature genetics* **27** (2001) 247–254.
- [5] 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.
- [6] G. Dollinger, V. Hable, A. Hauptner, R. Krücken, P. Reichart, A.A. Friedl, G.A. Drexler, T. Cremer, S. Dietzel, *Nucl. Instr. and Meth. B* **231** (2005) 195–201.
- [7] V. Hable, *Untersuchung der Dynamik von DNA-Reparaturproteinen nach Bestrahlung lebender Zellen am Rasterionenmikroskop SNAKE*, Diplomarbeit, TU München, 2004.
- [8] V. Hable, G. Dollinger, C. Greubel, A. Hauptner, R. Krücken, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, R. Löwe, *Nucl. Instr. and Meth. B* **245** (2006) 298–301.
- [9] C. Greubel, V. Hable, G.A. Drexler, A. Hauptner, S. Dietzel, H. Strickfaden, I. Baur, R. Krücken, T. Cremer, G. Dollinger, A.A. Friedl, *Radiat. Environ. Biophys.* **47** (2008) 423–429.
- [10] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.
- [11] M.R. Lieber, Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol* **4** (2003) 712–720.

- [12] W. Friedland, P. Jacob, P. Bernhardt, H.G. Paretzke, M. Dingfelder, *Rad. Res.* **159** (2003) 401–410.
- [13] A.A. Friedl, A. Kraxenberger, F. Eckardt-Schupp, *Electrophoresis* **16** (1995) 1865–1874.
- [14] F. Kraxenberger, K.J. Weber, A.A. Friedl, F. Eckardt-Schupp, M. Flentje, P. Quicken, A.M. Kellerer, *Radiat. Environ. Biophys.* **37** (1989) 107–115.
- [15] K.M. Prise, M. Pinto, H.C. Newman, B.D. Michael, *Radiation Research* **156** (2001) 572–576.
- [16] S. Brons, G. Taucher-Scholz, M. Scholz, G. Kraft, *Radiat. Environ. Biophys.* **42** (2003) 63–72.
- [17] A. Hauptner, W. Friedland, S. Dietzel, G.A. Drexler, C. Greubel, V. Hable, H. Strickfaden, T. Cremer, A.A. Friedl, R. Krücken, H.G. Paretzke, G. Dollinger, Spatial Distribution of DNA Double-Strand Breaks from Ion Tracks, in P. Sigmund (Hrsg.), *Ion Beam Science: Solved and Unsolved Problems*, Band 52 of *Matematisk-fysiske Meddelelser*, S. 59–85, Royal Danish Academy of Sciences and Letters, Copenhagen, 2006.
- [18] K. Rothkamm, I. Krüger, L.H. Thompson, M. Löbrich, *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 5706–5715.
- [19] K. Hiom, *Current Biology* **9** (1999) 446–448.
- [20] F. Delacote, M. Han, T.D. Stamato, M. Jasin, B.S. Lopez, *Nucleic Acids Res.* **30** (2002) 3454–3463.
- [21] M. Frank-Vaillant, S. Marcand, *Mol. Cell* **10** (2002) 1189–1199.
- [22] D. Ristic, M. Modesti, R. Kanaar, C. Wyman, *Nucleic Acids Res.* **31** (2003) 5229–5237.
- [23] R.T. Abraham, *Nature Cell Biol* **4** (2002) E277–E279.
- [24] E.U. Kurz, S.P. Lees-Miller, *DNA Repair* **3** (2004) 889–900.
- [25] A. Asaithamby, N. Uematsu, A. Chatterjee, M.D. Story, S. Burma, D.J. Chen, *Radiat. Res.* **169** (2008) 437–446.
- [26] E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner, *J Cell Biol* **146** (1999) 905–916.

- [27] 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.
- [28] T.A. Mochan, M. Venere, R.A. DiTullio Jr., T.D. Halazonetis, *DNA Repair* **3** (2004) 945–952.
- [29] T.A. Mochan, M. Venere, R.A. DiTullio, T.D. Halazonetis, *Cancer Research* **63** (2003) 8586–8591.
- [30] M. Stucki, S.P. Jackson, *DNA Repair* **3** (2004) 953–957.
- [31] P. Jowsey, N.A. Morrice, C.J. Hastie, H. McLauchlan, R. Toth, J. Rouse, *DNA Repair* **6** (2007) 1536–1544.
- [32] B. Jakob, J. Splinter, G. Taucher-Scholz, *Radiat. Res.* **171** (2009) 405–418.
- [33] C. Lukas, F. Melander, M. Stucki, J. Falck, S. Bekker-Jensen, M. Goldberg, Y. Lerenthal, S.P. Jackson, J. Bartek, J. Lukas, *The EMBO journal* **23** (2004) 2674–2683.
- [34] M.V. Botuyan, J. Lee, I.M. Ward, J.E. Kim, J.R. Thompson, J. Chen, G. Mer, *Cell* **127** (2006) 1361–1373.
- [35] C. Greubel, *Dynamik der Verteilung von DNA-Reparaturfaktoren in lebenden Zellen nach fraktionierter Bestrahlung am Rasterionenmikroskop SNAKE*, Diplomarbeit, TU München, 2005.
- [36] C. Greubel, V. Hable, G.A. Drexler, A. Hauptner, S. Dietzel, H. Strickfaden, I. Baur, R. Krücken, T. Cremer, A.A. Friedl, G. Dollinger, *Radiat. Environ. Biophys.* **47** (2008) 415–422.
- [37] C. Greubel, Doktorarbeit, Universität der Bundeswehr München, voraussichtlich 2011.
- [38] M. Modesti, R. Kanaar, *Genome Biol.* **2** (2001) reviews1014.1–1014.5.
- [39] T. Sugiyama, N. Kantake, *J. Mol. Biol.* **390** (2009) 45–55.
- [40] X. Deng, A. Prakash, K. Dhar, G.S. Baia, C. Kolar, G.G. Oakley, G.E.O. Borghstahl, *Biochemistry* **48** (2009) 6633–6643.
- [41] F. Chen, A. Nastasi, Z. Shen, M. Brenneman, H. Crissman, D.J. Chen, *Mutat. Res.* **384** (1997) 205–211.

- [42] S. Tashiro, J. Walter, A. Shinohara, N. Kamada, T. Cremer, *J. Cell Biol.* **150** (2000) 283–292.
- [43] P. Schwille, *Physik Journal* **6** (2007) 35–38.
- [44] W. Demtröder, *Experimentalphysik 3 – Atome, Moleküle und Festkörper*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2000.
- [45] J.W. Lichtman, J.A. Conchello, *Nature Methods* **2** (2005) 910–919.
- [46] S. Doose, M. Sauer, *Physik Journal* **6** (2007) 55–60.
- [47] G.A. Drexler, persönliche Mitteilung.
- [48] R.Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **67** (1998) 509–544.
- [49] R.E. Campbell, O. Tour, A.E. Palmer, P.A. Steinbach, G.S. Baird, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien, *PNAS* **99** (2002) 7877.
- [50] G.A. Drexler, W. Dirks, B. Mazurek, H. Strickfaden, V. Hable, C. Greubel, S. Auer, D.M. Seiler, A. Hauptner, G. Du, R. Krücken, T. Cremer, G. Dollinger, A.A. Friedl, *MLL Jahresbericht* (2008) 73, URL <http://www.bl.physik.uni-muenchen.de/blrep/jb2008/p073.pdf>.
- [51] E. Hecht, *Optik*, Oldenbourg Verlag, München, 2005.
- [52] W. Demtröder, *Experimentalphysik 2 – Elektrizität und Optik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999.
- [53] W. Zinth, H.-J. Körner, *Physik III – Optik, Quantenphänomene und Aufbau der Atome*, Oldenbourg Verlag, München, 1994.
- [54] H. Riesenberg, H. Beyer (Hrsg.), *Handbuch der Mikroskopie*, VEB Verlag Technik, Berlin, 1988.
- [55] Carl Zeiss AG, *Schwarz/Weiß-Kameras in der Mikroskopie*.
- [56] M.W. Davidson, *Fundamentals of Mercury Arc Lamps*, Carl Zeiss MicroImaging Online Campus, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>.
- [57] C.H. Chuang, A.E. Carpenter, B. Fuchsova, T. Johnson, P. de Lanerolle, A.S. Belmont, *Current Biology* **16** (2006) 825–831.



- [58] K.R. Spring, M.J. Parry-Hill, M.W. Davidson, Immersion Oil and Refractive Index, Molecular Expressions Microscopy Primer, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/microscopy/immersion/index.html>.
- [59] M. Abramowitz, M.W. Davidson, Immersion Media, Molecular Expressions Microscopy Primer, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/immersion.html>.
- [60] K.R. Spring, M.J. Parry-Hill, M.W. Davidson, Airy Patterns and the Rayleigh Criterion, Molecular Expressions Microscopy Primer, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/imageformation/rayleighdisks/index.html>.
- [61] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch, H. Heinz, *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*, Carl Zeiss Jena GmbH.
- [62] H. Nyquist, Trans. Amer. Inst. Elect. Eng. **47** (1928) 617–644.
- [63] C.E. Shannon, Proc. IRE **37** (1949) 10–21.
- [64] E. Schrüfer, *Elektrische Messtechnik*, Hanser, 2004.
- [65] K.R. Spring, J.C. Russ, M.W. Davidson, Basic Properties of Digital Images, Molecular Expressions Microscopy Primer, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/digitalimagebasics.html>.
- [66] M. Abramowitz, B. Herman, D.B. Murphy, M.W. Davidson, Anatomy of the Fluorescence Microscope, Molecular Expressions Microscopy Primer, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer>.
- [67] K.R. Spring, H.E. Keller, M.W. Davidson, Anatomy of the Microscope – Image Brightness, Molecular Expressions Microscopy Primer, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/imagebrightness.html>.
- [68] A. Nolte, L. Höring, M.W. Davidson, Fundamentals of Illumination Sources for Optical Microscopy, Carl Zeiss MicroImaging Online Campus, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>.
- [69] K. Michel, *Die Grundzüge der Theorie des Mikroskops in elementarer Darstellung*, Physik und Technik, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1964.
- [70] J.A. Conchello, J.W. Lichtman, Nature Methods **2** (2005) 920–931.

- [71] K.R. Spring, T.J. Fellers, M.W. Davidson, Theory of Confocal Microscopy – Confocal Microscope Scanning Systems, Olympus FluoView Resource Center, <http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalscanningsystems.html>.
- [72] Scientific Volume Imaging, Deconvolution Recipes, 1997 – 2003.
- [73] S. Kullback, R.A. Leibler, The Annals of Mathematical Statistics **22** (1951) 79–86.
- [74] I. Csiszár, Ann. Stat. **19** (1991) 2032–2066.
- [75] C. Cremer, A. von Kottler, P. Lemmer, R. Kaufmann, Y. Weiland, P. Mueller, M. Hausmann, M. Gunkel, T. Ruckelshausen, D. Baddeley, R. Amberger, Far-Field Fluorescence Microscopy of Cellular Structures at Molecular Optical Resolution, in A. Diaspro (Hrsg.), *Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy*, Taylor & Francis, 2009.
- [76] S.W. Hell, Physik Journal **6** (2007) 47–53.
- [77] S.W. Hell, Science **316** (2007) 1153–1158.
- [78] F. Zernike, Physica **9** (1942) 686–698.
- [79] F. Zernike, Science **121** (1955) 345–349.
- [80] G. Hinderer, G. Dollinger, G. Datzmann, H.J. Körner, Nucl. Instr. and Meth. B **130** (1997) 51–56.
- [81] G. Datzmann, G. Dollinger, C. Goeden, A. Hauptner, H.J. Körner, P. Reichart, O. Schmelmer, Nucl. Instr. and Meth. B **181** (2001) 20–26.
- [82] G. Datzmann, *Aufbau und Charakterisierung des Hochenergie Rasterionenmikroskops SNAKE*, Doktorarbeit, TU München, 2002.
- [83] P. Reichart, G. Datzmann, A. Hauptner, R. Hertenberger, C. Wild, G. Dollinger, Science **306** (2004) 1537–1540.
- [84] A. Hauptner, *Mikroskopisch genaue Zellbestrahlung mit hochenergetischen Ionen*, Doktorarbeit, TU München, 2006.
- [85] G. Dollinger, *Kohlenstoffolien als Stripper für schwere Ionen*, Doktorarbeit, TU München, 1990.

- [86] O. Schmelmer, G. Dollinger, G. Datzmann, C. Goeden, H.J. Körner, Nucl. Instr. and Meth. B **158** (1999) 107–112.
- [87] G. Datzmann, G. Dollinger, G. Hinderer, H.-J. Körner, Nucl. Instr. and Meth. B **158** (1999) 74–80.
- [88] P. Reichart, G. Greubel, V. Hable, P. Hartung, A. Hauptner, G. Dollinger, MLL Jahresbericht (2007) 85, URL [http://www.bl.physik.uni-muenchen.de/bl\\_rep/jb2007/p085.pdf](http://www.bl.physik.uni-muenchen.de/bl_rep/jb2007/p085.pdf).
- [89] V. Hable, C. Greubel, A. Bergmaier, P. Reichart, A. Hauptner, R. Krücken, H. Strickfaden, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, G. Dollinger, Nucl. Instr. and Meth. B **267** (2009) 2090–2097.
- [90] C.S. Murphy, M.W. Davidson, Light Source Power Levels, Carl Zeiss MicroImaging Online Campus, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>.
- [91] M.W. Davidson, Fundamentals of Light-Emitting Diodes (LEDs), Carl Zeiss MicroImaging Online Campus, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>.
- [92] F. Bernhard, *Technische Temperaturmessung*, Springer, 2004.
- [93] H. Unbehauen, *Regelungstechnik 1*, Vieweg Verlag, 2005.
- [94] Saint Gobain Plastic Scintillator Data Sheets, URL <http://www.detectors.saint-gobain.com/>.
- [95] Saint-Gobain, *Handling and Cleaning Plastic Scintillators*, 2003.
- [96] M. Heiss, B.E. Fischer, B. Jakob, C. Fournier, G. Becker, G. Taucher-Scholz, Radiat. Res. **165** (2006) 231–239.
- [97] Ph. Barberet, A. Balana, S. Incerti, C. Michelet-Habchi, Ph. Moretto, Th. Pouthier, Rev. Sci. Instrum. **76** (2005) 015101–1–015101–6.
- [98] G. Randers-Pehrson, C.R. Geard, G. Johnson, C.D. Elliston, D.J. Brenner, Radiat. Res. **156** (2001) 210–214.
- [99] C. Shao, M. Folkard, B.D. Michael, K.M. Prise, PNAS **101** (2004) 13495–13500.
- [100] G.F. Knoll, *Radiation Detection and Measurement*, John Wiley & Sons, 2<sup>nd</sup> edition, 1989.

- [101] Transmissionskurve LCI Plan Neofluar 63x/1,3 Imm Korr DIC M27, URL <http://www.zeiss.de/objektive>.
- [102] M. Heiss, *Entwicklung und Erprobung eines Aufbaus zur gezielten Bestrahlung einzelner biologischer Zellen an der Schwerionen-Mikrosonde der GSI*, Doktorarbeit, TU Darmstadt, 2004.
- [103] *Gebrauchsinformationen RTV 160*.
- [104] Laser Components Farbglass-Katalog, URL <http://www.lasercomponents.com/>.
- [105] J. Ziegler, SRIM & TRIM, URL <http://srim.org/>.
- [106] G. Dollinger, A. Bergmaier, A. Hauptner, S. Dietzel, G.A. Drexler, C. Greubel, V. Hable, P. Reichart, R. Krücken, T. Cremer, A.A. Friedl, Nucl. Instr. and Meth. B **249** (2006) 270–277.
- [107] C. Burgdorf, *Realisierung einer Schnittstelle für die externe Steuerung der Software AxioVision 4.6.3 in Verbindung mit dem Rasterionenmikroskop SNAKE*, Studienarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2008.
- [108] L. Hochstein, *Korrektur von 50 Hz Oszillationen am Rasterionenmikroskop „SNAKE“ unter Verwendung von arbiträren, triggerbaren Funktionsgeneratoren*, Studienarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2009.
- [109] L. Schermelleh, I. Solovei, D. Zink, T. Cremer, Chromosome Res. **9** (2001) 77–80.
- [110] J.A. Titus, R. Haugland, S.O. Sharrow, D.M. Segal, J. Immunol. Methods **50** (1982) 193.
- [111] T. Brüning, *Quantitative Analyse von Proteinkinetiken nach Bestrahlung lebender Zellen mit energetischen Schwerionen am Rasterionenmikroskop SNAKE*, Diplomarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2008.
- [112] ImageJ, URL <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>.
- [113] T. Brüning, *Entwicklung von Auswertemethoden zur Bestimmung von Proteinkinetiken nach Zellbestrahlungen am Rasterionenmikroskop SNAKE*, Studienarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2008.
- [114] B. Jakob, J. Splinter, M. Durante, G. Taucher-Scholz, PNAS **106** (2009) 3172–3177.

- [115] C. Burgdorf, *Quantitative Analyse der LET- und Strahlungsdosisabhängigkeit von Proteinkinetiken nach Ionenmikrobestrahlung*, Diplomarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2010.
- [116] B. Jakob, J.H. Rudolph, N. Gueven, M.F. Lavin, G. Taucher-Scholz, *Radiat. Res.* **163** (2005) 681–690.
- [117] S. Bekker-Jensen, C. Lukas, F. Melander, J. Bartek, J. Lukas, *J. Cell Biol.* **170** (2005) 201–211.
- [118] C.L. Limoli, J.F. Ward, *Radiat. Res.* (1993) 160–169.
- [119] S.R. Sternberg, *IEEE Computer* **16** (1983) 22–34.
- [120] A. Derer, *In vivo Beobachtung der DNA-Schadensantwort nach Ionenbestrahlung*, Diplomarbeit, LMU München, 2010.
- [121] D.L. Spector, *Annu. Rev. Biochem.* **72** (2003) 573–608.
- [122] T.E. Schmid, G. Dollinger, V. Hable, C. Greubel, O. Zlobinskaya, D. Michalski, M. Molls, B. Röper, *Radiotherapy and Oncology* **95** (2010) 66–72.



# Publikationsliste

1. UNTERSUCHUNG DER DYNAMIK VON DNA-REPARATURPROTEINEN NACH BE-  
STRAHLUNG LEBENDER ZELLEN AM RASTERIONENMIKROSKOP SNAKE  
**V. Hable**, Diplomarbeit, TU München, 2004.
2. MICROIRRADIATION OF CELLS WITH ENERGETIC HEAVY IONS  
G. Dollinger, **V. Hable**, A. Hauptner, R. Krücken, P. Reichart, A.A. Friedl,  
G.A. Drexler, T. Cremer, S. Dietzel, Nucl. Instr. and Meth. B **231** (2005) 195.
3. METHODS FOR QUANTITATIVE EVALUATION OF DYNAMICS OF REPAIR PROTE-  
INS WITHIN IRRADIATED CELLS  
**V. Hable**, G. Dollinger, C. Greubel, A. Hauptner, R. Krücken, S. Dietzel,  
T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, R. Löwe, Nucl. Instr. and Meth. B **245**  
(2006) 298.
4. HYDROGEN MICROSCOPY AND ANALYSIS OF DNA REPAIR USING FOCUSED  
HIGH ENERGY ION BEAMS  
G. Dollinger, A. Bergmaier, A. Hauptner, S. Dietzel, G.A. Drexler, C. Greubel,  
**V. Hable**, P. Reichart, R. Krücken, T. Cremer, A.A. Friedl, Nucl. Instr. and  
Meth. B **249** (2006) 270.
5. 3D HYDROGEN ANALYSIS OF FERROMAGNETIC MICROSTRUCTURES IN PROTON  
IRRADIATED GRAPHITE  
P. Reichart, D. Spemann, A. Hauptner, A. Bergmaier, **V. Hable**, R. Hertenber-  
ger, C. Greubel, A. Setzer, G. Dollinger, D.N. Jamieson, T. Butz, P. Esquinazi,  
Nucl. Instr. and Meth. B **249** (2006) 286.
6. IRRADIATION OF LIVING CELLS WITH SINGLE IONS AT THE ION MICROPROBE  
SNAKE  
A. Hauptner, T. Cremer, M. Deutsch, S. Dietzel, G.A. Drexler, C. Greubel,  
**V. Hable**, R. Krücken, R. Löwe, H. Strickfaden, G. Dollinger, A.A. Friedl, Acta  
Phys. Pol. A **109** (2006) 273.

7. THE MUNICH MICROPROBE SNAKE, A SINGLE-ION CELL IRRADIATION FACILITY  
C. Greubel, **V. Hable**, G. Dollinger, A. Hauptner, R. Krücken, H. Strickfaden, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, M. Deutsch, A.A. Friedl, *Radiation Research* **166** (2006) 654.
8. RADIOBIOLOGICAL EXPERIMENTS AT THE MUNICH MICROPROBE SNAKE  
A.A. Friedl, G.A. Drexler, M. Deutsch, H. Strickfaden, S. Dietzel, T. Cremer, A. Hauptner, R. Krücken, C. Greubel, **V. Hable**, G. Dollinger, *Radiation Research* **166** (2006) 668.
9. DYNAMICS OF DNA REPAIR PROTEINS AFTER DIRECTED HEAVY-ION CELL IRRADIATION  
**V. Hable**, G. Dollinger, C. Greubel, A. Hauptner, R. Krücken, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, *Radiation Research* **166** (2006) 676.
10. DNA-REPAIR PROTEIN DISTRIBUTION ALONG THE TRACKS OF ENERGETIC IONS.  
A. Hauptner, R. Krücken, C. Greubel, **V. Hable**, G. Dollinger, G.A. Drexler, M. Deutsch, R. Löwe, A.A. Friedl, S. Dietzel, H. Strickfaden, T. Cremer, *Radiation Protection Dosimetry* **122** (2006) 147.
11. SPATIAL DISTRIBUTION OF DNA DOUBLE-STRAND BREAKS FROM ION TRACKS  
A. Hauptner, W. Friedland, S. Dietzel, G.A. Drexler, C. Greubel, **V. Hable**, H. Strickfaden, T. Cremer, A.A. Friedl, R. Krücken, H.G. Paretzke, G. Dollinger, in P. Sigmund (Hrsg.), *Ion Beam Science: Solved and Unsolved Problems*, Band 52 of *Matematisk-fysiske Meddelelser*, S. 59–85, Royal Danish Academy of Sciences and Letters, Copenhagen, 2006.
12. QUANTITATIVE ANALYSIS OF DNA-DAMAGE RESPONSE FACTORS AFTER SEQUENTIAL ION MICROIRRADIATION  
C. Greubel, **V. Hable**, G.A. Drexler, A. Hauptner, S. Dietzel, H. Strickfaden, I. Baur, R. Krücken, T. Cremer, A.A. Friedl, G. Dollinger, *Radiat. Environ. Biophys.* **47** (2008) 415.
13. COMPETITION EFFECT IN DNA DAMAGE RESPONSE  
C. Greubel, **V. Hable**, G.A. Drexler, A. Hauptner, S. Dietzel, H. Strickfaden, I. Baur, R. Krücken, T. Cremer, G. Dollinger, A.A. Friedl, *Radiat. Environ. Biophys.* **47** (2008) 423.



- 
14. RBE OF 20 MEV PROTONS FOR INDUCTION OF MICRONUCLEI IN HELA CELLS AT CONTINUOUS AND PULSED IRRADIATION MODES  
T.E. Schmid, G. Dollinger, A. Hauptner, **V. Hable**, C. Greubel, A.A. Friedl, M. Molls, B. Röper, *Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie* **17** (2008) 105.
  15. NO EVIDENCE FOR A DIFFERENT RBE BETWEEN PULSED AND CONTINUOUS 20 MEV PROTONS  
T.E. Schmid, G. Dollinger, A. Hauptner, **V. Hable**, C. Greubel, S. Auer, A.A. Friedl, M. Molls, B. Röper, *Radiation Research* **172** (2009) 567.
  16. NANOSECOND PULSED PROTON MICROBEAM  
G. Dollinger, A. Bergmaier, **V. Hable**, R. Hertenberger, C. Greubel, A. Hauptner, P. Reichart, *Nucl. Instr. and Meth. B* **267** (2009) 2008.
  17. THE LIVE CELL IRRADIATION AND OBSERVATION SETUP AT SNAKE  
**V. Hable**, C. Greubel, A. Bergmaier, P. Reichart, A. Hauptner, R. Krücken, H. Strickfaden, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, G. Dollinger, *Nucl. Instr. and Meth. B* **267** (2009) 2090.
  18. RELATIVE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF PULSED AND CONTINUOUS 20 MEV PROTONS FOR MICRONUCLEUS INDUCTION IN 3D HUMAN RECONSTRUCTED SKIN TISSUE  
T.E. Schmid, G. Dollinger, **V. Hable**, C. Greubel, O. Zlobinskaya, D. Michalski, M. Molls, B. Röper, *Radiother. Oncol.* **95** (2010) 66.
  19. DIFFERENCES IN THE KINETICS OF  $\gamma$ -H2AX FLUORESCENCE DECAY AFTER EXPOSURE TO LOW AND HIGH LET RADIATION  
T.E. Schmid, G. Dollinger, W. Beisker, **V. Hable**, C. Greubel, A.A. Friedl, M. Molls, B. Röper, *Int. Jour. Radiat. Biol.* **86** (2010) 682.



# Danksagung

An erster Stelle möchte ich dem Leiter des Instituts LRT2, Herrn Prof. Günther Dollinger herzlich für die langjährige, kompetente Betreuung seit Beginn meiner Diplomarbeit danken. Seine Unterstützung und sein Interesse an den Zellbestrahlungsexperimenten haben die stete Verbesserung und Weiterentwicklung des Versuchsaufbaus ermöglicht. Sein klarer Blick für wissenschaftliche Zusammenhänge hat oft zu neuen Erkenntnissen geführt und neue Wege aufgezeigt.

Großer Dank gilt meinem (Zimmer-)Kollegen Christoph Greubel für die gute Zusammenarbeit bei allen Biologieexperimenten an SNAKE und für den angenehmen Teamgeist in der Gruppe. Danke auch für die Aufnahme des Spektrums 4.10, als ich verletzungsbedingt zwei Strahlzeittage pausieren musste. Als Ausgleich zu den kräftezehrenden Strahlzeiten sind diverse gemeinsame Konferenzreisen zu erwähnen, während derer zum Glück meist noch etwas Freizeit übrig blieb...

Vielen Dank an meine SNAKE-Kollegen von der pp-Gruppe Dr. Patrick „Baaadrig“ Reichart und Marcus Moser für die angenehme Zusammenarbeit und die problemlose Koexistenz der beiden „SNAKE-Modi“, sowie Dr. Guanghua Du für die Mithilfe (nicht nur) während der Strahlzeiten. Erstgenanntem auch danke für die Mithilfe bei der Rechneradministration am Institut. Besten Dank auch dem ehemaligen SNAKEler Dr. Andreas Hauptner für sein Interesse an dem Lebendzellprojekt und seine kompetente Unterstützung in der Anfangsphase.

Ein großes Dankeschön auch an die zahlreichen Diplomanden, Studienarbeiter und Werkstudenten an SNAKE, die viel der dort geleisteten Arbeit getragen haben.

Großer Dank für die gute Zusammenarbeit gebührt auch unseren zahlreichen Kollaborateuren aus der Biologie, ohne die keine Zelle bestrahlt werden würde. Hierbei seien besonders Dr. Anna Friedl sowie Dr. Guido Drexler und Hilmar Strickfaden für ihre großen Mühen bei der Erstellung der transgenen Zelllinien erwähnt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Andreas Bergmaier für seine Unterstützung bei Problemen jeder Art, seine Hilfe u. a. bei der Weiterverarbeitung der PMT-Signale, die gute Zusammenarbeit bei den Praktika, das Korrekturlesen eines großen Teils dieser Arbeit, sowie für Büro-Obdach am Anfang unserer Zeit am neuen Arbeitsplatz fern ab vom Experiment.

Vielen Dank an alle beteiligten Werkstätten. Der LRT2-Werkstatt Peter Wieczorek und Wolfgang Engl für die Anfertigung der meisten für diese Arbeit verwendeten Teile sowie diverse Logistikaufgaben, der Beschleuniger-Werkstatt Fritz Haftlmeier und Georg Obermaier für die große Hilfsbereitschaft bei spontanen Aufträgen während der Strahlzeit (Fertigstellungsziel: gestern) aber auch z.B. für die Soforthilfe bei gluckernden Heizkörpern im Ruheraum, sowie der TU-Zentralwerkstatt für die Massenfertigung der Zellbehälter.

Herzlicher Dank geht an die Operateure und alle anderen Mitarbeiter des Tandembeschleunigers für die Erfüllung all unserer Strahlwünsche und das angenehme Arbeitsklima dort. Besondere Anerkennung gebührt dabei Herrn Siegfried Koschartz für die Rundumbetreuung des „Linsers“ und sein besonderes Engagement während der Strahlzeiten. Ebenfalls vielen Dank an Herrn Peter Hartung für die Konstruktion der Mikroskophalterung und das Überlassen seiner CAD-Zeichnungen, die als Grundlage für die Abbildungen 4.3 und 4.4 dienen.

Bedanken möchte ich mich auch bei unserem Zeiss-Kundenbetreuer Dr. Andreas Bolzer für den guten Support und das bereitwillige Verleihen von Mikroskopkomponenten zu Testzwecken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die große Unterstützung, die sie mir während meines Studiums und meiner Promotionszeit entgegengebracht haben. Auch die sorgfältige Suche meines Vaters nach den letzten Rechtschreib- und Grammatikfehlern in dieser Arbeit sei hier dankend erwähnt.