

Universität der Bundeswehr München

Gezielte Bestrahlung zellulärer und nukleärer Substrukturen am Ionenmikrostrahl SNAKE

Dipl.-Phys. Christian Siebenwirth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Angewandte Physik und Messtechnik der Universität der Bundeswehr München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gerdts
1. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Günther Dollinger
2. Gutachterin:	PD Dr. rer. nat. Anna Friedl

Die Dissertation wurde am 16.01.2017 bei der Universität der Bundeswehr München eingereicht und durch die Fakultät für Luft- und Raumfahrttechnik am 03.04.2017 angenommen. Die mündliche Prüfung fand am 08.05.2017 statt.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Aufbau zur gezielten Bestrahlung von zellulären und nukleären Substrukturen am Rasterionenmikroskop SNAKE entwickelt, erfolgreich installiert und charakterisiert. Diese Entwicklung bildete die methodische Grundlage für die Untersuchung der Sensitivität des Nucleolus im Zellkern auf ionisierende Strahlung.

Das präsentierte neue Zielbestrahlungskonzept ermöglicht es, Substrukturen in Zellen mit einer Genauigkeit von besser als $(0,4 \pm 0,7)$ μm in X-Richtung und $(-0,2 \pm 0,8)$ μm in Y-Richtung mit einzelnen, abgezählten Ionen zu bestrahlen. So wird ein Nucleolus mit 3 μm Durchmesser von einem einzeln applizierten Ion zu mehr als 80% Wahrscheinlichkeit getroffen. Die Bestrahlung von 15-20 Zellen eines Kamerablickfeldes dauert dabei etwa 1 min, wodurch auf einer Probe mehr als 1000 Zellen pro Stunde gezielt bestrahlt werden können.

Diese methodische Entwicklung macht die Behandlung neuer Fragestellungen in der Strahlenbiologie möglich und wird schon erfolgreich für Projekte, wie der Untersuchung der Strahlensensitivität von Mitochondrien oder dem Vergleich von UV-Mikrobestrahlungen mit Ionenbestrahlungen angewendet. Als treibende Idee dieser Entwicklung wurde in dieser Arbeit erstmals mit einer gezielten Nucleolusbestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen die Hypothese getestet, ob der Zellkern homogen auf Strahlung sensitiv ist. Dazu wurde gezielt der Nucleolus oder der Zellkern mit ausgesparten Nucleoli mit 3 Ionen auf einen Punkt bestrahlt, was auf den Zellkern gemittelt etwa 1,1 Gy entspricht, und ein Zytokineseblock-Mikrokerntest durchgeführt. Es ergaben sich mit $(0,34 \pm 0,04)$ nach Nucleolusbestrahlung (NB) und $(0,35 \pm 0,04)$ nach „Zellkern ohne Nucleolus“-Bestrahlung (ZB) die gleichen Mikrokernraten pro doppelkerniger Zelle, die aber deutlich erhöht zu den Kontrollpositionen mit $(0,073 \pm 0,019)$ und $(0,073 \pm 0,022)$ sind. Nach NB wurde eine signifikant höhere Doppelkernrate von $(0,60 \pm 0,04)$ pro bestrahlter Zelle beobachtet als nach ZB mit $(0,508 \pm 0,023)$. Bei unbestrahlten Zellen lag die Doppelkernrate bei $(0,600 \pm 0,024)$. Offensichtlich wird der Zellzyklus nach NB etwas weniger verzögert als nach ZB. Bei beiden Endpunkten ist der Unterschied jedoch deutlich geringer als man anhand des DNA-Dichteunterschieds annehmen würde (DNA-Dichte im Nucleolus \approx 5% DNA-Dichte im Zellkern). Damit wirken sich im Nucleolus erzeugte DNA-Schäden scheinbar schwerer aus als im restlichen Zellkern.

Zusätzlich wurde überprüft, ob eine gezielte Bestrahlung des Nucleolus mit 1, 10, 50 und 100 Kohlenstoffionen eine Stressantwort der Nucleoli in der Zelle hervorruft. Eine auftretende nucleoläre Segregation mittels Färbung des UBF-Proteins, wie nach UV-Bestrahlung beobachtet wird, wurde weder in allen Nucleoli eines Zellkerns noch an dem bestrahlten Nucleolus in Folge der Ionenbestrahlung beobachtet. Jedoch ergab die Analyse der Transkription, dass an der Stelle eines Nucleolustreffer zu mehr als $(90\pm 20)\%$ das Signal des 5EU-Einbaus in die rRNA des Nucleolus verringert ist. Während auch keine generelle Umverteilung des Parp1-Proteins über den kompletten bestrahlten Nucleolus beobachtet wurde, kam es jedoch zu $(57\pm 15)\%$ lokal an der Stelle des reduzierten 5EU-Signals zu einer lokalen Verringerung des Parp1-Signals. Dies lässt auf eine von der Ionenzahl unabhängige lokale Hemmung der rRNA-Transkription im Nucleolus schließen.

Abstract

In this thesis, a setup for targeted irradiation of cellular and nuclear substructures at the ion microbeam SNAKE was developed, successfully installed and characterized. This development builds the methodical basis for investigations into the sensitivity of the nucleolus, which is in the nucleus, to ionizing radiation.

The presented new targeted irradiation concept enables the irradiation of substructures in the nucleus with an accuracy of less than (0.4 ± 0.7) μm in X-direction and (-0.2 ± 0.8) μm in Y-direction with single counted ions. Thus a nucleolus of 3 μm diameter is hit by a single applied ion with a probability of more than 80%. Irradiation of 15-20 cells in one field of view of the microscope camera takes about 1 min, whereby in one sample more than 1000 cells per hour can be irradiated.

This methodical development enables the investigation of new questions in radiobiology and is successfully used in projects like the investigation of the radiation sensitivity of mitochondria or the comparison of UV microirradiations with ion irradiations. For the first time, as the main motivation for this development, in this thesis the hypothesis was tested by a targeted irradiation of the nucleolus with 55 MeV carbon ion, if the nucleus is homogenously sensitive towards radiation. For this purpose, the nucleolus or the nucleus without the nucleoli were irradiated with 3 ions in one spot, which equates to an average dose of 1.1 Gy to the nucleus. Following the irradiation a cytokinesis-block micronucleus assay done. The micronuclei yield per binucleated cell were similar with (0.34 ± 0.04) after nucleolus irradiation (NB) and (0.35 ± 0.4) after "nucleus without nucleolus" irradiation (ZB), but clearly higher than at the control positions with (0.073 ± 0.019) and (0.073 ± 0.022) . After NB a significantly higher yield in binucleated cells of (0.60 ± 0.04) was investigated than after ZB with (0.508 ± 0.023) . In unirradiated cells the yield of binucleated cells was (0.600 ± 0.024) . Obviously, after NB the cell cycle is less delayed than after ZB. However, in both endpoints the difference is clearly smaller than expected using the DNA density difference (DNA density in the nucleolus \approx 5% DNA density in the nucleus). So DNA damages caused in the nucleolus seem to have more impact than in the residual nucleus.

Additionally, it was tested, if targeted irradiation of the nucleolus with 1, 10, 50 and 100 carbon ions induces a stress response in the nucleoli. An occurring nucleolar segregation using a staining of the protein UBF, as observed after UV irradiation, could not be observed in all nucleoli of the nucleus nor in the irradiated nucleolus using ions. However, analysis of the transcription showed, that at the spot of a nucleolus hit with more than $(90\pm 20)\%$ probability the signal of the incorporation of 5EU in the rRNA of the nucleolus is decreased. While no general reorganization of Parp1 in the complete irradiated nucleolus was observed, $(57\pm 15)\%$ of the spots with reduced 5EU signal showed a local reduction of the Parp1 signal. Thus, independent of the ion number the rRNA transcription in the nucleolus was locally inhibited.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Inhaltsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
2 Strahlenbiologische Grundlagen	5
2.1 Zelluläre Substrukturen.....	5
2.1.1 Zellkern (Nukleus).....	7
2.1.2 Nucleolus.....	11
2.2 DNA-Schäden und DNA-Reparatur.....	15
2.2.1 Strahleninduzierte DNA-Schädigung.....	15
2.2.2 DNA-Reparatur und die wichtigsten Reparaturproteine.....	17
2.3 Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung strahlenbiologischer Phänomene.....	21
2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung zur Untersuchung von Proteinverteilungen in fixierten Zellen.....	22
2.3.2 Stabile Transfektion zur Untersuchung von Proteinverteilungen in lebenden Zellen.....	22
3 Zielbestrahlung an SNAKE	25
3.1 Zellbestrahlungen an SNAKE.....	25
3.1.1 Mikrostrahl SNAKE.....	25
3.1.2 Bestrahlungsaufbau und LCI-Setup.....	27
3.2 Erweiterung des SNAKE Aufbaus zur gezielten Ionenbestrahlung von zellulären und subnukleären Strukturen.....	31
3.2.1 Strahlortbestimmung und Eichung der Strahlableinheiten.....	32
3.2.2 Offsetbestimmung.....	34
3.2.3 Zielbestrahlungssoftware.....	34
3.3 Charakterisierung der Zielbestrahlung an SNAKE.....	36
3.3.1 Kernspurdetektorbestrahlung.....	37
3.3.2 Gezielte Bestrahlung von zellulären Substrukturen.....	38

3.3.3	Diskussion der Einflüsse auf die Zielgenauigkeit.....	41
3.4	Weitere Funktionen.....	58
3.4.1	Semi-automatische Zielerkennung von Nucleoli.....	58
3.4.2	Bestrahlung zusammengesetzter Felder	62
3.4.3	„LiveGuck“-Modus	63
3.4.4	Markierte Szintillatoren zur Repositionierung von Bestrahlungsfeldern	63
3.5	Fazit	65
4	Biologische Experimente	67
4.1	Akkumulation von Reparaturproteinen nach Hochdosisbestrahlung	67
4.2	Strahlensensitivität von Mitochondrien.....	71
4.3	Untersuchung der Strahlensensitivität des Nucleolus	72
4.3.1	Genetischer Schaden nach gezielter Nucleolusbestrahlung mit Ionen mittels Mikrokerntest	72
4.3.2	Einfluss von Ionenschäden auf die Transkription und Proteinverteilung im Nucleolus.....	87
5	Ausblick	105
5.1	Mit der Zielbestrahlung neu zugängliche Fragestellungen	105
5.2	Ausbau von Experimentbedingungen	106
5.3	Rolle und Auswirkung von durch Ionen im Nucleolus erzeugten DNA- Schäden.....	107
6	Anhang	109
6.1	Unkorrigiertes Ergebnis des Mikrokerntests.....	109
6.2	Anleitungen für die Programme der Zielbestrahlung und Proben- Mikroskopie	110
6.2.1	Strahlkalibration	110
6.2.2	Protokoll zum Einbau und Einmessen der LCI-Container mit einem Öl-Objektiv	111
6.2.3	Zielbestrahlungssoftware.....	112
6.2.4	Protokoll zur Durchführung der Zielbestrahlung.....	116
6.2.5	Automatische Nucleolierkennung mittels CellProfiler	117
6.2.6	Makrogestützte Excelmappe zur Rekonstruktion und Mikroskopie von Bestrahlungsfeldern.....	118
6.2.7	Protokoll zur Repositionierung	121
6.2.8	VBA-Makro zur Erstellung von Kachelbildern in AxioVision.....	122
6.3	Biologische Protokolle	123
6.3.1	Zielgenauigkeitsbestimmung.....	123
6.3.2	Mikronukleitest.....	124
6.3.3	Transkriptionsassay mit γ H2AX-Färbung.....	125

6.3.4 Proteinverteilung von UBF und γ H2AX.....	127
7 Literaturverzeichnis.....	129
8 Publikationsliste.....	141
Danksagung	145

1 Einleitung

Tagtäglich ist jeder Mensch aufgrund von natürlichen Strahlungsquellen unvermeidbar ionisierender Strahlung ausgesetzt. In Deutschland beträgt die natürliche Strahlendosis eines Menschen im Mittel 2,1 Millisievert/Jahr (mSv/a) und variiert abhängig vom Wohnort zwischen 1-10 mSv/a. Weltweit gibt es sogar Orte mit Dosisraten von bis zu 300 mSv/a. Im Wesentlichen unterscheidet man in äußere und innere Strahlenexposition, die durch kosmische Höhenstrahlung und auf der Erde natürlich vorhandene Radionuklide hervorgerufen wird. [Bun]

Unter Vernachlässigung von Gewichtungsfaktoren der Strahlenarten, entspricht die natürliche mittlere Strahlendosis in Deutschland einer Energiedeposition von 2,1 Millijoule (mJ) pro Kilogramm Körpergewicht. Die Energiedeposition geschieht durch Ionisation von Atomen und Molekülen und kann zum Bruch weiterer Molekülbindungen führen. Mit einer mittleren Ionisierungsenergie von Wasser mit 30 Elektronenvolt (eV), das etwa für Gewebe entsprechend ist, und einem durchschnittlichem Körpergewicht von 75 kg, kommt man so auf ca. 10^9 Ionisationsereignisse pro Sekunde im menschlichen Körper. Geht man davon aus, dass der Körper aus etwa 10^{14} Zellen besteht, werden in einer Zelle dabei im Mittel 300 Ionenpaare im Jahr durch natürliche ionisierende Strahlung erzeugt. Bei einem Durchgang eines hochenergetischen Strahlungsteilchens (z.B. Elektron oder Photon) beträgt dessen Energieübertrag pro Weglänge, dem sogenannten LET (englisch: „Linear Energy Transfer“), etwa $1 \text{ keV}/\mu\text{m}$, wodurch es in einer Zelle mit einem Durchmesser von etwa $15 \mu\text{m}$ zu etwa 500 Ionisationsereignissen kommt. So sind etwa 2 Millionen Zellen jedes Menschen pro Sekunde von einem natürlichen Strahlungsereignis betroffen.

Für die Zelle wird dabei eine Schädigung innerhalb des Zellkerns und somit des darin befindlichen Erbguts als besonders schwerwiegend angesehen. So kann eine Schädigung und Änderung der dort vorliegenden genetischen Information zum direkten Zelltod, aber auch zu Mutationen führen, welche letztendlich Krebs hervorrufen können. Dank verschiedener Mechanismen zur Reparatur solcher durch Ionisation erzeugter Schäden, kommt der Mensch mit der natürlichen Strahlenbelastung weitestgehend zurecht. Ein näheres Verständnis dieser Mechanismen dient der Abschätzung von Risiken und Spätfolgen für den Menschen nach Strahlenunfällen, wie in Tschernobyl oder Fukushima, sowie nach Strahlenexposition in der Medizin. Dieses Verständnis fördert z.B. speziell die Qualität der Strahlentherapie von Tumoren. Hier

wird der Patient bestrahlt und dadurch gezielt eine Dosisüberhöhung in dem Tumor appliziert, um diesen „abzutöten“. Die akuten Strahleneffekte der im umliegenden Gewebe applizierten Dosis, die ein größeres Volumen betrifft als das Tumolvolumen selbst, sollen dabei möglichst minimal sein. Dennoch kommt es auch in diesem Gewebe zu Mutationen, die zu Tumoren als Folge der Krebstherapie führen können. So wird durch Ausnutzen von unterschiedlichen Erholungszeiten oder Sauerstoffversorgung der Gewebe z.B. mittels wiederholter Bestrahlungen geringer Dosis, sogenannte Fraktionierung, eine höhere Tumorkontrollwahrscheinlichkeit, bei gleichen oder geringeren Nebeneffekten erreicht. Auch für eine zukünftige bemannte Marsmission und dessen eventuelle Besiedlung ist das Verständnis von zellulären Schäden durch ionisierende Strahlung essentiell [Dur08]. Denn verlässt man die schützende Atmosphäre und das Magnetfeld der Erde, so ist man der kosmischen Strahlung nahezu ungeschützt ausgesetzt. Deswegen sollte vorher sichergestellt werden, dass die Passagiere die Reise überleben und auch die nächsten Generationen nicht stark beeinträchtigt werden.

Zur Untersuchung von Strahleneffekten haben sich in den letzten zwei Jahrzehnten sogenannte Ionenmikrostrahlen als Methode der Wahl etabliert, die hochenergetische Ionen teilweise auf weniger als 1 μm Durchmesser fokussieren [Ger06; Pri11]. Je nach Ionensorte konzentriert sich dabei der Schaden auf unter 100 nm um die Ionenspur. Mit einer Einzelionendetektion kann somit eine exakt definierte Dosis kontrolliert in lebenden Zellen appliziert und damit der Schaden sehr lokal induziert werden. Trifft ein Ion dabei auf DNA ist der auftretende Schaden und speziell die Ausbeute an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) signifikant verschieden zum Schaden in Folge von Röntgenmikrobestrahlungen oder von in der Molekularbiologie gerne verwendeten UV-Mikrobestrahlungen. Bei Letzteren ist zudem die deponierte Energie schwierig zu verifizieren. Somit lassen sich z.B. die Induktion und die Folgen von DSB, den vermeintlich schwersten und folgenreichsten Schäden des Erbguts, am spezifischsten und reproduzierbarsten an Ionenmikrostrahlen untersuchen.

Mit Hilfe von Ionenmikrostrahlen konnten so radiobiologische Untersuchungen zu Zellüberleben und zu genetischen Veränderungen nach gezielter Bestrahlung subzellulärer Bereiche wie dem Zellkern oder dem Cytoplasma mit abgezählten Kohlenstoffionen, α -Teilchen und Protonen durchgeführt werden [Hei97; Wu99; Pri00; Fou12]. Ebenfalls ermöglichte eine gezielte Bestrahlung die Untersuchung des stark diskutierten Bystander-Effekts, bei dem nicht bestrahlte Zellen, die sich in Nachbarschaft von bestrahlten Zellen befinden, eine Schadensantwort zeigen, die sich u.a. über das Mikromilieu auf die nicht getroffenen Zellen auswirkt [Zho00; Sha04; Pri09]. Mit der Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie zur Lebendzellmikroskopie von lebenden Zellen, die z.B. fluoreszierende DNA-Reparaturproteine stabil herstellen, konnten die Reparaturkinetik und Dynamik der Schäden direkt nach oder sogar während der Bestrahlung untersucht werden [Hab04; Hab09; Jak05; Mos11; Hab12;

Gir13; Bou14b]. Inzwischen hat sich das Anwendungsspektrum von Ionenmikrostrahlexperimenten zusätzlich auf größere Zellsysteme, wie einfache lebende Mehrzeller, beispielsweise den sogenannte *C. elegans* [Ber09], Haut- [Sed07; Zlo13] und Mausmodellen [Gre11; Zlo14; Gir15a; Gir15b] erweitert.

In dieser Arbeit wird der Bogen zu der einzigartigen Möglichkeit zurückgeschlagen, mit Ionenmikrobestrahlungen Schäden gezielt im μm -Bereich zu applizieren und ihre Auswirkung spezifisch verfolgen zu können. Ansporn ist dabei die bisher unbehandelte Frage, ob es im Zellkern, u.a. aufgrund von unterschiedlicher DNA-Dichte oder DNA-Aktivität, Bereiche gibt, in denen sich von Ionen erzeugte Schäden besonders auf die Zelle auswirken. Zur Untersuchung dieser Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit der Ionenmikrostrahl SNAKE am Maier-Leibniz-Labor in Garching genutzt, der es mit einem Strahldurchmesser von etwa 500 nm ermöglicht einzelne hochenergetische Ionen zu applizieren [Hau06; Gre13]. In dieser Arbeit wurde das von Dr. Volker Hable etablierte Lebendzellsetup [Hab11] um den gezielten Bestrahlungsmodus erweitert, der es nun erlaubt, Bereiche in der Größe weniger μm^2 im Zellkern oder auch außerhalb, wie z.B. Mitochondrien zu bestrahlen. Dabei kann ein Durchsatz an bestrahlten Zellen erreicht werden, der die Beschränkung auf die reine Beobachtung einzelner Zellen nach der Bestrahlung aufhebt.

Nach kurzer Erläuterung einiger für diese Arbeit relevanter Grundlagen der Strahlenbiologie in Kapitel 2, wie z.B. Zellstrukturen, DNA-Schäden und die Funktion verwendeter Proteine, wird in Kapitel 3 das an SNAKE verwirklichte Zielbestrahlungskonzept und die Bestimmung der Zielgenauigkeit vorgestellt. Kapitel 4 behandelt biologische Experimente, die mit der Zielbestrahlungserweiterung an SNAKE durchgeführt wurden. Dabei wird speziell die Auswirkung einer gezielten Ionenbestrahlung des Nucleolus im Zellkern auf die Mikrokerninduktion und die Transkription im Nucleolus untersucht.

2 Strahlenbiologische Grundlagen

2.1 Zelluläre Substrukturen

Schon in den frühen Anfängen des 19. Jahrhunderts hat man bei der Mikroskopie von eukaryotischen Zellen, wie z.B. Säugetierzellen, drei Zellbereiche erkennen können, die auch heute noch bei Phasenkontrastaufnahmen als erstes ins Auge fallen: das Cytoplasma, den Zellkern (Nukleus) und die Nucleoli (Abb. 2.1. links).

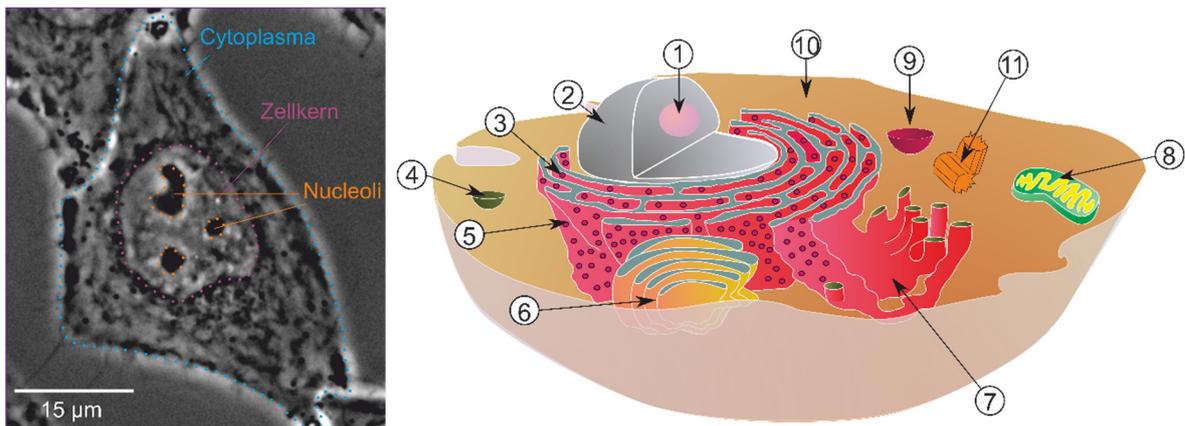


Abb. 2.1: links: Phasenkontrastaufnahme einer menschlichen Gebärmutterhalskrebszelle (HeLa). Drei Strukturen fallen deutlich ins Auge. Eine Membran bildet eine semipermeable Grenze zur Umgebung. Der Zellkern besitzt ebenfalls eine eigene Membran und in dessen Innerem fällt der Nucleolus auf Grund einer hohen RNA- und Protein-Dichte auf.

Rechts nach [Kri09]: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Eukaryotischen Zelle mit den unterschiedlichen Zellorganellen: 1. Nucleolus, 2. Zellkern (Nukleus), 3. Ribosomen, 4. Vesikel, 5. Raues Endoplasmatisches Retikulum, 6. Golgi-Apparat, 7. Glattes Endoplasmatisches Retikulum, 8. Mitochondrien, 9. Lysosom, 10. Cytoplasma, 11. Zentriolen.

Der Durchmesser menschlicher Zellen beträgt typischerweise 10 µm bis 50 µm. Eizellen mit einem Durchmesser zwischen 100 µm und 150 µm, Muskelzellen mit einer Länge von bis zu 10 cm und Nervenzellen mit einer Länge bis zu 1 m bilden dabei eine Ausnahme.

Zellkern und Cytoplasma werden durch 6-10 nm dicke Membranen voneinander und der Umgebung getrennt. Verschiedenste Proteine in der Membran und an ihren Innen- sowie Außenseiten sorgen dafür, dass z.B. Nährstoffe, Hormone und Zellbestandteile nach innen oder außen gepumpt werden und auch selektiv diffundieren können. Zusätzlich stellen sie Kontakt zu anderen Zellen her, dienen der Immunabwehr oder speziellen Stoffwechselprozessen.

Zu ca. 80 % besteht das Cytoplasma aus Wasser, in dem zahlreiche, für diverse Stoffwechselprozesse benötigte, Substanzen gelöst sind, wie z.B. Enzyme, Hormone, Nucleinsäuren und verschiedenste Elektrolyte. Neben dem **Zellkern** enthält es noch weitere Zellorganelle (Abb. 2.1. rechts), die im Folgenden beschrieben werden:

Das **Endoplasmatische Retikulum** (ER) beschreibt weitestgehend ein fein verzweigtes Schlauchgebilde. Man unterscheidet glattes und raues ER. Im Unterschied zum glatten ER, sind an die Membran des rauhen ER kugelförmige **Ribosomen** mit einer Größe von etwa 10 nm angelagert, die auch freischwimmend im Cytoplasma vorhanden sind. Ribosomen bestehen aus zusammengefalteten Ribonucleinsäuren (RNA) und synthetisieren Aminosäuren zu neuen Proteinen (Translation). Daher haben viele Proteine ihren Ursprung im ER. Während der Mitose ist das ER zur Abschnürung der Zellkernmembran zuständig.

Der **Golgi-Apparat** dient zur Weiterverarbeitung, Sortierung und Verpackung neu erzeugter Proteine zu komplexen Eiweißen, wie Enzymen oder Hormonen. Hier werden auch die unterschiedlichen Membranen der Zelle erzeugt. Er besteht aus sackförmigen Hohlkörpern, die übereinandergestapelt sind und einen Durchmesser von ungefähr 1 µm besitzen.

Lysosomen sind die „Verdauungsorgane“ der Zelle. Sie besitzen eine eigene Membran mit der sie Fremdstoffe einschließen, die in die Zelle gelangt sind, und mit Hilfe von Enzymen verdauen. Auch Zellorganelle werden von ihnen zersetzt, wenn sie nicht mehr benötigt werden.

Mitochondrien haben eine Doppelmembran, eine ellipsoide Form von 0,2-1 µm Breite und 3-10 µm Länge und besitzen ringförmige mitochondriale DNA und betreiben eine selbstständig Proteinbiosynthese. Damit werden mitochondriale Proteine aufgebaut, die organische Verbindungen (Zucker) in den Energielieferant ATP (Adenosintriphosphat) umwandeln. Dadurch bilden Mitochondrien die „Energiekraftwerke“ der Zelle.

Zur Vollständigkeit sollen noch weitere Zellkomponenten, wie **Zentriole**, **Vacuole**, **Mikrotubuli**, **Vesikel**, genannt werden, wobei ein Teil von ihnen speziell zellzyklusgebundene Aufgaben verrichtet.

Der **Zellkern** bildet letztendlich die Zentralbibliothek der Zelle. Hier lagert in Form von DNA die gesamte Erbinformation der Zelle und damit der Bauplan für jegliche zelluläre Proteine. Die DNA wird hier abgelesen und in RNA umgewandelt (Transkription) oder vor der Zellteilung verdoppelt (Replikation). [Kri09; Goo10; Bou14a]

Ziel dieser Arbeit ist die Reaktion auf Schäden durch Bestrahlung mit hochenergetischen Ionen im Bereich der **Nucleoli** zu studieren und mit Reaktionen auf Schäden im restlichen Zellkern zu vergleichen. Deswegen werden im Folgenden **Zellkern** und **Nucleolus** genauer erläutert.

2.1.1 Zellkern (Nukleus)

Der schon 1831 von Brown beschriebene Zellkern ist das erste entdeckte Zellorganell und hat bei menschlichen Zellen typischerweise einen Durchmesser von etwa 5 bis 15 μm . Im Zellkern befindet sich der Großteil der Erbinformation, kodiert in Genen (DNA-Abschnitte) auf der DNA. Die DNA (vgl. Abb. 2.2) ist eine leiterartige Struktur, deren Stützen aus einer Aneinanderreihung von Phosphorsäure- und Zuckermolekülen (Desoxyribose) bestehen. Die Phosphatgruppe ist am fünften (5') Kohlenstoffatom des Zuckermoleküls gebunden. An diesen Komplex bindet das dritte (3') Kohlenstoffatom der nächsten Desoxyribose. So lässt sich in jedem DNA Einzelstrang eine Richtung von 5' zu 3' definieren, wobei die Richtungen der Stränge entgegengesetzt sind. Die Quervernetzungen bestehen aus den zwei komplementären Basenpaaren aus Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin. Die Basen sind dabei durch zweifache bzw. dreifache Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden. Base, Zuckermolekül und Phosphatgruppe werden als Nukleotid bezeichnet und können in der Regel nur am 3'-Ende des vorherigen Nukleotids angehängt werden und wachsen somit von 5' nach 3'. In der Abfolge der Basen liegt die gespeicherte Information, wobei die Folge aus drei Basen eine Informationseinheit bildet, das sogenannte Basentriplett oder Codon. Ein Codon dient zur Kodierung von einer Aminosäure und aufeinanderfolgende Codons beschreiben ein Gen, das z.B. den Bauplan für ein neues Protein bildet, welches aus vielen Aminosäuren besteht. Die DNA-Leiter ist in sich gedreht und bildet eine Doppelhelix. In entfalteter Form besitzt sie etwa eine Breite von 2 nm und hätte in ausgebreiteter Form knapp 1 m Länge. DNA liegt jedoch in der Zelle meist als dicht gepacktes Chromatin vor, bei der die DNA gefaltet und um Proteine, die sogenannten Histone, geschlungen ist.

Der Nukleus besitzt eine Doppelmembran, mit der das in ihm befindliche Chromatin gegen das umliegende Cytoplasma abgegrenzt wird. In Eukaryoten, wie z.B. dem Menschen, ist das Chromatin in Chromosomen organisiert, welche in der Teilungsphase (Mitose) in kondensierter Form in Phasenkontrast-Aufnahmen zu beobachten sind. Im Menschen können 22 diploide Chromosomenpaare und die zwei geschlechtsspezifischen X- und Y-Chromosomen unterschieden werden. Aber auch in dem Zeitraum, in dem sie nicht in kondensierter Form vorliegen, sind sie in sogenannten Chromosomenterritorien angeordnet [Cre01]. Je nach Packungsdichte der DNA werden besonders dichte Segmente als Heterochromatin und lockeres Chromatin als Euchromatin bezeichnet. Gene im Euchromatin sind „aktiv“ und können abgelesen werden. Dieser Prozess der Transkription ist, neben der DNA-Replikation, einer von zwei Prozessen, die den Nukleus zu einem sehr dynamischen System machen. [Lam98; Kri09; Mis11]

Diese Prozesse prägen auch die verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelle.

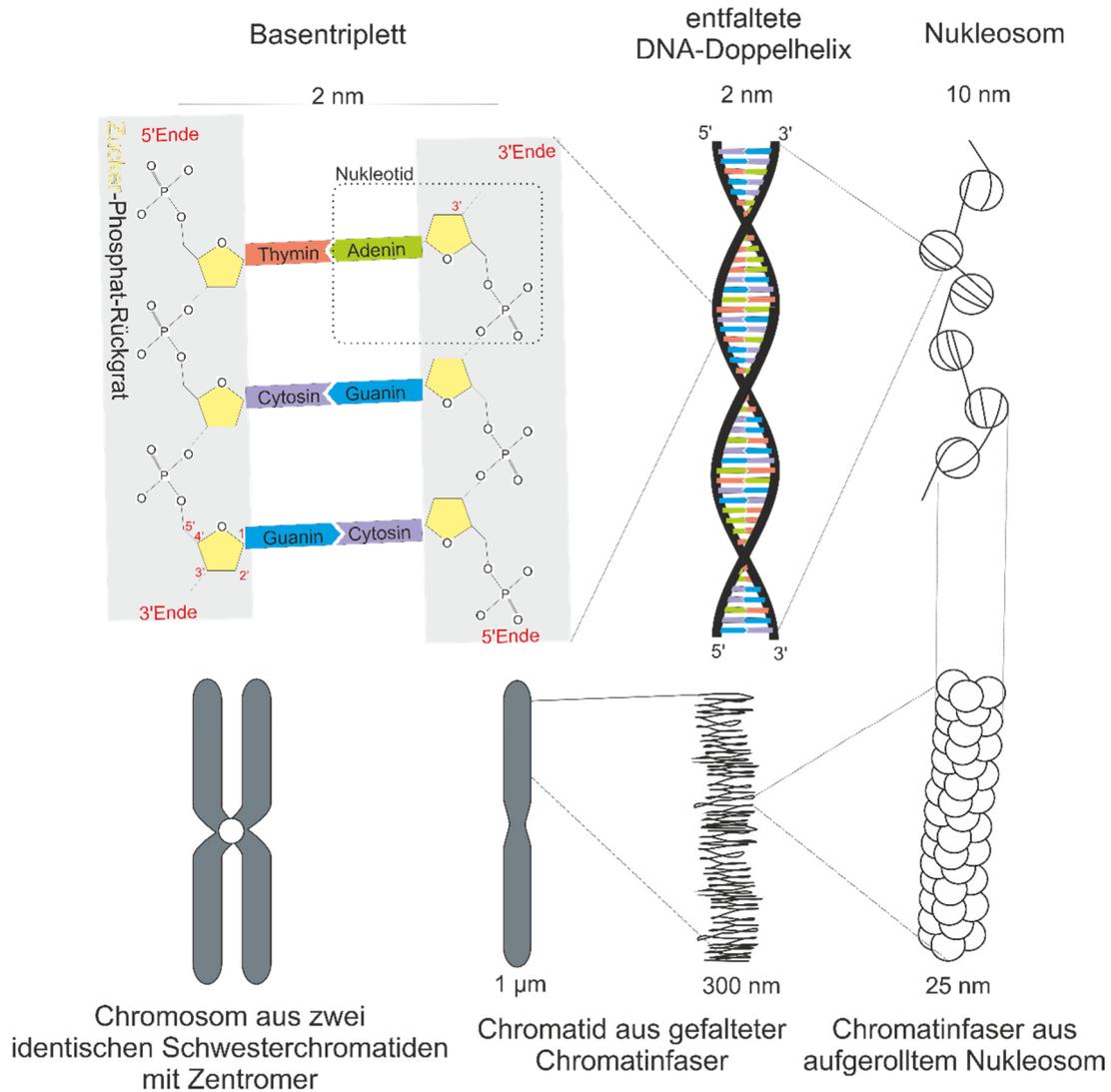


Abb. 2.2: Struktur der DNA. Nucleotide mit komplementären Basen (Thymin, Adenin, Guanin und Cytosin) bilden die DNA-Doppelhelix. Diese wird gefaltet, um Histone zum Nukleosom gewickelt. Das Nukleosom wird zu Chromatinfasern aufgerollt, die vor der Zellteilung zu Chromatiden weiter kondensiert werden. Bei der Zellteilung liegt die DNA dann als, aus je zwei Schwesterchromatiden bestehendes, Chromosom vor.

2.1.1.1 Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt die Zeit zwischen zwei Zellteilungen und liegt in vitro in vielen eukaryotischen Zellen im Bereich von 12 h bis 48 h. Grob unterscheidet man die Interphase und die Zellteilung (Mitose). Die **Interphase** beträgt etwa 90% des Zellzyklus während der die nötigen Prozessschritte zur Vorbereitung der Zellteilung durchgeführt werden. Dabei werden in einer ersten Phase, der sogenannten **G1-Phase** (G: engl. „gap“), nach der Zellteilung verlorene Zellorganelle und für die Replikation nötige Proteine hergestellt. Die G1-Phase ist von der Zeit her am variabelsten und hier hat die Zelle auch die Möglichkeit einen Ruhezustand mit minimalem Stoffwechsel zur Aufrechterhaltung der Zelle einzunehmen, die **G0-Phase**. Aus dieser Phase kann die Zelle auch wieder über die G1-Phase in den Zellzyklus zurückkehren. In der **S-Phase** (S: Synthese) findet die DNA-Replikation, und damit die Verdopplung

des Erbgutes statt. Parallel werden auch schon die Proteine synthetisiert, die zur Strukturierung der DNA in Nukleosomen, Chromatide und Chromosomen benötigt werden. In der folgenden **G2-Phase**, wird die Mitose vorbereitet, wobei die DNA verdoppelt vorliegt, aber noch nicht kondensiert ist. Bei der **Mitose** wird die DNA als erstes in der Prophase kondensiert, wodurch sie auch inaktiviert ist und nicht abgelesen werden kann. Es folgt die Auflösung der Kernmembran und Ausbildung des Spindelapparats. Anschließend werden die kondensierten Chromosomen in der Metaphase im Zentrum der Zelle ausgerichtet, während der Anaphase die Schwesterchromatide getrennt und zum Rand der Zelle gezogen. Mit der Telophase werden die Chromosomen wieder aufgefaltet, der Spindelapparat abgebaut und die Zelle teilt sich in zwei Tochterzellen. [Kri09; Bou14a]

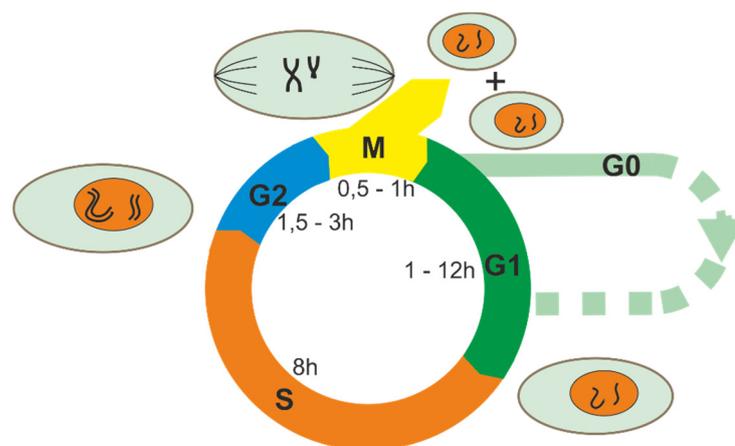


Abb. 2.3: Zellzyklus einer Zelle mit typischen Phasendauern nach [Kri09]. In der Interphase bestehend aus G1-, G0-, S- und G2-Phase wird die DNA-Verdopplung (Replikation) vorbereitet und durchgeführt, und findet die Vorbereitung auf die Mitose (M, Zellteilung) statt. Diese wird in Abhängigkeit von dem DNA-Kondensationsstufe und -Trennungsstufe in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase unterschieden. Die Zelle hat nach der Mitose die Möglichkeit in einen Ruhezustand überzugehen aus dem sie auch wieder in den Zyklus zurückkehren kann.

Betrachtet man Zellüberleben nach Bestrahlung mit Niedrig-LET-Strahlung stellen sich als strahlenempfindlichere Phasen die M- und die G2-Phase heraus. Dann kommen die G1-Phase, die frühe S-Phase und die strahlenresistentesten Phasen, späte S- und G0-Phase. [Kri09]

2.1.1.2 DNA-Replikation

Um bei der Zellteilung beiden Tochterzellen einen kompletten Chromosomensatz mitzugeben, muss während eines Zellzyklus das Genom verdoppelt werden. Dieser Prozess heißt Replikation und geschieht in der S-Phase an mehreren Stellen der DNA gleichzeitig. Zu Beginn erkennt der ORC-Erkennungskomplex (origin recognition complex) eine spezifische DNA-Sequenz und bereitet das Aufschmelzen der beiden DNA-Stränge durch das Enzym Helicase vor. Durch die Auftrennung entstehen zwei Replikationsgabeln. Mit Hilfe von der Primase gebildeten Primern, 10 Nukleotide lange zum DNA-Strang komplementäre RNA-Sequenzen, wird die Replikation gestartet. Dabei läuft die Replikation an beiden Strängen in entgegengesetzte Richtung,

Dadurch kann nur ein Strang (Leitstrang) komplett am Stück repliziert werden. Der andere Strang muss stückweise, über Abschnitte von etwa 200 Nukleotiden Länge, repliziert werden, was der maximalen Rückwärtsbeweglichkeit der Polymerase entspricht. Ansonsten würde die Polymerase abbrechen (Okazaki Fragmente).

2.1.1.3 Transkription

Bei der Transkription bindet ein spezielles Enzym, die „RNA-Polymerase“, mit einem oder mehreren Transkriptionsfaktoren, hinter der Startsequenz des zu transkribierenden Gens, dem Promoter. Es bildet sich die Transkriptionsblase in der die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA Doppelhelix gebrochen und ihre beiden Stränge dadurch gespalten werden. Anschließend bindet die RNA-Polymerase komplementäre Nukleotide an einen der Stränge und hilft bei der Formung des Riboserückgrats der RNA. Am Schluss brechen erneut die Brücken zwischen RNA und DNA, wodurch der neue RNA-Strang frei wird. Im Gegensatz zur DNA ist in der RNA die Base Thymin durch Uracil und das Desoxyribose-Rückgrat durch Ribose ersetzt.

Je nach beteiligter Polymerase wird zwischen ribosomaler RNA (rRNA), messenger RNA (mRNA) oder transfer RNA (tRNA) unterschieden.

Bei der **rRNA** handelt es sich um ribosomale RNA-Bausteine, die von der RNA-Polymerase I (RNA Pol I) im Nucleolus transkribiert werden. Es entsteht das präribosomale 47S rRNA-Transkript, das zu 18S, 5,8S und 28S rRNAs gespalten wird ([S] für Svedberg, ist die Einheit der Sedimentationsgeschwindigkeit und damit ein Maß für die Größe von RNA-Molekülen). Die 18S, 5,8S und 28S rRNAs werden mit der extra erzeugten 5S rRNA zu den ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S verarbeitet, die zur Bildung von Ribosomen in das Cytoplasma geschleust werden [Boi07]. Es wird angenommen, dass die rRNA-Produktion 80% der Gesamtproduktion zellulärer RNA beträgt [Mos07].

Die **mRNA** wird von der RNA-Polymerase II transkribiert und definiert ein Protein schon vor seiner Synthese. Sie wird in mehreren Schritten weiter modifiziert: Entfernung von nicht relevanten Sequenzen (RNA Spleißen), Strukturierung des 5'-Endes (RNA-Capping) und Anhängen eines PolyA-Schwanz (Polyadenylierung) zum Schutz vor vorzeitigem Abbau. Während dieser Verarbeitungsschritte gelangt sie ins Cytoplasma und wird letztendlich dort zu einem Protein translatiert.

Die **tRNA**, transkribiert von der RNA Polymerase III, bekommt ihre reife Form auch nach RNA-Spleißen, RNA-Capping und Modifikationen der Basen. Bei der Translation hilft sie die richtige Aminosäure an das passende Basentriplett der mRNA anzuhängen.

Es gibt noch weitere nicht kodierende DNA (microRNA) oder enzymatische RNA, deren Funktion gerade erst verstanden wird.

Alles in allem sind die RNA-Moleküle essentiell für die Zelle, da sie die Synthese, Regulation und Herstellung von Proteinen ermöglichen. Da sie ähnlich wie Proteine aber

nur eine geringe Lebensdauer haben, müssen sie ständig neu produziert werden. [Kri09; Mis11; Bou14a]

2.1.1.4 Quantifizierung der Transkription und Replikation

Will man zelluläre Prozesse, wie Transkription oder Replikation, untersuchen, nutzt man leicht veränderte Nukleoside (Nukleotid mit angehängter Phosphatgruppe), die bei diesen Prozessen dann in die RNA oder DNA eingebaut werden. Diese können z.B. über das „Click-Chemistry“-Verfahren [Kol01] spezifisch und einfach mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Gibt man das Nukleosidanalogen eine bestimmte Zeit in das Medium der Zellen, wird es von diesen aufgenommen und gelangt in den Zellkern. Besitzt das Nukleosid einen Ribosezucker, wird es gezielt nur in neu synthetisierte RNA eingebaut. Nach Fixierung und Färbung der Zellen mittels „Click Chemistry“-Verfahren spiegelt die Signalstärke der neusynthetisierten RNA den Einfluss einer Behandlung auf die Transkription wieder. [Jao08]

Dieses Verfahren wird in dieser Arbeit genutzt, um den Einfluss einer gezielten Nucleolusbestrahlung mit Ionen auf die rRNA-Transkription zu untersuchen.

Ähnlich kann dieses Verfahren auch für neu synthetisierte DNA verwendet werden, wobei das Nukleosid Desoxyribose enthält.

2.1.2 Nucleolus

Obwohl der Nucleolus eine der offensichtlichsten Strukturen ist und auch im 19. Jahrhundert oft beschrieben wurde, wurden sein Aufbau und seine Funktion lange nicht verstanden.

2.1.2.1 Aufbau und Funktion

1931 hatte E. Heitz in Pflanzenzellen die Entdeckung gemacht, dass es Chromosomen gibt, die nach Anfärben neben den primären Einschnürungen am Zentromer auch eine weitere, sekundäre Einschnürung besitzen. Die Anzahl der Chromosomen mit diesen sekundären Einschnürungen war dabei immer ähnlich zu der Anzahl der Nucleoli im Nucleus am Schluss der Zellteilung. Zugleich schien die Entfernung der Einschnürung von Zentromer den Ort der Nucleoli im Zellkern zu bestimmen. Da die Größe der Einschnürungen mit der Größe der Nucleoli korrelierte und ein mehrfacher Chromosomensatz zu dementsprechend mehr Nucleoli führte, war der Schluss gerechtfertigt, dass Nucleoli nur an Chromosomen mit sekundären Einschnürungen entstehen. [Hei31] Es etablierte sich für diese Einschnürungen der Begriff der „Nucleolar Organizer Bodies“, die heute NOR genannt werden (englisch: Nucleolar Organizer Region) (vgl. Abb. 2.4, links).

Die Funktion dieser Region konnte erst zwischen 1960 und 1970 aufgeklärt werden, als man herausfand, dass die rRNA in den Nucleoli synthetisiert wird [Bro64]. Man konnte mit Hilfe von radioaktiv markierter rRNA zeigen, dass rRNA an den sekundä-

ren Einschnürungen der fünf akrozentrischen Chromosomen des Menschen (Chromosom 13, 14, 15, 21 und 22, Zentromer eher am Ende der Chromosomenarme) hybridisiert [Rit65; Hen72] und sie vorzugsweise im Nucleolus erzeugt wird [Per62; McC64]. Hierdurch war bewiesen, dass rRNA in den Nucleoli gebildet wird und die für rRNA kodierenden Gene, auch rDNA genannt, an den NOR sitzen (vgl. Abb. 2.4). Der Nucleolus bildet sich nur um aktiv transkribierte NOR, wobei ein oder mehrere NOR zu einem Nucleolus beitragen können [Sav01]. In menschlichen HeLa Zellen sind dabei im Schnitt etwa 6 NOR aktiv, die sich auf etwa drei Nucleoli aufteilen [Her10]. Der Anteil der rDNA am gesamten menschlichen Genom wird dabei auf bis zu 0,5 % geschätzt [Stu09; vSl15].

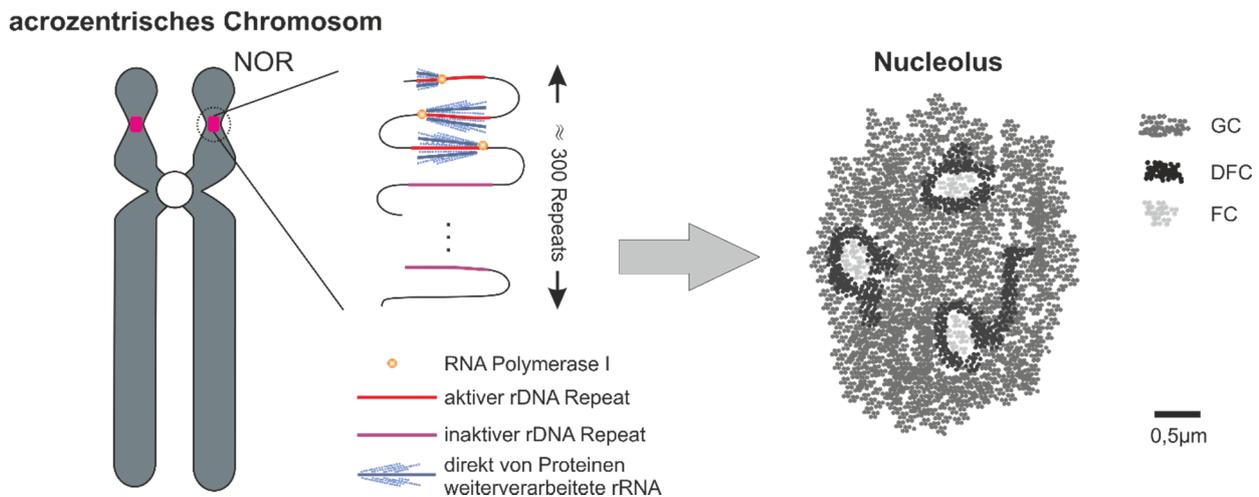


Abb. 2.4: Der Nucleolus entsteht an aktiven „Nucleolar Organizer Regions“ (NORs), die sich in menschlichen Zellen auf den akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21, 22) befinden.

(links): Aktive NOR kennzeichnen sich bei kondensierten Chromosomen durch sekundäre Einschnürungen in diesen Bereichen, die nach Silber-Färbung oder DNA-Färbung sichtbar werden. Durch zusätzliche FISH-Färbung, können die rDNA-Regionen sichtbar gemacht werden (rot).

(Mitte): Dabei besteht der Bereich aus etwa 300 sich wiederholenden rRNA kodierenden Sequenzen (rDNA Repeats). Aktive Repeats von der RNA Polymerase I abgelesen werden. Die entstehende rRNA wird direkt weiterverarbeitet, wodurch die Transkription an isolierter rDNA nach Uranylacetatfärbung von Nucleinsäuren unter dem Elektronenmikroskop als Christbaumstruktur, sogenannte Miller-Spreads, sichtbar wird.

(Rechts): In der Zelle führt dies zu der typischen Struktur des Nucleolus, wie sie z.B. unter dem Elektronenmikroskop zu sehen ist. Es ist das fibrillare Zentrum (FC) erkennbar, das von der dichten fibrillären Komponente teilweise umschlossen wird (DFC). Alles ist in die granuläre Komponente eingebettet (GC). Dabei können mehrere NOR zu einem Nucleolus beitragen. Maßstabsbalken 0,5 µm.

Bilder in Anlehnung an [Mil69; Boi07; Her10]

In den späten 1960ern gelang es, den Transkriptionsvorgang und die Verarbeitungsmaschinerie mit dem Elektronenmikroskop (EM) an dem Nucleolus entnommenen und isolierten DNA-Strängen zu beobachten [Mil69]. Hier wurde deutlich, dass die rDNA aus mehreren, sich wiederholenden rRNA kodierenden Sequenzen besteht, den sogenannten rDNA Repeats, an denen die Transkriptionsmaschinerie rRNA erzeugt, die sogleich weiterverarbeitet wird (Abb. 2.4, Mitte). Die Anzahl der rDNA-Repeats in einer NOR liegt in der Größenordnung von 300. Eine Sequenz besitzt dabei eine Länge von etwa 43 000 Basenpaaren (43 kbp), die die 5,8S-, 18S- und 28S-rRNA kodiert.

In der Zelle führt die Konzentration dieser Kopien auf einen Ort zu der typischen Nucleolusstruktur. Dabei unterscheidet man im Nucleolus folgende Bereiche, die sich in der Struktur und Farbintensität unter dem EM unterscheiden: Das fibrillare Zentrum (FC für englisch: fibrillar center), die dichte fibrillare Komponente (DFC für englisch: dense fibrillar component) und die granulare Komponente (GC für engl.: granular component). Die FC zeichnen sich dabei als deutliche, feinfaserige Bereiche aus, deren Größe von 0,1-1 μm variiert. Sie sind teilweise von einem dichten Bereich, dem DFC, umgeben, das einen hohen Kontrast aufweist. Alles ist in das lose GC eingebettet, dessen Körner etwa einen Durchmesser von 15-20 nm besitzen (vgl. Abb. 2.4, rechts). Es hat sich herausgestellt, dass aktive RNA Pol I am Übergang des FC zu DFC lokalisiert ist und dort die rDNA transkribiert wird [Hoz94; Cma00]. Die ersten Verarbeitungsschritte der rRNA finden in der DFC statt und die Späten in der GC [Big89; Puv97]. In den FCs befinden sich die nichttranskribierten DNA-Abschnitte, der RNA Pol I-Komplex und weitere Teile der Transkriptionsmaschinerie [Goe84]. Größe und Anzahl der FCs hängen dabei stark mit der Aktivität der Transkription zusammen [Der93], wobei vermutet wird, dass sich die FCs entfalten, da mehr Kopien der rDNA transkribiert werden [Och97].

2.1.2.2 Nucleoläre Proteine

Das Spektrum des nucleolären Proteoms (Gesamtheit aller Proteine im Nucleolus) umfasst etwa 700 unterschiedliche Proteine, deren Funktion und Zusammenspiel noch nicht gänzlich bekannt sind [Boi07].

Da in dieser Arbeit die Erkennung der Struktur des Nucleolus essentiell ist, sollen kurz drei Proteine erwähnt werden, die nach Anfärben die drei unterschiedlichen Nucleolusbereiche markieren. So befindet sich angefärbtes Fibrillarin, ein Enzym, das vermutlich die frühe rRNA mitverarbeitet, im Bereich des DFC. Färbt man Nucleophosmin (früher B23) an, dem verschiedene Funktionen, u.a. als Transporter für nucleoläre Proteine, zugesprochen werden [Sir08], bekommt man ein Signal im Bereich der GC. [Och97]

Betrachtet man gefärbtes **UBF** (englisch: upstream binding factor), das an die rDNA gebunden die Bildung sekundärer Einschnürungen unterstützt [Gro14] und dessen Binden an den rDNA-Promoter erst RNA Pol I die Transkription ermöglicht [Ste13], erkennt man die FCs im Nucleolus.

40% des im Zellkern vorhandenen **Parp1** (Poly-ADP-Ribose-Polymerase I) befindet sich im Nucleolus. Diese Prominenz ist ein Grund für die Vermutung, dass Parp1, neben einer Rolle in der DNA-Reparatur [God08; Lan13; Buc16], auch eine wesentliche Rolle bei der rRNA-Synthese spielt [Cal13].

2.1.2.3 Stressantwort des Nucleolus

Der Nucleolus reagiert stark auf Stress. So kann beispielsweise Nährstoffmangel zu einer Verminderung der Transkription aktiver rDNA-Gene und damit zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstum führen [Bou10; Hei13]. Dabei kann sich eine geringe Transkriptionsaktivität im Nucleolus schon vorher durch Verkleinerung der FCs äußern [Der93]. Auch Sauerstoffmangel (Hypoxie) oder virale Infektionen können zu einer Unterdrückung der rRNA-Synthese führen [Bou10].

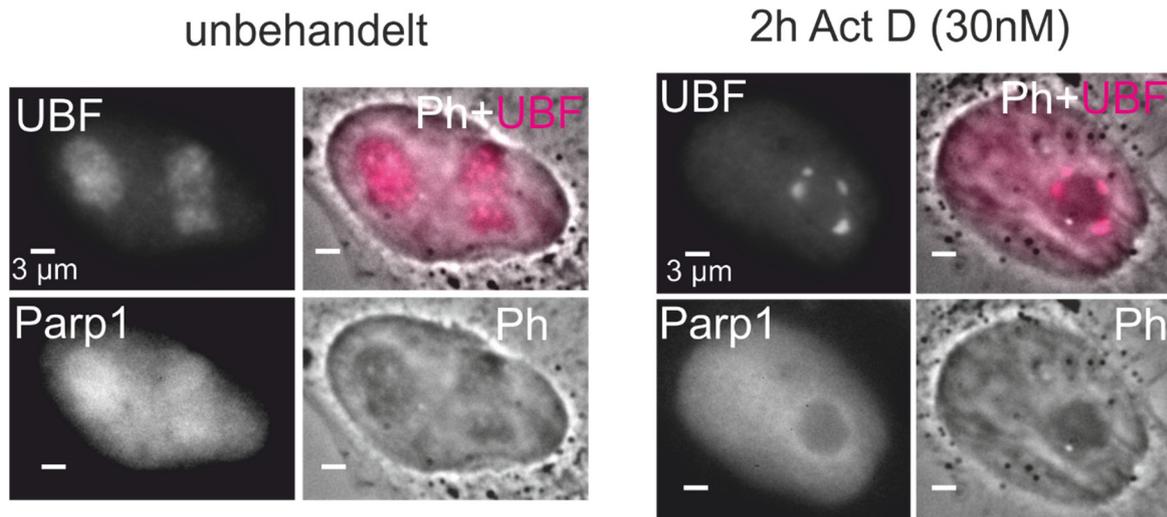


Abb. 2.5. Proteinumverteilung in HeLa-Zellen nach Unterdrückung der RNA Pol I-Transkription. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen mit angefärbtem UBF und Parp1, und Phasenkontrastaufnahmen der Zellen (Ph). Oben ist das Phänomen der nucleolären Segregation am gefärbten UBF-Protein gezeigt. Das bei der unbehandelten Zelle über den Nucleolus verteilte UBF (links), bildet nach 2 h Actinomycin-D-Behandlung nucleoläre Kappen (rechts). Dieser Effekt ist auch bei anderen Proteinen wie Fibrillarin und RNA Pol I-Untereinheiten zu beobachten.

Ein weiterer durch das Stoppen der Transkription hervorgerufener Effekt ist das Verschwinden des Parp1-Proteins aus dem Nucleolus. Hier spricht man von „Nucleolar Disruption“. Maßstabsbalken 3 µm.

Zwei weitere Effekte zeigen sich im Nucleolus durch Umverteilung von Proteinen. Setzt man Zellen Chemotherapeutika oder UV-Strahlung aus, kann man die Freisetzung von Proteinen aus dem Nucleolus in das Nukleoplasma beobachten (sog. „Nucleolar Disruption“). Das kann bei bestimmten Proteinen zu einer Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 führen und damit auch zum Zelltod (Apoptose) oder einem G1-Arrest [Rub03]. Des Weiteren ist bei Unterdrückung der Transkription durch die RNA Polymerase I, eine Umverteilung der nucleolären Komponenten zu beobachten, die sogenannte „Nucleolar Segregation“. Dabei kondensieren und separieren die FCs und die GC und formen nucleoläre Kappen („nucleolar caps“) um den verbliebenen Nucleolus [Sha05]. Dies kann ebenfalls über eine Aktivierung von p53 zur Apoptose führen [Fra05; Cho09]. Die Unterdrückung der rRNA-Transkription kann mit Hilfe von Chemikalien, wie Actinomycin D (Act D), hervorgerufen werden, dies kann zu einer „Nucleolären Disruption“ und „Nucleolären Segregation“ führen (vgl. Abb. 2.5).

Diese Effekte werden auch nach Behandlung mit weiteren Chemikalien, Hitze oder unter Hypoxie beobachtet, wodurch dem Nucleolus neben der Erzeugung ribosomaler Bausteine auch eine Rolle als Stresssensor zugeschrieben wird [Rub03; Bou10]. Ebenso gibt es erste deutliche Hinweise, dass DNA-Schäden im Nucleolus auch zu solchen Umverteilungen führen. Jedoch beruhen die Experimente auf UV-Laserbestrahlungen [Kru07; Cal13; Lar14], wodurch weder die Art, noch das Ausmaß der Schäden näher definiert ist. Nach Röntgenbestrahlung konnten sie nur in Mauszellen beobachtet werden [Kru07; Cal13]. Bei einer anderen Vorgehensweise wurden mit Hilfe von Enzymen gezielt DNA-Doppelstrangbrüche in der rDNA erzeugt, die zu einer Reorganisation im Nucleolus geführt haben [vSl15; War16; Fra16]. Die Auswirkungen dieser lokalen Schäden in der rDNA und die Signalwege sind aber immer noch größtenteils unbekannt.

2.2 DNA-Schäden und DNA-Reparatur

Da die DNA zur Weitergabe genetischer Information essentiell ist und im Gegensatz zu Proteinen, Enzymen und RNA nur in wenigen Kopien vorliegt, wirkt sich ihre Schädigung am stärksten für die Zelle aus. Neben spontanen Mutationen, verursachen besonders äußere biologische, chemische oder physikalische Einflüsse Änderungen der DNA.

Physikalische Einflüsse beschreiben dabei Schäden, die beispielsweise durch ionisierende Strahlung oder UV-Strahlung in der DNA erzeugt werden. In dieser Arbeit sollen Schäden besonders durch dicht ionisierende Ionen hervorgerufen werden, deren Natur und Auswirkung im folgenden Kapitel näher besprochen wird. Da in der Biologie oft UV-Laser genutzt werden, um lokal Schäden in der Zelle hervorzurufen, werden ihre charakteristischen Schäden auch vorgestellt, um den Unterschied zur Ionenbestrahlung zu verdeutlichen.

2.2.1 Strahleninduzierte DNA-Schädigung

2.2.1.1 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Teilchen, wie γ -Quanten, Elektronen und hochenergetische Ionen, wirken hauptsächlich durch Wechselwirkung mit der Elektronenhülle der Atome oder Moleküle des Targetmaterials. Dabei können Elektronen aus der Hülle geschlagen werden (Ionisation), die bei ausreichender Energie wiederum Ionisationsereignisse hervorrufen können. Prinzipiell können dadurch an der DNA Basenschäden, Zuckerschäden, Verlinkungen der Leitersprossen (Crosslink), Zuckerverluste, Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche (DSB) und Schadenscluster entstehen. Ein Teil der Schäden ist in Abb. 2.6 dargestellt.

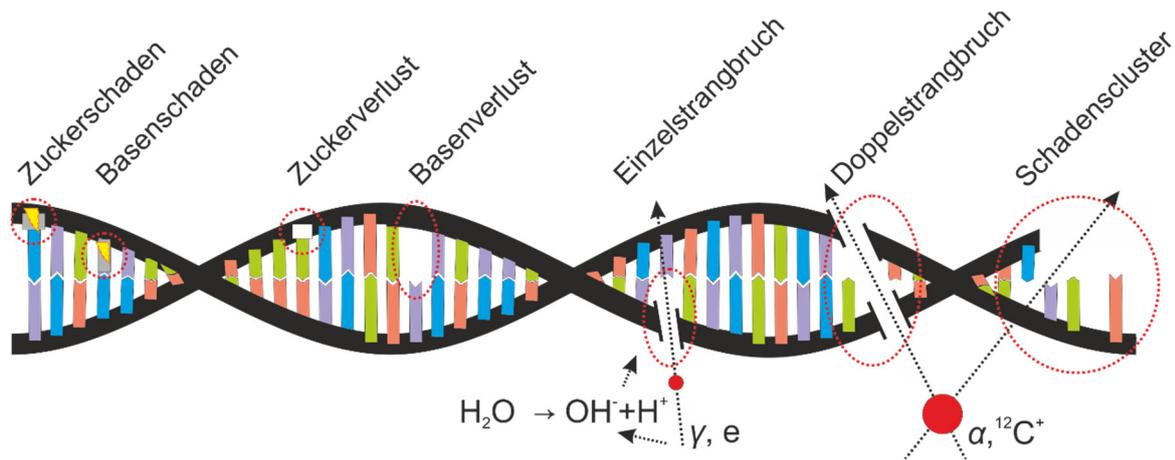


Abb. 2.6: Schäden an der DNA, die durch direkte und indirekte Ionisationsereignisse mittels ionisierender Teilchen oder Radikale erzeugt werden können. Während leichte Schäden von Zucker- über Basenschäden und Einzelstrangbrüche eher von locker ionisierenden Teilchen, z.B. Röntgenquanten γ oder Elektronen (e), und Radikale erzeugt werden, führen dicht ionisierende Teilchen, wie α -Teilchen oder ^{12}C -Ionen, vermehrt zu schweren Doppelstrangbrüchen und Schadensclustern.

Liegen die Ionisationsereignisse im Bereich der DNA vor, so spricht man von einer direkten Schädigung der DNA. Jedoch kann die Ionisation von Wasser zu einer Radikalbildung führen, die wiederum chemisch die DNA schädigen kann. Bei locker ionisierender Strahlung mit einer geringen Ionisationsdichte, wie Röntgenstrahlung oder Elektronen, ist die direkte DNA Schädigung eher gering. So werden hierdurch häufiger Einzelstrangbrüche, Basen- oder Zuckerschäden erzeugt. Die Zahl der Einzelstrangbrüche bei Röntgenstrahlung pro Gy ist im Bereich von 10^3 [Pri99]. Diese Schäden können meist leicht und fehlerfrei vor, bei oder nach der Replikation repariert werden, da der gegenüberliegende DNA-Strang die fehlende Base vorgibt. Bei einer Dosis von 1 Gy kommt es aber auch zu etwa 35 Doppelstrangbrüchen [Fri95; Kra98]. Bei höheren Dosen kommt zu dem linearen Anteil der 35 DSB/Gy ein zusätzlicher quadratischer Anteil hinzu, der die Fusion von zufällig nah (weniger als 25bp) beieinanderliegenden Einzelstrangbrüchen zu einem DSB berücksichtigt [vdS73]. Dieser Term erklärt auch, warum es bei dicht ionisierenden Teilchen, wie α -Teilchen oder Kohlenstoffionen, vermehrt zu Doppelstrangbrüchen oder größeren Schadensclustern aus verschiedenen Schäden kommt. Sie sind wesentlich schwieriger zu reparieren und ihre Reparatur hat eine größere Fehleranfälligkeit. Dadurch treten biologische Effekte, wie z.B. Zelltod oder Chromosomenaberrationen (fälschlicherweise verknüpfte Chromosomen) bei dicht ionisierende Strahlung auch überproportional auf, was sich in dem RBE-Faktor widerspiegelt [Pri01; Hau04]. Dieser Faktor gibt das Verhältnis der Röntgendosis für den gleichen biologischen Effekt zu der verwendeten Bestrahlungsdosis an und liegt für das Zellüberleben bei α -Teilchen mit einem LET von ca. $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ zwischen 3 und 8 [ICRP58].

2.2.1.2 UV-Strahlung

UV-Strahlung (UV-A, UV-B und UV-C), hat eine Wellenlänge von 100-400 nm. Diese Wellenlängen entsprechen Photonenenergie von 3-12 eV und reichen damit nicht aus, direkt Wasser und damit etwa Gewebe zu ionisieren, wofür etwa 12,5 eV nötig sind. So werden

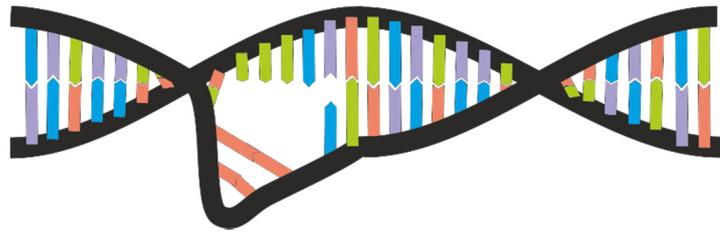


Abb. 2.7: Prymidindimer aus Thyminbasen in der DNA, das der spezifische von UV-Strahlung induzierte DNA-Schaden ist. Bei misslungener Replikation oder Reparatur können Einzel- oder Doppelstrangbrüche entstehen.

nur sehr selten direkte Strangbrüche durch UV-Strahlung erzeugt. Jedoch können Molekülverbindungen verändert werden. So bilden sich häufig Prymidindimere, die sich durch Verbinden nebeneinander liegender Thymin- oder Cytosinbasen bilden und ein exklusives Merkmal für von UV-Strahlen erzeugten DNA Schäden sind (Abb. 2.7). Sie verformen die DNA so stark, dass Replikation und Transkription an diesen Stellen beeinträchtigt werden. Erst durch den Versuch der Reparatur oder einer missglückten Replikation, kommt es dann zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. [Kri09; Kie12; Bou14a]

Diese Ausführung soll hervorheben, dass es sich bei Schäden durch UV- bzw. ionisierender Strahlung initial um komplett unterschiedliche Schadensarten handelt. Sie können aber beide in Einzel- und Doppelstrangbrüchen enden, wodurch die zwei Bestrahlungsarten schnell als wirkungsgleich angesehen werden. Kritisch ist zudem zu bemerken, dass die von UV-Bestrahlungen in der Zelle applizierte Dosis in der Regel nicht bekannt ist und man sich darauf beschränkt nur die Belichtungsintensität in J/m^2 anzugeben. Dies liegt in der Natur der Sache, da die Absorption des UV-Lichts von deutlich mehr und schwieriger zu spezifizierenden Faktoren abhängt, wie z.B. Medium-/Zellzusammensetzung und Medium-/Zellhöhe. Speziell unbekanntes Reflexionsverhalten an Grenzschichten, wie Luft/Medium oder Medium/Zelle, erschwert die Charakterisierung der Absorption der Zelle und damit der darin applizierten Dosis zusätzlich. So ist ein direkter Vergleich von Effekten, die durch UV-Bestrahlung hervorgerufen werden, mit denen von ionisierender Strahlung nicht möglich.

2.2.2 DNA-Reparatur und die wichtigsten Reparaturproteine

2015 wurde der Nobelpreis für Chemie an die Forscher Tomas Lindahl, Paul Modrich und Aziz Sancar für ihre Arbeiten zur DNA-Reparatur verliehen. In ihrer Forschung zur Basen-, Nukleotidexzisions- und Basenfehlpaarungsreparatur gewannen sie grundlegendes Wissen über die DNA-Reparatur. Durch Ausnutzen des komplementären, intakten Einzelstranges ermöglichen diese Mechanismen der Zelle einfache Schäden wie DNA-Einzelstrangbrüche und Basenfehler leicht und meist fehlerfrei zu reparieren. Dies ist essentiell zum Erhalt der Integrität des Erbguts jedes Lebewesens. Die Preisvergabe an dieses Gebiet der Grundlagenbiologie spiegelt wieder, welchen

Stellenwert man dieser Forschung speziell für das Verständnis der Entstehung von Krebs zuschreibt, die inzwischen zu der zweithäufigsten tödlichen Erkrankung zählt.

Bei Schäden durch ionisierende Strahlung treten aber eher DSB auf, die schwieriger zu reparieren sind. In der Zelle gibt es jedoch wichtige Reparaturwege, wie die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endenverknüpfung (NHEJ), so dass DSB nicht zwingend im Zelltod enden.

2.2.2.1 Homologe Rekombination

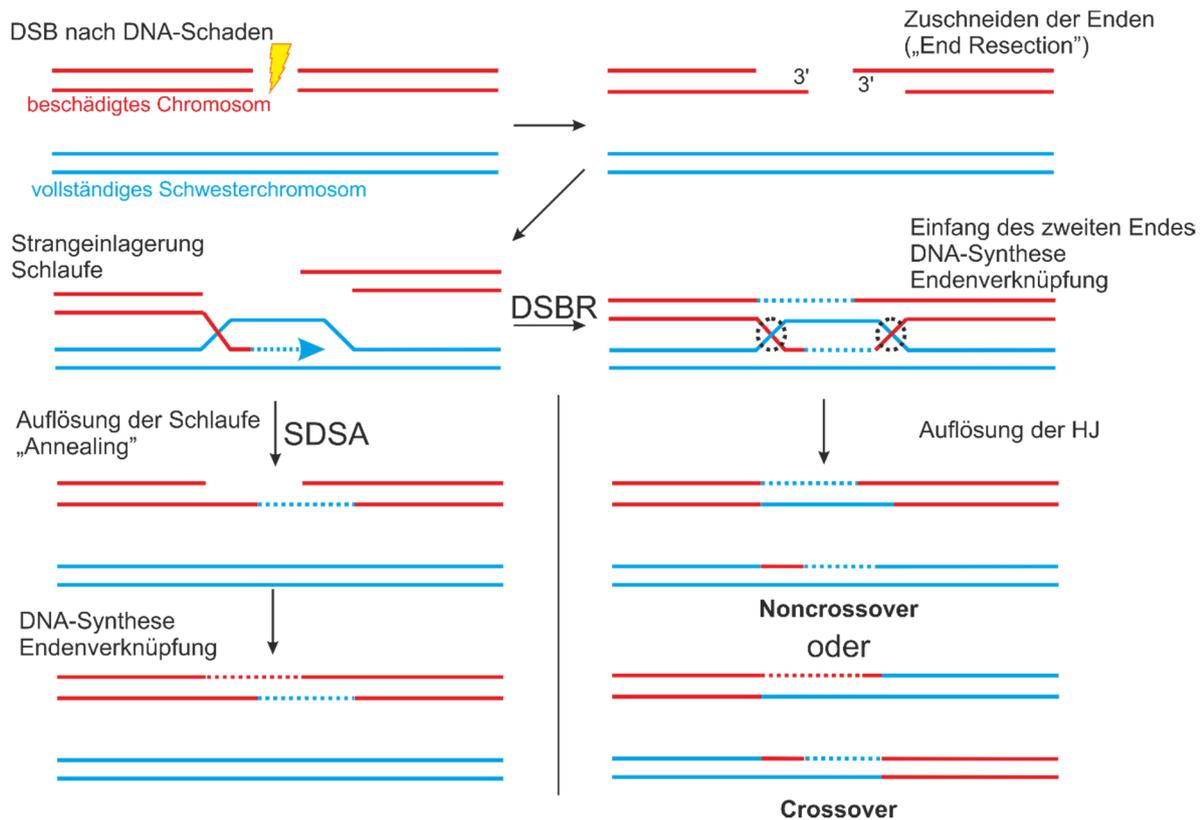


Abb. 2.8: Schema der Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruchs mittels homologer Rekombination. Nach der Erkennung des Doppelstrangbruchs (DSB), werden die Enden so zugeschnitten, dass längere 3'-Enden entstehen. Dies wird als „End resection“ bezeichnet. Anschließend wird eines der 3'-Enden in den homologen DNA-Doppelstrang eingelagert und die fehlende Sequenz neu synthetisiert. Bei dem anschließendem „synthesis-dependent strand annealing“ (SDSA), wird nur die eine Seite der beschädigten DNA mit Hilfe der homologen DNA repariert und nach dem Zusammenführen der Stränge des beschädigten DNA-Moleküls die zweite Seite in einem zweiten Schritt vervollständigt. Alternativ können auch beide Stränge der homologen DNA zum Vervollständigen beider beschädigten Seiten genutzt werden. Bei diesem Vorgehen, dem „double-strand break repair“ (DSBR), werden jedoch die zwei DNA-Moleküle verflochten. Diese Kreuzungen, sogenannte holiday junctions (HJ; schwarz gestrichelt), müssen zum Entflechten zerschnitten werden. Je nach Schnittausrichtung werden dabei nur kleine Teile der beiden DNA-Moleküle ausgetauscht („Noncrossover“) oder es entstehen zwei neue DNA-Moleküle, die eine Mischung der beiden ursprünglichen DNA-Moleküle darstellen („Crossover“). [San08; Har09]

Die homologe Rekombination (HR) tritt hauptsächlich in der S und G2-Phase der Zelle auf. Hier wird ausgenutzt, dass mit dem Schwesterchromatid eine Kopie des beschä-

digten Chromatids (homologe DNA) vorliegt, das als Vorlage für eine fehlerfreie Reparatur genutzt wird. Zusätzlich können in stark repetitiven DNA-Bereichen auch kurze homologe DNA-Sequenzen desselben Chromatids genutzt werden, wodurch HR vermindert auch in anderen Zellzyklusphasen auftreten kann. Entsteht nun ein Doppelstrangbruch werden die Enden detektiert und so zurechtgeschnitten, dass einzelsträngige Schwänze mit 3'-Enden entstehen. An diesen formiert sich die Maschinerie der HR und ermöglicht nun eines der Enden an den Strang der homologen DNA zu legen, um dann die fehlende Sequenz, nach der Vorlage des homologen DNA-Strangs, wieder anzuhängen. Ist dies geschehen kann der reparierte Strang wieder gelöst werden und zur Vervollständigung der zweiten beschädigten Seite genutzt werden. Bei diesem Vorgehen spricht man von „synthesis-dependent strand annealing“. Alternativ kann auch durch Kreuzen des zweiten Endes mit der anderen Seite des homologen DNA-Moleküls, die Ergänzung der fehlenden Sequenzen auf beiden Seiten gleichzeitig erfolgen, das sog. „double-strand-break repair“ (DSBR). Da bei dieser Methode nach der Vervollständigung die zwei DNA-Moleküle miteinander verflochten sind, müssen die zwei Kreuzungen, sogenannte „holiday junctions“, erst auseinander geschnitten werden. Je nachdem wie der Schnitt orientiert ist, erhält man die zwei ursprünglichen DNA-Moleküle mit kurzen ausgetauschten Sequenzen oder es entstehen zwei DNA-Moleküle, bei denen jeweils eine Seite von der Doppelhelix der ursprünglich beschädigten DNA und die andere von der homologen DNA vermischt sind. Diese Phänomene werden als „Noncrossover“ bzw. „Crossover“ bezeichnet. [San08; Har09]

2.2.2.2 Nicht-homologe Endenverknüpfung (NHEJ, engl.: non-homologous end-joining)

Ist keine Kopie der DNA vorhanden, kann die Zelle nur noch mittels „non-homologous end joining“ den Doppelstrangbruch reparieren. Hier werden die Enden von einem Proteinkomplex aus Ku70/Ku80 erkannt, der die Enden auch zusammenhält. Durch das Binden des Komplexes werden andere Proteine zum Zuschneiden und zusammenfügen der Enden rekrutiert. Bei dieser Bearbeitung kann es leicht zu Basenverlusten kommen, die nicht mehr wiederhergestellt werden. Somit ist dieser Reparaturweg zwar schnell und einfach, jedoch kommt es hier leichter zu Veränderungen im Erbgut. [Cah06; Har09]

2.2.2.3 Wichtige Proteine der DSB-Reparatur

Die in die Reparatur eingebundenen Proteine, die den DNA-Schaden markieren, fixieren und reparieren, sind zahlreich. Die genauen Zusammenhänge und Abhängigkeiten bei dem Zusammenspiel der Proteine sind höchstkomplex und auch noch nicht komplett verstanden. Es sollen aber im Folgenden die Proteine vorgestellt werden, die in dieser Arbeit verwendet und deren Anlagerung an einem erzeugten DSB untersucht oder genutzt wird:

γ H2AX: Als Chromatin liegt die DNA-Doppelhelix um Histonkerne gewickelt in der Zelle vor. Ein Bestandteil dieser Kerne ist das Histon H2A. Die Isoform des H2A, H2AX,

tritt in etwa 5-25% der Histonkerne auf [Gig11]. Kommt es zu einem DSB werden die H2AX-Histone in der Umgebung phosphoryliert, welche einen Bereich von mehreren Megabasenpaaren umfasst. Die phosphorylierte Form nennt man γ H2AX und kann mittels Immunfluoreszenzfärbung unter dem Mikroskop als strahleninduzierter Focus beobachtet werden. Da sie mit den meisten anderen Proteinen der DNA-Reparatur kolokalisieren, wird davon ausgegangen, dass sie als Andockstelle für diese Proteine dienen und die Reparatur dadurch effektiver machen. [Cah06; Har09; Gig11]

Die beiden Zellzyklus-Checkpoint-Faktoren **MDC1** („mediator of the damage checkpoint 1“) und **53BP1** („p53 binding protein“) akkumulieren ebenfalls wie γ H2AX an DSB. Sie rekrutieren auch Reparaturproteine zu den Schadensorten und sind dafür verantwortlich, dass Zellen in einem Zellzyklus verharren bis der DNA-Schaden behoben ist. [Har09; Gig11]

2.2.2.4 Chromosomenaberrationen als Folge misslungener DNA-Reparatur

In der G1-Phase unvollständig oder falsch reparierte DSB können während der Zellteilung als sogenannte Chromosomenaberrationen sichtbar werden. Da dadurch teilweise DNA-Enden unterschiedlicher DSB desselben Chromosoms oder unterschiedlicher Chromosome fusionieren, unterscheidet man zwischen intrachromosomaler und interchromosomaler Aberration. Die dabei auftretenden chromosomalen Anordnungen sind vielfältig und es soll sich hier auf die Beschreibung der einfachsten Formen beschränkt werden (Abb. 2.9). In einer Form der intrachromosomalen Aberrationen wird ein abgespaltenes Chromosomenstück nicht mehr eingebaut. Das resultiert in einer Verkürzung des Chromosoms und man spricht von Deletion. Das übriggebliebene Teilstück wird als azentrisches Fragment (da ohne Zentromer) bezeichnet.

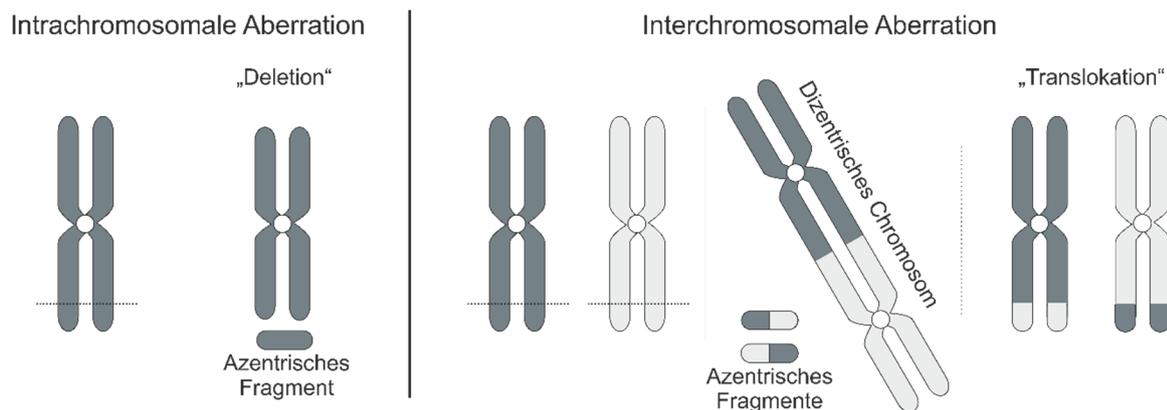


Abb. 2.9: Auswahl an Chromosomenaberrationen, die nach nicht reparierter DSB in einem einzelnen (intrachromosomal) oder in zwei Chromosomen (interchromosomal) auftreten können.

Interchromosomale Aberrationen können in Chromosomen mit zwei Zentromeren (dizentrisch) in Verbindung mit einem azentrischen Fragment resultieren. Alternativ werden die Chromosomen vermischt, sogenannte Translokation, wobei wieder zwei „normale“ Chromosomen mit einem Zentromer entstehen.

Die azentrischen Fragmente gehen bei der Zellteilung aus den Zellkernen verloren und können als sogenannte Mikrokerne in den Tochterzellen erhalten bleiben. Die Anzahl dieser Mikrokerne ermöglicht die Quantifizierung des genetischen Schadens, der durch einen schädlichen Einfluss hervorgerufen wird. Dieser Test wird als Mikrokern-test bezeichnet. In dieser Arbeit soll speziell der Zytokinese-Block-Mikrokern-test genutzt werden, um den strahleninduzierten genetischen Schaden nach gezielter Nucleolusbestrahlung zu untersuchen. Hier wird die Teilung der äußeren Zellmembran unterdrückt, wodurch doppelkernige Zellen entstehen, die eventuell zusätzlich erzeugte Mikrokerne enthalten, so dass man die Mikrokernrate pro nach Bestrahlung teilender Zelle bestimmen kann.

2.3 Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung strahlenbiologischer Phänomene

Zur Visualisierung von Proteinverteilungen während der DNA-Schadensreparatur hat sich die Fluoreszenzmikroskopie als Methode der Wahl etabliert. Hier markiert man eine oder mehrere Strukturen oder Proteine, die untersucht werden sollen, gezielt mit je einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor). Regt man diese Farbstoffe mit einer bestimmten Wellenlänge an, leuchtet es in dem charakteristischen Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes zurück. Trennt man nun dieses Licht mit Hilfe von Farbfiltern, kann man speziell das Signal der zu untersuchenden Struktur oder Proteinverteilung beobachten. Inzwischen haben sich zwei Methoden der Fluoreszenzmikroskopie etabliert.

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie wird das Anregungslicht durch eine Quecksilberdampfampe oder LEDs erzeugt und mit Hilfe von Farbfiltern definiert und die Probe damit belichtet. Das Emissionslicht des Farbstoffes wird ebenfalls mit einem Farbfilter selektiert und mit Hilfe einer Kamera kann direkt die Signalverteilung bestimmt werden.

Bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie wird die Probe mittels eines Lasers abgetastet, dessen Anregungswellenlänge auch z.B. durch sogenannte Bragg-Gitter gezielt gesteuert werden kann. Je Punkt wird im Bereich der Abregung des verwendeten Fluorochroms, der auch durch Filter oder Bragg-Gitter festgelegt wird, die Intensität mit Photomultipliern bestimmt. Durch Zusammensetzen der Intensitäten der verschiedenen Rasterpunkte erhält man danach wieder ein Bild.

Prinzipiell kann mit beiden Methoden bei optimalen Proben die gleiche Auflösung erreicht werden. Jedoch hat die konfokale Mikroskopie in der Praxis den Vorteil, dass durch das punktweise Abrastern eine sogenannte konfokale Blende eingebracht werden kann, so dass im wesentlichen nur Licht aus der Fokusebene gesammelt wird und man so nur Signale aus der gewünschten Fokusebene erhält. Bei der Epifluoreszenzmikroskopie von dreidimensionalen Proben kommt das aufgenommene Signal aus

mehreren Ebenen, kann aber mit Bildverarbeitungsmethoden nachträglich korrigiert werden. Dazu müssen jedoch mehrere Bilder mit geringem Fokusabstand in der Größenordnung der Tiefenauflösung gemacht oder alternativ mit einer strukturierten Beleuchtung die Probe abgerastert werden. Ist man an schnellen Überblicksbildern interessiert oder untersucht Proben, die schnell ausbleichen, ist die Epifluoreszenzmikroskopie im Vorteil. [Hab11]

Um nun Proteine oder Strukturen gezielt anzufärben, kann man drei Methoden unterscheiden. Dabei ist bei der Immunfluoreszenzfärbung und der Färbung nach dem „Click Chemistry“-Prinzip die Fixierung der Zellen nötig, wodurch nur der Zustand der Zelle beim Fixierungszeitpunkt wiedergegeben wird. Will man jedoch an einer Zelle den zeitlichen Verlauf einer Proteinverteilung verfolgen, muss man Zellen färben ohne sie vorher zu fixieren. Durch genetische Veränderung, sogenannte Transfektion, kann z.B. erreicht werden, dass Zellen von sich aus ein gewünschtes Protein mit einem angehängten Fluoreszenzprotein herstellen und dieses Protein beobachtet werden kann.

2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung zur Untersuchung von Proteinverteilungen in fixierten Zellen

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Antikörper genutzt, die gezielt an Zielproteine binden. Hierzu werden die Zellen meist mit PFA fixiert und ihre Membran mit Triton permeabilisiert, damit der Antikörper in die Zelle oder auch den Zellkern gelangen kann.

Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung ist der Antikörper fest mit einem Fluoreszenzfarbstoff fusioniert. Gibt man die Antikörper auf die Zelle, docken die Antikörper an das Zielprotein an, wodurch dieses dann dank des Fluorophors lokalisiert werden kann. Diese fusionierten Antikörper sind meist kommerziell erhältlich.

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung nutzt zwei Antikörper. Dabei dockt der primäre Antikörper gezielt an das Zielprotein an. Der sekundäre Antikörper besitzt die Fluorophore und wird so gewählt, dass er spezifisch an den gewählten primären Antikörper bindet. Diese Methode besitzt den Vorteil, dass für ein neues Zielprotein nicht für jede Farbe ein eigener Antikörper entwickelt werden muss, sondern nur ein spezifischer primärer Antikörper. Außerdem wird durch mehrere Bindungsstellen für den sekundären Antikörper an dem primären Antikörper das Signal verstärkt. Aufgrund der hohen Flexibilität wird die indirekte Immunfluoreszenzfärbung am häufigsten am Mikrostrahl SNAKE verwendet, um Proteinverteilungen oder ihre Anlagerung an DNA-Schäden der Zelle zu untersuchen.

2.3.2 Stabile Transfektion zur Untersuchung von Proteinverteilungen in lebenden Zellen

Mit der obigen Methode ist es wegen der Fixierung nicht möglich, in individuellen Zellen den zeitlichen Verlauf einer Proteinverteilung zu untersuchen. Der Fund eines

Gens in Quallen hat jedoch die Mikroskopie in dieser Hinsicht revolutioniert. Denn dieses Gen ist für die Erzeugung des selbst grün fluoreszierenden Protein GFP verantwortlich und es konnte gezielt an das Gen eines Zielproteins einer lebenden Zelle angehängt werden. Nach erfolgreicher Manipulation erzeugt die Zelle stabil eine grün fluoreszierende Form des Zielproteins, das dieselbe Funktion ausführt, wie das natürlich vorkommende Zielprotein. Man spricht bei diesem Vorgehen von Transfektion. [Tsi98] Durch zusätzliches Anhängen eines Gens für Antibiotika-Resistenz, wird durch Zugabe des Antibiotikums die Zellpopulation auf Zellen beschränkt, bei denen die Transfektion erfolgreich war.

3 Zielbestrahlung an SNAKE

Der Ionenmikrostrahl SNAKE (Supraleitendes Nanoskop für Angewandte Kernphysikalische Experimente) befindet sich an dem 14 MV Tandem-Van-de-Graf-Beschleuniger des Maier-Leibniz-Laboratoriums am Forschungszentrum Garching. Mit einem breiten Spektrum an hochenergetischen Ionen haben sich einzigartige Anwendungen etabliert. Einerseits Ionenstrahlanalytik, speziell die 3D-Wasserstoffmikroskopie in dünnen Materialien [Rei04], und andererseits die Ionenbestrahlung von biologischen Proben wie Zellen [Sch09; Hab09; Sch15], künstlichen Hautgewebemodellen [Sch10; Gir15a; Gir15b] und Mausmodellen [Gre11; Zlo14; Gir16].

Im folgenden Kapitel soll kurz der Mikrostrahl Aufbau für die Bestrahlung biologischer Proben und seine wesentlichen Eigenschaften beschrieben werden. Anschließend wird genauer auf den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Aufbau für die gezielte Ionenbestrahlung von zellulären Substrukturen von wenigen Mikrometern Größe und auf die Bestimmung der damit erreichten Zielgenauigkeit eingegangen.

3.1 Zellbestrahlungen an SNAKE

3.1.1 Mikrostrahl SNAKE

Abb. 3.1 zeigt die wesentlichen Komponenten des Ionenmikrostrahls SNAKE, der es ermöglicht mit einem Ionenstrahl von unter 1 μm Durchmesser abgezählte hochenergetische Ionen in einem beliebigen Punktmuster auf Zellproben zu bestrahlen.

Diese Eigenschaften sind wesentlich, um subzelluläre Strukturen gezielt mit einer definierten Ionenzahl, und damit Dosis, zu bestrahlen.

Die ersten wesentlichen Komponenten stellen Ionenquelle, Beschleuniger und 90°-Magnet dar, mit denen hochenergetische Ionen mit einer scharfen Energieverteilung erzeugt werden. Verschiedene Ionenquellen (u.a. MultiCusp für Protonen [Mos12] und Sputter-Quelle für schwere Ionen) stellen dafür ein breites Spektrum an einfach negativ geladenen Ionen (Protonen, Lithium-, Kohlenstoffionen, etc.) bereit. Mit einer kinetischen Energie von etwa 150 keV werden die Ionen in den Beschleuniger eingeschossen und durch die Terminalspannung von bis zu 14 MV zum positiv geladenen Terminal in der Mitte des Tanks beschleunigt. Dort streifen die Ionen Elektronen beim

Durchfliegen einer Kohlenstoffstripperfolie [Dol90] ab, wodurch positiv geladene Ionen mit Ladung $q = N \cdot e$, mit Ladungszustand N und Elektronenladung $e = 1,66 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ entstehen. Diese werden zum auf Erdpotential liegenden Tankende weiterbeschleunigt. Schließlich verlassen Ionen mit Energien von $E_{ion} = [U_{Vorberechnung} + (1 + N) \cdot U_{Terminal}] \cdot e$ den Tank, wobei in der Regel Terminalspannungen $U_{Terminal}$ von 5 – 13 MV in einem stabilen Betrieb möglich sind. Die breite Auswahl an Ionen und Energien ermöglicht es biologische Experimente mit einer breiten LET-Variation vom Niedrig-, Mittel- bis zum Hoch-LET (2 keV/ μm – 10 MeV/ μm) durchzuführen. Dabei ist die Randbedingung, dass die Reichweite der verwendeten Ionen ausreichen muss, die Zellen auch zu durchdringen. Durch den 90°-Magneten und das anschließende Schlitzsystem werden die Ionen nach dem gewünschten Ladungszustand selektiert. Die Energieverteilung der Ionen besitzt dabei eine Breite von unter $1 \cdot 10^{-4}$, was für eine Strahlaufösung von unter 1 μm essentiell ist [Dat02].

Mit den nächsten Hauptkomponenten aus Mikroschlitzsystemen und supraleitender Multipoltriplett-Linse wird der Ionenstrahl fokussiert. Die SNAKE-Objektschlitze schneiden den Ionenstrahl nach dem 90°-Magneten auf etwa $20 \times 10 \mu\text{m}^2$ und befinden sich etwa 30 m vor der supraleitenden Linse, die den Strahl asymmetrisch im Bereich von ca. 0,5 Meter fokussiert. Damit wird ein Abbildungsmaßstab des Objekts von etwa 1:100 in horizontaler „X“-Richtung und 1:25 in vertikaler „Y“-Richtung erreicht und der Strahl auf einen Strahldurchmesser von weniger als 1 μm verkleinert. Mit den SNAKE-Divergenzschlitzen wird der Ausleuchtungsbereich der magnetischen Linse auf den Bereich beschränkt, der den besten Kompromiss zwischen resultierender Ionenrate und Linsenaberrationen, und damit Strahlfleckgröße, bietet.

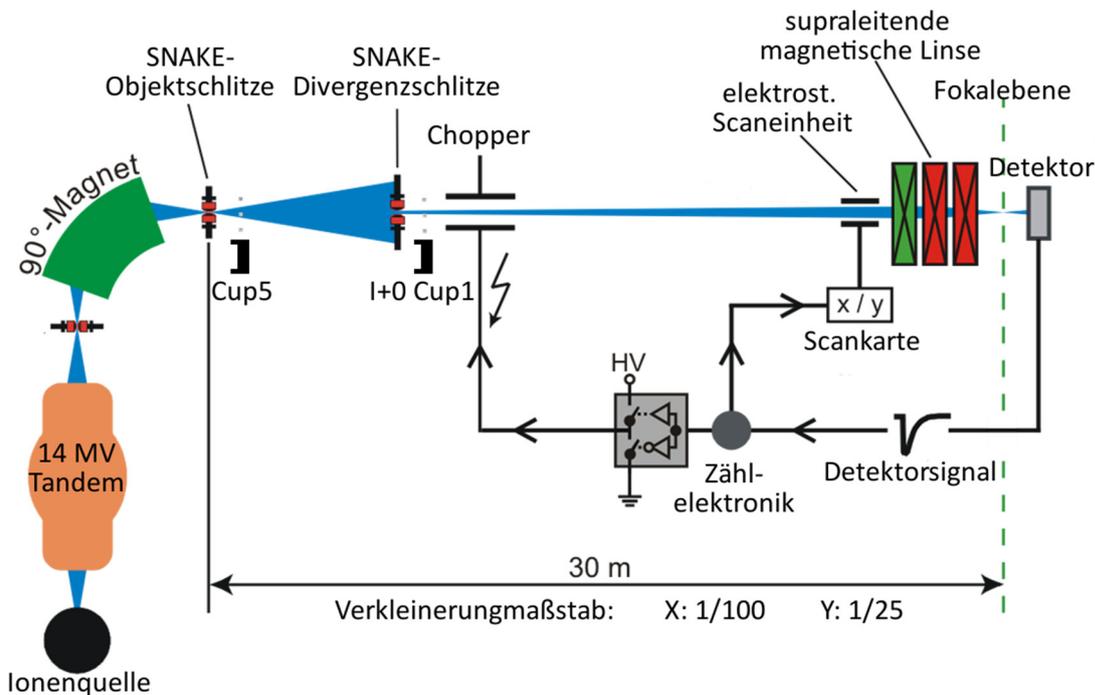


Abb. 3.1: Strahlführungsschema des Ionenmikrostrahls SNAKE am Maier-Leibniz-Laboratorium in Garching. Abbildung adaptiert aus [Hau06].

Die nächsten Komponenten dienen der Einzelionenpräparation. Für die Bestrahlung befinden sich die Proben in der Fokusebene der Multipol-Linse. Durch die hohen Ionenenergien, die der Tandembeschleuniger liefert, ist die Reichweite der Ionen in der Regel groß genug, um die Zellen zu passieren. Dadurch können die Ionen mit einem Detektorsystem hinter den Zellen detektiert und die erzeugten Signale von einer Zählerlogik gezählt werden. Bei Erreichen der gewünschten Ionenzahl wird ein Signal an den schnellen Strahlschalter, den sogenannten Chopper, gesendet, der innerhalb von $1 \mu\text{s}$ den Strahl vor der Probe stoppt.

Für die Bestrahlung eines beliebigen Punktmusters wird das Signal der Zählerlogik zusätzlich von einem Steuerrechner weiterverarbeitet. Mit Hochspannungsverstärkern (10/10B und PD08049, Trek Inc., USA), die mittels der PC-Steuerkarte (NI 6733, National Instruments Corporation, USA) angesprochen werden, werden Spannungen von bis zu $\pm 20 \text{ kV}$ an die Strahlablenkplatten (65 mm Länge, 20 mm Breite und 20 mm Abstand) angelegt, um den Strahl bei Bedarf an eine weitere Position auf der Probe zu lenken. Die Strahlablenkplatten vor der supraleitenden Multipollinse ermöglichen so den Strahl über ein Feld von $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ zu scannen, wobei zunehmende Einflüsse von Linsenfehlern limitieren.

Nach einer abgeschlossenen Bestrahlung dienen Faraday-Cups vor dem Chopper dazu, den Strahl für längere Zeit von der Probe abzuhalten, wodurch die Strahlenbelastung durch sekundäre Teilchen am Bestrahlungsplatz vermieden wird.

3.1.2 Bestrahlungsaufbau und LCI-Setup

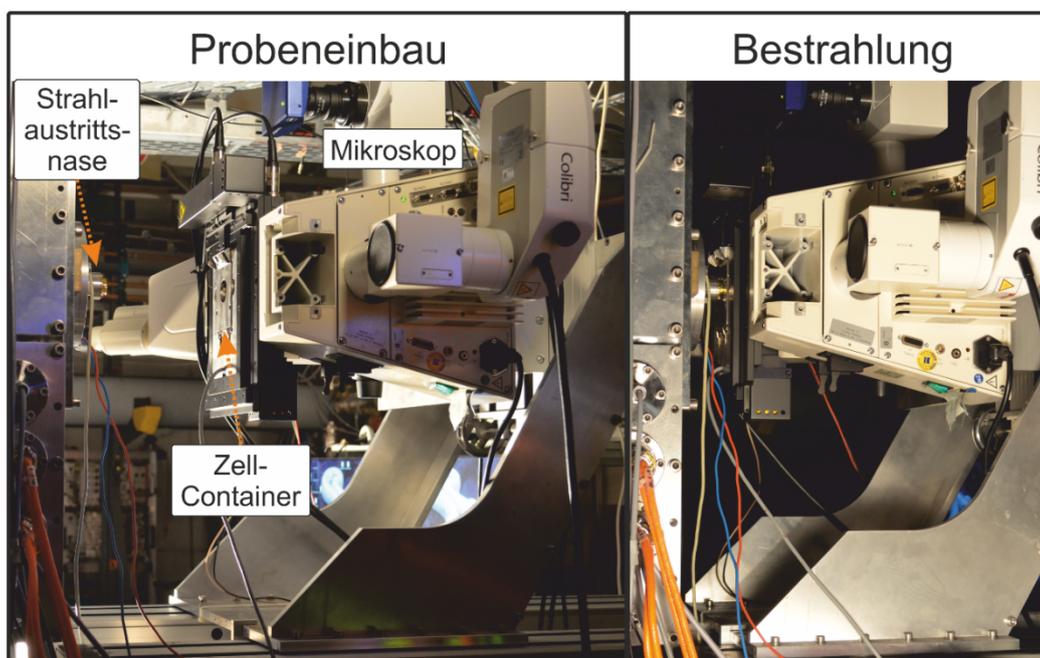


Abb. 3.2: Bestrahlungsaufbau für biologische Experimente von SNAKE bei Probeneinbau und Bestrahlung. Der fokussierte Ionenstrahl verlässt das Vakuum durch die Strahlaustrittsnase. In den motorisierten Mikroskoptisch des um 90° gekippten Mikroskops (Axiovert 200M) wird der Zellcontainer eingebaut (links). Zur Bestrahlung wird der Zellcontainer mit der Strahlaustrittsnase durch Verfahren des Mikroskops in Strahlrichtung auf Kontakt gebracht (rechts).

Für Zellbestrahlungen werden an SNAKE zwei Setups unterschieden. Zum einen der von Dr. Andreas Hauptner [Hau06] entwickelte konventionelle Zellbestrahlungsaufbau, der von Dr. Christoph Greubel [Gre13] u.a. für Koloniebildungstests erweitert wurde. Dieser wird in der Regel zur Ionenmikrobestrahlung von Zellproben im 5-20 min Takt genutzt, bei der Felder mit einem Durchmesser von bis zu 4 mm mit mehreren 10000 Zellen in regulären Mustern bestrahlt werden. Zum anderen gibt es den Lebendzellbeobachtungsaufbau (auch **Live Cell Imaging(LCI)**-Setup), der von Dr. Volker Hable entwickelt wurde. Dieser verbindet gute Lebensbedingungen für Zellen über mehrere Stunden mit einer hochauflösenden optischen Mikroskopie nahe des Abbe-Limits [Abb73] und einer Strahlfleckgröße auf Zellebene von weniger als 1 μm Durchmesser [Hab09; Hab11; Hab12; Gir13].

Im Folgenden soll der in Abb. 3.2 gezeigte Lebendzellaufbau näher beschrieben werden, da dieser Aufbau als Grundlage für die Zielbestrahlung dient. Eine Strahlaustrittsnase trennt mit einer 7,5 μm dicken Kaptonfolie das strahlführende Vakuum von der Atmosphäre und erlaubt den fokussierten Ionen mit nur geringer Streuung und Energieverlust das Vakuum des Strahlrohrs zu verlassen. Da die Zellprobe möglichst nah an der Kaptonfolie sein muss, wird für eine senkrechte Probenhalterung das verwendete Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss GmbH) um 90° gekippt. Dadurch kann zur Probenhalterung der elektrisch verfahrbare Mikroskoptisch des Mikroskops genutzt werden. Auf diesem kann die Probe in einen speziellen, beheizbaren Einsatz montiert und etwa 10 cm in horizontaler (X-) und 14 cm in vertikaler (Y)-Richtung auf wenige μm genau bewegt werden. Zum Probenwechsel befindet sich das Mikroskop etwa 30 cm von der Strahlaustrittsnase entfernt. Für die Bestrahlung wird das Mikroskop in Strahlrichtung so verfahren, dass die Strahlaustrittsnase mit der Probe in Kontakt ist und der Abstand zwischen Zellebene und der Kaptonfolie der Austrittsnase 20 - 35 μm entspricht. So hat der fokussierte Ionenstrahl nach Verlassen des Vakuums durch die 7.5 μm dünne Kaptonfolie, noch 4 μm Polypropylenefolie und 20 - 30 μm Medium zu durchdringen bis er auf die Zellen trifft. Durch diese kurze Strecke des Ionenweges bis zur Zelle wird die Strahlaufstreuung durch Kleinwinkelstreuung minimiert und weiterhin ein Strahlfleckdurchmesser von unter einem Mikrometer in der Zellebene erreicht [Hab09; Hab12]. Für schwere Ionen ist jedoch der Energieverlust in den Folien und dem Medium zu berücksichtigen. Beispielsweise erreichen die oft verwendeten 55 MeV Kohlenstoffionen letztlich mit einer Energie von 43 MeV die Zellebene und besitzen einen LET von etwa 363 keV/ μm .

Der sogenannte Lebendzellbeobachtungsaufbau (LCI-Aufbau, schematisch in Abb. 3.3) wird speziell für die Bestrahlung und zeitnahe Beobachtung lebender Zellen an SNAKE verwendet. Hierbei werden die Komponenten, die mit der Zellprobe Kontakt haben (Austrittsnase, Tischeinsatz und Objektiv) auf 37°C temperiert. In dem speziellen Zellcontainer sind die Zellen auch in vertikaler Ausrichtung immer mit Medium bedeckt. Dadurch können Zellen mehrere Stunden in dem Bestrahlungssetup bestrahlt und mikroskopiert werden [Hab11]. Dies ermöglicht mehrere Bestrahlungen

in einer Zellprobe sowie lange Beobachtungszeiten, wie z.B. die Untersuchung von Proteinrekrutierungskinetiken in Reparaturfoci und Fociauflösung [Hab12], sowie Messung der Focimobilität [Gir13].

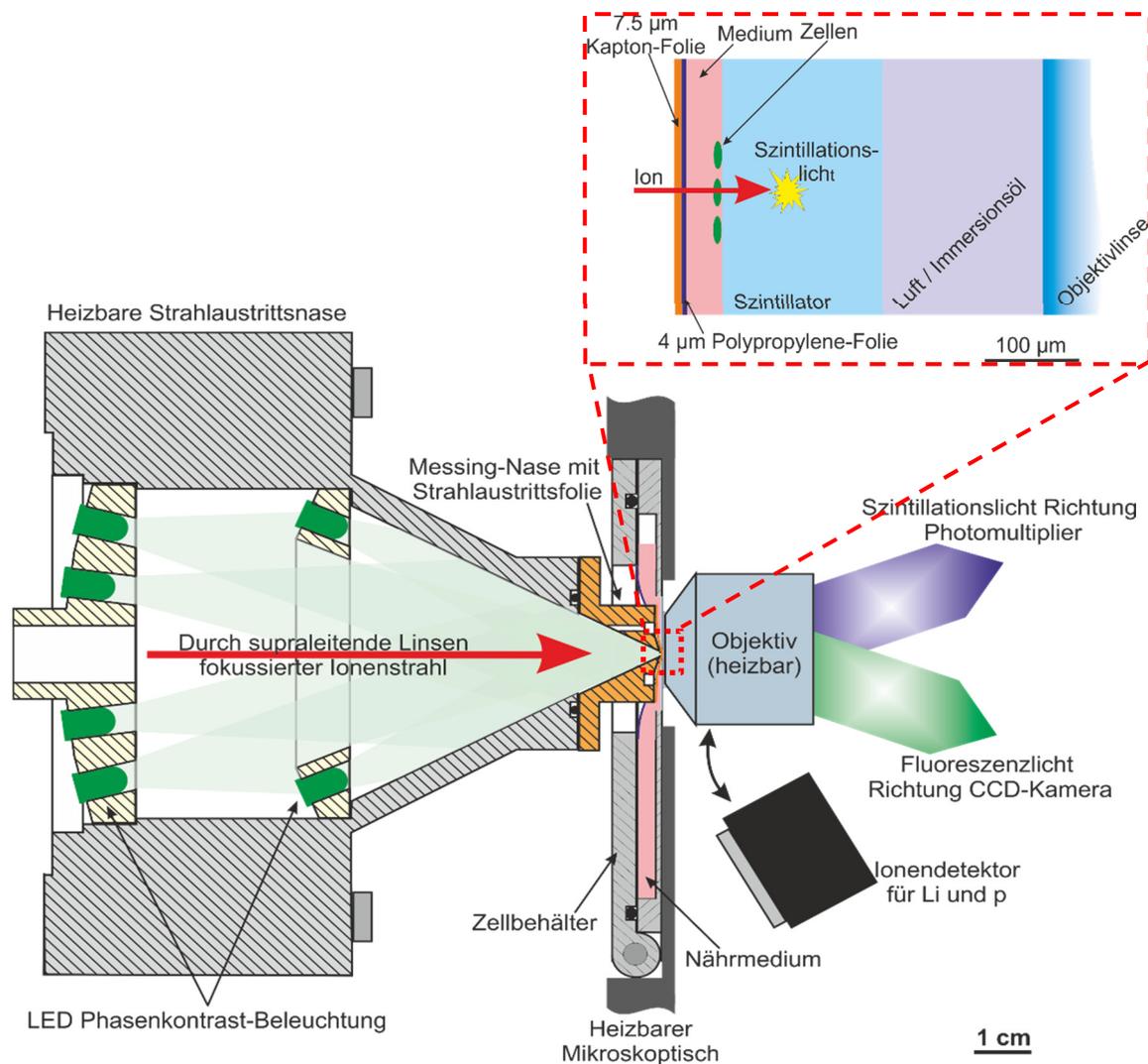


Abb. 3.3: Schema des Lebendzellbeobachtungs(LCI)-Setups an SNAKE. Die beheizte Strahlaustrittsnase befindet sich in Kontakt mit dem Zellcontainer, der in den beheizten Mikroskopisch eingebaut ist. Bei Bestrahlung müssen die fokussierten Ionen etwa $30\ \mu\text{m}$ durch Materie (Kapton-, Polypropylene-Folie und Medium) bis zu den Zellen zurücklegen. Die Zellen wachsen auf einem $170\ \mu\text{m}$ dicken transparenten Szintillator. Schwerere Ionen, wie z.B. Kohlenstoffionen, werden im Szintillator gestoppt und erzeugen dabei einen Lichtblitz. Das Licht zur Beobachtung der Zellen und Szintillationslicht zur Ionendetektion wird von dem Objektiv hinter den Zellen gesammelt. Für die Ionendetektion wird der Lichtweg im Mikroskop anstatt auf die Kamera auf den Photomultiplier gelenkt. Alternativ können leichte Ionen, die wie Protonen und Lithiumionen zu wenig Licht im Szintillator erzeugen, durch Tauschen des Objektivs gegen einen Ionendetektor detektiert werden. Abbildung teilweise adaptiert aus [Hab11].

Eine Schlüsselrolle in dem Setup spielt der als Zellsustrat verwendete Plastikszintillator (BC418, Saint Gobain crystals). Dieser ermöglicht die Detektion der üblicherweise im LCI-Setup verwendeten Kohlenstoffionen für die Einzelionenbestrahlung durch Weiterleiten des in ihm erzeugten Szintillationslichts über den Lichtweg des Mikroskops auf einen Photomultiplier. Durch die Ionendetektion hinter der Zellprobe

werden die Ionen in dem Szintillator gestoppt, wodurch die gesamte Energie im Detektor deponiert wird und damit die Detektionswahrscheinlichkeit nahezu 1 ist. Im Gegensatz zu anderen Detektionskonzepten, bei denen die Ionen vor den Zellen nachgewiesen werden und nur ein kleiner Anteil ihrer Energie in dem Detektor appliziert wird, vermeidet man hiermit einen Kompromiss zwischen detektionsbedingter Strahlaufstreuung und der Detektionswahrscheinlichkeit [Hei06]. Der Szintillator besitzt mit 170 μm eine ähnliche Dicke, und mit 1,58 einen ähnlichen Brechungsindex, wie Deckglas, welches bei kommerziellen Objektiven ein Bestandteil der Optik ist, und somit für hochauflösende optische Mikroskopie essentiell. Hierdurch wird die Auflösung der mikroskopierten Bilder nur von der Beugung des verwendeten Lichts limitiert. Für leichtere Ionen, die mit ihrer Reichweite nicht im Szintillator stoppen, reicht das erzeugte Szintillationslicht nicht aus, um ein spezifisches Detektionssignal in dem Photomultiplier zu erzeugen. Daher wird bei Verwendung von leichten Ionen zur Bestrahlung ein Ionendetektor, der im Objektivrevolver eingebaut ist, in den Strahlweg hinter die Probe gedreht, um die Ionen zu detektieren. Nach der Bestrahlung muss für die Mikroskopie nur wieder das gewünschte Objektiv zurückgefahren werden. Dies benötigt 1-2 Sekunden.

Farbstoff	Anregungs- max. [nm]	Emissions- max. [nm]	Auflösung 63× Objek- tiv [nm]	Auflösung 40× Objek- tiv [nm]
Alexa488	490	525	246	337
eGFP	488	509	239	327
Syto 80	531	545	256	350
Syto 83	543	559	262	359
tagRFP	555	584	274	374
Draq 5	646	681	320	437
To-Pro-3	642	661	310	424
Vybrant Ruby	638	686	322	440

Tab. 3.1: An SNAKE verwendete Farbstoffe und ihre Anregungs-/Emissionswellenlängen. Zusätzlich ist die theoretische Auflösungsgrenze des 40× Objektivs (Plan-Apochromat 40×/0,95 Korr Ph3 M27) und 63× Objektivs (LCI Plan Neofluar 63×/1,3 M27) nach dem Rayleigh Kriterium angegeben.

Für die Fluoreszenzmikroskopie stehen ein Colibri-LED-Modul mit 3 LEDs (470 nm, 555 nm und eine Weißlicht LED) und diverse Filtersätze (13, 20HE, 61HE (alle Carl Zeiss AG) und ein spezieller Cy5-Filter) zu Verfügung, wodurch bis zu 3 Farben „gleichzeitig“ in einer Probe mikroskopiert werden können und Phototoxizitätseffekte durch UV-Strahlung einer Quecksilberdampfampe vermieden werden können. So sind zum Beispiel mehrere 100 Aufnahmen über bis zu 12 h möglich, ohne dass

Toxizitätseffekte in den Zellen erkennbar sind [Hab11]. Üblicherweise werden dabei ein 40x Objektiv (Plan-Apochromat 40×/0,95 Korr Ph3 M27, Zeiss AG) in Kombination mit einem 1,0x Kameraadapter oder ein 63x Ölimmersionsobjektiv (LCI Plan Neofluar 63×/1,3 M27, Zeiss AG) mit einem 0,63x Kameraadapter in dem Lebendzellsetup verwendet. Beide Konfigurationen erlauben für die typischen an SNAKE verwendeten Farbstoffe eine Auflösung von weniger als 0,5 µm (Tab. 3.1). Die Pixelgröße der verwendeten CCD Kamera (AxioCam Mrm Rev3) ist mit 0,16 µm kleiner als die optische Auflösung.

Die Wahl der Konfiguration wird nach den Kriterien der Lichtempfindlichkeit, Farbstoffintensität und Handlichkeit getroffen. Nach

$$\frac{\text{Bildhelligkeit}_{63x}}{\text{Bildhelligkeit}_{40x}} = \frac{NA_{63x}^4 / M_{63x}^2}{NA_{40x}^4 / M_{40x}^2} \approx 3,6 \quad (3.1)$$

ist die Bildhelligkeit der Kombination des 63x Objektivs deutlich größer als die des 40x Objektivs, wobei M die Vergrößerung der Objektive in Kombination mit dem Kameraadapter beschreibt und NA die numerische Apertur der Objektive (1,3 bei 63x Objektiv und 0,95 bei 40x Objektiv) [Hab11]. Jedoch ist die Handhabung der Ölimmersion durch die senkrechte Ausrichtung der Probe deutlich aufwendiger, sodass nach Möglichkeit das 40x Luftobjektiv verwendet wird.

Für eine direkte Beobachtung der Zellantwort nach Bestrahlung mit Ionen, die nicht im Szintillator gestoppt werden, muss das 40x Objektiv verwendet werden, da nur so nach der Bestrahlung einfach wieder vom Photomultiplier auf das Objektiv gewechselt werden kann.

3.2 Erweiterung des SNAKE Aufbaus zur gezielten Ionenbestrahlung von zellulären und subnukleären Strukturen

Um möglichst zielgenau Strukturen in Zellen zu bestrahlen, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt werden. Mit der Nutzung des LCI-Aufbaus werden einige davon schon erfüllt. So sind die richtigen Lebensbedingungen für die Zellen über die gesamte Dauer der Bestrahlung und Beobachtung gegeben. Des Weiteren ist für eine genaue Dosisapplikation die Detektion der applizierten Ionen möglich und die Energie der Ionen, und somit ihr LET, auf Zellebene wohl definiert. Gleichzeitig ist die Strahlfleckgröße von unter einem Mikrometer kleiner als die zu bestrahlende Struktur mit nur wenigen Mikrometern Durchmesser. Die Strahlposition kann über das Szintillationslicht bestimmt und damit dessen Auslenkung durch die Ablenkeinheiten kalibriert werden. Die Ziele können durch Mikroskopie am Strahl direkt spezifisch sichtbar ge-

macht werden. So wurden auch schon erste Versuche durchgeführt, bei denen rot angefärbte Chromatinbereiche gezielt bestrahlt wurden und eine Zielgenauigkeit von weniger als 2 μm festgestellt wurde [Hab11]. Jedoch lag hierbei der Durchsatz bei etwa 3-4 Zellen pro Tag, was für aussagekräftige biologische Experimente oft nicht ausreicht, da die meisten strahleninduzierten Effekte statistisch auftreten und damit eher eine Mindestanzahl in der Größenordnung von 100 Zellen benötigt wird.

Das Ziel der Zielbestrahlungserweiterung an SNAKE ist also eine Verbesserung der Bestrahlungsgenauigkeit, einen deutlich höheren Durchsatz an bestrahlten Zellen und eine minimale Fehleranfälligkeit im Ablauf zu erreichen. Dies soll aussagekräftige biologische Experimente ermöglichen, die eine gewisse Statistik von 300-500 bestrahlten Zellen, wie z.B. für den Mikronukleitest [Sch09; Sch11; Sch12], benötigen. Dabei ist auch die Kombination bisheriger biologischer Experimente, die größtenteils auf Echtzeitbeobachtungen von Proteinakkumulationen basieren, mit Immunfluoreszenz- oder sogar Proliferationsuntersuchungen nach gezielter Zellbestrahlung essentiell.

In den folgenden Kapiteln werden das entwickelte Zielbestrahlungskonzept und dessen Realisierung an SNAKE vorgestellt und charakterisiert.

3.2.1 Strahlortbestimmung und Eichung der Strahlableinheiten

Um Strukturen im μm -Bereich gezielt bestrahlen zu können, ist es als erstes nötig den Strahlort möglichst genau zu ermitteln. Für die Bestimmung der Strahlposition wird dasselbe Setup genutzt wie für die Mikroskopie der Zellen. Das ist unabdingbar, um systematische Fehler zu vermeiden [Fis09]. Das Szintillationslicht des im Szintillator gestoppten Strahls wird dazu über denselben Lichtweg wie bei der Zellmikroskopie ebenfalls durch das Objektiv auf die AxioCam Mrm Rev3 (Zeiss GmbH) gelenkt. Mit dieser wird der Strahl sichtbar und lokalisiert.

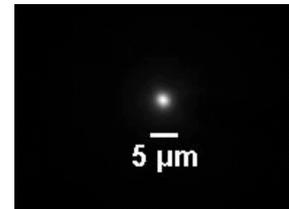


Abb. 3.4: Mit AxioCam MR Rev3 auf dem BC418-Szintillator aufgenommener Ionenstrahl

Um nun den Strahl definiert an einen Ort der Kamera auszulenken, muss eine Kalibrierung der Strahlableinheiten erfolgen, die in einem Zellcontainer ohne Zellen durchgeführt wird. Zur Kalibrierung wird der Ionenstrahl mit definierten Spannungsdifferenzen auf dem Szintillator über das Blickfeld der Kamera (AxioCam Mrm, Zeiss AG, Deutschland) gerastert. Über ein in dem Mikroskopprogramm (AxioVision 4.8.2, Zeiss AG, Deutschland) geschriebenes VBA-Makro werden die Spannungsamplitude und die Schrittweite definiert und die daraus resultierenden Spannungspaare erzeugt. Automatisiert werden danach die einzelnen Punkte nacheinander angesteuert und jeweils ein Kamerabild aufgenommen und abgespeichert. Die Optimierung der Zeit ist essentiell, da sonst zu befürchten ist, dass Strahldrifts in der Zeit der Bildaufnahmen die Kalibration verfälschen. Üblicherweise wird der Strahl auf 25 Punkte der Kamera gelenkt und aufgenommen. Dabei ist die Zeit im Wesentlichen durch die benötigte Be-

lichtungszeit limitiert, um den Strahl im Kamerabild zu erkennen. Bei üblichen Zählraten von etwa 1 kHz sind etwa 3 s Belichtung nötig. So dauert die Aufnahme aller Kalibrationsbilder weniger als 1,5 min.

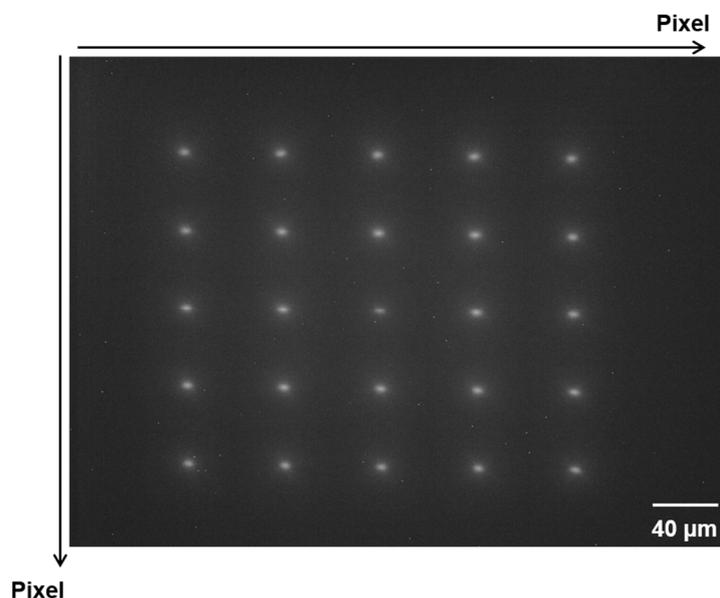


Abb. 3.5: Überlagerung von 25 Aufnahmen des über den Kameraausschnitt gescaanten Strahlflecks. Durch Fitten einer 2D Gauß-Verteilung werden die Strahlpositionen bestimmt und dem jeweiligen Spannungspaar zugeordnet. Es ergibt sich dann eine lineare Abhängigkeit der X-/Y-Spannung u bzw. v von dem Strahlort auf dem Kamerabild x bzw. y .

Mit dem von Dr. Christoph Greubel geschriebenen „calcTrafo“-Programm wird in allen Bildern der Mittelpunkt der Verteilung des aufgenommenen Szintillationslichts mit einem 2D-Gaussfit aus dem Datenanalyseframework ROOT bestimmt und dem jeweiligen Spannungspaar zugeordnet. Nimmt man eine lineare Abhängigkeit der Ablenkspannungen, u und v , und der Strahlposition auf der CCD Kamera, x und y , an, so ergibt sich:

$$u = ax + by + e \quad (3.2)$$

$$v = cx + dy + f \quad (3.3)$$

Hierbei werden die Transformationskoeffizienten a, b, c, d, e, f mittels der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt.

Zur Beurteilung der Kalibration werden die Abweichungen $\Delta x = x_{ist} - x(u, v)$ und $\Delta y = y_{ist} - y(u, v)$ des gefundenen Strahlflecksorts x_{ist}, y_{ist} zu dem sich mit den Spannungen u und v aus der invertierten Kalibration ergebenden Orts $x(u, v), y(u, v)$ berechnet. Die typisch erreichte Qualität zeigt dabei eine Standardabweichung von Δx bzw. Δy von etwa $0,11 \mu\text{m}$ und ist durch die Genauigkeit der Bestimmung der Strahlposition und schnelle Strahlbewegungen beschränkt. Die Abweichungen zeigen keine Ortsabhängigkeit (Daten nicht gezeigt). Erfahrungsgemäß gilt die Kalibration als verwendbar, wenn alle Abweichungen geringer als $0,24 \mu\text{m}$ sind.

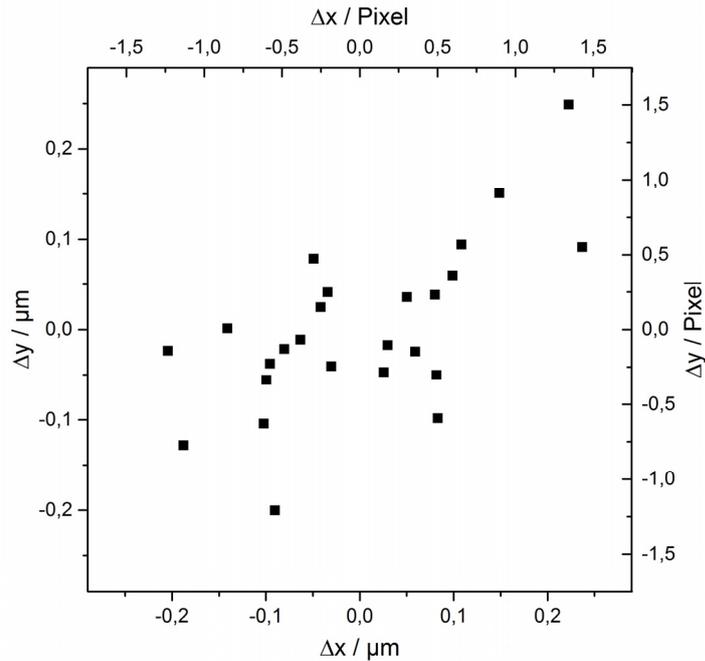


Abb. 3.6: Abweichungen Δx , Δy der Strahlfleckorte (x_{ist} , y_{ist}) einer verwendeten Kalibration zu ihrem Sollort ($x(u, v)$, $y(u, v)$), der sich mit ihren Ablenkspannungen (u , v) aus der Kalibration ergibt. Liegen die Abweichungen unter 1,5 Pixel, so ist eine Kalibration verwendbar.

Bei gleichbleibender Mikroskopkonfiguration (gleiches Objektiv, Kameraadapter, Kameraausrichtung, ...) bleiben die Kalibrationsparameter gleich. So muss die Kalibrierung nur einmal pro Zielbestrahlungsblock durchgeführt werden.

3.2.2 Offsetbestimmung

Langsame Oszillationen und thermische Bewegung ändern die absolute Strahlposition und resultieren in einem sogenanntem Offset, der in der Kalibration durch die Parameter e und f beschrieben wird. Diese müssen somit kurz vor jeder Bestrahlung neu ermittelt werden. Dazu wird der Strahl definiert in einen Bereich des Kamerablickfeldes gelenkt, in dem sich keine Zellen befinden und von der Kamera bei einer Belichtungszeit von typischerweise 1,5 s aufgenommen. Anschließend wird der Strahlort in dem aufgenommenen Bild direkt mit Bildverarbeitungsfunktionen der Mikroskopsoftware AxioVision (Version 4.8.2, Zeiss AG) bestimmt, indem der Mittelpunkt der Fläche gewählt wird, die nach dem mehrfachen Setzen von Schwellen eine bestimmte Größe unterschreitet. Dies dauert weniger als 1 s. Die Differenz zu der ursprünglich anvisierten Position ergibt den sogenannten Offset.

3.2.3 Zielbestrahlungssoftware

Mit der Kalibrierung und dem Offset verfügt man im Prinzip über alle Bausteine, um gezielt Zellen zu bestrahlen. Hierfür müssen dann insgesamt folgende Schritte durchgeführt werden:

1. Einbau der Probe:

Der Lebendzellcontainer wird in den Mikroskopisch eingebaut und die Austrittsnase auf eine Distanz von 20-30 μm von der Zellebene eingeregnet. Der Abstand kann durch die geringe Tiefenschärfe des verwendeten Objektivs gemessen werden.

2. Zieldefinition:

Der Fokus muss auf die Zellebene gesetzt und ein Bild im Farbkanal der Zielstrukturen aufgenommen werden. Die Zieldefinition soll durch Bildbearbeitung automatisch erfolgen und kann per Hand korrigiert werden.

3. Offsetbestimmung:

Hierzu wird der Strahl definiert ausgelenkt, wozu die Pixelkoordinaten mit den in Kapitel 3.2.1 bestimmten Kalibrationsparameter in Ablenkspannungen umgerechnet werden. Die Scaneinheit lenkt den Strahl dementsprechend aus. Die Cups in der Strahlführung und der Chopper werden manuell geöffnet, die Kamera eine bestimmte Zeit belichtet und Cups und Chopper wieder geschlossen. Anschließend muss die Strahlposition bestimmt und der Offset berechnet werden.

4. Bestrahlung:

Die Zielkoordinaten werden um den Offset korrigiert, mit der Kalibration in Spannungspaare umgerechnet und an die Scaneinheit weitergegeben. Für die Bestrahlung werden die Cups in der Strahlführung und der Chopper durch ein Triggersignal geöffnet. Die Bestrahlung läuft standardmäßig im Einzelionenpräparationsmodus ab, wobei hierzu im Mikroskop der Lichtstrahlweg von der Kamera auf den nötigen Photomultiplier gewechselt werden muss. Die Ionenzahl wird hardwareseitig festgelegt.

5. Beobachtung der Zellantwort:

Im Anschluss an die Bestrahlung kann die Zellantwort direkt beobachtet werden, indem der Lichtstrahlweg wieder auf die Kamera gestellt wird. Eine Einzelbildaufnahme/Zeitserie kann automatisch oder per Hand nach der Bestrahlung gestartet werden.

Da der Ablauf sehr komplex ist und ein großes Fehlerpotential birgt (Cups müssen zur richtigen Zeit geöffnet werden, Fokuspositionen an die Situation angepasst werden, der Strahl zum richtigen Zeitpunkt ausgelenkt werden, usw.), konnten in bisherigen „Proof of Principle“-Zielbestrahlungen nur 3-4 Zellen pro Tag bestrahlt werden.

Um die Zielbestrahlung standardmäßig nutzen zu können, muss dieser Ablauf benutzerfreundlich und zügig durchzuführen sein. Daher wurde die Steuersoftware zur Zielbestrahlung in AxioVision (Zeiss GmbH) als Makro in Visual Basic for Applications

(VBA) implementiert. Dies erlaubt die Nutzung vorhandener Funktionen zur Steuerung des Mikroskops und Bearbeitung erzeugter Bilder. Zugleich können verschiedene Kommunikationswege genutzt werden, um andere Komponenten zu automatisieren (z.B. Mikroskopschlitten, Scannereinheit und Cups). Primäres Ziel war es dabei, die Dauer des gesamten Ablaufs und seine Fehleranfälligkeit zu minimieren, um möglichst viele Strukturen zu bestrahlen und gleichzeitig auch den Einfluss der Strahlbewegung und Zellbewegung auf die Zielgenauigkeit zu verringern. Im Anhang wird die Software mit ihrer Oberfläche und ihren Funktionen ausführlich vorgestellt. Der Experimentator muss nun nach dem Probeneinbau nur noch einmalig die Fokusebenen der Zielstrukturen und des Szintillators festlegen, die Kalibrationsparameter einlesen lassen und den Strahl bis zu dem automatisierten I+0-Cup1 freigeben. Nach der Aufnahme der Zielstrukturen, kann er die Ziele in beliebigen Mustern definieren, den Offset mit einem Mausklick bestimmen lassen und ebenfalls mit einem Mausklick die Bestrahlung starten. Die Struktur des Makros ist dabei so aufgebaut, dass die Handlungsfolge weitestgehend vorgegeben ist und Prozesse, wie die Offsetbestimmung und Bestrahlung, in die mehrere Komponenten involviert sind, automatisch ablaufen. So wird eine Fehlbedienung verhindert.

Somit sind nun Experimente mit einer größeren Anzahl gezielt bestrahlter Zellen/Ziele möglich, welche auch für die genauere Charakterisierung der Zielbestrahlung im folgenden Kapitel benötigt wird.

3.3 Charakterisierung der Zielbestrahlung an SNAKE

Im folgenden Kapitel werden die Zielgenauigkeit des vorgestellten Zielbestrahlungsaufbaus in zwei verschiedenen Testszenarien bestimmt und mögliche limitierende Einflüsse wie Strahloszillationen oder Zellbewegung diskutiert. In dem ersten Szenario werden Strukturen auf sogenannten Kernspurdetektoren gezielt bestrahlt und die Abweichung bestimmt. In dem zweiten Szenario werden Zielstrukturen in lebenden Zellen gezielt bestrahlt. Hier wird die Trefferantwort einerseits aus der direkten Schadensantwort von stabil transfizierten Reparaturproteinen oder durch eine, an die Bestrahlung anschließende, Immunfluoreszenzfärbung von sogenannten Schadensmarkern bestimmt. Hauptsächlich werden 55 MeV Kohlenstoffionen verwendet.

3.3.1 Kernspurdetektorbestrahlung

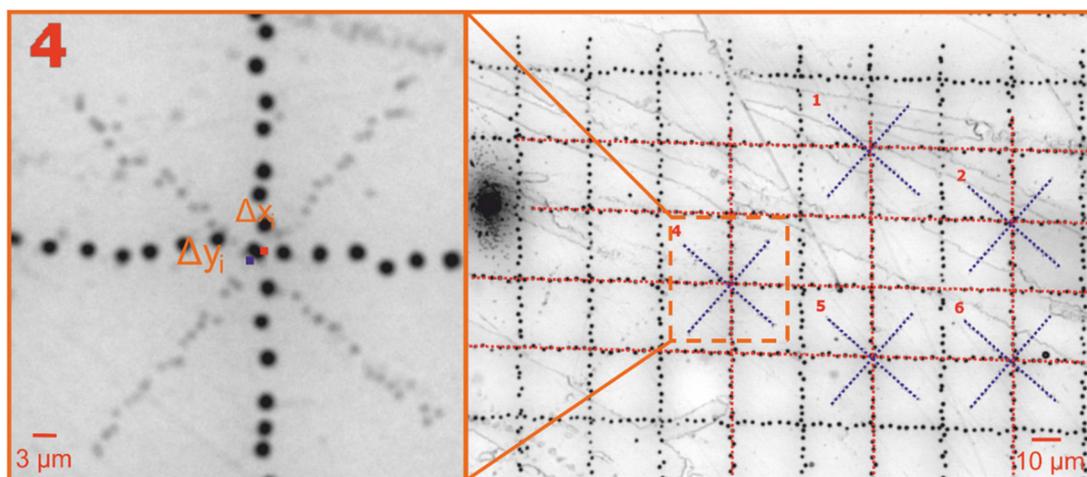


Abb. 3.7: Bestimmung der Zielbestrahlungsgenauigkeit nach Bestrahlung von Polycarbonatfolien. Nach einer Bestrahlung eines $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ -Liniengitters mit $3 \mu\text{m}$ Punktabstand wird durch Ätzen das Punktmuster sichtbar. Linienschnittpunkte wurden als Ziel für eine gezielte Bestrahlung mit einem x-Kreuz aus 45 Punkten verwendet und die Folie ein weiteres Mal geätzt. Der Abstand Δx_i , Δy_i der Schnittpunkte der Gitterlinien (rote Punkt Bild links) und Kreuze (blauer Punkt Bild links) ergibt sich durch Anfügen der Gitterlinien (rote Linien im rechten Bild) und Kreuze (blaue Linien im rechten Bild).

Um die reine Funktion des Zielbestrahlungssetups zu testen, wurden dünne Polycarbonatfolien als Kernspurdetektoren verwendet. Mit einer ersten Bestrahlung wurden Muster erzeugt, die dann als Ziel für eine gezielte zweite Bestrahlung dienten. Für die Ionendetektion wurde die Folie über ein Stück Plastiksintillator BC-418 geklebt. In der ersten 55 MeV Kohlenstoffionen-Bestrahlung wurde ein Zielmuster, z.B. $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ Gitter aus Linie mit $3 \mu\text{m}$ Punktabstand bestrahlt. Nach einem ersten Ätzvorgang von ca. 50 min mit einer alkoholischen Natronlauge, kann das Bestrahlungsmuster im Mikroskop beobachtet werden. Per Hand ausgewählte Linienschnittpunkte wurden anschließend als Ziele für eine weitere gezielte Bestrahlung verwendet. Hierbei wurde ein x-förmiges Kreuz aus 45 Punkten bestrahlt. Nach einem zweiten Ätzvorgang von etwa 50 min wurde der Abstand Δx_i , Δy_i der Linienschnittpunkte der Gitter und Kreuze, also die Ziel- und Trefferorte, bestimmt (Abb. 3.7). Aus der Auswertung von drei Bestrahlungen mit je 10 bis 12 bestrahlten Zielen ergab sich eine mittlere Abweichung von $(0,8 \pm 0,8) \mu\text{m}$ in X-Richtung und $(0,2 \pm 0,5) \mu\text{m}$ in Y-Richtung. Die einzelnen Kreuze einer Bestrahlung streuten mit $(0,67 \pm 0,16) \mu\text{m}$ in X- und $(0,71 \pm 0,05) \mu\text{m}$ in Y-Richtung.

Kernspurdetektorauswertung

(3 Bestrahlungen von 10-12 Zielen))

	$\overline{\Delta X} / \mu\text{m}$	$\overline{\Delta Y} / \mu\text{m}$
Mittlere Abweichung	$0,8 \pm 0,8$	$0,2 \pm 0,5$
Standardabweichung	$0,67 \pm 0,16$	$0,71 \pm 0,05$

Tab. 3.2: Ermittelte Zielgenauigkeit nach Kernspurdetektorbestrahlung. Die angegebenen Fehler beschreiben den Fehler des Mittelwerts.

3.3.2 Gezielte Bestrahlung von zellulären Substrukturen

Um mehr anwendungsbezogen die Zielgenauigkeit in lebenden Zellen zu bestimmen, gab es mehrere Ansätze. Dabei hat sich ein Dreifarben-Zellsystem mit lebend Zellkern- und Nucleolifärbung, sowie einem durch stabile Transfektion fluoreszierenden Schadensmarker als bester Ansatz herausgestellt.

3.3.2.1 Zelllinie und Färbung

Für die Zielgenauigkeitsbestimmung wurden U2OS- und HeLa-Zellen verwendet, die nach stabiler Transfektion ein GFP-MDC1-Fusionsprotein exprimieren. Dieses agiert wie das Schadensmarkerprotein MDC1, ist aber zusätzlich im Fluoreszenzmikroskop in lebenden Zellen zu beobachten. Die HeLa-Zellen stammen von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Sie wurden mit dem MDC1-GFP-Vektor von C. Mielke und W.G. Dirks [Mos11] von Dr. Guido Drexler transfiziert. Die U2OS-Zelllinie ist in [Hab12] beschrieben. Einen Tag vor der Bestrahlung wurden die Zellen mit einer Dichte von 500 Zellen/mm² ausgesät. Für die Zellkernfärbung, die für die automatische Zielerkennung nötig ist, wurden die Lebendzellfarbstoffe „Draq5 DNA Dye“ [Mar05] und „VybrantDyeCycle Ruby“ verwendet (beide ThermoFisher Scientific Inc.). Draq5 wird 5 min vor Bestrahlung mit einer Konzentration 1 µM in Medium auf die Zellen gegeben, VybrantRuby mit 5 µM in Medium 15 min vorher. Die Nucleolifärbung wurde mit Syto80 bzw. Syto83 (ThermoFisher Scientific Inc.) erreicht, die an Nukleinsäuren binden und dadurch zu einem erhöhten Signal im Bereich der Nucleoli führt. Dazu wurden die Zellen vor Bestrahlung für 2 h mit Syto80/83 in einer Konzentration von 1 µM inkubiert.

Die Akkumulation des MDC1 Reparaturproteins an den durch die Bestrahlung geschädigten Chromatindomanen ermöglicht es, die Trefferantwort direkt nach der Bestrahlung in den lebenden Zellen zu verfolgen. Alternativ wurden die Zellen etwa 20 min nach der Bestrahlung mit 2 % PFA für 15 min fixiert. Hierdurch konnten die Ziele und Treffer mit der Immunfluoreszenzfärbung des Schadensmarkers γ H2AX mit dem Fluorochrom Alexa488 an einem separaten Mikroskop (Zeiss AxioObserver Z.1, Zeiss GmbH) aufgenommen werden. Das detaillierte Protokoll ist im Anhang aufgeführt.

3.3.2.2 Zielgenauigkeitsbestimmung

Für die Zielgenauigkeitsbestimmung wurden Felder von 225 x 170 µm² bestrahlt. Der Ablauf der Zielbestrahlung ist in Abb. 3.8. skizziert und wird mit Hilfe der Zielbestrahlungssoftware, wie in Kap. 3.2.3 vorgestellt, durchgeführt. Dabei wurden die hellsten und damit größten Nucleoli jedes Zellkerns mit einem Kreuz bestrahlt, das aus 17 Einzelpunkten mit 1,6 µm Abstand bestand. Zudem wurden 10 Kohlenstoffionen pro Punkt appliziert. Die automatische Zielerkennung (Kap. 3.4.1) identifizierte die größten Nucleoli mit einer Effizienz von etwa 80 %, wobei durch Artefakte die Rate von

falsch erkannten Nucleoli etwa bei 10 % lag und manuell korrigiert wurde. Mit manueller Korrektur dauerte dieser Schritt zwischen 5 s und 2 min. Bei der Offsetbestimmung wird der Strahl automatisch in das äußerste Eck gelenkt, seine Position und seine Abweichung zur Sollposition bestimmt. Das dauert etwa 5-10 s. Die Bestrahlung benötigt 1-5 s.

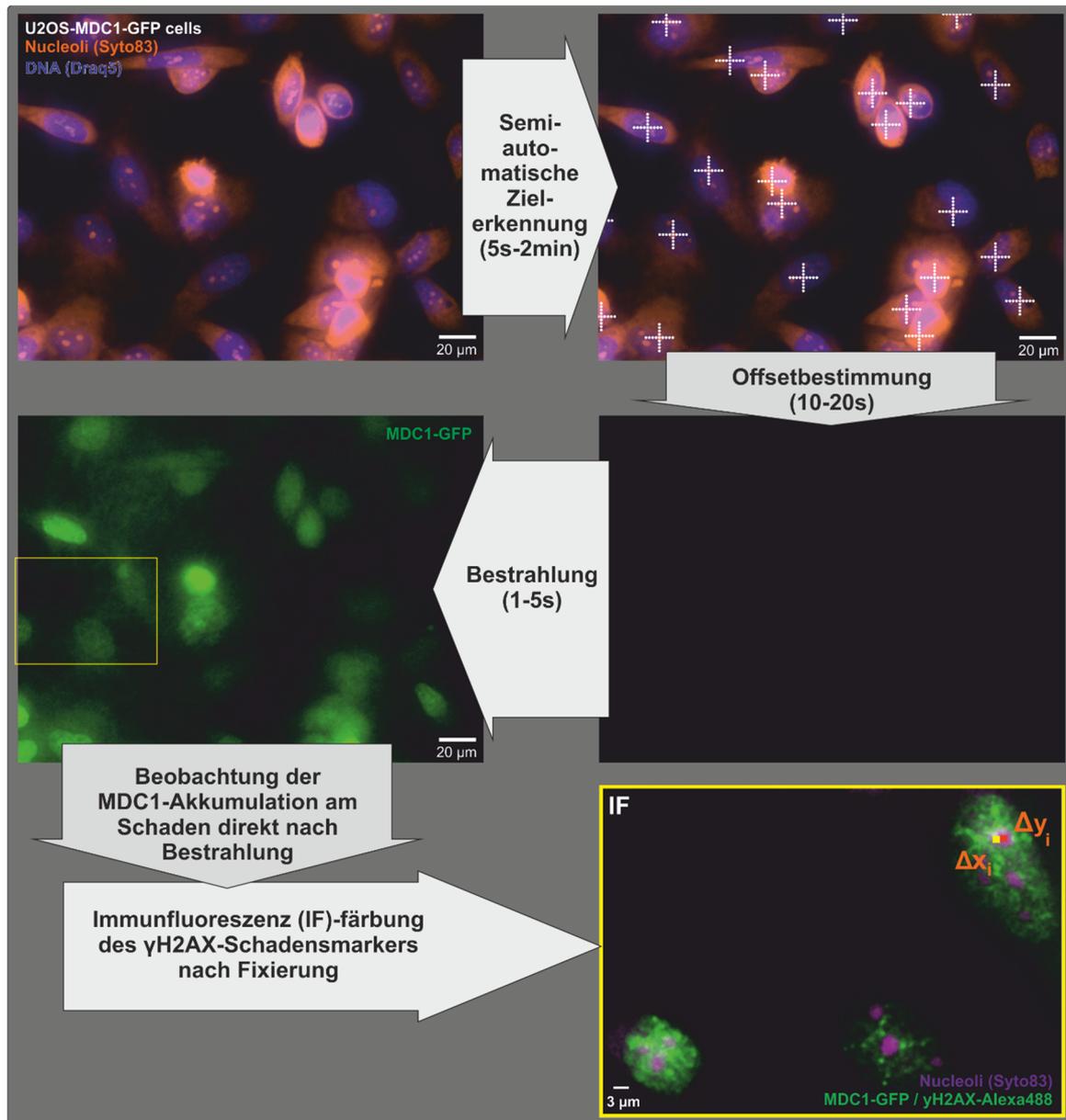


Abb. 3.8: Bestrahlungsablauf für die Zielgenauigkeitsbestimmung. Es werden Großfelder bestehend aus 2x2 Kamerablickfeldern bestrahlt. Das erste Feld wird angefahren und je ein Bild im Kanal der Nucleolifärbung (orange) und Zellkernfärbung (blau) aufgenommen. Anschließend wird mit der automatischen Zielerkennung der hellste Nucleolus eines Zellkerns mit Kreuzen aus 17 Einzelpunkten anvisiert. Bei der anschließenden Offsetbestimmung wird der Strahl definiert in ein Eck gelenkt und seine Position bestimmt. Nach der 1-5 s dauernden Bestrahlung können die Trefferorte durch die Akkumulation von dem MDC1-GFP Protein direkt oder durch γ H2AX nach IF-Färbung mit Alexa488 (im untersten Bild grün) bestimmt werden. Über den Abstand des anvisierten Nucleolus (im untersten Bild lila) zum Treffer ergibt sich die Abweichung Δx_i , Δy_i .

Für die Bestimmung der Zielgenauigkeit wurden zwei Methoden angewendet, um die Trefferorte zu rekonstruieren. Bei Onlinebeobachtung wird das GFP-markierten Reparaturprotein MDC1 als Schadensmarker direkt nach der Bestrahlung genutzt. So kann das erste Bild schon 5 s nach der Bestrahlung aufgenommen werden und dadurch auch die Bewegung der Nucleoli nachvollzogen werden. Bei der zweiten Methode werden die Zellen 20 min nach Bestrahlung fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie von γ H2AX gefärbt. Bei beiden Methoden werden die Trefferpositionen durch das Anfitzen von geraden Linien durch die in einem Kreuz angeordneten Foci bestimmt. Deren Schnittpunkt stellt danach den Trefferort dar. Anschließend kann wie bei der Lebendzellbeobachtung der Syto80 bzw. Syto83 Kanal für die Bestimmung des Zielorts auch in der Immunfluoreszenz genutzt werden. Die Differenz zwischen dem Ziel- und dem Trefferort Δx , Δy dient zur Berechnung der Bestrahlungsgenauigkeit.

Auswertung mittels

	Lebendzellmikroskopie (36 rekonstruierte Treffer)		Immunfluoreszenzfärbung (33 rekonstruierte Treffer)	
	$\overline{\Delta X}/\mu\text{m}$	$\overline{\Delta Y}/\mu\text{m}$	$\overline{\Delta X}/\mu\text{m}$	$\overline{\Delta Y}/\mu\text{m}$
Mittlere Abweichung	$-0,07 \pm 0,12$	$0,02 \pm 0,14$	$0,37 \pm 0,12$	$-0,12 \pm 0,07$
Standardabweichung	0,7	0,8	0,7	0,4

Tab. 3.3: Ermittelte Zielgenauigkeit nach Lebendzellbeobachtung und Immunfluoreszenzfärbung. Die Fehler beschreiben den Fehler des Mittelwerts.

Bei Nutzung der Lebendzellbeobachtung für die Identifikation der Schadensantwort wurden ebenfalls Felder von $225 \times 170 \mu\text{m}^2$ bestrahlt. Danach wurden die Zellen über 5 min nach der Bestrahlung beobachtet. Dabei lagerte sich das MDC1 Protein in der Regel innerhalb von 1 min am Schaden an. So wurden etwa 140 Ziele bestrahlt. 36 Zellen zeigten ein spezifisches Kreuzmuster mit einem definierten Schwerpunkt. Bei den anderen Zellen war die Expression des MDC1 für eine verlässliche Auswertung des Musters zu schwach. Es ergab sich dabei eine Verteilung der Ortsabweichungen von Ziel- und Trefferort mit einem Mittelwert von $(-0,07 \pm 0,12) \mu\text{m}$ in x- und $(0,02 \pm 0,14) \mu\text{m}$ in y-Richtung. Der Fehler stellt den Fehler des Mittelwerts dar. Die Breite der Verteilung (Standardabweichung) betrug dabei $0,7 \mu\text{m}$ in x- und $0,8 \mu\text{m}$ in y-Richtung (Tab. 3.3).

Für die Bestimmung der Zielgenauigkeit nach Immunfluoreszenzfärbung wurden 190 Zellen in zwei Großfeldern von etwa $420 \times 320 \mu\text{m}$ bestrahlt. Nach der Fixierung und Repositionierung der Bestrahlungsfelder konnten 33 Kreuze mit zugehörigen Nucleoli identifiziert werden. Die übrigen Zellen ließen aufgrund von Zellverformung und unspezifischem Schadenssignal keine Auswertung zu oder lösten sich während der Probenpräparation ab. Somit konnte ein Mittelwert von $(0,37 \pm 0,12) \mu\text{m}$ in x- und

($-0,12 \pm 0,07$) μm in y-Richtung gemessen werden. Dabei war die Verteilungsbreite in x-Richtung $0,7 \mu\text{m}$ und in y-Richtung $0,4 \mu\text{m}$ (Tab. 3.3).

3.3.3 Diskussion der Einflüsse auf die Zielgenauigkeit

Nach der Auswertung von mehr als 300 Zellen ergab sich eine mittlere Abweichung von weniger als $0,4 \mu\text{m}$ und einer Breite der Verteilung von weniger als $0,8 \mu\text{m}$. Im Vergleich dazu konnte bei der gezielten Bestrahlung von Mustern in Folien eine mittlere Verschiebung von weniger als $0,8 \mu\text{m}$ mit einer Breite von etwa $0,7 \mu\text{m}$ beobachtet werden. Bei der Folienbestrahlung ist damit zu rechnen, dass es durch einen Belichtungswinkel oder nicht planes Aufliegen der Probe zu einem systematischen Versatz der Zielstrukturen kommen kann [Fis09]. Die statistische Streuung liegt jedoch im Rahmen des Ergebnisses aus der Zellbestrahlung. Dieses ist für die Anwendung des Zielbestrahlungssetups auch relevanter. Im folgenden Kapitel werden die möglichen Einflussfaktoren und ihre Auswirkung auf die gezielte Bestrahlung hinsichtlich der oben vorgestellten Messung und des Zielbestrahlungssetups an sich diskutiert.

3.3.3.1 Choppereinfluss und Maximale Scanfrequenz der Ablenkeinheiten

Um Einflüsse der Strahlableinheiten oder des Choppers auf die Zielgenauigkeit abzuschätzen, wurde untersucht, wie groß die Punktscanfrequenz werden muss, damit es, durch ein eventuell zu langsames Schaltverhalten der Komponenten, zu Abweichungen der Strahlposition oder der Strahlableitung kommt.

Beim Chopper ist zu befürchten, dass dieser bei hohen Scanfrequenzen eventuell die Strahlage während des Schaltvorgangs verändert, da die Ablenkspannung eventuell nicht schnell genug auf- oder abgebaut wird. Zur Untersuchung wurde ein sich wiederholender Sägezahnschweifen von 100 Punkten mit Abstand $1 \mu\text{m}$ in X-Richtung mit einer Scanfrequenz von $500\,000 \text{ Hz}$ durchgeführt. Unter Verwendung einer Belichtungszeit von etwa 2 s wird der Strahl auf dem YAG-Szintillator als $100 \mu\text{m}$ lange Linie sichtbar (Abb. 3.9 a). In einem zweiten Schritt hat man mit dem Chopper den Strahl auf die Hälfte der Periode beschnitten. Dabei geht der Chopper mit einer Scanfrequenz von 5 kHz für $0,1 \text{ ms}$ auf. Um die Strahlage zu bestimmen, wurden in definierten Abständen die Helligkeitsprofile mit einem Gaußfit angefügt. Abstände der Helligkeitsprofile entsprechen einer Zeitdifferenz von $2 \mu\text{s}$ (Abb. 3.9 b). So kann durch die Auftragung der Strahlage über die Zeit, der Verlauf der Strahlage nach dem Einschaltvorgang des Choppers dargestellt werden (Abb. 3.9 c). Dabei unterschied sich die Strahlage bei ausgeschaltetem und eingeschaltetem Chopper in den ersten $20 \mu\text{s}$ signifikant um etwa 100 nm . Anschließend stimmen die Strahlagen im Rahmen des Fehlers überein. Die Strahlage bei eingeschaltetem Chopper liegt jedoch konstant über der Strahlage bei ausgeschaltetem Chopper. Dadurch liegt die Vermutung nah, dass ein leichter Strahldrift in der Zeit zwischen den zwei Aufnahmen für die Hälfte der Abweichung in den ersten $20 \mu\text{s}$ verantwortlich ist. Da bei den üblichen Zählraten

bis zu 5 kHz die Ionen in einem Zeitfenster von 200 μs nach Öffnen des Choppers appliziert werden, sind weniger als 10% der applizierten Ionen von diesem Effekt betroffen. Dadurch wird der Einfluss des Choppers auf die Zielbestrahlungsgenauigkeit als vernachlässigbar angenommen.

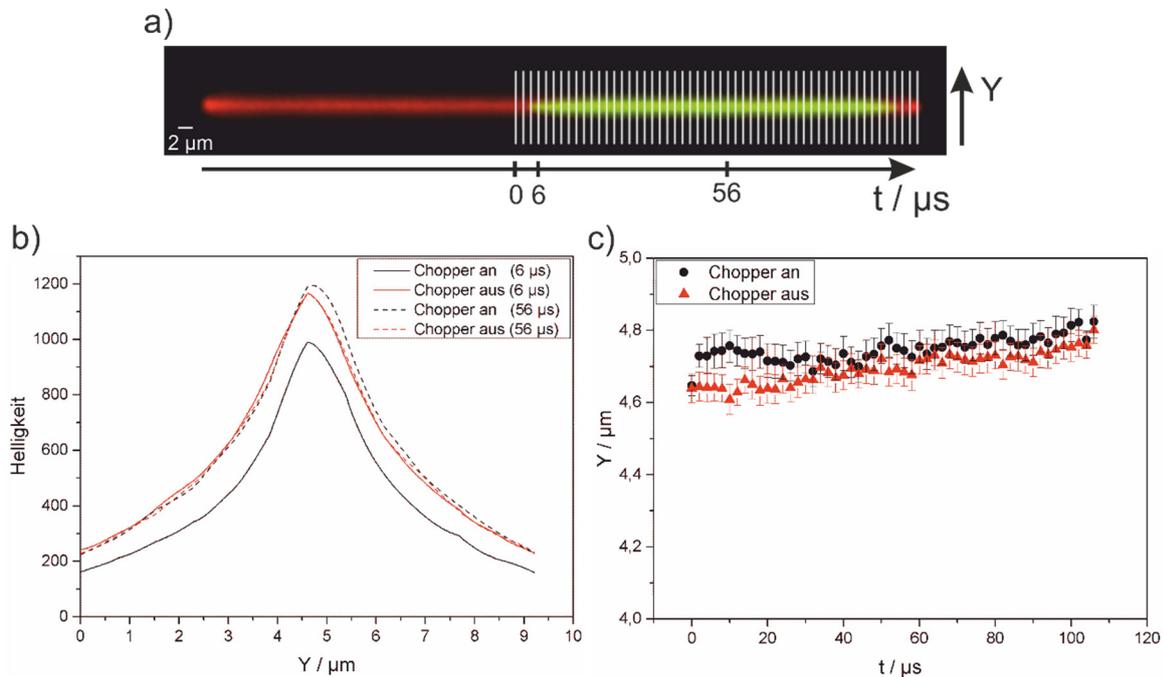


Abb. 3.9: Untersuchung der Strahlage bei Scannen mit und ohne Verwendung des Choppers. a) Der Strahl wird mit einem Sägezahnscan mit Frequenz 5 kHz wiederholt gescannt. Mit einer Belichtungszeit von 2 s wird der Strahl auf dem YAG-Szintillator als Linie sichtbar (rot). Mit dem Chopper wird mit einer Frequenz von 5 kHz eine halbe Linienscanperiode (100 μs) herausgeschnitten (grün). unten) Fittet man die Schnitte der Helligkeitsverteilungen mit Abstand von 2 μm (Diagramm b)) mit einer Gaußfunktion, ergibt sich, dass die Strahlage bei einer Chopper-Frequenz von 5 kHz (größer als übliche Bestrahlungsfrequenzen) nicht beeinflusst wird (Diagramm c), Fitfehler sind gegeben). Es zeigt sich in den ersten 20 μs eine Abweichung von unter 0,1 μm zwischen „Chopper an“ und „Chopper aus“. Da die Ionen in einem Zeitfenster von größer als 200 μs appliziert werden und so weniger als 10% der Ionen betroffen sind, ist kein merklicher Einfluss durch den Chopper auf die Zielgenauigkeit zu erwarten.

Zur Ermittlung der maximalen Scanfrequenz der Ablenkeinheit wurde ein Punktscan von 100 Punkten mit 1 μm Abstand als Sägezahnscan in X-Richtung durchgeführt (Abb. 3.10). Durch Überlagerung einer Rechtecksspannung in Y-Richtung, die den Strahl um 100 μm bei der Hälfte der Periode ablenkt, ergibt sich bei einer Punktscanfrequenz von 1 kHz auf dem Szintillator ein Bild aus zwei Stufen mit 50 μm Länge und 100 μm Abstand. Wird die Punktscanfrequenz auf 500 kHz erhöht, zeigt sich, dass der Spannungshub der Scaneinheiten zu gering ist und sich ein Tiefpassverhalten zeigt, bei dem die Stufen verzerrt werden. Bei dieser Frequenz beträgt eine Periode für den Scan einer ganzen Linie 200 μs . Zwischen dem 63,2%- und 95%-Werts des Spannungshubs der Anstiegsflanke liegt die zweimalige Zeitkonstante τ . Es ergibt sich $\tau \approx 4 \mu\text{s}$ und mit

$$f_c = \frac{1}{2\pi \cdot \tau} \quad (3.4)$$

ergibt sich die Grenzfrequenz f_c von etwa 40 kHz. Dies ist um einiges größer als die üblichen Bestrahlungsfrequenzen von einigen kHz.

Bei analogem Vorgehen für die andere Ablenkrichtung ergibt sich das gleiche Ergebnis.

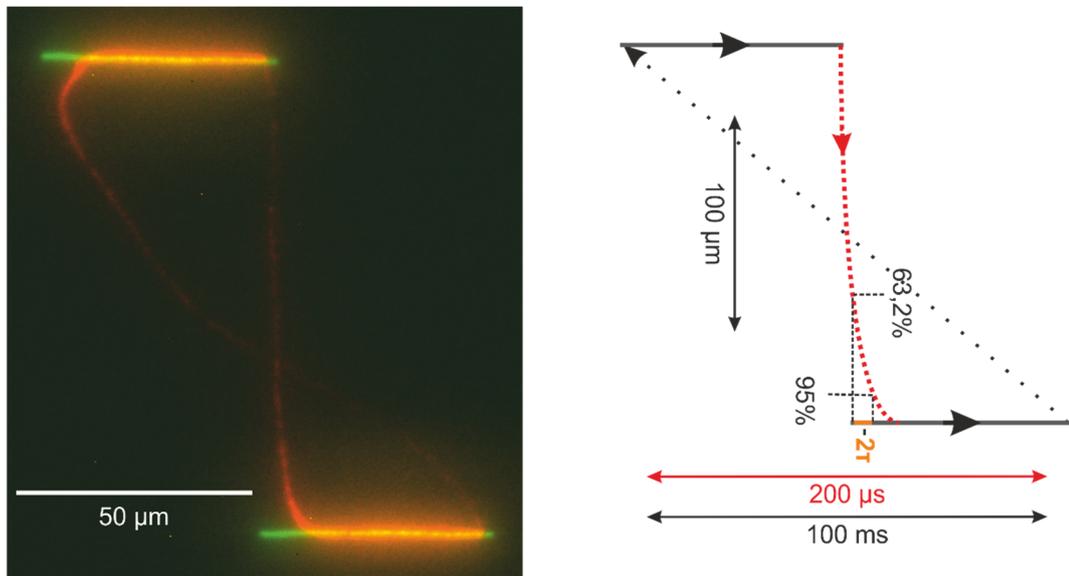


Abb. 3.10: Untersuchung der Sprungantwort der Ablenkeinheit. Der Strahl wird in X-Richtung in $1 \mu\text{m}$ Schritten $100 \mu\text{m}$ über den Szintillator gescannt. In der Mitte wird ein Sprung von $100 \mu\text{m}$ in Y-Richtung gemacht. Bei einer Punktscanfrequenz von 1 kHz ergeben sich zwei scharfe Stufen (grün links; grau rechts). Bei Erhöhung auf eine Frequenz von 500 kHz wird die Stufe deutlich verzerrt (rot beide Bilder). Dies entspricht einem Tiefpassverhalten. Zwischen dem $63,2\%$ -Wert und dem 95% -Wert des Spannungshubs liegt zweimal die Zeitkonstante τ von etwa $4 \mu\text{s}$. Daraus ergibt sich eine Grenzfrequenz $f_c \approx 40 \text{ kHz}$.

3.3.3.2 Strahlortbestimmung und Offsetkorrektur

Die Strahlortbestimmung ist ein kritischer Schritt. Denn eine ungenaue oder falsche Offsetbestimmung führt zu einer systematischen Abweichung des Bestrahlungsorts bei einer ganzen Bestrahlungsposition. Zur Prüfung der Genauigkeit der Strahlortsbestimmung und damit der Offsetbestimmung wurden 25 Strahlorte einer Kalibration mit drei unterschiedlichen Auswertungsmethoden bestimmt. Eine Methode nutzt das Objektidentifizierungs-Modul des CellProfiler, die Nächste die Strahlortbestimmung, die für die Kalibration verwendet wird und eine zweidimensionale Gaußverteilung fittet. Die letzte Methode nimmt den Mittelpunkt der Fläche, die nach dem mehrfachen Setzen von Schwellen eine bestimmte Größe unterschreitet, und verwendet diesen bei der Offsetbestimmung. In Tab. 3.4 sind die mittleren Abweichungen und Standardabweichungen angegeben, die sich aus der Analyse von 25 Strahlbildern mit den drei Methoden ergeben haben.

	CellProfiler vs. calcTrafo		Offsetvorgehen vs. calcTrafo		Offsetvorgehen vs. CellProfiler	
	$\Delta X / \mu\text{m}$	$\Delta Y / \mu\text{m}$	$\Delta X / \mu\text{m}$	$\Delta Y / \mu\text{m}$	$\Delta X / \mu\text{m}$	$\Delta Y / \mu\text{m}$
Mittelwert	-0,159	-0,161	-0,076	-0,080	-0,082	-0,08
STABW	0,017	0,019	0,018	0,023	0,026	0,04

Tab. 3.4: Abweichungen von 25 Strahlorten, die mit 3 unterschiedlichen Strahlortbestimmungsmethoden lokalisiert wurden.

Die Standardabweichungen betragen zwischen 0,017 und 0,026 μm in X Richtung und 0,019 und 0,04 μm in Y-Richtung. Letzteres entspricht etwa $\frac{1}{4}$ Pixel, was zeigt, dass die Strahlortbestimmung aller Methoden sehr reproduzierbar ist. Die mittleren Abweichungen zwischen den Methoden sind aber signifikant von 0 verschieden. Dies liegt an den unterschiedlichen Koordinatensystemen in denen die Programme arbeiten. Zwischen CellProfiler und calcTrafo kommt es zu einer Verschiebung um einen Pixel, da calcTrafo die Pixel ab 1|1 adressiert und der CellProfiler ab 0|0. Das Offsetvorgehen nutzt die Bildverarbeitung in AxioVision. Hier werden die Pixel zwar ab 0|0 adressiert, sind aber um 0,5 Pixel verschoben, was bei der Bildverarbeitung nicht berücksichtigt wird. Da in AxioVision die Pixelkoordinaten die linke obere Ecke eines Pixels adressieren, kommt es hier zu einer systematischen Verschiebung von 0,5 Pixel und damit 0,08 μm , was aber nur einen kleinen Teil der systematischen Abweichung der Zielgenauigkeit erklärt. Generell können die systematischen Abweichungen der unterschiedlichen Koordinatensysteme leicht korrigiert werden.

Die statistische Ungenauigkeit bei der Offsetkorrektur beträgt etwa 0,5 Pixel, da dieser bei der Verarbeitung durch das Zielbestrahlungsmakro immer auf ganze Pixel gerundet wird.

3.3.3.3 Strahleichung

Die Strahleichung hat, wie in Kapitel 3.2.1 erwähnt, eine Ungenauigkeit von etwa 0,11 μm und ist damit größer als die oben erwähnte Ortsbestimmungsunsicherheit von etwa 0,02 μm .

3.3.3.4 Ziel-, Trefferbestimmung und Zielrekonstruktion

Einen Großteil der statistischen Ungenauigkeit rufen die Bestimmung der Zielorte und der Trefferorte, sowie die Rekonstruktion der Ziele hervor. Eine Mehrfachbestimmung von Treffern und Zielen an einem Bild ergab, dass beide Orte mit einer statistischen Ungenauigkeit von 1,7 Pixeln (STABW) und damit 0,28 μm bestimmt werden können. Dies entspricht dem Einfluss auf die Zielgenauigkeit des Systems. Bei der Messung der Zielgenauigkeitsbestimmung waren drei Ortsbestimmungen nötig und mit der Gaußschen Fehlerfortpflanzung kann ihr Einfluss auf die ermittelte Zielgenauigkeit mit 0,5 μm abgeschätzt werden.

3.3.3.5 Zielbewegung

Als weiterer beeinträchtigender Einfluss auf die Genauigkeit der Zielbestrahlung muss die Bewegung der Ziele selbst berücksichtigt werden. Im Rahmen der Untersuchung der Bewegung von adhärent angewachsenen und MDC1-GFP exprimierenden Zellkernen in der Diplomarbeit von Tino Brüning [Brü08] ergab sich eine Diffusionskonstante $D = 1,866 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Daraus lässt sich abschätzen, dass sich Zellkerne nach 30 s, 1 min, 2 min und 5 min etwa um $\delta(30 \text{ s}) = 0,34 \mu\text{m}$, $\delta(1 \text{ min}) = 0,47 \mu\text{m}$, $\delta(2 \text{ min}) = 0,67 \mu\text{m}$ und $\delta(5 \text{ min}) = 1,06 \mu\text{m}$ bewegen. Es ist zu erwarten, dass sich die Ziele, die sich im Zellkern befinden, mindestens genauso weit bewegen. Um die Bewegung der Ziele in der Zelle abzuschätzen, wird die in der Diplomarbeit von Dr. Stefanie Girst betrachtete Focibewegung genutzt. Hier ergeben sich nach Kohlenstoffbestrahlung nach 30 s, 1 min, 2 min und 5 min Standardabweichungen der Distanzänderungen zwischen zwei Foci von $\sigma(30\text{s}) = 0,13 \mu\text{m}$, $\sigma(1 \text{ min}) = 0,16 \mu\text{m}$, $\sigma(2 \text{ min}) = 0,19 \mu\text{m}$ und $\sigma(5 \text{ min}) = 0,23 \mu\text{m}$ [Gir13]. Da die Focibewegungen deutlich kleiner ist als die Zellbewegung, wird angenommen, dass die Zielbewegung im Wesentlichen durch die Zellbewegung hervorgerufen wird.

Mit dem Vergleich der Zielorte bei Ziel- und Trefferbestimmung in der LCI-Methode kann die Zell- oder Zielbewegung bei der Bestimmung der Zielbestrahlungsgenauigkeit abgeschätzt werden. In dieser Zeitspanne, die bis zu 3,5 min betrug, wurde kein systematischer Drift beobachtet, der auf eine gerichtete Bewegung zwischen Zielen und Objektiv hindeuten würde. Es zeigte sich eine Zufallsverteilung der Abweichungen der Zielorte von 0,5 μm Breite (STABW). Berücksichtigt man die Unsicherheit der Ortsbestimmung mit etwa 0,4 μm , so kann man durch die Annahme von unabhängigen Fehlern den Einfluss der Zielbewegung mit etwa 0,3 μm abschätzen.

3.3.3.6 Strahlaflösung und aktive 50 Hz-Korrektur

Einen wesentlichen Einfluss auf die Zielgenauigkeit einzelner Ionen hat die Strahlfleckgröße. Die Strahlaflösung an SNAKE wird durch das ionenoptische Abbildungsvermögen der supraleitenden Multipollinse begrenzt. Die Verkleinerung beträgt etwa 1/100 in X-Richtung und 1/25 in Y-Richtung. Dies führt bei üblichen Objektschlitzöffnungen von 20 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ zu einer Strahlfleckgröße 0,55 $\mu\text{m} \times 0,4 \mu\text{m}$ (FWHM) an Luft [Dol05]. Im Lebendzellaufbau wird jedoch in der Regel ein größerer Strahlfleck von z.B. 0,58 $\mu\text{m} \times 0,86 \mu\text{m}$ (FWHM) beobachtet [Hab11]. Diese Verbreiterung des Strahlflecks ist nicht nur auf die Kleinwinkelstreuung der Ionen in der Materie vor der Zellebene (Kaptonfolie, Polypropylenfolie und Medium) zurückzuführen. Schnelle mechanische Bewegungen, die aufgrund eines Umbaus des

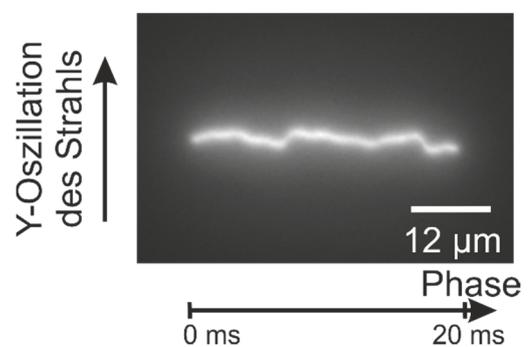


Abb. 3.11: Stabile Phasenbeziehung der Strahlbewegung in Y-Richtung zu Auslenkung des Strahls mit einer Frequenz von 50 Hz in X-Richtung.

Bestrahlungssetups stärker ausgeprägt sind, oder elektromagnetische Felder führen zu kleinen Strahlbewegungen und beeinträchtigen zusätzlich die Strahlauflösung. Einige dieser schnellen Bewegungen weisen u.a. eine stabile Phasenbeziehung zu der 50 Hz-Netzspannung auf. Diese Bewegung kann mit der Ausgabe eines Sägezahnsignals mit einer Periode von 20 ms und einer ausreichenden Belichtungszeit der Kamera sichtbar gemacht werden, bei der der Strahl als Linie erscheint (Abb. 3.11).

Bei der gezielten Bestrahlung dauert die Bestrahlung einige Perioden der Oszillation, wodurch die Streuung einzelner Bestrahlungspunkte verstärkt wird. Somit wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die erreichte Strahlauflösung nach Anwendung unterschiedlicher Korrekturmethode mittels Matrixbestrahlung auf Kernspurdetektoren bestimmt. Anschließend wurde die Methode gesucht, die einen optimalen Kompromiss zwischen Korrekturaufwand, geringer Strahlauflösung und verwendbarem Strahlstrom bietet.

Im Wesentlichen können zwei Arten der Korrektur unterschieden werden. Bei der Ersten, dem Austasten, wird durch phasenstarres Öffnen des Choppers der Strahlverlauf auf ein kurzes Phasenintervall beschränkt, in dem der Verlauf möglichst eben ist. Die Verkleinerung des Strahlflecks geht jedoch auf Kosten der Ionenrate.

Bei der zweiten Methode wird mit den Ablenkplatten gegengesteuert. Dabei ist die einfachste Möglichkeit passiv die erste Harmonische der Schwingung durch Anlegen eines Sinussignals zu kompensieren. Da hier schnelle kurze Sprünge nicht korrigiert werden, wird diese Methode meist in Kombination mit Austasten verwendet (Abb. 3.12).

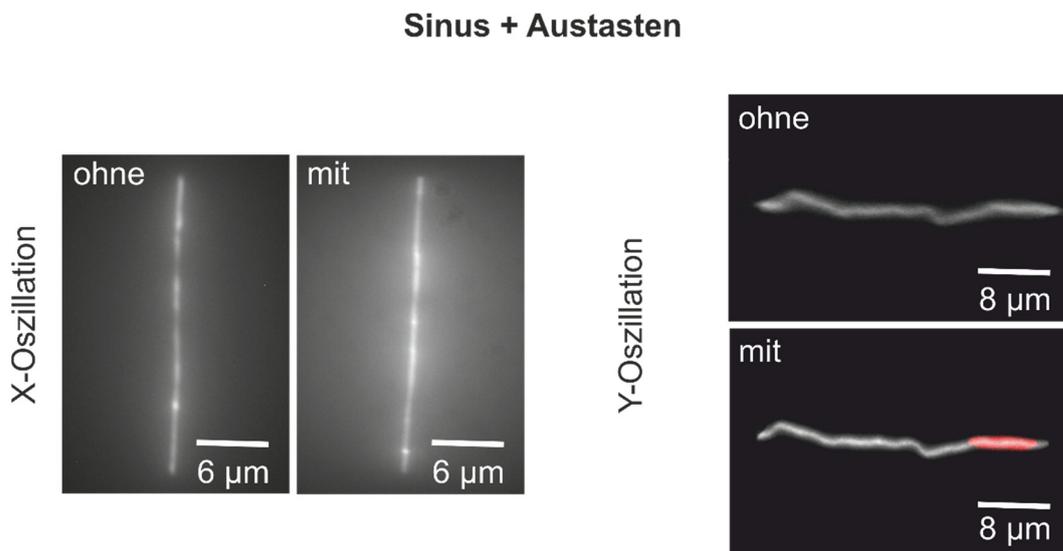


Abb. 3.12: Anwendung der „Sinus+Austasten“-Methode zur Korrektur von 50 Hz-Strahloszillationen. Als erstes wird die erste harmonische Schwingung der Strahloszillation mit einem Sinussignal kompensiert, das auf die Ablenkheit gegeben wird. Durch die Kombination mit Austasten wird der Strahl durch den Chopper auf glatte Phasenbereiche beschränkt (rot), wodurch aber die Ionenrate verringert wird.

Um auf das Austasten verzichten zu können und die volle Ionenrate zur Verfügung zu haben, wurde zusätzlich eine aktive Korrekturmethode entwickelt. Diese erfordert, dass der exakte Funktionsverlauf der Oszillation ermittelt wird, um diesen anschließend mit negativem Vorzeichen dem Strahl mit den Ablenkeinheiten aufzuprägen, mit dem Ziel die Störung zu kompensieren (Abb. 3.13). Zur Messung des Funktionsverlaufs können zwei Methoden verwendet werden. Bei der Ersten wird nach dem STIM („Scanning Transmission Ion Microscopy“)-Prinzip phasenaufgelöst eine Raster-scanabbildung der Stege eines Goldgitters durchgeführt. Die Strahloszillation führt zu einer Verschiebung des aufgenommenen Objekts mit der Phase. Man erhält ihren Funktionsverlauf durch Ermittlung der Objektposition in Abhängigkeit der Phase. Die Korrektur mit STIM ist aufwendig, da eine Mehrkanal-Datenaufnahme erforderlich ist und auch die Analyse der Daten einige Arbeitsschritte benötigt. Die zweite Lösung nutzt kurzzeitiges phasenstarrs Öffnen des Choppers. Damit wird der phasenstarr ausgetastete Strahl auf einen YAG-Szintillator geschossen und dessen Position aus einer Kameraaufnahme bestimmt. Dieses Vorgehen wird im folgenden Text als „Stroboskop“-Methode bezeichnet. Verschiebt man nun das Phasenfenster in kleinen Schritten über die volle Periode und trägt die resultierende Strahlposition über die Phase auf, erhält man wieder die Funktion der Oszillation. In Abb. 3.13 wird die Kompensation der 50 Hz-Oszillation mittels der aktiven Korrektur gezeigt.

Aktive Korrektur

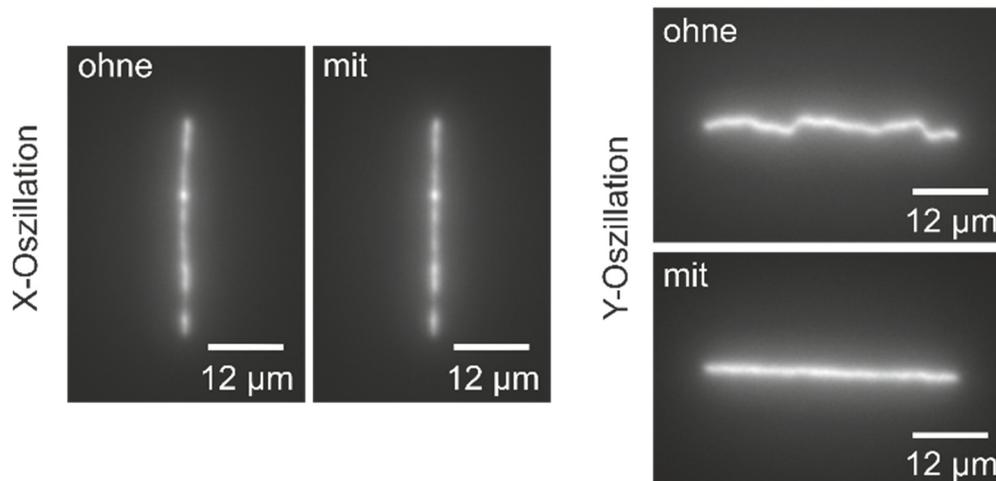


Abb. 3.13: 50 Hz-Strahloszillation und aktive Korrektur. Der Strahl wird auf dem YAG-Szintillator mit 50 Hz in X- bzw. Y-Richtung gescannt. Die 50 Hz-Oszillationen führen zu Schwankungen in der Linie. Bei der aktiven Korrektur wird der Funktionsverlauf der Strahloszillation genau bestimmt und mit den Ablenkeinheiten anschließend kompensiert.

Die Strahlaufösung wurde für alle Korrekturmethode mittels Bestrahlung eines Punktmusters auf eine Polycarbonatfolie vermessen. Das Auswerteprinzip ist in Abb. 3.14 gezeigt. Durch Ätzen der Folie mit einer alkoholischen Natronlauge werden die Ionentrefferorte an den Ein- bzw. Austrittsseiten als Kegel sichtbar. Die Kegelpositionen wurden halbautomatisch mit dem „Particle Analyzer“-PlugIn der Opensource-Software „ImageJ“ [ImageJ] auf der Eintrittsseite ermittelt. Um nun jedem Kegelort

seinen Soll-Trefferort zuzuweisen, wird ein regelmäßiges Matrixmuster angefitet, welches die Soll-Trefferorte repräsentiert. Wenn ein Soll-Trefferort von zwei Kegeln besetzt wird, und eine Fehlstelle, d.h. Gitterort ohne Kegel, im Umkreis von 15 μm erkennbar ist, wird der nächstgelegene Kegel der Fehlstelle zugeordnet. Wenn keine Fehlstelle vorhanden ist, wird ein Doppeltreffer gezählt und beide Kegelabstände dem Gitterort zugeordnet. Aus dem Histogramm der X- bzw. Y-Abstände ergibt sich mit dem Fit einer Gauß-Verteilung die Strahlbreite σ_x und σ_y und durch $FWHM = 2 \sqrt{2 \ln 2} \cdot \sigma$ die volle Halbwertsbreite $FWHM_x$ und $FWHM_y$. Für die Unsicherheitsabschätzung von $\Delta FWHM = 0,16 \mu\text{m}$ wird als größter Fehlereinfluss angenommen, dass die Grubenorte auf einen Pixel (= 0,16 μm) genau bestimmt werden.

Mit diesem Vorgehen ergibt sich aus verschiedenen Experimentierzeiten folgende in Tab. 3.5 dargestellte Strahlaufösung. $\overline{\Delta FWHM}$ ist die Standardabweichung, da der Umfang der Auswertungen pro Strahlzeit mit 2-3 Replikaten sehr gering ist. Da die Standardabweichungen meist unter dem Fehler der Strahlaufösungsermittlung von 0,16 μm liegen, wird letzterer als Obergrenze des Fehlers der Strahlaufösung angenommen.

50 Hz-Korrekturart	Strahlzeit	\overline{FWHM}_x [μm]	$\overline{\Delta FWHM}_x$ [μm]	\overline{FWHM}_y [μm]	$\overline{\Delta FWHM}_y$ [μm]	N
Stroboskop	Januar 2016	0,99	0,08	1,24	0,05	2
Stroboskop	Januar 2015	0,92	0,03	0,86	0,05	3
Stroboskop	November 2014	0,90	-	0,91	-	1
STIM	August 2014	0,74	0,04	0,82	0,04	3
STIM	April 2014	0,72	0,03	1,40	0,17	3
Sinus + Austasten	Dezember 2013	0,63	0,02	0,94	0,03	3
Sinus + Austasten	August 2013	0,98	0,16	1,66	0,27	2
Ohne Korrektur	Dezember 2013	0,93	0,01	2,19	0,06	2

Tab. 3.5: Strahlaufösung über verschiedene Strahlzeiten und nach unterschiedlichen Korrekturmethode der 50 Hz-Oszillationen. Die angegebenen Fehler entsprechen dem Fehler des Mittelwerts. N ist die Anzahl der ausgewerteten Positionen.

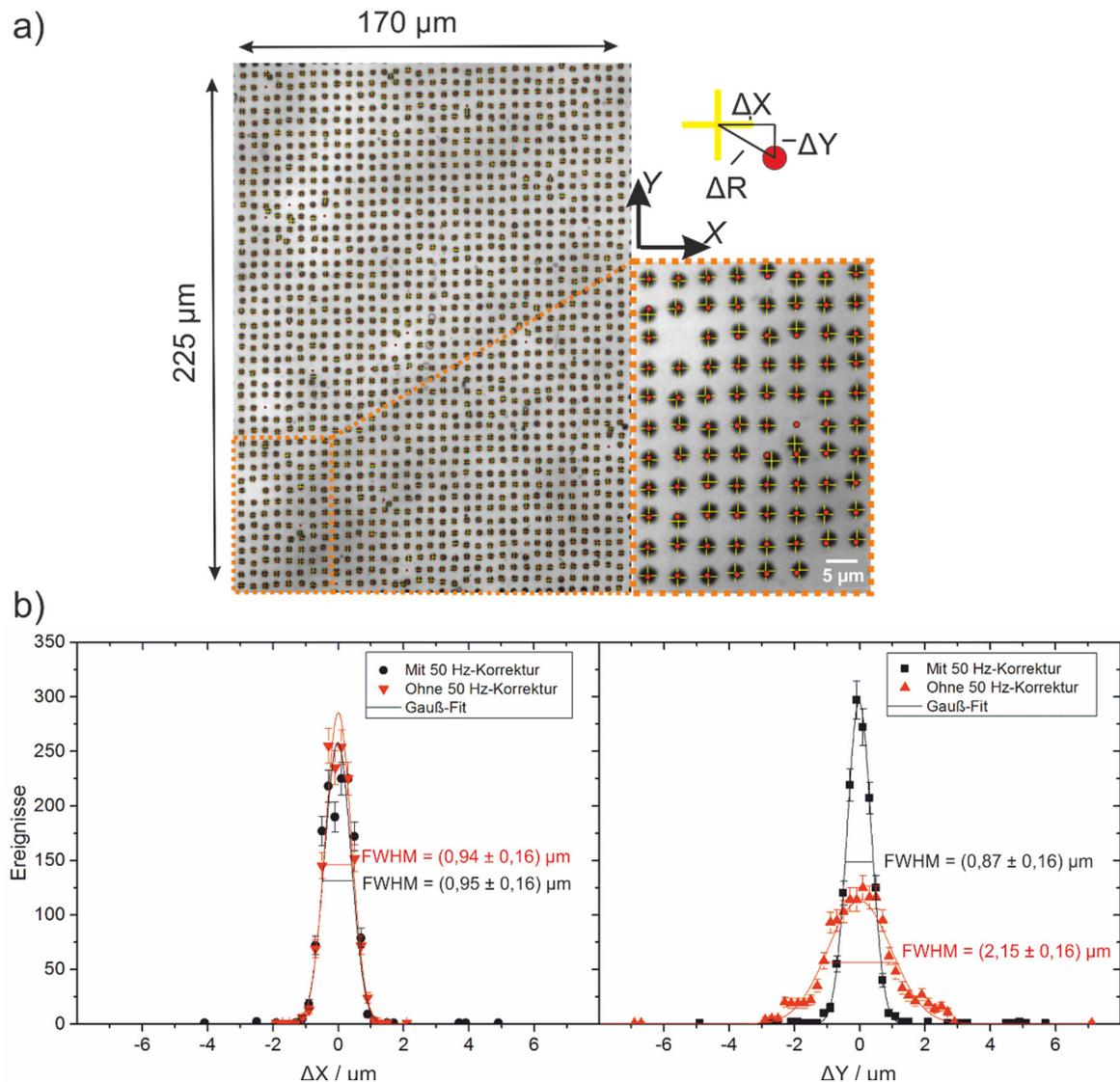


Abb. 3.14: Ermittlung der Strahlaufösung.

a) Auflicht-Mikroskopbild (40x Objektiv mit Num. Apertur 0,95 und 1,0 Kameraadapter, Skalierung = $0,16 \mu\text{m}/\text{Pixel}$) einer mit einem $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Matrixmuster und einem Kohlenstoffion pro Punkt bestrahlten Polycarbonatfolie. Nach Ätzen entstehen an den Ioneneinschlagsorten Ätzgruben, die als dunkle Punkte erkennbar sind. Nach Bestimmung der Grubenorte (gelbe Kreuze) mittels des „Particle Analyzer“-Plugins von ImageJ [ImageJ], wird die optimale Soll-Treffermatrix mit $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ angefitzt (rote Punkte).

b) Die Abweichung in X- und Y-Richtung jedes Grubenpunktes zu seinem Sollpunkt wird als Histogramm aufgetragen. Es wird eine Gaußverteilung angefitzt, deren Breite der Strahlaufösung entspricht. Die Diagramme zeigen zwei Verteilungen, bei denen die 50 Hz-Oszillationen korrigiert (schwarz) oder nicht korrigiert (rot) wurden. In X-Richtung ergibt sich mit einer Breite von $(0,94 \pm 0,16) \mu\text{m}$ (FWHM) keine Verbesserung der Strahlbreite. In Y-Richtung wird die Strahlbreite von $(2,15 \pm 0,16) \mu\text{m}$ auf $(0,87 \pm 0,16) \mu\text{m}$ deutlich verringert. Für die Unsicherheitsabschätzung von $0,16 \mu\text{m}$ wird angenommen, dass die Orte auf einen Pixel genau bestimmt werden.

Im Mittel ergeben sich für die einzelnen 50 Hz-Korrekturarten folgende Werte für die Strahlaufösung:

Korrekturart	\overline{FWHM}_x [μm]	$\overline{\Delta FWHM}_x$ [μm]	\overline{FWHM}_y [μm]	$\overline{\Delta FWHM}_y$ [μm]	Nutzbarer Phasenanteil	Zählrate [kHz]
Stroboskop	0,94	0,06	1,00	0,19	1	3,5
STIM	0,73	0,04	1,11	0,34	1	2,3
Sinus+Austasten	0,77	0,21	1,23	0,42	0,25	0,9
ohne Korrektur	0,93	0,01	2,19	0,06	1	2,0

Tab. 3.6: Mittlere Strahlaufösung für die verwendeten Korrekturmethode. Die angegebenen Fehler sind Fehler des Mittelwerts.

Die Strahlaufösung in Y-Richtung wird durch alle 50 Hz Korrekturen von 2 μm auf 1 μm halbiert. In X-Richtung sind kaum 50 Hz-Oszillationen ausgeprägt, wodurch die Strahlaufösung schon unter 1 μm liegt. Nur durch die STIM-Methode konnte eventuell eine leichte Verbesserung erreicht werden. Jedoch rechtfertigt diese nicht den hohen Aufwand der STIM-Methode, weshalb die Stroboskopmethode für die folgenden Strahlzeiten zur 50 Hz-Korrektur verwendet wird.

Zusätzlich zur Strahlaufösung wurden anhand der $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Matrixbestrahlungen der Polycarbonatfolien die Anzahl an Doppeltreffern, Leerstellen und auch der Anteil an großen radialen Abweichungen von $> 3 \mu\text{m}$ und $> 5 \mu\text{m}$ bestimmt, der durch den Fit einer einzigen Gaußverteilung nicht beschrieben wird. Hierdurch wird ein Großteil der Einflüsse des Strahls auf die Qualität einer Zielbestrahlung bestimmt. Nimmt man alle Bestrahlungen zusammen, erhält man folgende Ergebnisse:

Doppeltrefferrate	Leerstellenrate	Anteil der Treffer mit radialer Abweichung größer als		
		1,5 μm	3 μm	5 μm
(0,33 \pm 0,14) %	(0,46 \pm 0,12) %	(2,2 \pm 0,2) %	(0,68 \pm 0,09) %	(0,29 \pm 0,06) %

Tab. 3.7: Trefferstatistik der Folienbestrahlungen zur Strahlaufösungsbestimmung.

Der angegebene Fehler ist der Fehler des Mittelwerts, der sich bei 15 ausgewerteten Matrixfeldern ergibt. Der Fehler ist größer als der Fehler, der sich mit der Zählstatistik ergibt. Die Gesamtzahl an rekonstruierten Trefferkegeln beträgt 21130. Unter der Annahme, dass Leerstellen und zugeordnete Treffer mit Abstand größer als 3 μm keine Schnittmenge sind, erhält man, dass etwa 2,6 % (1 %) der Ionen strahlbedingt nicht eine Fläche mit Durchmesser 3 μm (6 μm) treffen, wobei sie von dem Ionendetektor gezählt werden. Dies wird nicht von der Strahlbreite beschrieben. Denn die daraus erwartete Wahrscheinlichkeit $P(R)$ für Ionentreffer mit einem radialen Abstand R von größer als 1,5 μm kann mit

$$\begin{aligned}
 P(R) &= \frac{1}{2\pi \cdot \sigma_x \sigma_y} \iint_{x^2+y^2 \geq R^2} e^{-\left(\frac{x^2}{2\sigma_x^2} + \frac{y^2}{2\sigma_y^2}\right)} dx dy = \\
 &= \frac{1}{2\pi \cdot \sigma^2} \int_0^{2\pi} \int_R^\infty r \cdot e^{-\left(\frac{r^2}{2\sigma^2}\right)} dr d\varphi = e^{-\frac{R^2}{2\sigma^2}} = 0,2\%
 \end{aligned} \tag{3.5}$$

berechnet werden und liegt mit 0,2% deutlich unter der Rate der beobachteten Treffer mit Abstand größer 1,5 μm von 2,2%. Dabei wird vereinfachend $\sigma_x = \sigma_y = \sigma = 0,44 \mu\text{m}$ angenommen, was der Größeren der beiden mittleren Strahlbreiten

$$\overline{\sigma_x} = (0,34 \pm 0,06)\mu\text{m}, \quad \overline{\sigma_y} = (0,44 \pm 0,11)\mu\text{m}$$

entspricht, die sich bei den 50 Hz-korrigierten Strahlbreiten ergeben. Gegeben ist der Fehler des Mittelwerts. Für 3 μm und 5 μm Abstand ist die Wahrscheinlichkeit bei unter 10^{-10} . Spontane Ereignisse im Ionendetektor, die zu einem vermeintlich falsch positiven Ionensignal führen, wurden auf unter 0,1 Hz bestimmt, sodass in einem $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -Matrix bestrahlten $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ -Feld bei einer Zählrate von etwa 1 kHz, nur eine Leerstelle (das entspricht 0,01 %) durch sogenannte Dunkelereignisse zu erklären ist.

Bei der Zielgenauigkeit einzelner Ionen ist anzunehmen, dass die oben bestimmte Strahlbreite voll mit etwa 0,4 μm eingeht.

Dagegen wurde bei der Messung der Zielgenauigkeit jeder Punkt eines Kreuzes mit 10 Ionen bestrahlt, wodurch der Schwerpunkt des entstehenden Focus und somit des Treffers genauer definiert sein sollte. Der Beitrag der Strahlfleckgröße zur Trefferortsunsicherheit sollte daher um das Inverse der Wurzel der Ionenanzahl reduziert sein. Betrachtet man analogerweise, dass der Ort des Trefferkreuzes von 17 Punkten definiert wird, ist der Einfluss der Ortsunsicherheit der Einzelfoci insgesamt um den Faktor $\frac{1}{\sqrt{170}}$ reduziert. Da nicht alle Punkte immer zur Kreuzbestimmung beitragen, wird der Einfluss der Einzelpunktverteilung auf die Kreuzposition, die durch den Strahlfleck hervorgerufen wird, auf unter 0,1 μm geschätzt.

3.3.3.7 Langsame Strahlbewegungen

Langsame Strahlbewegungen führen in der Zeit zwischen Offsetbestimmung und Bestrahlung zu einer Änderung des Offsets und so zu systematischen Abweichungen der Zielgenauigkeit. Zur Untersuchung dieser Bewegungen wurde das Szintillationslicht des Strahls auf einem YAG-Szintillator sichtbar gemacht und mit dem 40x Objektiv (LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr Ph2 M27, Zeiss AG) über den 0,63x Kameraadapter mit der AxioCam MRm (Zeiss AG) über längere Zeit beobachtet (Skalierung = 0,26 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$). Mit der Durchführung von sog. Zeitserien, Bildaufnahmen mit bestimmten Zeitabständen, und einer anschließenden Strahlpositionsbestimmung im Kamerabild mit Hilfe eines 2D-Gaussfits, lässt sich die Strahlbewegung analysieren.

In der kurzen Zeitserie (vgl. Abb. 3.15) mit Bildabständen von 0,1 s über 5 min zeigt sich, dass der Strahl sich in X-Richtung teilweise periodisch in 30 s mit einer Amplitude von 0,2 μm verschiebt. In Y-Richtung ist ähnliches Verhalten nur mit einer kleineren Amplitude von 0,1 μm zu erahnen. Auffällig ist hier jedoch ein langsamer Drift, um fast 1 μm vom Anfang der Zeitserie bis zum Ende. Mit der Breite der Linien von etwa 0,1-0,15 μm lässt sich eine Ungenauigkeit der Positionsbestimmung von etwa $\pm 0,08 \mu\text{m}$ und damit ca. 0,25 Pixel abschätzen. 0,25 Pixel entsprechen dabei ungefähr der in Kap. 3.3.3.2 beobachteten Ungenauigkeit der Strahlortsbestimmung.

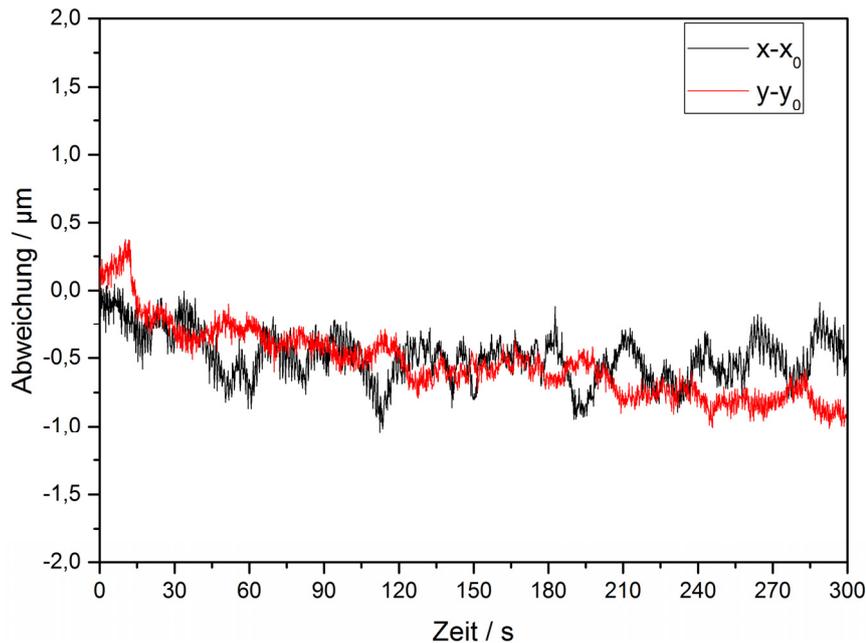


Abb. 3.15: Schnelle Zeitserienaufnahme des Strahlortes über 5 min mit Zeitabstand $\Delta t = 0,1 \text{ s}$. Gegeben sind die X- und Y-Komponente der Ortsabweichung des Strahlortes (x/y) am Zeitpunkt t zum Startort (x_0/y_0). Das Rauschen der Kurven gibt ein Maß für die Ungenauigkeit der Positionsbestimmung, von etwa 0,1 μm . Über 5 min ist ein leichter Drift in Y-Richtung (rot) um fast 1 μm zu erkennen und schnellere Schwankungen um bis zu 0,5 μm innerhalb von 15 s. In X-Richtung (schwarz) ist der Drift über 5 min mit etwa 0,25 μm deutlich geringer. Dafür sind Schwankungen mit einer Periodizität im Rahmen von 30 s und Amplitude von bis zu 0,3 μm zu beobachten.

In längeren Zeitserien über 30 min bis zu 75 min (Abb. 3.16) verlaufen die Kurven der x-Abweichungen unterschiedlich. Es lässt sich jedoch in x-Richtung beobachten, dass bis zu 15 min nur ein leichter mittlerer Drift in der Größenordnung von 0,25 μm vorherrscht. Darum schwankt der Strahl aber in 2 min teilweise bis zu 0,6 μm . Nach 15 min zeigt sich eine Verstärkung des mittleren Drifts. In Exp2 beträgt er 2 μm in 12 min. Die y-Abweichungen scheinen teilweise ähnliche Verläufe zu haben, wenn man die Kurven in der Zeit verschiebt. Jedoch ist die Statistik zu klein, um das signifikant zu bestätigen. Es ist teilweise ein langsames Pendeln im Rahmen von 30 min mit einer Amplitude von bis zu 0,4 μm zu beobachten. Zusätzlich zeigen sich aber auch schnellere Abweichungen von etwa 0,4 μm in 2 min. Die starke Abweichung in Exp3 zwischen 65 min und 70 min von 2 μm fällt nach anfänglich ruhiger Lage deutlich ins Auge.

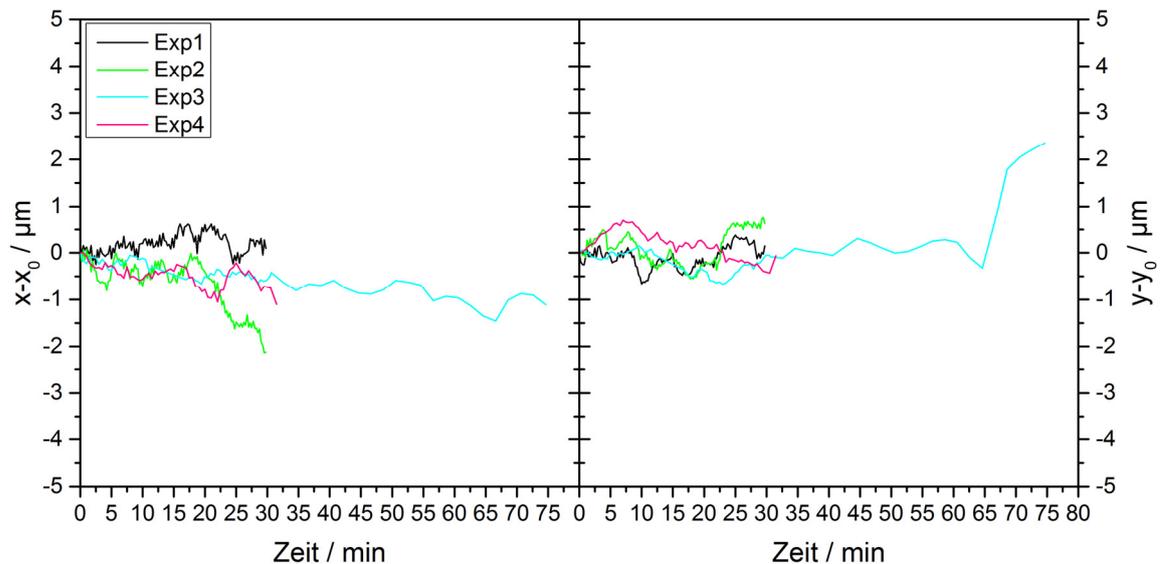


Abb. 3.16: X- und Y-Ortsabweichungen des Strahls in Zeitserien über 30 min bis zu 75 min. Zeitabstand 15 s bei Exp1 und Exp2. 30 s bei Exp3 und Exp4. Oben ist die Abweichung in x-Richtung gezeigt. Über die ersten 15 min ist kein Strahldrift zu erkennen. Jedoch schwankt der Strahl bis zu $0,6 \mu\text{m}$ in 2 min. Nach 15 min wird der Strahldrift stärker und beträgt bis zu $2 \mu\text{m}$ in 12 min (Exp2).

Um die Auswirkung der Strahlbewegung auf die Zielbestrahlungsgenauigkeit abzuschätzen, wird der Ortsunterschied zwischen dem Zeitpunkt $t+T$ und t für alle Zeiten t der Strahlbewegungskurve berechnet. Die Zeitspanne T steht dabei für die Zeit, die von der für die Zielbestrahlung essentiellen Offsetbestimmung bis zur Bestrahlung benötigt wird. Berechnet man für alle Kurven der Abb. 3.15 und Abb. 3.16 und für exemplarische Zeiten T von 10 s, 15 s bis 120 s den Mittelwert und die Standardabweichung der Abweichungen, so ergeben sich die in Abb. 3.17 dargestellten Werte.

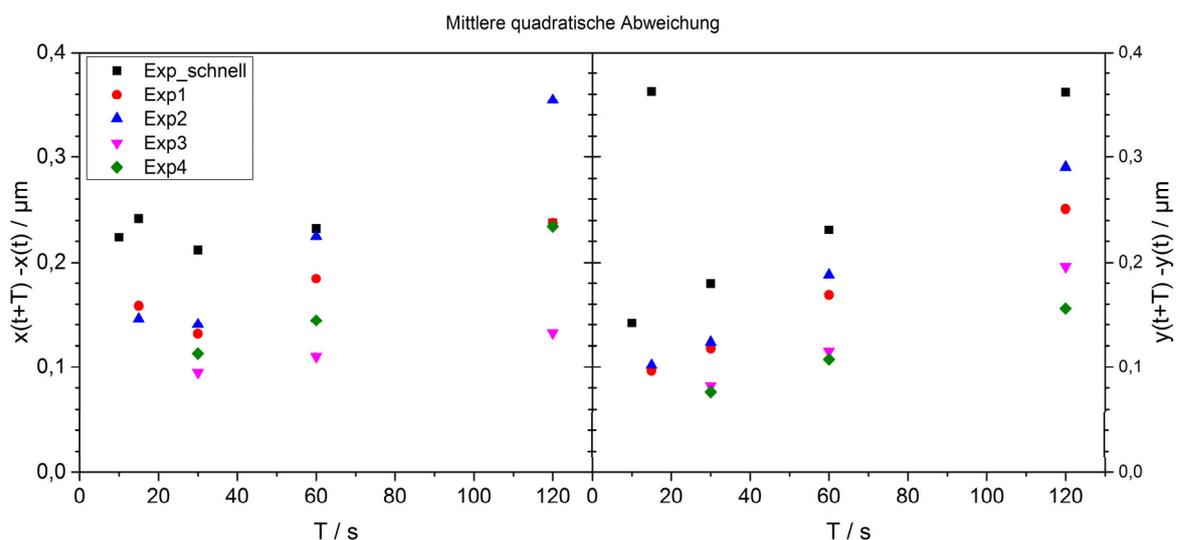


Abb. 3.17: Abschätzung des Einflusses der Strahlbewegung. Es wurden die Kurven aus Abb. 3.15 und Abb. 3.16 mit einem Zeitabstand T abgetastet. Es zeigt sich, dass bei steigendem T die mittlere quadratische Abweichung wächst. Dies spiegelt die Auswirkung des mittleren Drifts wieder, der in y-Richtung größer ist als in x-Richtung. Die Streuung der Abweichungen nimmt mit zunehmendem T tendenziell zu, wobei in x-Richtung kein eindeutiger Vorteil zu kurzen Zeiten sichtbar ist.

Hier zeigt die Tendenz, dass ab einem Zeitabstand T von 60 s, die mittlere quadratische Abweichung in y -Richtung signifikant ansteigt. Auch in x -Richtung lässt sich ein Anstieg über die einzelnen Kurven erahnen. Die Ursache liegt größtenteils im langsamen, gerichteten Drift, der in Abb. 3.15 und Abb. 3.16 zu erkennen war. Unter 30 s ist der Einfluss der Streuung eher konstant. Jedoch ist der Ausreißer bei $T = 15$ s durch die Streuung verursacht, was bestätigt, dass die kurzen Anstiegsflanken der Abweichungen in Abb. 3.15 in dem Bereich von 15 s liegen.

Das Ergebnis zeigt, dass es für eine gute Treffergenauigkeit essentiell ist, die Zeit zwischen Offsetbestimmung und Bestrahlung zu minimieren. Aus diesem Grund wird der Offset erst nach der Zieldefinition direkt vor Bestrahlung bestimmt. Für Zeitabstände zwischen Offsetbestimmung und Bestrahlung von unter 30 s lässt sich eine mittlere quadratische Abweichung von $(0,162 \pm 0,019)$ μm in X -Richtung und $(0,14 \pm 0,04)$ μm in Y -Richtung bestimmen. Diese Abweichung wird als durch die Strahlbewegung hervorgerufener Beitrag zu der statistischen Unsicherheit der Zielgenauigkeit angenommen.

Die beobachtete Strahlbewegung kann zwei Hauptursachen haben. Einerseits eine Strahlbewegung durch z.B. mechanische Bewegungen der supraleitenden Multipolrinne im Flüssig-Helium-Kryostaten. Andererseits eine einfache Bewegung des Mikroskops gegen den Kryostaten. Um diese Bewegungen in Abhängigkeit zueinander zu untersuchen, wurde eine Zeitserie über 30 min durchgeführt

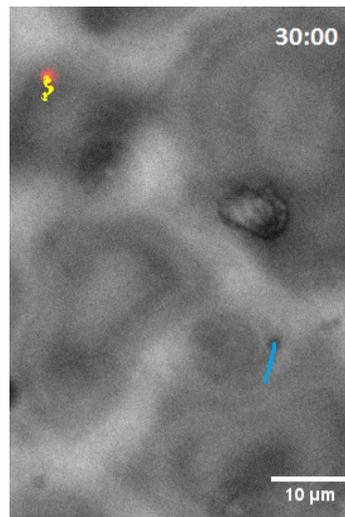


Abb. 3.18: Strahl- und Nasenbewegung bezüglich des Mikroskopobjektives über 30 min. Es wird ein überlagertes Bild des Strahls auf dem YAG-Szintillator (rot) und der Kaptonfolie (grau) gezeigt. Verfolgt man beide Strukturen im 5 s Abstand über 30 min ergibt sich die Strahlbewegung (gelbe Trajektorie) und die Mikroskopbewegung (blaue Trajektorie).

bei der gleichzeitig der Strahl und die Struktur der Kaptonfolie auf der Strahlaustrittsnase im Auflichtmodus aufgenommen wurden (vgl. Abb. 3.18). Die X - und Y -Komponente der Trajektorien beider Objekte sind in Abb. 3.19 aufgezeichnet. In X -Richtung ist dabei zu beobachten, dass sich das Mikroskop etwa $1,5 \mu\text{m}$ in 30 min bewegt und der Strahl sich auf der Kamera nur um $0,5 \mu\text{m}$. Die Differenz zwischen der Strahl („Strahl bezgl. Objektiv“) und der Mikroskopbewegung („Nase bezgl. Objektiv“) zeigt, dass es eine von der Mikroskopbewegung unabhängige Bewegungskomponente („Strahl bezgl. Nase“) gibt, die hier der Mikroskopbewegung entgegengesetzt ist. Diese Komponente führt auch zu einem Strahlversatz mit bis zu $0,5 \mu\text{m}$ in 1 min. In Y -Richtung sind mit $5 \mu\text{m}$ (Mikroskop) und $2 \mu\text{m}$ (Strahl bezgl. Nase) in 30 min die Drifts stärker ausgeprägt und ebenfalls entgegengesetzt. Schnelle Versätze sind hier jedoch nicht zu erkennen und es ist auch keine einzelne Ursache erkennbar.

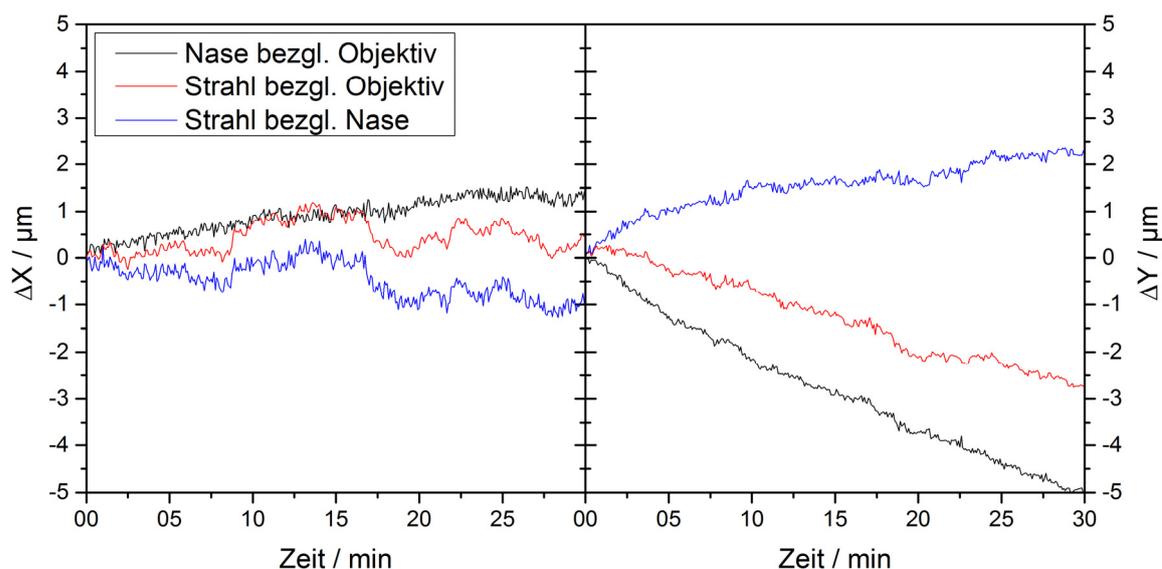


Abb. 3.19: X- (links) und Y-Komponente (rechts) der Strahl- (rote Linie) und Mikroskopbewegung (schwarze Linie) aus Abb. 3.18. Die Differenz zwischen beiden Bewegungen ist ungleich 0. Somit verschiebt sich der Strahl mit einer von der Mikroskopbewegung unabhängigen Komponente (blaue Linie). Bei der X-Komponente lässt sich erkennen, dass ein gleichmäßiger Drift um $1,5 \mu\text{m}$ über 30 min bei der Mikroskopbewegung vorherrscht. Der Strahl unterliegt einem kleineren entgegengesetzt gerichteten Drift, so dass sich dieser nur um $0,5 \mu\text{m}$ in 30 min in X-Richtung bewegt hat. Jedoch scheinen schnelle Abweichungen mit bis zu $0,5 \mu\text{m}$ in 1 min rein strahlbedingt zu sein. In Y-Richtung sind die Drifts stärker ausgeprägt (Mikroskop: $5 \mu\text{m}$ in 30 min, Strahl bezgl. Nase: $2 \mu\text{m}$ in 30 min). Wobei der Strahl auch hier in die entgegengesetzte Richtung driftet. In Y-Richtung sind hingegen keine stärkeren kurzzeitigen Ausschläge in beiden Bewegungen zu erkennen.

Als Ursache für die zwei Bewegungen werden thermische und mechanische Schwankungen vermutet. Schnelle kleine Bewegungen werden vermutlich durch Luftbewegung in der Experimentierhalle erzeugt, die über das Halsrohr oben am Kryostaten die Linse bewegen oder an den Stützen des Mikroskops angreifen. Die Kryostatwände sind ca. 1 m hoch und bestehen aus Stahl, der einen Längenausdehnungskoeffizienten von ca. $10 \mu\text{m}/\text{K}\cdot\text{m}$ bei Raumtemperatur hat. Somit reicht es aus, dass sich eine Seite um $0,1^\circ\text{C}$ stärker abkühlt oder erwärmt, damit es zu Bewegungen in der Größenordnung von $1 \mu\text{m}$ kommt. Das Mikroskop steht ebenfalls auf Stahlstützen von etwa 30 cm und Aluminiumschienen (Ausdehnungskoeffizient bei Raumtemperatur = $20 \mu\text{m}/\text{K}\cdot\text{m}$) von etwa 30 cm Höhe, wodurch ebenfalls Bewegungen im Bereich von $1 \mu\text{m}$ bei $0,1^\circ\text{C}$ Temperaturänderung zu erwarten sind.

Eine weitere für den Strahldrift in Y-Richtung verantwortliche Komponente kann auch das Sinken des Flüssigheliumspiegels sein. Es wird beobachtet, dass in etwa 48 h der Heliumstand von der Oberseite des Flüssigheliumbehälters bis zu dem Flansch sinkt, der zum Linsenkompartiment führt (Abb. 3.20, rot). Die Höhendifferenz ist dabei etwa 0,4 m, damit verringert sich der Heliumlevel um etwa 0,8 cm pro Stunde. Smit wird die Höhe des Wandbereichs, der oberhalb des Heliumlevels liegt und einen Temperaturverlauf von 4 K bis zum Flüssigstickstoffschild mit 77 K vollzieht, um $\Delta L_{\text{He}} = 0,8 \text{ cm}$ größer. Die Temperaturänderung des Heliumtanks über diese Höhe resultiert in einer Längenänderung und damit einer Linsenbewegung. Für eine grobe

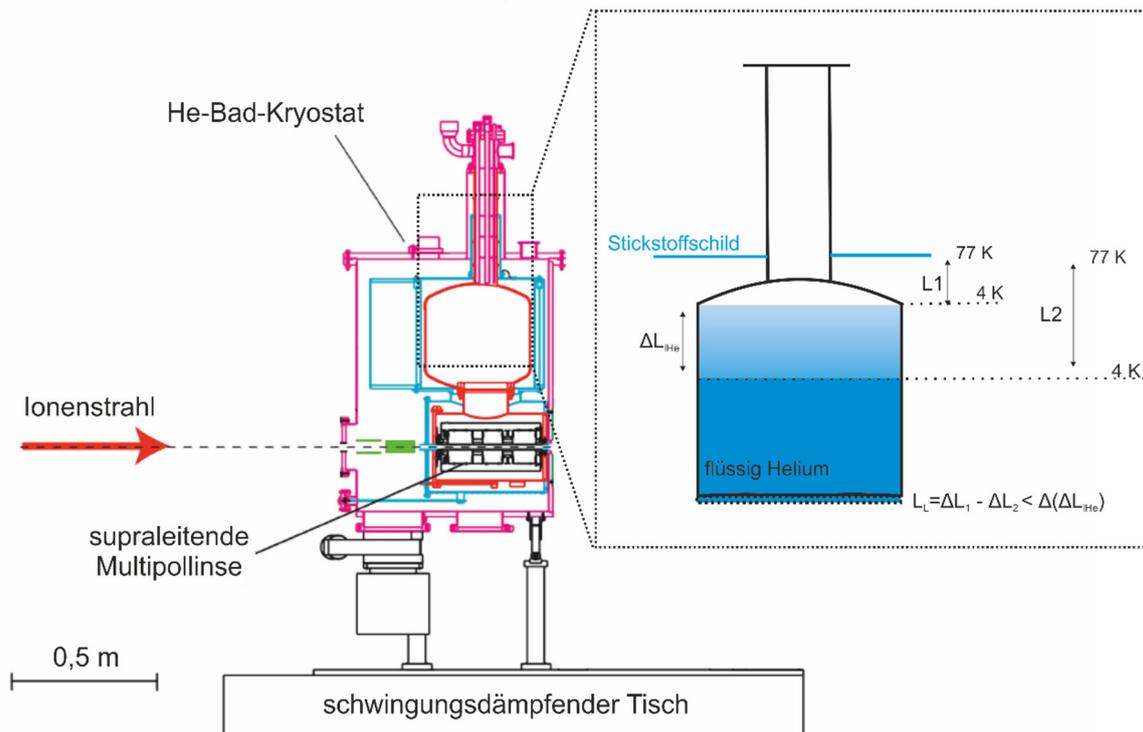


Abb. 3.20: Seitenansicht des Helium-Bad-Kryostaten von SNAKE. Die supraleitende Multipollinse befindet sich im unteren Teil des Flüssigheliumbehälters (rot) und ragt etwa 1 m in den Kryostaten. Der Temperaturgradient wird eindimensional nur in der Höhe betrachtet. Bei Änderung des Flüssigheliumpegels um ΔL_{He} wird der Teil der Wandhöhe mit dem Temperaturverlauf von 77 K zu 4 K von L_1 auf $L_2 = L_1 + \Delta L_{\text{He}}$ länger. Durch die unterschiedlichen Längen ist auch die thermische Kontraktion $\Delta L_2 > \Delta L_1$ unterschiedlich, die durch das Abkühlen bis auf 4 K hervorgerufen wird. Dies führt zu einer gerichteten Linsenbewegung L_L nach unten. Als obere Abschätzung wird die Längenänderung $\Delta(\Delta L_{\text{He}})$ des Tankstücks betrachtet bei dem sich der Heliumlevel um ΔL_{He} ändert als ob es von 4 K auf 77 K erwärmt wird.

Abschätzung der Größenordnung wird vereinfacht die Längenänderung eines Stahlstabes der Länge 0,8 cm bei Erwärmung von 4 K auf 77 K betrachtet. Die Längenänderung lässt sich nach [Cer13] mit

$$\Delta(\Delta L_{\text{He}}) \approx \Delta L_{\text{He}} \cdot \alpha_m \Big|_{t_1}^{t_2} \cdot (t_2 - t_1) \quad (3.6)$$

abschätzen, wobei ΔL_{He} der Länge entspricht, die von $t_1 = 23 \text{ K}$ auf $t_2 = 77 \text{ K}$ erwärmt wird und für Baustahl der mittlere Längenausdehnungskoeffizient $\alpha_m \Big|_{t_1}^{t_2} = 3,14 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{1}{\text{K}}$ beträgt. Somit ergibt sich für $\Delta L_{\text{He}} = 0,8 \text{ cm}$ eine resultierende Längenänderung von etwa $\Delta(\Delta L_{\text{He}}) \approx 1,7 \mu\text{m}$. So lässt sich theoretisch allein durch die Änderung des Heliumstandes in dem Kryostaten ein Strahldrift von bis zu $1,7 \mu\text{m/h}$ erwarten.

Zur Belegung dieser Theorie wurde eine mehrfache Strahlortsbestimmung bezüglich der Oberkante der Strahlaustrittsnase in Abhängigkeit des Heliumstandes innerhalb von drei Füllungszyklen vollzogen. Diese ergab folgende mittlere Strahlbewegung in X- und Y-Richtung:

Heliumfüllstandsänderung	Zeit [hh:mm]	Mittlere Strahlbewegung	
		X [$\mu\text{m}/\text{h}$]	Y [$\mu\text{m}/\text{h}$]
70% → 63% (1)	04:53	0,4	3,2
62% → 45% (2)	13:12	0,7	-2,3
45% → 40% (2)	04:16	-0,4	3,6
40% → 25% (2)	10:03	0,1	1,4
43% → 24% (3)	13:21	-0,1	1,5

Tab. 3.8: Mittlere Strahlbewegung in Abhängigkeit des Füllstandes während drei Kryostatfüllungszyklen. Es ergibt sich in X-Richtung eine mittlere Strahlbewegung von $(0,1 \pm 0,2) \mu\text{m}/\text{h}$ und Y-Richtung von $(1,5 \pm 1,2) \mu\text{m}/\text{h}$.

In X-Richtung ist die Bewegung im Mittel $(0,1 \pm 0,2) \mu\text{m}/\text{h}$ und somit im Rahmen des Fehlers des Mittelwerts mit 0 vereinbar. In Y-Richtung ergibt sich mit $(1,5 \pm 1,2) \mu\text{m}/\text{h}$ ein mittlerer Drift in der erwarteten Größenordnung des oben abgeschätzten Strahldrifts. Jedoch ist die Richtung, entgegen der Erwartung, bis auf eine Ausnahme (62% → 45%) positiv. Somit scheint der Heliumstand nicht dominant die Höhe der Multipollinse zu beeinflussen. Es wird vermutet, dass es an der Aufhängung des Stickstofftanks an der Kryostataußenseite zu Erwärmung kommt, deren Ausdehnung die Ausdehnung des Flüssigheliumreservoirs innerhalb des Kryostaten überwiegt.

3.3.3.8 Fazit der Einflüsse auf die Zielgenauigkeit

In Tab. 3.9 sind alle ermittelten und quantifizierten Unsicherheiten und ihr Beitrag zu der Unsicherheit der in Kap. 3.3.2.2 in Zellen bestimmten Zielgenauigkeit angegeben. Nimmt man alle genannten Unsicherheiten zusammen, so erhält man eine Gesamtunsicherheit von etwa $(0,1 \pm 0,7) \mu\text{m}$. Das spiegelt die Breite der bestimmten Zielgenauigkeit von bis zu $0,8 \mu\text{m}$ gut wieder. Zwar ist ein systematischer Fehler von etwa $0,1 \mu\text{m}$ bekannt, dieser erklärt jedoch nicht die beobachtete mittlere Abweichung von bis zu $0,37 \mu\text{m}$. Es wird vermutet, dass diese systematische Abweichung wohl durch die in Kapitel 3.3.3.7 langsamen Strahlbewegungen hervorgerufen wird. Hier zeigten sich, speziell in der unruhigeren X-Richtung, Bewegungen von bis zu $0,5 \mu\text{m}$ in 10 s, die zu einer von 0 verschiedenen mittleren Abweichung führen können.

Betrachtet man die Zielbestrahlung einzelner Ionen an sich, kann die Korrektur des bekannten systematischen Fehlers, der bei der Offsetbestimmung hervorgerufen wird, korrigiert werden. Da für die Bestrahlung nur einmal der Zielort bestimmt wird, sinkt der Beitrag der Unsicherheit der Ortsbestimmung auf $0,28 \mu\text{m}$. Jedoch geht bei einzelnen Ionen die Strahlaufösung mit etwa $0,4 \mu\text{m}$ voll ein. So ist die resultierende

Gesamtunsicherheit, und damit die wahrscheinlich echte Zielgenauigkeit bei der gezielten Bestrahlung einzelner Ionen, mit $0,6 \mu\text{m}$ leicht geringer als sie bei der Zielgenauigkeitsbestimmung abgeschätzt wurde.

	Beitrag zu Unsicherheit der Zielgenauigkeitsbestimmung (Syst.Abw. \pm STABW)	Beitrag zu reiner Zielgenauigkeit mit einzelnen Ionen (Syst.Abw. \pm STABW)
Strahleichtung	$\pm 0,11 \mu\text{m}$	$\pm 0,11 \mu\text{m}$
Offsetbestimmung	$0,08 \pm 0,08 \mu\text{m}$	$\pm 0,08 \mu\text{m}$
Ortsbestimmung von Zielen und eventuell Treffern	$\pm 0,5 \mu\text{m}$	$\pm 0,28 \mu\text{m}$
Zielbewegung	$\pm 0,3 \mu\text{m}$	$\pm 0,3 \mu\text{m}$
Strahlauflösung	$\pm 0,1 \mu\text{m}$	$\pm 0,4 \mu\text{m}$
Strahlbewegung	$\pm 0,15 \mu\text{m}$	$\pm 0,15 \mu\text{m}$
Resultierender Gesamtbeitrag	$(0,1 \pm 0,7) \mu\text{m}$	$\pm 0,6 \mu\text{m}$

Tab. 3.9: Ermittelte Unsicherheiten und ihr Beitrag zur Unsicherheit der Zielgenauigkeitsbestimmung und zur Zielgenauigkeit an sich. Die resultierende Gesamtunsicherheit ergibt sich nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung.

3.4 Weitere Funktionen

Mit dem Zielbestrahlungsmakro wurden viele Schritte des Zielbestrahlungsablaufes automatisiert, wodurch der Ablauf beschleunigt und die Fehleranfälligkeit reduziert wurde. Der Fokus und Lichtweg werden dem jeweiligen Arbeitsschritt angepasst, Cups automatisch geöffnet und geschlossen, und Kameraaufnahmen durchgeführt. Für die Durchführung von biologischen Experimente bedarf es noch weiterer Funktionen, die zusätzlich und individuell implementiert wurden. Die Wesentlichen werden in diesem Kapitel kurz vorgestellt.

3.4.1 Semi-automatische Zielerkennung von Nucleoli

Für die gezielte Ionenbestrahlung ist es neben einer genauen Bestrahlung mit einem kleinen Strahl wichtig, die Ziele präzise und schnell zu erkennen. Daher wurde für den Nucleolus als potentielles Ziel für die Anwendung der Zielbestrahlung in weiteren biologischen Experimenten eine automatische Zielerkennung entwickelt, die auch schon bei der Bestimmung der Zielgenauigkeit (Kap. 3.3.2) angewendet wurde. Ziel ist es hierbei, pro Zellkern ein oder mehrere Nucleoli zu identifizieren und die Verfolgung der durch die Bestrahlung erzeugten Schadensorte zu ermöglichen. Hierzu

wurde ein Zellsystem mit drei Färbungen etabliert, um Zellkern, Nucleolus und Schadden gemeinsam in lebenden Zellen zu verfolgen.

Für die automatische Zielerkennung kann das Zielbestrahlungsmakro Bilder an Analyseprogramme weitergeben, von ihnen verarbeiten lassen und die Ergebnisse einlesen. Für die Etablierung wurde die Bildanalyse-Software „CellProfiler“ [Lam07] verwendet, da sie eine einfache schrittweise Entwicklung und Überprüfung einer Zielerkennungsvorgehensweise ermöglicht.

Das Vorgehen zur Nucleolierkennung besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten und ist in Abb. 3.21 dargestellt:

Als erstes wird je eine Aufnahme im Fluoreszenzkanal der gefärbten Zellkerne und Nucleoli gemacht. Anschließend wird eine Glättung des Zellkernbildes durchgeführt, um Rauschen zu unterdrücken. Durch Anwendung der Schwellenmethode wird ein binäres Bild erzeugt und eine Objektanalysemethode erkennt dann die Zellkernflächen unter Berücksichtigung manuell definierter Größenbeschränkungen. Das Nucleolibild wird anschließend mit den Bereichen der Zellkerne maskiert, wobei zum Rand ein definierter Abstand gelassen wird. Danach werden Signale von Objekten der Größe von 1 bis 4 μm mittels eines Tophat-Filters hervorgehoben. Eine weitere Verwendung der Schwellenmethode und Objektanalyse liefert dann die potentiellen Nucleolibereiche. Es wird ein Filter auf einen Formfaktor, der die Rundheit beschreibt,

$$F = 4\pi \cdot \text{Fläche} / \text{Umfang}^2 > 0.5 \quad (3.7)$$

angewendet, um Artefakte zu verwerfen. Die Koordinaten des hellsten Nucleolus jedes Zellkerns werden als Ziel verwendet und in einer Textdatei gespeichert, die automatisch von dem Zielbestrahlungsmakro eingelesen wird. Der genaue Arbeitsablauf der Zielerkennung befindet sich im Anhang und dauert etwa 40 s für eine Zielerkennung.

Das System funktioniert gut, jedoch ist die Verarbeitungsdauer von 40 s deutlich zu lang. Deswegen wurde im Rahmen einer Studienarbeit von Nico Hochberger ein maßangefertigtes Java-Programm „NuFi“ (Nucleoli Finder) für das zweifarben Zellsystem (1. Färbung: Zellkern, 2 Färbung: Nucleoli) entwickelt. Bis auf eine Belichtungskorrektur bei der Zellkernerkennung und den Verzicht auf die Verstärkung der nucleolären Strukturen wurde das gleiche Vorgehen wie beim CellProfiler-Ablauf angewendet. Unter Verwendung von ImageJ-APIs wurde dabei die Zielerkennungszeit auf 3 s reduziert. Die Nucleolierkennungswahrscheinlichkeit liegt bei etwa 80% und die Wahrscheinlichkeit für falsch erkannte Nucleoli nur bei 3% [Hoc14]. Im Vergleich zum CellProfiler-Ablauf ist die Nucleolierkennung leicht schlechter. Dafür ist die Wahrscheinlichkeit für die Erkennung falscher Nucleoli niedriger. Die Erkennungszeit beträgt nur ein Zehntel der Zeit des CellProfiler-Ablaufs. Abb. 3.22 zeigt einen Vergleich der Zielerkennungsergebnisse der beiden Vorgehensweisen.

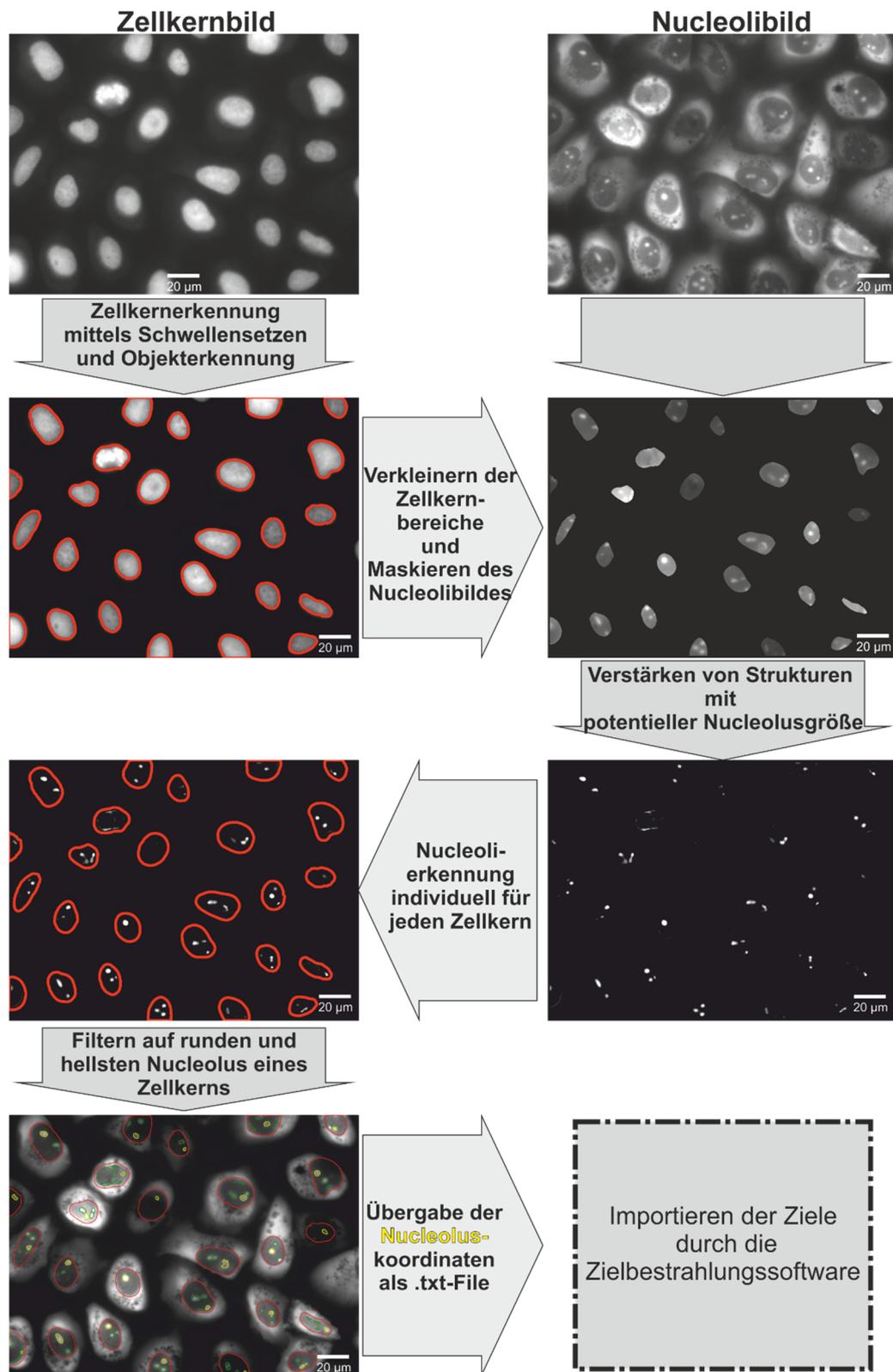


Abb. 3.21: Ablauf der automatischen Zielerkennung mit dem CellProfiler (Lamprecht et al. 2007). Zellkernebereiche werden in dem Nucleibild durch Schwellensetzen und Objekterkennung identifiziert, verkleinert und dienen als Maske des Nucleolibildes. In dem maskierten Nucleolibild werden Strukturen mit der potentiellen Nucleolusgröße verstärkt. Nucleoläre Bereiche (grün im untersten Bild) werden identifiziert wie die Zellkerne und den Zellkernen zugeordnet. Durch Filtern wird der hellste runde Nucleolus (gelb im untersten Bild) eines Zellkerns ausgewählt und seine Koordinaten als .txt-File gespeichert. Daraus importiert die Zielbestrahlungssoftware die Ziele.

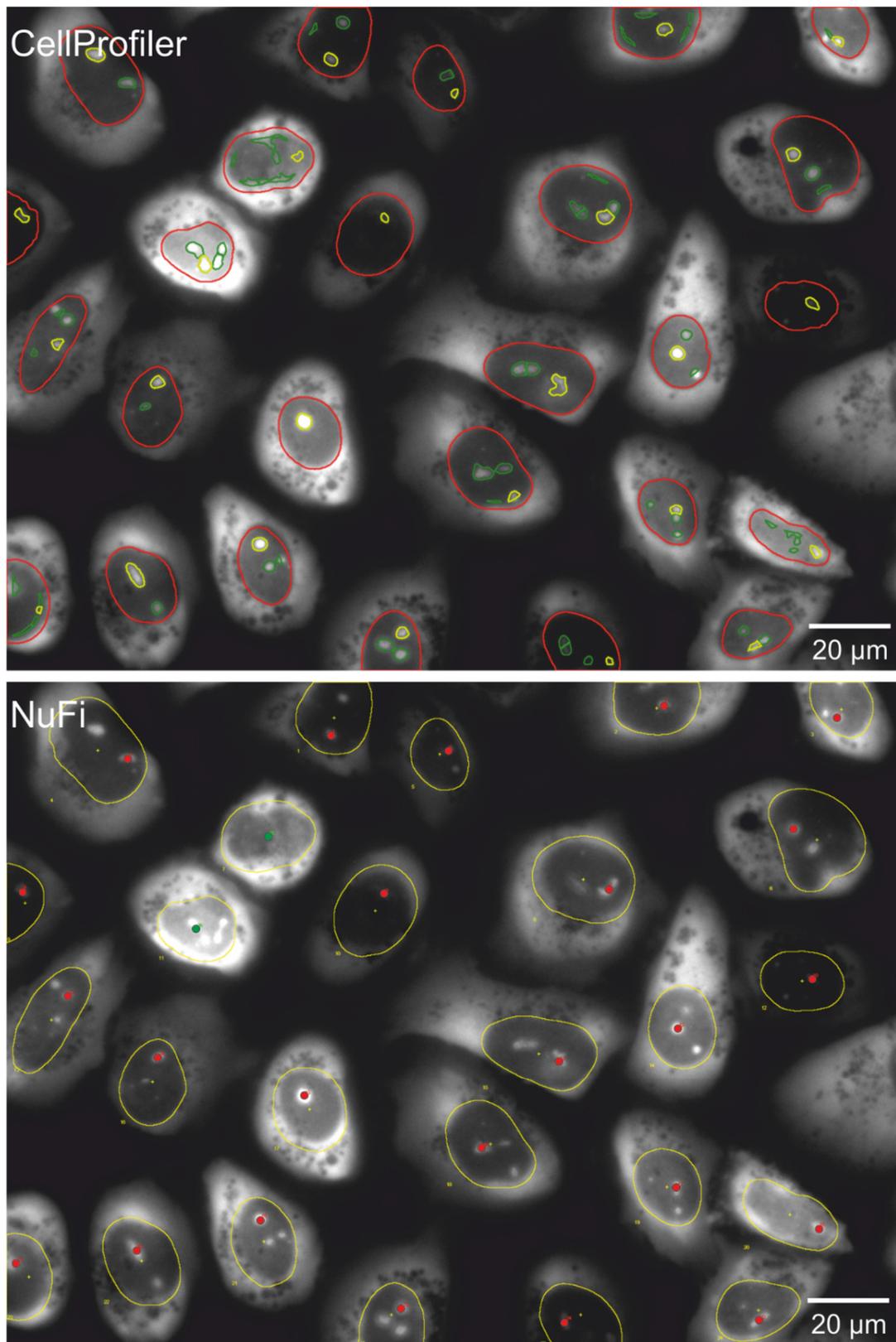


Abb. 3.22: Vergleich der Zielerkennung des CellProfiler-Ablaufs und des NuFi. Im CellProfiler-Bild (Ziele gelb) wurden zwei Nucleoli mehr als im NuFi-Bild (Ziele rot) gefunden. Jedoch ist eins davon falsch. Die Effizienz bei der Zellkernerkennung ist gleich.

Bei beiden Umsetzungen hängt die Erkennungswahrscheinlichkeit stark von dem verwendeten Mikroskopiesetup, der Zelldichte, und der Färbung ab. Dadurch müssen die Eingabeparameter (z.B. Filtergrößen und Schwellen) zur optimalen Erkennung immer einem neu etablierten Gesamtsystem angepasst werden.

3.4.2 Bestrahlung zusammengesetzter Felder

Ein weiteres Ziel ist es, in einigen Zielbestrahlungsexperimenten größere zusammenhängende Felder zu bestrahlen. Dies hat den Vorteil, dass nach Weiterverarbeitung der Probe die bestrahlten Felder leichter auffindbar sind, leichter mehr Zellen bestrahlt werden können und zugleich vermieden wird, dass Felder teilweise doppelt bestrahlt werden. Zugleich wird das Verhältnis von Umfang zu bestrahlter Fläche kleiner, wodurch der Anteil bestrahlter Zellen, die aus dem Bestrahlungsbereich wandern, auch kleiner wird. Wodurch die Zellen bis zu 24 h später fixiert werden können, ohne dass das Zellwandern das Ergebnis verfälscht. Die Herausforderung dabei ist, alle Zellen möglichst einmal zu bestrahlen und mechanischen Stress beim Wechsel der Position durch das Verfahren des Mikroskopisches möglichst zu vermeiden. Letzteres ist wichtig, da dieser Stress eine größere und eventuell zeitlich instabile Offsetänderung hervorruft und, durch die mechanische Spannung auf der Folie des Zellbehälters, diese mit größerer Wahrscheinlichkeit beschädigt wird. Dadurch wäre die Probe verloren.

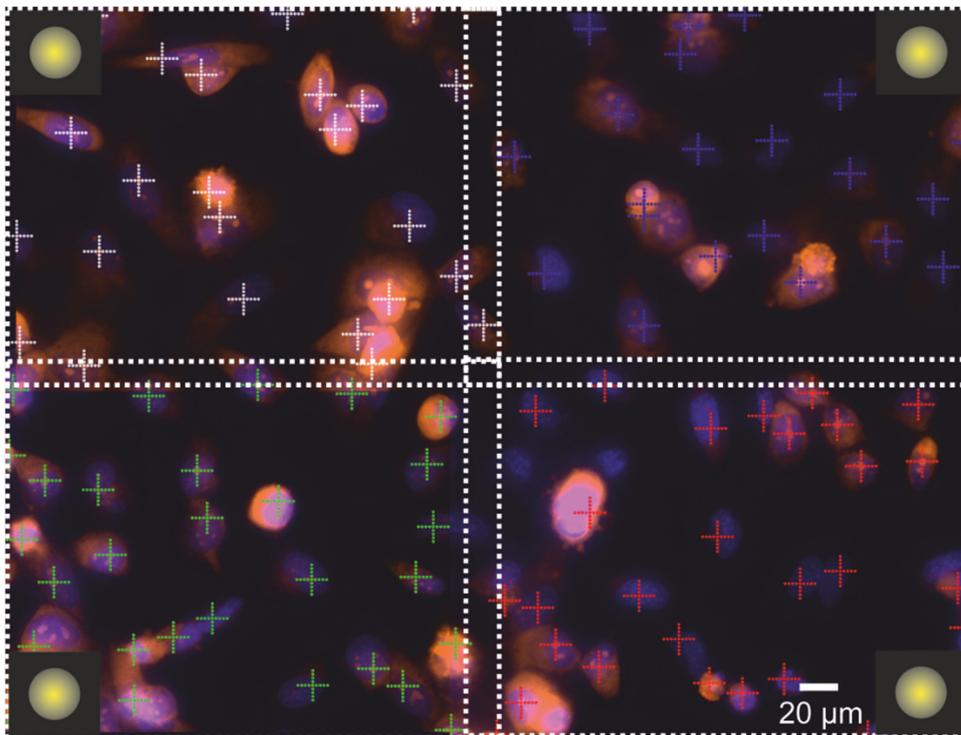


Abb. 3.23: Bestrahlung eines sog. Großfeldes mit Syto83 (orange) und Draq5 (blau) gefärbten U2OS Zellen. Hierbei werden 2x2 Kamerablickfelder hintereinander bestrahlt. Zum Wechsel des Kamerablickfeldes wird das Mikroskop von der Austrittsnase weggefahren, um mechanischen Stress auf der Folie des Zellcontainers zu vermeiden. Bei der Offsetbestimmung wird der Strahl (gelb) standardmäßig in das äußere Eck des Großfeldes gelenkt. Der Überlapp der Felder wird bei der Zieldefinition berücksichtigt und ist so gewählt, dass jede Zelle in der Regel einmal bestrahlt wird.

Dafür gibt es im Zielbestrahlungsmakro die Option ein sog. Großfeld, bestehend aus 2x2 Kamerablickfeldern oder sogar eine Linie von nx2-Feldern, mit $n \in \mathbb{N}$ zu bestrahlen. Bei Letzterem werden mehrere Großfelder aneinandergesetzt. Bei der Großfeldbestrahlung wird als Erstes die Mitte bestimmt. Dadurch werden unter Berücksichtigung der Ausmaße des Kamerablickfeldes und eines gewissen Überlapps die Positionen der Kleinfelder berechnet. Der Überlapp ist so gewählt, dass ein Zellkern in der Regel nur einem Bild zugeordnet und somit auch bei Nutzung der automatischen Zielerkennung nur einmal berücksichtigt wird. Für die Bestrahlung wird die erste Position von dem Mikroskopisch angefahren. Um den mechanischen Stress zu vermeiden, wird das Mikroskop vor dem Verfahren automatisch um 1 mm von der Strahlaustrittsnase wegbewegt und danach wieder zurückbewegt. Für die Offsetbestimmung wird berücksichtigt, dass abhängig von dem Kleinfeld der Strahl in das vom Großfeldmittelpunkt am weitesten entfernte Eck gelenkt wird.

Dieses Vorgehen ermöglicht es nun, zusammenhängende Felder von bis zu $700 \mu\text{m} \times 5 \text{mm}$ zu bestrahlen und damit z.B. den Mikrokerntest mit mindestens 500 Zellen pro Feld mit gezielter Bestrahlung durchzuführen.

3.4.3 „LiveGuck“-Modus

Der „LiveGuck“-Modus erlaubt die Zellen während der Bestrahlung zu beobachten. Dabei wird auf eine Einzelionenpräparation und Detektion der Ionen verzichtet. Die Ionenzahl wird über eine einstellbare Scanfrequenz über die Zielpunkte geregelt, wobei die Ionenrate vorher gemessen werden muss. Für die Bestrahlung verlässt man sich auf eine konstante Zählrate. Dies beschränkt die Anwendung auf die Bestrahlung von vielen Ionen pro Ziel. Denn bei Ionenzahlen von 1 Ion pro Punkt ist die Wahrscheinlichkeit zu hoch, dass ein Ziel nicht bestrahlt wird. Dafür ermöglicht dieser Modus aber sehr schnelle Proteinakkumulationen am Schadensort zu beobachten, indem nach der Zieldefinition eine Zeitserie in AxioVision und anschließend die Bestrahlung gestartet wird. Dabei werden die Lichtwege im Mikroskop nicht verändert, sodass die Zellen auf der Probe weiterhin beobachtet werden können.

3.4.4 Markierte Szintillatoren zur Repositionierung von Bestrahlungsfeldern

Bei einigen biologischen Experimenten ist es nötig, die Probe vom Mikroskop zu nehmen und direkt an einem anderen Mikroskop für Langzeitbeobachtungen zu mikroskopieren. Andere Endpunkte erfordern z.B. Immunfluoreszenzfärbungen oder Weiterinkubation der Zellen in einem Brutschrank und die bestrahlten Orte abschließend wieder an einem anderen Mikroskop zu mikroskopieren. So ist die Repositionierung besonders für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, wie der Untersuchung des genetischen Schadens und der Untersuchung der nucleolären Funktion nach Nucleolusbestrahlung, essentiell. Dafür ist es aber nötig, dass die Position des bestrahlten Bereichs wieder rekonstruiert werden kann. Das muss teilweise möglichst schnell und mit geringem Fehlerpotential erfolgen.

Um eine Ortsreferenz zu schaffen, wurden die Plastiksintillatoren mittels Laserbeschriftung durch die Grüner Laser GmbH mit 4 Kreuzen der Größe 1 mm, Liniendicke von ca. 100 μm und Abstand 1 cm markiert (Abb. 3.24). Zur Erkennung des obersten Kreuzes befindet sich darüber zusätzlich eine Markierung in Form eines „L“. Die Kreuze dienen als Referenzpunkte und die Bestrahlungspositionen werden relativ zu ihnen im Mikroskop festgelegt.



Abb. 3.24: Bild des mit Kreuzen markierten Szintillators. Die Zellen werden in dem Fensterbereich des LCI-Containers ausgesät und die bestrahlten Orte mit den Kreuzen rekonstruiert werden. Kreuzabstand ist 10 mm und Kreuzhöhe 1 mm.

Für eine mögliche Rekonstruktion muss vor der Bestrahlung die Position der Kreuze in Mikroskoptischkoordinaten $(x_i|y_i)$ mit dem gleichen Objektiv bestimmt werden wie bei der Mikroskopie für die Zielbestrahlung. Nach der Bestrahlung von n verschiedenen Positionen $(x_{B,n}|y_{B,n})$ kann nun die Probe an einem anderen Mikroskop eingebaut werden. Nach wiederholter Bestimmung der Positionen der Kreuze $(\hat{x}_i|\hat{y}_i)$ ergibt sich der Zusammenhang der Probenpositionen analog zum Vorgehen der Kalibrierung der Strahlenkeinheiten (Kapitel 3.2.1) mit:

$$\hat{x} = ax + by + e \quad (3.8)$$

$$\hat{y} = cx + dy + f \quad (3.9)$$

Die Transformationskoeffizienten a, b, c, d, e, f werden wieder durch die Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Damit kann man nun die Tischkoordinaten der Bestrahlungspositionen \hat{x}, \hat{y} berechnen.

Für eine schnelle und benutzerfreundliche Durchführung dieses Vorgehens und der anschließenden Bestrahlungspositionsumrechnung in Tischkoordinaten eines zweiten Mikroskops wurde eine makrounterstützte Exceltabelle erstellt. Hier können auch über die AxioVision-Erweiterung „Mark&Find“ exportierte Positionen direkt eingelesen werden. Nach Berechnung der Transformationskoeffizienten werden die Bestrahlungspositionen umgerechnet, die auch in eine Text-Datei exportiert werden können, um sie anschließend mit „Mark&Find“ von AxioVision wieder zu importieren. Diese Methode erlaubt eine Bestrahlungsposition auf weniger als 20 μm zu rekonstruieren. So kann nach der Bestrahlung die Probe weiter inkubiert oder z.B. mittels Immunfluoreszenzfärbung weiterverarbeitet werden, um die gezielt bestrahlten Zellen anschließend zu analysieren.

3.5 Fazit

Das neue Zielbestrahlungskonzept erlaubt es, Substrukturen in Zellen genauer als $(0,4 \pm 0,7) \mu\text{m}$ in X-Richtung und $(-0,2 \pm 0,8) \mu\text{m}$ in Y-Richtung zu bestrahlen. Dies wurde mit der Bestrahlung von Kreuzen auf Nucleoli gezeigt. Hierbei wurden die Treffer direkt nach der Bestrahlung mittels der Beobachtung der Akkumulation des Reparaturproteins MDC1 identifiziert oder durch nachträgliche Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie des Schadensmarkers γH2AX sichtbar gemacht. Damit wird ein Objekt mit $3 \mu\text{m}$ Durchmesser mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 80 % getroffen. Ein Großteil der Ungenauigkeit wird dabei durch die Ziel-, Trefferdefinition und Zielrekonstruktion hervorgerufen. Den anderen Teil verursachen langsame Strahlbewegungen und Zellbewegung. Bestrahlt man die Ziele mit einzelnen Ionen, so erhöht sich die statistische Ungenauigkeit vermutlich durch die Strahlaufösung mit einer Breite von etwa $0,42 \mu\text{m}$ (Sigma) in X- und Y-Richtung auf $0,8 \mu\text{m}$ in X- bzw. $0,9 \mu\text{m}$ in Y-Richtung. Schnelle spontane Strahldriffts werden als Ursache für systematische Abweichungen vermutet.

Eine Kalibration kann innerhalb von 5 min durchgeführt werden. Die Bestrahlung eines Kamerablickfeldes ist innerhalb von 30 s bis zu 2,5 min möglich. Hierbei dauert die Zieldefinition mit 10 s bis 2 min am längsten. Mit Zellkern-, Nucleoli- oder Mitochondrienfärbungen ist es möglich, diese Strukturen automatisch zu erfassen, wobei das Ergebnis händisch überprüft werden muss und gegebenenfalls korrigiert werden kann. Die Dauer der Zieldefinition hängt stark von der Anzahl der zu bestrahlenden Zellen und der Größe der Zielstruktur ab, wobei die automatische Zielerkennungsmethoden weniger als 5 s benötigen. Die Offsetbestimmung benötigt mit 5-10 s nur wenig Zeit, genauso wie die Bestrahlung mit 1-5 s. Typischerweise wird ein Kamerablickfeld mit 15-20 Zellen innerhalb von 1 min bestrahlt und ein zusammengesetztes 2x2-Kamerablickfeld mit 60-80 Zellen in 5 min. Des Weiteren ermöglichen zusätzliche Sonderfunktionen die Durchführung weiterer biologischer Experimente mit einer erhöhten Nachfrage an bestrahlten Zellen, einer zur Bestrahlung parallelen Beobachtung der Zellen oder der Weiterverarbeitung der Probe mit anschließender Rekonstruktion des Bestrahlungsortes.

4 Biologische Experimente

Nach Design und Charakterisierung des Zielbestrahlungsaufbaus, wird dieser erfolgreich eingesetzt um biologische Fragestellungen zu untersuchen. Ein Projekt betrachtet dabei die Fociakkumulation von Proteinen, die bisher nur nach UV-Bestrahlung beobachtet werden konnte, nach gezielter Hochdosisbestrahlung mit bis zu 1000 Ionen und die gezielte Bestrahlung von Mitochondrien zur Untersuchung ihrer Strahlensensitivität. Diese sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. Anschließend wird sich dem Hauptprojekt der Arbeit gewidmet, der gezielten Nucleolusbestrahlung. Mit dieser wird die Strahlensensitivität des Nucleolus bezüglich genetischem Schaden mit dem restlichen Zellkern verglichen und der Einfluss der Bestrahlung auf seine Funktion untersucht.

4.1 Akkumulation von Reparaturproteinen nach Hochdosisbestrahlung

In einem der ersten Experimente sollte getestet werden, ob verschiedene Proteine nach einer Ionenbestrahlung am Schadensort akkumulieren und sichtbare Foci bilden. Anliegen dieses Versuchs ist, dass die Proteine, Poly-ADP-ribose Polymerase 1 (PARP1) und PCNA („Proliferating cell nuclear antigen“) [Mor07] eine Focibildung nach UV-Lasermikrobestrahlungen zeigen, und dies als eine Rolle in der DSB-Reparatur interpretiert wird. Jedoch können die Akkumulation und damit die Rolle in der DSB-Reparatur durch eine herkömmliche breitflächige homogene Bestrahlung mit ionisierender Strahlung nicht bestätigt werden. [Vig13; Sei11; Spl10] Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass bei der herkömmlichen Bestrahlung die Dosisapplikation für den nötigen Schaden länger braucht als die Verweildauer der Proteine an den Schadensorten oder aber die Akkumulation an einzelnen DSB sehr niedrig ist. Dadurch akkumulieren für eine Focibeobachtung nicht genug Proteine zeitgleich an einem Ort. Um zu klären, ob die Schadensart oder die Schadensmenge für die Akkumulation nach UV-Bestrahlung verantwortlich ist, und eventuell auch die nötige Schadensmenge abzuschätzen, ist eine gezielte Bestrahlung mit Ionen von Vorteil. Denn nur bei dieser ist es möglich die Dosis exakt über mehrere Größenordnungen (1-1000 Ionen pro Punkt) zu variieren, somit den Schaden zu quantifizieren, und trotzdem zeitnah oder sogar währenddessen die Proteinverteilung in der Zelle zu beobachten.

Bei diesen Bestrahlungen wurden Kreuze bestehend aus 5 Punkten auf Zellkerne bestrahlt, die das zu untersuchende, mit einem Fluoreszenzmarker versehene, Protein stabil exprimieren. Es wurden Kohlenstoffionen mit einer Energie von 55 MeV verwendet. Dies entspricht einem LET von 363 keV/ μm bei Zelleintritt. Die Ionenzahl pro Punkt wurde dabei zwischen 1 und 1000 variiert. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen bis zu 15 min beobachtet und geprüft, ob sich das spezifische Kreuzmuster in Form von Foci zeigt oder verschwindet. Die Methode, wenige Punkte spezifisch im Zellkern zu bestrahlen, bietet im Vergleich zu Matrixmustern den Vorteil, dass die Dosen breit von 1 bis 1000 Ionen pro Punkt variiert werden können, die Bestrahlung ausreichend vieler Zellen nur wenige Sekunden dauert und so die Schadensantwort kurz nach der Schadenserzeugung in lebenden Zellen beobachtet werden kann. Unter Verwendung einer an SNAKE bisher üblichen Matrixbestrahlung mit einem $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ -Matrixmuster würden 140 Punkte bestrahlt werden müssen, um $50 \times 40 \mu\text{m}^2$ und damit nur ein sechszehntel des Kameraausschnitts zu bestrahlen. Bei 1000 Ionen pro Punkt und einer Ionenrate von 1 kHz dauert diese Bestrahlung mehr als 2 min und entspricht damit der kürzesten Zeit ab der ein erster Effekt beobachtet werden könnte. Zusätzlich befinden sich in dem Bereich von $50 \times 40 \mu\text{m}^2$ nur ca. 6 Zellen, wobei ein Teil mit Wahrscheinlichkeit (ca. 30 %) kein ausreichendes Signal exprimiert, um die Proteinanlagerung zu beobachten. Unter Verwendung der Zielbestrahlung kann man die Bestrahlung auf Zellen mit ausreichendem Signal im gesamten Kamerablickfeld beschränken. Würde man 4 Zellen bestrahlen, entspräche dies insgesamt 20 bestrahlten Punkten. Dies dauert bei gleicher Ionenzahl von 1000 pro Punkt nur 20 s und damit ein Sechstel der Matrixmusterbestrahlung. Damit können auch schnellere Anlagerungseffekte untersucht werden. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit auf eine Ionendetektion zu verzichten. Die Ionenzahl wird in diesem Fall über die Abtastfrequenz der Bestrahlungspunkte und die Ionenrate des Strahls eingestellt. So würde für 1000 Ionen bei 1 kHz Ionenrate eine Abtastrate von 1 Hz verwendet werden. Die Ungenauigkeit der Ionenzahl liegt dabei aufgrund von Schwankungen in der Ionenrate bei etwa 30%. Die Zellen gleichzeitig zu bestrahlen und zu beobachten ermöglicht es so, schnelle Proteinakkumulation im Sekundenbereich zu studieren.

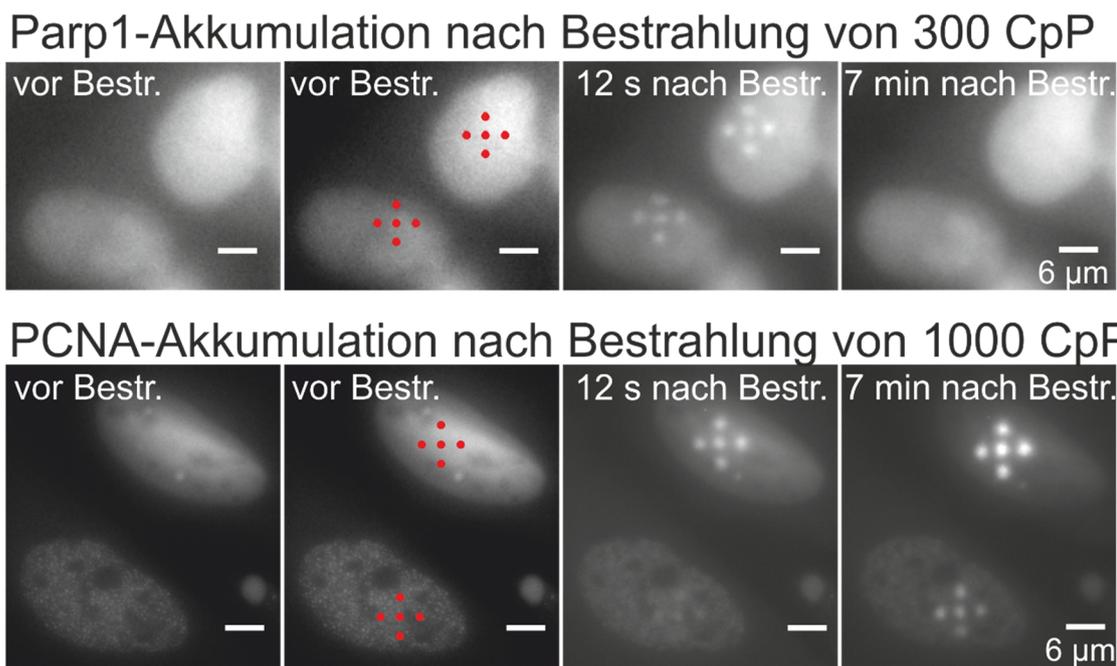


Abb. 4.1: Beobachtung der Akkumulation von Parp1 in HeLa und PCNA in U2OS-Zellen nach gezielter Bestrahlung von Kreuzen aus 5 Punkten im „LiveGuck-Modus“. Ab einer Ionenrate von 300 CpP ist eine Focibildung von Parp1 10 s nach Bestrahlung zu erkennen, die nach 7 min wieder aufgelöst ist. Die Zählrate war bei etwa 1 kHz wodurch bei der Parp1-Bestrahlung 3 Punkte pro Sekunde bestrahlt wurden. PCNA bildet ca. 3 s nach Bestrahlung mit 1000 CpP Foci, die nach 7 weiterhin bestehen. 1 Punkt wird in einer Sekunde bestrahlt. Deswegen sind die Foci ca. 12 s nach Bestrahlung des ersten Punktes in der oberen Zelle unterschiedlich stark ausgeprägt.

Mit gezielter Bestrahlung von 5-Punktkreuzen in Zellkerne wurden speziell die Proteine PARP1 und das PCNA untersucht (Abb. 4.1). An SNAKE konnte durch die gezielte Bestrahlung gezeigt werden, dass PARP1 nach einer Bestrahlung mit mehr als 300 Kohlenstoffionen pro Punkt ca. 7 s nach Bestrahlung sichtbare Foci bildet und etwa 7 Minuten später wieder verschwindet. Bei einer Anzahl von 30 Ionen war dies nicht zu beobachten [Buc16].

Focibildung von PCNA zeigte sich erst nach 1000 Ionen pro Punkt, wobei die Akkumulation in weniger als 3 s nach einer Bestrahlung beobachtet werden konnte und nach 7 min weiterhin vorhanden ist [Dre15].

Es zeigt sich, dass sehr hohe Ortsdosen von 300-1000 Ionen pro Punkt benötigt werden, um nach Ionenbestrahlung eine Akkumulation der untersuchten Proteine, Parp1 und PCNA, hervorzurufen.

Dies verdeutlicht, dass mit DNA-Läsionen gewonnene Erkenntnisse, die durch UV-Laserbestrahlung erzeugt wurden, nur schwer auf ionisierende Strahlung angewendet werden können, da für ionisierende Strahlung außergewöhnlich hohe Dosen appliziert werden müssen, um ähnliche Effekte hervorzurufen (bei MDC1 und γ H2AX reichen 1 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP) aus). Zusätzlich zeigt Abb. 4.2, dass nach einer Bestrahlung von 5 Punktkreuzen mit 1000 Kohlenstoffionen pro Punkt das Signal des DSB-Markers MDC1 Löcher an den Stellen der Bestrahlungsorte zeigt. Dies verdeutlicht umso mehr wie schwer die Schäden sein müssen, die mit UV-Laserbestrahlungen erzeugt werden. So sind UV-Mikrobestrahlungen wohl nicht geeignet, Proteinen eine Rolle in der Reparatur einzelner DSB zuzuschreiben, wenn andere seit langem etablierte DSB-Schadensmarker an diesen Schadensorten nicht mehr vorzufinden sind. Unklar ist, ob dies durch Schädigung des Fluoreszenzmarker, des Reparaturproteins oder eine Verdrängung durch andere Proteine, die erst bei diesen Dosen deutlich akkumulieren, hervorgerufen wird.

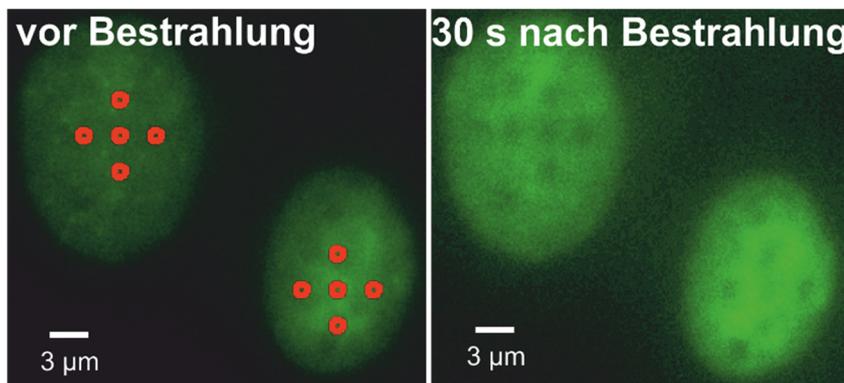


Abb. 4.2: Bestrahlung von zwei Zellen mit 5 Punktkreuzen (rot) mit 1000 Kohlenstoffionen pro Punkt. Wenige Sekunden nach der Bestrahlung zeigen sich ca. 1 min nach Bestrahlung an den bestrahlten Punkten Löcher im MDC1-GFP-Signal.

4.2 Strahlensensitivität von Mitochondrien

Der Zielbestrahlungsaufbau bildet die Grundlage für ein weiteres Projekt zur Untersuchung der Strahlensensitivität von Mitochondrien, das im Rahmen der Promotion von D.W.M. Walsh durchgeführt wird. Im Folgenden wird kurz die Idee des Projektes, ob die Mitochondrien nach Bestrahlung ihre Funktion einstellen, vorgestellt. Dies wird beispielsweise indirekt über den Fluoreszenzfarbstoff TMRE (Enzo Life Sciences) studiert, der von aktiven Mitochondrien aufgrund des vorliegenden Membranpotentials aufgenommen wird. Dadurch wird das Netzwerk aus Mitochondrien um den Zellkern wie in Abb. 4.3 sichtbar. Stellen Mitochondrien ihre Funktion ein, so fällt ihr Membranpotential auf das umgebende Potential des Cytoplasmas ab und der Farbstoff verteilt sich in der restlichen Zelle, wodurch die Mitochondrien verdunkeln. Die Funktion der Mitochondrien kann hierzu z.B. durch Chemikalien gestoppt werden. In ersten gezielten Bestrahlungen mit Kohlenstoffionen konnte dieser Effekt in kleinen Teilbereichen (Abb. 4.3), aber auch durch gezielte Bestrahlung aller im Cytoplasma befindlicher Mitochondrien über die ganze Zelle hinweg erzeugt und beobachtet werden (nicht gezeigt). In der weiteren Arbeit sollen die Mechanismen, die dazu führen identifiziert und weiter studiert werden, wobei besonders auch die zusätzlichen Funktionen der Zielbestrahlung wie der „LiveGuck“-Modus zum direkten Verfolgen der Bestrahlung und ein automatisches Zielerkennungstool genutzt werden, mit dem der Bereich der Mitochondrien in einem definierten Matrixmuster bestrahlt wird.

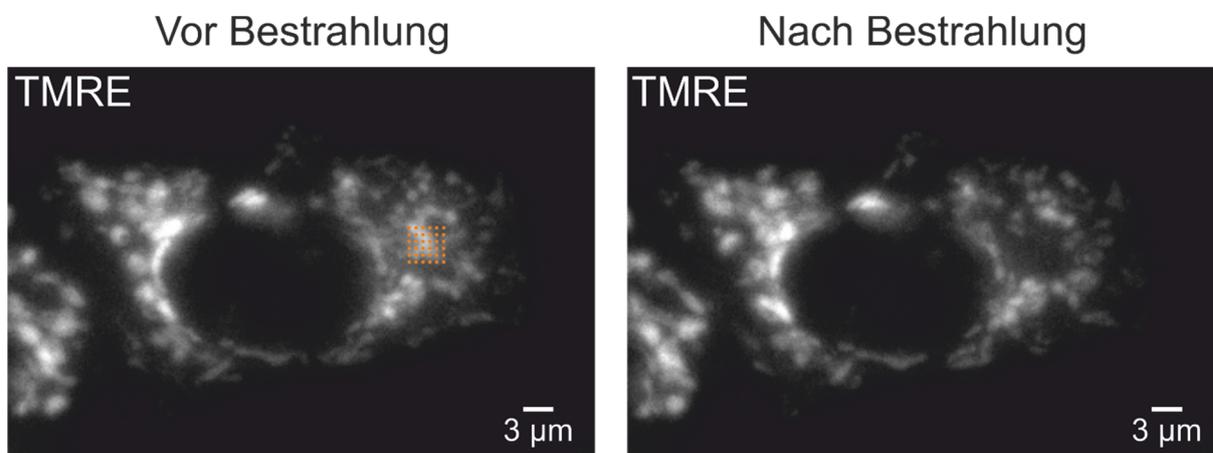


Abb. 4.3: Gezielte Bestrahlung von Mitochondrien

(links): Vor Bestrahlung befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff TMRE in den Mitochondrien, wodurch das Netzwerk aus Mitochondrien im Cytoplasma beobachtet werden kann. Es wird ein kleiner Teil mit einer 6x6-Punktmatrix mit Abstand 0,8 µm (orange) und einer Zahl von 100 CpP gezielt bestrahlt.

(rechts): 10 s nach Bestrahlung kann man beobachten, dass Mitochondrien, die sich im bestrahlten Bereich befanden, nicht mehr sichtbar sind und somit ihre Funktion eingestellt haben oder eventuell sogar geplatzt sind, was in der Doktorarbeit von D.W.M. Walsh näher studiert wird.

4.3 Untersuchung der Strahlensensitivität des Nucleolus

Treibende Projektidee für die Entwicklung der gezielten Bestrahlung an SNAKE war die Frage, ob der Zellkern trotz Bereichen unterschiedlicher DNA-Dichte als homogenes Ziel bezüglich ionisierender Strahlung angesehen werden kann. Daraus entwickelte sich das Hauptprojekt dieser Arbeit, das mit Hilfe des Zielbestrahlungsaufbaus klären sollte, ob Ionenschäden im Bereich des Nucleolus im Zellkern spezielle Folgen für die Zelle haben. So wurde als erstes mit dem Mikronukleitest die These überprüft, ob der Zellkern ein homogenes Ziel für ionisierende Strahlung bezüglich chromosomaler Aberrationen ist, obwohl sich z.B. im Nucleolus weniger DNA befindet. Außerdem sollte die Funktion des Nucleolus mit Hilfe eines Transkriptionsassay nach gezielter Nucleolusbestrahlung untersucht werden. Hier steht die Suche nach einer Stressantwort wie der nucleolären Segregation oder Proteinumverteilung im Vordergrund.

4.3.1 Genetischer Schaden nach gezielter Nucleolusbestrahlung mit Ionen mittels Mikrokerntest

4.3.1.1 Motivation

Färbt man DNA in Zellen, fällt auf, dass Nucleoli als dunkle Flächen sichtbar werden (Abb. 4.4). Dies lässt darauf schließen, dass die DNA-Dichte im Nucleolus deutlich geringer ist als im umliegenden Zellkern. Daraus lässt sich die vermeintlich naheliegende Hypothese ableiten, dass sich die Zahl der DNA-Schäden bei Bestrahlung des Nucleolus im Vergleich zu einer Zellkernbestrahlung unter Aussparung des Nucleolus verringern sollte.

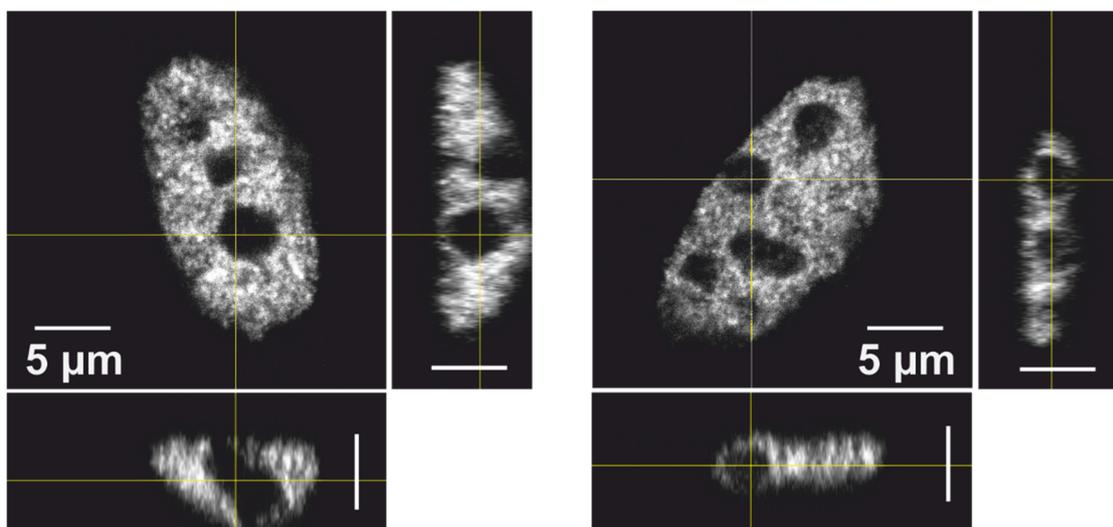


Abb. 4.4: Konfokale Mikroskopaufnahmen von zwei HeLa-Zellen mit angefärbter Histon-Methylierung H3K4me3, die aktive DNA-Bereiche markiert. Gezeigt sind die Schnitte durch einen z-Stack entlang der gelben Linien. Man kann deutlich die Nucleoli als dunkle Löcher erkennen, die bis zu 2/3 der Zellkernhöhe einnehmen und deren Gesamtfläche etwa 10% der Zellkernfläche entsprechen. Maßstabsbalken entsprechen 5 µm.

Für die Abschätzung der DNA-Dichte im Nucleolus (lus) soll als Grundlage die in Kapitel 2.1.2.1 erwähnte Information dienen, dass der Anteil der rDNA etwa 0,4% der gesamten DNA entspricht. Die rDNA befindet sich auf 5 Chromosomen, wodurch in einer Zelle 10 potentielle Entstehungsorte für Nucleoli (NOR) vorhanden sind. Im Schnitt sind etwa $\frac{2}{3}$ der NOR aktiv, um die sich dann ein Nucleolus bildet, wobei aber auch mehrere NOR zu einem Nucleolus beitragen können. Die Gesamtfläche der Nucleoli entspricht etwa 10% der Zellkernfläche, wobei die Nucleolushöhe etwa 50% der Zellkernhöhe entspricht. Der größte Nucleolus eines Zellkerns (ZK) nimmt in etwa $\frac{2}{3}$ der Zellkernhöhe ein. Dies zeigt sich z.B. aus der Mikroskopie von HeLa-Zellen bei denen die Histon-Methylierung H3K4me3 angefärbt wird, die sich an aktiven DNA-Bereichen befindet (vgl. Abb. 4.4).

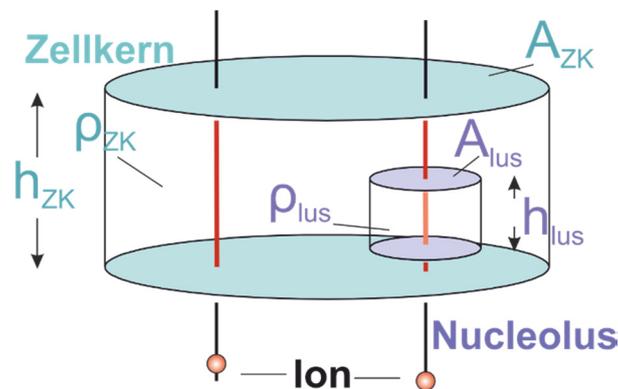


Abb. 4.5: Ionenspuren durch einen Zellkern. Bei einer wird der Nucleolus getroffen und in der anderen nicht. Aufgrund der unterschiedlichen DNA-Dichte $\rho_{DNA,lus}$ im Nucleolus und $\rho_{DNA,ZK}$ im Zellkern kommt es auf den roten und violetten Teilabschnitten zu verschiedenen DNA-Schadensraten $\#S_{DNA}$, wodurch vermutlich mit einem unterschiedlichen genetischen Schaden zu rechnen ist.

Aus diesen Informationen und unter der Annahme, dass Zellkern und Nucleolus zylindrisch sind (Abb. 4.5), lässt sich das Verhältnis der DNA-Dichten des Nucleolus $\rho_{DNA,lus}$ und Zellkerns $\rho_{DNA,ZK}$ abschätzen:

$$\frac{\rho_{DNA,lus}}{\rho_{DNA,ZK}} \approx \frac{\frac{m_{DNA,lus}}{A_{Nucleoli,ges} \cdot h_{lus}}}{\frac{m_{DNA,ZK}}{A_{ZK} \cdot h_{ZK}}} \cdot P_{NOR,aktiv} \approx \frac{0,4\%}{10\%} \cdot 65\% \approx 5\% \quad (4.1)$$

m_{DNA} steht für die DNA-Masse im Bereich des Nucleolus (lus) bzw. restlichen Zellkerns (ZK), h für deren Höhe und A für deren Fläche, wobei $A_{Nucleoli,ges}$ die Summe aller i Nucleoliflächen $A_{lus,i}$ des Zellkerns beschreibt.

So beträgt die DNA-Dichte im Nucleolus 5% der DNA-Dichte im restlichen Zellkern.

Es wird angenommen, dass die Induktion von DNA-Schäden pro Ionspurlänge mit der DNA-Dichte ρ_{DNA} und einer konstanten Rate k skaliert. Dadurch beträgt beim Durchgang eines Ions durch einen Nucleolus die erzeugte Anzahl der DNA-Schäden $\#S_{DNA,lus}$ pro Spurlänge Δl ca. 5% der erzeugten DNA-Schäden $\#S_{DNA,ZK}$ bei Durchgang durch den reinen Zellkern. Wird ein Nucleolus mit einer oben abgeschätzten Höhe h_{lus} von etwa

$\frac{2}{3}$ der Zellkernhöhe getroffen, kann so die Anzahl der Schäden bei Nucleolusdurchgang des Ions mit

$$\begin{aligned} \#S_{DNA,lus} &= k \cdot \rho_{DNA,ZK} \cdot (h_{ZK} - h_{lus}) + k \cdot \rho_{DNA,lus} \cdot h_{lus} = \\ &= \left(\frac{1}{3} + 5\% \cdot \frac{2}{3} \right) \cdot k \cdot \rho_{DNA,ZK} \cdot h_{ZK} \approx 37\% \cdot \#S_{DNA,ZK} \end{aligned} \quad (4.2)$$

auf $(37 \pm 16)\%$ der Schäden nach reinem Zellkerndurchgang abgeschätzt werden. Dabei tritt der meiste Schaden unter- oder oberhalb des Nucleolus auf (vgl. Abb. 4.5). Die Unsicherheit der Abschätzung ergibt sich mittels Gaußscher Fehlerfortpflanzung unter der Annahme einer relativen Unsicherheit des DNA-Massenverhältnisses im Nucleolus ($m_{Nucleolus}/m_{Zellkern}$) von 25%, des Höhenverhältnisses von 25% ($h_{Nucleolus}/h_{Zellkern}$) und des Flächenverhältnisses ($A_{Nucleolus}/A_{Zellkern}$) von 10%. Dabei hat der Fehler des Höhenverhältnisses den größten Einfluss.

Eine Möglichkeit den genetischen Schaden in der Zelle zu quantifizieren, ist der sogenannte Mikrokerntest. Da sich dieser Endpunkt gut mit den Randbedingungen der Zielbestrahlung vereinbaren lässt, wurde er für den Vergleich von gezielter Nucleolus- und „Zellkern ohne Nucleolus“-Bestrahlung gewählt. Damit soll die oben aufgestellte Hypothese, dass der Zellkern ein homogenes Ziel bezüglich ionisierender Strahlung darstellt, getestet werden.

4.3.1.2 Zelllinie

Für das Experiment wurden stabil transfizierte HeLa-Parp1-Chromobody®-TagRFP Zellen [Buc16] verwendet, bei denen das Protein Parp1 mit einem fluoreszierendem endogen exprimierten Chromobody-tagRFP-Antikörper markiert ist. Da mehr als 40% des Parp1 sich in den Nucleoli befindet [Yun04; Ran09], sind die Nucleoli so als Ziele erkennbar.

Im Gegensatz zu einer Lebendzellfärbung wie z.B. mit Syto80/83, zeigt sich hier, dass sich weder die Färbung noch die Beobachtung mittels Fluoreszenzmikroskopie der Zellen wachstumshemmend auf die Zellen auswirken, was für den Mikrokerntest essentiell ist (Abb. 4.6). Dies bestätigt sich in Wachstumskurven HeLa-Parp1-CB-tagRFP Zellen, die zwischen 0 und 72 h durchgeführt wurden. Die Zellen wurden in 6-Wellplatten mit 50 000 Zellen pro Well ausgesät, für 30-60 min Syto83 1 μ M gefärbt und jeder Well mit dem Anregungslicht für Syto83 bei voller LED-Intensität der Colibribeleuchtung 5 min ohne Objektiv belichtet. Dies entspricht etwa der üblicherweise verwendeten Lichtintensität, die bei der Aufnahme von 9 Bildern mit 500 ms Belichtungszeit, dem 40x Objektiv und 10% LED-Intensität bei der Bestrahlung an SNAKE appliziert wird. Anschließend wurden die Zellen weiter inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen: gefärbt, aber nicht belichtet; nicht gefärbt und nicht belichtet; nicht gefärbt, aber belichtet. Es zeigt sich, dass die Zellen der unbehandelten Wells

das gleiche Wachstum zeigen, wie die Zellen die nur belichtet wurden. Die Wachstumskurven der belichteten und nicht belichteten Syto83 gefärbten Zellen knicken jedoch beide ab.

Da die Syto83-Färbung einen klaren Effekt auf das Wachstum hat, kommt es nicht für die Nucleolimarkierung bei dem Experiment in Frage. Die Parp1-Zellen zeigen belichtet und unbelichtet ein exponentielles Wachstum. Da die Verdopplungszeit mit etwa 24 h auch im Bereich liegt, wie er bei untransfizierten HeLa-Zellen in der Zellkultur in der Regel zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt) und so kein Einfluss auf die Zellen beobachtet wurde, werden die HeLa-Parp1-Chromobody®-TagRFP Zellen als Zellsystem für die gezielte Nucleolibestrahlung gewählt.

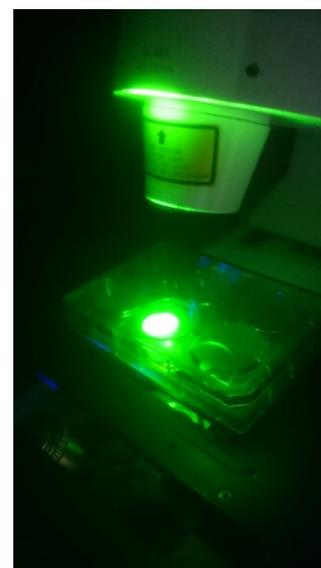
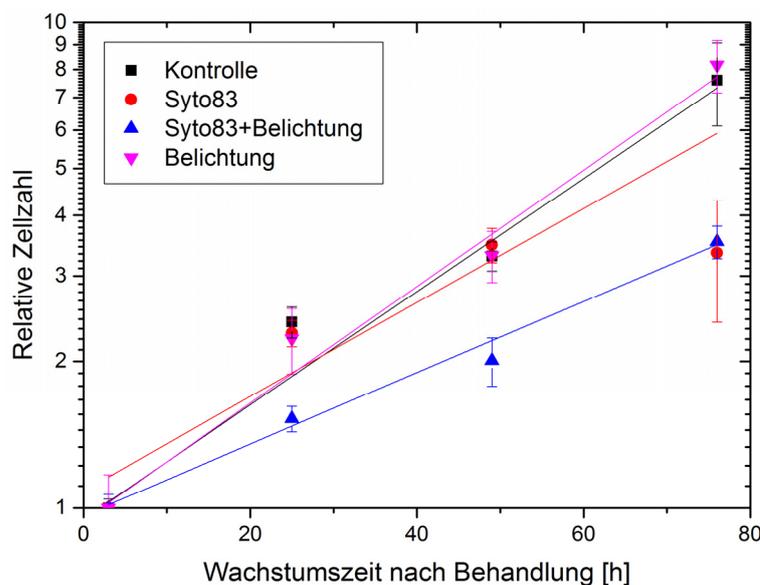


Abb. 4.6: Wachstumstest von HeLa-Parp1-CB-tagRFP Zellen nach Färbung mit Syto83 und 5 min Belichtung jedes Wells mit dem Anregungslicht von Syto83, das auch dem von tagRFP entspricht. (Links): Zellen wurden in 6-Wellplatten ausgesät und 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung ausgezählt. Die Linien stellen das Ergebnis eines exponentiellen Fits dar. Die Lichtintensität entspricht dabei in etwa der gleichen Belastung wie bei der Mikroskopie der Zellen bei Zielbestrahlung (40x Objektiv, 500 ms Belichtungszeit). Belichtete aber nicht mit Syto83 gefärbte HeLa-Parp1-Zellen wachsen wie die unbelichtete Kontrolle. Die Wachstumskurven mit Syto83 behandelte Zellen knicken ab, wobei einer zusätzlicher wachstumshemmender Effekt auftritt, der durch die Belichtung hervorgerufen wird. (Rechts): Vorgehen zur Belichtung eines ganzen Wells. 6-Wellplatte wurde auf Mikroskoptisch positioniert. Dadurch, dass das Objektiv ausgebaut wurde, leuchtet der Strahl des Anregungslichts, einen ganzen Well aus. Somit kann ein ganzer Well in etwa 30 min belichtet werden, was keinen Effekt auf die Zellen hat.

4.3.1.3 Bestrahlung

Etwa 12 h vor der Bestrahlung wurden etwa 30 000 Zellen in DMEM-Medium (Sigma Aldrich, D6429) mit Trolox (Sigma Aldrich, 238813), HEPES (Sigma Aldrich, H3375), 10% FBS (fetal bovine serum, Sigma Aldrich, F7524) und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Sigma Aldrich, P0781-100ML) auf dem Szintillator des LCI-Containers ausgesät. Die Probe wurde an SNAKE eingebaut und die Positionen der Markierungs-

kreuze für die Rekonstruktion der bestrahlten Bereiche eingemessen. Für die Bestrahlung wurde das 40x Objektiv (Plan-Apochromat, Zeiss) mit dem 0,63 Kamera-Adapter verwendet, wodurch das Kamerablickfeld etwa $350 \times 260 \mu\text{m}^2$ beträgt. Vor der Bestrahlung wurden die zwei Bestrahlungspositionen bestehend aus 2×32 Feldern im Phasenkontrast aufgenommen. Anschließend wurde unter Nutzung des nx2-Modus des Zielbestrahlungsmakros gezielt der größte Nucleolus des Zellkerns mit 3 Kohlenstoffionen der Energie 55 MeV bestrahlt. Zellkerne die kein ausreichendes Nucleolus-signal zeigten, wurden mittig bestrahlt. Mit einer Belichtungszeit von 1000 ms bei 20% Intensität der Weißlicht-LED unter Verwendung des 20HE-Filtermoduls (beides Zeiss GmbH) konnten in etwa 80% der Zellen Nucleoli identifiziert werden. In 1,5 h wurden ca. 1800 Ziele bestrahlt. Die gleiche Prozedur wurde für die „Zellkern ohne Nucleolus“-Bestrahlung durchgeführt, wobei hier in 1 h ungefähr 1600 Ziele bestrahlt wurden.

4.3.1.4 Zytokinese-Block-Mikrokerntest

Nach der Bestrahlung wurde die Probe ausgebaut und der Zytokinese-Block-Mikrokerntest durchgeführt. Dabei blieben die Zellen bis einschließlich zur Mikroskopie auf der Probe und wurden davor nicht trypsiniert oder vereinzelt, da sie sonst nicht mehr der Bestrahlung zugeordnet werden können. So ermöglicht dieser Test die Quantifizierung des genetischen Schadens, der z.B. durch ionisierende Strahlung oder karzinogene Chemikalien hervorgerufen wird [Fen00; Fen07]. Bei Mikrokernen (MN) handelt es sich um azentrische Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen, die bei der Zellteilung nicht in die Tochterkerne aufgenommen werden, und mit einer eigenen Zellkernhülle einen zusätzlichen Kern im Cytoplasma bilden. Dies geschieht in Folge einer DNA-Schädigung, in der Regel von DSBs, oder einer Schädigung des Spindelapparats [Fen86; Fen00; Fen07; Bon11]. Um zu prüfen, ob eine Zelle nach der Behandlung eine Zellteilung vollzogen hat, bei der es eventuell zur Mikrokernbildung gekommen ist, wird die Zytokinese, die Teilung der äußeren Zellmembran, blockiert. Dies geschieht mittels Inkubation der Zellen mit der Chemikalie Cytochalasin B über die Dauer eines Zellzyklus von etwa 24 h, wodurch Zellen mit einem, zwei oder mehreren Kernen entstehen. Es werden gezielt nur Mikrokerne in Zellen gezählt, die eine Teilung vollzogen haben, sogenannte doppelkernige Zellen (DK). Zellen mit einem oder mehr als zwei Kernen werden nicht gezählt. Nekrotische oder apoptotische Zellen, und Zellen, ohne intakte Zellmembran oder Zellkernmembran werden ebenfalls nicht berücksichtigt. Zusätzlich fallen Zellen mit überlappenden, unterschiedlich großen oder Zellkernen mit unterschiedlichen Farbintensitäten aus der Bewertung, da hier die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass Mikrokerne verdeckt werden, sowie keine oder nur eine unvollständige Teilung stattgefunden hat [Fen86; Fen00; Fen07; Bon11]. Mikrokerne werden gezählt, wenn ihr Durchmesser kleiner als $1/3$ des Durchmessers des Hauptzellkerns ist. Sie dürfen keine Verbindung zum Zellkern besitzen oder nicht mit diesem überlappen und müssen eine ähnliche Farbintensität besitzen [Fen86; Fen00; Fen07].

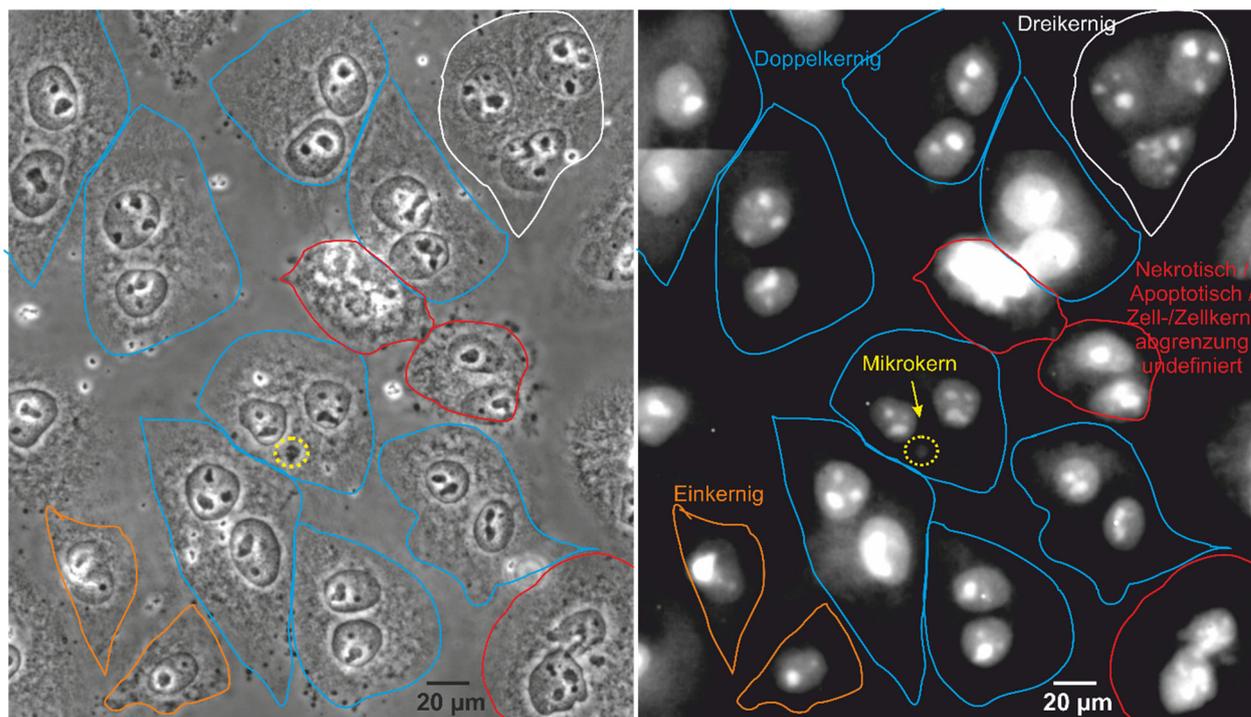


Abb. 4.7: Phasenkontrast- (links) und Zellkernfärbungsbild (rechts; ToPro3) des bestrahlten Bereichs. Mit Hilfe des Phasenkontrastbildes können die Zellgrenzen definiert werden und bestimmt werden, ob es sich um ein- (orange), doppel- (blau), drei- (weiß) oder vierkernige Zellen handelt. Für die Auswertung sind die doppelkernigen Zellen relevant. Mit dem Phasenkontrastbild kann zusätzlich der Zustand der Membran und des Zellkerns beurteilt werden. So gehen apoptotische, nekrotische Zellen, sowie Zellen mit undefinierter Zellkern- oder Zellmembran nicht in die Auswertung ein (rot). Mit der Zellkernfärbung werden auch die Mikrokern in den Zellen sichtbar, die für jede doppelkernige Zelle gezählt werden.

Das verwendete Protokoll des MN-Tests wurde in dieser Arbeit auf Basis der Protokolle von MN-Tests etabliert, die von PD Dr. Thomas Schmid an SNAKE durchgeführt wurden [Sch09; Sch11]. Das detaillierte Protokoll befindet sich im Anhang. Nach der Bestrahlung wurde das alte Medium abgesaugt und Medium mit 1%-Pen/Strep und 1 µg/ml Cytochalasin B (Sigma Aldrich) zugegeben. Nach 24 h Inkubation der Zellen bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 95%-Luftfeuchtigkeit, wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 5 min hypotonisch mit 75 mM KCl behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol/Eisessig (3:1) fixiert, getrocknet und mit To-Pro®-3 (Thermo Fisher Scientific, T3605) mit einer Verdünnung 1:1000 in PBS für 5 min gefärbt. Abschließend wurde die Lösung abgezogen und die Probe mit Pro-Long® Gold (Thermo Fisher Scientific, P36934) unter einem Deckglas mit Durchmesser 15 mm eingedeckelt. An einem Epifluoreszenzmikroskop wurden unter Verwendung des 63x Plan-Neofluoar Ölimmersionsobjektivs und des 0,63er Adapter die Bestrahlungsfelder rekonstruiert und mit Hilfe des Mosaix-Moduls (Zeiss GmbH) als zusammengefügtes Bild im Cy5-Kanal und Phasenkontrast aufgenommen. Auf der Fläche des Bestrahlungsfeldes wurde die Zellen in die Kategorien: einkernig, doppelkernig, mehrkernig (>2 Kerne), apoptotisch/mitotisch/nekrotisch und mit defekter

Zell- bzw. Zellkernmembran eingeteilt (vgl. Abb. 4.7). Hierbei wurde für jede Zelle unterschieden, ob sie sicher oder nur wahrscheinlich einer Kategorie angehören, z.B. sichere und wahrscheinlich doppelkernige Zellen. Dies ermöglicht die Überprüfung, ob die Kategorisierung einen Einfluss auf das Experiment hat. Die MN wurden nur in den sicheren, d.h. eindeutig erkennbaren, Doppelkernen gezählt. Insgesamt wurde der komplette Einteilungs- und Zählprozess dreimal vom Autor durchgeführt. Dies vermied Personenabhängigkeiten beim Zählen. Mit demselben Verfahren wurden zusätzlich zwei unbestrahlte Kontrollfelder derselben Fläche mikroskopiert und ausgewertet.

4.3.1.5 Ergebnis

Bei der dreimal wiederholten Auswertung der Zellen wurden auf derselben Probe an der Position der Nucleolusbestrahlung (NB) 1550 ± 40 Zellen, der „Zellkern ohne Nucleolus“-Bestrahlung (im Folgenden als ZB oder Zellkernbestrahlung bezeichnet) 1200 ± 40 , der Kontrolle1 (K1) und Kontrolle2 (K2), 1000 ± 40 bzw. 1400 ± 40 Zellen den oben beschriebenen Kategorien zugeordnet: einzelkernige (EK), doppelkernig (DK), mehrkernige (MK), apoptotische/mitotische/nekrotische Zelle (AMN) und Zelle mit defekter Zell- bzw. Zellkernmembran (DM). Die Fehler entsprechen dem Fehler des Mittelwerts aus den drei Zähl Durchgängen bzw. dem Zählfehler, der sich aus unter Annahme einer Poisson-Verteilung ergibt, wenn dieser größer war.

Die Rekonstruktion der Bestrahlung ergab, dass bei der Nucleolusbestrahlung in 81% der Zellen der hellste Nucleolus bestrahlt wurde und in 19% der Mittelpunkt des Zellkerns, da die Nucleoli nicht erkennbar waren. Bei der Zellkernbestrahlung wurde in 89% der Zellen gezielt der Zellkern ohne Nucleoli bestrahlt und in 11% der Mittelpunkt des Zellkerns. Die Analyse des Überlappbereichs der Kamerablickfelder ergab, dass bei der Nucleolusbestrahlung 9% und der Zellkernbestrahlung 11% versehentlich doppelt und 1,7% bzw. 1% der Zellen nicht bestrahlt wurden.

Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Zellen mit defekter Zell- bzw. Zellkernmembran nicht um einen Bestrahlungseffekt handelt, sondern dass durch mechanische Belastung, eventuell durch Berührung mit der Strahlaustrittsnase, KCl-Behandlung zum Aufblähen der Zellen, Waschen oder Einbetten der Probe, zu diesem Effekt kommt. Die Vernachlässigung dieses Anteils beeinflusst nicht die Beobachtungen (vgl. Mikrokerntest-Rohdaten im Anhang).

So ergab sich die in Abb. 4.8 dargestellte Kategorieverteilung relativ zu den ausgezählten Zellen.

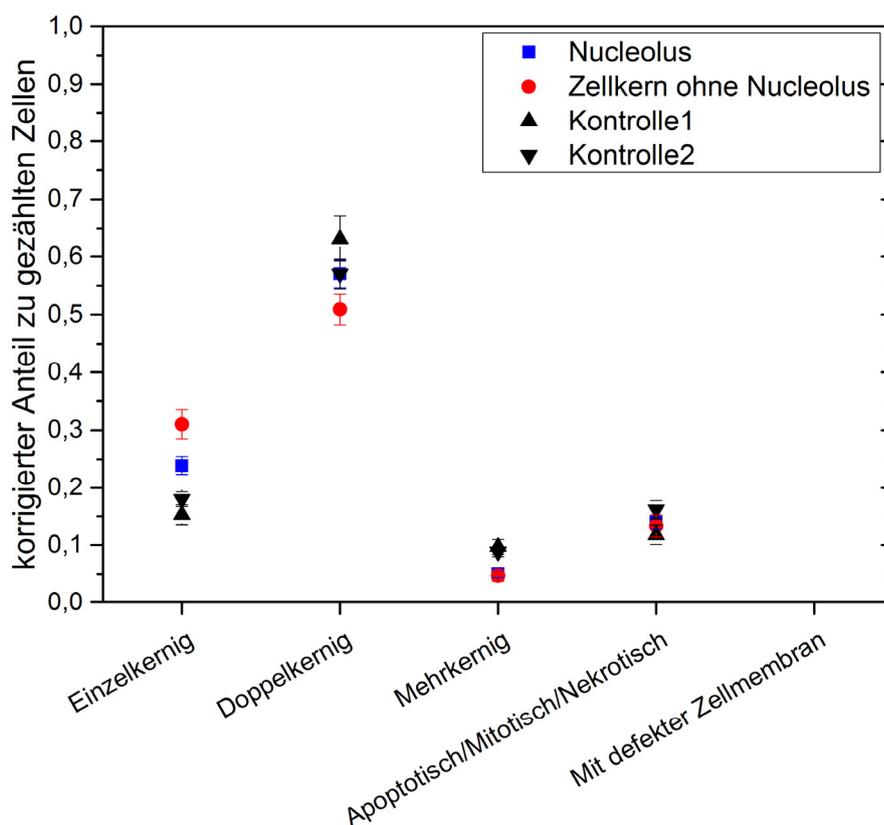


Abb. 4.8: Verteilung der Zellarten bezgl. ausgewerteter Zellen. Zellen mit defekter Zellmembran wurden für die unterschiedlichen Bestrahlungsarten und zwei Kontrollpositionen nicht berücksichtigt, da davon ausgegangen wird, dass es sich hier nicht um einen Bestrahlungseffekt handelt. Die Fehler sind Standardfehler der Mittelwerte und ergeben sich aus Gaußscher Fehlerfortpflanzung der Zählfehler.

Das im Folgenden verwendete Indexschema der Anteile $A_{w,x,y,z}$ ist in der Fußnote dargestellt. Es zeigt sich, dass der Anteil der einkernigen Zellen nach der Nucleolusbestrahlung mit $A_{EK,NB,gez,korr} = 0,239 \pm 0,012$ signifikant kleiner ist als nach der Zellkernbestrahlung mit $A_{EK,ZB,gez,korr} = 0,310 \pm 0,020$.¹ Beide Anteile sind dabei signifikant größer als bei Kontrolle1 und Kontrolle2 mit $A_{EK,K1,gez,korr} = 0,153 \pm 0,014$ und $A_{EK,K2,gez,korr} = 0,180 \pm 0,010$, die sich im Rahmen des Fehlers nicht unterscheiden. Bei den Doppelkernigen tritt mit $A_{DK,NB,gez,korr} = 0,570 \pm 0,019$ und $A_{DK,ZB,gez,korr} = 0,509 \pm 0,020$ ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Bestrahlungsarten auf, wobei dieses Mal der Anteil nach Zellkernbestrahlung kleiner ist als nach Nucleolusbestrahlung. Der Nucleolusbestrahlungsanteil liegt im Rahmen der Kontrollen mit $A_{DK,K1,gez,korr} = 0,63 \pm 0,03$ und $A_{DK,K2,gez,korr} = 0,570 \pm 0,020$. Der Anteil der Zellen mit mehr als zwei Kernen ist bei den bestrahlten Zellen wieder mit $A_{MK,NB,gez,korr} = 0,050 \pm 0,005$ und mit $A_{MK,ZB,gez,korr} = 0,047 \pm 0,008$ im Rahmen des Fehlers gleich. Damit ist ihr Anteil signifikant kleiner als bei den Kontrollpositionen mit $A_{MK,K1,gez,korr} = 0,097 \pm 0,010$ und mit $A_{MK,K2,gez,korr} = 0,088 \pm 0,007$, die sich nicht signifikant unterscheiden. Der Anteil der apoptotische/mitotische/nekrotische Zellen ist in

¹ Indexschema der Anteile $A_{w,x,y,z}$: $w \triangleq$ „Zellkategorie“, $x \triangleq$ „Bestrahlungsart“, $y \triangleq$ „relativ bezgl. Anzahl gezählter (gez) oder bestrahlter (bes) Zellen“, $z \triangleq$ „Zellzahl korrigiert (korr)“

den Kontrollen mit $A_{AMN,K1,gez,korr} = 0,118 \pm 0,013$ und $A_{AMN,K2,gez,korr} = 0,162 \pm 0,013$ signifikant unterschiedlich und liegt in etwa im Rahmen der einkernigen Anteile. Bei den bestrahlten Zellen ist hier mit $A_{AMN,NB,gez,korr} = 0,140 \pm 0,009$ und $A_{AMN,ZB,gez,korr} = 0,133 \pm 0,014$ kein Unterschied erkennbar und ist jedoch kleiner als der Anteil der EK. Die Fehler ergeben sich nach Gaußscher Fehlerfortpflanzung aus dem größeren der Zählfehler, die man aus der Streuung der drei Zählungen oder der Anzahl der gezählten Zellen nach Poisson erhält.

Feld	Bestrahlte Zellen	sDK	$P_{sDK,bes}$	MN	$P_{MN,sDK}$ in MN/sDK	Interzelluläre MN-Verteilung			
						0	1	2	3
NB	1660	610	0,369	210	0,34	436	150	24	4
	\pm 40	\pm 40	\pm 0,025	\pm 20	\pm 0,04				
ZB	1420	340	0,239	122	0,36	238	85	15	3
	\pm 30	\pm 40	\pm 0,025	\pm 9	\pm 0,05				
K1	-	370	-	27	0,073	346	23	2	0
		\pm 50		\pm 4	\pm 0,019				
K2	-	560	-	41	0,073	525	31	4	0
		\pm 60		\pm 8	\pm 0,022				

Tab. 4.1: Bildungsrate für sicher doppelkernige Zellen $P_{sDK,bes}$, Mikrokernrate $P_{MN,sDK}$ und Mikrokern(MN)-Verteilung in sicheren doppelkernigen HeLa-Parp1-CB-tagRFP-Zellen (sDK), die nach Bestrahlung des hellsten Nucleolus eines Zellkerns (NB) oder „Zellkern ohne Nucleolus“-Bestrahlung (ZB) mit 3 Kohlenstoffionen entstehen. Als Kontrolle wurden zwei unbestrahlte Felder (K1, K2) ausgewertet. Alle Felder wurden dreimal ausgezählt. Der angegebene Fehler entspricht dem Fehler des Mittelwerts der drei Zählungen.

In Tab. 4.1 sind die Ergebnisse des Mikrokerntests nach dreimaligem Zählen angegeben, wobei die Auszählung auf die sicheren Doppelkerne (sDK) beschränkt wurde. Denn in „wahrscheinlich doppelkernigen Zellen“ liegen die Kerne oft so eng beisammen, dass Mikrokerne wahrscheinlich nicht identifiziert werden. Die Rate, pro bestrahlter Zelle eine sichere doppelkernige Zelle zu bilden, ist $P_{sDK,NB,bes} = 0,369 \pm 0,025$ nach Nucleolusbestrahlung und $P_{sDK,ZB,bes} = 0,239 \pm 0,025$ nach Zellkernbestrahlung. Man kann erkennen, dass es durch die gezielte Bestrahlung der Nucleoli oder des Zellkerns ohne Nucleoli mit drei Kohlenstoffionen mit $P_{MN,NB,sDK} = (0,34 \pm 0,04)$ MN/sDK bzw. $P_{MN,ZB,sDK} = (0,36 \pm 0,05)$ MN/sDK einem signifikanten Anstieg bei der Mikronukleirate im Vergleich den mit $P_{MN,K1,sDK} = (0,073 \pm 0,019)$ MN/sDK und $P_{MN,K2,sDK} = (0,073 \pm 0,022)$ MN/sDK übereinstimmenden Kontrollen kam. Die Mikrokernraten pro sicher doppelkerniger Zelle bei beiden Bestrahlungsarten sind im Rahmen des Fehlers gleich. Betrachtet man jedoch unabhängig von der Mikrokernzahl,

wie viele doppelkernige Zellen mit mind. einem Mikrokern pro bestrahlter Zelle entstehen, so liegen mit $0,107 \pm 0,011$ nach Nucleolusbestrahlung signifikant mehr vor als nach Zellkernbestrahlung mit $0,073 \pm 0,008$.

4.3.1.6 Diskussion

Die höheren Anteile der mehrkernigen und doppelkernigen Zellen und niedrigere Anteile an einzelkernigen Zellen, jeweils pro ausgezählter Zelle, in den Kontrollen (Abb. 4.8) zeigen einen deutlichen Effekt auf den Zellzyklus durch die Bestrahlung. Es ist interessant, dass die Anteile der einzelkernigen Zellen nach der Nucleolusbestrahlung signifikant kleiner als nach Zellkernbestrahlung sind. Dabei liegt der doppelkernige Zellanteil nach der Nucleolusbestrahlung im Rahmen der Kontrollen und ist damit leicht größer (erfüllt 68%-Vertrauen, aber nicht 95%) als nach Zellkernbestrahlung. Dass der doppelkernige Zellanteil der Kontrolle nicht wesentlich über dem der Nucleolusbestrahlung liegt, ist wohl durch den Übergang von doppelkernigen zu mehrkernigen Zellen in den Kontrollen zu erklären. Denn hier liegen die Kontrollen wieder signifikant über dem Anteil mehrkerniger Zellen der Nucleolusbestrahlung. Bei den apoptotischen/mitotischen/nekrotischen Zellen stimmen die Anteile der Bestrahlung überein, wodurch der Einfluss der Bestrahlung in 24 h wohl nur zu einem Zellzyklusarrest führt, und nicht direkt zu Zellsterben.

Die Doppelkernraten der Kontrollen im Bereich von $P_{DK,K1,gez,korr} = 0,63 \pm 0,04$ bis $P_{DK,K2,gez,korr} = 0,570 \pm 0,026$ sind plausibel, da bei Cytochalasin B-Konzentrationsreihen bei der verwendeten Konzentration $1 \mu\text{g/ml}$ ebenfalls eine Doppelkernrate von $0,64 \pm 0,06$ bestimmt wurde. Die Konzentrationsreihen wurden in Behältern (μ -Dish, 81166, IBIDI GmbH) mit einem $170 \mu\text{m}$, und damit für Lebendzellmikroskopie geeigneten, dicken Glasboden mit einem $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ -Gittermuster verwendet. Die Doppelkernrate wurde durch Mikroskopieren vor und 24 h nach Cytochalasin B-Behandlung bestimmt (Daten nicht gezeigt).

So ergibt sich insgesamt unter der Annahme, dass die Bestrahlung nach 24 h zu einem leichten Zellzyklusarrest führt, ein stimmiges Bild, wobei die Zellkernbestrahlung scheinbar stärker hemmend wirkt als die Nucleolusbestrahlung.

Aufgrund der Zielerkennungsquote von etwa 80% und der mit der Zielgenauigkeit abgeschätzten Trefferwahrscheinlichkeit eines Nucleolus mit $3 \mu\text{m}$ Durchmesser von über 80%, sind bei den unterschiedlichen Bestrahlungsarten nicht nur der Nucleolus oder der Zellkern ohne Nucleolus getroffen worden. Dadurch sind die Ergebnisse in Tab. 4.1 nicht eine reine Folge eines Nucleolus bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffers. Deswegen soll im Folgenden der Mikrokernrest mit den eingehenden Wahrscheinlichkeiten modelliert werden und die Werte entmischt werden, um die reinen Doppelkernraten und Mikrokernraten nach einer Bestrahlung des Nucleolus bzw. Zellkerns ohne Nucleolus zu erhalten.

Nach der Bestrahlung eines Nucleolus (lus) bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“ (ZK), setzen sich die über die Mikrokernanzahl $N_{MN,lus}$, $N_{MN,ZK}$ und die Zahl sicher doppelkerniger Zellen $N_{sDK,lus}$, $N_{sDK,ZK}$ gemessenen Mikrokernraten $P_{MN,sDK,lus}$ bzw. $P_{MN,sDK,ZK}$ aus zwei Wegen zusammen, die in Abb. 4.9 orange dargestellt sind. Sie lassen sich mit den Wahrscheinlichkeiten $P_{sDK,lus}$ bzw. $P_{sDK,ZK}$ der sicheren Doppelkernbildung nach Nucleolus bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffer, der Wahrscheinlichkeit für eine Mikrokernbildung bei sicherer Doppelkernbildung $P_{MN,lus}$ bzw. $P_{MN,ZK}$ nach Nucleolus bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffer und der jeweiligen Trefferwahrscheinlichkeit $P_{Treff,lus}$ bzw. $P_{Treff,ZK}$ folgendermaßen berechnen:

$$P_{MN,sDK,lus} = \frac{N_{MN,lus}}{N_{sDK,lus}} = P_{MN,lus} \cdot P_{sDK,lus} \cdot P_{Treff,lus} + P_{MN,ZK} \cdot P_{sDK,ZK} \cdot (1 - P_{Treff,lus}) \quad (4.3)$$

$$P_{MN,sDK,ZK} = \frac{N_{MN,ZK}}{N_{sDK,ZK}} = P_{MN,ZK} \cdot P_{sDK,ZK} \cdot P_{Treff,ZK} + P_{MN,lus} \cdot P_{sDK,lus} \cdot (1 - P_{Treff,ZK}) \quad (4.4)$$

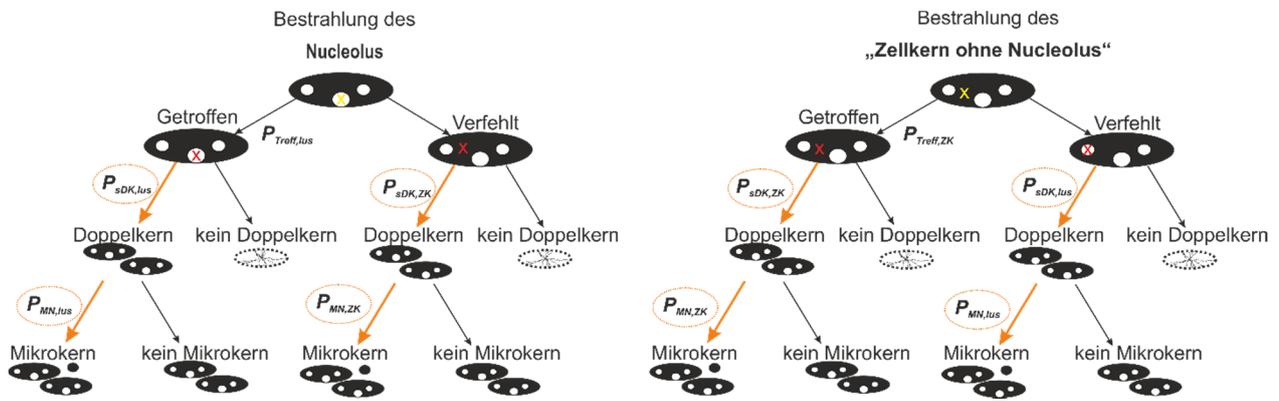


Abb. 4.9: Wahrscheinlichkeiten für die Mikrokernbildung nach Nucleolus- und „Zellkern ohne Nucleolus“-Bestrahlung. Nach beiden Bestrahlungen setzen sich die gemessenen Mikrokernraten $P_{MN,sDK,lus}$ bzw. $P_{MN,sDK,ZK}$ aus der Summe von zwei Wegen zusammen (orange Pfeile). Die Wege sind dabei das Produkt der gesuchten Wahrscheinlichkeit der Doppelkernbildung $P_{sDK,lus}$ bzw. $P_{sDK,ZK}$ nach Nucleolus- bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffer und der gesuchten Wahrscheinlichkeit der Mikrokernbildung $P_{MN,lus}$ bzw. $P_{MN,ZK}$ nach Nucleolus- bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffer bei der Doppelkernbildung. Die Wege sind in Abhängigkeit des Bestrahlungsorts mit der Trefferwahrscheinlichkeit des Nucleolus $P_{Treff,lus}$, und des „Zellkerns ohne Nucleolus“ $P_{Treff,ZK}$ gewichtet.

Zugleich kann auch die sichere Doppelkernrate $P_{sDK,lus,ges}$, bzw. $P_{sDK,ZK,ges}$ der beiden Bestrahlungsarten über die Zahl der ausgewerteten sicheren Doppelkerne $N_{sDK,lus}$, $N_{sDK,ZK}$ und bestrahlten Zellen $N_{Z,lus}$, $N_{Z,ZK}$ des jeweiligen Bestrahlungsexperiments analog zu den Formeln (4.3) und (4.4) ermittelt werden:

$$P_{sDK,lus,ges} = \frac{N_{sDK,lus}}{N_{Z,lus}} = P_{sDK,lus} \cdot P_{Treff,lus} + P_{sDK,ZK} \cdot (1 - P_{Treff,lus}) \quad (4.5)$$

$$P_{sDK,ZK,ges} = \frac{N_{sDK,ZK}}{N_{Z,ZK}} = P_{sDK,ZK} \cdot P_{Treff,ZK} + P_{sDK,lus} \cdot (1 - P_{Treff,ZK}) \quad (4.6)$$

Die Wahrscheinlichkeit den Nucleolus oder „Zellkern ohne Nucleolus“ bei der jeweiligen Bestrahlungsart zu treffen, ergibt sich ebenfalls aus zwei Wegen: Erstens den Nucleolus bei der jeweiligen Bestrahlung zu erkennen $P_{Erk,lus,lus}$ bzw. $P_{Erk,lus,ZK}$ um ihn anvisieren oder gezielt nicht anvisieren zu können, und diesen Zielort ($P_{Treff,ort,lus}$ bzw. $P_{Treff,ort,ZK}$) zu treffen. Zweitens kommt die Wahrscheinlichkeit hinzu den Nucleolus oder „Zellkern ohne Nucleolus“ mit $P_{lus} = 0,1$ bzw. $P_{ZK} = 0,9$ zu treffen, wenn die Mitte des Zellkerns bestrahlt wird. Dabei wird angenommen, dass der Nucleolus, gemäß seinem Flächenanteil im Zellkern, mit etwa 10% getroffen wird. Die Mitte des Zellkerns wurde bestrahlt, wenn die Nucleoli nicht zu erkennen waren. Es ergibt sich:

$$P_{Treff,lus} = P_{Treff,ort,lus} \cdot P_{Erk,lus,lus} + P_{lus} \cdot (1 - P_{Erk,lus,lus}) \quad (4.7)$$

$$P_{Treff,ZK} = P_{Treff,ort,ZK} \cdot P_{Erk,lus,ZK} + P_{ZK} \cdot (1 - P_{Erk,lus,ZK}) \quad (4.8)$$

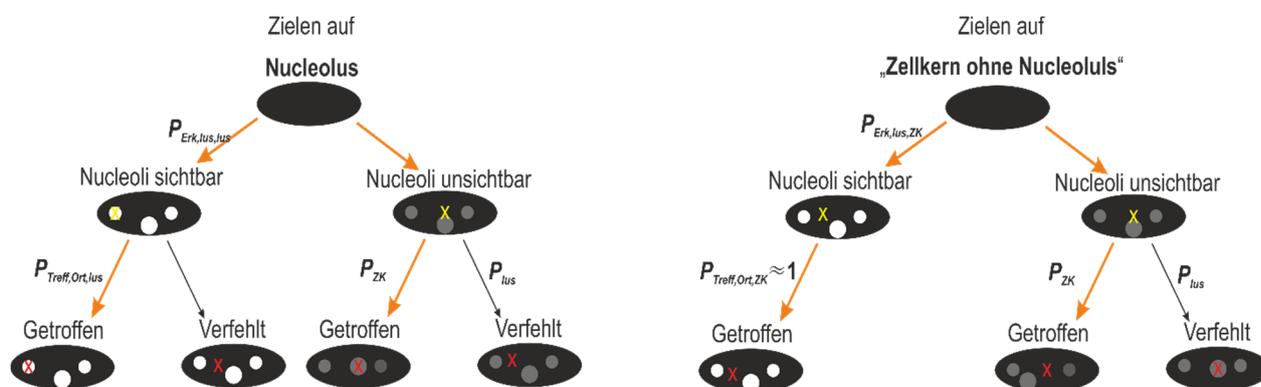


Abb. 4.10: Die Wahrscheinlichkeit den Nucleolus bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“ bei der jeweiligen Bestrahlung zu treffen $P_{Treff,lus}$ bzw. $P_{Treff,ZK}$, hängt von der Rate ab, wie oft das jeweilige Ziel erkennbar ist ($P_{Erk,lus}$) und getroffen wird ($P_{Treff,ort}$), oder das Ziel nicht erkennbar ist und zufällig getroffen wird (P_{lus} bzw. P_{ZK}).

Setzt man die Formeln (4.7) und (4.8) in (4.3)-(4.6) ein, erhält man ein lineares Gleichungssystem mit 4 Gleichungen und den unabhängigen Unbekannten für die Bildung von mindestens einem Mikrokern $P_{MN,lus}$, $P_{MN,ZK}$ und eines sicheren Doppelkerns $P_{sDK,lus}$, $P_{sDK,ZK}$, nach einem Nucleolus- oder „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffer (Tab. 4.2).

Alle in der Modellierung verwendeten Wahrscheinlichkeiten, wie für die Doppelkernbildung oder Mikrokernbildung, beziehen sich auf die Anzahl bestrahlter Zellen. So muss die Kategorieverteilung nach Nucleolusbestrahlung und Zellkernbestrahlung auch bezüglich bestrahlter Zellen berechnet werden (Abb. 4.11 oben). Dabei entsteht die zusätzliche Kategorie der verlorenen Zellen, deren Anteil nach Nucleolusbestrahlung mit $0,073 \pm 0,0254$ deutlich größer ist als nach Zellkernbestrahlung mit $0,158 \pm 0,028$. Es können aber trotzdem bezüglich der bestrahlten Zellen auch die in Abb. 4.8 beobachteten signifikanten Unterschiede der Anteile doppelkerniger Zellen und Übereinstimmungen der mehrkernigen und apoptotischen/mitotischen/nekroti-

schen Zellanteile bezüglich ausgewerteter Zellen nach Nucleolusbestrahlung und Zellkernbestrahlung festgestellt werden, wobei die einzelkernigen Zellanteile der beiden Bestrahlungen übereinstimmen. Es wird jedoch angenommen, dass der Unterschied bei den verlorenen Zellen ebenfalls kein Bestrahlungseffekt ist, sondern hauptsächlich durch die Probenbehandlung hervorgerufen wird oder die Zellen schon bei Bestrahlung nicht mehr voll funktionsfähig waren, was durch eine kugelige Erscheinungsform erkennbar ist. So wurden diese Kategorie und die Kategorie der Zellen mit defekter Zell- bzw. Zellkernmembran wieder aus der Auswertung genommen (Abb. 4.11 unten). So zeigt sich das gleiche Ergebnis wie in Abb. 4.8. Der Anteil doppelkerniger Zellen ist nach Nucleolusbestrahlung mit $P_{DK,NB,bes,korr} = 0,570 \pm 0,023$ leicht höher als $P_{DK,ZB,bes,korr} = 0,509 \pm 0,022$ nach Zellkernbestrahlung (erfüllt 68%-Vertrauen, aber nicht 95%), während der einzelkernige Anteil wieder mit

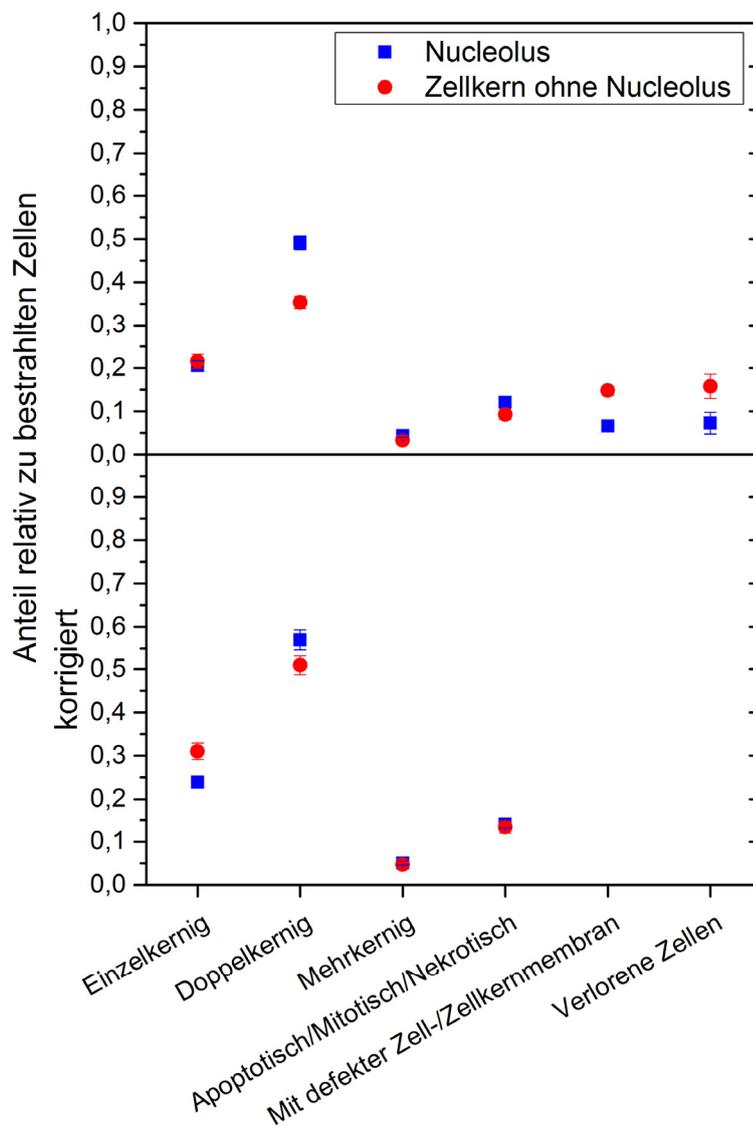


Abb. 4.11: Anteil (oben) und korrigierter Anteil (unten) der Zellarten bezgl. bestrahlter Zellen für die unterschiedlichen Bestrahlungsarten. Bei der Korrektur wurden die Zellen mit defekter Zellmembran und verlorene Zellen auf die anderen Kategorien unter der Annahme umverteilt, dass die gleichbleibender Verhältnisse der Kategorien zueinander gleichbleiben. Die Fehler sind Standardfehler der Mittelwerte und ergeben sich aus Gaußscher Fehlerfortpflanzung der Zählfehler.

$P_{EK,NB,bes,korr}=0,239\pm 0,013$ nach Nucleolusbestrahlung signifikant niedriger ist als $P_{EK,NB,bes,korr}=0,310\pm 0,019$ bei der Zellkernbestrahlung. Die restlichen Anteile stimmen auch wieder überein. Dadurch zeigt sich wieder der Unterschied im Zellzyklus (vgl. Abb. 4.11 unten).

Mit der Beschränkung auf sicher doppelkernige Zellen erhält man eine signifikant unterschiedliche Wahrscheinlichkeit für sichere Doppelkerne von $P_{sDK,lus,bes}=0,369\pm 0,025$ nach Nucleolusbestrahlung und $P_{sDK,ZK,bes}=0,239\pm 0,025$ nach Zellkernbestrahlung. Korrigiert man diese um die Zellen mit defekter Zell- bzw. Zellkernmembran und die verlorenen Zellen ergibt sich mit $P_{sDK,lus,bes,korr}=0,428\pm 0,030$ und $P_{sDK,ZK,bes,korr}=0,35\pm 0,04$ noch ein Unterschied, der zwar 68%-Vertrauen erfüllt, aber nicht mehr 95%-Vertrauen.

In Tab. 4.2 sind die für die Entmischung verwendeten Werte und die Ergebnisse präsentiert:

Für die Entmischung verwendete gemessene Wahrscheinlichkeiten			
$P_{MN,sDK,lus}$	$P_{sDK,lus,bes,korr}$	$P_{Treff,Ort,lus}$	
0,107±0,011	0,428±0,030	0,8±0,05	
$P_{MN,sDK,ZK}$	$P_{sDK,ZK,bes,korr}$	$P_{Treff,Ort,ZK}$	
0,073±0,008	0,35±0,04	1	
$P_{Erk,lus,lus}$	$P_{Erk,lus,ZK}$	P_{lus}	
0,81±0,04	0,89±0,04	0,1±0,01	
Entmischte Wahrscheinlichkeiten			
$P_{MN,lus}$	$P_{MN,ZK}$	$P_{sDK,lus}$	$P_{sDK,ZK}$
0,27±0,05	0,21±0,04	0,47±0,05	0,35±0,04

Tab. 4.2: Ergebnis der entmischten Raten der doppelkernigen Zellen, die mindestens 1 Mikrokern bilden $P_{MN,lus}$, $P_{MN,ZK}$ und der Doppelkernbildungsraten $P_{sDK,lus}$, $P_{sDK,ZK}$ nach Nucleolus- bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffer. Die zugehörigen Fehler ergeben sich mit der Gaußschen Fehlerfortpflanzung. Die eingehenden Wahrscheinlichkeiten sind mit ihren Fehlern ebenfalls gegeben.

Es zeigt sich, dass nach der Bildung einer doppelkernigen Zelle die Wahrscheinlichkeit, dass sie mindestens einen Mikrokern nach Nucleolus- bzw. „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffer bildet mit $P_{MN,lus} = 0,27\pm 0,06$ und $P_{MN,ZK} = 0,21\pm 0,05$ im Rahmen des Fehlers nicht unterscheiden. Dabei unterscheidet sich aber die sichere Doppelkernbildungsrate der bestrahlten Zellen mit $P_{sDK,lus} = 0,47\pm 0,05$ und $P_{sDK,ZK} = 0,35\pm 0,04$ und ist zum Teil der Grund für die unterschiedliche Rate an doppelkernigen Zellen mit mindestens einem Mikrokern pro bestrahlter Zelle (Kap. 4.3.1.5). Nimmt man die Gesamtzahl an doppelkernigen Zellen (sicher + wahrscheinlich) und entmischt diese ebenfalls, so erhält man mit $P_{DK,lus} = 0,60\pm 0,04$ und $P_{DK,ZK} = 0,508\pm 0,023$ gleichfalls einen Unterschied. Dies zeigt, dass das Ergebnis durch die Einschränkung auf sichere Doppelkerne unbeeinflusst ist. Die Experimente wurden auf derselben Probe durch-

geführt, wodurch eine unterschiedliche Probenbehandlung als Erklärung für den Unterschied ausgeschlossen werden kann. Die Bestrahlungsfelder hatten die gleichen Maße und eine ähnliche Zellzahl, wodurch der Verlust von Zellen oder Zellzuwanderung ähnlich sind und das Ergebnis nicht beeinflussen sollten.

4.3.1.7 Fazit des Mikrokerntests

Bei den präsentierten Ergebnissen wurde das erste Mal der genetische Schaden einer gezielten Nucleolus-Ionenbestrahlung mit einer Zellkern-Ionenbestrahlung, bei der der Nucleolus nicht bestrahlt wird, mittels Mikrokerntest verglichen. Unter Verwendung dieser Ergebnisse erhält man ein Verhältnis der „Mikrokern pro sicherem Doppelkern“-Rate von Nucleolus- und „Zellkern ohne Nucleolus“-Treffer von $\frac{P_{MN,lus}}{P_{MN,ZK}} = 1,29 \pm 0,24$ und ein Verhältnis der Gesamtdoppelkernrate von $\frac{P_{DK,lus}}{P_{DK,ZK}} = 1,18 \pm 0,15$.

Gemäß der linearen Abschätzung aus Kap. 4.3.1.1 ist bei der Doppelkernrate ein Wert im Bereich von 1,5 bis 3,9 ($1/0,37 = 2,7$) zu erwarten, wodurch der gemessene Wert signifikant unter der Abschätzung liegt, jedoch mit >1 noch in die gleiche Richtung geht. Bei dem Verhältnis der Mikrokernraten wird, der Abschätzung nach, ein Wert von $0,37 \pm 0,16$ erwartet. Hier liegt das gemessene Verhältnis mit $1,29 \pm 0,24$ jedoch sehr deutlich über der Abschätzung und die Mikrokerninduktion ist nach Nucleolustreffer sogar größer als nach Zellkerntreffer.

Zieht man den signifikant geringeren Anteil der einzelkernigen Zellen nach Nucleolusbestrahlung als nach Zellkernbestrahlung zusätzlich in Betracht, kann auf eine leicht weniger hemmende Wirkung der Nucleolusbestrahlung auf den Zellzyklus geschlossen werden. Dies ist zwar konform mit der Annahme, dass die Teilungsrate mit dem geringen DNA-Schaden entlang der Ionenspur, die durch den Nucleolus führt, steigt. Die Auswirkung der geringeren DNA-Dichte im Nucleolus liegt aber signifikant unter der Abschätzung, die sich aus der Hypothese ergibt.

Betrachtet man zusätzlich, dass die Zahl der Doppelkerne, die Mikrokerne ausbilden, nach beiden Bestrahlungen trotzdem ähnlich ist, kann man die Hypothese signifikant widerlegen und auf einen verstärkten Mikrokernbildungseffekt durch die Schädigung im Bereich des Nucleolus schließen. Es kann hierbei jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Sättigungseffekt bei Bestrahlung mit 3 Kohlenstoffionen auf einen Punkt eingetreten ist. So könnte bei der „Zellkern ohne Nucleolus“-Bestrahlung die Mikrokernelausbeute durch die geringere Doppelkernbildungsrate begrenzt werden und dadurch zu der gleichen Mikrokernrate wie bei der Nucleolusbestrahlung führen. So ist zusätzlich zu einer Wiederholung der Messung auch eine Reduzierung der Dosis, also der Ionenzahl pro Punkt, empfehlenswert.

Insgesamt fallen die beobachteten Effekte der Nucleolusbestrahlung im Vergleich zu der Zellkernbestrahlung dennoch wesentlich geringer aus als mit der linearen Schadensabschätzung aus Kap. 4.3.1.1 angenommen. Dadurch kann die Hypothese, dass die mit 5% deutlich geringere DNA-Dichte im Nucleolus als im restlichen Zellkern nach Ionendurchgang zu einer deutlich geringeren genetischen Zellschädigung führt, abgelehnt werden.

4.3.2 Einfluss von Ionenschäden auf die Transkription und Proteinverteilung im Nucleolus

4.3.2.1 Motivation

Um mögliche Mechanismen für die Auswirkung von Ionisationsschäden im nucleolären Bereich auf die Zellproliferation aufzudecken, wurde speziell die Transkription und die Verteilung der Proteine Parp1 und UBF nach gezielter Bestrahlung des Nucleolus mit Kohlenstoffionen untersucht. Mit der rRNA-Transkription soll untersucht

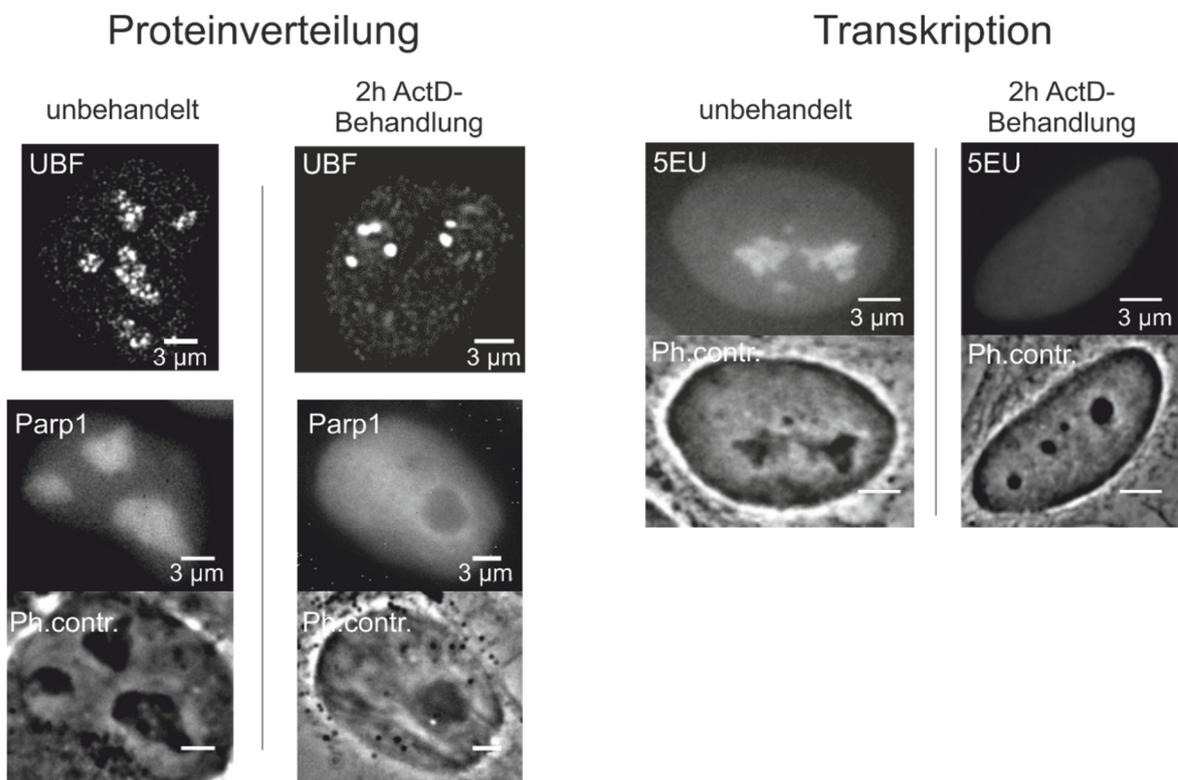


Abb. 4.12: Einfluss des Blockierens der RNA Pol I Transkription auf Proteinverteilung und Transkription die über den 5EU-Einbau quantifiziert wird. 2 h Behandlung von U2OS-MDC1-GFP oder HeLa-Parp1-CB-Zellen mit ActinomycinD (30 nM) blockiert die Transkription der RNA Pol I und sorgt dadurch dafür für die sogenannte Segregation des Nucleolus, bei der sich z.B. UBF in „Nucleolar Caps“ um den Nucleolus sammelt und zu einer Umverteilung von Proteinen wie z.B. Parp1, das den Nucleolus verlässt. Über den 5EU-Einbau wird deutlich, dass keine Transkription mehr im Nucleolus abläuft, wodurch dort das 5EU-Signal ähnlich wie im Zellkern ist. Die Struktur des Nucleolus bleibt bei der Behandlung jedoch erhalten, wie im Phasenkontrast (Ph.contr.) zu erkennen ist.

werden, ob es nach Schäden im Bereich des Nucleolus zu einer Einstellung oder Verminderung der kompletten rRNA-Transkription in der Zelle kommt, und ob der Effekt nur auf den betroffenen Nucleolus oder nur auf den Bereich des Schadens beschränkt ist. Mit den Proteinen Parp1 und UBF werden mögliche Stresssignalwege des Nucleolus an die Zelle überprüft, da nach zellulärem Stress oft eine Umverteilung, die sogenannte Segregation von UBF oder die Umverteilung von Parp1 beobachtet wird (vgl. Kap. 2.1.2.3). [Bou10; Rub03]

Alle die genannten Effekte können durch Blockieren der RNA Pol I-Transkription mit Actinomycin D hervorgerufen (Abb. 4.12) und durch Immunfluoreszenz- oder ClickIT-Chemistry-Verfahren (vgl. Kap. 2.1.1.4 und Kap. 2.3.) sichtbar gemacht werden. Auch durch UV- oder UV-Lasermikrobestrahlungen konnte die rRNA-Transkription in Nucleoli ausgeschaltet und eine Umverteilung von nucleolären Proteinen beobachtet werden. Daraus wurde unter anderem die Schlussfolgerung gezogen, dass DSB im Bereich der rDNA für die Transkriptionsunterbrechung verantwortlich sind. [Lar14; Cal13; Kru07]

Diese Schlussfolgerung ist jedoch umstritten, da nach breiter Bestrahlung mit ionisierender Röntgenstrahlung eine Segregation [Kru07] oder gehemmte rRNA Transkription im gesamten Zellkern selten beobachtet [Lar14; Cal13; Kru07] und auch nicht beobachtet wurde [Al-04; Moo11; War16]. Durch die molekularbiologische Methode DSB in der rDNA mittels Schneideproteinen wie z.B. I-Ppol und Cas9 zu erzeugen, konnte in jüngster Vergangenheit gezeigt werden, dass diese zu einer rDNA-schadensspezifischen nucleolären Segregation und damit verbundenem Stopp der RNA Polymerase I-Transkription führt [vSl15; War16; Fra16]. Es ist jedoch die Frage, wie sich dieser Schaden mit einem strahleninduzierten Schaden vergleichen lässt, da z.B. das Schneideprotein I-Ppol mit 60 DSB pro NOR (0,2 DSB pro rDNA Repeat [vSl15]) eine sehr hohe DSB-Dichte in diesem Bereich erzeugt und die ständige Präsenz der Schneideproteine eventuell die DNA-Reparatur behindern. Da schwere Ionen die höchste Ausbeute an DSB in Relation zu den übrigen DNA-Schäden haben, ist der Schritt, diese Hypothese durch eine gezielte Ionenbestrahlung mit Kohlenstoffionen zu testen, nahezu zwingend.

4.3.2.2 Zelllinien

Es wurden die in Kap. 4.3.1.2 erwähnten HeLa-Parp1-CB-tagRFP-Zellen verwendet, in denen die Nucleoli mittels des Parp1 identifiziert werden können. Zusätzlich wurden für dieses Experiment U2OS-MDC1-GFP-Zellen verwendet, die auch für die Zielgenauigkeitsbestimmung (Kap. 3) verwendet wurden. Zur Bestimmung der Nucleoli wurde hier das MDC1-Signal verwendet, in dem die Nucleoli als dunkle Stellen im Zellkern identifiziert werden können.

4.3.2.3 *Bestrahlung*

Für die Bestrahlung wurden Großfelder, bestehend aus 2x2 Kamerablickfeldern bestrahlt. In den einzelnen Blickfeldern wurden dabei Nucleoli mit einem Punkt bestrahlt. Bei Nichtidentifizierbarkeit werden die Zellkerne mit aus 17 Punkten bestehenden Kreuzen bestrahlt, um die Zellen, die keinen erkennbaren Nucleolus haben, deutlich zu markieren und nicht versehentlich in die Auswertung einzubeziehen. Die Ionenzahl wurde dabei von 1, 10, 50 bis 100 Kohlenstoffionen pro Punkt variiert. Zwischen den Großfeldbestrahlungen wurden definierte Zeitabstände, von 15 min bis zu einer Stunde, eingehalten, um zeitliche Veränderungen der Effekte bis zur Fixierung zu verfolgen. Die Bestrahlung mehrerer Großfelder auf einer Probe hat dabei, im Gegensatz zur Fixierung jedes einzelnen Zeitpunkts auf einer Probe, den großen Vorteil, dass unterschiedliche Dosis- oder Zeiteffekte nicht durch eventuelle Unterschiede während der Färbung oder Probenbehandlung verwischt werden. Die Bestrahlung eines Großfeldes mit etwa 70 Zellen dauert ca. 10 min.

4.3.2.4 *Transkriptionsassay und Proteinfärbung*

Für die Untersuchung der UBF-Proteinverteilung wurden die Zellen ca. 2 h nach der Bestrahlung mit 2% PFA fixiert. Danach wurde die Immunfluoreszenzfärbung von UBF mit dem Fluorophor Alexa647 und γ H2AX mit dem Fluorophor Alexa488 durchgeführt. Zum Abschluss wurden die Nucleoli mit Syto80/83 mit einer Verdünnung von 1:5000 gefärbt und die Proben mit ProLong® Gold eingedeckelt.

Für die Quantifizierung der rRNA-Transkription wurde mit dem 5EU-ClickIT-Chemistry-Kit (ThermoFisher Scientific, C10329) der Einbau des 5EU-Nukleosidanalogs in die RNA im Nucleolus gemessen. Dafür wurde die Probe nach Bestrahlung bei Bedarf weiter inkubiert, um den Zellen bis zu 24 h Zeit zu geben, sich zu erholen. Dann wurden die Zellen 30 min mit 5EU in einer Konzentration von 1 mM bei 37°C weiter inkubiert, womit die Zellen eine definierte Zeitdauer bekommen, das 5EU einzubauen. Nach 15 minütiger Fixierung der Probe mit 2% PFA, folgen die Immunfluoreszenzfärbung des Schadensmarkers γ H2AX mit dem Fluorochrom Alexa647 und darauf die Färbung des 5EU mit Alexa488 mittels ClickIT-Chemistry Verfahren.

Zur Überprüfung, ob überhaupt ein Effekt messbar ist, wurden die Zellen 2 h mit Actinomycin D behandelt. Dies hat einen Stopp der RNA Pol I-Transkription zu Folge, der mit dem 5EU-Assay in den HeLa- und U2OS-Zellen beobachtet werden kann. Dabei tritt auch die nucleoläre Segregation auf, die anhand der Verteilung des UBF-Proteins beobachtbar ist, und eine Umverteilung des Parp1-Proteins (Abb. 4.12).

Die detaillierten Protokolle sind im Anhang hinterlegt.

4.3.2.5 Ergebnis

Durch gezielte Bestrahlung des Nucleolus mit 1, 10 bzw. 100 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP) mit 55 MeV sollte getestet werden, ob es in der betroffenen Zelle oder dem betroffenen Nucleolus zu einer Segregation (Kap. 2.1.2.3, Abb. 4.12) kommt. Deren Erscheinungsbild ist nach konfokaler Mikroskopie in Abb. 4.12 gezeigt. Hierzu wurden die Zellen 2-3 h nach Bestrahlung fixiert. Die Mikroskopie wurde mit einem konfokalen Mikroskop durchgeführt (Leica TCS SP8). Insgesamt konnte in etwa 200 Zellen zu keinem Zeitpunkt und bei keiner Dosis das typische Bild einer Segregation des UBF in sogenannte „Nucleolar Caps“, wie u.a. in Abb. 4.12 dargestellt, beobachtet werden.

Abb. 4.13 zeigt 4 Zellen, in denen jeweils ein Nucleolus mit 1, 10 oder 100 CpP bestrahlt wurde. Es sind zwei Bilder (MDC1 und Phasenkontrast) vor Bestrahlung dargestellt. Dabei deutet die Punktmarkierung, den Bestrahlungsort, und damit den bestrahlten Nucleolus an, dessen Form und Lage klar erkennbar sind. Die vier weiteren Bilder zeigen die UBF-, γ H2AX-, Syto83-Verteilung und eine Überlagerung von UBF und γ H2AX. Da nach der 17 Punkt-Kreuzbestrahlung mit 10 CpP bei der Zielgenauigkeitsbestimmung, die Nucleoli mit Syto83 gut als kompakte Strukturen identifizierbar waren, wird angenommen, dass mit dieser Färbung auch nach einer eventuellen Segregation des UBF der Nucleolusbereich identifizierbar ist. Mit Hilfe der γ H2AX-Färbung kann der getroffene Ort und Nucleolus verifiziert werden.

Bei den oberen beiden Zellen ist klar ein γ H2AX-Focus zu erkennen, der mit dem durch Syto83 gekennzeichneten Nucleolus überlagert, aber auch mit dem UBF-Signal überlagert, das eine homogene Ausdehnung im Nucleolus zeigt (Abb. 4.13 oben). Die Beispielzelle nach Bestrahlung mit 100 CpP lehnt eine Segregation besonders deutlich ab. Hier verteilt sich das γ H2AX-Signal um die UBF-Ansammlung. Da diese UBF-Ansammlung die gleiche Form besitzt wie der Nucleolus vor Bestrahlung in der Phasenkontrastaufnahme, wird eine Segregation hier deutlich ausgeschlossen (vgl. Abb. 4.13 rechts unten). Teilweise konnte nach Bestrahlung mit 10 CpP eine Verteilung des UBF-Signals um den γ H2AX-Focus beobachtet werden (vgl. Abb. 4.13 links unten). Da die Signalform aber eher eine zusammenhängende Sichel um den Schadensmarker bildet und das Syto83-Signal auch diese Form annimmt, wird angenommen, dass die gesamte Nucleolusstruktur von einer Verformung betroffen ist, was auch in den nachfolgenden Experimenten im Phasenkontrastbild deutlich beobachtet wird (vgl. z.B. Abb. 4.22). Dies fällt nicht unter die Definition der eigentlichen nucleolären Segregation, die sich durch die Umverteilung von einigen Proteinen zu „Nucleolar Caps“ am Nucleolusrand auszeichnet, wobei die grobe äußere Form des Nucleolus an sich erhalten bleibt (vgl. Phasenkontrast und UBF-Überlagerung in Abb. 2.5).

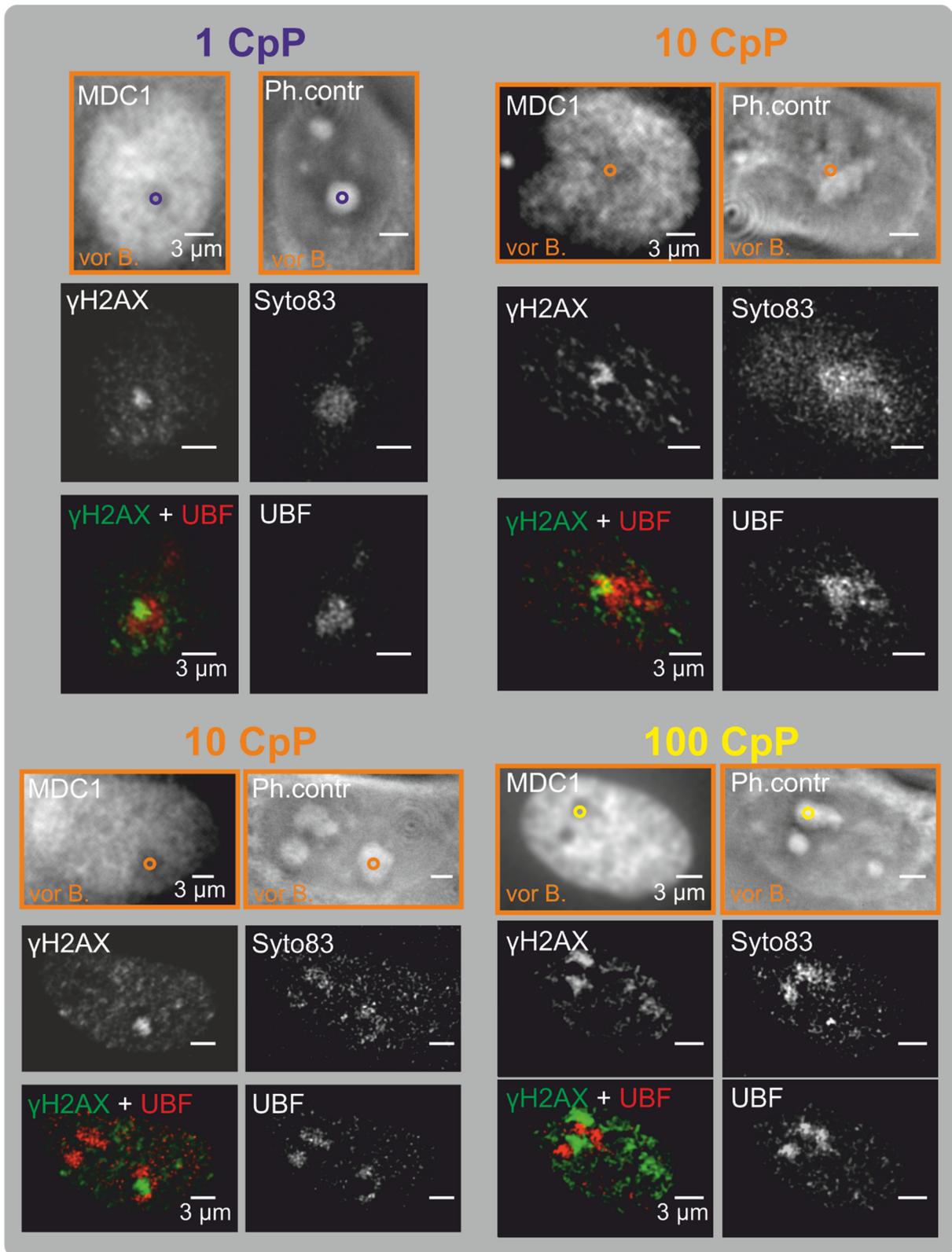


Abb. 4.13: Gezielte Bestrahlung des Nucleolus mit 1, 10 oder 100 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP) und Untersuchung des Einflusses auf die Verteilung des UBF-Proteins. Zu keinem Zeitpunkt und keiner Dosis zwischen 2-3 h konnte eine sogenannte Segregation, Umverteilung des UBF in Nucleolar Caps, beobachtet werden.

Um den Bestrahlungseffekt eventuell auch sensitiver aufzulösen, wurde alternativ der Transkriptionstest gewählt. Bei der Untersuchung der rRNA-Transkription nach gezielter Nucleolusbestrahlung, wurden über 1500 Zellen bestrahlt und im tagRFP-Kanal des Parp1, dem Alexa488-Kanal des 5EU, dem Alexa647-Kanal des γ H2AX und im Phasenkontrast mikroskopiert. Durch Nutzung des Filtersets 20HE (Zeiss GmbH) für tagRFP und des Filtersets 13 für Alexa488 (Zeiss GmbH) kann ein Übersprechen zwischen den zwei Kanälen ausgeschlossen werden. Bei der Mikroskopie wurden z-Stacks mit Abstand 250 nm über die gesamte Zellhöhe aufgenommen und zur Verbesserung der Tiefenauflösung entfaltet. Die Erholungszeiten vor 5EU-Inkubation variierten dabei von 15 min über 45 min, 1:15 h, 1:30 h, 1:45 h, 2:15 h, 3:15 h, 6:30 h bis zu 24 h und die Dosis von 1 über 10, 50 bis 100 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP). Generell konnte bei keinem der Erholungszeitpunkte und Dosispunkte ein genereller Stopp der Transkription in der Zelle und auch nicht über den ganzen bestrahlten Nucleolus beobachtet werden. Jedoch sieht man lokal an den Schadensorten Einflüsse, z.B. Reduzierung des 5EU Signals, die näher untersucht wurden (Abb. 4.14).

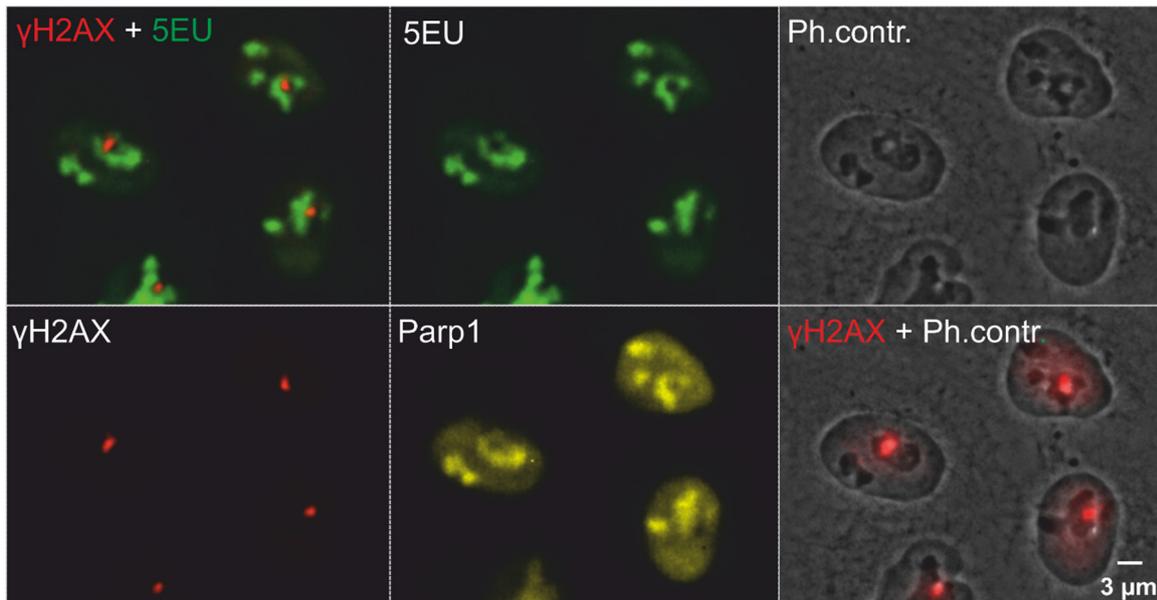


Abb. 4.14: Beispielbild von HeLa-Parp1-CB-tagRFP-Zellen, die mit 10 CpP bestrahlt wurden und 2 h Erholungszeit hatten. Die Zellen wurden als z-Stack mit 33 Ebenen und 300 nm Abstand in den einzelnen Kanälen des γ H2AX, Parp1, 5EU und Phasenkontrast aufgenommen. Zur Auflösungsverbesserung wurden die Bilder entfaltet. Hier ist eine Ebene aus der Mitte des z-Stacks dargestellt. Links oben und rechts unten befinden sich Überlagerungen des 5EU- und γ H2AX-Kanals bzw. γ H2AX und Phasenkontrast. Ein genereller Stopp der Transkription oder in den bestrahlten Nucleoli ist nicht erkennbar. Jedoch scheint lokal an den Schadensorten die Transkription schwächer gewesen zu sein und sich auch die Parp1-Verteilung zu ändern.

Für diese Untersuchung wurde jede Zelle einzeln seinem Zieldefinitionsbild vor Bestrahlung zugeordnet und eine individuelle Bewertung nach verschiedenen Aspekten durchgeführt. Ein Kriterium ist die Rekonstruierbarkeit, die bewertet, wie gut die Übereinstimmung von Zellposition, -form, Nucleolanzahl und -größe der Zellaufnahme bei Bestrahlung im Vergleich zu der Aufnahme der Auswertung ist. Danach wurden die Focusstruktur und dessen Position zum ursprünglich anvisierten Nucleo-

lus bewertet. Abschließend wurde bewertet, ob es an dem Schadensort zu einer Verringerung des 5EU-Signals kommt und ob das Signal des Parp1-Proteins mit dem 5EU-Signal im Nucleolus korreliert. Aufgrund der DNA-Schadensreparatur und der Zellbewegung war die Rekonstruierbarkeit bei 24 h Erholung, speziell mit der Dosis von 1 CpP sehr schwierig, wodurch dieser Zeitwert in der Analyse nicht berücksichtigt wird. Für die weitere Analyse wurden nur Zellen verwendet, die gut zu rekonstruieren waren. Dies eliminierte etwa 1/3 der bestrahlten Zellen aus der Analyse.

Bei der Analyse der Focusstruktur konnten 4 unterschiedliche Arten an Foci unterschieden werden, die am Schadensort durch das γ H2AX gebildet wurden (vgl. Abb. 4.15):

- Einzelfoci: Bestehen aus einem einzigen, runden Punkt.
- Doppelfoci: Bestehen aus zwei, getrennten Punkten.
- Bananenfoci: Beschreiben längliche gekrümmte Foci. Dies ist auch oft in der Tiefe zu beobachten.
- Tripel-/Mehrfachfoci: Beschreiben die Beobachtung von drei bzw. mehreren getrennten Punkten.

Abb. 4.15 zeigt exemplarisch das Erscheinungsbild der vier Fociarten in 4 Zellen, in denen jeweils ein Nucleolus mit einem Kohlenstoffion bestrahlt wurde. Dabei ist eine Ebene des z-Stacks gezeigt. Ein Bild zeigt die Parp1-Verteilung vor Bestrahlung und nach IF-Färbung. Der Punkt in dem Bild vor Bestrahlung (orange umrandet) deutet den Bestrahlungsort, und damit den bestrahlten Nucleolus, an. Ebenfalls sind Einzelkanalaufnahmen von γ H2AX, 5EU, und des Phasenkontrastbildes, sowie eine Überlagerung des 5EU und γ H2AX, nach IF-Färbung gezeigt. Für die Einteilung der Fociart dient das γ H2AX-Bild (weiß umrandet). Foci sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Der Bananenfocuss setzt sich in der Tiefe fort (nicht gezeigt), deutet seine charakteristische gebogene Form aber auch in einer Ebene schon an.

Abb. 4.17 zeigt die Häufigkeiten der Fociarten pro bestrahltem Ziel. Hier tragen zwischen 300 bis 500 Zellen zu einem Dosispunkt bei. Da kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeiten der Fociarten zwischen den Erholungszeiten bis 6:30 h erkennbar war, wurden für die weitere Analyse die Zeiten zusammengefasst. Die Einzelfoci treten mit ca. $(39\pm 6)\%$ bei allen Dosen am Häufigsten auf. Zu 50 CpP ist ein leichter Anstieg auf $(45\pm 3)\%$ zu erkennen. Ca. $(11,7\pm 2,7)\%$ beträgt die Häufigkeit der Doppel- und Bananenfoci bei 1 CpP. Während die Häufigkeit der Bananenfoci von 10 bis zu 50 CpP nahezu konstant bleibt, nimmt die Häufigkeit der Doppelfoci deutlich bei höheren Dosen auf $(5,4\pm 2,7)\%$ ab. Tripel-/Mehrfachfoci haben nur mit 2,3% einen geringen Anteil und fallen zu 50 CpP auf $(0,5\pm 0,6)\%$ ab. Dies ist eine Folge der räumlichen Ausdehnung der Einzelfoci, die bei Häufung an einem Ort zu einem Focus verschmelzen, was sich in dem Anstieg der Einzelfoci zeigt. Die angegebenen Fehler ergeben sich mittels Gaußscher Fehlerfortpflanzung aus den Zählfehlern der Foci und der bestrahlten Ziele.

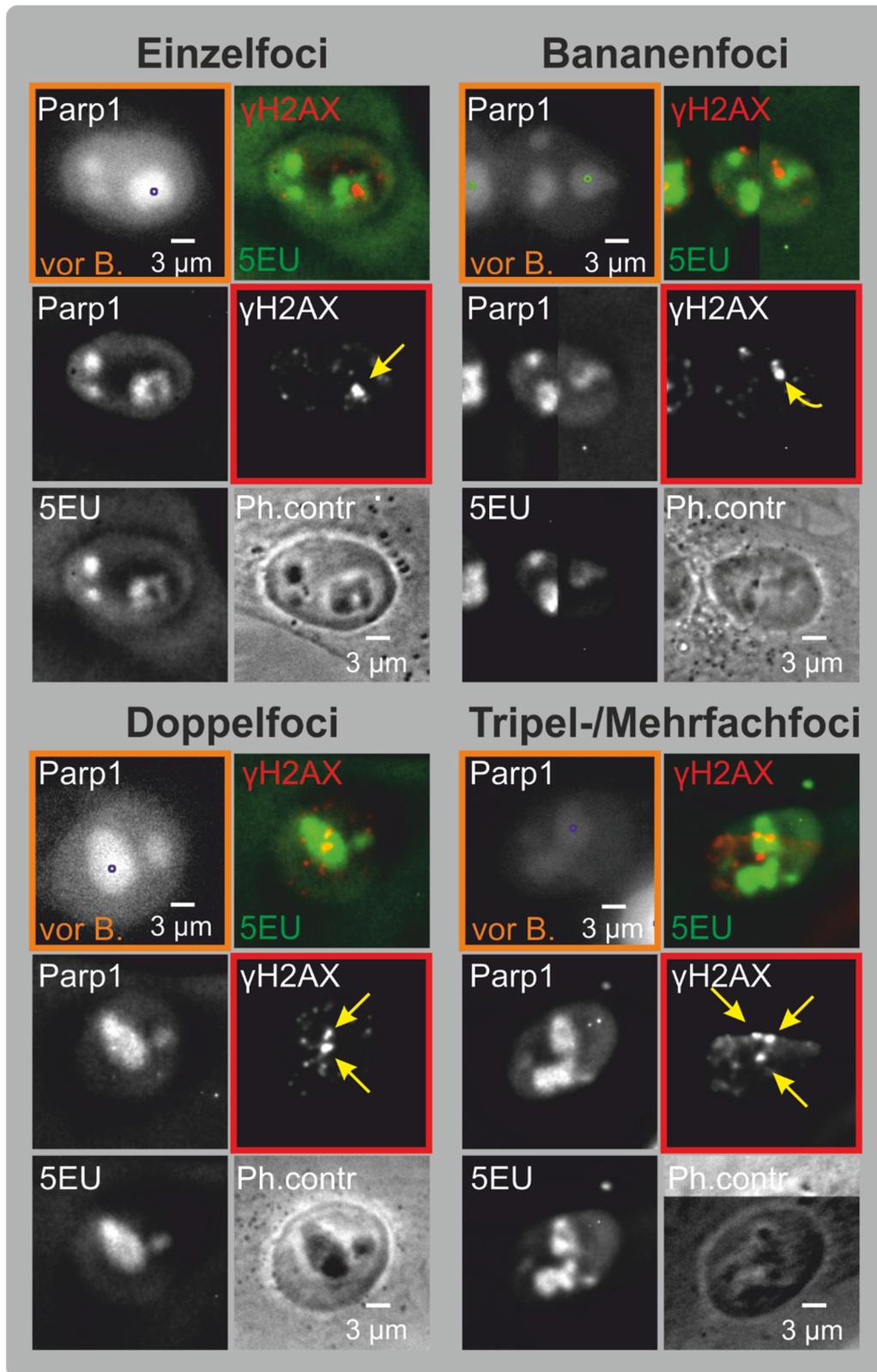


Abb. 4.15: Exemplarische Darstellung der zur Klassifizierung verwendeten Focistrukturen, Einzel-,Bananen-, Doppel- und Mehrfachfoci, nach gezielter Nucleolusbestrahlung. Es sind Bilder einzelner Zellen vor Bestrahlung und nach IF-Färbung gezeigt. Das Parp1-Signal mit dem markierten Ziel (blauer/grüner Punkt) vor Bestrahlung (orange umrandet) und das überlagerte 5EU (grün) und γ H2AX (rot)-Bild nach der IF-Färbung. Zusätzlich sind die Einzelkanalbilder von γ H2AX, Parp1, 5EU und des Phasenkontrastbildes dargestellt (alle grau). Alle Ziele wurden mit 1 Kohlenstoffionen pro Punkt bestrahlt (CpP). Helligkeitskanten entstehen, wenn Zelle sich in am Rand von zwei Kamerablickfeldern liegt. Für die Einteilung wird das γ H2AX Bild (rot umrandet) verwendet. Foci sind mit gelben Pfeilen gekennzeichnet.

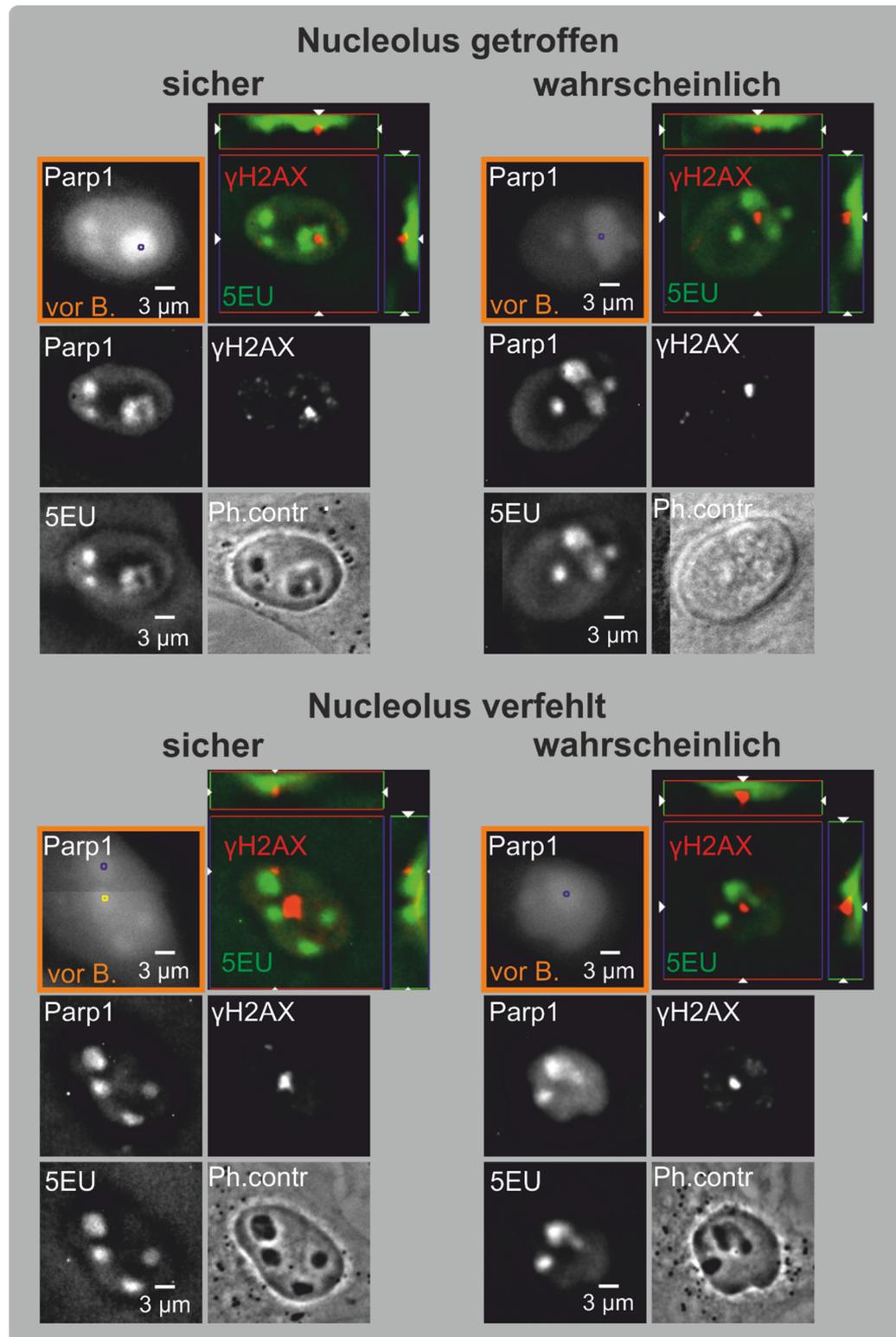


Abb. 4.16: Exemplarische Darstellung der Einteilung des Trefferorts in sichere/wahrscheinliche Nucleolustreffer und sicher/wahrscheinlich verfehlten Nucleolus. Es sind Bilder von 4 Zellen gezeigt, die Einzel-foci nach IF-Färbung zeigen. Es ist das Parp1-Signal mit dem bestrahlten Ziel (blauer/gelber Punkt) vor Bestrahlung (orange umrandet) und nach IF-Färbung zu sehen. Zusätzlich sind die Einzelkanalbilder von γ H2AX, Parp1, 5EU und des Phasenkontrastbildes dargestellt nach IF-Färbung (alle grau). Blaue Ziele wurden mit 1 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP) bestrahlt. Die Trefferbeurteilung erfolgt über die Lage des Focusorts zum bestrahlten Nucleolus, die sich mit der Überlagerung des 5EU(grün)- und γ H2AX(rot)-Bilds nach IF-Färbung beurteilen lässt. Die Tiefenprofilschnitte der Höhe 10 μ m durch den untersuchten Focus zeigen auch eine unterschiedliche Lage der Foci in der Höhe. Bei der sicher verfehlten Nucleolusbildserie wurde zusätzlich ein Nucleolus mit 50 CpP bestrahlt (gelb), was in einem zusätzlichen großen Foci resultiert.

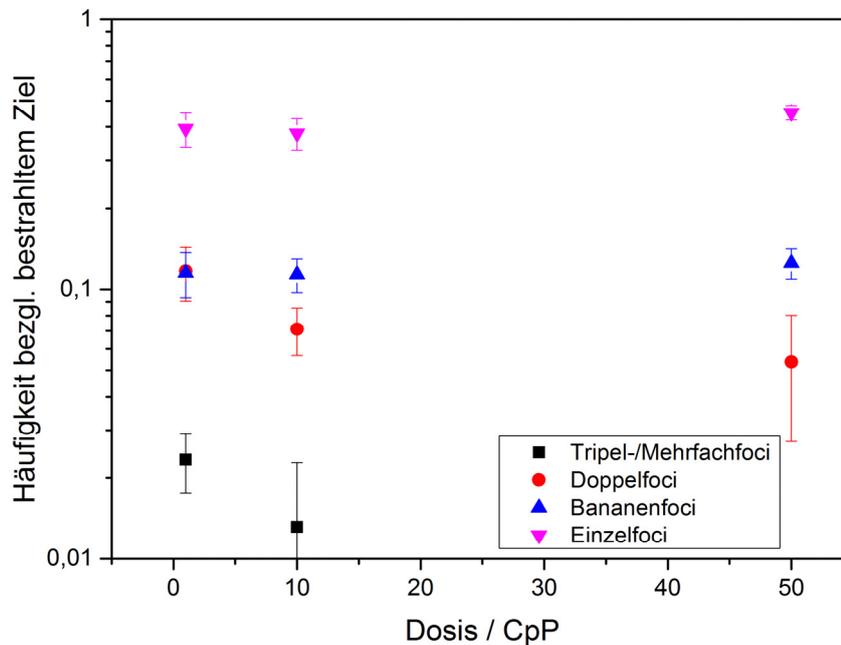


Abb. 4.17: Anteil von Einzel-, Doppel-, Bananen- und Tripel-/Mehrfachfoci nach Bestrahlung mit 1, 10 und 50 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP). Einzelfoci kommen zu 40% bei allen Dosen vor. Bananenfoci treten fast mit 11% konstant bei allen Dosen auf. Die Doppelfoci sind bei 1 CpP genauso häufig zu beobachten. Ihr Anteil fällt aber mit zunehmender Dosis auf fast 5%. Dieser Abfall ist auch bei Tripel-/Mehrfachfoci zu beobachten. Da der Anteil der Einzelfoci und Bananenfoci bei 50 CpP leicht steigt, wird davon ausgegangen, dass die anderen Foci mit zunehmendem Schaden verschmelzen und so ihr Anteil sinkt. Die Fehler ergeben sich nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung aus den Zählfehlern der Foci und bestrahlten Ziele.

Zusätzlich zu den Fociarten, lässt sich ihr Ort bezogen auf den, bei der Bestrahlung, anvisierten Nucleolus als sicherer/wahrscheinlicher Nucleolustreffer oder sicher/wahrscheinlich verfehler Nucleolus kategorisieren (Abb. 4.16).

Abb. 4.16 zeigt exemplarisch die Einteilung des Trefferorts in sichere/wahrscheinliche Nucleolustreffer und sicher/wahrscheinlich verfehlten Nucleolus. Es sind Bilder von 4 Zellen gezeigt, die Einzelfoci nach IF-Färbung zeigen. Es ist das Parp1-Signal mit dem bestrahlten Ziel (blauer/gelber Punkt) vor Bestrahlung (orange umrandet) und nach IF-Färbung zu sehen. Zusätzlich sind die Einzelkanalbilder von γ H2AX, Parp1, 5EU und des Phasenkontrastbildes dargestellt nach IF-Färbung (alle grau). Alle blauen Ziele wurden mit 1 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP) bestrahlt. Die Trefferbeurteilung erfolgt über die Lage des Focusorts zum bestrahlten Nucleolus, die sich mit der Überlagerung des 5EU(grün)- und γ H2AX(rot)-Bildes nach IF-Färbung beurteilen lässt. Die Tiefenprofilschnitte der Höhe 10 μ m durch den untersuchten Focus zeigen auch eine unterschiedliche Lage der Foci in der Höhe. Bei der sicher verfehlten Nucleolusbildserie wurde zusätzlich ein Nucleolus mit 50 CpP bestrahlt (gelb), was in einem zusätzlichen großen Foci resultiert.

Bei sicheren Treffern sind die Foci oder ihr Schwerpunkt mittig im 5EU Signal des Nucleolus eingebettet. Beim wahrscheinlichen Nucleolustreffer fällt aber ein deutlicher Höhenunterschied des Focus- und 5EU-Signals auf oder der Focus liegt am Rand aber noch innerhalb des Nucleolus. Wahrscheinlich verfehlte Nucleoli zeigen eher im 5EU-Signal eingebettete Foci, die sich aber eher außerhalb des Nucleolus befinden. Alternativ kann es sich auch oft um Bananenfoci handeln, die in der Höhe gekrümmt um den Nucleolus herumführen. Bei sicher verfehlten Nucleoli befinden sich die Foci deutlich außerhalb des Nucleolus.

Auch hier ist kein signifikanter Unterschied in den Häufigkeiten der Trefferarten zwischen den Erholungszeiten bis 6:30 h erkennbar, so dass die Zeiten im Folgenden ebenfalls zusammengefasst werden. Betrachtet man dann die Häufigkeit der Trefferorte (Abb. 4.18), zeigt sich, dass die Häufigkeit sicherer Treffer in Abhängigkeit der Ionenzahl von $(30\pm 8)\%$ auf $(40\pm 7)\%$ steigt und die wahrscheinlichen Treffer mit ca. 40% nahezu konstant bleiben. Mit etwa 10 % verhält sich auch die Häufigkeit der sicher verfehlten Nucleoli nahezu konstant. Die Häufigkeit der wahrscheinlich verfehlten Nucleoli sinkt von etwa $(22\pm 3)\%$ auf $(13\pm 4)\%$. Die Fehler ergeben sich nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung aus den Zählfehlern der Foci und gezählten Trefferarten.

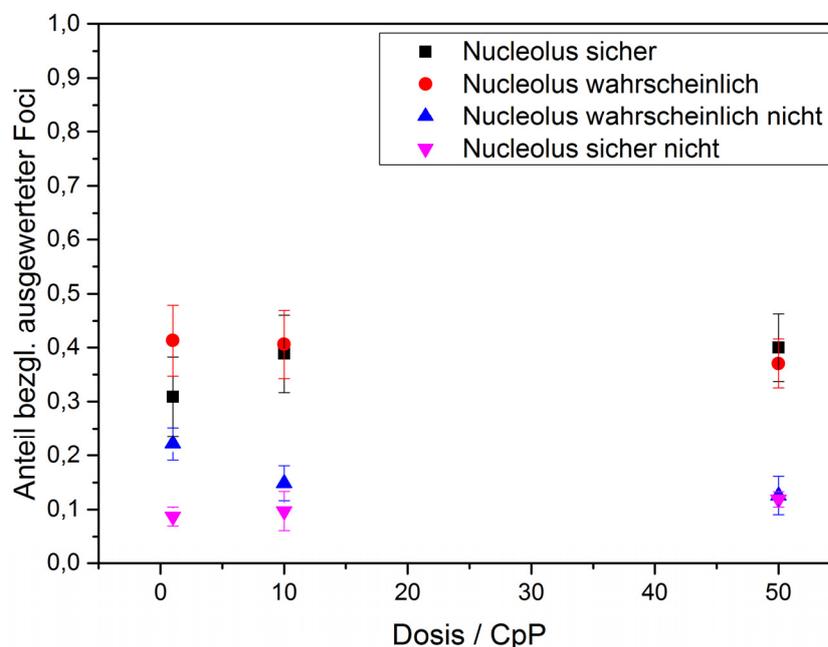


Abb. 4.18: Beurteilung der Fociorte nach sicherem/wahrscheinlichem Nucleolustreffer und sicher/wahrscheinlich verfehlten Nucleolus. Die Fehler ergeben sich nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung aus den Zählfehlern der Foci und gezählten Trefferarten.

Um den Einfluss auf die rRNA-Transkription zu untersuchen, beschränkt man sich auf die Zellen, deren Nucleolus getroffen wurde und Einzelfoci zeigen, da hier am sichersten davon ausgegangen werden kann, dass sich der Schaden im Nucleolus befindet. Der Anteil dieser Zellen pro bestrahltem Ziel ist in Abb. 4.19 über die Dosis dargestellt und steigt von $(10 \pm 3)\%$ auf $(16 \pm 3)\%$. Nimmt man alle Mehrfachfoci zusammen haben sie einen Anteil zwischen $(3,3 \pm 0,8)\%$ und $(2,0 \pm 1,0)\%$, wobei den Großteil dabei Doppelfoci ausmachen. Die Fehler ergeben sich nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung aus den Zählfehlern der Foci und bestrahlten Ziele.

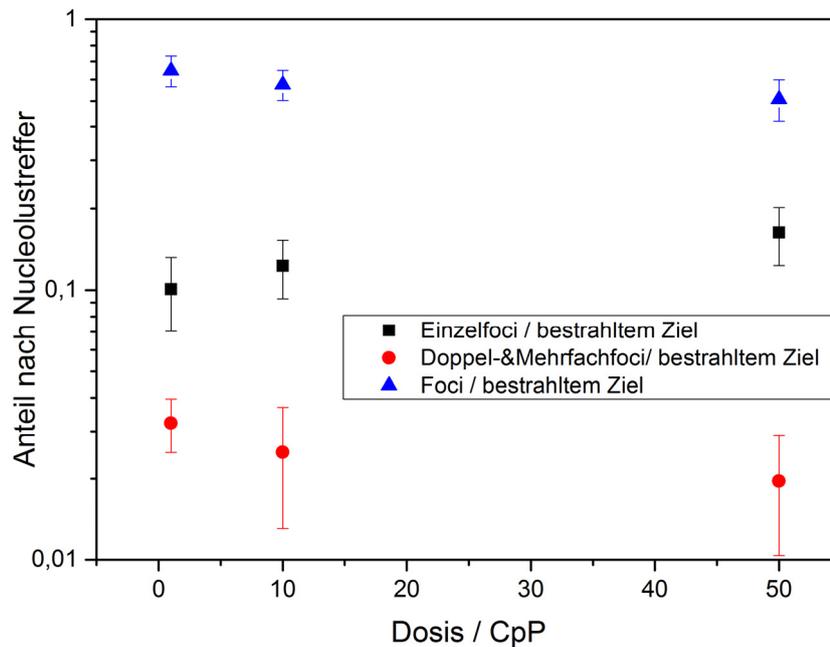


Abb. 4.19: Häufigkeit von Nucleolustreffern pro bestrahltem Ziel mit Einzel- oder Mehrfachfoci. Zusätzlich ist der Anteil der auswertbaren Foci pro bestrahltem Ziel unabhängig vom Trefferort gegeben. Die Fehler ergeben sich nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung aus den Zählfehlern der Foci und bestrahlten Ziele.

Bei der Auswirkung des Schadens auf das 5EU-Signal wurden ebenfalls 4 Kategorien, sicheres/wahrscheinliches 5EU-Loch und sicher/wahrscheinlich kein 5EU-Loch, unterschieden (Abb. 4.20). Abb. 4.20 stellt exemplarisch die Bewertung des 5EU-Signals nach Nucleolustreffer dar. Es sind Bilder von 4 Zellen vor Bestrahlung und nach IF-Färbung gezeigt, die Foci aufweisen. Es ist das Parp1-Signal mit dem markierten Ziel (blauer/grüner Punkt) vor Bestrahlung (orange umrandet) und nach IF-Färbung zu sehen, sowie die Überlagerung des 5EU(grün)- und γ H2AX(rot)-Bilds nach IF-Färbung. Die Tiefenprofilschnitte der Höhe $10 \mu\text{m}$ durch den untersuchten Foci erlauben eine Bewertung der Korrelation von Foci und 5EU-Löchern in der Höhe. Zusätzlich sind die Einzelkanalbilder von γ H2AX, Parp1, 5EU und des Phasenkontrastbildes dargestellt (alle grau). Zur 5EU-Dip-Beurteilung wird bewertet, ob an der Stelle des Einzelfocus (gelber Pfeil) das 5EU-Signal geringer ist als im restlichen Nucleolus. Alle Ziele wurden mit 1 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP) bestrahlt.

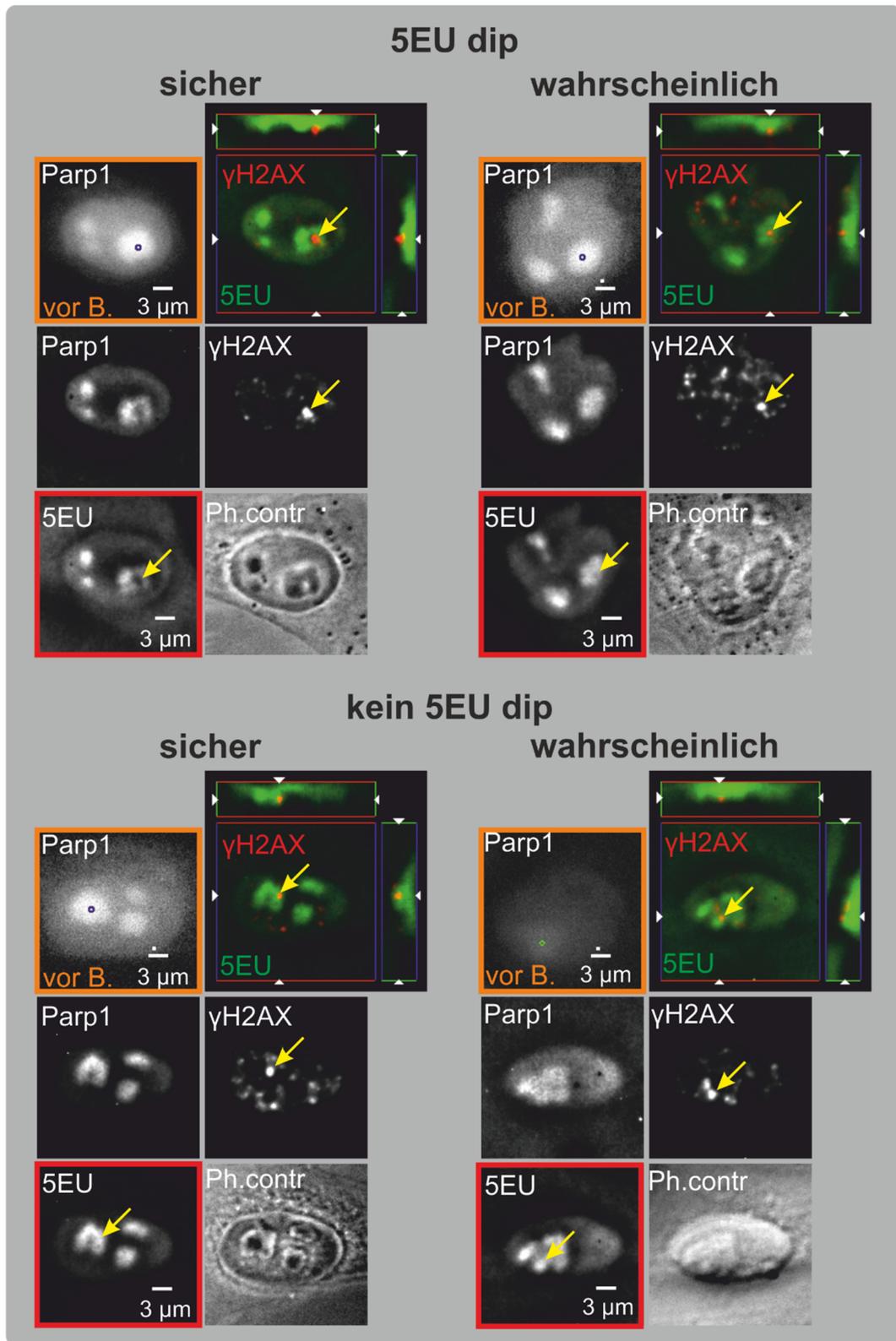


Abb. 4.20: Exemplarische Darstellung der Bewertung des 5EU-Signals nach Nucleolustreffer. Es sind Bilder von 4 Zellen vor Bestrahlung und nach IF-Färbung gezeigt, die einen Foci zeigen. Es ist das Parp1-Signal mit dem markierten Ziel (blauer/grüner Punkt) vor Bestrahlung (orange umrandet) und nach IF-Färbung zusehen, sowie die Überlagerung des 5EU(grün)- und γ H2AX(rot)-Bilds nach IF-Färbung. Die Tiefenprofilschnitte der Höhe 10 μ m durch den untersuchten Foci erlauben eine Bewertung der Korrelation von Foci und 5EU-Löchern in der Höhe. Zusätzlich sind die Einzelkanalbilder von γ H2AX, Parp1, 5EU und des Phasenkontrastbildes dargestellt (alle grau). Zur 5EU-Dip-Beurteilung wird bewertet, ob an der Stelle des Einzelfocus (gelber Pfeil) das 5EU-Signal geringer ist als im restlichen Nucleolus. Alle Ziele wurden mit 1 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP) bestrahlt.

Die Auswertung ergab (Abb. 4.21), dass bei 1 CpP ($90 \pm 19\%$) der sicheren Nucleolustreffer mit Einzelfoci mit einem Rückgang des 5EU-Signals einhergehen. Dieser Effekt steigt bei höheren Ionenzahlen leicht an. Bei der zusätzlichen Untersuchung der Verteilung des Parp1-Signals fällt auf, dass bei hohen Ionenzahlen zu 60% bei einem Loch im 5EU-Signal auch ein Loch im Parp1-Signal auftritt. Bei 1 CpP liegt die Korrelation jedoch bei knapp 87%. Jedoch sind diese Unterschiede aufgrund geringer Statistik nicht signifikant. Die Fehler ergeben sich nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung aus den Zählfehlern der Treffer und beobachteten Löcher.

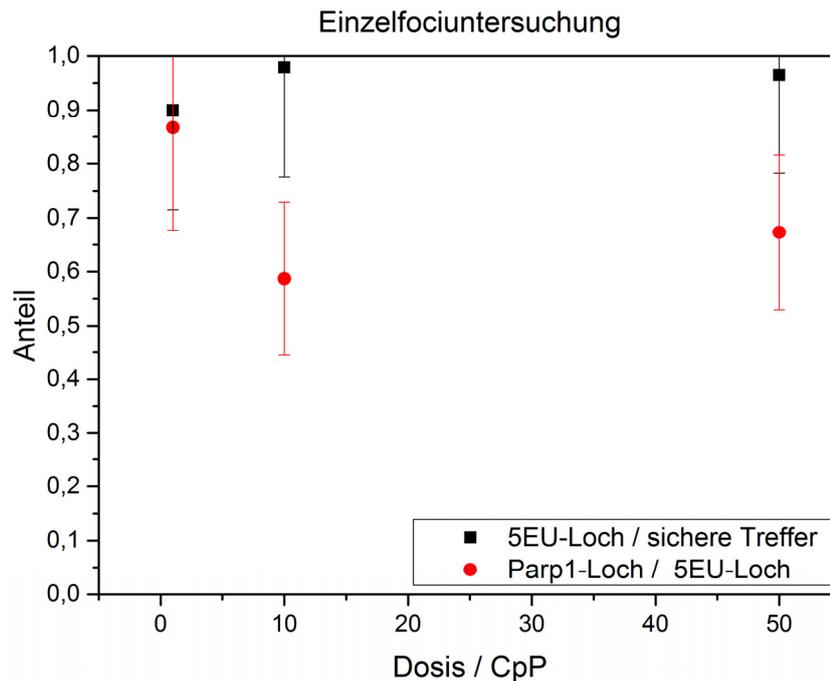


Abb. 4.21: Häufigkeit von Löchern im 5EU-Signal bei sicherem Treffer und Einzelfoci über die Dosis (in Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP)). Zusätzlich ist die Häufigkeit gegeben mit der ein 5EU-Loch von einem Parp1-Loch begleitet wird. Die Fehler ergeben sich nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung aus den Zählfehlern der Treffer und beobachteten Löcher.

4.3.2.6 Diskussion

Man erwartet bei den verwendeten 55 MeV Kohlenstoffionen mit einem LET von $363 \text{ keV}/\mu\text{m}$ in der Zellebene etwa 2 DSB pro μm im Zellkern. Mit der abgeschätzten DNA-Dichte im Nucleolus von 5% (Kap. 4.3.1.1) und einer angenommenen Zellkernhöhe von etwa $6 \mu\text{m}$ und $4 \mu\text{m}$ Nucleolushöhe würde man so nach Bestrahlung mit einem Ion 0,4 DSB in der rDNA des Nucleolus und 4 DSB oberhalb oder unterhalb des Nucleolus abschätzen. So könnte durchaus 1 CpP reichen, um die Transkription durch DSB im Nucleolus zu stoppen.

Da γH2AX über eine Region von etwa 10^6 Basenpaaren um einen DSB phosphoryliert wird [Rog99] und auch mit zusätzlichen DSB über- und unterhalb des Nucleolus nach einem Ionendurchgang durch den Nucleolus zu rechnen ist, wird angenommen, dass, trotz des geringen DNA-Gehalts im Nucleolus, die beobachteten γH2AX -Fociorte in etwa den Trefferorten entsprechen und sich auch im Nucleolus befinden können. So

ergibt sich anhand des Signals des Schadensmarkers γ H2AX, dass der Nucleolus bei der gezielten Nucleolustrahlung zu 70% getroffen wurde (Summe aus wahrscheinlichen und sicheren Treffern in Abb. 4.18). Die Trefferwahrscheinlichkeit liegt damit nur leicht unter dem Bereich der Zielgenauigkeitsabschätzung, ein 3 μ m Objekt mit mehr als 80% zu treffen. Durch das Erscheinungsbild von Doppel- und Mehrfachfoci, sowie Bananenfoci, die sich oft um den Nucleolus bilden, wird jedoch vermutet, dass die unterschiedliche DNA-Dichte in den Bereichen innerhalb und außerhalb des Nucleolus dazu führt, dass die DNA-Schäden eher außerhalb erzeugt werden. Somit werden Treffer in der Nähe des Nucleolusrandes eher außerhalb des Nucleolus zugeordnet, was zu der vermeintlich schlechteren Zielgenauigkeit führt. Eventuell bewegen sich die Schäden auch aus dem Nucleolus. Solche Focusbewegungen wurden bei Ionendurchgängen durch Heterochromatinbereiche im Zellkern schon beobachtet [Jak11] und sind in dem aktiven Bereich des Nucleolus durchaus vorstellbar. Denn dort werden z.B. bei der Segregation große Proteinbewegungen beobachtet und dabei wandern z.B. durch Schneidepoteine erzeugte DSB in der rDNA in die „Nucleolar Caps“ am Rand des Nucleolus [vSl15; War16; Fra16]. Aufgrund geringer Statistik konnte eine Bewegung aber nicht über den zeitlichen Verlauf analysiert werden. Interessant ist jedoch, dass diese Häufigkeitsverteilungen der Fociorte und -erscheinungsbilder nahezu unabhängig von der im Nucleolus applizierten Ionenanzahl sind, die von 1 über 10 bis 50 CpP variiert wurde.

Bei sicheren Treffern in Verbindung mit Einzelfoci konnte eine örtliche Hemmung und der Stopp der Transkription mittels dem 5EU-Einbau in die rRNA beobachtet werden, der auch zu 70% mit einer Schwächung des Parp1-Signals einhergeht. Dass dabei keine Parp1-Foci am Schaden vorhanden sind, ist mit der in Kap 4.1 beobachteten, kurzen Akkumulationszeit von 7 min am Schaden zu erklären. Dadurch sollte Parp1 nach 30 min Inkubation mit dem 5EU Nukleosid nicht mehr am Schaden akkumuliert sein. Das verminderte 5EU-Signal am Ort des γ H2AX Focus ist sehr ähnlich zu der Beobachtung, dass im Zellkern, aber außerhalb des Nucleolus, die RNA Polymerase II Transkription nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung vermindert ist [Sei11]. Deshalb wird vermutet, dass mit der Phosphorylierung von γ H2AX auch im Nucleolus die Transkription vermindert bzw. gestoppt wird.

Die Häufigkeit der örtlichen Transkriptionshemmung wird mit zunehmender Dosis nicht erkennbar größer. Jedoch wird mit zunehmender Dosis die Hemmung der Transkription durch größere Löcher im 5EU-Signal deutlicher, führt aber nicht zu einem ganzheitlichen Stopp der Transkription im betroffenen Nucleolus, obwohl die abgeschätzte DSB-Anzahl im Nucleolus bei 50 CpP und auch 100 CpP bei 20 bzw. 40 DSB in der rDNA liegt. Dies ist konform mit der Beobachtung, dass nach gezielter Bestrahlung des Nucleolus mit Ionenraten von bis zu 100 CpP auch keine nucleoläre Segregation anhand von UBF nachgewiesen werden konnte. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass die Reparaturmaschinerie oberhalb oder unterhalb des Nucleolus die Transkriptionsmaschinerie verdrängt, wodurch das Transkriptionssignal an

der Stelle geschwächt würde. Hier sind z-Stacks mit noch besserer Tiefenaufklärung nötig, um diesen Unterschied weiter zu klären. Besonders schöne Beispiele von Transkriptionslöchern sind in Abb. 4.22 dargestellt, bei denen ein großer Teil des ursprünglichen Nucleolus, der auch von dem γ H2AX-Signal überlagert wird, nicht mehr transkribiert, aber auch im Phasenkontrastbild und auch im Parp1-Signal ein Loch zeigt, woraus geschlossen wird, dass der von dem γ H2AX markierte Schaden immens ist. Das ganze Phänomen ist auch über den gesamten Einschusskanal der Ionen gleich zu beobachten und ist ähnlich zu den Ergebnissen der UV-Lasermikrobestrahlung bei denen die Foci des Schadensmarkers jedoch größer waren als der Nucleolus und damit die Transkription im gesamten Nucleolus gestoppt wurde [Kru07]. Dabei ist vermutlich bei der UV-Mikrobestrahlung der gesamte Nucleolus bestrahlt worden.

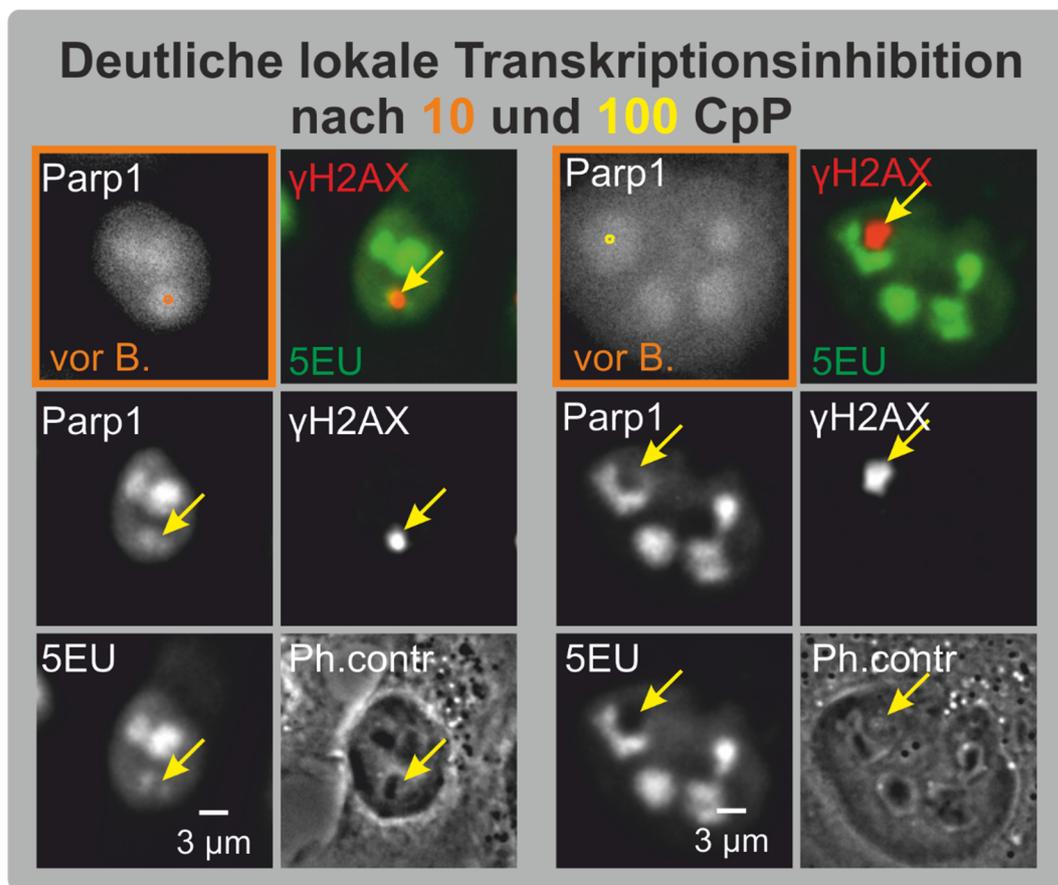


Abb. 4.22: Deutliche Veränderungen in der Nucleolusstruktur bei Dosen ab 10 Kohlenstoffionen pro Punkt (CpP). Man sieht deutlich wie sich nach Bestrahlung das 5EU-Signal des Nucleolus und das γ H2AX-Signal des Schadens (gelber Pfeil) ausschließen und sich dies auch in dem Parp1- und Phasenkontrastbild beobachten lässt.

Besonders bemerkenswert ist jedoch die in diesem Experiment gemachte Beobachtung von mit etwa 10%iger Wahrscheinlichkeit auftretenden Doppelfoci nach hohen Ionenahlen. Dabei wurden die Ionen auf einen einzigen Punkt bestrahlt und der Schwerpunkt der entstandenen Doppelfoci liegt in der Regel auf dem bestrahlten Nucleolus. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass dieser getroffen wurde und dort auch DSB entstanden sind. Jedoch zeigt der Nucleolus, z.B. im 5EU-Signal,

keinerlei Einfluss und der Schaden scheint sich aus dem Nucleolus bewegt zu haben. Für diese Interpretation sind jedoch mehr Daten nötig, wodurch über eine zeitliche Änderung der Doppel- und Mehrfachfoci eventuell ein eindeutiger Schluss gezogen werden könnte.

4.3.2.7 Fazit

Mit diesem Experiment konnte das erste Mal gezeigt werden, dass nach einer gezielten Bestrahlung des Nucleolus mit dicht ionisierenden Teilchen keine nucleoläre Segregation und kein Stopp der RNA Pol I-Transkription im gesamten Zellkern oder im gesamten betroffenen Nucleolus verursacht wird, wie es nach UV-Bestrahlung berichtet wurde. Es wird daraus wie in [Al-04] der Schluss gezogen, dass in erster Linie die bei der UV-Bestrahlung erzeugten sperrigen Schäden, und nicht die relativ dazu selten erzeugten DSB, zu einem Transkriptionsstopp und damit zu einer nucleolären Segregation führen. Bei 50 oder 100 Ionen liegen die erwartete Anzahl an DSB in der rDNA nach gezielter Nucleolus-Ionenbestrahlung in etwa im Rahmen der Anzahl an DSB, die mit Schneideproteinen erzeugt wurden und zu einer nucleolären Segregation führten [vSl15]. Diese war jedoch nicht nach Bestrahlung zu beobachten, wodurch vermutet wird, dass die normal funktionierende DSB-Reparatur den schwerwiegenden Verlauf der Segregation im Nucleolus möglicherweise verhindert.

Es konnte jedoch eine örtliche Hemmung und Stopp der Transkription beobachtet werden, wenn der Ort des Schadensmarkers γ H2AX sich mit dem Nucleolus überlagert. Hierfür können mögliche DSB und deren Reparatur in der im Nucleolus befindlichen rDNA verantwortlich sein, aber auch DSB oberhalb oder unterhalb des Nucleolus, deren Reparaturmaschinerie die Transkriptionsmaschinerie des Nucleolus verdrängt. Jedoch kann nicht beobachtet werden, dass sich der restliche Nucleolusbereich ausweitet, was eher gegen die Verdrängung spricht. Zur Klärung dieser Frage, sind aber z-Stacks mit einer besseren Tiefenauflösung und auch kleinere Schadensmarker nötig, um die genaue Höhe des Schadens zu lokalisieren.

5 Ausblick

Die Entwicklung des Zielbestrahlungsmodus an SNAKE ermöglicht es Substrukturen der Zelle und sogar im Zellkern mit einer Zielgenauigkeit von $(0,4 \pm 0,7) \mu\text{m}$ in X- und $(0,2 \pm 0,8) \mu\text{m}$ in Y-Richtung zu treffen und dabei bis zu 1200 Zellen in einer Stunde zu bestrahlen. Die bestrahlten Zellen können nach Weiterverarbeitung wiedergefunden werden, wodurch in dieser Arbeit z.B. mit dem Mikrokernstest der Einfluss einer gezielten Nucleolusbestrahlung auf den genetischen Schaden und den Zellzyklus untersucht werden konnte.

Für den möglichen weiteren Fahrplan lassen sich grob drei Richtungen unterscheiden, die sich in folgenden Fragen ausdrücken:

1. Welche neuen Fragestellungen in der Strahlenbiologie sind mit der Entwicklung der gezielten Bestrahlung an SNAKE zugänglich?
2. Wie können die Experimentbedingungen ausgebaut werden, um neue Fragestellungen zu beantworten oder gewonnene Erkenntnisse zu vertiefen?
3. Wie können die nach gezielter Nucleolusbestrahlung gewonnenen Erkenntnisse weiter verstanden und eingeordnet werden?

5.1 Mit der Zielbestrahlung neu zugängliche Fragestellungen

Neben der initialen Idee, den Zellkern auf eine ortsabhängige Strahlensensitivität am Beispiel der gezielten Nucleolusbestrahlung zu testen, ist es in diesem Zusammenhang lohnenswert zu klären, ob ähnliche Beobachtungen nach Bestrahlung anderer besonders dichter (Heterochromatin) bzw. dünner DNA-Bereiche (Euchromatin) gemacht werden können. Damit könnte ein Hinweis darauf gewonnen werden, ob die DNA-Dichte Hauptfaktor für DNA-Schäden im Zellkern ist oder ob der Faktor der Transkriptionsaktivität die DNA anfälliger oder widerstandsfähiger für ionisierende Strahlung macht.

Zusätzlich können weitere Strukturen außerhalb des Zellkerns, wie Mitochondrien auf ihre Sensitivität auf ionisierende Strahlung untersucht werden. Diese Idee wird schon erfolgreich mit dem Zielbestrahlungsaufbau im Rahmen des Promotionsprojekts von D.W.M Walsh verfolgt (vgl. Kap. 4.2). Durch eine vom Mitochondrienpotential abhängige Mitochondrienfärbung, konnten u.a. Indizien dafür gewonnen werden,

dass die Mitochondrien nach gezielter Bestrahlung mit Ionenraten von 100 CpP ihr Membranpotential verlieren.

Mit der gezielten Bestrahlung kann auch die weitere Frage beleuchtet werden, ob Bereiche der DNA-Reparatur anfälliger oder widerstandsfähiger auf ionisierende Strahlung reagieren. Hier kann durch eine gezielte Erzeugung von DNA-Schäden mittels einer ersten Ionenbestrahlung, die Akkumulation von z.B. Schadensmarkern stabil transfizierter Zellen genutzt werden, um diese Schadensorte live zu lokalisieren und den Einfluss einer oder mehrerer weiterer Bestrahlungen in definierten Zeitabständen zu untersuchen.

5.2 Ausbau von Experimentbedingungen

Die Anzahl neuer Anwendungsideen und auch einige biologische Endpunkte erfordern die Steigerung der Anzahl bestrahlter Zellen und Probenreplikaten. Die Bestrahlungszeit wird hauptsächlich durch die Zieldefinition limitiert, die auch den Großteil zur Arbeitsbelastung des Experimentators beiträgt.

Für eine Ausweitung der Zielbestrahlungsexperimente ist so eine weitere Automatisierung der Zielerkennung angeraten. Derzeit ist diese stark von der Färbeeffizienz sowie -qualität nach stabiler Transfektion eingeschränkt. Intensive Optimierung des Transfektionsvorgehens und neue zellverträgliche Farbstoffe könnten zu einer Steigerung der Zielerkennungseffizienz der in dieser Arbeit etablierten automatischen Zielerkennung führen. Es ist jedoch fraglich, ob diese stabil zum Zeitpunkt des Experiments eine ausreichende Effizienz gewährleisten und ob ein Einfluss auf die Zelle zufriedenstellend ausgeschlossen werden kann. Eine zellschonende und effiziente Methode zur Identifikation von Zellen, Zellkernen und Nucleoli ist die Phasenkontrast-Methode. Wegen der Struktur der Kaptonfolie der Austrittsnase ist es aber momentan mit ihr nicht möglich Zellstrukturen im Zielbestrahlungsmodus zu erkennen. Mit einer anderen Folienart und der Automatisierung der Steuerung der Phasenkontrastbeleuchtung kann diese Methode anwendbar gemacht werden. Herkömmliche Thresholding-Methoden werden jedoch höchstwahrscheinlich nicht ausreichen in den strukturreichen Phasenkontrastbildern das gewünschte Ziel verlässlich (>95%) zu finden. Daher ist es am vielversprechendsten, die Zielerkennung auf Basis künstlich neuronaler Netze (deep learning) zu verwirklichen. Dies erfordert aber ein stabil etabliertes System (Zellart, Aufnahmeart, Vergrößerung, Ziele,...) auf das man die Erkennung anwenden will. Zugleich wird ein großer Satz an Trainingsdaten in diesem System benötigt, mit dem das Maschinlernen durchgeführt werden muss. Vorteil ist, dass die Aufnahme von Trainingsdaten und das Training unabhängig von Strahlzeiten durchgeführt werden kann. Eine Automatisierung des Trainingsprozesses ist dennoch empfehlenswert.

Eine andere lohnenswerte Weiterentwicklung ist, einzelne Zellen strukturiert in den Lebendzellcontainern auszusäen. Neben einer erwarteten Steigerung der Zielerkennungseffizienz, könnten dadurch komplizierte biologische Endpunkte etabliert werden. So würde dies bei genügend großem Abstand einen Zellüberlebensstest mittels Koloniebildung nach 5-8 Teilungen direkt im Bestrahlungscontainer ermöglichen. Großer Vorteil davon ist, dass auf das Vereinzeln der Zellen in 6-Wellplatten verzichtet und damit einhergehende Zellverluste von bis zu 70% vermieden werden. Weitere Endpunkte wären die Untersuchung von dizentrischen Chromosomenaberrationen, bei der die Chromosomen kondensiert und etwas vereinzelt werden müssen. Der entstehende Chromosomenhaufen muss dabei der bestrahlten Zelle zugeordnet werden können. Das ist ebenfalls nur möglich, wenn genügend Abstand zwischen den Zellen vorliegt. Zusätzlich hätte man mit genügend großem Abstand potentiell die Möglichkeit DNA-Schäden in einzelnen Zellen mittels des Cometassays zu quantifizieren.

5.3 Rolle und Auswirkung von durch Ionen im Nucleolus erzeugten DNA-Schäden

Die gezielte Nucleolusbestrahlung hat in dieser Arbeit im Vergleich zu der Zellkernbestrahlung einen signifikant schwächer hemmenden Einfluss auf den Zellzyklus gezeigt. Mit diesem Ergebnis drängt sich die Frage auf, ob sich dies auf das Zellüberleben auswirkt. Diese Frage kann mit der Etablierung des vereinzelt aussäens mittels eines Koloniebildungsassays an SNAKE geklärt werden. Dadurch könnte gezeigt werden, dass sich durch ionisierende Strahlung erzeugte Schäden im Zellkern ortsabhängig auf das Zellüberleben, dem Goldstandard der Strahlenbiologie, auswirken.

Bemerkenswert ist jedoch, dass die gemessene Mikrokernrate nach Nucleolus- und Zellkernbestrahlung gleich ist. Hier wäre interessant, die Art der Schäden zu klären. Z.B. könnte man mit der Etablierung eines Cometassays Indizien dafür erhalten, ob sich die Fragmentgröße oder -anzahl nach Nucleolusbestrahlung und Zellkernbestrahlung unterscheiden. Es bietet sich auch die Untersuchung von dizentrischen Chromosomen an, wobei hier besonders die zusätzliche Etablierung des mFish-Assays angedacht werden sollte. Denn dies würde ermöglichen zu klären, ob nach Nucleolusbestrahlung speziell die am Nucleolus beteiligten akrozentrischen Chromosomen von dem genetischen Schaden betroffen sind.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit nach gezielter Ionenbestrahlung gezeigt werden, dass lokal am Schadensort die Transkription gehemmt wird, dies aber nicht zu einer nucleolären Segregation führt. Um die direkte Auswirkung von DNA-Schäden im Nucleolus weiter einordnen zu können, könnte z.B. die STED-Mikroskopie und die Betrachtung von Proteinen wie Ku70 oder sogar Rad51, die kleinere Foci bilden, weiterhelfen, womit der Schadensort genauer lokalisiert werden kann. Das Reparaturprotein Rad51, das spezifisch bei der homologen Rekombination auftritt,

würde dabei auch ein weiteres Indiz liefern, dass rDNA geschädigt wurde oder im Nucleolus durch die stark repetitive rDNA homologe Rekombination unabhängig vom Zellzyklus stattfindet. Denn nach der Erzeugung von DSB in der rDNA mittels Enzymen wurden unabhängig vom Zellzyklus Proteine der homologen Rekombination in den Nucleolar Caps identifiziert, die dort die DSB reparieren sollen [vSl13; vSl15]. Um diese Fragen mit Hilfe von superauflösenden Mikroskopiemethoden zu beantworten, muss jedoch als erstes getestet werden, ob das genutzte System der gezielten Bestrahlung mit dem Szintillator als Zellsubstrat mechanisch und optisch kompatibel ist.

Die oben genannte Auflistung an möglichen Zielen und Fragestellungen, die durch die Entwicklung des Zielbestrahlungsaufbaus an SNAKE möglich ist, ist bei weitem nicht vollständig. Sie zeigt aber auf, dass diese Entwicklung das Spektrum der möglichen Zellexperimente an SNAKE um eine Reihe neuer und exklusiver Experimente erweitert und einige auch schon erfolgreich durchgeführt wurden und werden. So lieferten seine Anwendung auf Experimente, wie dem Mikrokerntest nach gezielter Nucleolusbestrahlung, erste Indizien auf eine ortsabhängige Strahlensensitivität des Zellkerns bezüglich des Zellzyklus und der Mikrokernrate, und ist mit dessen Entwicklung zahlreichen weiteren Erkenntnissen im Bereich der Strahlenbiologie der Weg geebnet worden.

6 Anhang

6.1 Unkorrigiertes Ergebnis des Mikrokerntests

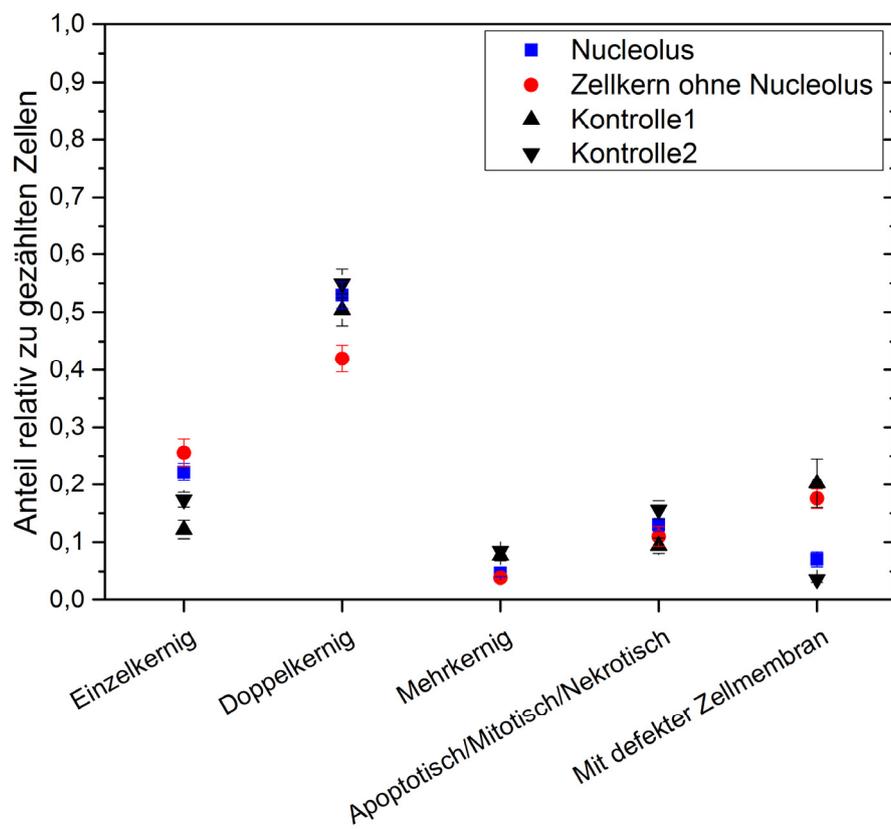


Abb. 6.1: Anteil der Zellarten bezgl. ausgewerteter Zellen für die unterschiedlichen Bestrahlungsarten und zwei Kontrollpositionen. Die Fehler sind Standardfehler der Mittelwerte und ergeben sich aus Gaußscher Fehlerfortpflanzung der Zählfehler.

6.2 Anleitungen für die Programme der Zielbestrahlung und Proben-Mikroskopie

6.2.1 Strahlkalibration

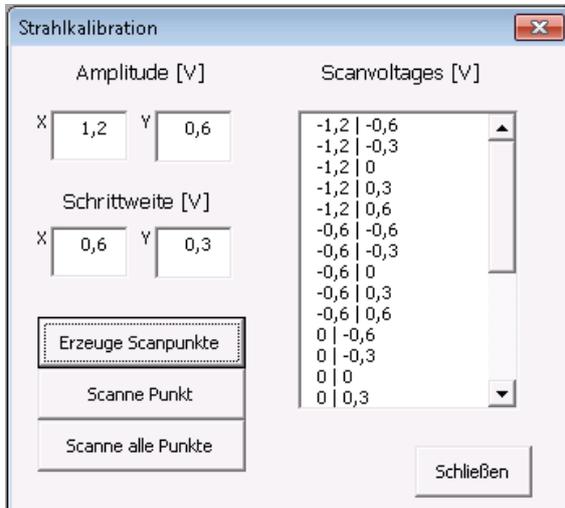


Abb. 6.2: Oberfläche des Makros zur Kalibration der Strahlblendenkeinheiten: Durch Festlegen der Spannungsamplitude und der Schrittweite werden die Spannungspaare erzeugt, zu denen dann automatisch eine Aufnahme des Strahlflecks auf dem Szintillator von der CCD Kamera erzeugt wird.

in der Initialisierungsdatei angegebenem Ordner als Tiff-Bild abgespeichert, wobei „VX“ und „VY“ für die jeweilige X-/Y-Spannung stehen. Alternativ werden mit „Scanne alle Punkte“ alle Punkte automatisch angefahren und bei jedem ein Bild gemacht. Dabei wird die aktuell in den Kameraeinstellungen hinterlegte Belichtungszeit verwendet.

Die erzeugten Bilder werden in einen Kalibrationsordner auf dem Raid in Garching verschoben. Um mit dem auf Root basierendem Analyseprogramm „calcTrafo“ die Kalibrationsparameter zu berechnen, geht man in den Ordner der Bilder und führt die Befehle

```
> mlo marabou
> ls *.tif | calcTrafo
```

aus. Das Programm bestimmt in allen Bildern die Strahlfleckorte mittels Fits einer 2D-Gaußverteilung und berechnet mit der Methode der kleinsten Quadrate die Kalibrationsparameter, die in der Datei „trafo.txt“ im Bildordner hinterlegt werden. Zur Bewertung der Kalibration wird eine .root-Datei hinterlegt, in der z.B. die Abweichungen der gefundenen Strahlorte zu den mit den Spannungswerten und der Kalibration berechneten Orten gegeben sind. Diese Datei kann z.B. mit dem „HistPresenter“ von Dr. Otto Schaile aufgerufen werden, um die Abweichungen grafisch darzustellen. Wenn

Die Eichung der Strahlblendenkeinheiten wird in einem leeren Zellcontainer durchgeführt. Dabei ist die Austrittsnase mit dem Szintillator auf Kontakt. Zur Kalibrierung wird der Ionenstrahl mit definierten Spannungsdifferenzen auf dem Szintillator über den Bildausschnitt der Kamera gerastert. Die Spannungsamplituden und -schritte können per Hand eingegeben werden oder es werden Standardwerte, die in der „TargetedIrradiation.ini“-Datei hinterlegt sind verwendet. Mit „Erzeuge Scanpunkte“ werden die Scanspannungspaare erzeugt, die mit „Scanne Punkt“ einzeln angefahren werden und dort jeweils ein Bild aufgenommen wird. Die Bilder werden mit den Namen „N_VX_VY“ in dem

alle Abweichungen kleiner als $0,25\ \mu\text{m}$ sind, ist die Kalibration der Erfahrung nach gut verwendbar.

6.2.2 Protokoll zum Einbau und Einmessen der LCI-Container mit einem Öl-Objektiv

1. Szintillator und Objektiv mit Putzmischung (4:1 n-Heptan und Isopropanol) reinigen
2. Probe einbauen
3. Mikroskopisch manuell bei unterem Kreuz 0|0 setzen.
4. Für Repositionierung: Kreuze einmessen und Positionen speichern
5. Mit LD-Objektiv Probe auf $30\ \mu\text{m}$ zu Austrittsnase einjustieren
6. Fokusposition an Objektiv zugewandter Szintillatorseite 0 setzen
7. Definiert 300 Schritte ($\approx 450\ \mu\text{m}$) von Nase wegfahren
8. Auf 63er Öl-Objektiv wechseln, und objektivzugewandte Szintillatorseite fokussieren (Als letztes im Auflicht, Kante des Kreuzes sollte sichtbar sein)
9. $300\ \mu\text{m}$ mit Objektiv von Szintillatorvorderseite entfernen
10. Öl mit Pipette (1000 μl , Spitze abschneiden auf 2 mm Durchmesser) von oben zwischen Objektiv und Szintillator in $500\ \mu\text{l}$ Tropfen zuführen
11. Indizien für erfolgreiche Durchführung:
 - Bei Beobachtung des Vorgangs im Livebild wird Bildschirm kurz hell („etwas läuft durchs Bild“).
 - Wenn Fokusposition der Szintillatorvorderseite sich um etwa $100\ \mu\text{m}$ geändert hat.
 - Falls nicht erfolgreich -> Noch einmal Öl zugeben -> nicht erfolgreich -> Ausbauen und Reinigen der Probe
12. Zellbereich suchen und wieder auf $30\ \mu\text{m}$ Abstand zur Nase einjustieren.

6.2.3 Zielbestrahlungssoftware

Die Oberfläche des Zielbestrahlungsmakros ist in mehreren arbeitsschrittspezifischen Seiten organisiert:

- „Ziele“ für die Zieldefinition und Bestrahlung.
- „Offset“ für die Offsetbestimmung.
- „Fokus-Position“ zum Festlegen des Fokus von Szintillator- und Zellebene.
- „Feldbestrahlung“ zum Festlegen zusammengesetzter Felder und Anfahren der Einzelfelder.
- „Optionen“: Hier werden für die Bestrahlung wichtige Parameter, wie die, eingelesen (Kalibrationsparameter) und festgelegt (Scanfrequenz, Punktabstand der Zielmuster) oder Komponenten der Zielbestrahlung verbunden (Mikroskopschlitten, I+O Cup1).

Benötigte Standardwerte und Speicherpfade sind in den Initialisierungsdateien „TargetedIrradiation.ini“ hinterlegt.

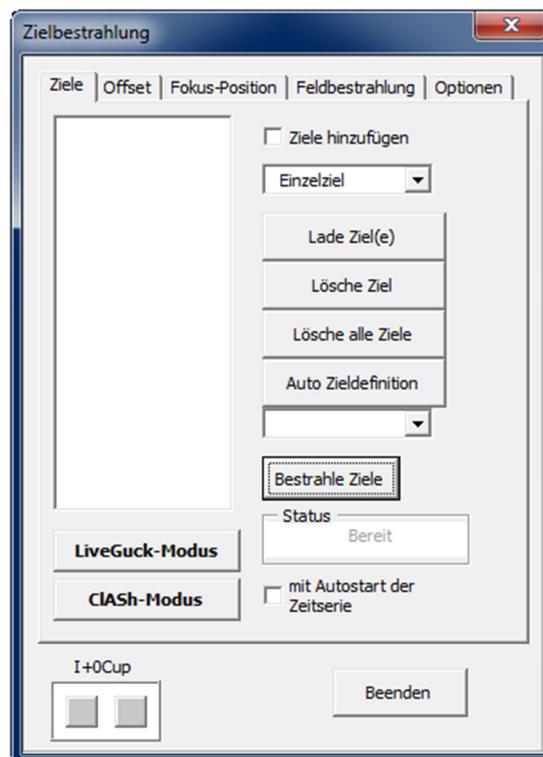


Abb. 6.3: „Ziele“-Seite des Zielbestrahlungsmakros. Hier werden die Zielmuster festgelegt, die durch Klicken in das Zielbild eingefügt werden. Durch Nutzung von „Auto Zieldefinition“ können mit geeigneter Zielfärbung Bereiche wie Zellkerne und Nucleoli automatisch ausgewählt werden oder Mitochondrienbereiche mit einem Matrixmuster belegt werden. Zusätzlich werden hier die verschiedenen Bestrahlungsmodi und ein automatisch Starten der unter „Mehrdimensionale Bildaufnahme“ in AxioVision gerade geöffneten Zeitserie aktiviert.

Die Seite „Ziele“ wird für die Zieldefinition und Bestrahlung verwendet. Als erstes werden die Kalibrationsdaten importiert. Dann können bei aktivierter „Ziele hinzufü-

gen“-Option durch Klicken in das Zielbild die zu bestrahlenden Punkte (Ziele) eingefügt werden, deren Koordinaten in die Listbox eingefügt werden. Es ist möglich unterschiedliche Anordnungen an Punkten (+-Kreuze, x-Kreuze, Kreise,...) um die Position des Mausklicks einzufügen. Zusätzlich ist es möglich ein beliebiges Muster zu erstellen oder aus einem schwarz/weiß-Bild der Größe 100 Pixel x 100 Pixel zu importieren.

Für die Bestrahlung stehen drei unterschiedliche Bestrahlungsmodi zu Verfügung:

- Im Standard-Modus werden die Ziele definiert und danach die Bestrahlung per Hand über „Bestrahle Ziele“ gestartet. Hierbei werden die Zielkoordinaten mit den Transformationskoeffizienten a, b, c, d, e, f in Spannungswerte umgerechnet, die bei der Kalibration der Strahlblendenkeinheiten ermittelt wurden. Diese werden direkt an die Scanning-Karte, die die Strahlblendenkeinheiten steuert weitergegeben. Gleichzeitig werden der Chopper und „I+0 Cup1“ geöffnet und die Bestrahlung im Einzelionenpräparationsmodus durchgeführt. Hierzu wird automatisch der Lichtweg im Mikroskop auf den zugehörigen Photomultiplier gestellt. Am Ende der Bestrahlung wird der Lichtweg zurück auf die Kamera gewechselt.
- Im sog. „Live-Guck“ Modus wird auf eine Ionendetektion verzichtet und intern eine Punktscanrate vorgegeben, die auf der Seite „Optionen“ festgelegt wird. Über die Verweildauer des Strahls an einem Punkt und die Ionenrate des Strahls wird hier auf die Ionenanzahl pro Punkt geschlossen. Dieser Modus erlaubt während der Bestrahlung Zellreaktionen zu beobachten, indem vor oder während der Bestrahlung eine Mikroskopiezeitreihe gestartet wird. In Er wird für sehr schnelle Proteinakkumulationen oder hohen Ionenzahlen (>500 Ionen/Punkt) verwendet.
- Bei aktiviertem ClASh-Modus (Click And Shoot) wird nach einem Mausklick zur Zieldefinition direkt die Bestrahlung der erzeugten Punkte wie im Standardmodus durchgeführt. Anschließend wird eine Aufnahme gemacht, um bei Bedarf das nächste Ziel durch einen Mausklick zu Bestrahlen.

Auf der Seite „Fokus-Position“ werden die Fokuspositionen der Zellebene und der Szintillatorebene nach der Einrichtung Probe festgelegt. Doppeltes betätigen des „Setze Zellebene“-Feldes setzt die Szintillatorebene standardmäßig auf 10 μm vor die Zellebene. Bei dem Wechsel auf die Seite „Zieldefinition“ wird danach automatisch die Zellebene fokussiert und dementsprechend bei der Seite „Offset“ die Szintillatorebene.

In der Seite „Optionen“ sind die Anzahl an Astpunkten oder die Punktabstände des Kreuzmusters hinterlegt. Zusätzlich wird hier die Scanfrequenz für den „Live-Guck“-Modus eingegeben und die Verbindung zu der Tischsteuerung aufgenommen, die für die Großfeldbestrahlung das Mikroskop von der Austrittsnase wegfährt.

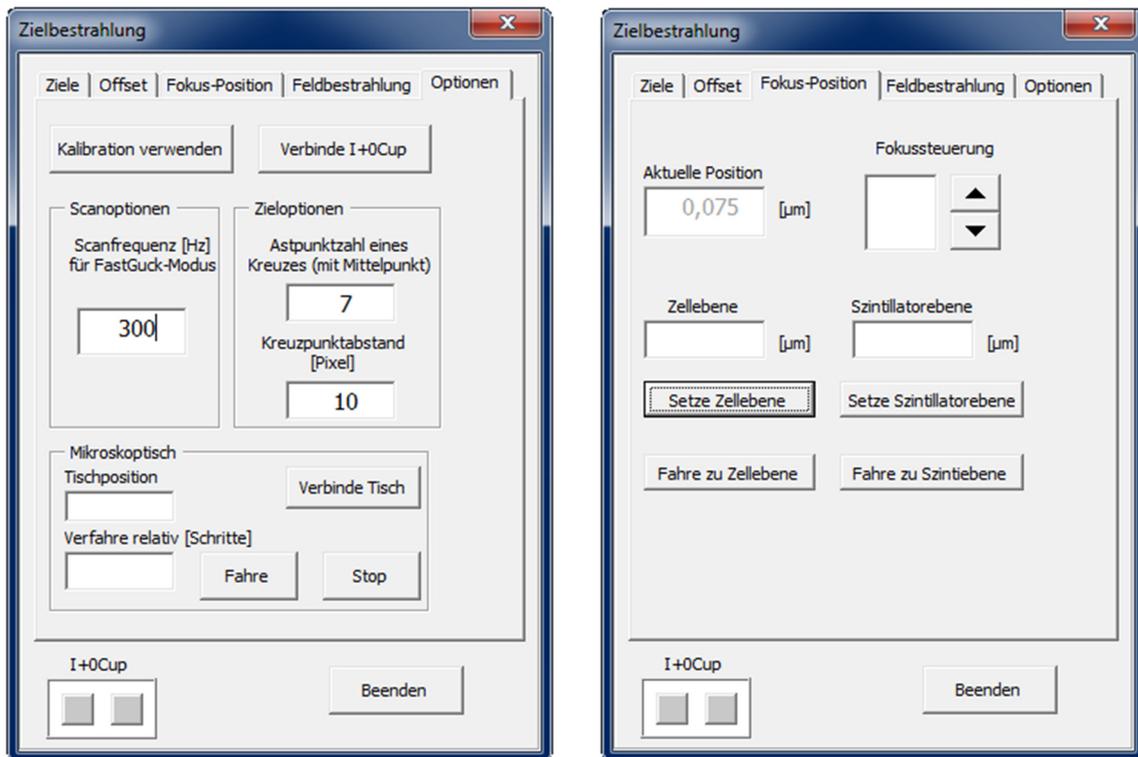


Abb. 6.4: Seite „Optionen“ (links) und „Fokus-Positionen“ (rechts) des Zielbestrahlungsmakros. Bei „Optionen“ werden nach Probeneinbau, der Mikroskopschlitten für das automatische Verfahren des Mikroskops beim Wechsel der Bestrahlungsposition und der I+0Cup1 zum automatischen Bestrahlungsstart verbunden. Zusätzlich werden die Kalibrationsparameter eingelesen und weitere Bestrahlungsparameter (Punktabstand, Astpunktzahl für generierte Kreuze) festgelegt. Auf „Fokus-Position“ werden kurz vor Bestrahlung die Fokuspositionen der Zellebene und Szintillatorebene festgelegt.

Die Seite „Offset“ wird für die Offsetbestimmung benötigt. Nach Einlesen der Kalibrationsparameter der Strahlableinheiten, wird durch Klicken des Buttons „Offset ermitteln“ der Strahl standardmäßig mit 15 µm Abstand zum Rand in die linke obere Ecke des Kamerabildes gelenkt (Bei Verwendung des Großfeldes in die am weitesten vom Großfeldmittelpunkt entfernte Ecke des Bildes). Diese Position kann per Mausklick an das verwendete Bild angepasst werden. Nach Öffnen des Choppers wird eine Aufnahme des vom Ionenstrahl im Szintillator erzeugten Szintillationslichts gemacht. Als Strahlort wird der hellkeitsgewichtete Schwerpunkt der hellsten Fläche mit zwischen 20 und 60 Pixeln genommen. Die Differenz zwischen anvisierter Position und dem Strahlort wird als Offset verwendet.

Zur Großfeldbestrahlung wird die Seite „Feldbestrahlung“ verwendet. Hier wird der Mittelpunkt des Großfeldes gesetzt und der Überlapp angegeben mit dem die Kamerabilder überlappen sollen. Bei Anwählen der Felder wird der Mikroskoptisch an die entsprechende Position gefahren. Bei dem Fahrvorgang ist die Zellebene durch automatisches Verfahren des Mikroskops 1 mm von der Austrittsnase entfernt. Dadurch wird mechanischer Stress vermieden, der durch Reibung der Zellcontainerfolie und der Kaptonfolie der Austrittsnase erzeugt wird und den Strahl im Kamerabild deutlich

versetzt. Nach erfolgter Bestrahlung einer Feldposition wird deren Überschrift ausgegraut.

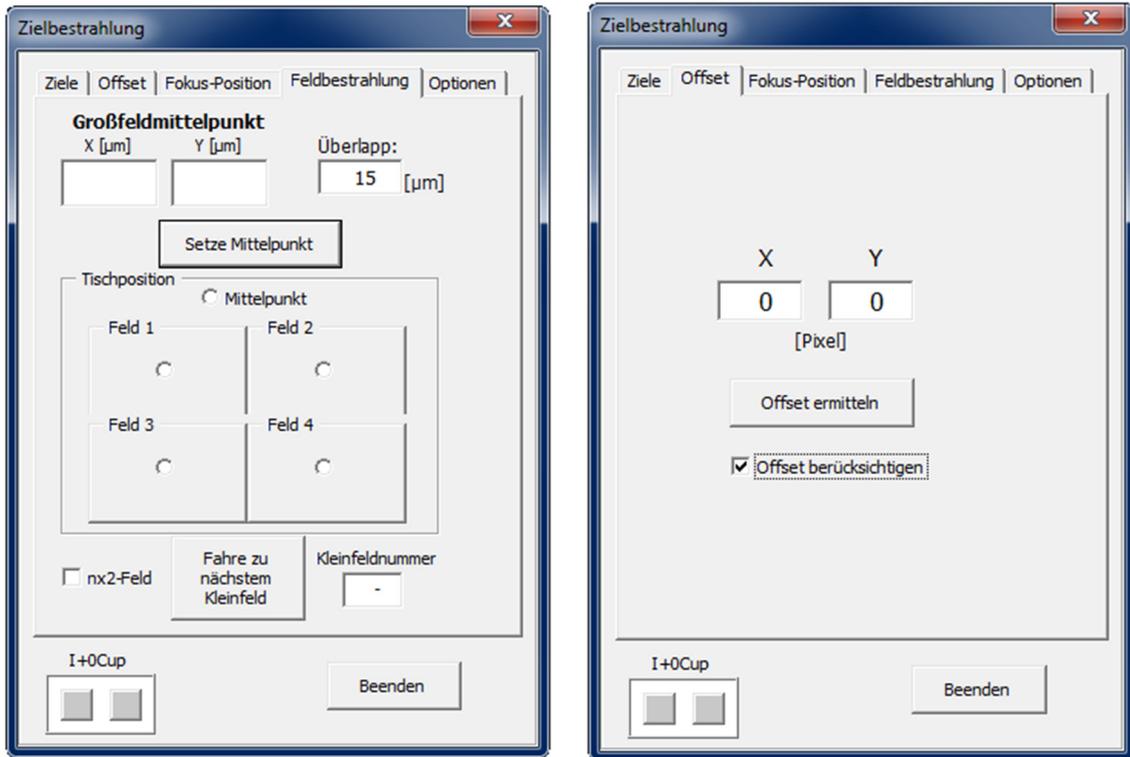


Abb. 6.5: Seite „Feldbestrahlung“ und „Offset“ des Zielbestrahlungsmakros. Für die Bestrahlung von zusammengesetzten 2x2-Feldern, wird auf „Feldbestrahlung“, dessen Mittelpunkt festgelegt. Zum Anfahren der einzelnen Kamerablickfelder, können die Felder einzeln durch Anklicken ausgewählt werden oder mit „Fahre zu nächstem Feld“ das folgende Feld angesteuert werden. Durch Aktivieren der Option nx2-Feld werden beliebig viele 2x2-Felder aneinandergesetzt. Für die Offsetbestimmung wird auf das Fenster „Offset“ gewechselt. Dabei wird eine Position, vorgeschlagen zu der der Strahl abgelenkt wird, die aber per Mausclick in das Bild beliebig angepasst werden kann (z.B. falls sich dort Zellen befinden).

6.2.4 Protokoll zur Durchführung der Zielbestrahlung

0. Laufzettel
1. Überprüfung der „Autosave“-Option und der Speicherverzeichnisse in AxioVision
2. Zielbestrahlungsmakro öffnen
3. Kalibration laden und I+0 Cup1 verbinden
4. Fokusposition von Szintillator- und Zellebene festlegen
5. Cup1 & Cup5 öffnen
6. Zielbildaufnahme (Mehrdimensionale (MD) Bildaufnahme festlegen; ohne Zeitserie)
7. Bestrahlungsmuster und Ziele definieren
8. „Offsetbestimmung“ klicken
9. Auf „Ziele“ wechseln
10. „Bestrahle Ziele“ klicken
11. Nach abgeschlossener Bestrahlung MD-Aufnahme starten (ggf. mit Zeitserie); kann auch automatisch gestartet werden lassen
12. Mikroskop eventuell von Strahlaustrittsnase wegfahren & Fokus überprüfen

6.2.5 Automatische Nucleolierkennung mittels CellProfiler

Anbei werden der Arbeitsablauf und die den Schritten zugehörigen wichtigen Parameter angegeben, die zur automatischen Nucleolierkennung mittels dem CellProfiler-Programm genutzt wurde. Dafür sind zwei Bilder notwendig: ein Bild mit gefärbten Zellkernen (Zellkernbild) und ein Bild mit den gefärbten Nucleoli (Nucleolibild). Als erstes werden beide Bilder mit einem „Median“-Filter und einem Artefaktdurchmesser von 5 Pixeln geglättet, um Kamerarauschen zu unterdrücken. Anschließend werden im geglätteten Zellkernbild mittels einer zweiklassigen „Otsu-Thresholding“ Methode Objekte gesucht, die einen Durchmesser von 70 bis 150 Pixeln besitzen. Für ein stabileres Ergebnis und um die Objekte etwas zu verkleinern, wird ein Schwellenkorrekturfaktor von 4,5 verwendet. Zum Trennen von zusammen-

hängenden Strukturen wird die Intensität genutzt, wobei diese davor nicht geglättet werden. Das Nucleolibild wird mit gefundenen Objekten (Zellkernen) maskiert. In dem maskierten Nucleolibild werden Strukturen in der Größe von Nucleoli (20 Pixel Durchmesser) verstärkt („EnhanceOrSuppress Features“), wobei auf das resultierende Bild ein weiteres Mal die Maske der Zellkerne angewendet wird. Anschließend werden die Nucleoli identifiziert. Hierbei wird eine dreiklassige „Otsu-Thresholding“-Methode verwendet, die aber jeweils individuell auf den Bereich der zuvor ermittelten Zellkerne angewendet wird. Die erlaubte Nucleoligröße liegt zwischen 15 bis 40 Pixeln. Auf einen Korrekturfaktor wird verzichtet und zusammenhängende Nucleolistrukturen wieder mittels der Intensität geteilt, wobei der minimal erlaubte Abstand 5 Pixel beträgt. Die nächsten Schritte dienen dazu die Intensität in den gefundenen Nucleoli messen und die Nucleoli den zugehörigen Zellkernen zuzuordnen. Damit kann dann auf den hellsten und somit größten Nucleolus eines Zellkerns gefiltert werden. Für eine Analyse der Zielerkennung werden Intensität und Größe der hellsten Nucleoli abschließend vermessen und mit den Umrissen der Zellkerne und Nucleoli in das originale Nucleolibild gespeichert. Die Mittelpunkte der hellsten Nucleoli pro Zellkern werden zusätzlich in einer „.csv“-Datei gespeichert, die von der Zielbestrahlungssoftware automatisch ausgelesen werden kann.

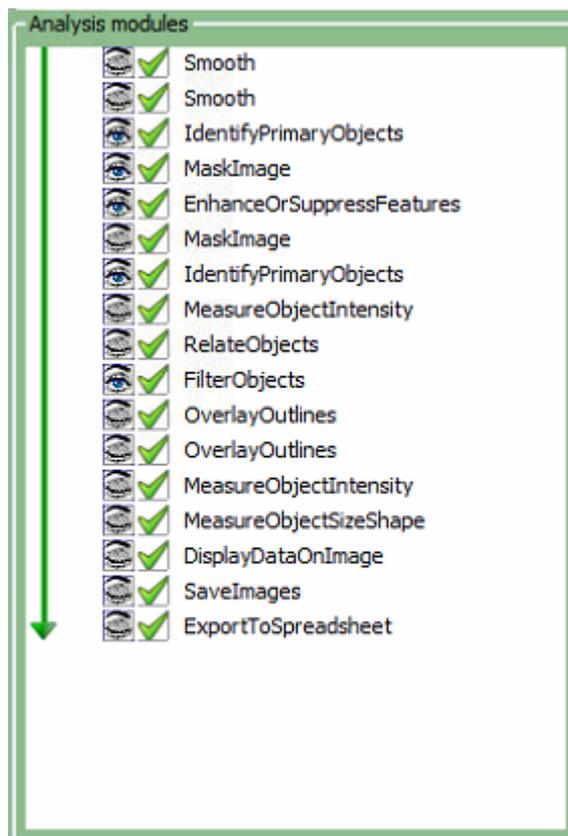


Abb. 6.6: Arbeitsablauf der automatischen Nucleolierkennung mit Hilfe des CellProfiler.

6.2.6 Makrogestützte Excelmappe zur Rekonstruktion und Mikroskopie von Bestrahlungsfeldern

Um größere zusammenhängend bestrahlte $m \times n$ -Felder (m Spaltenanzahl, n Zeilenanzahl) zu mikroskopieren, können hier auch die Positionen des den Bestrahlungsbereichs abdeckenden $m' \times n'$ -Mikroskopiefeldes berechnet werden. Hierzu müssen als erstes unter Angabe des Kamerablickfeldes und des Feldüberlapps die relativen Bestrahlungsfeldpositionen des $m \times n$ -Feldes berechnet werden. Die Eckpunkte werden dann mit dem Transformationskoeffizienten auf das zweite Mikroskop umgerechnet. Anschließend werden die relativen Positionen berechnet mit denen dessen Kamera mit einem bestimmten Überlapp, den Bestrahlungsbereich komplett abdeckt.

The screenshot shows an Excel spreadsheet with the following content:

Tischkalibrierung

eingeladene Datei:

Kreuzpositionen:	Mikroskop Halle I		Mikroskop Zelllabor	
	X ₂ [μm]	Y ₂ [μm]	X _M [μm]	Y _M [μm]
1.				
2.				
3.				
4.				

Einlesen der Kreuzpositionen unten

Einlesen der Kreuzpositionen oben

Kalibrationsmatrix

a	b	e
0,01065	1,00022	-18194,70296
c	d	f
-0,9984	0,00859	-2703,22234

Berechne Kalibration

Abb. 6.7: Oberfläche zur Berechnung der Transformationskoeffizienten a , b , c , d , e , f der Formeln (3.8) und (3.9). Links werden die Kreuzpositionen der in den unterschiedlichen Mikroskopen eingebauten Probe eingegeben. Die Positionen können aus einer Text-Datei importiert werden, die von dem Modul „Mark&Find“ von AxioVision erzeugt wurde. Die Reihenfolge ist in der Skizze definiert. Rechts wird das Ergebnis angegeben.

The screenshot shows an Excel spreadsheet with the following content:

für 1 Bild/Feldmittelpunkte

Einlesen von Positionen unten

Einlesen von Positionen oben

eingeladene Datei:

Mikroskop Halle I		Mikroskop Zelllabor	
X ₂ [μm]	Y ₂ [μm]	X _M [μm]	Y _M [μm]

Berechne Positionen für Mikroskop Zelllabor

Exportiere Positionen für Mikroskop Zelllabor

Abb. 6.8: Eingabeoberfläche zur Berechnung der am zweiten Mikroskop zu mikroskopierenden Positionen. Unter „Mikroskop Halle I“ werden die Bestrahlungspositionen eingegeben, die ebenfalls aus von dem Modul „Mark&Find“ erzeugten Textdateien importiert werden können. Rechts (Grauer Bereich) werden die mit den Formeln (3.8) und (3.9) umgerechneten Positionen ausgegeben. Diese können für „Mark&Find“ in eine Text-Datei exportiert werden

Um abschließend die zu mikroskopierenden absoluten Positionen zu bestimmen, kann der Mittelpunkt des m'xn'-Feldes zu den relativen Positionen addiert werden und die ganze Feldliste wieder für das „Mark&Find“ Modul exportiert werden.

für m x n-Bilder

Zeilenzahl m	Spaltenzahl n
2	2

Berechne mxn-Feldpositionen

Kamerablickfeld		Überlapp	
X [$\mu\text{m}/\text{Pixel}$]	Y [$\mu\text{m}/\text{Pixel}$]	X [μm]	Y [μm]
224	167	15	15

Relativ um Mittelpunkt zu bestrahlende Positionen			
Position	X _z [μm]	Y _z [μm]	
1	-104,5	-76	(können auch manuell eingegeben werden!)
2	-104,5	76	
3	104,5	-76	
4	104,5	76	

Abb. 6.9: Berechnung der relativen Feldpositionen eines zusammengesetzten mxn-Feldes unter Berücksichtigung der Größe des Kamerablickfeldes und des Überlapps der Felder.

Relative Positionen um am Mikroskop (Halle I) bestrahltes $m \times n$ Feld
am Mikroskop im Zelllabor zu mikroskopieren

Berechne $m' \times n'$ -Positionen für
Mikroskop Zelllabor

Kamerablickfeld

X' [$\mu\text{m}/\text{Pixel}$]	Y' [$\mu\text{m}/\text{Pixel}$]
224	167

Überlapp

X' [μm]	Y' [μm]
15	15

Exportiere relative $m' \times n'$ -
Positionen für Mikroskop Zelllabor

Relativ um Mittelpunkt zu mikroskopierende Positionen

Position	X_M [μm]	Y_M [μm]
1	104,50	-228
2	-104,50	-228
3	-104,50	-76
4	104,50	-76
5	104,5	76
6	-104,5	76
7	-104,5	228
8	104,5	228

Eckpunkte des $m' \times n'$ Feldes am Mikroskop Zelllabor

Position	X_M [μm]	Y_M [μm]
	-18356,5	-2488,4
	-18037,5	-2485,7
	-18351,9	-2920,7
	-18032,9	-2918

Abb. 6.10: Ausgabeoberfläche der relativen Feldpositionen des zu mikroskopierenden $m' \times n'$ -Feldes. Der Bereich des $m \times n$ -Feldes, der durch die relativ um den Mittelpunkt zu mikroskopierenden Positionen definiert wird (Abb. 6.9), wird für das zweite Mikroskop umgerechnet. Dieser wird mit Feldern abgedeckt, deren Positionen durch das Kamerablickfeld und dem gewünschten Überlapp definiert sind. Ein Export für das „Mark&Find“-Modul ist implementiert.

Absolute $m' \times n'$ -Feldpositionen

	X' [μm]	Y' [μm]
Mittelpunkt	1000,00	1000,00

Addiere Mittelpunktkoordinaten zu
relativen $m' \times n'$ -Feldpositionen

Exportiere absolute $m' \times n'$ -
Positionen für Mikroskop Zelllabor

Abb. 6.11: Oberfläche zur Berechnung der absoluten $m' \times n'$ -Feldpositionen. Die Mittelpunktswerte werden oben manuell aus dem Bereich von Abb. 6.9 übernommen und dann auf die relativen $m' \times n'$ -Feldpositionen addiert. Ein Export für das „Mark&Find“-Modul ist implementiert.

Absolut um Mittelpunkt zu mikroskopierende Positionen

Position	X'_M [μm]	Y'_M [μm]
1	1104,5	772
2	895,5	772
3	895,5	924
4	1104,5	924
5	1104,5	1076
6	895,5	1076
7	895,5	1228
8	1104,5	1228

6.2.7 Protokoll zur Repositionierung

1. Kreuzpositionen am unteren Mikroskop vorhanden
2. Remotesitzung zu tsm starten (als AD\snake)
3. Unter \\snakehome\Tischkalibrierung_Vorlage\
 - 3.1.1. Erstellen eines neuen Ordners
 - 3.1.2. Kopie von Mikroskoptischkalibrierung in erzeugten Ordner
4. Exceltabelle öffnen
5. Kreuzpositionen von Mikroskop in Exp.HalleI einlesen
6. Kreuzpositionen am Mikroskop des Biologielaors bestimmen und in Tabelle eingeben
7. „Berechne Kalibration“ klicken
8. Bestrahlungspositionen in Positionsumrechnungstabelle eingeben (Positionen müssen mehr als eine sein!)
9. „Berechne Positionen für Mikroskop Zelllabor“ klicken
10. „Exportiere ...“ für Einlesen der Positionen in Mark&Find (Speicherort am besten unter \\project\SNAKE01\...
11. Einlesen der Positionen am Mikroskoprechner über AxioVision -> Mark&Find -> „Neuer Objektträger“ oder „Ändern“ -> „Positionsliste importieren“

6.2.8 VBA-Makro zur Erstellung von Kachelbildern in AxioVision

Um die erzeugten Teilbilder zu einem Teilbild zusammzusetzen, wurde in AxioVision ein Makro „Mosaixbildbearbeitung“ geschrieben, das Bilder eines Ordners einliest und sie an ihre in den Metadaten gespeicherten Orte setzt. Da es sein kann, dass die Bilder durch die unterschiedliche Aufnahmesetups gespiegelt oder gedreht sind, ist auch eine Option zum Zurückspiegeln oder Vertauschen der x/y-Achsenrichtungen implementiert. Die Option des anschließenden automatischen Stitches der Bilder hat oft wenig Erfolg, so dass die Bilder oft per Hand nachjustiert werden müssen. Dies kann in einem beliebigen Farbkanal durchgeführt werden. Durch die Angabe des Kanals und betätigen der Schaltfläche „Justiere restliche Bilder nach“ werden die anderen Bilder der anderen Kanäle nachgeführt. Mit dem Button „Kopiere Shapes aus Bild 2“ werden eventuelle Markierungen aus einem Teilbild in das zusammengesetzte Bild kopiert, wobei die Bildnummer des Teilbildes im zusammengesetzten Bild angegeben werden muss. Das Teilbild sollte als einziges Bild in AxioVision zusätzlich geöffnet sein.

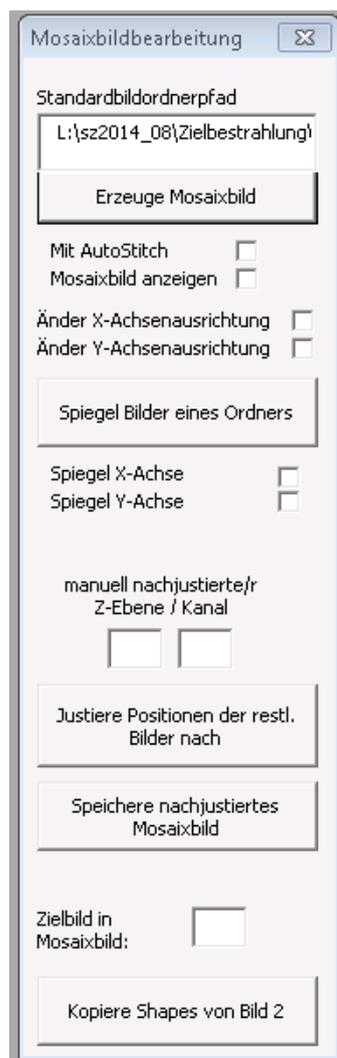


Abb. 6.12: Oberfläche des in AxioVision implementierten Mosaixbildbearbeitungsmakros. Aus einem Ordner werden die Bilder nach ihren Tischpositionen zu einem sog. Mosaixbild zusammengesetzt. Spiegelungen bei der Bildaufnahme oder unterschiedliche Tischachsenausrichtungen können korrigiert werden. Eine automatische Stitchingoption ist eingerichtet. Bei Bedarf können in einzelnen Kanälen die Bilder nachjustiert werden und die Bilder der restlichen Kanäle dementsprechend mitverschoben werden. Markierungen der Teilbilder können an bestimmte Positionen des Mosaixbildes kopiert werden.

6.3 Biologische Protokolle

6.3.1 Zielgenauigkeitsbestimmung

1. Aussäen 60 000 Zellen auf Szintillator in SNAKE LCI-Behälter (400 µl Tropfen auf Szintillator-Fläche); Anwachsen über Nacht; Medium + Trolox + Hepes
2. Kohlenstoffbestrahlung von 2x2 Feldern mit 17 Punkt Kreuzen auf 1 Nucleolus pro Zelle
3. γ H2AX-mouse-Alexa488 Immunfluoreszenzfärbung (**Im Dunkeln!**)
 - 3.1. Fixierung mit 2% PFA, Inkubation 15 min, bei Raumtemperatur
 - 3.2. Waschen mit PBS (d.h. Abnehmen von Lösung, Zugabe und Abnehmen von PBS)
 - 3.3. 3x 5 min mit PBS + 0.15% Triton waschen
 - 3.4. 3x 10 min mit PBS⁺ (100 ml PBS mit 0,15 g Glycin und 1 g BSA) blockieren
 - 3.5. 100 µl primären Antikörper zugeben (m- γ H2AX from Upstate #05-636 (1:350) 1:200 in PBS⁺); mind. 1 h in feuchter Kammer inkubieren
 - 3.6. 5 min mit PBS waschen
 - 3.7. 10 min mit PBS + 0,15%-Triton waschen
 - 3.8. 5 min mit PBS waschen
 - 3.9. 7 min mit PBS⁺ blockieren
 - 3.10. 100 µl sekundären Antikörper im Dunkeln zugeben (g-a-m-Alexa-488, Invitrogen 1:500 in PBS⁺); mind. 45 min in feuchter Kammer im Dunkeln inkubieren
 - 3.11. im Dunkeln wie folgt waschen:
 - 3.11.1. 2x 10 min PBS + Triton
 - 3.11.2. 1x 10 min mit PBS
 - 3.11.3. 2x 7 min mit PBS
4. Syto80/83-Färbung (1:5000 in PBS) 500 µl pro Szintillator für 20 min
5. Abnehmen (ohne Waschen)
6. Eindeckeln mit ProlongGold, Tropfen auf Szintillatorfläche geben und rundes 15 mm Deckglas darauflegen, 24 h Aushärten bei Raumtemperatur
7. Mikroskopie

6.3.2 Mikronukleitest

1. Aussäen 30 000 Zellen in LCI-Behälter (400 µl Tropfen auf Szintillator-Fläche); Anwachsen über Nacht; Medium + Trolox + Hepes
2. Bestrahlung (m x n-Feld: „Nucleolus“ & „Zellkern ohne Nucleolus“)
3. Mediumwechsel + Inkubation 24 h mit 1 µg/ml Cytochalasin B
4. Medium abnehmen, Zellen 1-2x PBS waschen
5. Langsam tropfenweise 500 µl KCl (Raumtemperatur) Lösung zugeben (75 mM; bei 6 ml Zielvolumen -> 0.9 ml von 0.5 M KCL aus 5.1 ml Wasser), Einwirkzeit 5 min
6. Fixierung mit kaltem Methanol/Eisessig (3:1):
Zu KCL(!) 1ml Methanol/Eisessig in 500 µl Schritten zugeben und 2 min inkubieren (Raumtemperatur)
7. Fixativ abnehmen und 1 ml Methanol/Eisessig zugeben, 2 min
8. Abnehmen und etwas in aufrechter Position trocknen lassen
9. Zellkernfärbung (ToPro3)
10. ToPro3: Zellen 5 min Färben mit 1 µM To-Pro3-Lösung (= 1:1000 Verdünnung des 1 mM Stocks in PBS); Kein Waschen!
11. Flüssigkeit Abnehmen und Probe in aufrechter Position trocknen lassen
12. Eindeckeln mit ProlongGold, Tropfen auf Szintillatorfläche geben und rundes 15 mm Deckglas darauflegen, 24 h Aushärten bei Raumtemperatur
13. Mikroskopie nachher

6.3.3 Transkriptionsassay mit γ H2AX-Färbung

5EU-Assay mit γ H2AX-IF-Färbung:

1. Aussäen 60 000 Zellen auf Szintillator in SNAKE LCI-Behälter (400 μ l Tropfen auf Szintillator-Fläche); Medium + Trolox + Hepes
2. Mehrfachbestrahlung von 2x2 Feldern
3. Dosis: 1, 10, 50, 100 C/Pkt, Zeitabstände: 0 min, 15 min, 30 min, 60 min,)
4. Mediumwechsel
5. Inkubation für 0 min bis 24h
6. Medium abnehmen
7. 5-EU Assay (100 mM Stock durch Hinzufügen von 373 μ l deionisiertem Wasser zu Vial (Haltbarkeit 1 Monat bei -20°C))
 - 7.1. 1 mM EU (in warmen Medium) zu Zellen hinzufügen
 - 7.2. Inkubation 30 min, 37°C
8. Immunfluoreszenzfärbung mit γ H2AX-mouse-Alexa647 (**Im Dunkeln!**)
 - 8.1. Fixierung mit 2% PFA (Invitrogen 3.7%), Inkubation 15 min, Raumtemperatur
 - 8.2. Abnehmen und Waschen mit PBS
 - 8.3. 3x 5 min mit PBS + 0.15% Triton waschen
 - 8.4. 3x 10 min mit PBS+ (100 ml PBS, 0,15 g Glycin, 1 g BSA) blockieren
 - 8.5. 100 μ l primären Antikörper zugeben (1:200 UBF in 1-3% BSA-PBS; m-a- γ H2AX (abcam 81299) 1:200 (LMU)
 - 8.6. mind. 1 h in feuchter Kammer inkubieren
 - 8.7. 5 min mit PBS waschen
 - 8.8. 10 min mit PBS + Triton waschen
 - 8.9. 5 min mit PBS waschen
 - 8.10. 7 min mit PBS+ blockieren
 - 8.11. 100 μ l sekundären Antikörper im Dunkeln zugeben (g-a-m Alexa 647 (molecular probes#A21237) 1:200 in PBS+)
 - 8.12. mind. 45 min in feuchter Kammer im Dunkeln inkubieren
 - 8.13. im Dunkeln wie folgt waschen:
 - 8.13.1. 2x 5 min PBS + Triton
 - 8.13.2. 1x 10 min mit PBS
 - 8.13.3. 2x 7 min mit PBS
9. Click-Chemistry (Stock: 85 μ l DMSO zu Alexa594 vial (1 Jahr bei -20°C); Buffer 10X stock: 2 ml deionisiertes Wasser in vial (1 Jahr bei -20°C))
 - 9.1. Abnehmen und 0.15% Triton (Invitrogen 0.5%) in PBS zugeben, Inkubation 15 min
 - 9.2. 250 μ l (für 5 **Proben** mit 500 μ l) 1:10 10X Bufferlösung mit deionisiertem Wasser herstellen

- 9.3. 2.1 ml reaction buffer (Component C) + 100 μ l CuSO₄ (Component D) + 9.3 μ l Alexa594-Lsg + 250 μ l-reaction buffer additive (aus 4.4.) in Reihenfolge und zügig zusammenfügen
- 9.4. Abnehmen und Waschen mit PBS
- 9.5. Abnehmen und 500 μ l aus Lösung (4.5) zugeben. Inkubieren für 30 min (Raumtemperatur und **Dunkel**)
- 9.6. Abnehmen und mit 1 ml ClickII reaction rinse buffer (Component F) waschen
10. Flüssigkeit Abnehmen und Probe in aufrechter Position trocknen lassen
11. Eindeckeln mit ProlongGold, Tropfen auf Szintillatorfläche geben und rundes 15 mm Deckglas darauflegen, 24 h Aushärten bei Raumtemperatur
12. Mikroskopie

6.3.4 Proteinverteilung von UBF und γ H2AX

UBF-Alexa647 und γ H2AX-Alexa488-Färbung:

1. Aussäen 60 000 Zellen auf Szintillator in SNAKE LCI-Behälter (400 μ l Tropfen auf Szintillator-Fläche); Medium + Trolox + Hepes
2. Mehrfachbestrahlung von 2x2 Feldern
3. Mediumwechsel + 2 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂
4. Medium abnehmen
5. Fixierung mit 2% PFA (Invitrogen 3.7%), Inkubation 15 min, Raumtemperatur
6. Abnehmen und Waschen mit PBS
7. Immunfluoreszenzfärbung UBF-mouse Alexa647 und γ H2AX-rabbit-Alexa488 **(Im Dunkeln!)**
8. 1x schnell mit PBS waschen
9. 3x 5 min mit PBS + 0.15% Triton waschen
10. 3x 10 min mit PBS+ (100 ml PBS, 0,15 g Glycin, 1 g BSA) blockieren
11. 100 μ l primären Antikörper zugeben (1:200 UBF(F-9, Santa Cruz) in 1-3% BSA-PBS + Zentrifugieren 30 min bei 16000g; r-a-gH2AX (abcam 81299) 1:200)
12. mind. 1 h in feuchter Kammer inkubieren (alternativ: Kühlschrank 4°C über Nacht)
13. 5 min mit PBS waschen
14. 10 min mit PBS + Triton waschen
15. 5 min mit PBS waschen
16. 7 min mit PBS+ blockieren
17. 100 μ l sekundären Antikörper im Dunkeln zugeben (g-a-m Alexa 647 (molecular probes#A21237) 1:200); g-a-r Alexa 488 (Molekular Probes #A-11034) 1:200 bis 1:500 (beides LMU) in PBS+)
18. mind. 45 min in feuchter Kammer im Dunkeln inkubieren
19. im Dunkeln wie folgt waschen:
20. 2 x 5 min PBS + Triton
21. 1 x 10 min mit PBS
22. 2 x 7 min mit PBS
23. Eindeckeln mit ProlongGold, Tropfen auf Szintillatorfläche geben und rundes 15 mm Deckglas darauflegen, 24 h Aushärten bei Raumtemperatur
24. Mikroskopie

7 Literaturverzeichnis

[Abb73]

Abbe, E.; *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, in: Archiv f. mikrosk. Anatomie, 9, 1873, S. 413–418.

[Al-04]

Al-Baker, E. A., et al.; *A p53-independent pathway regulates nucleolar segregation and antigen translocation in response to DNA damage induced by UV irradiation*, in: Experimental Cell Research, 292, 2004, S. 179–186.

[Ber09]

Bertucci, A., et al.; *Microbeam Irradiation of the C. elegans Nematode*, in: JRR, 50, 2009, A49-A54.

[Big89]

Biggiogera, M., et al.; *Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus*, in: The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 37, 1989, S. 1371–1374.

[Boi07]

Boisvert, F.-M., et al.; *The multifunctional nucleolus*, in: Nat Rev Mol Cell Biol, 8, 2007, S. 574–585.

[Bon11]

Bonassi, S., et al.; *Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies*, in: Mutagenesis, 26, 2011, S. 93–100.

[Bou14a]

Boujard, D., et al.; *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*, Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg, 2014.

[Bou10]

Boulon, S., et al.; *The Nucleolus under Stress*, in: Molecular Cell, 40, 2010, S. 216–227.

[Bou14b]

Bourret, S., et al.; *Fluorescence time-lapse imaging of single cells targeted with a focused scanning charged-particle microbeam*, in: Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 325, 2014, S. 27–34.

[Bro64]

Brown, D. D. and Gurdon, J. B.; *ABSENCE OF RIBOSOMAL RNA SYNTHESIS IN THE ANUCLEOLATE MUTANT OF XENOPUS LAEVIS*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 51, 1964, S. 139–146.

[Brü08]

Brüning, T.; *Quantitative Analyse von Proteinkinetiken nach Bestrahlung lebender Zellen mit energetischen Schwerionen am Rasterionenmikroskop SNAKE*, München, 2008

Diplomarbeit, München.

[Buc16]

Buchfellner, A., et al.; *A New Nanobody-Based Biosensor to Study Endogenous PARP1 In Vitro and in Live Human Cells*, in: PLoS ONE, 11, 2016, S. e0151041.

[Bun]

Bundesamt für Strahlenschutz, <http://www.bfs.de>.
Abgerufen am 25.10.2016.

[Cah06]

Cahill, D.; *Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair*, in: Front Biosci, 11, 2006, S. 1958.

[Cal13]

Calkins, A. S.; Iglehart, J. D.; Lazaro, J.-B.; *DNA damage-induced inhibition of rRNA synthesis by DNA-PK and PARP-1*, in: Nucleic acids research, 41, 2013, S. 7378–7386.

[Cer13]

Cerbe, G. and Wilhelms, G.; *Technische Thermodynamik: Theoretische Grundlagen und praktische Anwendungen ; mit 40 Tafeln, 135 Beispielen, 138 Aufgaben und 182 Kontrollfragen*, 17. Auflage, München. Hanser, 2013.

[Cho09]

Choong, M. L., et al.; *Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy*, in: Cell cycle (Georgetown, Tex.), 8, 2009, S. 2810–2818.

[Cma00]

Cmarko, D., et al.; *Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP*, in: Histochemistry and cell biology, 113, 2000, S. 181–187.

[Cre01]

Cremer, T. and Cremer, C.; *Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells*, in: Nature reviews. Genetics, 2, 2001, S. 292–301.

[Dat02]

Datzmann, G.; *Aufbau und Charakterisierung des Hochenergie Rasterionenmikroskops SNAKE*, München, 27.03.2002
Dissertation, München.

[Der93]

Derenzini, M.; Farabegoli, F.; Trere, D.; *Localization of DNA in the fibrillar components of the nucleolus: a cytochemical and morphometric study*, in: The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 41, 1993, S. 829–836.

[Dol90]

Dollinger, G.; *Kohlenstofffolien als Stripper für schwere Ionen*, München, 1990
Dissertation, München.

[Dol05]

Dollinger, G., et al.; *Microirradiation of cells with energetic heavy ions*, in: Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 231, 2005, S. 195–201.

[Dre15]

Drexler, G. A., et al.; *Live cell imaging at the Munich ion microbeam SNAKE - a status report*, in: Radiation oncology (London, England), 10, 2015, S. 42.

[Dur08]

Durante, M. and Cucinotta, F. A.; *Heavy ion carcinogenesis and human space exploration*, in: Nature reviews. Cancer, 8, 2008, S. 465–472.

[Fen00]

Fenech, M.; *The in vitro micronucleus technique*, in: Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455, 2000, S. 81–95.

[Fen07]

Fenech, M.; *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*, in: Nature protocols, 2, 2007, S. 1084–1104.

[Fen86]

Fenech, M. and Morley, A. A.; *Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation*, in: Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 161, 1986, S. 193–198.

[Fis09]

Fischer, B. E.; Voss, K.-O.; Du, G.; *Targeted irradiation of biological cells using an ion microprobe – Why a small beam spot is not sufficient for success*, in: Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 267, 2009, S. 2122–2124.

[Fou12]

Fournier, C., et al.; *The Fate of a Normal Human Cell Traversed by a Single Charged Particle*, in: Sci. Rep., 2, 2012.

[Fra16]

Franek, M., et al.; *Nucleolar Reorganization Upon Site-Specific Double-Strand Break Induction: DNA Repair and Epigenetics of Ribosomal Genes*, in: The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 2016.

[Fra05]

Fraschini, A., et al.; *Changes in extranucleolar transcription during actinomycin D-induced apoptosis*, in: *Histology and histopathology*, 20, 2005, S. 107–117.

[Fri95]

Friedl, A. A.; Kraxenberger, A.; Eckardt-Schupp, F.; *An electrophoretic approach to the assessment of the spatial distribution of DNA double-strand breaks in mammalian cells*, in: *Electrophoresis*, 16, 1995, S. 1865–1874.

[Ger06]

Gerardi, S.; *A comparative review of charged particle microbeam facilities*, in: *Radiation Protection Dosimetry*, 122, 2006, S. 285–291.

[Gig11]

Giglia-Mari, G.; Zotter, A.; Vermeulen, W.; *DNA damage response*, in: *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3, 2011, a000745.

[Gir13]

Girst, S., et al.; *Subdiffusion supports joining of correct ends during repair of DNA double-strand breaks*, in: *Scientific reports*, 3, 2013, S. 2511.

[Gir15b]

Girst, S., et al.; *Improved normal tissue protection by proton and X-ray microchannels compared to homogeneous field irradiation*, in: *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, 31, 2015, S. 615–620.

[Gir15a]

Girst, S., et al.; *The influence of the channel size on the reduction of side effects in microchannel proton therapy*, in: *Radiation and Environmental Biophysics*, 54, 2015, S. 335–342.

[Gir16]

Girst, S., et al.; *Proton Minibeam Radiation Therapy Reduces Side Effects in an In Vivo Mouse Ear Model*, in: *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 95, 2016, S. 234–241.

[God08]

Godon, C., et al.; *PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility*, in: *Nucleic acids research*, 36, 2008, S. 4454–4464.

[Goe84]

Goessens, G.; *Nucleolar Structure*, in: Michael McCloskey, Mu-Ming Poo (Hrsg.), *Protein diffusion in cell membranes: Some biological implications*, Orlando, San Diego, San Francisco, Academic Press, 1984, S. 107–158.

[Goo10]

Goodsell, D. S.; *Wie Zellen funktionieren: Wirtschaft und Produktion in der molekularen Welt*, 2. Auflage, Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag, 2010.

- [Gre11]
Greubel, C., et al.; *Scanning irradiation device for mice in vivo with pulsed and continuous proton beams*, in: *Radiation and Environmental Biophysics*, 50, 2011, S. 339–344.
- [Gre13]
Greubel, C.; *Einfluss der zeitlichen und räumlichen Fokussierung auf die strahlenbiologische Wirksamkeit von Protonen*, 2013
Dissertation.
- [Gro14]
Grob, A.; Colleran, C.; McStay, B.; *Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division*, in: *Genes Dev.*, 2014.
- [Hab04]
Hable, V.; *Untersuchung der Dynamik von DNA-Reparaturproteinen nach Bestrahlung lebender Zellen am Rasterionenmikroskop SNAKE*, München, 2004, München.
- [Hab09]
Hable, V., et al.; *The live cell irradiation and observation setup at SNAKE*, in: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267, 2009, S. 2090–2097.
- [Hab11]
Hable, V.; *Echtzeitbeobachtung schneller Reaktionskinetiken in lebenden Zellen nach Ionenmikrobestrahlung*, 2011
Dissertation.
- [Hab12]
Hable, V., et al.; *Recruitment kinetics of DNA repair proteins Mdc1 and Rad52 but not 53BP1 depend on damage complexity*, in: *PLoS ONE*, 7, 2012, S. e41943.
- [Har09]
Hartlerode, A. J. and Scully, R.; *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*, in: *The Biochemical journal*, 423, 2009, S. 157–168.
- [Hau04]
Hauptner, A., et al.; *Microirradiation of cells with energetic heavy ions*, in: *Radiation and Environmental Biophysics*, 42, 2004, S. 237–245.
- [Hau06]
Hauptner, A.; *Mikroskopisch genaue Zellbestrahlung mit hochenergetischen Ionen*, 2006
Dissertation.
- [Hei97]
Hei, T. K., et al.; *Mutagenic effects of a single and an exact number of alpha particles in mammalian cells*, in: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 1997, S. 3765–3770.
- [Hei13]
Hein, N., et al.; *The nucleolus: an emerging target for cancer therapy*, in: *Trends in molecular medicine*, 19, 2013, S. 643–654.

[Hei06]

Heiß, M., et al.; *Targeted Irradiation of Mammalian Cells Using a Heavy-Ion Microprobe*, in: Radiation Research, 165, 2006, S. 231–239.

[Hei31]

Heitz, E.; *Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Grösse pflanzlicher Nukleolen*, in: Planta, 12, 1931, S. 775–844.

[Hen72]

Henderson, A. S.; Warburton, D.; Atwood, K. C.; *Location of Ribosomal DNA in the Human Chromosome Complement*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 69, 1972, S. 3394–3398.

[Her10]

Hernandez-Verdun, D., et al.; *The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism*, in: WIREs RNA, 1, 2010, S. 415–431.

[Hoc14]

Hochberger, N.; *Detection of Nucleoli Using ImageJ*, München, 2014 Studienarbeit, München.

[Hoz94]

Hozak, P., et al.; *Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells*, in: Journal of Cell Science, 107, 1994, S. 639–648.

[ICRP58]

ICRP; *RBE for Deterministic Effects*, in: Annals of the ICRP, 20, 1989.

[Image]

ImageJ: Image Processing and Analysis in Java.

[Jak05]

Jakob, B., et al.; *Live Cell Imaging of Heavy-Ion-Induced Radiation Responses by Beamline Microscopy*, in: Radiation Research, 163, 2005, S. 681–690.

[Jak11]

Jakob, B., et al.; *DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin*, in: Nucleic acids research, 39, 2011, S. 6489–6499.

[Jao08]

Jao, C. Y. and Salic, A.; *Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 2008, S. 15779–15784.

[Kie12]

Kiefer, J.; *Strahlen und Gesundheit: Nutzen und Risiken*, 1. Auflage, Weinheim. Wiley-VCH, 2012.

[Kol01]

Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*, in: Angew. Chem. Int. Ed., 40, 2001, S. 2004–2021.

[Kra98]

Kraxenberger, F., et al.; *DNA double-strand breaks in mammalian cells exposed to*

gamma-rays and very heavy ions. Fragment-size distributions determined by pulsed-field gel electrophoresis, in: *Radiation and Environmental Biophysics*, 37, 1998, S. 107–115.

[Kri09]

Krieger, H.; *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*, 3. Auflage, Wiesbaden. Vieweg + Teubner, 2009.

[Kru07]

Kruhlak, M., et al.; *The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks*, in: *Nature*, 447, 2007, S. 730–734.

[Lam98]

Lamond, A. I.; *Structure and Function in the Nucleus*, in: *Science*, 280, 1998, S. 547–553.

[Lam07]

Lamprecht, M. R.; Sabatini, D. M.; Carpenter, A. E.; *CellProfilerTM: Free, versatile software for automated biological image analysis*, in: *BioTechniques*, 42, 2007, S. 71–75.

[Lan13]

Langelier, M.-F. and Pascal, J. M.; *PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis*, in: *Current opinion in structural biology*, 23, 2013, S. 134–143.

[Lar14]

Larsen, D. H., et al.; *The NBS1–Treacle complex controls ribosomal RNA transcription in response to DNA damage*, in: *Nat Cell Biol*, 16, 2014, S. 792–803.

[Mar05]

Martin, R. M.; Leonhardt, H.; Cardoso, M. C.; *DNA labeling in living cells*, in: *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 67, 2005, S. 45–52.

[McC64]

McConkey, E. H. and Hopkins, J. W.; *THE RELATIONSHIP OF THE NUCLEOLUS TO THE SYNTHESIS OF RIBOSOMAL RNA IN HELA CELLS**, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, 1964, S. 1197–1204.

[Mil69]

Miller, O. L. and Beatty, B. R.; *Visualization of Nucleolar Genes*, in: *Science*, 164, 1969, S. 955–957.

[Mis11]

Misteli, T. and Spector, D. L.; *The nucleus: A subject collection from Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.

[Moo11]

Moore, H. M., et al.; *Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation*, in: *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10, 2011, M111.009241.

[Mor07]

Mortusewicz, O. and Leonhardt, H.; *XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions*, in: *BMC molecular biology*, 8, 2007, S. 81.

[Mos11]

Mosconi, M., et al.; *53BP1 and MDC1 foci formation in HT-1080 cells for low- and high-LET microbeam irradiations*, in: *Radiation and Environmental Biophysics*, 50, 2011, S. 345–352.

[Mos12]

Moser, M., et al.; *High brilliance multicusp ion source for hydrogen microscopy at SNAKE*, in: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 273, 2012, S. 226–230.

[Mos07]

Moss, T., et al.; *A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis*, in: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 64, 2007, S. 29–49.

[Och97]

Ochs, R. L.; *Chapter 14 Methods Used to Study Structure and Function of the Nucleolus*, in: Miguel Berrios (Hrsg.), *Methods in Cell Biology : Nuclear Structure and Function*, Academic Press, 1997, S. 303–321.

[Per62]

Perry, R. P.; *THE CELLULAR SITES OF SYNTHESIS OF RIBOSOMAL AND 4S RNA**, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48, 1962, S. 2179–2186.

[Pri00]

Prise, K. M., et al.; *Single ion actions: The induction of micronuclei in V79 cells exposed to individual protons*, in: *Advances in Space Research*, 25, 2000, S. 2095–2101.

[Pri01]

Prise, K. M., et al.; *A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering*, in: *Radiation Research*, 156, 2001, S. 572–576.

[Pri09]

Prise, K. M. and O'Sullivan, J. M.; *Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy*, in: *Nature reviews. Cancer*, 9, 2009, S. 351–360.

[Pri99]

Prise, K. M.; Pullar, C. H.; Michael, B. D.; *A study of endonuclease III-sensitive sites in irradiated DNA: detection of alpha-particle-induced oxidative damage*, in: *Carcinogenesis*, 20, 1999, S. 905–909.

[Pri11]

Prise, K. M. and Schettino, G.; *Microbeams in radiation biology: review and critical comparison*, in: *Radiation Protection Dosimetry*, 143, 2011, S. 335–339.

[Puv97]

Puvion-Dutilleul, F.; Puvion, E.; Bachellerie, J. P.; *Early stages of pre-rRNA formation*

within the nucleolar ultrastructure of mouse cells studied by in situ hybridization with a 5'ETS leader probe, in: *Chromosoma*, 105, 1997, S. 496–505.

[Ran09]

Rancourt, A. and Satoh, M. S.; *Delocalization of nucleolar poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the nucleoplasm and its novel link to cellular sensitivity to DNA damage*, in: *DNA repair*, 8, 2009, S. 286–297.

[Rei04]

Reichart, P., et al.; *Three-dimensional hydrogen microscopy in diamond*, in: *Science* (New York, N.Y.), 306, 2004, S. 1537–1540.

[Rit65]

Ritossa, F. M. and Spiegelman, S.; *LOCALIZATION OF DNA COMPLEMENTARY TO RIBOSOMAL RNA IN THE NUCLEOLUS ORGANIZER REGION OF DROSOPHILA MELANOGASTER**, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53, 1965, S. 737–745.

[Rog99]

Rogakou, E. P., et al.; *Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo*, in: *J Cell Biol*, 146, 1999, S. 905–916.

[Rub03]

Rubbi, C. P. and Milner, J.; *Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses*, in: *The EMBO journal*, 22, 2003, S. 6068–6077.

[San08]

San Filippo, J.; Sung, P.; Klein, H.; *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*, in: *Annual review of biochemistry*, 77, 2008, S. 229–257.

[Sav01]

Savino, T. M., et al.; *Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells*, in: *The Journal of cell biology*, 153, 2001, S. 1097–1110.

[Sch09]

Schmid, T. E., et al.; *No Evidence for a Different RBE between Pulsed and Continuous 20 MeV Protons*, in: *Radiation Research*, 172, 2009, S. 567–574.

[Sch10]

Schmid, T. E., et al.; *Relative biological effectiveness of pulsed and continuous 20MeV protons for micronucleus induction in 3D human reconstructed skin tissue*, in: *Radiotherapy and Oncology*, 95, 2010, S. 66–72.

[Sch11]

Schmid, T. E., et al.; *The Effectiveness of 20 MeV Protons at Nanosecond Pulse Lengths in Producing Chromosome Aberrations in Human-Hamster Hybrid Cells*, in: *Radiation Research*, 175, 2011, S. 719–727.

[Sch12]

Schmid, T. E., et al.; *Low LET protons focused to submicrometer shows enhanced radiobiological effectiveness*, in: *Phys. Med. Biol.*, 57, 2012, S. 5889–5907.

[Sch15]

Schmid, T. E., et al.; *Sub-micrometer 20MeV protons or 45MeV lithium spot irradiation enhances yields of dicentric chromosomes due to clustering of DNA double-strand breaks*, in: Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis, 793, 2015, S. 30–40.

[Sed07]

Sedelnikova, O. A., et al.; *DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models*, in: Cancer Research, 67, 2007, S. 4295–4302.

[Sei11]

Seiler, D. M., et al.; *Double-strand break-induced transcriptional silencing is associated with loss of tri-methylation at H3K4*, in: Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology, 19, 2011, S. 883–899.

[Sha04]

Shao, C., et al.; *Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 2004, S. 13495–13500.

[Sha05]

Shav-Tal, Y., et al.; *Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition*, in: Molecular biology of the cell, 16, 2005, S. 2395–2413.

[Sir08]

Sirri, V., et al.; *Nucleolus: the fascinating nuclear body*, in: Histochem Cell Biol, 129, 2008, S. 13–31.

[Spl10]

Splinter, J., et al.; *Biological dose estimation of UVA laser microirradiation utilizing charged particle-induced protein foci*, in: Mutagenesis, 25, 2010, S. 289–297.

[Ste13]

Stepanchick, A., et al.; *DNA binding by the ribosomal DNA transcription factor *rrn3* is essential for ribosomal DNA transcription*, in: The Journal of biological chemistry, 288, 2013, S. 9135–9144.

[Stu09]

Stults, D. M., et al.; *Human rRNA gene clusters are recombinational hotspots in cancer*, in: Cancer Research, 69, 2009, S. 9096–9104.

[Tsi98]

Tsien, R. Y. and Miyawaki, A.; *Seeing the machinery of live cells*, in: Science (New York, N.Y.), 280, 1998, S. 1954–1955.

[vdS73]

van der Schans, G. P.; Bleichrodt, J. F.; Blok, J.; *Contribution of Various Types of Damage to Inactivation of a Biologically-active Double-stranded Circular DNA by Gamma-*

radiation, in: International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine, 23, 1973, S. 133–150.

[vSl13]

van Sluis, M.; *Nucleolar reorganisation promotes repair of rDNA double strand breaks by homologous recombination throughout the cell cycle*, Galway, 2013 Dissertation, Galway.

[vSl15]

van Sluis, M. and McStay, B.; *A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage*, in: Genes Dev., 29, 2015, S. 1151–1163.

[Vig13]

Vignard, J.; Mirey, G.; Salles, B.; *Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up*, in: Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 108, 2013, S. 362–369.

[War16]

Warmerdam, D. O.; van den Berg, J.; Medema, R. H.; *Breaks in the 45S rDNA Lead to Recombination-Mediated Loss of Repeats*, in: Cell reports, 14, 2016, S. 2519–2527.

[Wu99]

Wu, L.-J., et al.; *Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 1999, S. 4959–4964.

[Yun04]

Yung, T. M. C.; Sato, S.; Satoh, M. S.; *Poly(ADP-ribosyl)ation as a DNA damage-induced post-translational modification regulating poly(ADP-ribose) polymerase-1-topoisomerase I interaction*, in: The Journal of biological chemistry, 279, 2004, S. 39686–39696.

[Zho00]

Zhou, H., et al.; *Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences, 97, 2000, S. 2099–2104.

[Zlo13]

Zlobinskaya, O., et al.; *Reduced side effects by proton microchannel radiotherapy: study in a human skin model*, in: Radiation and Environmental Biophysics, 52, 2013, S. 123–133.

[Zlo14]

Zlobinskaya, O., et al.; *The effects of ultra-high dose rate proton irradiation on growth delay in the treatment of human tumor xenografts in nude mice*, in: Radiation Research, 181, 2014, S. 177–183.

8 Publikationsliste

2016

Low LET proton microbeam to understand high-LET RBE by shaping spatial dose distribution

C. Greubel, K. Ilicic, T. Rösch, J. Reindl, C. Siebenwirth, M. Moser, S. Girst, D.W.M. Walsh, T.E. Schmid, G. Dollinger; Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms (2016), *In Press*.

Depletion of Histone Demethylase Jarid1A Resulting in Histone Hyperacetylation and Radiation Sensitivity Does Not Affect DNA Double-Strand Break Repair

C. Penterling, G.A. Drexler, C. Böhland, R. Stamp, C. Wilke, H. Braselmann, R.B. Caldwell, J. Reindl, S. Girst, C. Greubel, C. Siebenwirth, W. Mansour, K. Borgmann, G. Dollinger, K. Unger, A.A. Friedl; PLoS One 11(6) (2016).

A New Nanobody-Based Biosensor to Study Endogenous PARP1 In Vitro and in Live Human Cells

A. Buchfellner, L. Yurlova, S. Nuske, A.M. Scholz, J. Bogner, B. Ruf, K. Zolghadr, S.E. Drexler, G.A. Drexler, S. Girst, C. Greubel, J. Reindl, C. Siebenwirth, T. Romer, A.A. Friedl, U. Rothbauer; PLoS One 11(3) (2016).

Proton Minibeam Radiation Therapy Reduces Side Effects in an In Vivo Mouse Ear Model

S. Girst, C. Greubel, J. Reindl, C. Siebenwirth, O. Zlobinskaya, D. Walsh, K. Ilicic, M. Aichler, A. Walch, J. Wilkens, G. Multhoff, G. Dollinger and T. Schmid; International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics 95 (0) (2016) 234-241.

2015

Determination of the accuracy for targeted irradiations of cellular substructures at SNAKE

C. Siebenwirth, C. Greubel, S. Drexler, S. Girst, J. Reindl, D. Walsh, G. Dollinger, A. Friedl, T. Schmid and G. Drexler; Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 348 (0) (2015) 137-142.

Live cell imaging at the Munich ion microbeam SNAKE - a status report

G.A. Drexler, C. Siebenwirth, S.E. Drexler, S. Girst, C. Greubel, G. Dollinger and A.A. Friedl; Radiation Oncology 10 (2015) 42.

Sub-micrometer 20 MeV protons or 45 MeV lithium spot irradiation enhances yields of dicentric chromosomes due to clustering of DNA double-strand breaks

T.E. Schmid, W. Friedland, C. Greubel, S. Girst, J. Reindl, C. Siebenwirth, K. Ilicic, E. Schmid, G. Multhoff, E. Schmitt, P. Kunderát, G. Dollinger; *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 793 (2015) 30-40.

Proton Minibeam Radiation Therapy Reduces Side Effects in an In Vivo Mouse Ear Model

S. Girst, C. Greubel, J. Reindl, C. Siebenwirth, O. Zlobinskaya, D.W.M. Walsh, K. Ilicic, M. Aichler, A. Walch, J.J. Wilkens, G. Multhoff, G. Dollinger, T.E. Schmid; *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2015).

Improved normal tissue protection by proton and X-ray microchannels compared to homogeneous field irradiation

S. Girst, C. Marx, E. Bräuer-Krisch, A. Bravin, S. Bartzsch, U. Oelfke, C. Greubel, J. Reindl, C. Siebenwirth, O. Zlobinskaya, G. Multhoff, G. Dollinger, T. Schmid and J. Wilkens; *Physica Medica* (0) (2015) online.

The influence of the channel size on the reduction of side effects in microchannel proton therapy

S. Girst, C. Greubel, J. Reindl, C. Siebenwirth, O. Zlobinskaya, G. Dollinger and T.E. Schmid; *Radiation and Environmental Biophysics* (2015). In *Radiation and Environmental Biophysics*, Springer Berlin Heidelberg.

Nanosopic exclusion between Rad51 and 53BP1 after ion irradiation in human HeLa cells

J. Reindl, G.A. Drexler, S. Girst, C. Greubel, C. Siebenwirth, S.E. Drexler, G. Dollinger and A.A. Friedl; *Physical Biology* 12(6) (2015) 066005.

2014

The Effects of Ultra-High Dose Rate Proton Irradiation on Growth Delay in the Treatment of Human Tumor Xenografts in Nude Mice

O. Zlobinskaya, C. Siebenwirth, C. Greubel, V. Hable, R. Hertenberger, N. Humble, S. Reinhardt, D. Michalski, B. Röper, G. Multhoff, G. Dollinger, J. J. Wilkens and T. E. Schmid; *Radiation Research* 181 (2014) 177.

2013

Subdiffusion Supports Joining Of Correct Ends During Repair Of DNA Double-Strand Breaks

S. Girst, V. Hable, G. A. Drexler, C. Greubel, C. Siebenwirth, M. Haum, A. A. Friedl and G. Dollinger; *Sci. Rep.* 3 (2013) 2511

Reduced side effects by proton microchannel radiotherapy: study in a human skin model

O. Zlobinskaya, S. Girst, C. Greubel, V. Hable, C. Siebenwirth, D.W.M. Walsh, G. Multhoff, J.J. Wilkens, T.E. Schmid, G. Dollinger; *Radiat. Environ. Biophys.* 52 (2013) 123-133.

2012***Low LET protons focused to submicrometer shows enhanced radiobiological effectiveness***

T.E. Schmid, C. Greubel, V. Hable, O. Zlobinskaya, D. Michalski, S. Girst, C. Siebenwirth, E. Schmid, M. Molls, G. Multhoff, G. Dollinger; Phys. Med. Biol. 57 (2012) 5889.

2011***Scanning irradiation device for mice in vivo with pulsed and continuous proton beams***

C. Greubel, W. Assmann, C. Burgdorf, G. Dollinger, G. Du, V. Hable, A. Hapfelmeier, R. Hertenberger, P. Kneschaurek, D. Michalski, M. Molls, S. Reinhardt, B. Röper, S. Schell, T.E. Schmid, C. Siebenwirth, T. Wenzl, O. Zlobinskaya, J.J. Wilkens; Radiat. Environ. Biophys. 50 (2011) 339-344.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Günther Dollinger danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit durchzuführen. Gleichzeitig stand er jederzeit zur Diskussion neuer Ergebnisse und Probleme bereit. Dies hat wesentlich zu dem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls möchte ich PD Dr. Thomas E. Schmid für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken, wodurch der interdisziplinäre Aspekt der Arbeit zusätzlich gestärkt wurde und ich auch die Expertise des Mikrokerntests erlernen konnte.

Ein großer Dank gilt PD Dr. Anna Friedl und ihrer Gruppe um Dr. Guido Drexler, Sophie Drexler, Iris Baur und Claudia Böhland. Neben der Unterstützung diverser Strahlzeiten mit der Vorbereitung von Lebendzellcontainern, biologischem Zubehör und stabil transfizierter Zellen, erhielt ich in den letzten Jahren in ihrem Labor die Möglichkeit die in der Arbeit verwendeten biologischen Methoden zu erlernen und zu etablieren.

Vielen Dank auch an den Kapitän der SNAKE-Bio Gruppe, Dr. Christoph Greubel. Er hat das Schiff nicht nur in rauen und stürmischen Strahlzeiten auf Kurs gehalten, sondern hatte auch bei den meisten Problemen der Besatzung immer einen Rat, oder sogar gleich die Lösung parat. Gleichzeitig hatte er auch bei den Landgängen wie z.B. in Japan immer den richtigen Riecher für gute Restaurants oder Bars.

Ein weiterer Dank geht an die Organisatorin und Doktorandenkollegin Judith Reindl, die den Strahlzeiten die nötige Struktur verpasst hat, aber auch lange Strahlzeitabenden bis 5 Uhr früh mit Geschichten oder einem Eis aufgelockert hat. Ebenfalls danke ich der langjährigen Kollegin Dr. Stefanie Girst, Matthias Sammer, Benjamin Schwarz, Dieter W. Walsh für erfolgreiche Strahlzeiten, konstruktive Diskussionen und eine tolle gemeinsame Zeit auf Konferenzen.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Helmut Pospiech und seinen ehemaligen Doktoranden Dr. Mikko Sokka für erhellende Diskussionen rund um den Nucleolus.

Zusätzlich danke ich Herrn Wolfgang Engl und Herrn Schubert der LRT2 Werkstatt für ihre Unterstützung.

Für die Vorbereitung des Ionenstrahls und der ständigen technischen Unterstützung im Beschleunigerlabor danke ich den Operateuren, Christian, Michael, Michael und Oliver, sowie unserem unermüdlichen Spezialoperateur „Sigi“.

An dieser Stelle möchte ich auch allen Freunden danken, die mich in den letzten Jahren in vielerlei Hinsicht unterstützt und auch immer wieder getreten haben, wenn ich es gebraucht habe. Ein besonderer Dank gilt dabei meinem Mitbewohner und Cousin Severin, ohne dem ich die letzten Monate vom Fleisch gefallen wäre und der immer da war, wenn er gebraucht wurde.

Zu allerletzt möchte ich meiner Familie und meiner Freundin von ganzem Herzen danken. Ich kann mich glücklich schätzen, dass ich hier die Erfahrung machen kann, dass ich immer Rückendeckung habe.