
Aufbau eines Mikrobleichsystems an der GSI Schwerionen- Mikrosonde und dessen biologische Anwendungen

Setup of a micro bleaching system at the GSI heavy-ion microprobe and its biological applications

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von Dipl.-Phys. Bruno Merk aus Duschambe

April 2013 – Darmstadt – D 17



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Institut für Festkörperphysik
AG Durante

Aufbau eines Mikrobleichsystems an der GSI Schwerionen- Mikrosonde und dessen biologische Anwendungen

Setup of a micro bleaching system at the GSI heavy-ion microprobe and its biological applications

Genehmigte Dissertation von Dipl.-Phys. Bruno Merk aus Duschanbe

1. Gutachten: Prof. Ph.D. Marco Durante
2. Gutachten: Prof. Dr. Christina Trautmann

Tag der Einreichung: 23.04.2013

Tag der Prüfung: 17.06.2013

Darmstadt – D 17

Erklärung zur Dissertation

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Darmstadt, den 22. April 2013

(Bruno Merk)



Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Aufbau und der Integrierung eines Lasersystems zur Untersuchung der Austauschkinetik fluoreszenzmarkierter Ku80 Reparaturproteine an strahleninduzierten DNA Schädigungen, welche durch gezielte Ionenbestrahlung mittels der Schwerionen-Mikrosonde der GSI erzeugt werden.

Zur Messung dieser schnellen Austauschkinetik, mit wenigen Sekunden Halbwertszeit, muss auch die räumliche und zeitliche Auflösung des dedizierten in-situ Mikroskopes verbessert werden. Diese Verbesserungen erlauben es, dass die zuvor nur ex-situ beobachtbare Dekondensation von heterochromatischen Bereichen mit dichter DNA nun auch in-situ beobachtet werden kann und zusätzlich speziesübergreifend nachgewiesen wird.

Bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen entlang des Reparaturmechanismus der „Nicht Homologen Endverknüpfung“ spielt Ku80 eine entscheidende, frühe Rolle. Durch die gezielte Bestrahlung von Zentren unterschiedlicher Chromatindichte kann mit dem verbesserten Mikroskop der Mikrosonde gezeigt werden, dass Ku80-GFP für die Akkumulation in Heterochromatin (HC) signifikant länger benötigt als in Euchromatin (EC).

Im Rahmen der Untersuchung des Austausches von Ku80-GFP in diesen geschädigten Bereichen von HC und EC wird das Lasersystem genutzt, um gezielt die lokale Fluoreszenz durch Bleichen zu deaktivieren und den Austausch von gebleichten durch benachbarte ungebleichte Ku80-GFP Molekülen aufzunehmen. Diese Methode ist als FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) bekannt. Dabei zeigt sich, dass der Austausch von Ku80-GFP im dichten HC langsamer als im weniger dichten EC stattfindet.

Abstract

This study tackles the setup and integration of a laser system to measure the turnover of repair protein Ku80, labeled with a fluorescent marker, at DNA damage sites that are produced by targeted ion irradiation at the heavy-ion microprobe of GSI.

To measure this fast turnover, with half-times of some seconds, spatial and temporal resolution of the dedicated in-situ microscope has to be improved. These improvements also allow for in-situ observation of the previously only ex-situ detectable decondensation of heterochromatic regions with higher DNA concentrations that is additionally found to be species conserved.

During the repair of double strand breaks along the „non-homologous end joining“ repair pathway repair protein Ku80 plays a critical early role. By targeted irradiation of centers of different chromatin density the accumulation of Ku80-GFP in heterochromatin (HC) is significant slower than in euchromatin (EC). To investigate the exchange of Ku80-GFP at the damage sites in HC and EC the laser system is used for targeted deactivation of the fluorescent behaviour by bleaching and subsequent recording of the exchange of bleached Ku80-GFP molecules with neighboring fluorescent molecules. This technique is known as fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). It is found, that the exchange of Ku80-GFP in the dense HC is slower than in the less dense EC.



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung / Abstract	3
1 Einleitung	7
1.1 Schwerionen-Mikrosonde der GSI	8
1.2 Aufbau für radiobiologische Untersuchungen	10
1.2.1 Bestrahlungsaufbau	10
1.2.2 Epifluoreszenz Mikroskop-Aufbau	11
1.2.3 Programm zur Steuerung des Bestrahlungsablaufs	12
1.2.4 Kalibration des magnetisch abgelenkten Bestrahlungsorts im Mikroskopiebild	13
1.3 Grundlagen der Wechselwirkung dicht ionisierender Strahlung mit biologischen Materialien	14
1.3.1 Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung auf Zellebene	14
1.3.2 Biologische Grundlagen	16
1.3.3 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung	16
1.4 Analyse von fluoreszenzmarkierten Proteinen mittels FRAP	18
2 Erweiterungen des Bestrahlungsaufbaus für Radiobiologie	21
2.1 Integrierung eines Wasserimmersions-Objektivs	21
2.2 Einbau eines Piezo-Linearaktors	26
3 Aufbau und Integrierung eines Lasersystems	29
3.1 Anforderungen	29
3.1.1 Biologische Anforderungen	29
3.1.2 Mikrosondenspezifische Anforderungen	30
3.1.3 Laserauswahl	30
3.2 Aufbau und Integrierung	32
3.2.1 Einkopplungspfad des Lasers	32
3.2.2 Simulation des optischen Systems	34
3.2.3 Auswahl optische Elemente	35
3.2.4 Mechanischer Aufbau	36
3.2.5 Elektronische Steuerung	36
3.2.6 Laser Kontrollprogramm	38
3.3 Optimierungen	43
3.3.1 Laser-Emissionspektrum	43
3.3.2 Verkleinerung der Fokusgröße	43
3.4 Ergebnisse	45

4 Radiobiologische Untersuchungen	49
4.1 Zellkultivierung und Behandlung	49
4.1.1 Zellkultivierung und Transfektion der Zellen	49
4.1.2 Bestrahlung der Zellen an der Mikrosonde	49
4.2 Bestrahlungsparameter	50
4.3 Chromatinstrukturveränderung nach Ionenbestrahlung	52
4.3.1 Visualisierung der Chromatindekondensation nach Bestrahlung mit schweren Ionen	52
4.3.2 Dekondensation von Chromatin nach Bestrahlung mit schweren Ionen	53
4.3.3 Dekondensation von Heterochromatin nach gezielter Ionenbestrahlung	58
4.4 Reparaturprotein-Dynamik nach Ionenbestrahlung	60
4.4.1 Akkumulation von Ku80 in Abhängigkeit der Chromatindichte	60
4.4.2 Austausch von Ku80-GFP in Abhängigkeit der Chromatinstruktur	66
5 Schlussfolgerung	75
6 Ausblick	77
Literaturverzeichnis	79
Danksagung	91
Lebenslauf	94
Veröffentlichungen	96

1 Einleitung

Mikrosonden kommen schon seit geraumer Zeit auf den unterschiedlichsten Gebieten zum Einsatz [1]. Diese erstrecken sich von der Lithographie [2, 3], der Mikrostrukturierung [4, 5], über die Elektronikbestrahlung [6, 7, 8], der Ionenstrahlanalytik [9, 10, 11], bis hin zur Radiobiologie [12, 13, 14].

Insbesondere die Radiobiologie gewinnt immer mehr an Bedeutung, da es durch Bestrahlungen an Mikrosonden möglich ist Ort und Anzahl der auftreffenden Ionen zu definieren und somit die Dosis exakt zu kontrollieren. Nach ersten frühen radiobiologischen Untersuchungen [15] ist 1991 an der Columbia Universität (New York, USA) [16] und 1997 am Gray Laboratory (England) [17, 18] eine routinemäßige Bestrahlung von biologischen Proben an Mikrosonden aufgenommen worden. Seither ist das wissenschaftliche Interesse von radiobiologischen Bestrahlungen an Mikrosonden ungebrochen gestiegen, was sich in der steigenden Zahl der Mikrosonden weltweit widerspiegelt, die sich entweder im Aufbau befinden oder bereits erste radiobiologische Untersuchungen unternehmen [19]. Im Moment existieren weltweit nur drei Mikrosonden, die eine gezielte Bestrahlung biologischer Zellen mit schweren Ionen und Energien größer als 4 MeV/u erlauben: die JAEA in Takasaki (Japan) [20], SNAKE in München (Deutschland) [21] und das GSI in Darmstadt (Deutschland) [22]. Wobei die Mikrosonde des GSI Helmholtzzentrums für Schwerionenforschung die bisher höchste Treffergenauigkeit erreicht [23].

Die ersten biologischen Proben wurden an der GSI Mitte der 1980er Jahre, im Rahmen einer Doktorarbeit über die Inaktivierung von Bakteriensporen, mittels eines kollimierten Strahls bestrahlt [24, 25], der eine weitere Arbeit über die Inaktivierung von Säugertierzellen folgte [26]. Eine routinemäßige Bestrahlungseinrichtung an der Mikrosonde der GSI wurde im Rahmen einer Doktorarbeit 2004 realisiert [27] und zur Messung von Kalziumoszillationen in Zellen erweitert [28].

In der Radiobiologie ist das Interesse an der Reparatur von durch ionisierende Strahlung erzeugten Doppelstrangbrüchen von besonderem Interesse [29]. Zur Untersuchung dieser teils schnellen Prozesse ist oft eine in-situ Mikroskopie mit hoher räumlicher und/oder zeitlicher Auflösung wünschenswert [30] und häufig notwendig [31]. Jedoch sind weitverbreitete Lösungen bei Mikrosonden oft schwierig direkt zu übernehmen, so dass diese oft eine Anpassung bzw. Neuentwicklung benötigen [32].

Diese Arbeit widmet sich der Erweiterung und Verbesserung der in-situ Mikroskopie nach Ionenbestrahlung und gliedert sich in drei Teile: Der erste Teil befasst sich mit der Verbesserung der räumlichen und zeitlichen Auslösung des Mikroskopes (Kapitel 2), der zweite Teil mit der Integrierung eines Lasersystems (Kapitel 3). Im dritten Teil werden schließlich die biologischen Untersuchungen diskutiert (Kapitel 4).

1.1 Schwerionen-Mikrosonde der GSI

Die Schwerionen-Mikrosonde des GSI Helmholtzzentrums für Schwerionenforschung (Darmstadt, Deutschland) ist am Ende des Linearbeschleunigers UNILAC angebracht. Dort können Protonen und Ionen bis einschließlich Uran mit Energien von 1,4 bis 11,4 MeV/u mit einer Zielgenauigkeit von $<1 \mu\text{m}$ auf das Zielobjekt gelenkt werden (Abbildung 1.1).

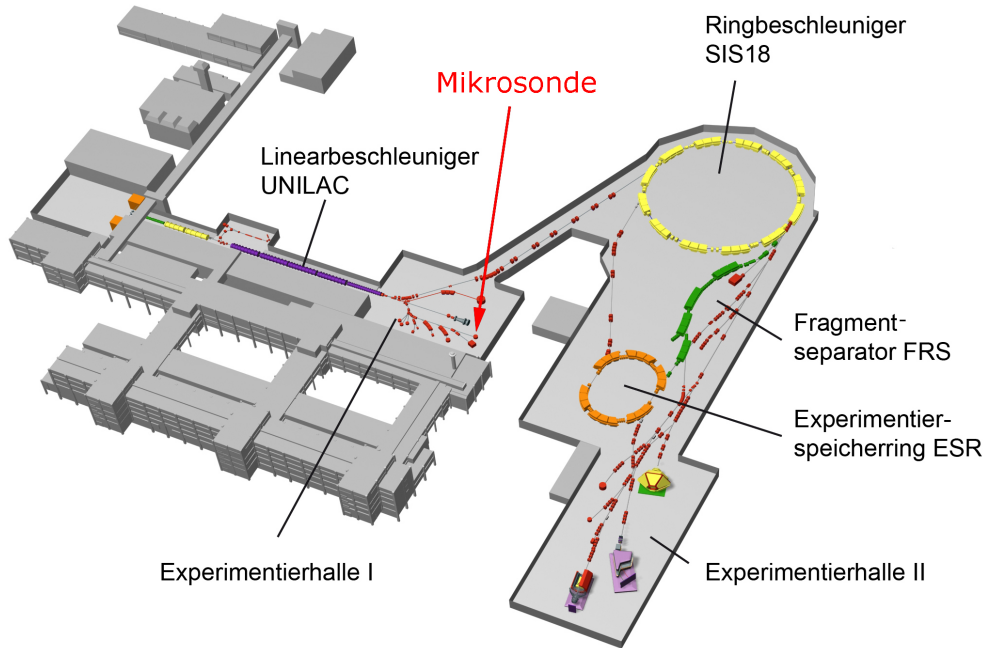


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Beschleunigereinrichtungen des GSI Helmholtzzentrums für Schwerionenforschung (Darmstadt, Deutschland) [33].

Funktionsweise

In Abbildung 1.2 ist eine schematische Darstellung des Mikrosonden-Aufbaus gezeigt. Der von links kommende Ionenstrahl passiert einen Strahlschalter und gelangt auf die Objektschlitze. Ihre Größe ist auf etwa $10 \times 5 \mu\text{m}^2$ eingestellt. Sie dienen als Quasi-Punktquelle für die weitere Strahloptik [27]. Ionen, die diese Schlitze passieren, werden mittels einer Quadrupol-Triplett-Linse (magnetische Linse) auf die Probe fokussiert (Fokusgröße $700 \times 500 \text{ nm}$). Dabei werden durch die Aperturblende (Öffnungsgröße von $100 \mu\text{m}$) sphärische Aberrationen begrenzt. Die Anti-Streuschlitze, welche sich zwischen den Objektschlitzen und der Aperturblende befinden, stoppen die durch die Objektschlitze gestreuten Ionen. Damit die Ionen auf unterschiedliche Positionen der Probe fokussiert werden können, ist vor der magnetischen Linse eine schnelle magnetische Strahlablenkung angebracht.

Eine Bestrahlung mit einzelnen Ionen wird durch die Kombination eines schnellen Einzelionendetektors (Sekundärelektronenvervielfacher) mit einem schnellem Strahlschalter ermöglicht. Der Einzelionendetektor verstärkt niederenergetische Elektronen, welche durch Auftreffen von Ionen auf die Probe bzw. bei Passieren des Vakuumfensters (siehe Kapitel 1.2.1) entstehen und erzeugt ein Trigger-Signal [34]. Dieses Signal aktiviert den elektrostatischen Strahlschalter, bestehend aus zwei Kondensatorplatten, der

daraufrin durch Anlegen von 400 V alle weiteren Ionen ablenkt (Abbildung 1.2 rot). Mit einer extrem schnellen Plattenkondensator-Ladezeit von 200 ns kann zwischen einzelnen Ionen bis zu einer Teilchenrate von 1000 Ionen/s geschaltet werden. Dies erlaubt eine Bestrahlung einer definierten Position mit einer bestimmaren Anzahl von einzelnen Ionen. Die Wahrscheinlichkeit ungewollt mit mehr als einem Ion zu bestrahlen liegt bei $2,5 \times 10^{-4}$ [35].

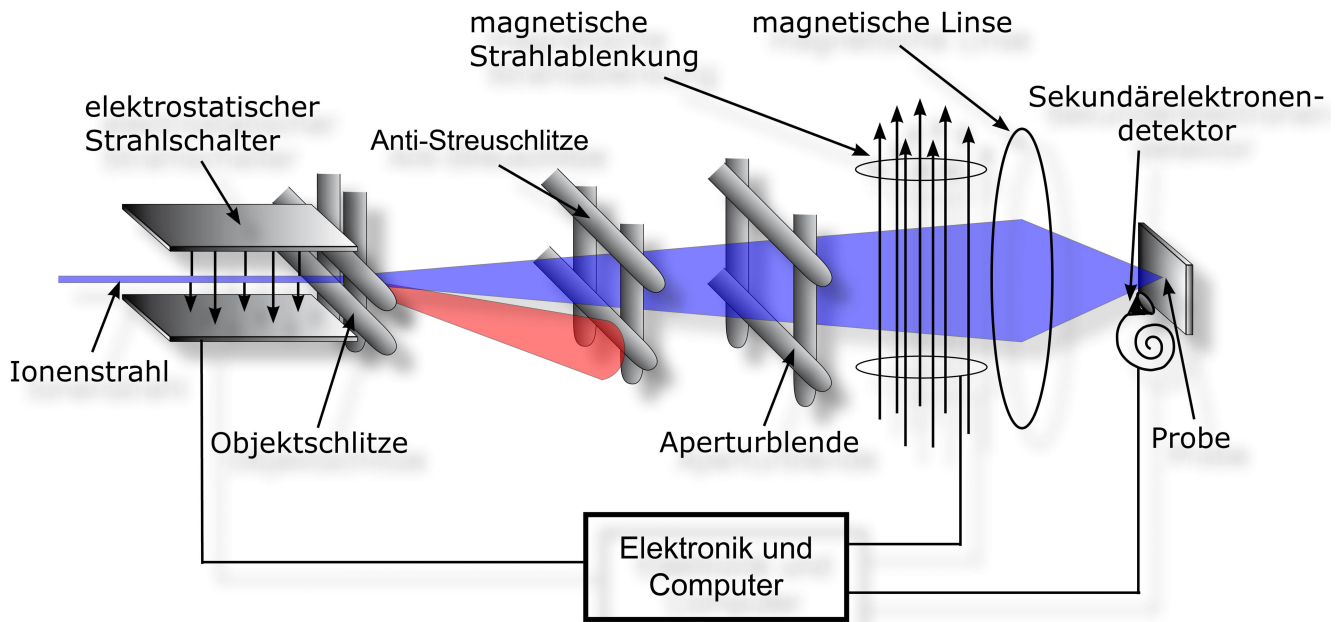


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau der Mikrosonde: Ionenstrahl bei Bestrahlung mit einzelnen Ionen (blau) und bei Abschaltung durch Strahlschalter (rot).

1.2 Aufbau für radiobiologische Untersuchungen

Zur gezielten Bestrahlung von lebenden Zellen mit einzelnen schweren Ionen muss die Mikrosonde Ionen auf bestimmte Bereiche innerhalb einer Zelle ablenken. Dazu müssen die Zellen gehalten (Kapitel 1.2.1), visualisiert (Kapitel 1.2.2), Ziele bestimmt (Kapitel 1.2.3) und schließlich bestrahlt (Kapitel 1.2.4) werden.

1.2.1 Bestrahlungsaufbau

In Abbildung 1.3 ist eine schematische Darstellung des Aufbaus dargestellt. Der Ionenstrahl passiert ein 200 nm dünnes Siliziumnitrid (Si_3N_4) Vakuumfenster und wird auf die Ebene der Zellkultur fokussiert. Ionen, die das Vakuumfenster passieren, produzieren Sekundärelektronen. Dieser Effekt ist durch eine Cäsiumiodid (CsI) Beschichtung auf dem Vakuumfenster weiter verstärkt und dient zur Detektion einzelner Ionen mittels eines Sekundärelektronenvervielfachers [22] und ermöglicht die Detektion einzelner Ionen. Die Zellen wachsen auf einer Polypropylenfolie, welche als Boden des Zellgefäßes dient, das weniger als 50 μm vom Vakuumfenster entfernt angebracht ist. Das Zellgefäß wird auf einem Kreuztisch gehalten, mit dem das Anfahren unterschiedlicher Positionen innerhalb der Zellkultur möglich ist.

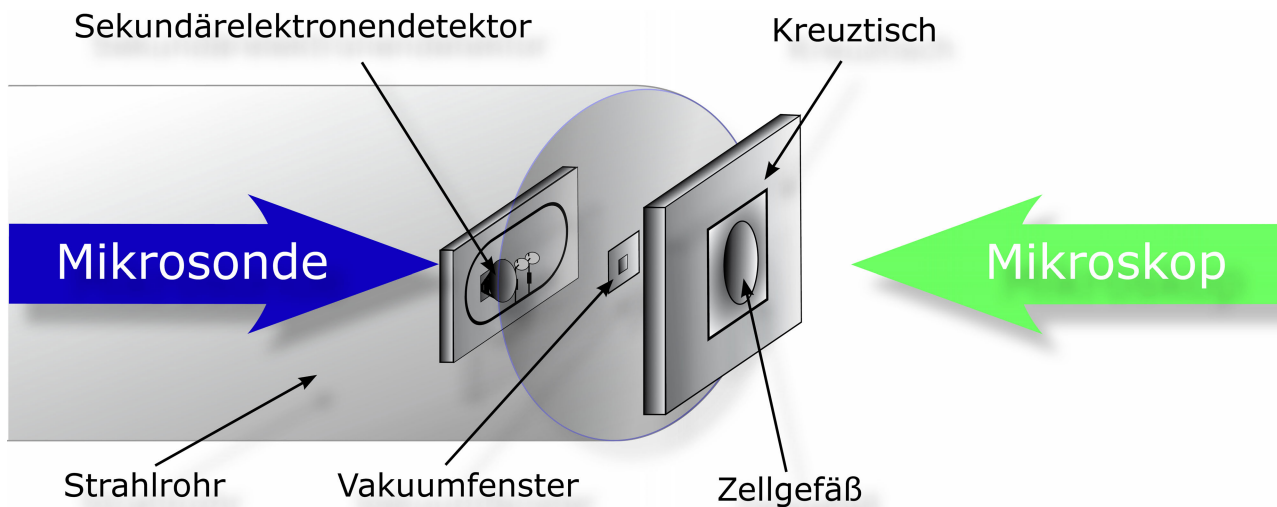


Abbildung 1.3: Schema des Bestrahlungsaufbaus: Der Ionenstrahl wird durch die Mikrosonde (von links kommend) auf die Ebene der Zellen fokussiert und abgelenkt. Das Mikroskop (von rechts kommend) dient zur Visualisierung der Zellen.

1.2.2 Epifluoreszenz Mikroskop-Aufbau

Damit einzelne Zellkerne, bzw. bestimmte Bereiche innerhalb eines Zellkerns, bestrahlt werden können, müssen diese visualisiert werden. Dazu wurde unter Berücksichtigung der besonderen Anforderungen wie limitierter Platz und mechanische Stabilität ein dediziertes Epifluoreszenz-Mikroskop konzipiert [27].

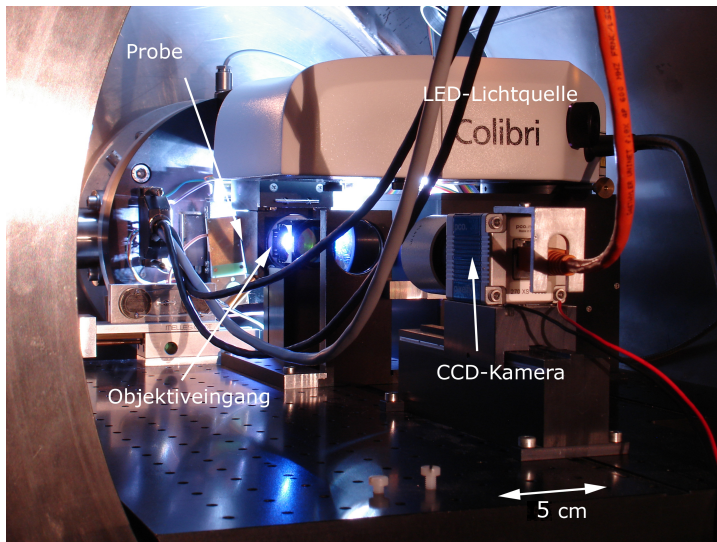


Abbildung 1.4: Aufnahme des optischen Tisches mit darauf montiertem Mikroskop.

Der Aufbau ist wie in Abbildung 1.4 dargestellt auf einem optischem Tisch angeordnet und kann sowohl zur Fokussierung, als auch zum Probenwechsel zurückgefahren werden. In Abbildung 1.5 ist ein Schema dieses Mikroskop-Aufbaus dargestellt, in dem von links der Ionenstrahl (rot) auf die zu bestrahlenden Zellen gelangt, welche in einem Zellgefäß kultiviert und zur Bestrahlung in einen Kreuztisch eingebaut werden. Ein LED-Beleuchtungssystem (Colibri, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) dient als Lichtquelle mit der Möglichkeit bis zu vier schmalbandige Anregungswellenlängen (zur Zeit drei Module mit 365 nm, 470 nm und 590 nm integriert) zu emittieren mit vernachlässigbarer Wärmeentwicklung [36].

Im Lampenhaus wird das Anregungslicht (blau) „geköhler“ [37]: Jeder Punkt auf der Zellebene erhält Licht von jedem Punkt der Lichtquelle (Homogenität der Belichtung), die rechteckige Feldblende definiert den auf der Zellebene belichteten Bereich (Reduktion des Ausbleichens außerhalb des durch die Kamera betrachteten Bereiches). Zusätzlich wird die irisförmige Objektblende auf den Objektiveneingang abgebildet. Durch Feld- und Objektblende wird Licht, welches nicht zu der Bilderzeugung beiträgt, stark reduziert und somit Streulicht vermieden (Kontrasterhöhung). Nach Passieren des Lampenhauses wird das Anregungslicht an einem multichromatischen Strahlteiler in das Objektiv reflektiert und regt dann in das Probenmaterial eingebrachte fluoreszierende Farbstoffmoleküle innerhalb des Bildfeldes an. Das durch Stokes-Verschiebung rot-verschobene Emissionslicht (in Abbildung 1.5 grün) gelangt hinter dem Objektiv und einem Bandpassfilter auf die Tubuslinse, die das Emissionslicht auf einen CCD-Kamera Sensor (Pixelfly XS270, PCO AG, Deutschland) abbildet. Der multichromatische Strahlteiler und der Emissionsfilter (Filter Set 62 HE, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) sind speziell für alle genutzten LED Anregungs- und Farbstoff-Emissionswellenlängen angepasst, wodurch mechanische Filterwechsel vermieden werden und somit schnell aufeinanderfolgende Aufnahmen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen möglich werden. Ein mechanischer Wechsel von Strahlteiler und Emissionsfilter würde nicht nur die Bildaufnahme mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen verlangsamen, sondern auch kleine Verschiebungen des Mikroskopiebildes auf dem CCD Sensor verursachen, da Strahlteiler und Emissionsfilter dicke, lichtbrechende Elemente darstellen, deren exakte mechanische Ausrichtung schwierig zu reproduzieren ist. Im Gegensatz zum typischen Gebrauch

von Mikroskopen, zur Visualisierung von Objekten sowie Längenbestimmungen innerhalb des abgebildeten Bereichs, bei dem eine leichte optische Verschiebung der Absolutposition des Bildes weniger problematisch ist, stellt diese speziell bei Mikrosonden ein großes Problem dar. Hier verändert nämlich jede mechanische oder optische Verschiebung die Kalibration (Kapitel 1.2.4) zwischen Mikroskop und Mikrosonde und verursacht systematische Fehler in der Treffergenauigkeit [38]: Das Mikroskop der Mikrosonde muss die Position eines zu treffenden Objektes relativ zur Position des Mikrostrahls messen können.

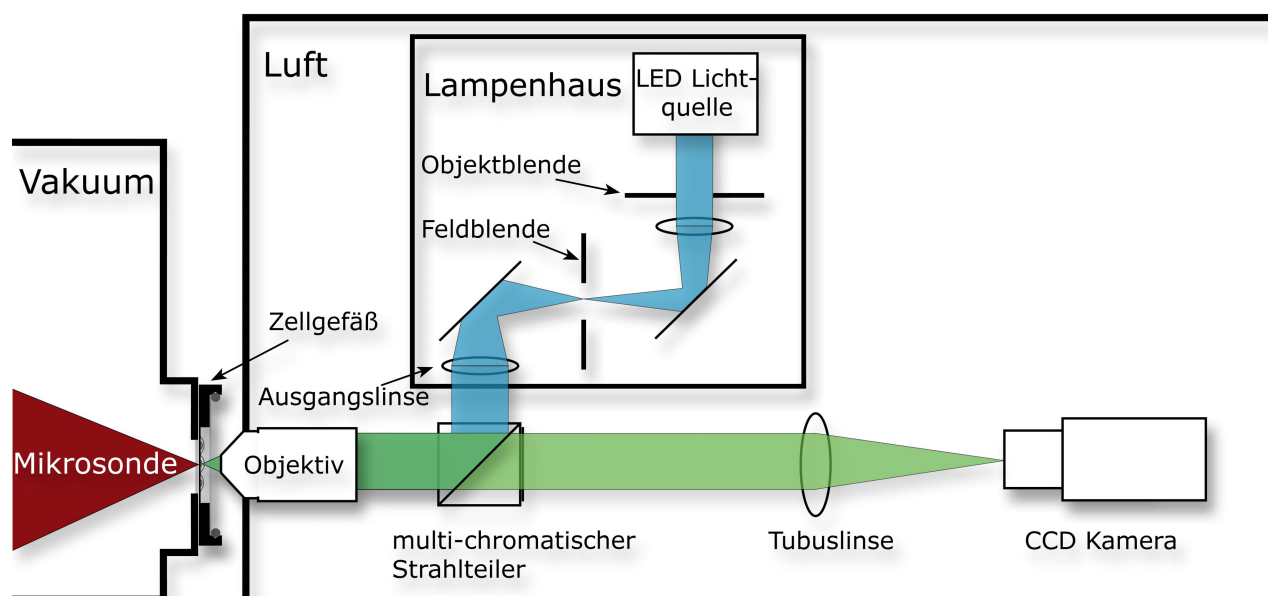


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Epifluoreszenz-Mikroskops mit eingezeichneten Strahlenwegen für Anregung (blau) und Emission (grün).

1.2.3 Programm zur Steuerung des Bestrahlungsablaufs

Die Bestrahlung biologischer Proben erfolgt mittels eines in C++ programmierten Plug-ins, welches in das kommerzielle Bildverarbeitungsprogramm Image-Pro Plus (Media Cybernetics Incorporation, USA) integriert ist [27]. Dieses Plug-in steuert alle notwendigen Abläufe und Hardware-Komponenten, sowohl zur Bildaufnahme und den damit verbundenen Routinen (Kamera, Kreuztisch, LED-Lichtquelle, etc.), als auch alle für die Ionenbestrahlung notwendigen Routinen (Strahlschalter, magnetischer Ablenker, Detektor, etc.). Dadurch ist eine schnelle und effektive Bestrahlung von Zellkulturen mit auf das Experiment abstimmbaren Parametern möglich (Musterbestrahlung, Bestrahlung aller Zellen, definierte Ionenzahl, Bildaufnahmen nach Ionenbestrahlung, automatische Zellerkennung, etc.) [39, 40].

Dabei stellt Image-Pro neben Bildverarbeitungsroutinen, welche z.B. für die automatische Zellerkennung wichtig sind, auch die Möglichkeit zur Verfügung, Menüpunkte in die Menüleiste zu integrieren. Mittels des Plug-ins sind diese Menüpunkte mit Dialogfenstern verbunden, die die Steuerung der Mikrosonde und des Mikroskopes ermöglichen.

1.2.4 Kalibration des magnetisch abgelenkten Bestrahlungsorts im Mikroskopiebild

Der Ort des Auftreffens von Ionen in der Probenebene wird bei statischer Mikrosonden-Objektapertur und Triplet-Linse durch das Feld im magnetischen Strahlablenker bestimmt. Gleichzeitig wird die Probenebene durch das Mikroskop optisch vergrößernd auf den CCD-Chip der Kamera abgebildet. Wird nun der fokussierte Ionenstrahl durch einen geeigneten Szintillator sichtbar gemacht, kann die optische Achse des Mikroskops auf die Strahlachse der Mikrosonde ausgerichtet werden. Die Ablenkung des Ionenstrahls durch den magnetischen Ablenker wird dann mit Hilfe des Szintillators im Mikroskopiebild kalibriert. Für jeden im Mikroskop abgebildeten Ort ist daraufhin ein Strompaar (I_x, I_y) bekannt, das den Ionenstrahlfokus in diesen Ort ablenkt [27]. Unstimmigkeiten bei der Kalibration zwischen Mikrosonde und Mikroskop oder kleinste mechanische oder thermische Verschiebungen führen zu systematischen Fehlern in der Treffergenauigkeit [38, 41]. Die mechanische und thermische Stabilität des gesamten Aufbaus wird daher mit großem Aufwand optimiert.

1.3 Grundlagen der Wechselwirkung dicht ionisierender Strahlung mit biologischen Materialien

Für das Verständnis der Wirkung von dicht ionisierender Ionenstrahlung auf biologische Systeme ist einerseits die physikalische Wechselwirkung des Projektils mit dem Material von Bedeutung (Kapitel 1.3.1). Aus dieser Wechselwirkung geht die räumliche Verteilung der eingetragenen Energie hervor. Andererseits wird im Kapitel 1.3.3 die Wirkung dieser physikalischen Dosis auf eine biologische Probe beschrieben.

1.3.1 Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung auf Zellebene

Bei Wechselwirkung von Materie mit Photonen oder Ionen wird Energie deponiert, für Photonen nach dem Lambert-Beerschem Gesetz und für Ionen nach der Bethe-Bloch Gleichung [42, 43]. In Abbildung 1.6 (a) ist eine Dosisverteilung von Röntgen-Photonen auf einer Fläche von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (Größe

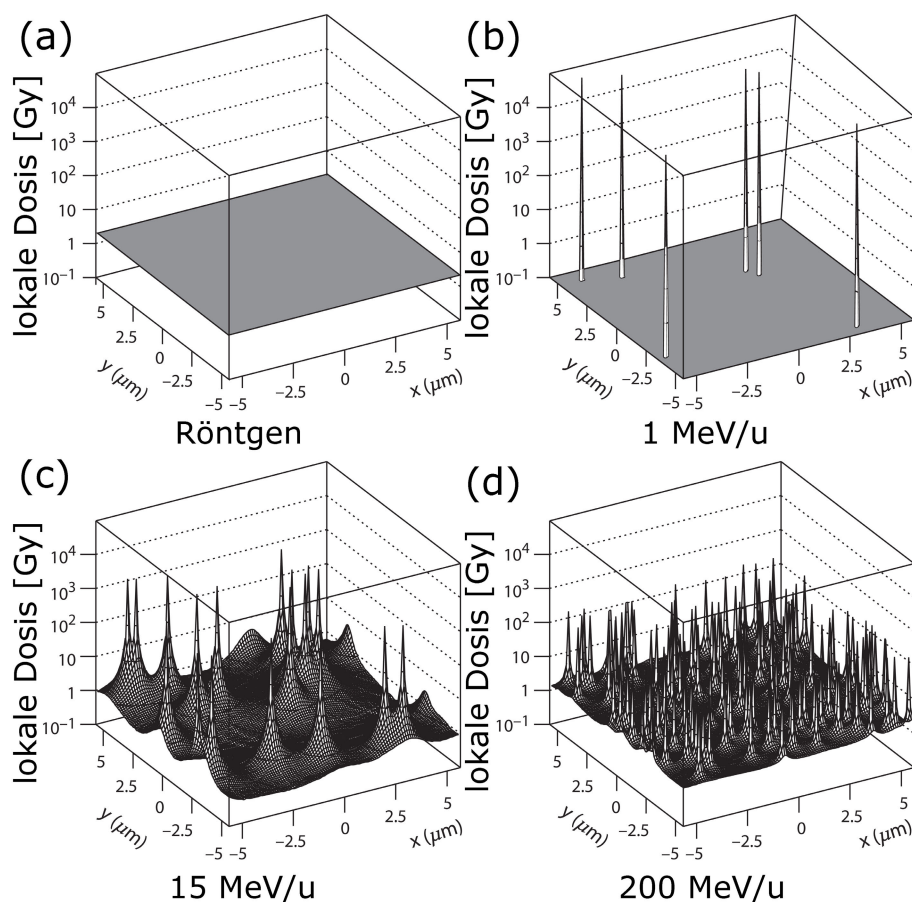


Abbildung 1.6: Simulierte Dosisverteilungen nach Bestrahlung von Photonen (a) und Kohlenstoffionen (b - d) auf eine Bestrahlungfläche von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Alle Dosisverteilungen besitzen eine durchschnittliche deponierte Dosis von 2 Gy. Abbildungen (b - d) zeigen Dosisverteilungen für Kohlenstoffionen mit unterschiedlichen spezifischen Energien. Dosisverteilung nach Photonenbestrahlung (a) zeigt eine homogene Verteilung. Die Ionenbestrahlung (b - d) zeigt eine ausgeprägte Struktur, welche bei niedrigeren Energien höher und lokalisierter wird. (Abbildung modifiziert übernommen [44])

vergleichbar mit Zellkern) mit einer durchschnittlichen Dosis von 2 Gy dargestellt. Da Photonen Energie hauptsächlich durch Photo-, Comptoneffekt und Paarbildung deponieren, die eine geringe Wechselwirkungswahrscheinlichkeit besitzen, wird relativ wenig Energie pro Photon in einem Zellkern deponiert. Daher sind viele Photonen notwendig, was die dargestellte homogene Verteilung erklärt (Abbildung 1.6) [44].

Der größte Teil der von Ionen deponierten Energie (für die betrachteten Energien $E > 1$ MeV/u) wird auf die Elektronen des bestrahlten Materials in Form von kinetischer Energie übertragen. Diese so von den Kernen abgestreift δ -Elektronen geben ihre Energie wiederum durch Stöße weiter. Damit ergibt sich eine radiale Dosisverteilung die mit $1/r^2$ abnimmt [45]. Abweichungen existieren für sehr geringe Ionenenergien, kleine Abstände ($r < 10$ nm) und große Abstände [46]. Für große Abstände ist die Dosisdeposition limitiert durch die maximale Reichweite der Elektronen [47]:

$$r_{max} = 0,05 \cdot E^{1,7} \quad (1.1)$$

Dabei ist r_{max} die maximale Reichweite in μm und E die spezifische Energie des Ions in MeV/u. Hiermit lassen sich auch die unterschiedlichen lokalen Verteilungen der in Abbildung 1.6 (b-d) dargestellten Dosis erklären. Da die Kohlenstoffionen unterschiedliche Energien (Geschwindigkeiten) besitzen, besitzt die Dosisdeposition pro Ion unterschiedliche Maximalreichweiten was zu unterschiedlichen Dosisverteilungen führt (Abbildungen 1.6 (b-d)). Langsamere Ionen erzeugen somit eine stärker lokalisierte, sehr hohe Dosis nahe ihrer Trajektorie und wenig Dosis im restlichen Zellkern (Abbildung 1.6 (b)). Ionenstrahlung wird auch als dicht ionisierende Strahlung bezeichnet [44].

Die mittlere Bestrahlungsdosis D [Gy] ist gegeben durch [44]:

$$D = 1,6 \cdot 10^{-9} \cdot F \cdot LET \cdot \rho^{-1} \quad (1.2)$$

Hierbei ist die Ionenfluenz F in $1/\text{cm}^2$, der lineare Energieverlust LET in $\text{keV}/\mu\text{m}$ und die Dichte ρ in g/cm^3 angegeben. Der LET kann, da in dieser Arbeit einzelne Zellkerne mit Dicken von wenigen μm bestrahlt werden, als konstant angesehen werden (wie in Kapitel 4.2 gezeigt). Ein Vorteil der Mikrosonde gegenüber der Breitfeldbestrahlung, welche der Poissonstatistik folgt, ist eine extrem gute Kenntnis über die Dosis, da die Ionenfluenz frei gewählt werden kann (Kapitel 1.1), die Dichte gegeben ist, und der LET durch die Energie der Ionen bestimmt ist [48].

1.3.2 Biologische Grundlagen

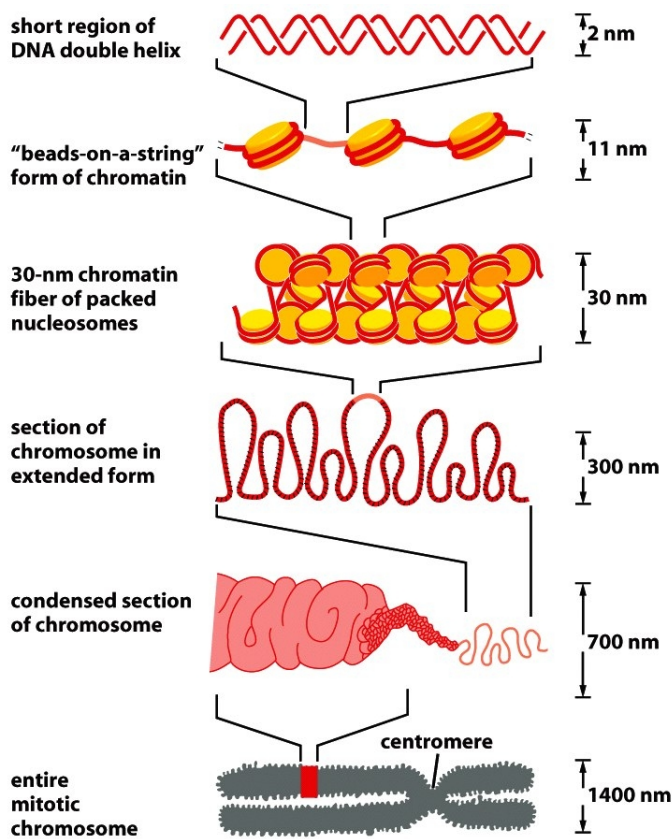


Abbildung 1.7: Aufbau der Chromosomen aus der DNA Doppelhelix und der Verpackungstufen (Entnommen aus [49])

Die gesamte genetische Information jeder Zelle ist im Zellkern gespeichert. Dabei wird die Information als langes Kettenmolekül aus DNA (Desoxyribonukleinsäure), auch DNA Doppelstrang genannt, hinterlegt. Mit einer Gesamtlänge von etwa zwei Metern muss der DNA Doppelstrang somit stark gepackt werden. Dies geschieht über mehrere Stufen und ist in Abbildung 1.7 dargestellt. Der DNA Doppelstrang nimmt die energetisch günstigere Form einer Doppelhelix an, wird um eine scheibenartige Struktur aus Histonen gewickelt und bildet eine Art „Perlenstruktur“. Dies wird auch Nukleosomfilament (DNA und Histone) genannt und gibt mit Proteinen die hoch gepackten Chromatinfasern. Während der Mitose (Zellteilung) werden die Chromosomen weiter verpackt und erzeugen so eine X-förmige Struktur. Eine normale menschliche Zelle besitzt 46 dieser Chromosomen [49].

1.3.3 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung

Schäden an der DNA spielen eine Schlüsselrolle bei der Reaktion von Zellen auf ionisierende Strahlung [50]. Ionisierende Strahlung kann einerseits Ionisationseffekte im DNA Molekül direkt erzeugen, was zum Aufbrechen der Molekülverbindungen führen kann. Dies wird als „direkter Effekt“ bezeichnet. Andererseits können auch hoch reaktive OH-Radikale durch Radiolyse der das DNA Molekül umgebenden Wassermoleküle entstehen. Diese Radikale haben während ihrer Lebenszeit, eine Reichweite von wenigen Nanometern und können die DNA Moleküle schädigen. Dies wird als „indirekter Effekt“ bezeichnet [44].

In Abbildung 1.8 sind die wichtigsten DNA Schäden, die durch ionisierende Strahlung erzeugt werden können, dargestellt. Da die Informationen der DNA in zwei Strängen komplementär vorliegt, können Schädigungen, die einen Strang betreffen, wesentlich einfacher durch die Benutzung der Information des intakten Stranges repariert werden. Bei Doppelstrangbrüchen (DSB) ist dies nicht so leicht möglich und diese sind daher weitaus schwieriger zu reparieren [51, 52]. DSB sind deshalb die kritischeren Schäden und können z.B. zu Apoptose (Zelltod), Mutationen, Chromosomenaberrationen und Krebs führen [53].

Durch die inhomogene Dosisverteilung nach Ionenbestrahlung (Kapitel 1.3.1) erzeugen Ionen ein sehr komplexes, dichtes und schwer zu reparierendes DNA Schadensmuster entlang ihrer Trajektorie [54, 55]. Durch die gezielte Bestrahlung mittels der Mikrosonde kann der Ort dieser schweren DNA-Schädigungen gewählt werden, was eine Vielzahl von Experimenten erlaubt (Kapitel 4).

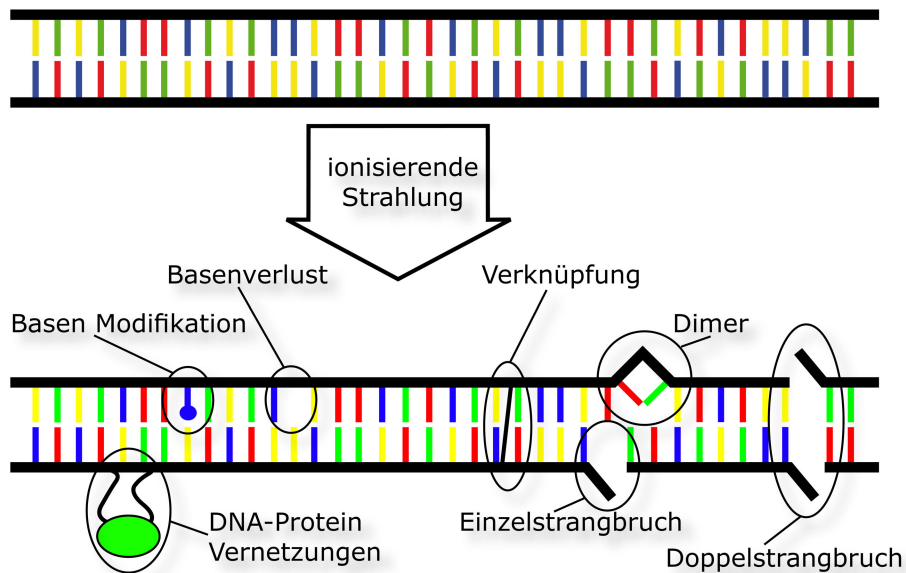


Abbildung 1.8: Strahlungsinduzierte DNA Schädigungen: Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung können eine Vielzahl von DNA-Schäden entstehen. Diese reichen von Basenveränderungen (Basenmodifikationen, Basenverlust, Bildung von Dimeren) über Einzel- und Doppelstrangbrüche und weiteren Veränderungen (z.B. Verknüpfung zwischen Strängen oder DNA-Protein Vernetzungen) und müssen repariert werden [53]. Die DNA-Doppelhelix zur Vereinfachung linear gezeigt.

1.4 Analyse von fluoreszenzmarkierten Proteinen mittels FRAP

Durch die erfolgreiche Klonierung 1992 [56] und die Expremierung in anderen Organismen 1994 [57, 58] des schon 1962 [59] beschriebenen grün fluoreszierenden Proteins (GFP) haben sich die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungsmöglichkeiten extrem stark erweitert [60]. Durch die große Bandbreite der nun verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffe und der nun markierbaren Proteine [61] hat das Interesse an der Analyse von Proteindynamiken in Zellkernen in den letzten Jahren stark zugenommen [62].

FRAP (engl. Fluorescence Recovery after Photobleaching) ist eine Methode um Molekülbewegungen in lebenden Zellen zu messen. Diese wurde erstmals in den 70er Jahren angewandt um die Molekülbewegungen in Zellmembranen zu bestimmen [63, 64] und wird seit der Verfügbarkeit der großen Bandbreite an Fluoreszenzmarkern in lebenden Zellen verwendet [65]. FRAP basiert darauf, in lebenden Zellen, in denen an dem zu untersuchendem Protein ein fluoreszierender Farbstoff angebracht ist, bestimmte Bereiche durch einen intensiven und fokussierten Laserstrahl zu Bleichen (Abbildung 4.16 (1)) und im Anschluss durch Messung der Fluoreszenz innerhalb dieses Bereiches die Proteinmobilität zu erhalten (Abbildung 4.16 (2)) [66]. Durch Messung der Fluoreszenzintensität innerhalb des gebleichten Berei-

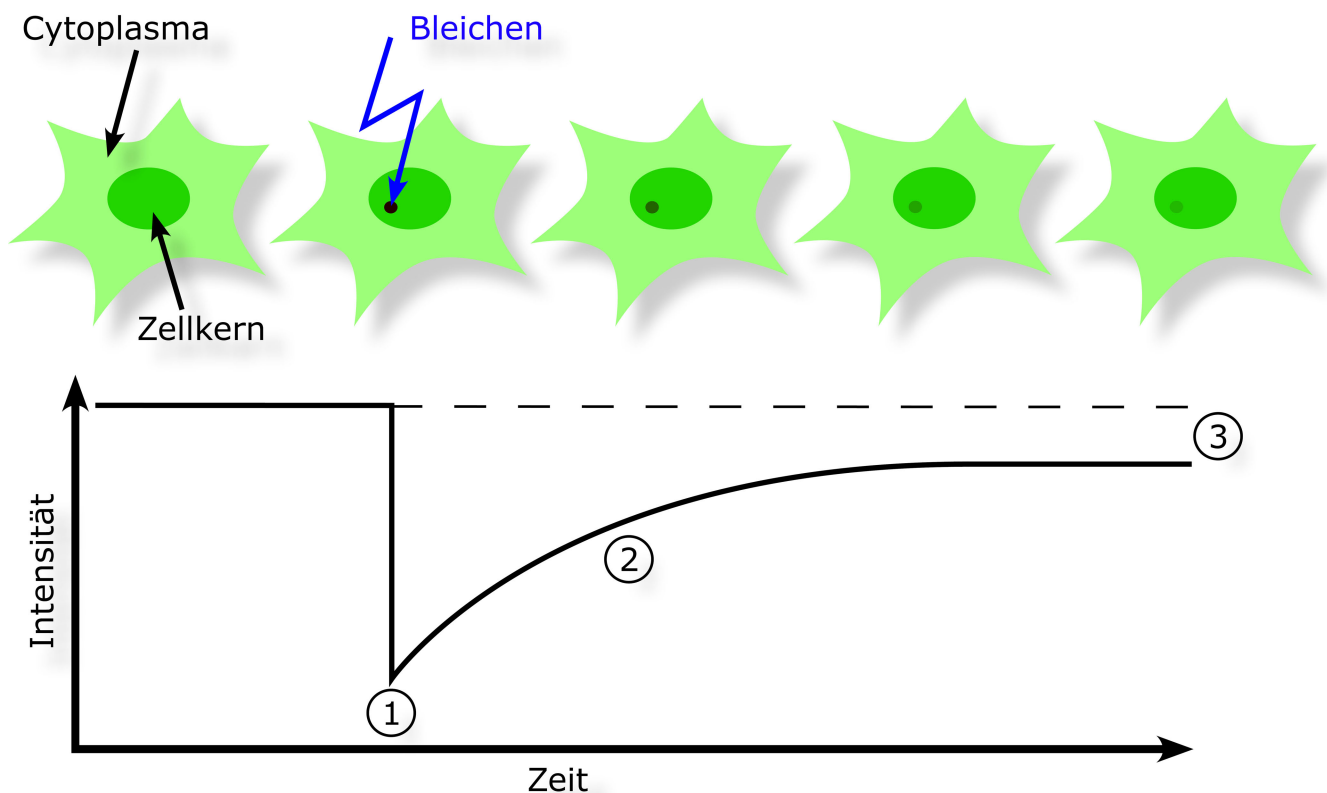


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der FRAP Messmethode: Die oberen Darstellungen zeigen zunächst eine Zelle, die ein GFP markiertes Protein exprimiert (dunkelgrün). Ein kleiner ausgewählter Bereich innerhalb des Zellkerns wird gebleicht (schwarz). Die folgenden Bilder zeigen den sich durch Austausch mit ungebleichten Proteinen ergebenden Anstieg in der Intensität. Bei Betrachtung der Intensität dieses kleinen Bereiches über die Zeit ergibt sich der im Diagramm gezeigte Verlauf, mit Bleichen (1), Austausch mit ungebleichten Proteinen (2) und gegebenenfalls Erreichen einer Plateauregion (3).

ches als Funktion der Zeit lässt sich der Fluß von gebleichten, nicht fluoreszierenden Proteinmolekülen aus diesem Bereich heraus, sowie der Fluß von ungebleichten, fluoreszierenden Proteinmolekülen in diesen Bereich hinein bestimmen (nähere Beschreibung in Kapitel 4.4.2). Damit können die Diffusions- und Bindungseigenschaften (z.B. Diffusionskonstanten, Bindungsraten, Dissoziationsraten, mobile/immobile Fraktionen) ermittelt werden (Abbildung 4.16 (3)).

Bei Belichtung des Fluorophors wird dieses in einen angeregten Zustand gebracht, in dem es chemisch extrem reaktiv ist. Die Lebenszeit in diesem Zustand beträgt z.B. für GFP nur 1 - 10 ns [67, 68], wodurch nur eine geringe Wahrscheinlichkeit zur chemischen Interaktion existiert. Durch die typische intensive FRAP Belichtung im ms-Bereich (Kapitel 3.1.1) ergeben sich jedoch so viele Anregungen, dass das Fluorophor mit hoher Wahrscheinlichkeit eine chemische Reaktion vornimmt und somit sein Fluoreszenzvermögen irreversibel verliert. Dieser Prozess wird als Bleichen bezeichnet. Das GFP Molekül besitzt die vorteilhafte Eigenschaft, dass diese chemische Reaktion tendenziell innerhalb des Moleküls abläuft und somit eine Veränderung anderer Moleküle vermieden werden kann [69].



2 Erweiterungen des Bestrahlungsaufbaus für Radiobiologie

2.1 Integrierung eines Wasserimmersions-Objektivs

Das Mikroskop wurde ursprünglich entwickelt um Zellkerne vor der Ionenbestrahlung zu lokalisieren [27], wobei die Analyse ex-situ erfolgte [12, 70, 71]. Da Zellkerne typische Durchmesser von 5-20 μm besitzen, konnte auf eine hohe Auflösung verzichtet werden zu Gunsten eines großen Sichtfelds (entsprechend der maximalen Ablenkung des Ionenstrahls) und eines maximalen Arbeitsabstands der Objektive (zum schnellen Probenwechsel) [27].

Um erste in-situ Untersuchungen vornehmen zu können wurde das Mikroskop erweitert, so dass eine Aufnahme von aufeinanderfolgenden Bildreihen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen möglich ist [28]. Dabei war die räumliche und zeitliche Auflösung (20x Vergrößerung, 0,6 numerische Apertur) ausreichend, da in diesen Messungen Ca^{2+} Konzentrationen in der gesamten Zelle (auch Zytoplasma) beobachtet wurden und der verwendete Farbstoff sehr leuchtstark war [72].

Die Integration einer LED-Lichtquelle ermöglichte die Aufnahme von Bildfolgen, durch das Entfallen mechanischer Farbfilter, zu beschleunigen und die thermische Stabilität des Systems durch Vermeidung der Hg-Hochdrucklampe zu erhöhen [36, 73]. Einige Verbesserungen, wie die Reduzierung des Fluoreszenz-Untergrundes [39] und die Herstellung der gleichwertigen optischen Dicke von Zellgefäß

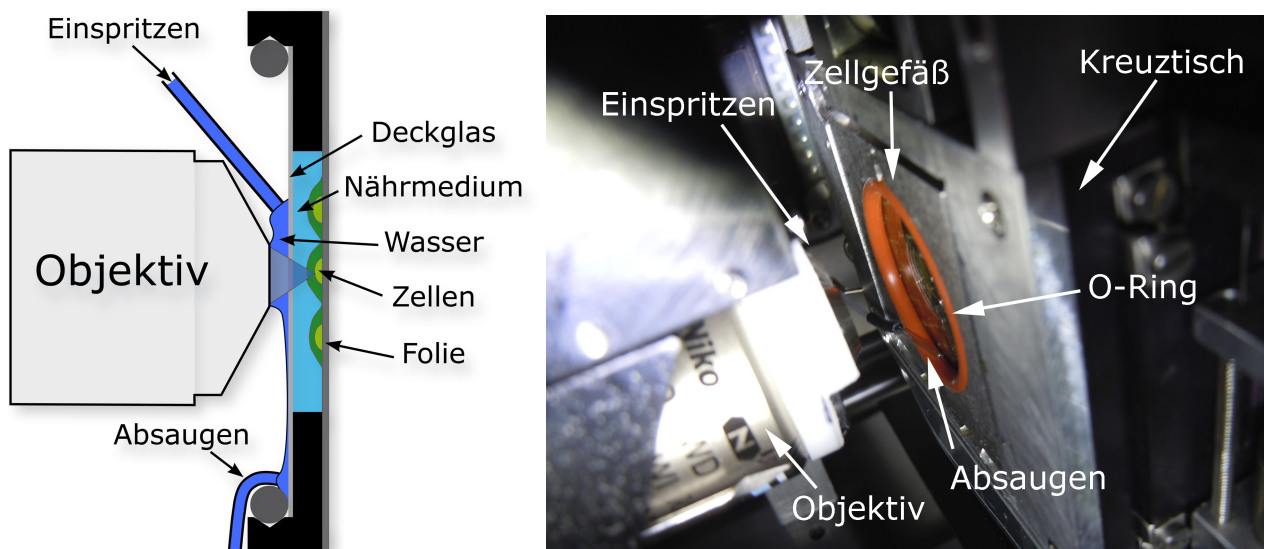


Abbildung 2.1: Integriertes Wasserimmersion-Objektiv. Links: Schematische Darstellung des Wasserimmersion-Objektivs und der Aufbau bedingten notwendigen Komponenten. Rechts: Aufnahme des eingebauten Wasserimmersion-Objektivs, neuem Zellgefäßes und der Halterung für Kreuztisch, sowie Einspritz und Absaugvorrichtung.

und Kalibrationsszintillator [38] ermöglichten schließlich die gezielte Bestrahlung von etwa $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ kleinen sub-nuklearen Bereichen [74, 75, 76]. Hierbei wurde eine Treffergenauigkeit von unter $1\ \mu\text{m}$ erreicht. Bei diesen Experimenten war jedoch die zeitliche und/oder räumliche Auflösung für eine in-situ Beobachtung nicht ausreichend. Damit dies möglich ist und um weitere Experimente durchzuführen, welche eine direkte Beobachtung nach Ionenbestrahlung benötigen, ist eine Verbesserung des vorhandenen Mikroskops nötig.

Zur Verbesserung der zeitlichen und räumlichen Auflösung bei der Aufnahme von Bildern bzw. Bildsequenzen ist die Verwendung eines Immersionsobjektivs mit einer hohen numerischen Apertur unumgänglich. Als Immersionsmedium ist Wasser Öl vorzuziehen, da die Mikroskopie durch das wässrige Zellmedium geschehen muss und somit der Brechungsindexunterschied zum Immersionsmedium reduziert wird. Desweiteren muss vermieden werden, dass die Bewegung des im Kreuztisch eingespannten Zellgefäßes auf das unbedingt fixiert zu haltende Objektiv übertragen wird, andernfalls geht die Kalibration zwischen Ionenstrahl und Mikroskop verloren (Kapitel 1.2.4). Je viskoser das Immersionsmedium, desto größer die Kraft auf das Objektiv.

In Abbildung 2.1 ist links die schematische Zeichnung und rechts eine Aufnahme des Aufbaus dargestellt. Das Wasserimmersions-Objektiv CFI Apochromat Lambda S LWD 40XW (Nikon Corporation, Japan) besitzt sowohl eine hohe numerische Apertur ($NA = 1,15$), als auch einen relativ langen Arbeitsabstand von $600\ \mu\text{m}$ (Immersionfilm, Deckglas und Nährmedium müssen durchquert werden). Einhergehend mit dem Objektiv sind einige Anpassungen am Aufbau notwendig: Die ursprünglichen Zellgefäße ($20 \times 20\ \text{mm}^2$ Größe) müssen durch größere Zellgefäße ($40 \times 40\ \text{mm}^2$ Größe, Abbildung 2.2) ersetzt werden, damit ein Verfahren des Kreuztisches ohne Kollision von O-Ring und Objektiv möglich ist. Damit einhergehend ist, wie in Abbildung 2.1 links dargestellt, eine vergrößerte Zellgefäß-Halterung am Kreuztisch angebracht. Durch den horizontalen Strahlverlauf bedingt, muss ständig Wasser durch einen PVC Schlauch eingespritzt und im unteren Bereich durch eine gebogene Glaskapillare abgepumpt werden [77].

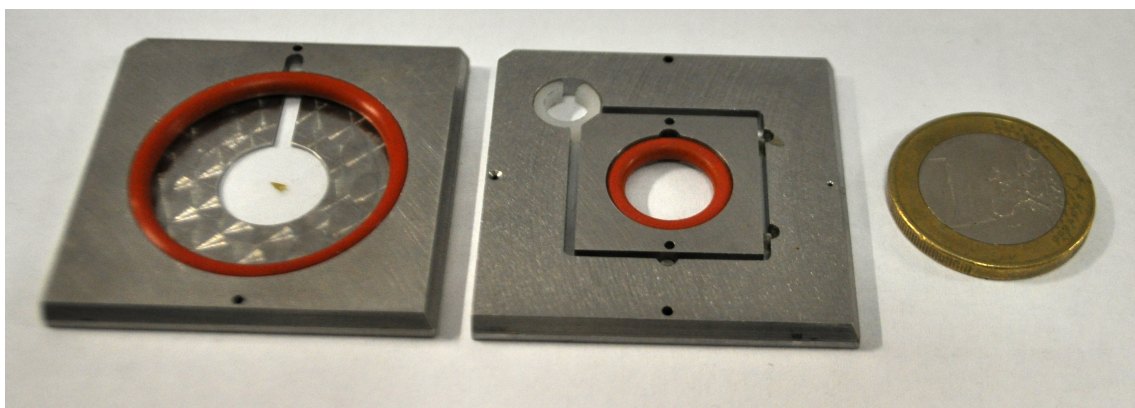


Abbildung 2.2: Links: Neues Zellgefäß mit einer Größe von $40 \times 40\ \text{mm}^2$. Rechts: Altes Zellgefäß ($20 \times 20\ \text{mm}^2$) in Adapter. Euromünze zum Größenvergleich.

Räumliche Auflösung

Die theoretische Auflösungsgrenze ist gegeben durch die Abbesche-Auflösungsgrenze d [78]:

$$d = \frac{1,22 \cdot \lambda}{2 \cdot NA} \quad (2.1)$$

Wobei NA die Numerische Apertur und λ die Wellenlänge des einfallenden Lichtes ist. Damit ergibt sich für unseren Fall mit einer Wellenlänge λ von 488 nm und NA von 1,15 eine maximale Auflösungsgrenze von ungefähr 260 nm. Experimentell kann dies gemessen werden indem Objekte abgebildet werden, die unterhalb der Auflösungsgrenze sind. Zu diesem Zweck sind fluoreszierende Nanosphären (TransFluoSpheres, Life Technologies GmbH, Deutschland), welche eine Größe von 200 nm besitzen und somit als Punktquellen angesehen werden können, bestens geeignet. In Abbildung 2.3 links ist ein Ausschnitt

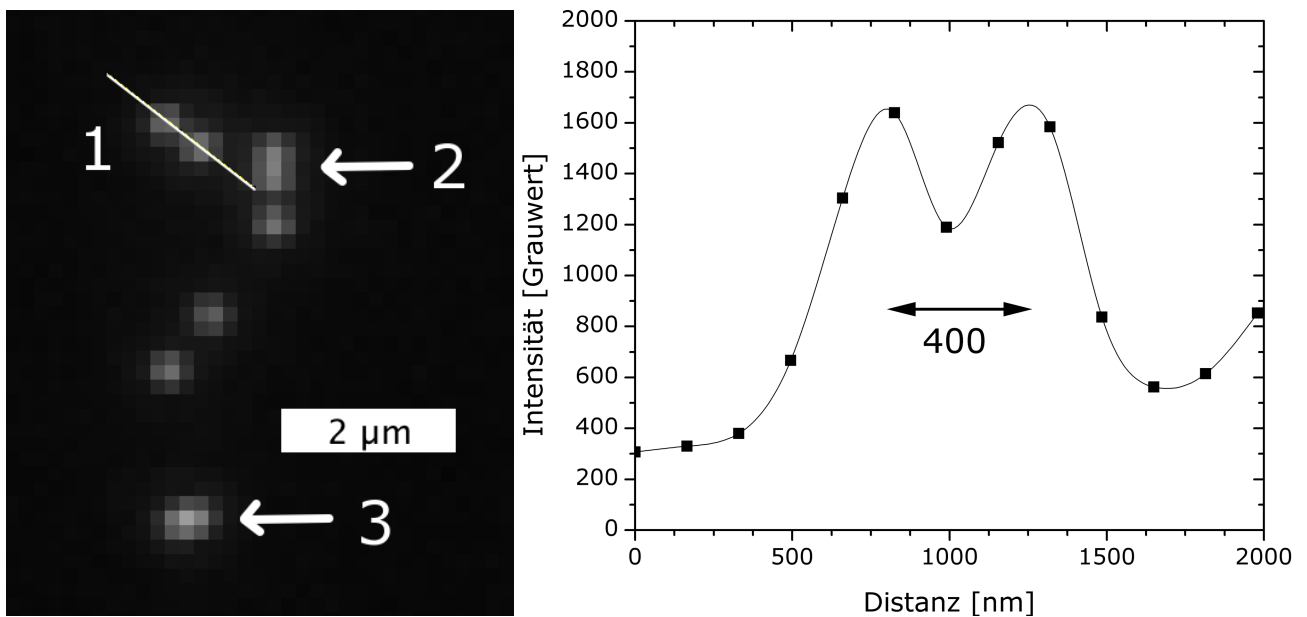


Abbildung 2.3: Messung der räumlichen Auflösungsgrenze. Links: Aufnahme eines Fluoreszenzbildes von 200 nm Nanosphären in Zellgefäß. Der Abstand zwischen zwei Objekten variiert zwischen leicht auflösbar (1), an der Auflösungsgrenze (2) und nicht mehr auflösbar (3). Rechts: Linienprofil entlang der im linken Bild gezeigten Linie (1) und einer damit einhergehenden Auflösung kleiner 400 nm.

gezeigt, der mehrere Nanosphären enthält, deren Abstand variiert.

Zu sehen sind Abstände die gut (1), schwer (2) und nicht (3) aufgelöst werden können. Abbildung 2.3 rechts zeigt ein Linienprofil für die beiden Nanosphären (1), bei dem sich beide Objekte noch trennen lassen, womit sich eine Auflösung von besser als ungefähr 400 nm ergibt.

Zeitliche Auflösung

Neben der verbesserten Bildqualität ist, besonders im Hinblick auf in-situ Experimente in Kapitel 4.4.1, die zeitliche Auflösung und die Belichtungszeit zur Aufnahme eines Fluoreszenzbildes wichtig. Die Aufnahmezeit ist extrem experimentabhängig. Die Helligkeit I eines Bildfeldes ist abhängig von NA und Vergrößerung M :

$$I \propto \frac{NA^4}{M^2} \quad (2.2)$$

Das zuvor verwendete Leica N Plan L Objektiv (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) besitzt eine NA von 0,55 und eine Vergrößerung von 40x. Das neue Objektiv besitzt eine NA von 1,15 und ebenfalls eine Vergrößerung von 40x. Es zeigt sich jedoch, dass die reale Bildgröße, und damit die Vergrößerung des Gesamtsystems (Objektiv und Tubuslinse), beim zuvor verwendeten Leica Objektiv 0,8x kleiner als die des neuen Wasserimmersions-Objektivs ist. Dies kommt durch die herstellerepezifischen Tubuslinsen zustande. Damit ergibt sich:

$$\frac{I_{neu}}{I_{alt}} = \frac{NA_{neu}^4}{NA_{alt}^4} \cdot \frac{M_{alt}^2}{M_{neu}^2} = 0,64 \cdot \frac{NA_{neu}^4}{NA_{alt}^4} = 12 \quad (2.3)$$

Damit ergibt sich eine Verbesserung der Helligkeit um einen Faktor 12 und damit auch eine theoretische Belichtungszeitreduzierung auf 1/12 der zuvor benötigten Zeit.

Eine genaue experimentelle Messung der Belichtungszeit mit Zellen ist schwierig, da eine Vielzahl von Faktoren die Belichtungszeit beeinflussen und diese stark schwanken kann. Jedoch zeigt sich bei Aufnahmen von HeLa H2B-GFP Zellen (Kapitel 4.1), dass die Belichtungszeit eines Bildfeldes mit neuem Objektiv ungefähr auf 1/10 reduziert werden kann gegenüber der Messung mit dem altem Objektiv.

Treffergenauigkeit Mikrosonde

Um festzustellen, ob die Modifikationen am Aufbau (Einspritzen und Absaugen von Wasser, größere Zellgefäße, größere Halterung am Kreuztisch, etc.) einen Einfluss auf die Treffergenauigkeit haben, wurden gezielte Bestrahlungen von Zellkernen quantitativ auf die Abweichung von angezieltem gegenüber getroffenem Ort ausgewertet. Die Visualisierung der getroffenen Position ist durch die Akkumulation von Reparaturproteinen am Schaden wenige Sekunden nach der Bestrahlung möglich. In Abbildung 2.4 ist links eine Aufnahme eines Zellkerns 5 s nach Ionenbestrahlung dargestellt. Die Kreuze markieren die Zielpositionen während die tatsächlich getroffenen Positionen durch einen erhöhten Helligkeitsgrad erkennbar sind. Es ist keine Veränderung der Treffergenauigkeit, die in Abbildung 2.4 (a) 670 nm mit einem Sigma von 400 nm ($N = 84$) beträgt, erkennbar [77].

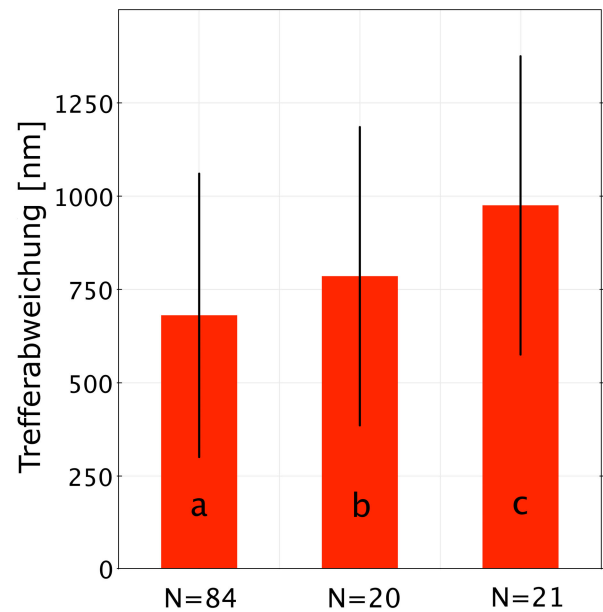
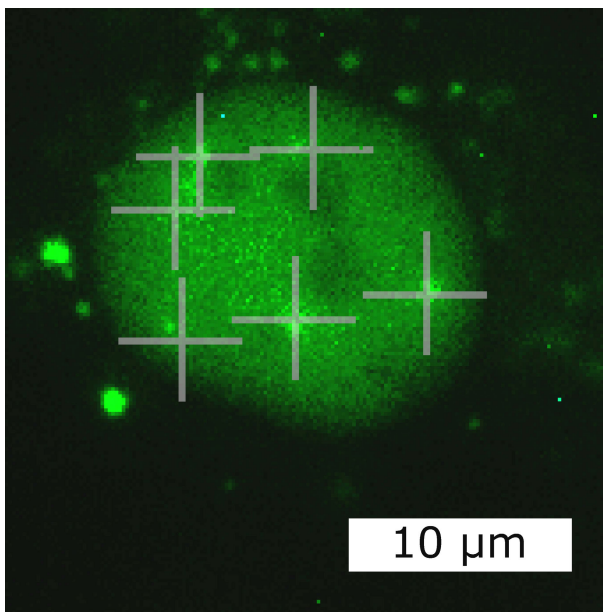


Abbildung 2.4: Einfluss des Wasserimmersion-Objektivs auf die Treffergenauigkeit der Mikrosonde. Linke Aufnahme zeigt die Akkumulation von Reparaturprotein Ku80-GFP am Schaden 5 s nach Bestrahlung mit 4,8 MeV/u Goldionen ($LET = 12900 \text{ keV}/\mu\text{m}$) in einem HeLa Zellkern. Die Kreuze kennzeichnen hierbei die anvisierten Bereiche. Rechts ist ein Graph dargestellt, der die Abweichung der anvisierten zur tatsächlichen Trefferposition der Ionen vergleicht. Dabei sind die Mittelwert der Trefferabweichungen und die Standardabweichungen für (a) den ursprünglichen Aufbau, (b) mit Immersionsobjektiv und (c) mit Trockenobjektiv und Adapter für kleine Kammern in neuer Halterung, gezeigt [77].

2.2 Einbau eines Piezo-Linearaktors

Durch die Integrierung des Wasserimmersions-Objektivs wurde die Auflösung des Mikroskops verbessert um auch tiefenaufgelöste Bilder aufzunehmen. Bisher wurde jedoch zum Probenwechsel und Fokussierung der gesamte optische Tisch gegenüber der Probenhalterung verschoben. Die sich dabei ergebende Hysterese erschwert insbesondere die Nachfokussierung, die besonders bei der in-situ Mikroskopie erforderlich ist.

Um eine geregelte hysteresefreie Fokussierung zu ermöglichen, wird ein Piezo-Linearaktor (P-601 PiezoMove Linearaktor, Physik Instrumente GmbH & Co KG, Deutschland) integriert, welcher durch seine Hebelwirkung wenig Platz benötigt und einen Verfahrweg von bis $100\ \mu\text{m}$ mit einer Auflösung im Nanometerbereich besitzt (Abbildung 2.5 links). Angesteuert wird dieser durch ein analoges Signal, welches an die Treiberelektronik (E-610, Physik Instrumente GmbH & Co KG, Deutschland) angelegt wird. Zum Verfahren wird ein mechanisches Dreh-Potentiometer (Abbildung 2.5 Mitte) verwendet. Durch die Integration des Piezo-Linearaktors in das Mikrosonden-Steuerungsprogramm ist auch eine automatisierte Bildaufnahme mit einstellbaren Tiefenschritten (z-Achse) möglich.



Abbildung 2.5: Integrierter Piezo-Linearaktor. Links: Eingebauter Piezo-Linearaktor. Mitte: Drehpotentiometer zur manuellen Einstellung. Rechts: Treiberelektronik mit Gehäuse.

Ergebnisse

Mauszellen haben die strukturelle Besonderheit (siehe Kapitel 4.4.1), dass perizentrosomale heterochromatische Bereiche dichter DNA akkumuliert werden, welche als Chromocenter durch DNA Färbung als helle Bereiche erkennbar sind (Abbildung 2.6 links). Durch Aufnahme einer Bildreihe mit 200 nm Abstand in der z-Achse, können Schnitte erzeugt werden in horizontaler (rote Linie) und vertikaler (blaue Linie) Richtung. Dabei zeigt sich das die Tiefenauflösung ausreicht um abgeschlossene Strukturen in der Tiefe aufzunehmen.

Durch Verwendung des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ [79] und des Plugins 3D Viewer lassen sich dreidimensionale Aufnahmen der Bereiche dichter DNA visualisieren. In Abbildung 2.6 rechts ist eine dieser Aufnahmen dargestellt. Hier lassen sich abgeschlossene Bereiche in unterschiedlichen Tiefen erkennen. Außerdem zeigen die Aufnahmen, dass die Form der Strukturen in Abhängigkeit der z-Richtung stark variiert und diese aufgelöst werden kann.

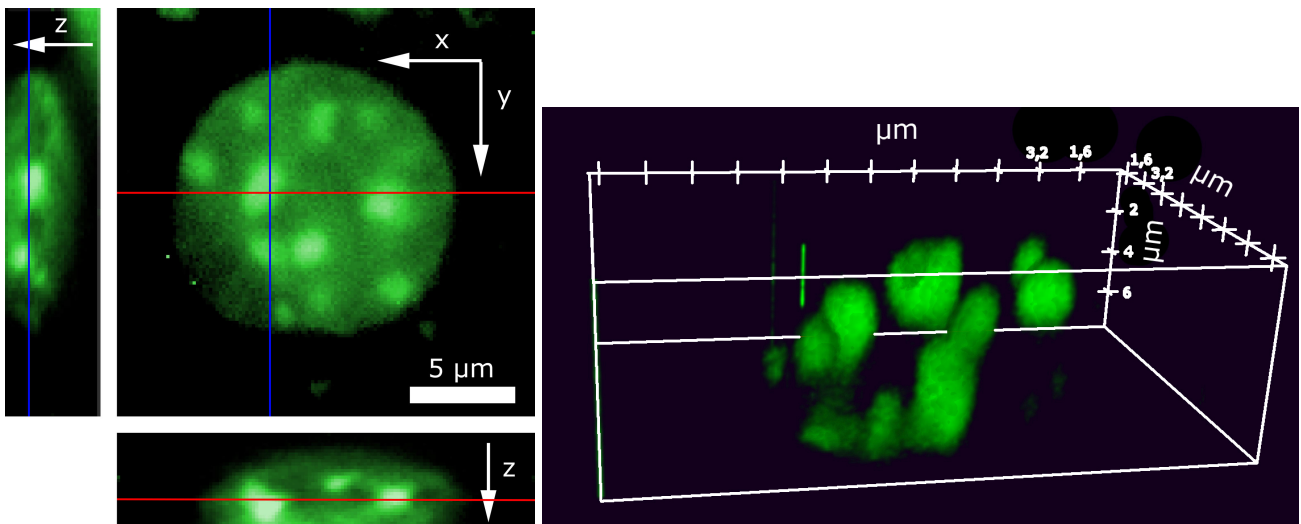


Abbildung 2.6: Tiefenaufgelöste Aufnahmen eines Mausellkerns (MEF Zellkern). Links: Aufnahmen der DNA Verteilung eines MEF Zellkerns (Hoechst-Färbung, siehe Kapitel 4.1) mit Schnitten in horizontaler (rote Linie) und vertikaler (blaue Linie). Rechts: Dreidimensionale Aufnahme der Bereiche mit hoher DNA Konzentration des links gezeigten Zellkerns mit erkennbaren tiefenaufgelösten Strukturen.



3 Aufbau und Integration eines Lasersystems

3.1 Anforderungen

Ziel ist es, ein Lasersystem zu entwickeln, dessen Strahl auf bestimmbare Bereiche innerhalb eines Zellkernes geleitet werden kann, um dort mittels Bleichen das Fluoreszenzverhalten von Fluophoren, welche an Reparaturproteinen gebunden sind, zu deaktivieren. Dieses System muss jedoch eine Vielzahl von Anforderungen sowohl biologischer, als auch technischer Natur genügen. Diese Anforderungen werden im Folgenden diskutiert.

3.1.1 Biologische Anforderungen

Von der biologischen Seite werden Wellenlänge, Intensität, Belichtungszeit und Größe des Laserfokus vorgegeben. All diese Parameter hängen von den verwendeten Fluophoren und dem damit durchzuführenden Experiment ab.

In den letzten Jahrzehnten wurden eine große Bandbreite von Fluophoren entwickelt, mit unterschiedlichsten Anregungs- und Emissionswellenlängen [61]. Hier ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) besonders hervorzuheben, welches früh beschrieben [80], aber erst ab Mitte der 90er [56] durch die Verfügbarkeit von Klonierungs- und Transfektionstechniken die Visualisierung einer Vielzahl von Proteinen ermöglichte [60]. Hinsichtlich der geplanten Experimente zum Bleichen von GFP bzw. dessen Variante EGFP (engl: Enhanced Green Fluorescent Protein) (Kapitel 1.4) sollte der Laser eine Wellenlänge von 488 nm besitzen, was einer der Anregungswellenlängen von EGFP [81] entspricht.

In Tabelle 3.1 ist eine Auflistung von typischen Parametern für FRAP Messungen zu sehen. Die meisten Lasersysteme für FRAP Untersuchungen mit 488 nm Anregungswellenlänge, verwenden einen Argon-Ionen-Laser mit einer Laserausgangsleistung zwischen 10 bis 30 mW. Diese Systeme sind oft kommerzielle Systeme, die auf ein jeweiliges Mikroskop und den damit verbundenen Strahlengang angepasst sind. Typische Fokusgrößen sind zwischen 1 - 2 μm zum Bleichen definierter Bereiche innerhalb eines Zellkerns (Kapitel 4.4.1). Belichtungszeiten variieren sehr stark und müssen experimentell bestimmt werden.

Laserausgangsleistung [mW]	Fokusgröße [μm]	Bleichzeit [ms]	Referenz
20	1	200 - 500	Phair et al. [82]
30	1	17	Sprague et al. [83]
20	1-2	50	Schmiedeberg et. al. [84]
15	1-2	keine Angabe	Ayoub et al. [85]

Tabelle 3.1: Übersicht einiger typischer Lasersystem-Parameter

3.1.2 Mikrosondenspezifische Anforderungen

Die Mikrosonde und der für biologische Untersuchungen entwickelte Mikroskop-Aufbau sind wie in Kapitel 1.2.2 erwähnt auf thermische und mechanische Stabilität optimiert. Diesen Kriterien soll auch das einzubringende Lasersystem genügen. So verbieten sich insbesondere für alle direkt in den Aufbau neu zu integrierenden Komponenten eine hohe Abwärme oder gar eine aktive Kühlung durch Lüfter oder Kühlmittelfluss.

Auch muss das Lasersystem in den Mikroskop-Aufbau und der damit verbundenen optischen Lichtführung integriert werden. Neben der Anforderung, einen räumlich und zeitlich definierbaren Laserfokus in der Probenebene zu erzeugen, was zweckmäßigerweise eine finale Fokussierung durch das Mikroskopieobjektiv bedingt, gilt als wichtige Randbedingung, dass der bildgebende optische Weg soweit wie irgend möglich unbeeinträchtigt bleiben soll. Das Einbringen von zusätzlichen Strahlteilern zwischen Objektiv und Kamera zur Einkopplung des Lasers hätte schließlich auch eine Reduktion des Lichtflusses auf die Kamera und damit längere Belichtungszeiten zur Folge.

Darüberhinaus ist eine Ansteuerung des Lasersystems notwendig, die in das Mikrosonden-Kontrollprogramm (Kapitel 1.2.3) integriert ist. Hier muss dafür gesorgt werden, dass die Position, die Intensität und die Belichtungsdauer des Bleichlaserfokus in den Ablauf eines Bestrahlungsexperiments sinnvoll eingefügt werden kann.

3.1.3 Laserauswahl

Zum Bleichen von Fluophoren mit Anregungswellenlängen von 488 nm werden wie oben erwähnt oft Argon-Ionen-Laser verwendet. Diese Laser haben jedoch den Nachteil eines sehr geringen Wirkungsgrads und damit einer intensiven Wärmeentwicklung und benötigen typischerweise eine aktive Kühlung. Beides führt jedoch zu thermischer Ausdehnung angrenzender, aufgeheizter Komponenten sowie mechanischer Vibration und kann somit systematische Fehler der Ionen-Treffergenauigkeit hervorrufen.

Faseroptische Trennung von heißem Ionenlaser und wärmeempfindlichem Mikroskop kann dieses Problem zwar vermeiden, eine elegantere Lösung ist jedoch der Einsatz von Diodenlasern, der hohe Stabilität und Intensität in unterschiedlichsten Wellenlängen zur Verfügung stellen. Der Diodenlaser iBeam smart (Toptica Photonics AG, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer maximalen Ausgangsleistung von 60 mW ist eines dieser Systeme und umgeht durch hohe Effizienz alle thermischen Probleme und ist durch passive Konvektion zu kühlen. Ebenfalls ist dieser Diodenlaser sehr kompakt und somit besser in das vorhandene Mikroskop



Abbildung 3.1: Diodenlaser iBeam smart

integrierbar. Darüberhinaus ist es möglich, die Intensität mittels Anlegen einer analogen Spannung zu regeln und durch Anlegen eines digitalen Signals den Laserstrahl an- bzw. auszuschalten [86]. Diese Ansteuerungsmöglichkeiten machen einen akustooptischen Modulator, der typischerweise bei FRAP Systemen mit Argon-Ionen-Lasern zur Intensitätsregelung verwendet wird, überflüssig.

3.2 Aufbau und Integrierung

In Abbildung 3.2 ist die grundsätzliche Funktionsweise des zu verwirklichenden Aufbaus dargestellt. Der Laserstrahl wird mittels eines Ablenkers nach Passieren einiger optischer Elemente in die Ebene des Zellkerns fokussiert. Gesteuert wird dies mittels einer Software die durch eine Datenerfassungskarte (DAQ-Karte) Laser und Ablenker anspricht.

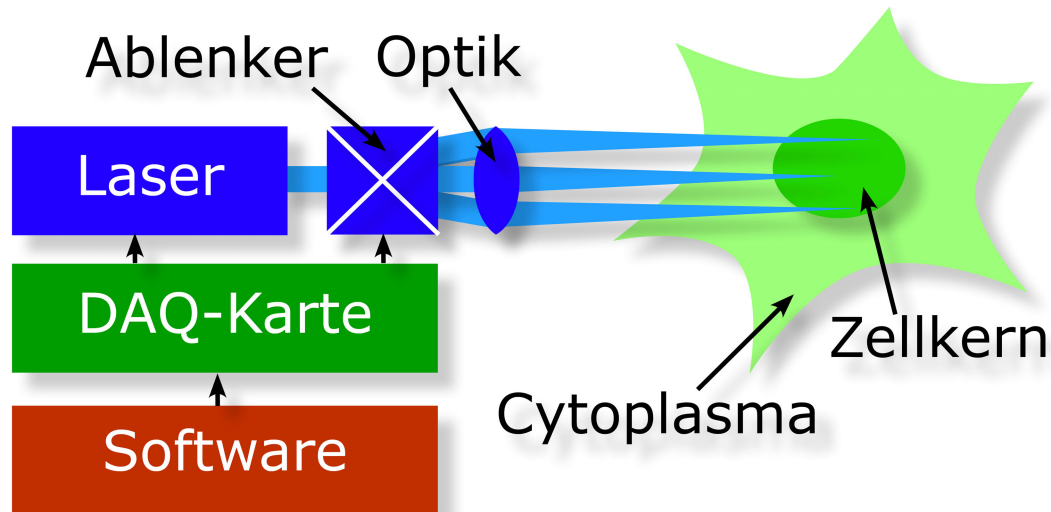


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der wichtigsten Elemente, die für die Belichtung bestimmter Bereiche innerhalb eines Zellkerns notwendig sind. Der Laserstrahl wird mittels eines Ablenkers und einiger optischer Elemente auf die Ebene des Zellkerns fokussiert und abgelenkt. Gesteuert wird dies mit einer Software die über eine Datenerfassungskarte (DAQ-Karte) Laser und Ablenker anspricht.

3.2.1 Einkopplungspfad des Lasers

Damit der Laserstrahl auf einen kleinen Bereich innerhalb eines Zellkerns fokussiert werden kann, muss der vorhandene Aufbau (Kapitel 1.2.1) berücksichtigt werden. Abbildung 3.3 zeigt schematisch den vorhandenen Aufbau und zusätzlich eine Möglichkeit zur Einkopplung des Lasers. Die Idee besteht darin, den durch den Diodenlaser erzeugten Laserstrahl mittels eines Ablenkers und einer Scanlinse in die Ebene der Feldblende zu fokussieren und abzulenken. Diese Feldblende wird durch Ausgangslinse und Objektiv auf die Zellebene abgebildet und definiert in der Zellebene den belichteten Bereich (Kapitel 2.1). Somit wird ein Laserstrahl, der auf die Ebene der Feldblende fokussiert wird, auf die Zellebene abgebildet. Die Einkopplung des Lasers in den Beleuchtungspfad der Epifluoreszenzlichtquelle erfolgt durch das Ersetzen des zuvor vorhandenen Spiegels durch einen Strahlteiler (im Vergleich zu Abbildung 1.5).

Neben der gezeigten Integrationsmöglichkeit gibt es auch die Möglichkeit zwischen multi-chromatischem Strahlteiler und Objektiv einzukoppeln, dieser Weg ist in kommerziellen Systemen weit verbreitet [87]. Von Vorteil ist dabei, dass außer dem Objektiv keine weiteren optischen Elemente des Mikroskops zur Laserabbildung berücksichtigt werden müssen, wodurch ein beugungslimitierter Laserfokus leichter erreicht werden kann. Der Nachteil besteht jedoch darin, dass diese Einkopplung ein

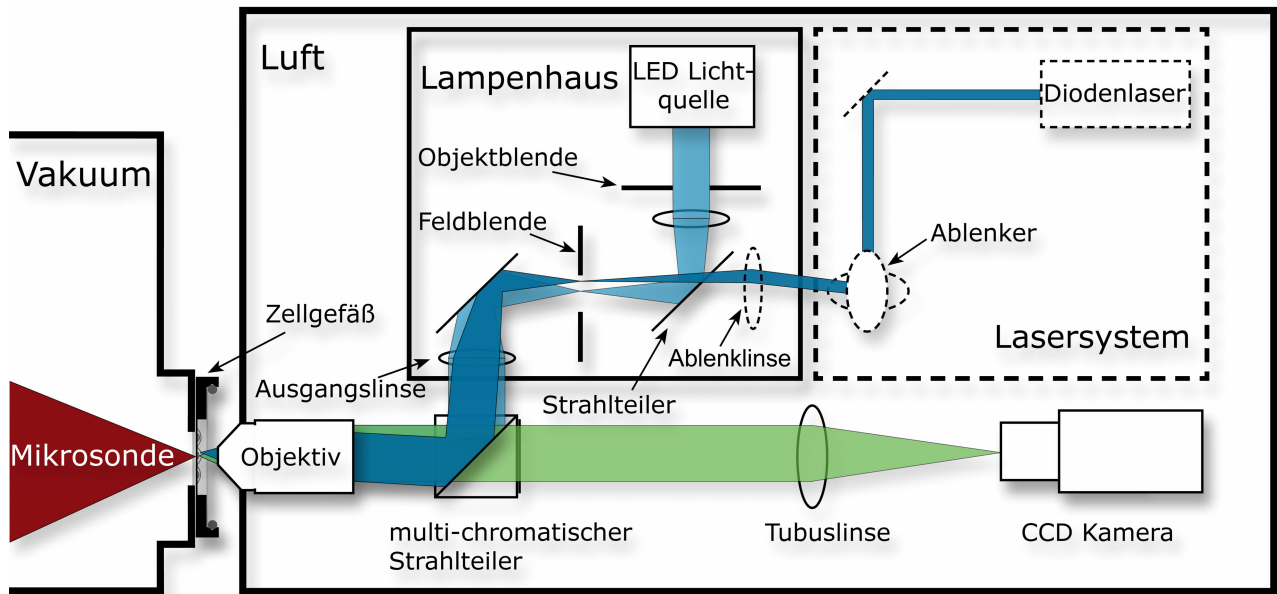


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des existierenden Mikroskopaufbaus (durchgezogene Linien) und der Lasererweiterung (gestrichelte Linien). Ebenfalls dargestellt ist der Anregungs- (hellblau) und Emissions-Lichtweg (grün) des Epifluoreszenz-Mikroskops und des Lasersystems (dunkelblau) für eine beispielhafte Auslenkung des Laser-Ablenkers.

optisches Element im bildgebenden Pfad des Mikroskops erfordert und dies zu einer Reduzierung des von den Zellen kommenden Emissionslichts führt. Für die geplanten Experimente ist kein beugungsbegrenzter Laserfokus notwendig (Kapitel 3.1.1). Auch ist Verlust des von den Zellen emittierten Lichts zu Gunsten zeitlicher Auflösung zu vermeiden, sodass eine Lasereinkopplung wie in Abbildung 3.3 ohne Beeinflussung des bildgebenden Pfades vorzuziehen ist.

3.2.2 Simulation des optischen Systems

Zur Umsetzung der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Idee ist es wichtig, die neuen optischen Elemente wie Ablenklinse und Ablenker so abzustimmen, dass diese in den bestehenden Aufbau passen und dabei der kleinstmögliche Laserfokus, bei maximaler Ablenkgenauigkeit, erreicht wird. Das Optik-Simulationsprogramm ZEMAX (Radiant Zemax LLC, USA) bietet die Möglichkeit den in Abbildung 3.3 gezeigten Strahlengang unter Berücksichtigung erhältlicher optischer Bauelemente und den gegebenen räumlichen Restriktionen strahlenoptisch zu simulieren (raytracing).

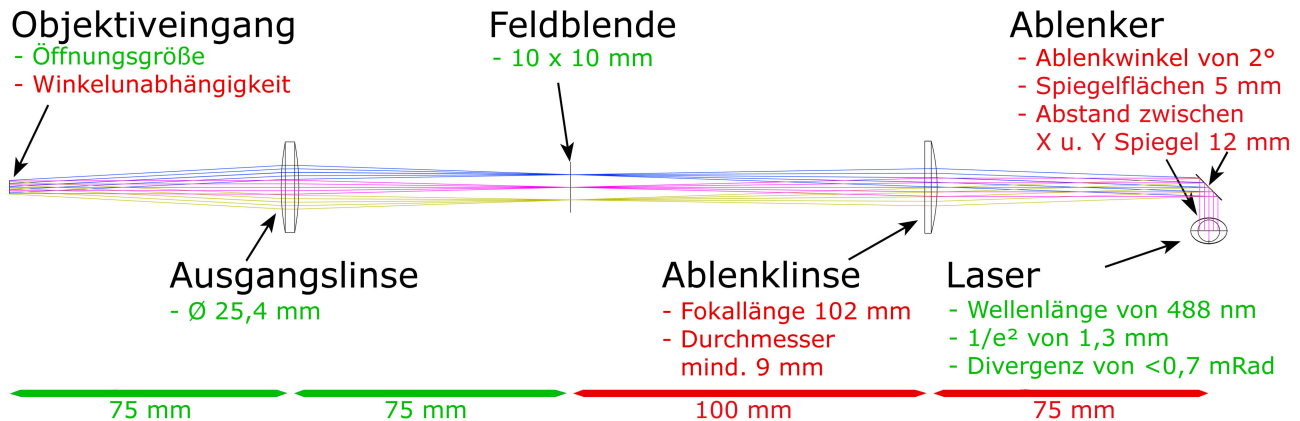


Abbildung 3.4: Simulation des Lichtweges bei unterschiedlichen Ablenkungen. Grün: Durch den Gesamtaufbau fixierte Randbedingungen. Rot: Durch Simulation zu bestimmenden Werte. Die unterschiedlich farbigen Strahlengänge entstehen bei unterschiedlichen Ablenkungswinkeln, wobei der Ablenkungswinkel jeweils um 2° variiert wird.

In Abbildung 3.4 ist eine Simulation des Lichtweges für mehrere Laserablenkungen zu sehen. Die durch den Aufbau vorgegebenen Randbedingungen sind in grün und die mit der Simulation bestimmten Werte in rot dargestellt. Objektiv, Ausgangslinse und Feldblende definieren durch Öffnungsgrößen und Abstände die wichtigsten Randbedingungen. Der Laserstrahl wird mittels Ablenklinse auf der Ebene der Feldblende fokussiert, wobei der Ablenker den Ort des Fokus bestimmt. Hinter der Feldblende läuft der Laserstrahl wieder auseinander und soll in der Ebene der Ausgangslinse diese nicht verlassen. Die Position der Ablenklinse und des Ablenkers muss dafür so gewählt werden, dass die optische Achsen der Strahlengänge zwischen Ablenklinse und Feldblende für alle Ablenkungswinkel möglichst parallel zueinander verlaufen. Bei Variation der Positionen von Ablenklinse, Ablenker und fokaler Länge der Ablenklinse ist zusätzlich darauf zu achten, dass der Laserstrahl für alle Ablenkungswinkel die Öffnung des Objektivs trifft.

3.2.3 Auswahl optische Elemente

Ausgehend von den durchgeführten Simulationen und den somit erhaltenen Parametern wurden folgende Elemente ausgewählt:

Ablenksystem

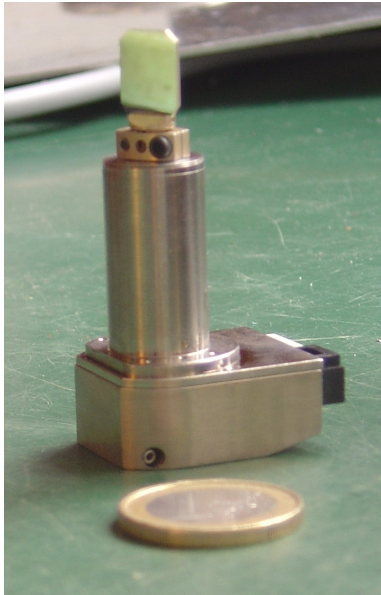


Abbildung 3.5: Galvanometerspiegel

Zur Ablenkung des Laserstrahl ist das Ablenksystem QuantumScan-7 (Nutfield Technology Incorporation, USA) bestens geeignet. Es besteht aus zwei Galvanometern, an denen jeweils ein Spiegel befestigt ist (Abbildung 3.5). Dadurch kann der Laserstrahl um die beiden Galvanometer-Längsachsen rotiert werden. Durch zueinander rechtwinklige Fixierung dieser Längsachsen und geringstmöglichen Abstand der beiden Spiegelflächen lässt sich im Zusammenspiel mit der Ablenklinse ein annähernd rechtwinkliges Koordinatensystem nahezu ohne Übersprechen zwischen den beiden Achsen erzeugen. Es sind unterschiedlich große Spiegelflächen mit unterschiedlichen Beschichtungen verfügbar. Die Größe der Spiegelfläche, und damit das zu rotierende Trägheitsmoment, beeinträchtigt dabei die Zeit bis die gewünschte Ablenkung erreicht ist. Eine Spiegelfläche von 5 mm ist mehr als ausreichend, damit bei maximaler Ablenkung von $\pm 2^\circ$ der Laserstrahl vollständig von der zweiten Spiegelfläche reflektiert werden kann. Mit einer Positionierzeit von $200 \mu\text{s}$ [88] besitzt der Ablenker im Vergleich zu den zu erwartenden Belichtungszeiten im Bereich einiger Millisekunden eine ausreichende Geschwindigkeit.

Ablenklinse

Um sphärische Aberrationen zu vermeiden werden in Aufbauten, in denen der Laserfokus über eine Fläche abgelenkt werden muss, häufig F-Theta oder telezentrische Linsensysteme verwendet. Diese sind oft für eine Wellenlänge ausgelegt und besitzen ein Linsensystem, mit dem ein großer Ablenkwinkel mit minimalen sphärischen Aberrationen möglich ist. Jedoch besitzen diese eine Größe, die die Integration in den vorhandenen Aufbau schwierig macht.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung einer asphärischen Linse, die ebenfalls die sphärischen Aberrationen minimiert, und die hier verwendet wird (gepresste Asphärische Linse aus Acryl F48-179, Edmund Optics GmbH, Deutschland). Der Nachteil einer einfachen Ablenklinse ist jedoch, dass zur Auslenkung des Lasers in der Feldblende, gegenüber den komplexeren Systemen, wesentlich kleinere Ablenkwinkel zustandekommen. Die durchgeführten Simulationen haben einen maximalen gesamten Ablenkwinkel von 4° (70 mrad) ergeben (Kapitel 3.2.2). Der Ablenker besitzt eine Genauigkeit von $20 \mu\text{rad}$ [88], was somit eine theoretische Auflösung von 3500 Punkten für jede Achse ergibt. Dies be-

deutet bei Mikroskopaufnahmen mit 1392 x 1024 Pixel, dass die Auflösung des Lasersystems mehr als ausreichend ist.

Strahlteiler

Damit der Laserstrahl in den Strahlengang des Epifluoreszenzmikroskopes integriert werden kann, muss der Spiegel zwischen Ablenklinse und Feldblende durch einen Strahlteiler ersetzt werden (Abbildung 3.3). Um möglichst wenig des LED-Anregungslichts zu verlieren und in Anbetracht der Laserleistung ist der Einsatz eines 90/10 Strahlteiler (Chroma Technology Corporation, USA), mit 10% Transmission des Laserlichts, ausreichend.

3.2.4 Mechanischer Aufbau

In Abbildung 3.6 sind technische Zeichnungen, erstellt mit AutoCAD Mechanical 2007 (Autodesk Incorporation, USA) des Lasersystems und des vorhandenen Mikroskopaufbaus, dargestellt. In der oberen Abbildung ist eine Aufsicht der mechanischen Umsetzung der zuvor beschriebenen Elemente zu sehen. In der unteren Abbildung ist eine zum Teil dreidimensionale Darstellung gezeigt. Dabei sind die für das Lasersystem hinzugekommenen oder ersetzten (Strahlteiler) Komponenten dreidimensional und die verbliebenen Komponenten zweidimensional dargestellt. Hier ist auch zu erkennen, dass sich Ablenklinse, Strahlteiler und die jeweiligen Halterungen im Lampenhaus befinden. Ebenfalls ist ein Strahlengang für eine Ablenkung in rot dargestellt.

3.2.5 Elektronische Steuerung

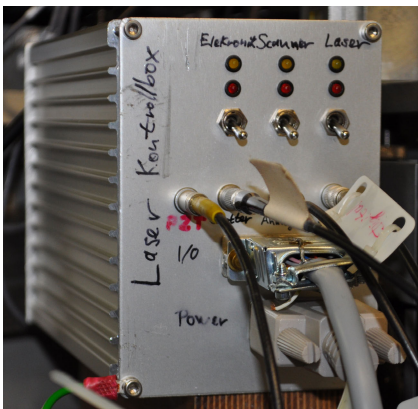


Abbildung 3.7: Gehäuse für Komponenten des Lasersystems

Zur Steuerung von Ablenker und Laser ist die Datenerfassungskarte (DAQ-Karte) NI-6733 (National Instruments Corporation, USA) bestens geeignet. Durch die Möglichkeit sowohl digitale, als auch analoge Signale auszugeben, kann der Diodenlaser mittels eines digitalen Signals an- und ausgeschaltet und durch Anlegen einer analogen Spannung die Intensität eingestellt werden [86].

Der Ablenker und die dafür notwendige Treiberelektronik QuantumDrive-4000 (Nutfield Technology Incorporation, USA) werden mit analogen Signalen angesteuert.

Da die Messhütte, von der aus die Mikrosondenbestrahlung gesteuert wird, und der Messplatz aus strahlenschutztechnischen Gründen getrennt sind, werden die DAQ-Steuersignale zunächst in eine „Laser-Kontrollbox“ geleitet, die die Ablenker-Treiberelektronik beinhaltet und deren Ausgangssignale dann auf kürzestmöglichem Weg an den Ablenker geleitet werden.

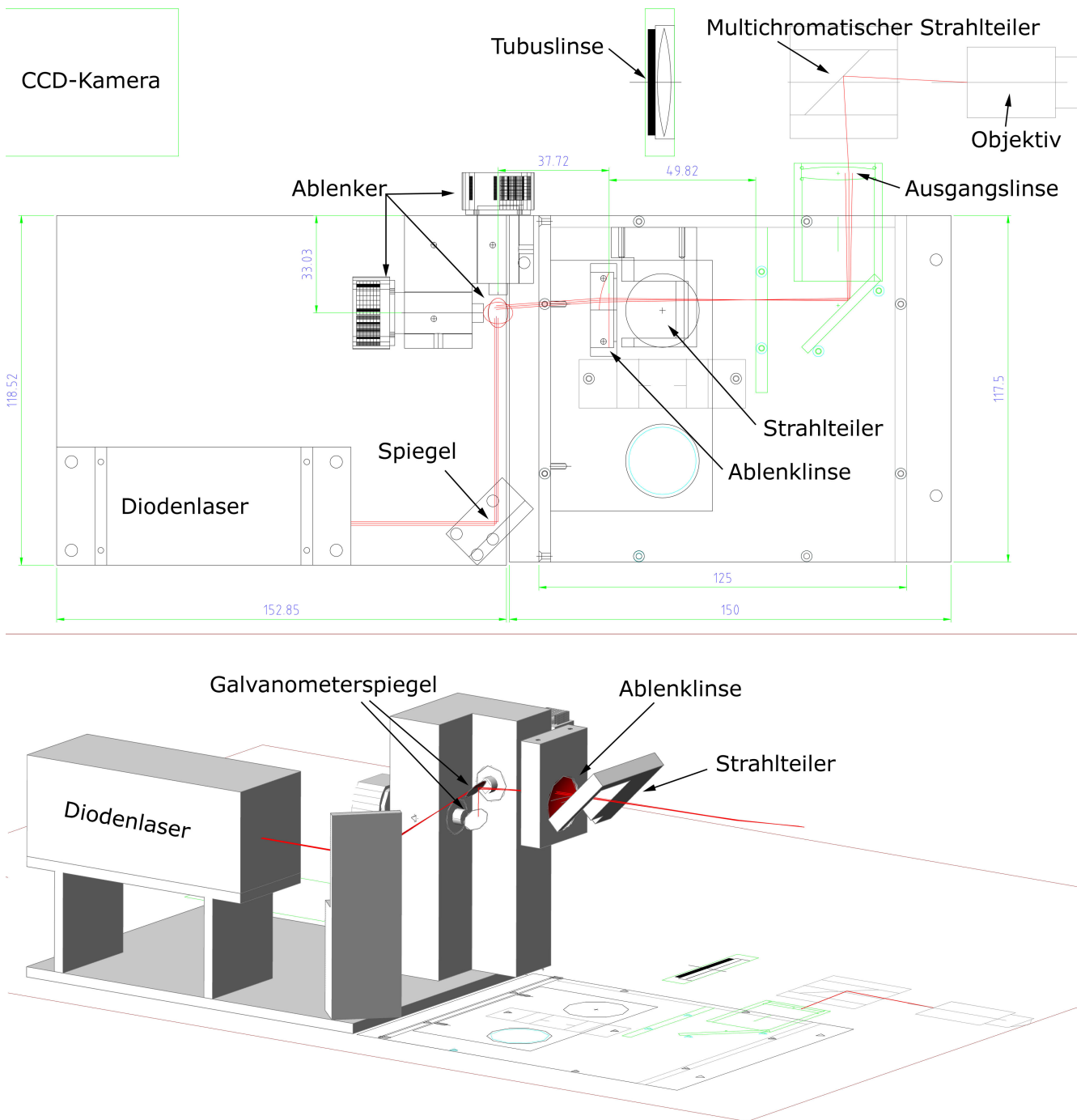


Abbildung 3.6: Oben: Technische Zeichnung des Mikroskopaufbaus und des Lasersystems (Aufsicht). Unten: Dreidimensionale Darstellung der für das Lasersystem notwendigen Komponenten, wobei dreidimensional alle neuen, zu verändernden Komponenten mit Halterungen und zweidimensional alle unveränderten Komponenten dargestellt sind.

3.2.6 Laser Kontrollprogramm

Zur Steuerung des Lasersystems ist eine Integrierung in das Mikrosonden-Steuerungsprogramm (Abschnitt 1.2.3) am sinnvollsten. Dadurch können zum einen die Routinen des Bildverarbeitungsprogrammes verwendet werden (z.B. für eine automatische Kalibration) und zum anderen können Experimente, in denen sowohl Laserstrahl, als auch Ionenbestrahlung benötigt werden besser koordiniert werden. In Abbildung 3.9 sind alle Dialogfenster (rechteckige Umrandung), die wichtigsten Routinen (runde Umrandung) und Hardware-Komponenten (gestrichelte rechteckige Umrandung) des Steuerungsprogramms dargestellt. Die Integration des Lasersystems in das Steuerungsprogramm gliedert sich in drei Schritte. Der erste ist die Erweiterung der Schnittstelle zwischen Image-Pro Plus und den Mikrosonden-Kontrollprogramm, damit ein Laserdialogfenster zur Lasersteuerung erzeugt werden kann. Die Erzeugung eines Dialogfensters und eines Laser Kontrollprogramms mittels dessen Nutzer Eingaben vornehmen und den Laser steuern kann, stellt den zweiten Schritt dar. Der dritte Schritt besteht darin, die zur Steuerung des Lasersystems notwendigen Routinen zu erzeugen und in das Steuerungsprogramm zu integrieren.

Erweiterung der Schnittstelle Image-Pro Plus und Mikrosonden-Steuerungsprogramm

Die Schnittstelle zwischen Image-Pro Plus und Mikrosonden-Steuerungsprogramm muss erweitert werden, damit ein weiterer Menüpunkt möglich ist. In Abbildung 3.8 ist dieser weitere Menüpunkt abgebildet, mit dem ein Dialogfenster geöffnet werden kann.

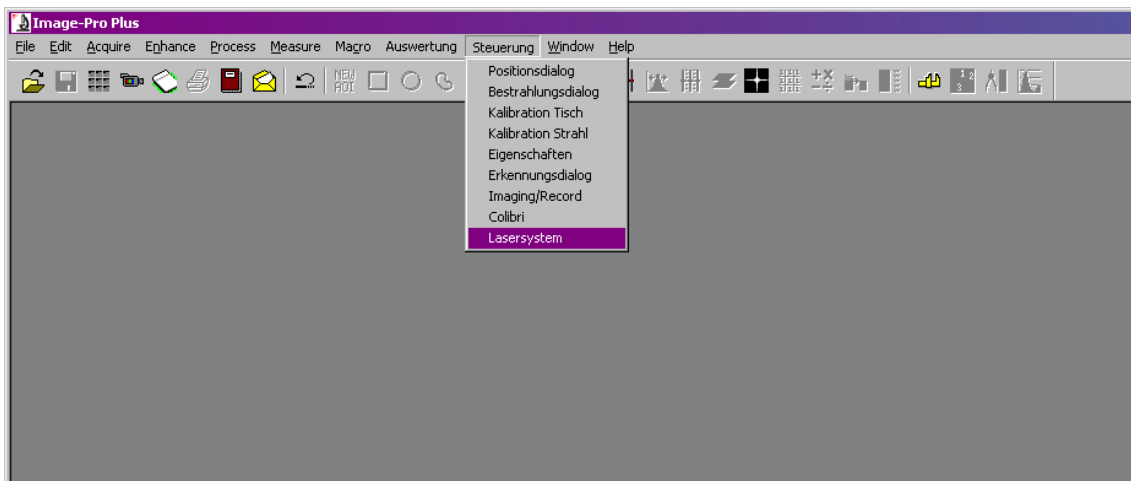
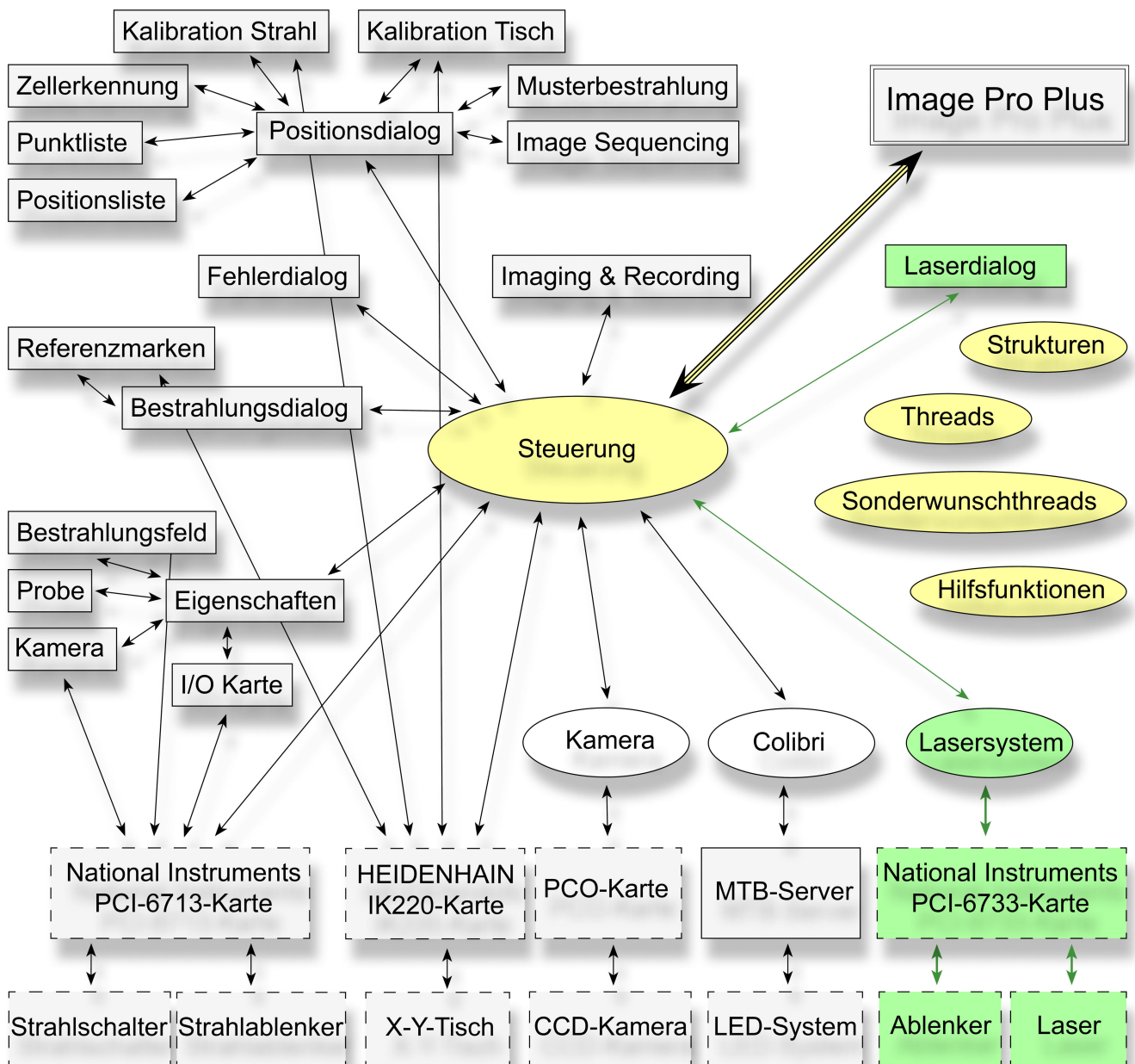


Abbildung 3.8: Menüleiste mit Erweiterung („Steuerung“) zur Mikrosonden- und Mikroskopsteuerung. Weiterer Menüpunkt „Lasersystem“ zur Einstellung von Lasersystem-Parametern.



Legende

- | | | |
|------------------|-------------|-------------|
| Weitere Software | Unverändert | Unverändert |
| Dialogfenster | Neu | Neu |
| C++ Routine | Verändert | Verändert |
| Hardware | | |

Abbildung 3.9: Vereinfachte Darstellung des Mikrosonden-Kontrollprogramms mit Lasererweiterung. Es sind alle Dialogfenster, die wichtigsten Routinen zur Hardware-Steuerung und Hardware-Komponenten abgebildet. Ebenfalls dargestellt sind die für die Integration des Lasersystems notwendigen Änderungen (grün) und Erweiterungen (gelb).

Erstellung eines Dialogfensters

In Abbildung 3.10 ist das neue Dialogfenster „Lasersystem“ dargestellt, mit dessen Hilfe alle für die Nutzung des Lasersystems relevanten Einstellungen getroffen werden können. Die wichtigsten Eigenschaften sind:

- „Automatische Kalibration“: Durch Einbau eines Probenhalters mit einem 50 μm dünnen YAG-Kristall (Yttrium-Aluminium-Granat $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) kann die Position des Laserstrahls sichtbar gemacht werden, und die Funktion von angelegter Ablenkspannung zu Laserposition in Bildfeld bestimmt werden. Dieses Verfahren ist der Ionenstrahl-Kalibration sehr ähnlich und geht von einem linearen Verhalten von Ablenkspannung und Position aus, beachtet jedoch auch ein Übersprechen zwischen den Achsen [27].
- „Ablenkung“: Hier kann der Laserstrahl entweder durch Eingabe von Ablenkspannungen oder nach Kalibration durch Mausklick auf eine Position innerhalb des Bildfeldes abgelenkt werden.
- „Lasereinstellungen“: Hier können Intensität und Belichtungszeit eingestellt werden. Die Intensität ist einstellbar zwischen 0 und 100% der maximalen Laserleistung, die mittels Leistungsmeßgerät FieldMaster (Coherent Incorporation, USA) kalibriert ist. Die einstellbare Belichtungszeit ist bei Beleuchtung eines einzelnen Punktes, nicht jedoch für Linien oder Kreise relevant.
- „Bestrahlung“: Hier können die Bestrahlungsformen und die zugehörigen Parameter definiert werden. Dabei wird bei den Bestrahlungsformen „Kreisbestrahlung“ und „Linienbestrahlung“ eine Liste von 10000 Koordinaten erzeugt, die automatisiert abgefahren wird [89].
Nach Drücken der Taste „Folgen“ wird der Stahl fortlaufend auf die Position des Mauszeigers abgelenkt, so dass per Mausbewegung der Laserstrahl schnell zu bestimmten Bereichen innerhalb des Bildfeldes bewegt werden kann. Dies dient zum Beispiel der schnellen Überprüfung der räumlichen Kalibration der Laserablenkung.
- „Weitere Einstellungen“: Hier kann eine Wartezeit eingegeben werden, um die die Laserbestrahlung gegenüber dem Bestrahlungsbefehl verzögert wird. Dadurch kann z.B. bei Aufnahme einer Bildfolge die Laserbestrahlung zeitlich verzögert erfolgen oder z.B. die Laserbestrahlung zeitlich gegenüber einer Ionenbestrahlung verzögert werden.



Abbildung 3.10: Dialogfenster Lasersystem

Integrierung des Lasersystems in das gesamte Mikrosonden-Kontrollprogramm

Die grundsätzliche Idee ist, eine Klasse CLasersystem zu erzeugen, die als Schnittstelle alle Hardware-Komponenten des Lasersystems ansteuert und dem restlichen Programm als Routinen bereitstellt (Abbildung 3.9). Dabei sind die Routinen, welche den Ablauf bei Ionenbestrahlung regeln, so anzupassen, dass das Lasersystem als zusätzliche Option zur Verfügung steht.

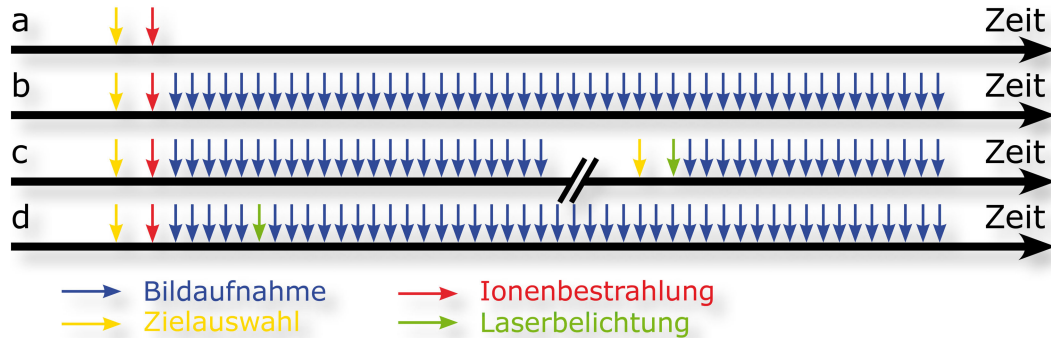


Abbildung 3.11: Typische Abläufe bei Ionenbestrahlung (a, b) und mit zusätzlicher Laserbestrahlung (c, d): (a) gezielte Ionenbestrahlung von Zellen innerhalb eines Bildfeldes, (b) gezielte Ionenbestrahlung und Aufnahme von Bildsequenzen, (c) gezielte Ionenbestrahlung mit Bildsequenzaufnahme und nach bestimmter Zeit gezielte Laserbelichtung, (d) gezielte Ionenbestrahlung und zeitlich verzögerter Laserbelichtung mit Bildsequenzaufnahme.

In Abbildung 3.11 (a) und (b) sind einige typische Experimentabläufe bei Ionenbestrahlung dargestellt. In Abbildung 3.11 (a) wird zuerst ein Bild aufgenommen (gelb), in dem die zu bestrahlenden Ziele definiert und dann automatisch anhand der Einstellungen bestrahlt werden (rot). Dies wird hauptsächlich für ex-situ Experimente benötigt, in denen die gezielte Bestrahlung mit einer definierten Zahl von Ionen essentiell ist, die Analyse wird im Anschluss ex-situ vorgenommen [74]. Abbildung 3.11 (b) zeigt ein typisches in-situ Experiment, in dem wie zuvor gezielt bestrahlt wurde, jedoch anschließend eine Aufnahme von Bildsequenzen folgt [40]. Abbildungen 3.11 (c) und (d) zeigen Abläufe mit zusätzlicher Laserbelichtung. Abbildung 3.11 (c) zeigt wie (b) einen Ablauf eines in-situ Experiments, bei dem der Laser als zusätzliches Untersuchungsinstrument hinzukommt. Die Belichtung per Laserstrahl erfolgt eine bestimmte Zeit nach Beendigung der Bildaufnahme. Dabei wird wie bei Ionenbestrahlung erst ein Bild aufgenommen, in dem die zu belichtenden Bereiche ausgewählt werden können. Nach der Laserbelichtung wird eine Sequenz von Bildern aufgenommen. In Abbildung 3.11 (d) soll ebenfalls gezielt mit Ionen bestrahlt werden, jedoch der Zeitpunkt der Laserbestrahlung nach Ionenbestrahlung definiert sein. Dabei wird ein Bild aufgenommen, in dem die mit Ionen zu bestrahlenden Ziele und die mittels Laser zu belichtenden Bereiche gewählt werden können.

Um Experimente vom Typ (c) und (d) durchzuführen, sind einige Änderungen bzw. Erweiterungen in der gesamten Ablaufsteuerung notwendig. Dazu wird das Lasersystem in den zeitlichen Ablauf von Ionenbestrahlung und Bildaufnahme eingefügt und gesteuert durch die Eingaben im Dialogfenster „Lasersystem“ (Abbildung 3.10).

3.3 Optimierungen

3.3.1 Laser-Emissionsspektrum

Bei Aufnahme eines Emissionsspektrums des Diodenlasers mit dem Spektrometer SD2000 (Ocean Optics Incorporation, USA) zeigt sich, dass neben der 488 nm Laserlinie ein relativ breiter Untergrund vorhanden ist (Abbildung 3.12 links), der schwach und unabhängig von der Intensität des Laserlichts ist. Damit dieser Untergrund nicht auf die Probe gelangt, wird ein Laserlinien-Bandpassfilter (V47-491, Edmund Optics GmbH, Deutschland) mit Halterung vor dem Ausgang des Diodenlasers angebracht (Abbildung 3.12 rechts). Neueren Versionen dieses Diodenlasers enthalten diesen Filter bereits. Zusätzlich wird ein Verschluss vor dem Lampenhaus angebracht, der den durch den Filter transmittierten Anteil des Untergrunds blockt während keine Laserbelichtung stattfindet, und so eine ungewollte Fluoreszenzanregung vermeidet.

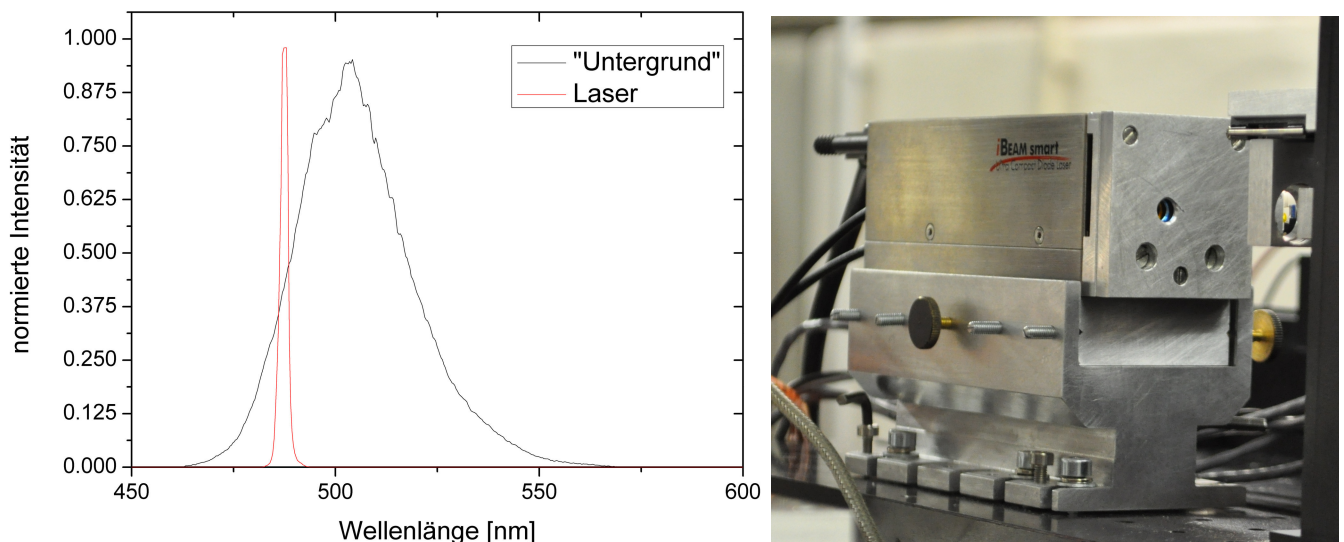


Abbildung 3.12: Links: Emissionsspektrum des Diodenlasers iBeam smart, Laserlicht und Untergrund jeweils normiert. Rechts: Diodenlaser mit Aufsatz für Bandpassfilter.

3.3.2 Verkleinerung der Fokusgröße

Visualisieren lässt sich der Laserstrahl entweder, wie zuvor erwähnt, durch Belichtung des $50\ \mu\text{m}$ dünnen YAG:Ce³⁺-Kristalls (Yttrium-Aluminium-Granat $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ mit Cer dotiert) oder durch eine dünne Schicht Textmarker [90], aufgetragen auf der Polypropylenfolie des Zellgefäßes. Durch Messung von Intensitätsprofilen mehrerer vom Laser angeregter Punkte ergibt sich eine Fokusgröße von ungefähr $2\ \mu\text{m}$ Halbwertsbreite ($1/e^2$ von ungefähr $3,4\ \mu\text{m}$) [39].

Diese Fokusgröße ist ausreichend zur Durchführung vieler biologischer Experimente (Kapitel 4.3.2), jedoch besteht die Möglichkeit, die Fokusgröße weiter zu reduzieren. Die theoretisch erreichbare minimale Fokusgröße ist gegeben durch den beugungsbegrenzten Fokus [78]:

$$d = \frac{1,22 \cdot \lambda}{NA} \quad (3.1)$$

Mit einer Wellenlänge λ von 488 nm und einer numerischer Apertur NA von 1,15 ergibt sich eine minimale Fokusgröße von 518 nm ($1/e^2$). Jedoch ist diese nur erreichbar, wenn der Objektiveneingang vom Laser vollständig ausgeleuchtet wird. Nur dann wird die volle NA des Objektivs genutzt. Der kleine, den Objektiveneingang nicht vollständig ausgeleuchtete Laserausschnitt erklärt die Diskrepanz der theoretisch Fokusgröße zur gemessenen: Bei dem genutzten Laserstrahl-Durchmesser von 2 mm ($1/e^2$) und der Objektiveneingangs-Durchmesser von 12 mm errechnet sich eine Fokusgröße von circa $3 \mu\text{m}$ ($1/e^2$) Durchmesser. Errechneter und beobachteter Wert befinden sich somit in guter Übereinstimmung.

Um den Laserfokus zu verkleinern, ist eine Vergrößerung des Laserstrahlquerschnitts am Objektiveneingang notwendig, was durch einen Strahlaufweiter erreicht werden kann. Es gibt zwei typische Strahlaufweiteranordnungen: Die Kepleranordnung, bestehend aus zwei konvexen Linsen, und die Galileoanordnung, bestehend aus einer konvexen und einer konkaven Linse. Da die Galileoanordnung kompakter angeordnet werden kann, wird diese hier vorgezogen.

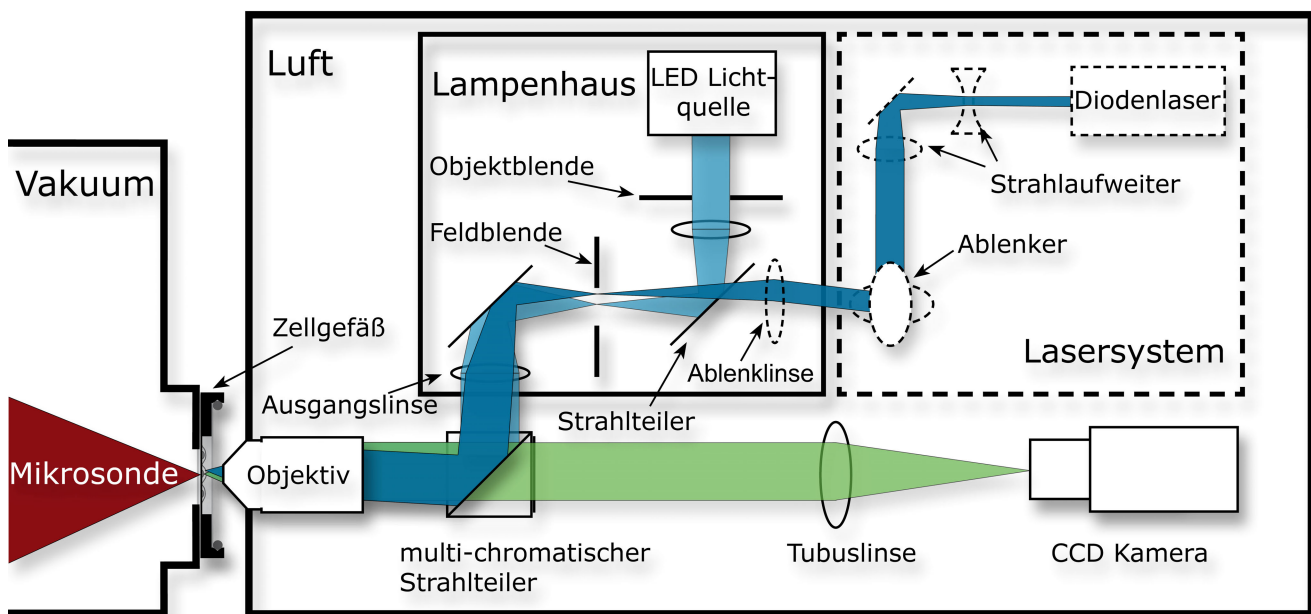


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des existierenden Mikroskopaufbaus (durchgezogene Linien) und des Lasersystems (gestrichelte Linien). Ebenfalls dargestellt ist der Anregungs- (hellblau) und Emissions-Lichtweg (grün) des Epifluoreszenz-Mikroskopes und des Lasersystems (dunkelblau). Zusätzlich ist der Strahlaufweiter abgebildet.

In Abbildung 3.13 ist eine schematische Darstellung des zuvor beschriebenen Aufbaus mit einem zusätzlichem Strahlaufweiter dargestellt. Die Randbedingungen bei Auswahl der Vergrößerung sind zum einen die gewünschte Fokusgröße, welche am besten zwischen 1 und $2 \mu\text{m}$ ($1/e^2$) liegen sollte (siehe Abschnitt 3.1.1) und zum anderen die bereits vorhandenen optischen Elemente. Eine Vergrößerung von ungefähr 2,8 (Bikonkave Linse $f = -18$ mm, Bikonvexe Linse $f = 50$ mm) erfüllt dies optimal.

3.4 Ergebnisse

Fokusgröße

Zur Messung der Fokusgröße ist, wie zuvor erwähnt, durch Beleuchtung eines $50\ \mu\text{m}$ dünnen YAG:Ce³⁺-Kristalls (Yttrium-Aluminium-Granat $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ mit Cer dotiert) oder einer dünnen Schicht gelben Textmarkers [90] möglich. Aufgrund ihrer geringen Dicke ist die Textmarkerschicht zur Messung der Fokusgröße besser geeignet als der Kristall, wird aber sehr schnell ausgebleicht.

In Abbildung 3.14 ist ein typisches Linienprofil des fokussierten Laserstrahls dargestellt,

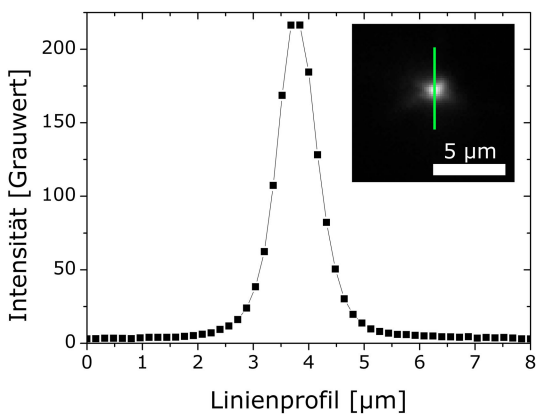


Abbildung 3.14: Messung der Fokusgröße. Linienprofil entlang des Laserfokus (verkleinerte Darstellung).

welcher durch Fluoreszenz des Textmarkers bei Belichtung durch den Laserstrahl entsteht. Nach Messung mehrerer Linienprofile ergibt sich eine Fokusgröße von $0,9 \pm 0,3\ \mu\text{m}$ Halbwertsbreite ($1,5 \pm 0,5\ \mu\text{m}\ 1/e^2$). Diese Fokusgröße erfüllt die zuvor erwähnten Anforderungen (Abschnitt 3.1.1). Der Laserfokus lässt sich auch in der z-Achse charakterisieren. Dazu ist die stabile Zelllinie HeLa H2B-GFP bestens geeignet (nähere Beschreibung der Zelllinie in Kapitel 4.1). Die Fluoreszenz des GFP wird durch den fokussierten Laserstrahl deaktiviert, sodass die Form des Laserfokus im gebleichten Bereich zurückbleibt. Durch die geringe Bewegungsfähigkeit von H2B-GFP [82] und der damit geringen Bewegung des gebleichten Bereiches kann also ein Tiefenprofil des Laserfokus aufgenommen werden.

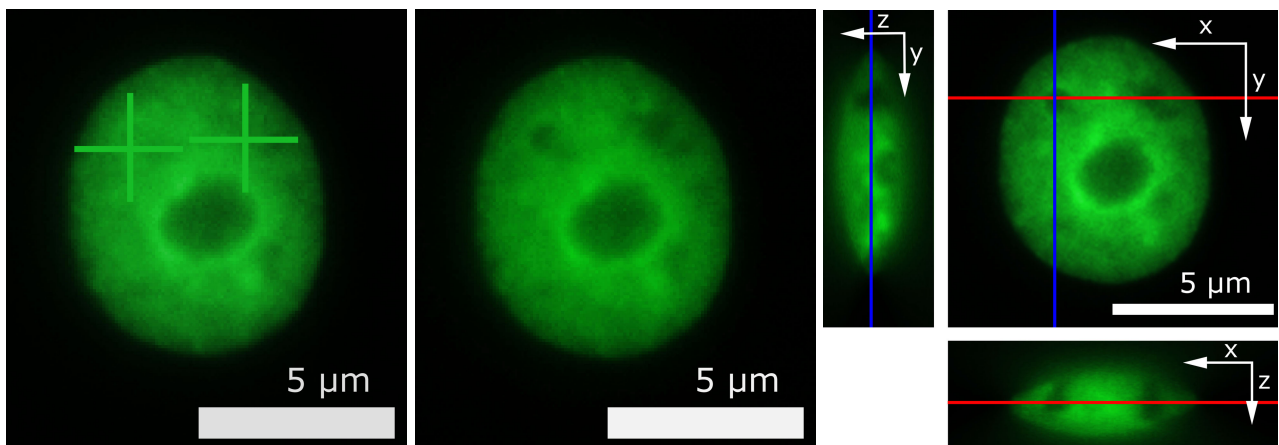


Abbildung 3.15: Visualisierung der tiefenaufgelösten Fokusgröße in einem HeLa H2B-GFP Zellkern. Nach Bildaufnahme zu bleichende Bereiche manuell ausgewählt (grüne Kreuze links) und gebleicht (1,25 mW und 40 ms). Nach Aufnahme einer tiefenaufgelösten Bildreihe des Zellkerns wenige Sekunden nach Bleichen (Mitte) können Schnitte in horizontaler (rechts rote Linie) und vertikaler (rechts blaue Linie) Richtung vorgenommen werden. Es ist ein tiefenaufgelöstes Bleichprofil erkennbar.

Nach Bildaufnahme, manueller Zielauswahl (Abbildung 3.15 links), Bleichen (Abbildung 3.15 Mitte) und Aufnahme einer Bildreihe mit 200 nm Schritten in der Tiefe sind in Abbildung 3.15 rechts Schnitte in horizontaler (rote Linie) und vertikaler (blaue Linie) Richtung dargestellt. Es ist ein relativ lineares Tiefenprofil des Laserfokus zu erkennen, welches auch theoretisch durch die Rayleighlänge zu erwarten ist. Dabei ist die Rayleighlänge z_R die Distanz, die der Laserstrahl braucht, bis er den doppelten Durchmesser erreicht hat und ist gegeben durch [78]:

$$z_R = \frac{\pi \cdot w_0^2}{\lambda} \quad (3.2)$$

Wobei w_0^2 der Radius des Strahls im Fokus und λ die Wellenlänge darstellt. Dadurch ergibt sich eine Rayleighlänge von ungefähr $3,6 \mu\text{m}$ ($1/e^2$), die in Anbetracht der geringen Zelldicke und Tiefenauflösung, den quasi linearen Verlauf (Abbildung 3.15 rechts Schnitte) erklärt.

Intensität und Belichtungszeit

Intensität und Belichtungszeit des Lasersystems sind stark von dem jeweiligen biologischen Experiment abhängig und müssen jeweils experimentell bestimmt werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist eine laserinduzierte Schädigung der DNA nicht wünschenswert. Um einschätzen zu können, ab welcher Intensität und Bestrahlungszeit diese auftritt, werden HeLa Zellen (Kapitel 4.1), welche mit dem Einzelstrangbruchmarker XRCC1 transfiziert sind, belichtet. Es ist bekannt, dass die DNA Färbung mittels Hoechst 33342 eine Sensibilisierung gegenüber der Schädigung durch Belichtung verursacht [91]. Daher wurden die Zellen zusätzlich mit diesem Farbstoff gefärbt.

Oberhalb einer Belichtung mit maximaler Intensität (2,5 mW) und circa 10 s Bestrahlungszeit zeigt sich eine leichte Akkumulation von XRCC1 am Belichtungsort und somit Erzeugung von Einzelstrangbrüchen. Bei den später gezeigten Experimenten (Kapitel 4) beträgt die typische Belichtungszeit 40 ms mit 1,25 mW Laserleistung, sodass die Erzeugung von Einzelstrangbrüchen extrem unwahrscheinlich ist. Die laserinduzierte Erzeugung von später betrachteten Doppelstrangbrüchen ist deshalb auszuschließen.

Integration in Kontrollsoftware

Das Lasersystem ist erfolgreich in das Mikrosonden-Kontrollprogramm integriert und kann als weitere Option verwendet werden. Dabei ist auch die Kombination von Lasersystem und anderen Routinen wie Aufnahmen von Bildsequenzen, gezieltes Bleichen nach definierter Zeit nach Ionenbestrahlung und Musterbelichtung möglich. In Abbildungen 3.16 sind neben den schon gezeigten Punktbelichtungen auch weitere bereits integrierte Bleichmuster wie Kreise und Linien gezeigt. Diese lassen sich ebenfalls zu komplexeren Mustern kombinieren (Abbildung 3.16 rechts).

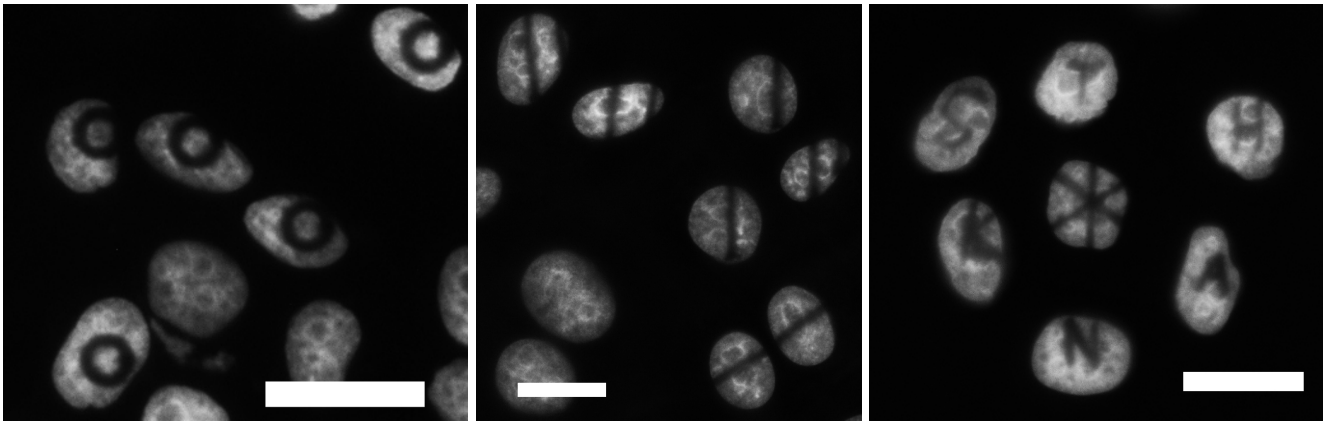


Abbildung 3.16: HeLa H2B-GFP Zellkerne gebleicht mit unterschiedlichen Mustern, wie Kreisen (links), Linien (mitte) und Buchstaben aus Kombination von Linien (rechts). Skala entspricht $20 \mu\text{m}$.

Zielgenauigkeit Lasersystem

Die Messung der Zielgenauigkeit (bzw. die Abweichung zur gewünschten Trefferposition) des Lasersystems ist durch Laserbestrahlung von HeLa H2B-GFP Zellkernen (nähere Beschreibung in Kapitel 4.1) möglich. Dazu werden ausgewählte Positionen gezielt gebleicht und im Anschluss die Differenz zwischen angezielter zu tatsächlich getroffener und somit gebleichter Position bestimmt. Es ergibt sich eine Zielgenauigkeit des Lasersystems von $0,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ($N = 29$), gemessen in Zellgefäß. Innerhalb eines Zellgefäßes ist die Zielgenauigkeit des Lasersystems dominiert durch einen konstanten systematischen Fehler, der von Zellgefäß zu Zellgefäß variiert und von einem Versatz in der Kalibration herrührt.

Treffergenauigkeit Mikrosonde

Zum Testen, ob die Integration des Lasersystems die Treffergenauigkeit der Ionenbestrahlung beeinflusst, wird die Treffergenauigkeit analog zu Abschnitt 2.1 gemessen. Dabei ergibt sich eine Treffergenauigkeit von 840 nm mit einem Sigma von 550 nm ($N = 210$) und ist somit nicht wesentlich verändert gegenüber dem ursprünglichem Aufbau (670 nm mit Sigma von 400 nm ($N = 84$) [77]).



4 Radiobiologische Untersuchungen

4.1 Zellkultivierung und Behandlung

4.1.1 Zellkultivierung und Transfektion der Zellen

Alle Zelllinien werden in DMEM Medium (4,5 g/l Glucose und 110 mg/l Na-pyruvat) mit 10 % FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) kultiviert.

Stabil transfizierte HT1080 Zellen, welche mit H2B-mRFP und H3 mit photoaktivierbarem GFP exprimieren, sind von Dr. I. Müller (GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung, Darmstadt, Deutschland) bereitgestellt [92]. Die HeLa H2B-GFP Zelllinie [93] ist dankenswerterweise von Dr. Daniela Zink (Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland) und die MEF-Ku80^{-/-} Linie aus dem Labor von Prof. Dr. M. Löbrich (Technische Universität Darmstadt, Deutschland) zur Verfügung gestellt worden.

Für Untersuchungen in Mauszellen werden NIH3T3 (ATCC, England) [94] und MEF-Ku80^{-/-} Zellen mit Fusionsplasmid aus Ku80 mit GFP (bereitgestellt von A.-L. Leifke (GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung, Darmstadt)) und XRCC1 mit RFP (bereitgestellt von Dr. N. Averbek (GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung, Darmstadt)) transfiziert. Hierzu wird das Transfektionsreagenz Attractene der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Exprimierende Zellen sind deutlich an ihrer Fluoreszenz zu erkennen.

4.1.2 Bestrahlung der Zellen an der Mikrosonde

Zur Durchführung von Mikrosonden-Experimenten müssen die Zellen in die zuvor erwähnten speziellen Kammern ausgesät werden (Kapitel 2.1). Dabei werden die Zellen auf der 4 µm dicken Polypropylenfolie (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim, Deutschland), welche mit 70 %igem Ethanol sterilisiert und mit BD Cell-TakTM (BD, Heidelberg, Deutschland) beschichtet ist, ausgebracht [27].

Zur Visualisierung der DNA werden die Zellen mit 0,1 µM Hoechst 33342 (Invitrogen Ltd., Paisley, England) für mindestens 30 min inkubiert.

Für die Bestrahlung wird das DMEM durch ein Medium ersetzt, dessen Eigenfluoreszenz bei Anregung des Hoechst-Farbstoffes, sowie der GFP und RFP Konstrukte soweit reduziert ist, dass sie bei quantitativen Messungen nicht weiter ins Gewicht fällt. Hierbei handelt es sich um EMEM Medium (Lonza Cologne AG, Deutschland) mit 1 % Glutamin (Biochrom AG, Deutschland) und 20 mM HEPES (Biochrom AG, Deutschland). Insbesondere wurden für dieses Bestrahlungsmedium die starken Fluoreszenzbeiträge von Phenolrot und von FCS beseitigt [39].

4.2 Bestrahlungsparameter

Der Linearbeschleuniger der GSI stellt Strahlen von Wasserstoff- bis zu Uranionen mit spezifischen Energien typischerweise zwischen 1,4 und 11,4 MeV/u für Experimente in der Niederenergie-Experimentierhalle zur Verfügung. An der Mikrosonde werden hauptsächlich Ionen mit der spezifischen Energie von 4,8 MeV/u verwendet, da mit dieser Energie alle typisch gelieferten Ladungszustände und Ionenmassen sicher von der Mikrosonde fokussiert werden können. Es kann zwar im Extremfall auch ein Uranstrahl maximaler Energie verarbeitet werden, jedoch ist dafür eine zusätzliche Umladung der Ionen aus dem beschleunigten Ladungszustand notwendig, damit die Strahlsteifigkeit die magnetische Linse nicht überlastet. Hiermit ginge selbstverständlich ein erheblicher Verlust von Strahlintensität einher. Durch die Variation der Ionensorte und Energie wird der lineare Energietransfer (LET) verändert, und damit die im Probenmaterial deponierte Energie pro einfallendem Ion. Beim Vergleich von unterschiedlichsten radiobiologischen Studien an Mikrosonden ist der LET Wert ein wichtiger physikalischer Parameter.

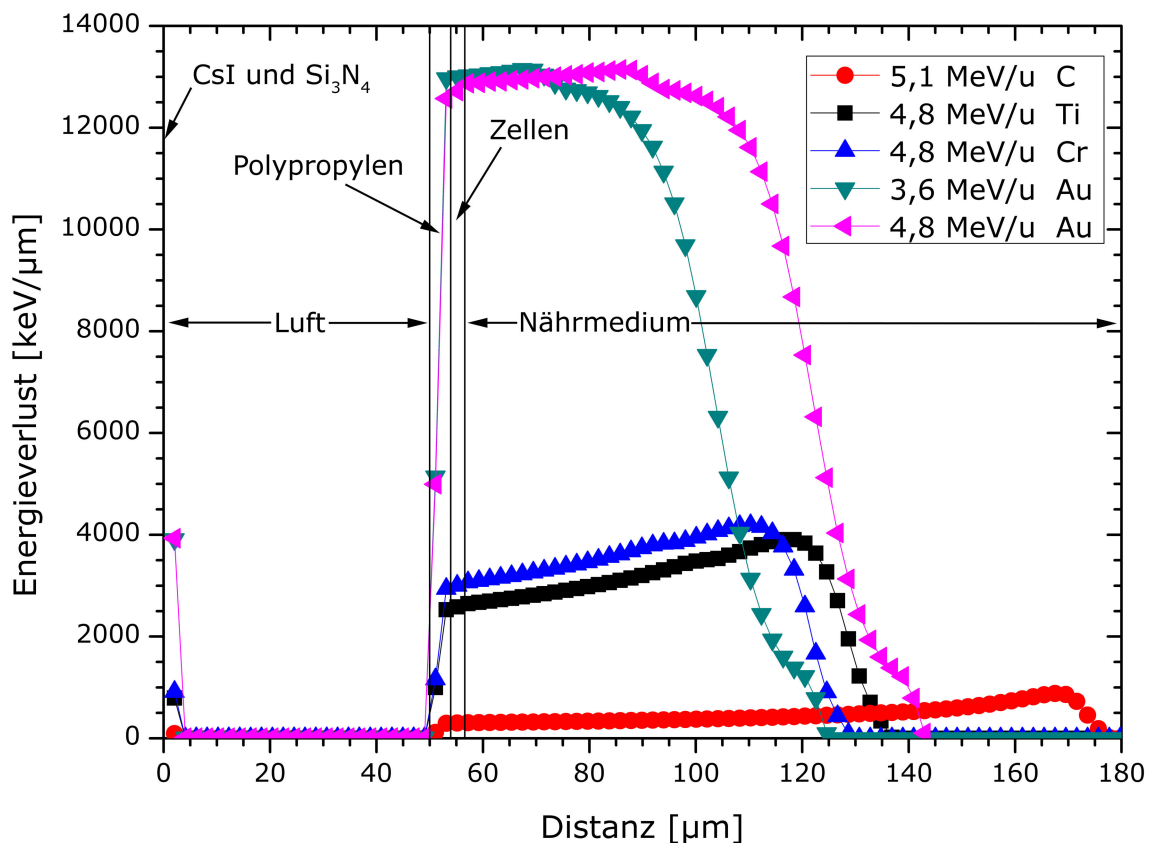


Abbildung 4.1: Simulierte Energieverluste in Abhängigkeit von Distanz, Ion und Energie. Gezeigt sind mit SRIM-2013 [95, 96] simulierte Energieverluste einiger typischer Ionen im Mikrosondenaufbau. Die Ionen passieren ein Vakuumfenster, Luft und eine Polypropylenfolie bevor sie auf die Zellkerne treffen und im Anschluss im Nährmedium stoppen. Im eingezeichneten Bereich, der den Zellen entspricht, ist wie zu erwarten ein relativ konstanter Energieverlust erkennbar. Kurven sind Mittelwerte aus jeweils 2000 Einzelionen-Simulationen.

Der LET kann durch das Monte-Carlo Simulationsprogramm SRIM-2013 (Englisch für Stopping and Range of Ions in Matter) [95, 96] berechnet werden. Im Experiment passiert ein einzelnes Ion auf dem Weg zur Probe das Vakuumfenster (200 nm Si₃N₄ bedampft mit CsI von 50 nm Dicke), Luft (kleiner 50 μm) und eine Polypropylenfolie (4 μm) bevor es die Zellen durchquert und in dem dahinter liegenden Nährmedium stoppt. In Abbildung 4.1 ist der Energieverlust in keV/μm, berechnet für einige typische Ionen, dargestellt. Hier ist auch der relativ homogene lineare Energietransfer entlang der Ionentrajektorie durch die Zellen zu sehen. In Tabelle 4.1 sind LET am Ort der Zellen und Reichweiten in Nährmedium der verwendeten Ionenstrahlen zusammengefasst.

Ion	Energie [MeV/u]	Gesamtenergie [MeV]	LET [keV/μm]	Reichweite [μm]
¹² C ²⁺	4,8	58	300	125
⁵⁰ Ti ¹²⁺	5,1	255	2800	84
⁵⁴ Cr ⁸⁺	4,8	259	3100	77
¹⁹⁷ Au ²⁵⁺	3,6	709	13100	72
¹⁹⁷ Au ²⁵⁺	4,8	946	12900	90

Tabelle 4.1: Übersicht typisch verwendeter Ionen und Energien und die sich dadurch ergebenden Energieverluste. LET und Reichweite berechnet mit SRIM-2013 [95, 96] basierend auf Aufbau, Ion und Ausgangsenergie des Ions. Die Reichweite der Ionen ist hierbei ab Auftreffen aufs Zellgefäß definiert. LET und Reichweite stammen aus 2000 gemittelten und gerundeten simulierten Ereignissen. Ungenauigkeit liegt bei 10 - 20 %.

4.3 Chromatinstrukturveränderung nach Ionenbestrahlung

Bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (Kapitel 1.3.2) spielt die Chromatinstruktur (Kapitel 4.3.1) des Schadensortes eine Rolle. In diesem Kapitel wird zum einen die Chromatindekondensation nach Schädigung mittels Lasermarkierung (Kapitel 4.3.2) untersucht und andererseits die durch Verbesserungen des verwendeten Mikroskops beobachtbare Dekondensation in geschädigtem Heterochromatin (Kapitel 4.3.3) gezeigt.

4.3.1 Visualisierung der Chromatindekondensation nach Bestrahlung mit schweren Ionen

Wie zuvor beschrieben (Kapitel 1.3.2), stellt die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) eine große Herausforderung für die Zelle dar. Zur Reparatur von DSB stehen zwei Hauptmechanismen zur Verfügung, die „Homologe Rekombination“ (HR) und die „Nicht Homologe Endverknüpfung“ (NHEJ) (Abbildung 4.2). Bei der HR wird das Schwesterchromatid verwendet, welches die gleiche Information wie das beschädigte Schwesterchromatid enthält, um mittels dieser Vorlage den beschädigten Abschnitt zu reparieren (Abbildung 4.2 (b)). Bei der NHEJ wird diese Vorlage nicht verwendet und die Bruchstücke werden von Einzelstrangresten befreit und dann direkt zusammengefügt (Abbildung 4.2 (a)), wodurch dieser Mechanismus als fehleranfälliger gilt [97].

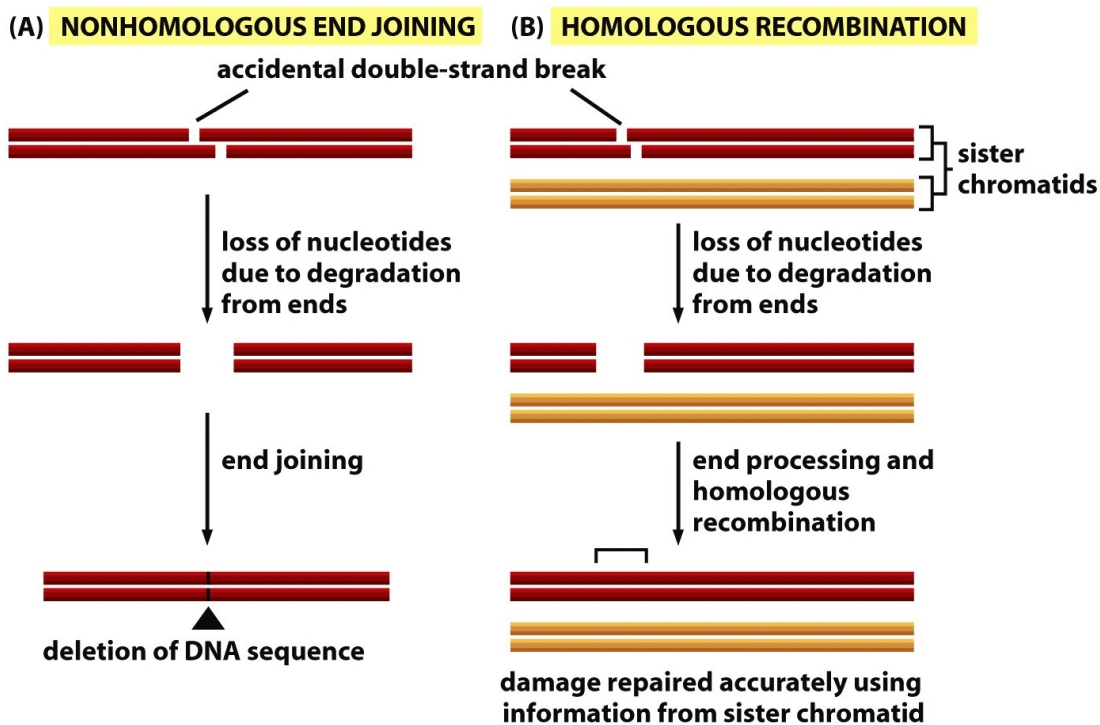


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der zwei Hauptreparaturmechanismen: (a) Nicht Homologe Endverknüpfung (NHEJ) und (b) homologe Rekombination. (Entnommen aus [49])

Untersuchungen in humanen Fibroblasten und embryonalen Mausfibroblasten haben gezeigt, dass die Reparatur zum einen von der Komplexität DSB abhängt und zum anderen von dem umgebenden Chromatin. Diese Experimente zeigen, dass DSB in heterochromatischen Bereichen (HC) [98], d.h. Bereichen

von dichter gepackter DNA, langsamer repariert werden als in euchromatischen Bereichen (EC) [85], welche eine offener Chromatinstruktur zeigen. Heterochromatin besteht hauptsächlich aus inaktiver DNA im Gegensatz zu Euchromatin, dessen DNA durch Transkriptionsaktivität gekennzeichnet ist [99]. Bevor eine Reparatur stattfinden kann, muss Chromatin dekondensiert werden. Dabei hat sich gezeigt, dass das Chromatin eine Dekondensation lokal [100] als auch global [101] durchläuft um den Zugang für die Reparatur zu erhalten (zusammengefasst von Misteli und Soutoglou [102]). Nach Bestrahlung mit Schwerionen haben Jakob et al. [74, 103] gezeigt, dass diese Dekondensation in Heterochromatin in Mauseellen direkt in der DNA Färbung zu erkennen ist. Gleichzeitig mit der Dekondensation ist eine Relokalisation des Schadens zum Rand des HC zu erkennen.

4.3.2 Dekondensation von Chromatin nach Bestrahlung mit schweren Ionen

In Untersuchungen von Kruhlak et al. [100] wurde gezeigt, dass nach DSB Erzeugung mittels ultraviolettem (UV), fokussiertem Laserlicht eine Dekondensation des Chromatin erkennbar ist. Dabei sind mehrere unterschiedliche Ansätze verfolgt worden. Alle basieren jedoch darauf, einen Laserstrahl zum Bleichen definierter Bereiche zu verwenden, bestimmte Bereiche mittels UV Anregung zu schädigen, und anschließend die Ausbreitung des geschädigten in den ungeschädigten Bereich zu verfolgen.

In Anlehnung an diese Experimente soll hier untersucht werden, ob eine solche Chromatindekondensation ebenfalls nach Erzeugung von DSB mit schweren Ionen sichtbar gemacht werden kann. Hierzu wird mit dem Laser ein Gebiet gebleicht, durch eine gezielte Ionenbestrahlung von ungebleichten Bereichen Schaden induziert und anschließend visualisiert.

In Abbildung 4.3 sind drei unterschiedliche Ansätze für die Versuchsdurchführung dargestellt. Diese unterscheiden sich durch das gebleichte Muster (Linien oder Kreise) und des Musters der im Anschluss durchgeführten Ionenbestrahlung (horizontale/vertikale Linien oder mehrere Ionen in Punkt). Zur Verifizierung der Trefferposition und des dadurch geschädigten Bereichs sind diese Zellkerne (Abbildungen 4.3 (c, g, k)) zusätzlich mit einem Einzelstrangbruch-Marker XRCC1-RFP transfiziert, der es erlaubt einzelne Ionentreffer zu visualisieren. Nach Ionenbestrahlung folgt die Aufnahme einer Bildsequenz. Eine Chromatinbewegung sollte sich als Veränderung der gebleichten Bereiche bemerkbar machen.

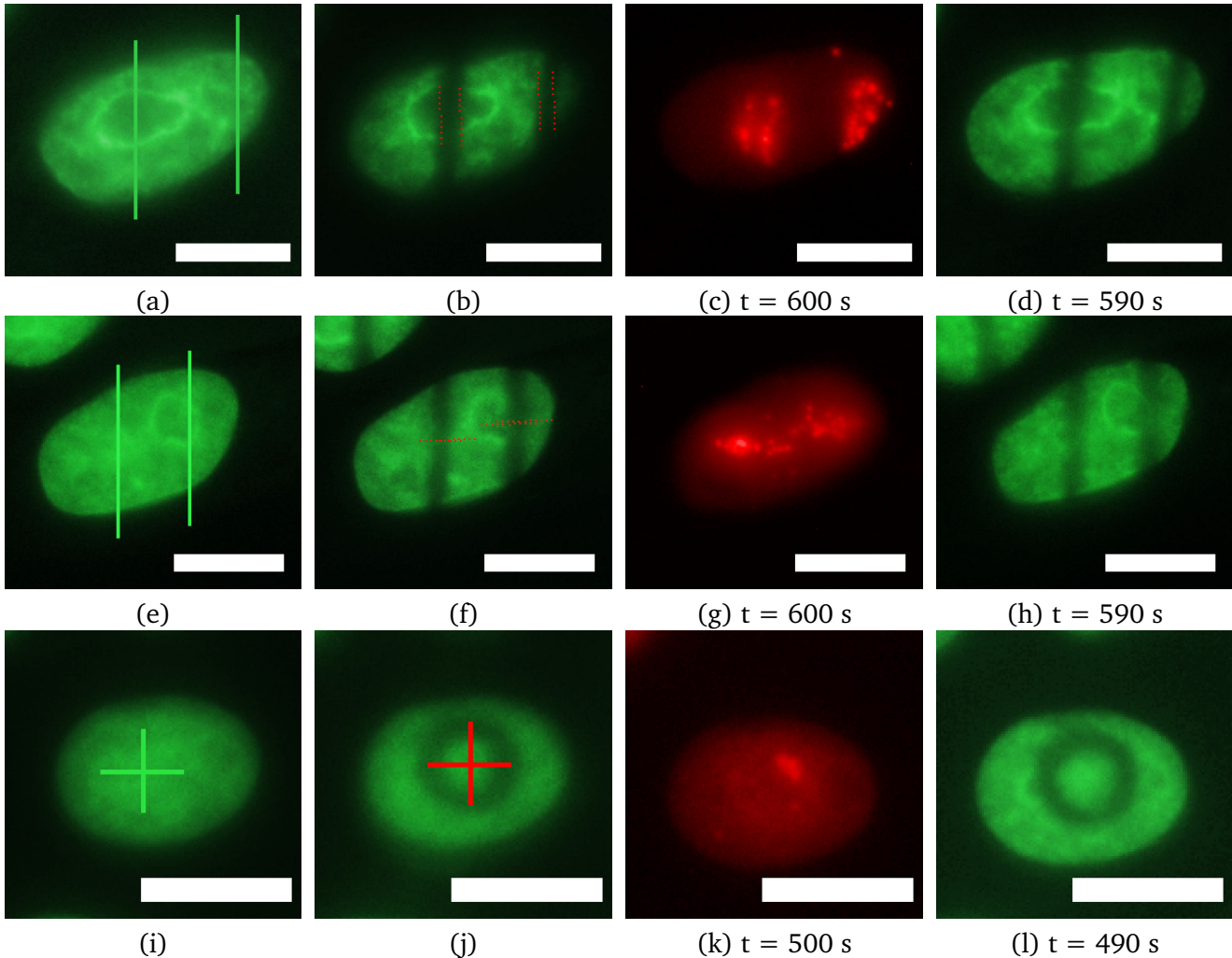


Abbildung 4.3: Dekondensation von Chromatin. Messung der Dekondensation von Chromatin untersucht in stabilen HeLa H2B-GFP Zellkernen mit drei unterschiedlichen Ansätzen, jeweils in einer Bildzeile dargestellt. Das Bleichen von Mustern erfolgt mittels des neu integrierten Lasersystems (a, e, i) gefolgt von einer Bestrahlung mit Ionen (b, f, j), wobei (b) und (f) mit 9 Goldionen ($\text{LET} = 12900 \text{ keV}/\mu\text{m}$) in Linien mit 500 nm Punktabstand und (j) mit 10 Kohlenstoffionen ($\text{LET} = 300 \text{ keV}/\mu\text{m}$) im Punkt bestrahlt werden. XRCC1-RFP zeigt Ionentreffer (c, g, k). Anschließend Aufnahme einer Bildreihe mit Aufnahmen alle 10 s über 10 min. Gezeigt werden ausgewählte Aufnahmen der entsprechenden Zeiten von Chromatin (grün) (d, h, l) und XRCC1-RFP (rot) (c, g, k). Skala entspricht $10 \mu\text{m}$ und Zeiten beziehen sich auf Zeit nach Ionenbestrahlung.

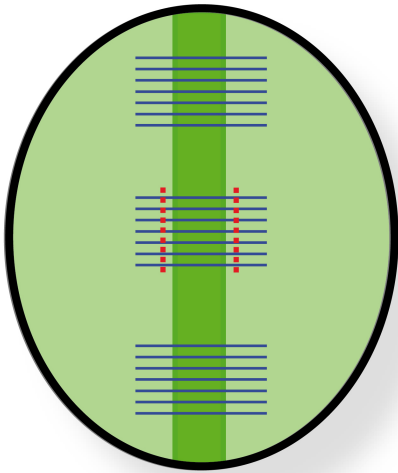


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Auswertung: Entlang des gebleichten Bereiches (dunkelgrün) werden Linienprofile (blau) gelegt. Gebiete, die eindeutig frei von Schäden sind, werden von solchen unterschieden, die DNA Schäden enthalten (rot).

Hierbei dienen unbestrahlte gebleichte Bereiche im gleichen Zellkern als Referenz gegenüber dem angrenzenden bestrahlten Bereich. In Abbildung 4.4 ist dies beispielhaft für den Fall einer gebleichten Linie (vertikal) und dazu paralleler Linienbestrahlung (vertikale rote Punkte) gezeigt. Durch Aufnahme von Linienprofilen quer über den vertikalen Bleichstreifen sowohl in geschädigten, als auch in ungeschädigten Chromatin kann die mittlere Breite des Bleichstreifens bestimmt und verglichen werden, wobei die Grenze des Streifens auf halber Intensität definiert wird ("Halbwertsbreite"). Schließlich wird für jede Aufnahme (und damit jeden gemessenen Zeitpunkt) das Verhältnis von Halbwertsbreite des Bleichstreifens gemittelt über viele Profile im geschädigten Bereich zur mittleren Halbwertsbreite im ungeschädigten Bereich bestimmt. Dies hat den Vorteil, dass Halbwertsbreitenveränderungen, welche z.B. von einer Fokusverschiebung herrühren, durch die relative Messung minimiert sind. Bei einer starken Dekondensation des geschädigten Chromatins würde man eine Verringerung der Halbwertsbreite des geschädigten Bereichs erwarten. Das nach der oberen Methode bestimmte Verhältnis von geschädigter zu ungeschädigter Halbwertsbreite würde durch die Dekondensation also verringert.

In Diagramm 4.5 ist der zeitliche Verlauf des Halbwertsbreitenverhältnisses als Funktion der Zeit dargestellt. Über den Verlauf von 600 s ist keine Veränderung des Halbwertsbreitenverhältnisses messbar. Eine

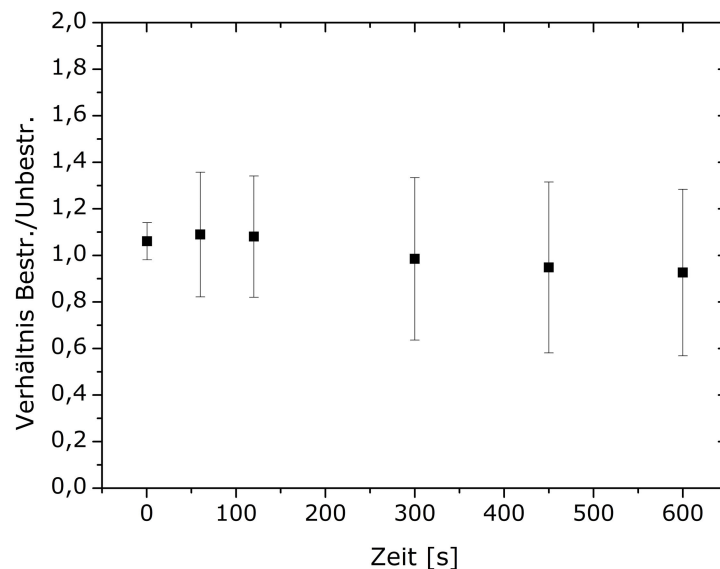


Abbildung 4.5: Zeitlicher Verlauf einer Dekondensationsmessung. Verlauf des gemittelten Verhältnisses der Breite des Bleichstreifens in bestrahltem zu unbestrahltem Bereich über 600 s nach Bestrahlung innerhalb eines Zellkerns für Bestrahlung wie in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt. Es ist keine Dekondensation feststellbar. Fehler entspricht Standardabweichung für $N = 3$. Aufnahme von Linienprofilen in ImageJ (NIH, Bethesda, USA) und Auswertung in OriginPro 8G (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Chromatindekondensation kann hier nicht nachgewiesen werden.

Bei allen Ansätzen (Abbildung 4.3) ist keine signifikante Dekondensation von Chromatin messbar. Es ist zu erwähnen, dass hier nur eine geringe Statistik zu Grunde liegt (Ansatz 1: $N = 3$, Ansatz 2: $N = 4$) und die Musterbestrahlung mit Kreisen sich als schwierig auswertbar herausstellt.

Einige Messungen mit einem externen Lasersystem [104], bei denen ein fokussierter 405 nm Laser sowohl bleicht, als auch schädigt, zeigt ebenfalls keine signifikante Dekondensation. Bei Verwendung eines photoaktivierbaren GFP (PAGFP) [105, 106] kann in manchen Fällen eine Dekondensation gemessen werden (Abbildungen 4.6). Hierbei aktiviert der 405 nm Laser das Fluoreszenzverhalten des PAGFP, sodass bei darauffolgender blauer Anregung der aktivierte Bereich grün fluoresziert. Gleichzeitig schädigt der 405 nm Laser die durch Hoechst-Färbung sensibilisierte DNA. Bei Betrachtung des photoaktivierten Zustandes über mehrere Minuten (Abbildungen 4.6 (b) und (c)) ist eine leichte Verbreiterung der photoaktivierten, geschädigten Linie erkennbar, wie auch in den Linienprofilen der Abbildung 4.7 gezeigt.

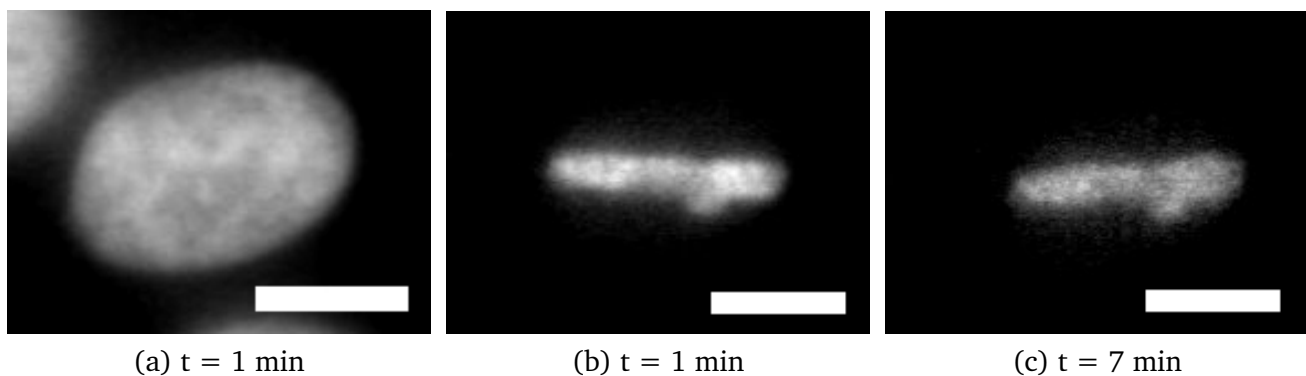


Abbildung 4.6: Dekondensation von Chromatin nach Laserbestrahlung mittels photoaktiviertem GFP. (a) Aufnahme von H2B-RFP einer HT1080 Zelle. (b) Durch 405 nm Laser photoaktiviertes H3-PAGFP in der selben Zelle. Dieser Bereich durch Laser gleichzeitig mit DNA Schäden durchsetzt, nachgewiesen durch XRCC1 (nicht gezeigt). (c) H3-PAGFP aus (b) 6 min später. Ausdehnung des aktivierten H3-PAGFP sichtbar. Skala entspricht $10 \mu\text{m}$ und Zeit nach Laserbestrahlung.

Diese Bewegung des H3 ist auf den DNA Schaden zurückzuführen und kann als Dekondensation des Chromatin verstanden werden.

Die Dekondensation ist erkennbar, da das aktivierte PAGFP im geschädigten Bereich einen hohen Kontrast gegenüber dem restlichen Zellkern zeigt. Bei weiteren lasergestützten Untersuchungen der Dekondensation ist daher möglichst ein photoaktivierter Farbstoff zu verwenden.

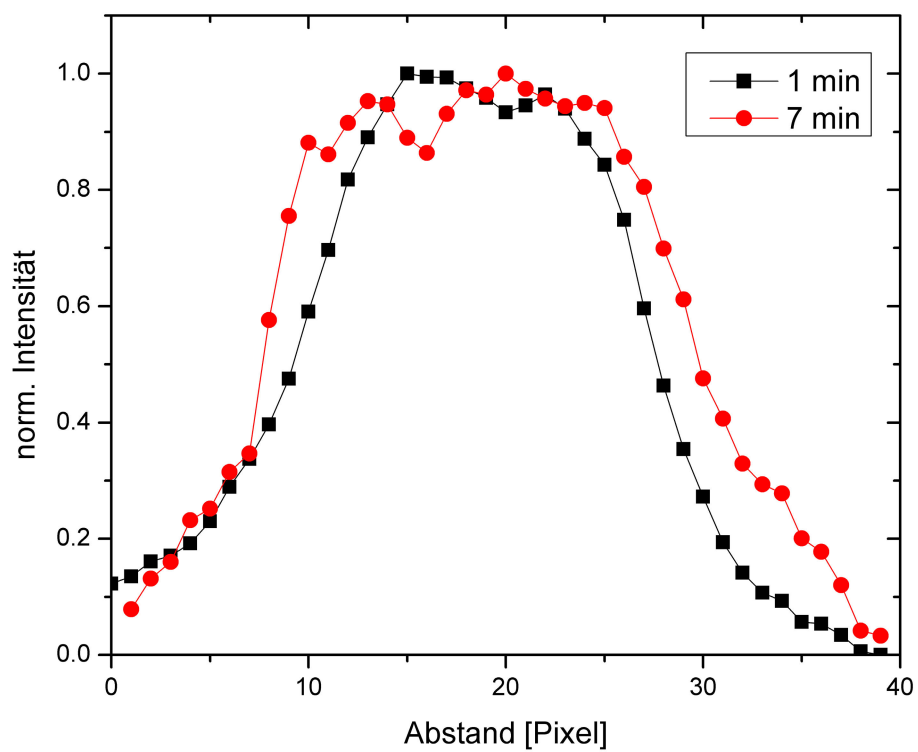


Abbildung 4.7: Linienprofile durch photoaktivierte und geschädigte H3-PAGFP Streifen aus Abbildung 4.6. Die Linienverbreiterung deutet auf eine Dekondensation hin.

4.3.3 Dekondensation von Heterochromatin nach gezielter Ionenbestrahlung

Während in den vorherigen Versuchen nach Bestrahlung mit schweren Ionen keine Dekondensation erkennbar ist, zeigt sich bei Experimenten mit ungezielter Bestrahlung eine Dekondensation von zufällig getroffenen Chromocentern von fixierten sowie lebenden Mauseellen [74, 107, 108, 109]. Diese Chromocenter stellen eine Ansammlung von stark kondensiertem Heterochromatin dar. Da die Wahrscheinlichkeit ein getroffenes Chromocenter bei ungezielter Bestrahlung mit einem zufälligen Strahlenbündel in-situ zu beobachten sehr gering ist, sollen diese Experimente an der Mikrosonde etabliert werden. Hierbei bildet die Verbesserungen der Auflösung (Kapitel 2.1) die Grundlage. Zuvor durchgeführte Experimente mit dem ursprünglichen Mikroskop zeigten, dass die Dekondensation nicht visualisiert werden konnte.

Zur Visualisierung der Chromocenter werden Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt und mit der Mikrosonde gezielt bestrahlt (Abbildungen 4.8 (a) und (b)). Die danach aufgenommenen Bildreihen zeigen deutlich, dass eine Dekondensation innerhalb getroffener heterochromatischer Bereiche erkennbar ist (beispielhaft gezeigt in Abbildungen 4.8). Zur Quantitativen Auswertung werden Linien-

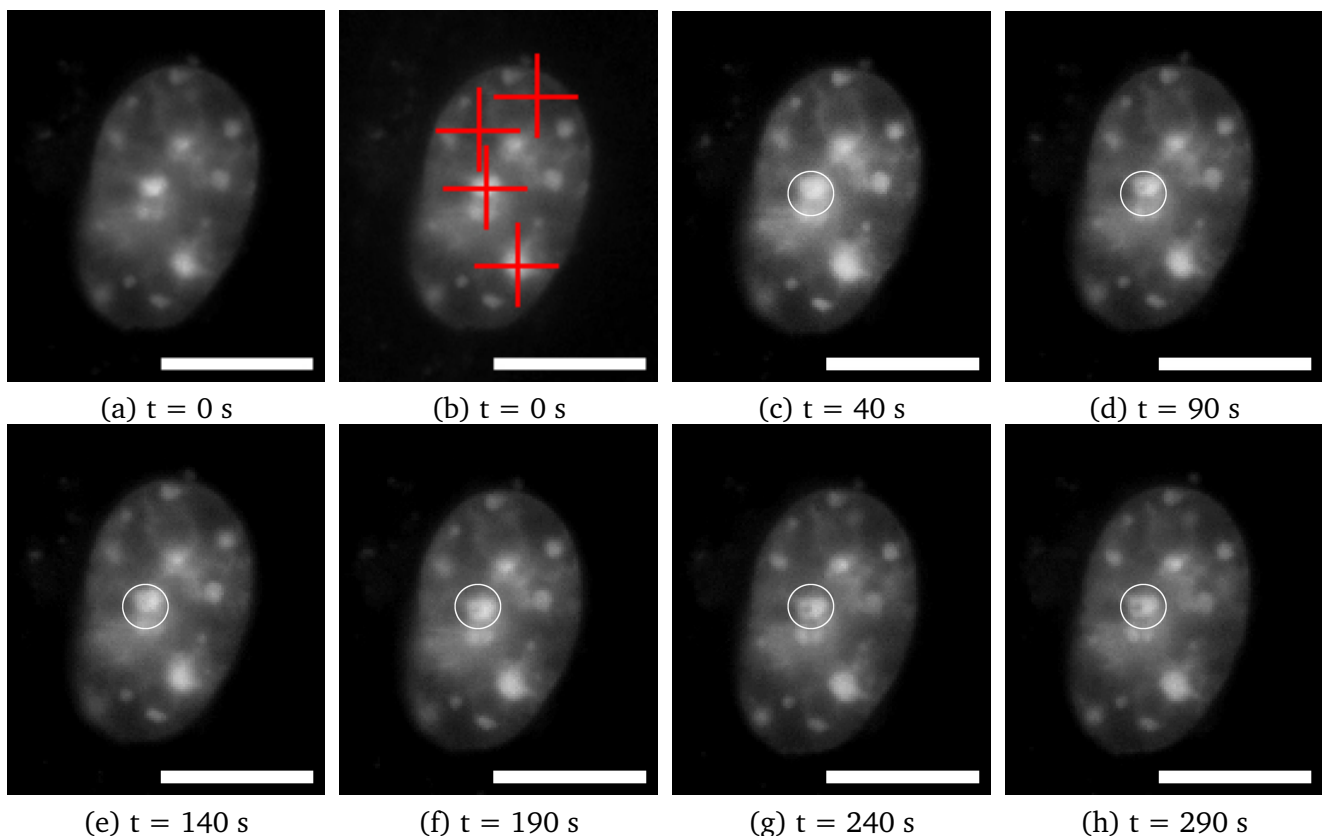


Abbildung 4.8: Lokale Dekondensation von Ionenbreffer in Heterochromatin in Mauseellen: DNA Färbung eines NIH3T3 Zellkerns mittels Hoechst 33342. Heterochromatische Bereiche sind durch erhöhte Fluoreszenzintensität visualisiert (a). Manuell werden einzelne Punkte in heterochromatischen und euchromatischen Bereichen ausgewählt und für die Bestrahlung mit einzelnen Titanionen ($LET = 2800 \text{ keV}/\mu\text{m}$) markiert (rote Kreuze) (b). Nach Bestrahlung erfolgt die Aufnahme einer Sequenz alle 5 s über 5 min. Gezeigt sind ausgewählte Aufnahmen der angegebenen Zeitpunkte nach Bestrahlung (c - h). Im umkreisten Chromocenter ist eine lokale Fluoreszenz-Verringerung über die Zeit erkennbar, welche die Dekondensation des Chromatins darstellt. Skala entspricht $10 \mu\text{m}$ und Zeit nach Ionenbestrahlung.

profilen entlang getroffener Chromocenter für unterschiedliche Zeiten nach Ionenbestrahlung betrachtet (Abbildung 4.9 links beispielhaft für markiertes Chromocenter aus Abbildung 4.8). Es ist eine Intensitätsverringering innerhalb des Chromocenters als Funktion der Zeit sichtbar, die als lokales Minimum im Linienprofil erscheint. Der zeitliche Verlauf gemittelt über einige getroffene Chromocenter ist in Abbildung 4.9 rechts zusammen mit dem mittlerem Intensitätsverlauf nicht bestrahlter Chromocenter dargestellt. Es ist ein signifikanter Unterschied und somit eine Dekondensation von getroffener Chromocenter erkennbar.

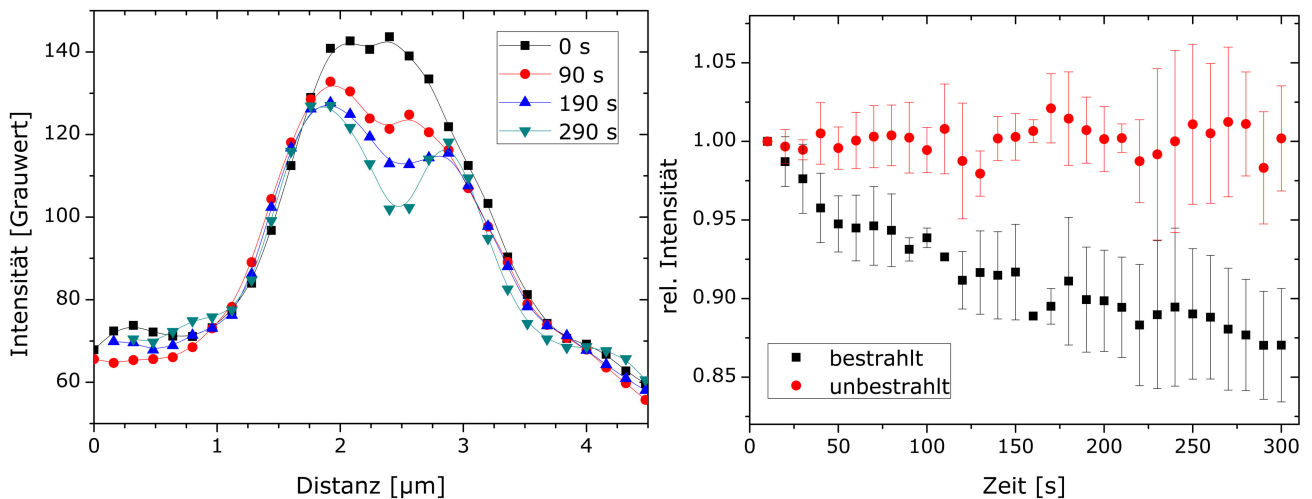


Abbildung 4.9: Zeitlicher Verlauf der Dekondensation von Heterochromatin: Links: Linienprofile durch HC für unterschiedliche Zeiten nach Bestrahlung mit einem Titanion ($LET = 2800 \text{ keV}/\mu\text{m}$). Dekondensation durch Intensitätsabfall erkennbar. Rechts: Intensitätsvergleich von bestrahltem ($N = 6$) und unbestrahltem ($N = 5$) Heterochromatin als Funktion der Zeit. Fehler entspricht Standardabweichung. [110]

Es zeigt sich, dass durch die Verbesserungen des Mikroskops (Abschnitt 2.1) die Messung der Dekondensation von Heterochromatin nach ionisierender Strahlung in-situ und in lebenden Zellen nun möglich ist. Dies erlaubt nun eine genauere Beobachtung mit einer statistisch signifikanten Menge an Chromatintreffern durchzuführen.

Diese neue Untersuchungsmöglichkeit wurde in Müller et al. [110] benutzt um zu zeigen, dass eine speziesunabhängige Dekondensation von geschädigtem HC existiert. So ist Dekondensation von Heterochromatin nicht nur in Mauszellen sondern auch im inaktiven X-Chromosom in menschlichen Fibroblastenzellen zu beobachten.

4.4 Reparaturprotein-Dynamik nach Ionenbestrahlung

In diesem Kapitel wird zunächst die Rekrutierung des Reparaturproteins Ku80 an Schäden in unterschiedlichen Chromatinstrukturen nach Ionenbestrahlung untersucht (Kapitel 4.4.1). In Anschluss wird zur Untersuchung der Austauschdynamik von Ku80 an Doppelstrangbrüchen die laserbasierte FRAP Methode verwendet (Kapitel 4.4.2).

4.4.1 Akkumulation von Ku80 in Abhängigkeit der Chromatindichte

Wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.3.1) existieren zwei Hauptmechanismen zur Reparatur von DSB [111, 112]. Dabei gilt die NHEJ gegenüber der HR als fehleranfälliger [97].

Bei der NHEJ spielen die Reparaturproteine Ku70 und Ku80 eine wichtige Rolle, da angenommen wird, dass diese die ersten Proteine am Schadenort sind (Abbildung 4.10) [113]. Dabei bilden diese ein ringförmiges Heterodimer welches sich an die DNA-Endstücke anbindet [114]. Im Anschluss wird DNA-PK_{CS} (DNA-PK catalytic subunit) am Schadensort rekrutiert, welches wiederum eine

Vielzahl von Reparaturproteinen durch Phosphorylierung aktiviert, und somit die Reparatur in Gang setzt. Dabei ist Ku80 essentiell für die Kontrolle der Rekrutierung und der Phosphorylierung von DNA-PK_{CS} [115].

Wie zuvor erwähnt (Kapitel 4.3.1) ist die Reparatur von DSB von der Chromatinstruktur abhängig.

Die grundsätzliche Idee besteht darin, gezielt Euchromatin (EC) und Heterochromatin (HC) zu bestrahlen und im Anschluss mögliche Unterschiede der Kinetiken von Ku80 in diesen Schadensbereichen zu untersuchen.

In NIH3T3 und MEF Zellen bildet HC relativ große Gebiete, die auch Chromocenter [116] genannt werden, eine typische Größe von 1-2 μm besitzen und einfach durch eine DNA-Färbung mittels Hoechst 33342 bei Anregung mit 365 nm Wellenlänge [117] visualisiert werden können. Um die Bewegung von Ku80 in lebenden Zellen zu beobachten, werden NIH3T3 und MEF Ku80 defiziente Zellen mit einem Fusionskonstrukt aus Ku80 + GFP transfiziert. Die Expression dieses Fusionskonstrukts ist anhand der grünen Fluoreszenz bei einer Anregung von 488 nm in den Zellen erkennbar.

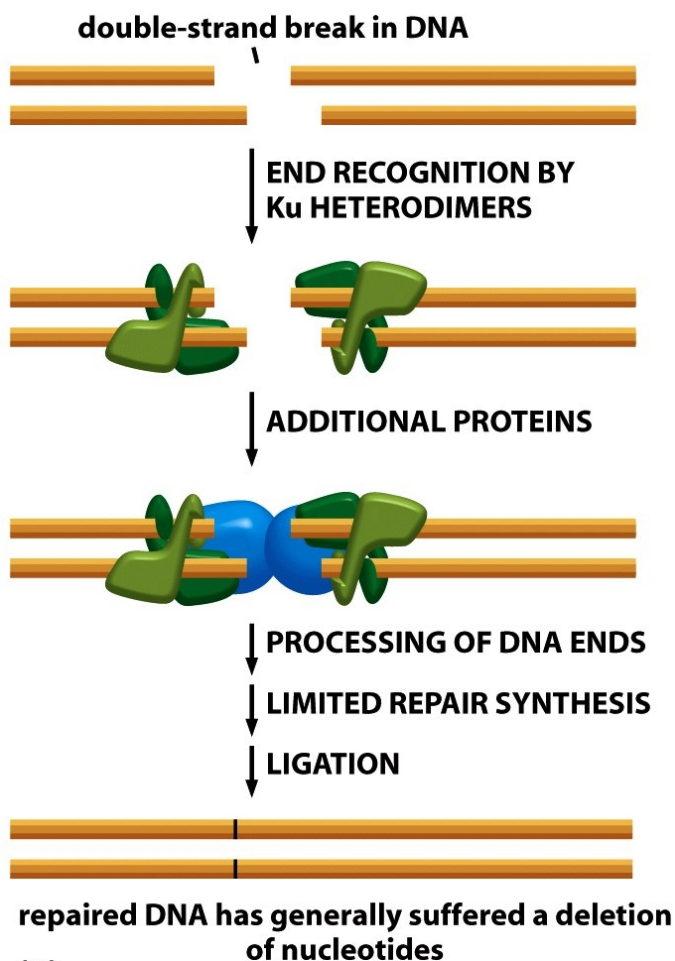


Abbildung 4.10: Schema des NHEJ Reparaturpfades. (Entnommen aus [49])

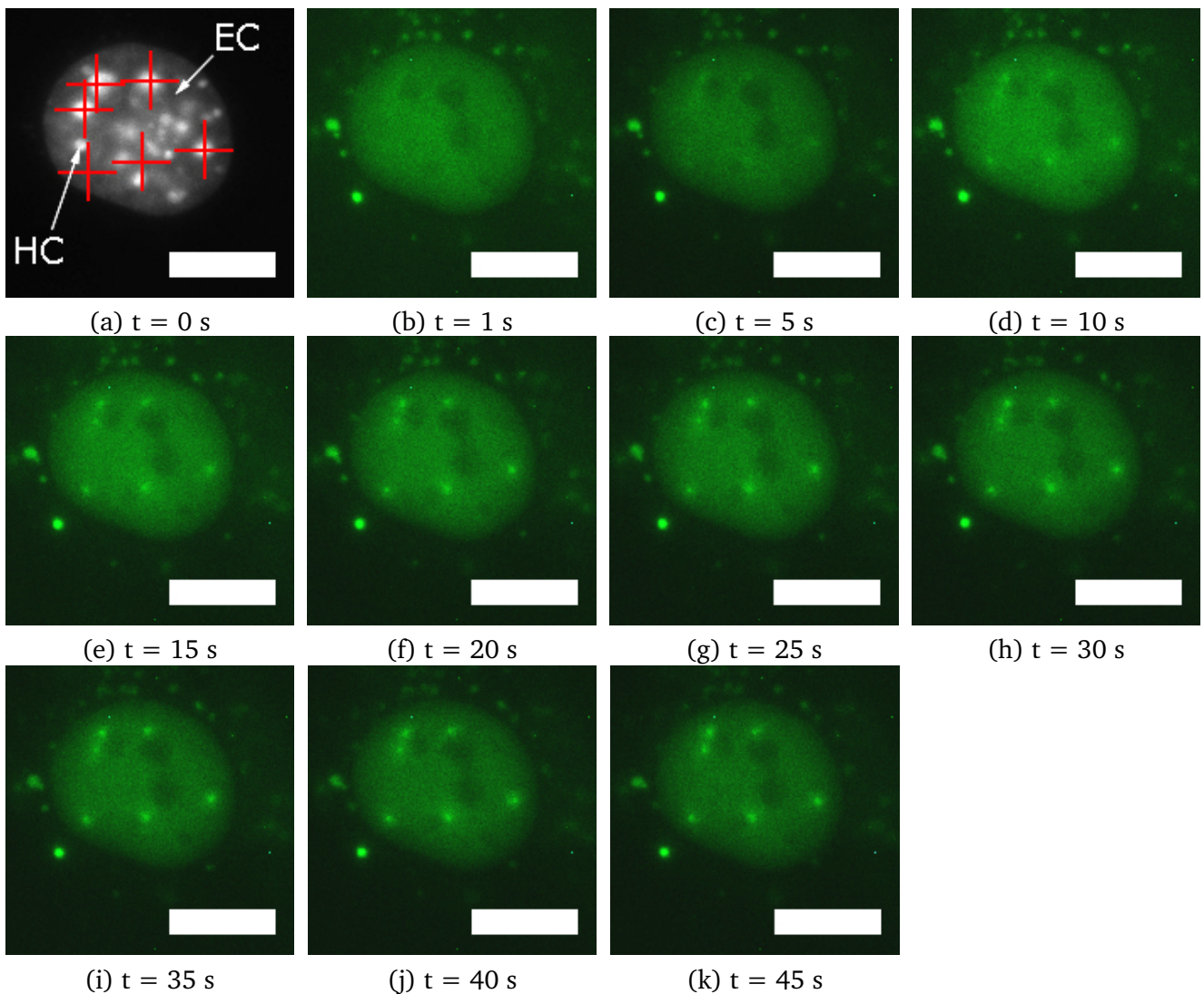


Abbildung 4.11: Messung der Rekrutierung von Ku80-GFP an Hetero- und Euchromatin: Aufnahme eines Zellkerns bei Hoechst Anregung (a) zur gezielten Bestrahlung von HC und EC mit einzelnen Goldionen ($LET = 12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$) (rote Kreuze). Im Anschluss Ku80-GFP Aufnahme einer Bildreihe alle 300 ms über mindestens 45 s. Auszugsweise hier dargestellt (b - k). Es ist eine Akkumulation von Ku80-GFP in den strahleninduzierten Schadensbereichen (Foci) erkennbar. Skala entspricht $10 \mu\text{m}$.

Vor der Bestrahlung ist eine homogene Verteilung von Ku80-GFP in den Zellen erkennbar (bis auf einige Bereiche, die Nucleoli darstellen) (Abbildung 4.11). Eu- und heterochromatische Bereiche werden angezielt und mit Ionen bestrahlt. Innerhalb weniger Sekunden ist eine Akkumulation von Ku80 in den strahlungsinduzierten Foci erkennbar. Durch die Auswertung der Foci-Position kurz nach Bestrahlung kann überprüft werden wo das Ion den Zellkern passiert hat und somit ob eindeutig HC oder EC getroffen wurde. Darüberhinaus ist so auch die Treffergenauigkeit der Mikrosonde messbar (Kapitel 2.1).

Zur Auswertung der Akkumulationskinetik von Ku80 muss der globale Verlust von Fluoreszenz (Abbildung 4.12), welcher mit zunehmender akkumulierter Belichtung einhergeht (photobleaching), kom-

pensiert werden. Hierzu wird die mittlere Fluoreszenzintensität des geschädigten Bereichs $F_{korrr.}(t)$ für die zum Zeitpunkt t gehörige Aufnahme berechnet mit [69]:

$$F_{korrr.}(t) = (F(t) - U(t)) \cdot \frac{G_0 - U_0}{G(t) - U(t)} \quad (4.1)$$

Dabei ist G_0 die Fluoreszenz pro Fläche gemittelt über den gesamten Zellkern vor Bestrahlung und U_0 die Fluoreszenz pro Fläche gemittelt über ein genügend großes, repräsentatives Gebiet außerhalb des Zellkernes vor Bestrahlung (Untergrund). $G(t)$, $U(t)$ und $F(t)$ sind Gesamtzellkernfluoreszenz, Untergrundfluoreszenz und Fokusfluoreszenz pro Fläche und zum jeweiligen Zeitpunkt t (Abbildung 4.12). Es ergibt sich also die Fokusfluoreszenz pro Fläche abzüglich eines zeitlich variablen Untergrund-offsets, normiert auf die ebenfalls zeitlich variable Gesamtfluoreszenz des Zellkerns zur Kompensation des photobleaching.

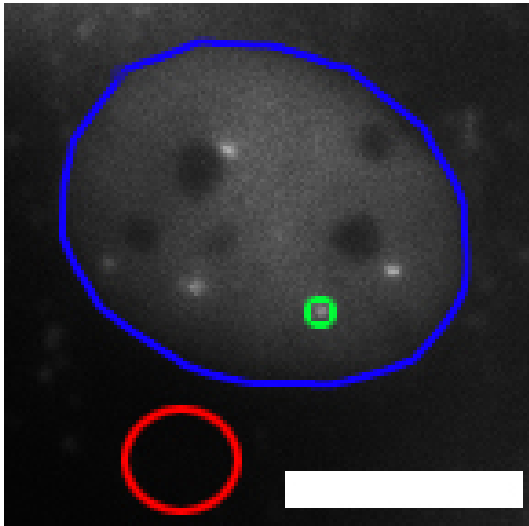


Abbildung 4.12: Ku80-GFP Aufnahme eines NIH3T3 Zellkerns und mit Markierungen der für die Bleichkorrektur notwendigen Bereiche. Blau: Gesamtintensität $G(t)$, Rot: Untergrund $U(t)$, Grün: geschädigter Bereich $F(t)$. Skala entspricht $10 \mu\text{m}$.

Die dadurch bleichbereinigten und untergrundbefreiten Intensitäten werden zur weiteren Auswertung normiert zwischen Intensität vor Bestrahlung und bis Erreichen eines Plateaus, welches durch vollständige Anlagerung von Reparaturproteinen an alle Schadensstellen gegeben ist. Sich daraus ergebenden Rekrutierungverläufe für HC und EC innerhalb eines Zellkerns sind beispielhaft in Abbildung 4.13 dargestellt.

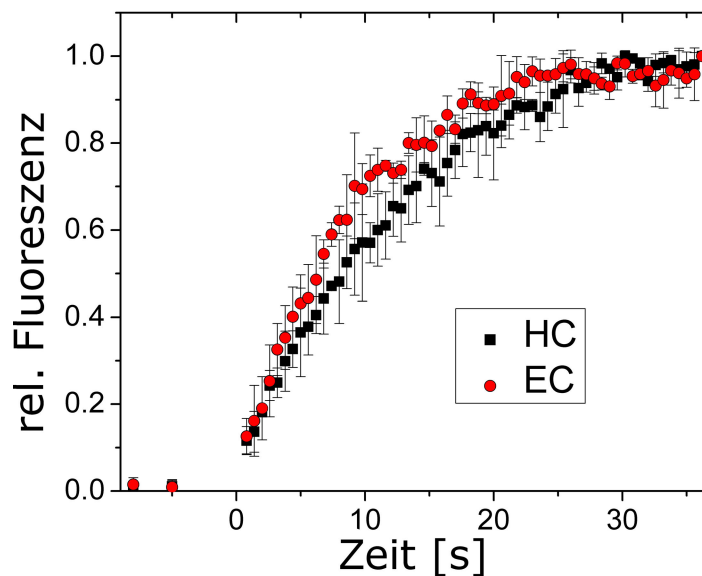


Abbildung 4.13: Typische Rekrutierungskurven von Ku80 für eindeutige Treffer in EC ($N = 3$) und HC ($N = 2$) innerhalb eines einzelnen NIH3T3 Zellkerns nach Bleich- und Untergrundkorrektur sowie Normierung. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung des Mittelwerts.

Als Fitfunktion wird häufig eine lineare Sprungantwort-Funktion erster Ordnung $I(t)$ verwendet [118, 119]:

$$I(t) = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.2)$$

Dabei stellt τ die Rekrutierungszeit in s dar. Diese Funktion spiegelt den Sachverhalt der DSB-Erzeugungen, welche als Stufe angesehen werden, und der daraus folgenden Akkumulation der Reparaturproteine bis zu einem bestimmten Grenzwert, gegeben durch endliche Anzahl der DSB, wieder [120, 121].

Zellen	Bereich	Anzahl Foci	τ [s]	Sigma [s]
NIH3T3 Ku80-GFP	HC	34	20 ± 2	12
	EC	59	15 ± 1	6
MEF-Ku80 ^{-/-} Ku80-GFP	HC	27	25 ± 3	12
	EC	55	21 ± 2	9

Tabelle 4.2: Übersicht der Rekrutierungszeiten in HC und EC für Ku80-GFP nach Bestrahlung mit Goldionen (LET = 12800 keV/ μ m). $\tau \pm$ Fehler des Mittelwertes, Sigma Standardabweichung.

Zusätzlich zu den Messungen in NIH3T3 Zellen sind die selben Messungen an MEF-Ku80^{-/-} Zellen in Tabelle 4.2 gezeigt. Die Verwendung von MEF-Ku80^{-/-} Zellen, in denen kein natürliches Ku80 vorkommt, das mit dem transfizierten Ku80-GFP um die Bindungsstellen am Schadensort konkurriert, soll dabei die Sichtbarkeit des Ku80-GFP verbessern. Die Messungen zeigen einerseits, dass die Rekrutierungszeiten in HC gegenüber EC erhöht sind, andererseits auch dass diese stark schwanken (große Standardabweichung).

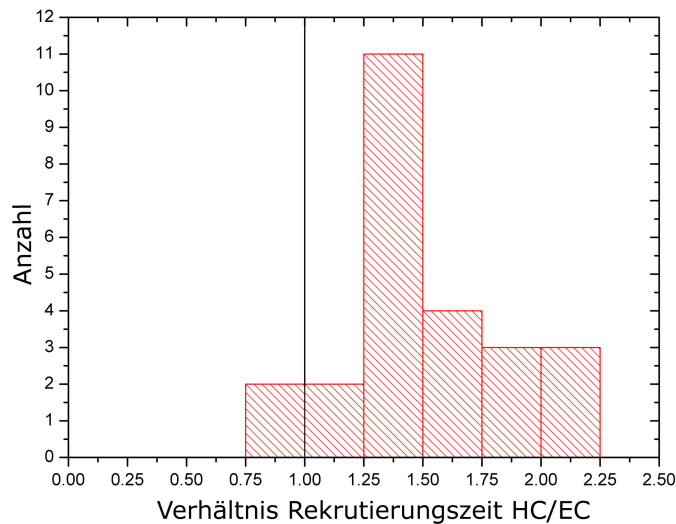


Abbildung 4.14: Histogramm der relativen Rekrutierungszeiten von Ku80-GFP als Verhältnisse von τ HC/EC in einzelnen NIH3T3 Zellen (N = 25) gemessen. Bestrahlt mit einzelnen Goldionen (LET = 12900 keV/ μ m).

Bei genauerer Betrachtung schwanken die Rekrutierungszeiten von Zelle zu Zelle, innerhalb einer Zelle jedoch deutlich weniger. Daher ist eine relative Messung von Rekrutierungszeiten innerhalb eines Zellkerns, der sichere Treffer in HC und EC aufweist, sinnvoller.

In Abbildung 4.14 ist ein Histogramm vieler solcher relativen Einzelzellmessungen dargestellt. Jeder Wert, d.h. jedes Verhältnis von Ku80 Rekrutierungszeit in geschädigtem HC zur Rekrutierungszeit in ge-

schädigtem EC, stammt aus Messungen innerhalb eines einzelnen Zellkerns.

Hier ist ein signifikanter Unterschied der Rekrutierungszeiten in HC zu EC erkennbar. Ku80-GFP benötigt dabei in NIH3T3 Zellen zur Rekrutierung in HC 50 % länger als in EC (Tabelle 4.3). Dieses Verhalten ist ebenfalls in MEF-Ku80^{-/-} Zellen erkennbar, jedoch nicht so ausgeprägt.

Zellen	Verhältnis Rekrutierungszeiten HC/EC	Anzahl Zellen
NIH3T3	1,5 ± 0,3	25
MEF-Ku80 ^{-/-}	1,3 ± 0,1	17

Tabelle 4.3: Mittlere relative Rekrutierungszeiten von Ku80-GFP in geschädigtem HC und EC. Einzelmessung des Verhältnisses innerhalb eines einzelnen Zellkerns. Mittelwert über Anzahl Zellen, Fehler des Mittelwerts. Bestrahlt mit einem Goldion pro Rekrutierungspunkt (LET = 12900 keV/μm).

Die Anzahl der Ku80-GFP Moleküle und somit die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Zahl der DSB [107, 122]. Somit kann durch einen relativen Vergleich der Fluoreszenzintensität von HC mit EC in einzelnen Zellen bestimmt werden, ob die DNA Konzentration einen Einfluss auf die Schadenskomplexität [123] hat.

In Abbildung 4.15 ist ein Histogramm der Fluoreszenzverhältnisse von Ku80-GFP Intensität in HC durch Intensität in EC dargestellt nach vollständiger Akkumulation von Ku80-GFP am Schadensort. Hier ist eine Verteilung zu sehen, in der HC gegenüber EC keinen signifikanten Unterschied aufweist. Dies bedeutet, dass die DNA Konzentration keinen oder einen sehr geringen Effekt auf die Gesamtzahl der Reparaturproteine am Schadensort hat.

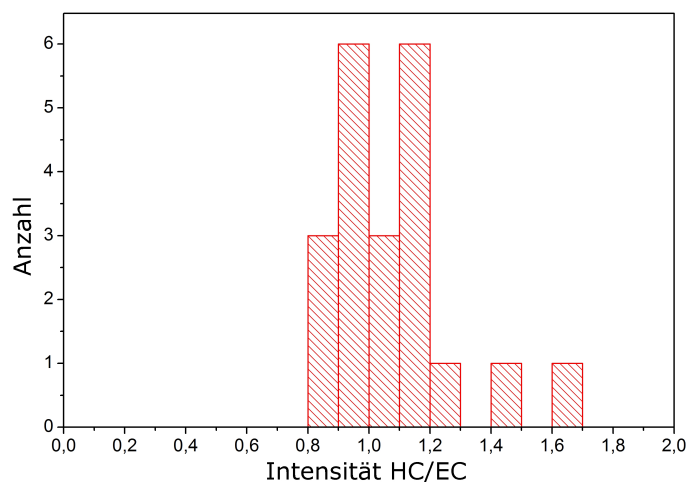


Abbildung 4.15: Histogramm des Verhältnisses von akkumuliertem Ku80-GFP in HC zu EC in NIH3T3 Zellen. Hierbei ist kein Unterschied erkennbar.

Diskussion der Ergebnisse zur Rekrutierung von Ku80-GFP

Durch die Messung der Rekrutierungszeiten von Ku80-GFP in HC und EC an strahleninduzierten Foci innerhalb von NIH3T3 und MEF-Ku80^{-/-} Zellkernen hat sich gezeigt, dass die Akkumulation von Ku80 in HC länger benötigt als in EC. Dies ist verwunderlich, da es Untersuchungen gibt, die zeigen, dass Rekrutierungszeiten anderer Reparaturproteine unabhängig von der Chromatindichte [74, 103, 124], jedoch die Reparaturdauer von der Chromatindichte abhängig ist [125, 126]. Auch gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass die Rekrutierungszeit von Reparaturproteinen von LET [119] und von der Komplexität des Schadens [127, 128] abhängig ist. Bei den meisten in der Literatur durchgeführten Untersuchungen ist eine gezielte Schadensinduzierung in unterschiedlichen Chromatinstrukturen innerhalb eines Zellkerns nicht möglich, sodass die breite Streuung der Rekrutierungszeiten unterschiedlicher Zellen einer Kultur einen Unterschied in den Rekrutierungszeiten der unterschiedlichen Chromatinbereiche verdecken.

4.4.2 Austausch von Ku80-GFP in Abhängigkeit der Chromatinstruktur

Nach Rekrutierung von ersten Reparaturproteinen an Schadensorten beginnt die Reparatur der DNA [52]. Die Verweildauer eines Reparaturproteins variiert sehr stark mit Ort und Art des Schadens (z.B. Chromatinstruktur, Komplexität, usw.) [127], der Funktion des Reparaturproteins und diversen anderen Faktoren [119, 52, 129, 130]. Reparaturproteine sind während Ausübung ihrer Funktion am Schadensort gebunden, befinden sich dabei aber auch im ständigen Austausch mit gleichartigen, ungebundenen Molekülen entsprechend des chemischen Bindungsgleichgewichts.

Um diesen Austausch zu untersuchen ist die zuvor beschriebene FRAP Methode (Kapitel 1.4) bestens geeignet.

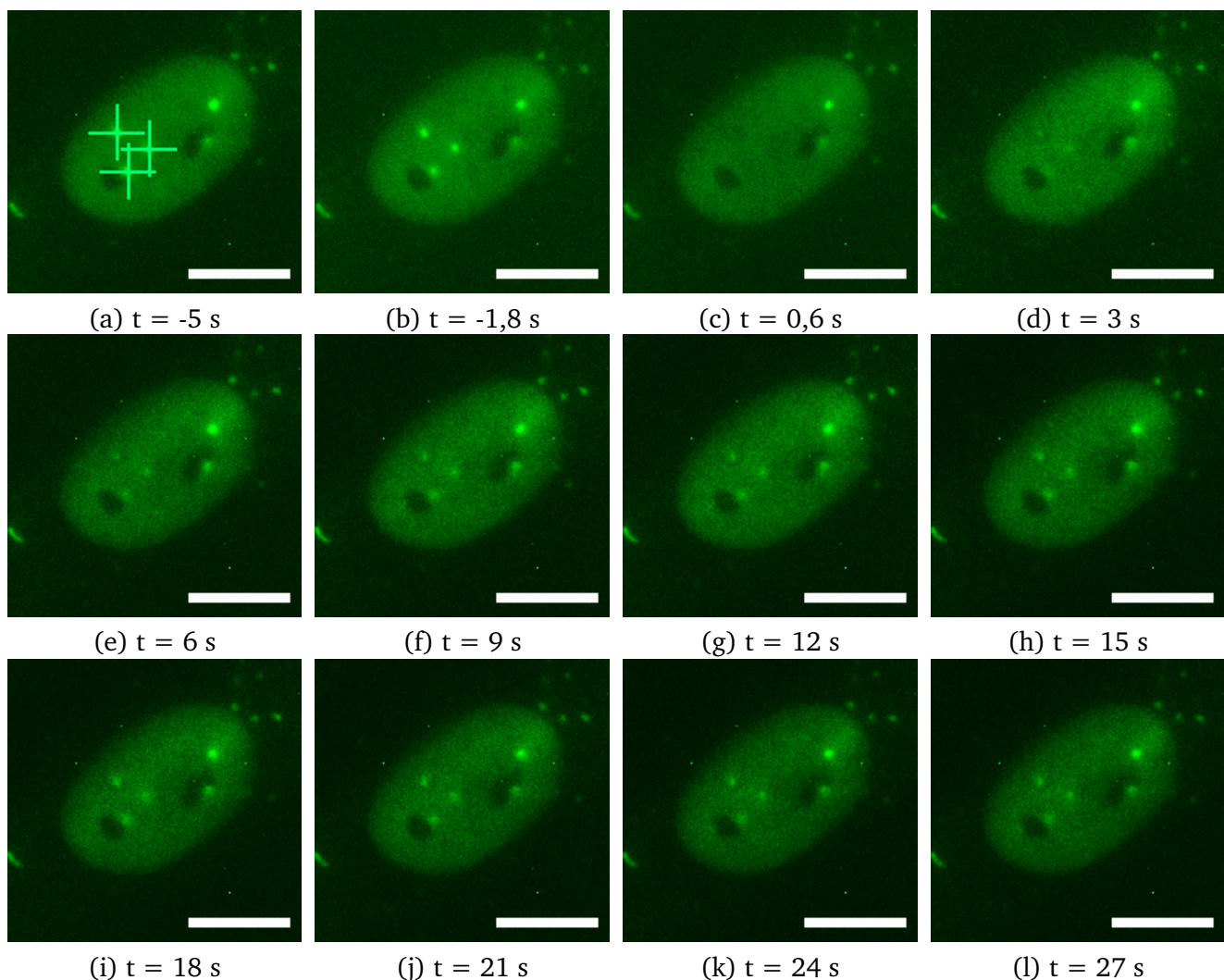


Abbildung 4.16: FRAP Messung von akkumuliertem Ku80-GFP an Schadensstellen beispielhaft in NIH3T3 Zellen. Das Ku80-GFP, welches nach Ionenbestrahlung in Foci akkumuliert vorliegt, dient als Ziel für das Bleichen durch einen fokussierten Laser (a) (grüne Kreuze). Anschließend folgt die Aufnahme einer Bildsequenz (b - l). Zwischen den Aufnahmen (b) und (c) werden die ausgewählten Ku80-GFP Foci mit fokussierten Laserpulsen von 40 ms Dauer und 1,25 mW Leistung gebleicht. Aufnahmen (c - l) zeigen in den zuvor gebleichten Bereichen das Wiederkehren der Fluoreszenz als Folge des Austauschs von irreversibel gebleichtem durch ungebleichtes Ku80-GFP aus der Umgebung. Skala entspricht 10 μm . Zeit t relativ zum Bleichen.

Nach der Akkumulation von Ku80-GFP in den strahleninduzierten Foci, welche wie zuvor beschrieben Informationen über die Rekrutierung ergibt, dienen diese Foci nun als Ziele (Abbildung 4.16 (a)) für das zuvor beschriebene Lasersystem (Kapitel 3).

Abbildung 4.16 zeigt dabei beispielhaft den Experimentablauf: Durch Bleichen (zwischen Abbildungen 4.16 (b) und (c)), und somit gezieltem Deaktivieren des Fluoreszenzverhaltens, gefolgt von Aufnahme einer Bildreihe (Abbildungen 4.16 (c - l)), kann der Austausch von Reparaturproteinen am Ort des DNA Schadens aufgenommen werden. Das Hinzuströmen von ungebleichten Molekülen des betrachteten Proteins aus der Umgebung des Schadensbereiches wird dabei als Zunahme der Fluoreszenzintensität am Ort des vorangehenden Bleichens messbar.

Zur Auswertung werden die mittleren Signale im ausgebleichten Bereich doppelnormiert auf die Signalintensität vor Bleichen und auf Verlust der Gesamtintensität des Zellkerns (ähnlich wie in Kapitel 4.4.1) [65, 131]:

$$F_{\text{doppelnormiert}}(t) = \frac{F(t) - U(t)}{F_0 - U_0} \cdot \frac{G_0 - U_0}{G(t) - U(t)} \quad (4.3)$$

Dabei ist $F(t)$ die mittlere Intensität des zu messenden Ku80 Focus, $G(t)$ die mittlere Intensität des gesamten Zellkernes, $U(t)$ die mittlere Intensität des Untergrundes gemessen außerhalb des Zellkerns und F_0 , G_0 , U_0 die Intensitäten vor Bleichen.

In Abbildung 4.17 sind die sich ergebenden gemittelten Verläufe für HC (N = 35) und EC (N = 38) dargestellt.

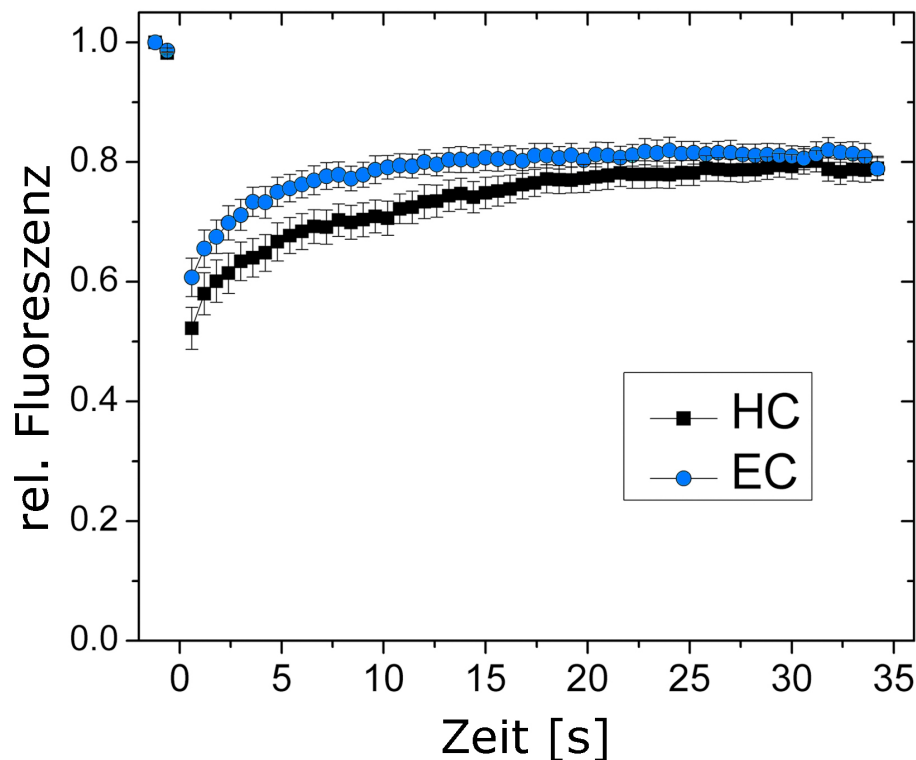


Abbildung 4.17: FRAP Kurven von HC und EC: Doppelnormierte gemittelte Verläufe von HC (N = 35) und EC (N = 38). Fehler des Mittelwerts.

Modellierung der FRAP-Kurven

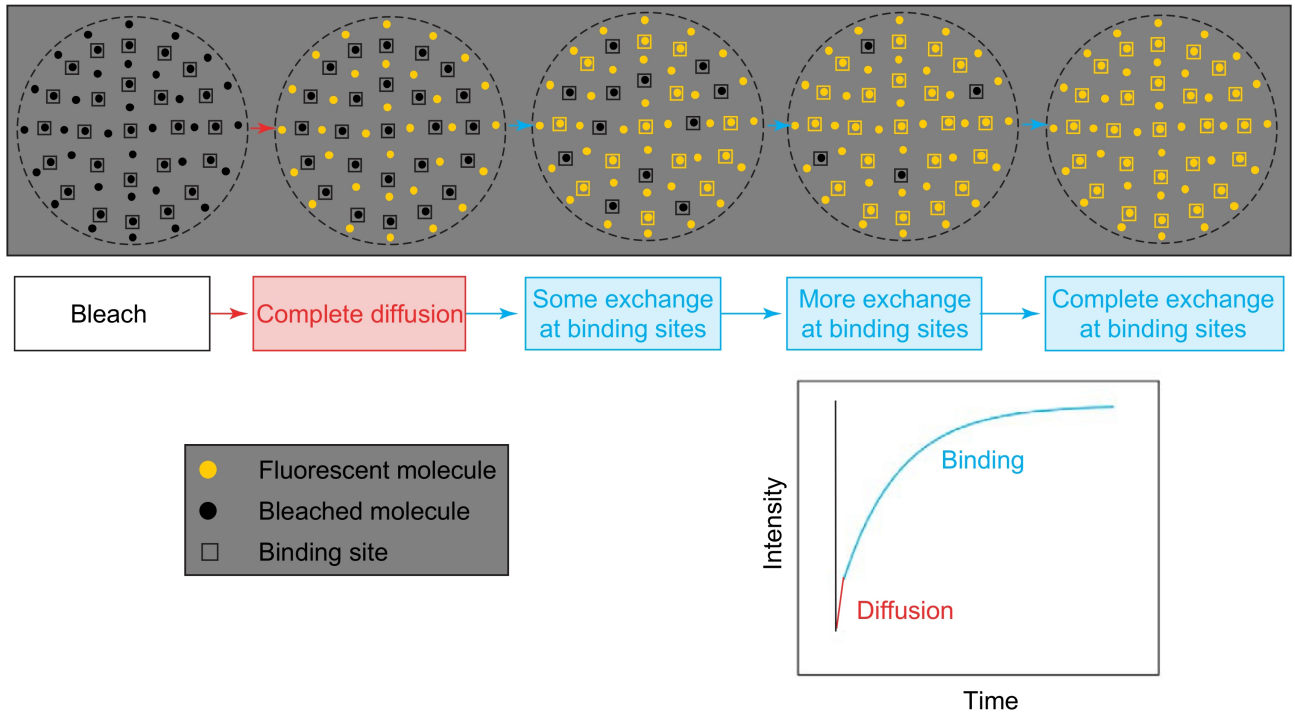
Durch das immer größere Interesse an der Messung von Proteinkinetiken sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Modellen und Kurvenmodellierungen zur Interpretation der gemessenen FRAP-Kurven entstanden [62, 83, 132, 133, 134]. Dabei lassen sich nach Sprague und McNally [135] zwei Fälle unterscheiden, der diffusionsentkoppelte und der diffusionsgekoppelte Fall. Beim diffusionsentkoppelten Fall ist die Diffusion des Reparaturproteins wesentlich schneller als der Proteinaustausch, wodurch die Austauschkinetik an den Bindungsstellen dominant ist. Im diffusionsgekoppelten Fall hingegen ist der Austausch von Molekülen an der Bindungsstelle diffusionsbegrenzt, also so schnell, dass der Nachschub von Molekülen aus hinreichend weit entfernten Volumina die Gesamtkinetik dominiert. Für beide Fälle ergeben sich unterschiedliche Ergebnisse zu Diffusionszeiten und Bindungsraten und damit unterschiedliche Interpretationsmöglichkeiten. Die Diffusionszeit ist die Zeit, die ein Molekül benötigt um in den gebleichten Bereich zu gelangen. Die Bindungsrate ist das Produkt aus Bindungsfrequenz und der Anzahl der möglichen Bindungsstellen im Gleichgewichtszustand [135]. In Abbildung 4.18 sind beide Fälle dargestellt. Beim diffusionsentkoppelten Fall ist die Diffusionszeit im Vergleich zur Bindungsrate signifikant geringer, wohingegen beim diffusionsgekoppelten Fall die Diffusionszeit geringer oder gleich der Bindungsrate ist.

Zur Unterscheidung welcher Fall vorliegt, existieren mehrere Ansätze. Ein Ansatz besteht darin, einen Bereich zu Bleichen und die Wiederkehr der Fluoreszenz an mehreren Stellen innerhalb des gebleichten Bereichs zeitlich zu verfolgen. Falls die Diffusionszeit viel schneller als die Bindungsrate ist, sollte der gemessene Fluoreszenzverlauf ortsunabhängig sein. Alle betrachteten Stellen im gebleichten Bereich werden unabhängig von ihrer Entfernung zum Reservoir ungebleichter Moleküle, also der Grenze des Bleichbereichs gleichzeitig von eindiffundierenden fluoreszierenden Molekülen durchsetzt. Somit liegt ein diffusionsentkoppelter Fall vor [131]. Falls sich andererseits betrachtete Stellen in Randlage des gebleichten Bereichs deutlich schneller vom Ausbleichen der Fluoreszenz erholen als zentrale Stellen, kann davon ausgegangen werden, dass die Zeit, die die fluoreszierende Moleküle zum Eindiffundieren benötigen eine erhebliche Rolle spielt. Ein weiterer Ansatz ist das Bleichen mehrerer unterschiedlich großer Bereiche. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Diffusion, jedoch nicht die Reaktionskinetik, abhängig von der Bleichgröße ist [136].

Der hier verwendete Ansatz besteht darin, neben dem Bleichen von schadensinduzierten Ku80-GFP Foci in HC und EC zusätzlich in einigen Zellen ungeschädigte Bereiche zu Bleichen und FRAP-Kurven aufzunehmen. Da in diesen Bereichen keine Schädigungen vorliegen und somit vermutlich keine Bindungsstellen existieren, entspricht dies reinen proteinspezifischen Diffusionskurven. Somit kann durch Vergleich der Verläufe von reiner Diffusion und Diffusion mit Bindungsstellen sehr einfach zwischen den unterschiedlichen Fällen unterschieden werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das reine GFP Molekül (26,9 kDa) im Zellkern nach Bleichen weniger als 1 s benötigt um zum Ausgangswert zurückzukehren [135, 137]. Genauer betrachtet besitzt das reine GFP Molekül eine Diffusionskonstante von $20 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ [135]. Für das freie Ku80-GFP Molekül (Größe von 106,9 kDa zusammengesetzt aus 80 kDa für Ku80 und 26,9 kDa für GFP) wird eine Diffusionskonstante von $14,3 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ berichtet [138], wodurch dieses wie freies GFP innerhalb von 1 s zu seinem Ausgangswert zurückkehren sollte.

(a) Diffusion-uncoupled FRAP



(b) Diffusion-coupled FRAP

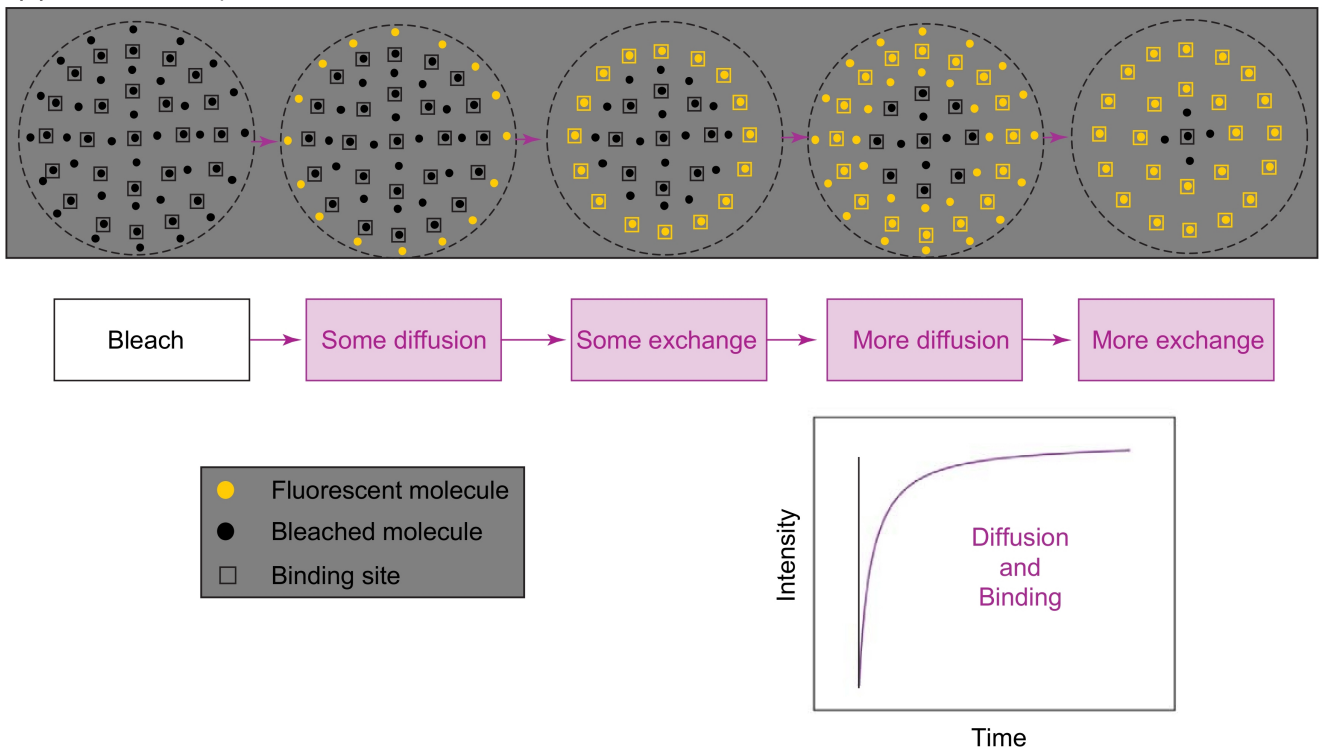


Abbildung 4.18: Schematische Darstellungen der beiden von Sprague und McNally [135] beschriebenen Fälle: (a) Diffusionsentkoppelter Fall, bei dem nach Bleichen eine schnelle Diffusion stattfindet, gefolgt durch eine langsamere Austauschkinetik an den Bindungsstellen. (b) Diffusionsgekoppelter Fall, bei dem die Austauschkinetik an den Bindungsstellen in der gleichen Größenordnung oder schneller als die Diffusion ist und somit beide gekoppelt sind. (Darstellung modifiziert übernommen aus [135])

Die zeitliche Auflösungsfähigkeit des Mikroskopes, limitiert durch die CCD-Kamera, erlaubt bei der bestmöglichen räumlichen Auflösung eine maximale Bildaufnahmezeit von 5 Bildern pro Sekunde. Es zeigt sich bei Aufnahme von FRAP-Kurven ohne Schädigung, dass die zeitliche Auflösungsfähigkeit des Mikroskopes nicht ausreicht, um die Diffusionskonstante mit hinreichender Qualität abzubilden. Ein Zurückkehren zum Ausgangsniveau innerhalb der ersten Sekunde kann jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung der in Abbildung 4.17 gezeigten FRAP-Kurven in HC und EC ist eine Halbwertszeit zu erkennen, die signifikant größer ist als bei reiner Diffusion (< 1 s). Somit kann für die weitere Auswertung von einem diffusionsentkoppeltem Fall ausgegangen werden.

Berechnung von Diffusionskonstanten aus FRAP Messungen

Es existieren eine Vielzahl von theoretischen Beschreibungen zur Auswertung der FRAP Aufnahmen [139], diese variieren mit dem Bleichmuster, Diffusions und Bindungsverhalten, Anzahl und Position der Bindungsstellen und anderen Faktoren (zusammengefasst in [62]).

Zum Vergleich mit Literaturwerten und damit einhergehend zur Validierung der FRAP Messungen dient das Modell nach Axelrod et al. [66], welches eines der Standardmodelle darstellt. Es ist ursprünglich für die zweidimensionale Diffusion von Proteinen in Zellmembranen ausgelegt, wird jedoch auch benutzt um die Diffusion von Proteinen in drei Dimensionen, sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma zu beschreiben [140]. Das Modell geht von einer stationären Verteilung (engl. steady-state) aus, bei der die Molekülbewegung einer unbeschränkten Zufallsbewegung (engl. random walk) folgt und bezieht auch die Bleichparameter mit ein [66].

Als Ergebnis der theoretischen Betrachtung von Axelrod et al. [66] ergibt sich die effektive Diffusionskonstante D aus:

$$D = \frac{\omega^2 \cdot \gamma}{4 \cdot \tau_{1/2}} \quad (4.4)$$

Dabei ist ω der Radius des fokussierten Laserstrahls, γ ein Korrekturfaktor für die tatsächliche Bleichtiefe und $\tau_{1/2}$ die durch Fitten einer monoexponentiellen Funktion erhaltene Halbwertszeit.

Diffusionskonstante von Ku80-GFP am Schadensort

Die sich durch einen monoexponentiellen Fit ergebenden Halbwertszeiten für Ku80-GFP in HC und EC sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Ebenfalls sind die sich aus der Formel 4.4 ergebenden Diffusionskonstanten D eingetragen.

In der Literatur wird für Ku80-GFP in HeLa Zellen nach Gamma-Bestrahlung ohne Unterscheidung nach HC/EC eine Diffusionskonstante von $\sim 0,35 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ berichtet [141]. Dieser Wert ist in sehr guter Übereinstimmung mit den in Tabelle 4.3 gezeigten Werten für EC.

In Tabelle 4.4 ist ein Unterschied der Halbwertszeiten von Ku80-GFP in HC und EC erkennbar, der unabhängig von der Zellsorte scheint.

Bei genauerer Betrachtung der Messdaten zeigt sich eine Variation der Halbwertszeiten von Zelle zu Zelle. Zum Vergleich der Diffusionskonstanten von HC und EC ist ganz analog zu 4.4.1 eine relative Be-

Zellen	Zellbereich	Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ [s]	Anzahl Messungen	Diff.konst. D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$]
NIH3T3	HC	$4,2 \pm 0,4$	35	$0,24 \pm 0,02$
	EC	$2,8 \pm 0,5$	38	$0,36 \pm 0,06$
MEF-Ku80 ^{-/-}	HC	$5,3 \pm 0,7$	18	$0,22 \pm 0,04$
	EC	$3,4 \pm 0,6$	30	$0,35 \pm 0,07$

Tabelle 4.4: Halbwertszeiten und errechnete Diffusionskonstanten von Ku80-GFP an strahleninduzierten Foci in HC und EC nach Bleichen, gemessen in NIH3T3 und MEF-Ku80^{-/-} Zellen. Jeweils Fehler des Mittelwerts.

trachtung mit eindeutigen Treffern sowohl in HC, als auch in EC innerhalb einzelner Zellkerne sinnvoller. In Tabelle 4.5 ist dieser relative Vergleich zusammengefasst. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied von HC zu EC. Dies bedeutet das in HC der Austausch von Ku80-GFP ungefähr 50 % länger benötigt als in EC.

Zellen	Verhältnis Halbwertszeiten HC/EC	Anzahl Zellen
NIH3T3	$1,5 \pm 0,1$	11
MEF-Ku80 ^{-/-}	$1,5 \pm 0,2$	5

Tabelle 4.5: Verhältnis der mittels FRAP gemessenen Halbwertszeiten von Ku80-GFP in HC und EC. Verhältnis innerhalb einzelner Zellen mit eindeutigen Treffern sowohl in HC, als auch EC bestimmt und anschließend über mehrere Verhältnisse gemittelt.

Bindungs- und Dissoziationsraten für Ku80-GFP in HC und EC

Der Austausch von Ku80-GFP kann durch Bindungs- und Dissoziationsrate beschrieben werden. Nach der theoretischen Betrachtung von Sprague et al. [136] kann für den diffusionsentkoppelten Fall (Reaktion dominant) durch Fitten folgender Funktion relativ einfach die Bindungs- und Dissoziationsrate ermittelt werden:

$$FRAP(t) = 1 - C_{eq} \cdot e^{-k_{off}t} \quad (4.5)$$

Hierbei entspricht k_{off} der Dissoziationsrate in Hz, und die Bindungsrate k_{on}^* in Hz kann über

$$k_{on}^* = -\frac{C_{eq} \cdot k_{off}}{C_{eq} - 1} \quad (4.6)$$

bestimmt werden. Dabei wird angenommen, dass ein Gleichgewichtszustand herrscht und keine neuen Bindungsstellen erzeugt werden. Dies entspricht unserem Fall, da nach Ionenbestrahlung eine Rekrutierung stattfindet bis zu einem Gleichgewichtszustand, und die FRAP Messungen nach Erreichen dieses Zustandes stattfinden (nach ca. 1 min).

Es zeigt sich ein Unterschied zwischen HC und EC in den jeweiligen Raten für beide betrachteten Zelltypen 4.6. Dabei ist

Zellen	Zellbereich	Anzahl Messungen	Bindungsrate k_{on}^* [Hz]	Dissoziationsrate k_{off} [Hz]
NIH3T3	HC	35	$0,15 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,04$
	EC	38	$0,22 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,07$
MEF-Ku80 ^{-/-}	HC	18	$0,04 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$
	EC	30	$0,09 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,03$

Tabelle 4.6: Aus FRAP Messungen sich ergebende Werte für Bindungs- und Dissoziationsraten. Werte für den jeweiligen Bereich berechnet und anschließend gemittelt.

Mobile und immobile Fraktion von Ku80-GFP in HC und EC

Es zeigt sich, dass in den hier betrachteten Zeiten von bis zu einer Minute die FRAP Kurven an DSB nicht zu der Ausgangsintensität zurückkehren (Abbildung 4.17). Es gibt auch Beschreibungen, die erlauben aus den gewonnenen Daten Informationen über mobile und immobile Fraktionen von Ku80-GFP am DSB zu erhalten [82, 142].

Nach Lippincott-Schwartz et al. [140, 143] kann die mobile Fraktion M_f über folgende Formel berechnet werden:

$$M_f = \frac{F_\infty - F_0}{F_i - F_0} \quad (4.7)$$

Hierbei ist F_i die Intensität vor Bleichen, F_0 die Intensität nach Bleichen und F_∞ die Fluoreszenzintensität des Plateubereichs. Durch die zuvor beschriebene Doppelnormierung (Formel 4.3) entspricht die Intensität des Plateubereichs der mobilen Fraktion. Die sich daraus ergebenden Fraktionen sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst:

Zellen	Zellbereich	Anzahl Messungen	Mobile Fraktion	Immobilie Fraktion
NIH3T3	HC	35	$0,52 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,07$
	EC	38	$0,54 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,04$
MEF-Ku80 ^{-/-}	HC	18	$0,54 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,03$
	EC	30	$0,57 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,03$

Tabelle 4.7: Ermittelte Werte für mobile und immobile Fraktionen von Ku80-GFP an DSB. Für jede Kurve einzeln bestimmt und im Anschluss gemittelt.

Interessanterweise zeigt sich, dass in der betrachteten Zeit von bis zu einer Minute, eine große immobile Fraktion von Ku80-GFP am Schadensort existiert, welche nicht ausgetauscht wird. Diese große immobile Fraktion scheint weder zell- noch chromatinstrukturabhängig zu sein.

Dies zeigt, dass ein großer Teil von Ku80 bei der Reparatur stark gebunden ist und entweder nicht oder mit einer sehr langsamen, hier nicht betrachteten Kinetik, ausgetauscht wird.

Diskussion der Ergebnisse zum Austausch von Ku80-GFP an DNA-Schadensorten

An den hier gezeigten Untersuchung des Austausches von Reparaturprotein Ku80-GFP an DSB, welche zuvor mittels gezielter Ionenbestrahlung induziert wurden, kann gezeigt werden, dass das neu hinzugefügte Lasersystem bestens geeignet ist um gezielt strahleninduzierte Foci zu Bleichen und deren Austauschkinetik zu untersuchen.

Durch zusätzliches Bleichen in ungeschädigten Bereichen, kann reine Diffusion von Ku80-GFP ohne Bindung gemessen werden. Es zeigt sich allerdings, dass die vorhandene zeitliche Auflösungsfähigkeit des Mikroskopes diese schnelle Kinetik (< 1 s Halbwertszeit) nicht mit hinreichender Genauigkeit erfassen kann. An Schadensbereichen ist diese jedoch langsamer und kann durch eine diffusionsentkoppelte Kinetik, bei der die Diffusion vernachlässigt werden kann und die Reaktion dominant ist, näher untersucht werden.

Eine genauere Auswertung mittels einer Standardauswertemethode zeigt, dass die so erhaltenen Diffusionskonstanten vergleichbare Größen haben, wie die aus der Untersuchung nach Gamma-Bestrahlungen bestimmten Werte aus der Literatur. Die durch die Integration eines Lasersystems hinzugefügte FRAP Methode kann daher als verifiziert angesehen werden.

Interessanterweise ist ein Unterschied im Austauschverhalten von Ku80-GFP in HC gegenüber EC in NIH3T3 und MEF-Ku80^{-/-} Zellen erkennbar, bei den HC einen 50 % langsameren Austausch gegenüber EC aufweist. Dieser Unterschied ist signifikant bei Betrachtung des Verhältnisses von HC/EC FRAP-Zeiten, das innerhalb einzelner Zellkerne bestimmt und erst danach über alle vermessenen Zellen gemittelt wird. Hierdurch wird vermieden, dass Effekte die Auswertung beeinflussen, die FRAP-Zeiten von Zelle zu Zelle innerhalb einer Kultur variieren lassen. Ein Unterschied zeigt sich ebenfalls bei Betrachtung der Dissoziations- und Bindungsraten. Bei Bestimmung der mobilen und immobilen Fraktion, für den betrachteten Zeitraum von bis zu einer Minute, existiert eine große immobile Fraktion von ~46 % die weder von der Zelllinie, noch von der Chromatinstruktur abhängig ist.



5 Schlussfolgerung

Diese Arbeit verbessert und erweitert die an der Schwerionen-Mikrosonde durchführbaren radiobiologischen Untersuchungsmöglichkeiten zur Reparatur von Zellen nach Bestrahlung mit energiereichen Ionen und ermöglicht damit neue, bisher nicht untersuchbare, Erkenntnisse.

Bedingt durch die speziellen Anforderungen der Mikrosonde, welche eine hohe thermische und mechanische Stabilität erfordert, sind viele standardisierte Möglichkeiten nur zum Teil verwendbar. Daher ist das dedizierte Epifluoreszenz-Mikroskop bisher hauptsächlich zur Visualisierung der Zellen vor gezielter Bestrahlung verwendet worden [70, 71, 144]. Nach ersten vielversprechenden in-situ und in-vivo Untersuchungen [28, 40] war das Interesse an einer Mikroskopie mit guter räumlicher und zeitlicher Auflösung groß.

Die hier durchgeführte Integration eines Wasser-Immersionsobjektivs und damit einhergehenden Anpassungen wird die Stabilität des Systemes beibehalten und steigert die Auflösungsfähigkeit beträchtlich [77, 145]. Eine praktisch hysteresee- und kriechfreie Fokussierung ist nun durch einen Piezo-Linearaktor realisiert, der eine relative Verschiebung des Objektivs gegenüber Mikroskop und Zellgefäß zulässt und auch automatisierte tiefenaufgelöste Aufnahmen ermöglicht.

Die Mikrosonde wird seit einigen Jahren verwendet um Heterochromatin, welches eine typische Größe von $\sim 1 - 2 \mu\text{m}$ und Bereiche mit dichter DNA darstellt, gezielt zu bestrahlen um anschließend durch ex-situ Analyse eine Dekondensation dieser Bereiche zu untersuchen [74, 76, 109]. Durch die mikroskopischen Verbesserungen ist diese Dekondensation nun auch in-situ messbar. Darüberhinaus zeigen erste Untersuchungen eine speziesunabhängige Dekondensation nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung [110].

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) stellt eine große Herausforderung für Zellen dar, daher ist die Reparatur dieser biologisch extrem wichtig und interessant. Bei der Reparatur stehen zwei Hauptmechanismen zur Verfügung, wobei im Mechanismus der „Nicht Homologen Endverknüpfung“ [112], welcher als fehleranfälliger gilt [97], Ku80 eine besondere Rolle spielt [113]. Ku80 ist einer der ersten Reparaturproteine am DSB und besitzt daher eine relativ schnelle Kinetik.

Bei Untersuchung der Kinetik dieses Reparaturproteines in Abhängigkeit von der Chromatinstruktur zeigt sich, dass die Rekrutierung in Heterochromatin signifikant langsamer stattfindet als in Euchromatin. Diese neue Beobachtung ist bisher nach Ionenbestrahlung nicht beschrieben, was die Vorteile einer gezielten Bestrahlung in Kombination einer guten zeitlichen und räumlichen Auflösung deutlich macht.

Ku80 wird an den Schadensbereichen nicht nur rekrutiert, sondern es findet ein Austausch der gebundenen Proteine statt. Dieser Austausch kann über die FRAP Methode (engl. Fluorescence Recovery After Photobleaching) untersucht werden, welche darauf basiert, dass das Fluoreszenzverhalten von Proteinen in definierten Bereichen gezielt durch Bleichen deaktiviert wird und der Austausch mit un-

gebleichten Proteinen aufgenommen und im Anschluss analysiert wird [62, 66, 140, 146]. Damit diese Methode verwendet werden kann, ist ein fokussierter Laserstrahl notwendig, der neben den zuvor erwähnten mikrosonden-, auch mikroskopie- und biologiespezifische Randbedingungen erfüllen muss. Um den Laserstrahl in das existierende optische und mechanische System zu integrieren ist eine Simulation notwendig auf der die optische und mechanische Realisierung beruht. Nach Implementierung einer Lasersystem-Programmerweiterung in das Mikrosonden-Kontrollprogramm kann es als zusätzliche Option verwendet werden [145, 147].

Dieses Lasersystem wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut und dann verwendet um das zuvor rekrutierte Ku80-GFP am Schadensort mittels Bleichen zu deaktivieren und dessen Austausch aufzunehmen. Damit eine sinnvolle Interpretation der Daten möglich ist, muss jedoch das passende Modell gefunden werden [62]. Nach Sprague und McNally [135] lassen sich zwei Fälle unterscheiden: der diffusionsentkoppelten (Bindung dominant) und diffusionsgekoppelten Fall (Diffusion dominant). Es zeigt sich, dass im hier betrachteten Zellsystem der diffusionsentkoppelte Fall vorliegt, bei dem die Diffusion wesentlich schneller abläuft als der Austausch des Proteines und somit die Diffusion vernachlässigt werden kann [135]. Ein Vergleich der gemessenen Diffusionskonstanten von Ku80-GFP in Euchromatin mit einem Literaturwert [141] ergibt eine sehr gute Übereinstimmung bei $0,36 \pm 0,06 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (N=38) für zwei unterschiedliche Zelllinien (NIH3T3 und stabile MEF-Ku80^{-/-} Zellen) und verifiziert somit die neu hinzugefügte FRAP Methode. Desweiteren zeigt sich interessanterweise ein 50 % langsamerer Austausch von Ku80-GFP in Heterochromatin gegenüber Euchromatin. Eine genauere Betrachtung zeigt signifikant verringerte Bindungs- und Dissoziationsraten in heterochromatischen Bereichen. Eine Betrachtung der immobilisierten Fraktion, d.h. des Anteils der im Schadensbereich gebundenen Proteinmoleküle, die nicht oder extrem langsam ausgetauscht werden, ergibt keinen chromatinstrukturabhängigen Unterschied zwischen Hetero- und Euchromatin für den betrachteten Zeitraum.

Es ist nun möglich durch gezielte Bestrahlung DNA Schädigungen zu erzeugen und mittels in-situ Mikroskopie Kinetiken von Reparaturproteinen bis hinunter in den Bereich weniger Sekunden zu untersuchen, der für ex-situ Mikroskopie nicht zugänglich ist.

Durch das in dieser Arbeit hinzugefügte Lasersystem ist es neben FRAP Messungen zur Bestimmung von Proteinkinetiken auch möglich, durch Deaktivierung des Fluoreszenzverhaltens ausgewählte Bereiche zu markieren, z.B. zur Untersuchung dynamischer Prozesse.

6 Ausblick

Basierend auf den hier verbesserten Eigenschaften des Mikrosonden-Mikroskops können zukünftige Experimente die einzigartige Kombination von gezielter Ionenbestrahlung mit einer Treffergenauigkeit von $< 1 \mu\text{m}$ und einer Mikroskopie mit guter zeitlicher und räumlicher Auflösung besser nutzen um zum Teil nicht vollständig verstandene Reparaturkinetiken in-situ zu untersuchen. Aus dem gleichen Grund ist es nun auch möglich zuvor nur ex-situ messbare Phänomene [74] in-situ zu untersuchen, was sich bereits in ersten erfolgreichen Untersuchungen widerspiegelt [110].

Durch hier durchgeführten Messungen von Ku80 können auf weitere Reparaturproteine ausgedehnt werden und dabei können Abhängigkeiten von Chromatinstruktur und LET betrachtet werden. Die hier implementierte FRAP System kann mit wenig Aufwand zu anderen Bleichmessungen herangezogen werden. Zum Beispiel lässt sich die FLIP (engl. fluorescence loss in photobleaching) Methode einfach integrieren [82, 148]. Der hier vermessene Effekt von chromatinstrukturabhängiger Rekrutierung sowie Austausch von Ku80 kann in künftigen Arbeiten auf Wechselwirkung mit anderen frühen Proteinen des Reparaturkomplexes, wie z.B. Ku70 und DNA-PK_{CS}, untersucht werden.



Literaturverzeichnis

- [1] G.J.F. Legge. A history of ion microbeams. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 130:9–19, 1997.
- [2] B.E. Fischer und R. Spohr. Heavy ion microlithography-a new tool to generate and investigate submicroscopic structures. *Nuclear Instruments and Methods*, 168:241–246, 1980.
- [3] B.E. Fischer. The scanning heavy ion microscope at GSI. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 10-11:693–696, 1985.
- [4] B.E. Fischer. The heavy-ion microprobe at GSI-Used for single ion micromechanics. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 30:284–288, 1988.
- [5] F. Watt, A.A. Bettiol und J.A. van Kan. Ion beam lithography and nanofabrication: a review. *International Journal of Nanoscience*, 4(3):269–286, 2005.
- [6] B.E. Fischer, M. Schlögl und J. Barak. Simultaneous imaging of upset- and latchup-sensitive regions in a static RAM. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 130:478–485, 1997.
- [7] K. Schweiger, M. Hofbauer, H. Dietrich, H. Zimmermann, K.-O. Voss und B. Merk. Position dependent measurement of single event transient voltage pulse shapes under heavy ion irradiation. *Electronics Letters*, 48(3):171, 2012.
- [8] M. Hofbauer, K. Schweiger, H. Diterich, H. Zimmermann, K.-O. Voss, B. Merk, U. Schmid und A. Steininger. Pulse Shape Measurements by On-Chip Sense Amplifiers of Single Event Transients Propagating Through a 90 nm Bulk CMOS Inverter Chain. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 59(6):2778–2784, 2012.
- [9] A. Simon, C. Jeynes und R.P. Webb. The new Surrey ion beam analysis facility. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 219-220:405–409, 2004.
- [10] J.A. Cookson. The use of the pixe technique with nuclear microprobes. *Nuclear Instruments and Methods*, 181:115–124, 1981.
- [11] H. Imaseki, M. Yukawa, F. Watt und T. Ishikawa. The scanning microbeam PIXE analysis facility at NIRS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 210:42–47, 2003.
- [12] K.-O. Voss, C. Fournier und G. Taucher-Scholz. Heavy ion microprobes: a unique tool for bystander research and other radiobiological applications. *New Journal of Physics*, 10(7):075011, 2008.

-
- [13] M. Durante und A. Friedl. New challenges in radiobiology research with microbeams. *Radiation and environmental biophysics*, 50(3):335–8, 2011.
- [14] A.W. Bigelow, D.J. Brenner, G. Garty und G. Randers-Pehrson. Single-Particle/Single-Cell Ion Microbeams as Probes of Biological Mechanisms. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 36(4):1424–1431, 2008.
- [15] R.E. Zirkle und W. Bloom. Irradiation of parts of individual cells. *Science*, 117(3045):487–493, 1953.
- [16] C.R. Geard und D.J. Brenner. Single-particle irradiation of mammalian cells at the radiological research accelerator facility: induction of chromosomal changes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 54(1-3):411–416, 1991.
- [17] M. Folkard, B. Vojnovic, K.M. Prise, A.G. Bowey, R.J. Locke, G. Schettino und B.D. Michael. A charged-particle microbeam: I. Development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles. *International Journal of Radiation Biology*, 72(4):375–385, 1997.
- [18] M. Folkard, B. Vojnovic, K.J. Hollis, A.G. Bowey, S.J. Watts, G. Schettino, K.M. Prise und B.D. Michael. A charged-particle microbeam: II. A single-particle micro-collimation and detection system. *International Journal of Radiation Biology*, 72(4):387–395, 1997.
- [19] S. Gerardi. A comparative review of charged particle microbeam facilities. *Radiation protection dosimetry*, 122(1-4):285–91, 2006.
- [20] Y. Kobayashi, T. Funayama, S. Wada, Y. Furusawa, M. Aoki, C. Shao, Y. Yokota, T. Sakashita, Y. Matsumoto, T. Kakizaki und N. Hamada. Microbeams of heavy charged particles. *Biological Sciences in Space*, 18(4):235–40, 2004.
- [21] V. Hable, C. Greubel, A. Bergmaier, P. Reichart, A. Hauptner, R. Krücken, H. Strickfaden, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl und G. Dollinger. The live cell irradiation and observation setup at SNAKE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267(12-13):2090–2097, 2009.
- [22] M. Heiß, B.E. Fischer, B. Jakob, C. Fournier, G. Becker und G. Taucher-Scholz. Targeted Irradiation of Mammalian Cells Using a Heavy-Ion Microprobe Targeted Irradiation of Mammalian Cells Using a Heavy-Ion Microprobe. *Radiation Research*, 165(2):231–239, 2006.
- [23] K.-O. Voss, B. Merk, B. Fischer, B. Jakob, F. Tobias und G. Taucher-Scholz. First Sub-Micron Targeting with Single Ions. *GSI Scientific Report 2009*, 483, 2010.
- [24] U. Weisbrod. *Konstruktion, Aufbau und Erprobung einer Einzelionen-Bestrahlungsapparatur und Untersuchung der Inaktivierung von Sporen von bacillus subtilis durch einzelne sehr schwere Ionen ($Z > 27$) in Abhängigkeit vom Stossparameter*. Dissertation, Universität Frankfurt, 1988.
- [25] U. Weisbrod, H. Bücken, G. Horneck und G. Kraft. Heavy ion effects on bacteria spores: The impact parameter dependence of the inactivation. *Radiation Research*, 129(3):250–257, 1992.

-
- [26] F. Kraske. *Inaktivierung von Säugertierzellen nach Beschuss mit örtlich korrelierten Ionen*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 1991.
- [27] M.C. Heiß. *Entwicklung und Erprobung eines Aufbaus zur gezielten Bestrahlung einzelner biologischer Zellen an der Schwerionen-Mikrosonde der GSI*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2004.
- [28] G. Du. *A Calcium imaging setup at the single ion hit facility at GSI and its application to the investigation of Calcium response to ion irradiation in mammalian cells*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2008.
- [29] M. Durante und F.A. Cucinotta. Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nature reviews. Cancer*, 8(6):465–72, 2008.
- [30] G. Schettino, S.T. Al Rashid und K.M. Prise. Radiation microbeams as spatial and temporal probes of subcellular and tissue response. *Mutation research*, 704(1-3):68–77, 2010.
- [31] B. Jakob, J.H. Rudolph, N. Gueven, M.F. Lavin und G. Taucher-Scholz. Live cell imaging of heavy-ion-induced radiation responses by beamline microscopy. *Radiation research*, 163(6):681–90, 2005.
- [32] A.W. Bigelow, C.R. Geard, G. Randers-Pehrson und D.J. Brenner. Microbeam-integrated multiphoton imaging system. *The Review of scientific instruments*, 79(12):123707, 2008.
- [33] GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung. https://www.gsi.de/forschung_beschleuniger/beschleunigeranlage.htm. Zugriff am 04.01.2013.
- [34] B.E. Fischer, M. Heiß und M. Cholewa. About the art to shoot with single ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 210:285–291, 2003.
- [35] B.E. Fischer. Single-particle techniques. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 54:401–406, 1991.
- [36] B. Merk, B.E. Fischer, R. Neumann und K.-O. Voss. A New LED Illumination System for the Bio-Endstation of the GSI Microbeam. *GSI Scientific Report 2010*, 361, 2009.
- [37] A. Köhler. Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für Mikroskopische Technik*, 10(4):433–440, 1893.
- [38] B.E. Fischer, K.-O. Voss und G. Du. Targeted irradiation of biological cells using an ion microprobe - Why a small beam spot is not sufficient for success. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267(12-13):2122–2124, 2009.
- [39] B. Merk, B.E. Fischer, R. Neumann, F. Tobias und K.-O. Voss. Contrast enhancement for in-situ GFP microscopy at the microbeam. *GSI Scientific Report 2009*, 457, 2010.

-
- [40] G. Du, B.E. Fischer und K.-O. Voss. Live cell calcium imaging at the single ion hit facility of GSI. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 269(20):2312–2316, 2011.
- [41] D. Spemann, T. Reinert, J. Vogt, J. Wassermann und T. Butz. Active compensation of stray magnetic fields at LIPSION. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 210:79–84, 2003.
- [42] H. Bethe. Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie. *Annalen der Physik*, 397(3):325–400, 1930.
- [43] F. Bloch. Zur Bremsung rasch bewegter Teilchen beim Durchgang durch Materie. *Annalen der Physik*, 408(3):285–320, 1933.
- [44] M. Scholz. Kapitel: Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues. In *Radiation Effects on Polymers for Biological Use*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003.
- [45] M. Krämer und G. Kraft. Calculations of heavy-ion track structure. *Radiation and environmental biophysics*, 33:91–109, 1994.
- [46] M. Krämer und M. Durante. Ion beam transport calculations and treatment plans in particle therapy. *The European Physical Journal D*, 60(1):195–202, March 2010.
- [47] J. Kiefer und H. Straaten. A model of ion track structure based on classical collision dynamics (radiobiology application). *Physics in medicine and biology*, 31(11):1201–1209, 1986.
- [48] M. Durante und F. Cucinotta. Physical basis of radiation protection in space travel. *Reviews of Modern Physics*, 83(4):1245–1281, 2011.
- [49] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Taylor & Francis, 2008.
- [50] T. R. Munro. The Relative Radiosensitivity of the Nucleus and Cytoplasm of Chinese Hamster Fibroblasts. *Radiation Research*, 42(3):451–470, 1970.
- [51] D. Frankenberg, M. Frankenberg-Schwager, D. Blöcher und R. Harbich. Evidence for DNA Double-Strand Breaks as the Critical Lesions in Yeast Cells Irradiated with Sparsely or Densely Ionizing Radiation under Oxic or Anoxic Conditions. *Radiation Research*, 88(3):524–532, 1981.
- [52] R. Kanaar, J.H. Hoeijmakers und D.C. van Gent. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends in cell biology*, 8(12):483–9, 1998.
- [53] J.H.J. Hoeijmakers. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835):366–374, 2001.
- [54] G. Taucher-Scholz, J. Heilmann und G. Kraft. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in CHO cells after heavy ion irradiation. *Advances in Space Research*, 18(1/2):83–92, 1996.

-
- [55] J. Heilmann, G. Taucher-Scholz, T. Haberer, M. Scholz und G. Kraft. Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 34(3):599–608, 1996.
- [56] D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast und M.J. Cormier. Primary structure of the Aequoreavictoriagreen-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229–233, 1992.
- [57] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward und D.C. Prasher. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263:802–805, 1994.
- [58] S. Inouye und F.I. Tsuji. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS letters*, 341(2-3):277–80, 1994.
- [59] O. Shimomura, F.H. Johnson und Y. Saiga. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59:223–239, 1962.
- [60] R.Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67:509–544, 1998.
- [61] Y. Wang, J.Y.-J. Shyy und S. Chien. Fluorescence proteins, live-cell imaging und mechanobiology: seeing is believing. *Annual review of biomedical engineering*, 10:1–38, 2008.
- [62] F. Mueller und D. Mazza. FRAP and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics: what do we really know. *Current opinion in cell Biology*, 22(3):403–411, 2010.
- [63] M.-M. Poo und R.A. Cone. Lateral diffusion of rhodopsin in Necturus rods. *Experimental Eye Research*, 17:503–510, 1973.
- [64] M.-M. Poo und R. A. Cone. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature*, 247:438–439, 1974.
- [65] E.A. Reits und J.J. Neefjes. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature cell biology*, 3(6):E145–E147, 2001.
- [66] D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson und W.W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*, 16(9):1055–69, 1976.
- [67] H. Brismar, O. Trepte und B. Ulfhake. Spectra and fluorescence lifetimes of lissamine rhodamine, tetramethylrhodamine isothiocyanate, texas red und cyanine 3.18 fluorophores: influences of some environmental factors recorded with a confocal laser scanning microscope. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 43(7):699–707, 1995.
- [68] R. Pepperkok, A. Squire, S. Geley und P.I. Bastiaens. Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Current biology : CB*, 9(5):269–72, 1999.
- [69] D. Stephens. *Cell Imaging*. Scion Publishing Ltd, 2006.

- [70] C. Fournier, D. Becker, M. Winter, P. Barberet, M. Heiß, B.E. Fischer, J. Topsch und G. Taucher-scholz. Cell Cycle-Related Bystander Responses are not Increased with LET after Heavy- Ion Irradiation. *Radiation Research*, 167(2):194–206, 2007.
- [71] C. Fournier, P. Barberet, T. Pouthier, S. Ritter, B. Fischer, K.-O. Voss, T. Funayama, N. Hamada, Y. Kobayashi und G. Taucher-Scholz. No Evidence for DNA and Early Cytogenetic Damage in Bystander Cells after Heavy-Ion Microirradiation at Two Facilities. *Radiation Research*, 171(5):530–540, 2009.
- [72] G. Du, B.E. Fischer, K.-O. Voss, G. Becker, G. Taucher-scholz, G. Kraft und G. Thiel. The Absence of an Early Calcium Response to Heavy-Ion Radiation in Mammalian Cells The Absence of an Early Calcium Response to Heavy-Ion Radiation in Mammalian Cells. *Radiation Research*, 170(3):316–326, 2008.
- [73] B. Merk. *Integrierung eines LED-Belichtungssystems und weitere Verbesserungen der Lebendzell- beobachtung am Fluoreszenzmikroskop der Schwerionen-Mikrosonde der GSI*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2009.
- [74] B. Jakob, J. Splinter, S. Conrad, K.-O. Voss, D. Zink, M. Durante, M. Löbrich und G. Taucher-Scholz. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic acids research*, 39:6489–6499, 2011.
- [75] M. Beuke, I. Müller, B. Jakob, J. Splinter, K.-O. Voss, B. Merk, G. Becker, and M. Durante. DNA lesions within the heterochromatin elicit fast damage response and are relocated to euchromatic regions. *GSI Scientific Report 2009*, 444, 2010.
- [76] M. Beuke, I. Müller, B. Jakob, K.-O. Voss, B. Merk, G. Becker und M. Durante. Relocation of heterochromatic DNA lesions to euchromatin is ATM-dependent. *GSI Scientific Report 2010*, 499, 2011.
- [77] K.-O. Voss, B.E. Fischer, B. Jakob und B. Merk. Immersion Optics for the Horizontal Online Microscope at the GSI Microbeam. *GSI Scientific Report 2010*, 425, 2011.
- [78] E. Hecht. *Optik*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2009.
- [79] C.A. Schneider, W.S. Rasband und K.W. Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671–5, 2012.
- [80] O. Shimomura, F.H. Johnson und Y.O. Saiga. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3):223–239, 1962.
- [81] N.C. Shaner, P.A. Steinbach und R.Y. Tsien. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12):905–909, 2005.
- [82] R.D. Phair und T. Misteli. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 404(6778):604–9, 2000.

-
- [83] B.L. Sprague, F. Müller, R.L. Pego, P.M. Bungay, D.A. Stavreva und J.G. McNally. Analysis of binding at a single spatially localized cluster of binding sites by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical journal*, 91(4):1169–1191, 2006.
- [84] L. Schmiedeberg, K. Weisshart, St. Diekmann, G. Meyer zu Hoerste und P Hemmerich. High-and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15(June):2819–2833, 2004.
- [85] N. Ayoub, A.D. Jeyasekharan, J.A. Bernal und A.R. Venkitaraman. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature*, 453(7195):682–6, 2008.
- [86] Toptica Photonics. http://www.toptica.com/fileadmin/user_upload/products/Diode_Lasers/Industrial_OEM/Single_Mode/iBeam_smart/toptica_br_iBeam_smart_2010.pdf. Zugriff am 03.01.13.
- [87] F Tobias, A.-L. Leifke, G. Becker und M. Durante. A new experimental setup allows studying protein turnover at DNA damage sites. *GSI Scientific Report 2007*, 364, 2008.
- [88] Nuffield Technology Inc. QS-7 Galvanometer Specification, 2011.
- [89] National Instruments. *DAQ Analog Output Series User, Manual National Instruments*. Number June. 2007.
- [90] I. Parker, N. Callamaras und W.G. Wier. A high-resolution, confocal laser-scanning microscope and flash photolysis system for physiological studies. *Cell calcium*, 21(6):441–452, 1997.
- [91] R. E. Durand und P. L. Olive. Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 30(2):111–116, 1982.
- [92] I. Müller, S. Boyle, R.H. Singer, W.A. Bickmore und J.R. Chubb. Stable morphology, but dynamic internal reorganisation, of interphase human chromosomes in living cells. *PloS one*, 5(7):e11560, 2010.
- [93] T. Kanda, K.F. Sullivan und G.M. Wahl. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current biology : CB*, 8(7):377–85, 1998.
- [94] G.J. Todaro und H. Green. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology*, (6):299–313, 1963.
- [95] J.F. Ziegler, M.D. Ziegler und J.P. Biersack. SRIM - The stopping and range of ions in matter (2010). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268:1818–1823, 2010.
- [96] J.F. Ziegler und M.D. Ziegler. www.srim.org. Zugriff am 01.01.13.
- [97] M. Christmann, M.T. Tomacic, W.P. Roos und B. Kaina. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2):3–34, 2003.

- [98] A.T. Noon, A. Shibata, N. Rief, M. Löbrich, G.S. Stewart, P.A. Jeggo und A.A. Goodarzi. 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nature cell biology*, 12(2):177–84, 2010.
- [99] S.I.S. Grewal und S.C.R. Elgin. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, 447(7143):399–406, 2007.
- [100] M.J. Kruhlak, A. Celeste, G. Dellaire, O. Fernandez-Capetillo, W.G. Müller, J.G. McNally, D.P. Bazett-Jones und A. Nussenzweig. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*, 172(6):823–34, 2006.
- [101] Y. Ziv, D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D.C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek und Y. Shiloh. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nature cell biology*, 8(8):870–6, 2006.
- [102] T. Misteli und E. Soutoglou. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(4):243–54, 2009.
- [103] I. Chiolo, A. Minoda, S.U. Colmenares, A. Polyzos, S.V. Costes und G.H. Karpen. Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell*, 144(5):732–44, 2011.
- [104] R. Khan, M. Herrlitz, B. Jakob und M. Durante. Design and validation of a photo activation setup with 405 nm laser. *GSI Scientific Report 2010*, 494, 2011.
- [105] M. Fernández-Suárez und A.Y. Ting. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(12):929–43, 2008.
- [106] N.G. Gurskaya, V.V. Verkhusha, A.S. Shcheglov, D.B. Staroverov, T.V. Chepurnykh, A.F. Fradkov, S. Lukyanov und K.A. Lukyanov. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nature biotechnology*, 24(4):461–5, 2006.
- [107] B. Jakob und M. Scholz. Biological Imaging of Heavy Charged-Particle Tracks Biological Imaging of Heavy Charged-Particle Tracks. *Radiation Research*, 159(5):676–684, 2003.
- [108] B. Jakob und G. Taucher-Scholz. Interaction of heavy ions with nuclear chromatin: Spatiotemporal investigations of biological responses in a cellular environment. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 245(1):292–297, 2006.
- [109] J. Splinter. *Distribution and dynamics of charged particle-induced DNA double-strand breaks*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2010.
- [110] I. Müller, B. Merk, K.-O. Voss, N. Averbek, B. Jakob und M. Durante. Species conserved DNA damage response at the inactive human X chromosome. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Im Druck April 2013.
- [111] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kaçmaz und S. Linn. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 73:39–85, 2004.

-
- [112] D.C. van Gent, J.H. Hoeijmakers und R. Kanaar. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews. Genetics*, 2(3):196–206, 2001.
- [113] F. Chen, S.R. Peterson, M.D. Story und D.J. Chen. Disruption of DNA-PK in Ku80 mutant xrs-6 and the implications in DNA double-strand break repair. *Mutation research*, 362(1):9–19, 1996.
- [114] J.R. Walker, R.A. Corpina und J. Goldberg. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412, 2001.
- [115] N. Uematsu, E. Weterings, K.-I. Yano, K. Morotomi-Yano, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, P.-O. Mari, D.C. van Gent, B.P.C. Chen und D.J. Chen. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*, 177(2):219–29, 2007.
- [116] M. Guenatri, D. Bailly, C. Maison und G. Almouzni. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *The Journal of cell biology*, 166(4):493–505, 2004.
- [117] Invitrogen. *Hoechst Stains User Manual*. 2005.
- [118] C. Lukas, F. Melander, M. Stucki, J. Falck, S. Bekker-Jensen, M. Goldberg, Y. Lerenthal, S.P. Jackson, J. Bartek und J. Lukas. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *The EMBO journal*, 23(13):2674–83, 2004.
- [119] V. Hable, G.A. Drexler, T. Brüning, C. Burgdorf, C. Greubel, A. Derer, J. Seel, H. Strickfaden, T. Cremer, A.A. Friedl und G. Dollinger. Recruitment Kinetics of DNA repair proteins Mdc1 and Rad52 but not 53BP1 depend on damage complexity. *PloS one*, 7(7):e41943, 2012.
- [120] K. Psonka-Antonczyk, T. Elsässer, E. Gudowka-Nowak und G. Taucher-Scholz. Distribution of Double-Strand Breaks Induced by Ionizing Radiation at the Level of Single DNA Molecules Examined by Atomic Force Microscopy Distribution of Double-Strand Breaks Induced by Ionizing Radiation at the Level of Single DNA Molecules Examined by. *Radiation Research*, 172(3):288–295, 2009.
- [121] A. Asaithamby, N. Uematsu, A. Chatterjee, M.D. Story und D.J. Chen. Repair of HZE-Particle-Induced DNA Double-Strand Breaks in Normal Human Fibroblasts Repair of HZE-Particle-Induced DNA Double-Strand Breaks in Normal Human Fibroblasts. *Radiation Research*, 169(4):437–446, 2008.
- [122] B. Jakob, M. Scholz und G. Taucher-Scholz. Biological imaging of heavy charged-particle tracks. *GSI Scientific Report 2002*, 159, 2003.
- [123] J.F. Ward. The complexity of DNA damage: Relevance to biological consequences. *International journal of radiation biology*, (April):10–14, 1994.
- [124] A. Asaithamby und D.J. Chen. Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2):87–99, 2011.

-
- [125] M. Falk, E. Lukášová und S. Kozubek. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(12):2398–414, 2008.
- [126] A.A. Goodarzi, P. Jeggo und M. Löbrich. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA repair*, 9(12):1273–82, 2010.
- [127] P. Reynolds, J.A. Anderson, J.V. Harper, M.A. Hill, S.W. Botchway, A.W. Parker, and P. O'Neill. The dynamics of Ku70/80 and DNA-PKcs at DSBs induced by ionizing radiation is dependent on the complexity of damage. *Nucleic Acids Research*, 1–11, 2012.
- [128] D.T. Goodhead. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology*, 65(1):7–17, 1994.
- [129] Z. Nagy und E. Soutoglou. DNA repair: easy to visualize, difficult to elucidate. *Trends in cell biology*, 19(11):617–29, 2009.
- [130] T.T. Paull, E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert und W.M. Bonner. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, 10(15):886–95, 2000.
- [131] R.D. Phair, P. Scaffidi und C. Elbi. Global Nature of Dynamic Protein-Chromatin Interactions In Vivo : Three-Dimensional Genome Scanning and Dynamic Interaction Networks of Chromatin Proteins. *Molecular and cellular biology*, 24(14):6393–6402, 2004.
- [132] G. Carrero, D. McDonald, E. Crawford, G. de Vries und M.J. Hendzel. Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods (San Diego, Calif.)*, 29(1):14–28, 2003.
- [133] T. Lele, P. Oh, J.A. Nickerson und D.E. Ingber. An improved mathematical approach for determination of molecular kinetics in living cells with FRAP. *Mechanics & chemistry of biosystems : MCB*, 1(3):181–190, 2004.
- [134] T. Lele, S.R. Wagner, J.A. Nickerson und D.E. Ingber. Methods for measuring rates of protein binding to insoluble scaffolds in living cells: histone H1-chromatin interactions. *Journal of cellular biochemistry*, 99(5):1334–1342, 2006.
- [135] B.L. Sprague und J.G. McNally. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends in cell biology*, 15(2):84–91, 2005.
- [136] B.L. Sprague, R.L. Pego, D.A. Stavreva und J.G. McNally. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical journal*, 86(6):3473–3495, 2004.
- [137] F. Tobias. *Analyse von schnellen dynamischen Prozessen und Proteininteraktionen nach dicht ionisierender Bestrahlung*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2011.
- [138] D. Merkle, D. Zheng, T. Ohrt, K. Crell und P. Schwillle. Cellular dynamics of Ku: characterization and purification of Ku-eGFP. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 9(8):1251–9, 2008.

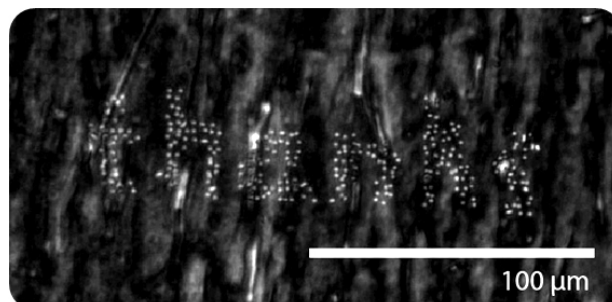
-
- [139] G. Carrero, D. McDonald, E. Crawford, G. de Vries und M.J. Hendzel. Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods*, 29(1):14–28, 2003.
- [140] J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp und A. Kenworthy. Studying protein dynamics in living cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(6):444–56, 2001.
- [141] W. Rodgers, S.J. Jordan und J.D. Capra. Transient association of Ku with nuclear substrates characterized using fluorescence photobleaching. *Journal of immunology*, 168(5):2348–55, 2002.
- [142] R.D. Phair und T. Misteli. Kinetic modelling approaches to in vivo imaging. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(12):898–907, 2001.
- [143] J. Lippincott-Schwartz and G.H. Patterson. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300(5616):87–91, 2003.
- [144] B. Meyer. *Kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Schwerionenbestrahlung*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2012.
- [145] B. Merk, K.-O. Voss, I. Müller, B.E. Fischer, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, C. Trautmann und M. Durante. Photobleaching setup for the biological end-station of the darmstadt heavy-ion microprobe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. Im Druck Januar 2013*.
- [146] A.B. Houtsmuller und W. Vermeulen. Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochemistry and cell biology*, 115:13–21, 2001.
- [147] B. Merk, K.-O. Voss, B.E. Fischer, B. Jakob und M. Durante. A Laser Microbeam for the Heavy-Ion Microbeam. *GSI Scientific Report 2010*, 394, 2011.
- [148] J. White und E. Stelzer. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends in cell biology*, 9(2):61–5, 1999.



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. PhD. Marco Durante für die Möglichkeit zur Promotion und Unterstützung meiner Arbeit.
- Prof. Dr. Christina Trautmann für die stetige Unterstützung und Hilfe während der Promotionszeit, sowie der Übernahme des 2. Gutachtens.
- Dr. Kay-Obbe Voss für seine hervorragende Betreuung, fortwährende Unterstützung, sein großes Engagement, die wissenschaftlichen Diskussionen und die harmonische Zusammenarbeit.
- Dr. Iris Müller für die hervorragende Zusammenarbeit, sehr gute Betreuung, wissenschaftliche Diskussionen und Verbesserung meines biologischen Verständnisses.
- Dr. Bernd Fischer für guten Rat, konstruktive Ideen und interessante Gespräche.
- Dr. Burkhard Jakob und Prof. Dr. Gisela Taucher-Scholz für die Unterstützung meiner Arbeit und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen.
- Gudrun Becker und Anna-Lena Leifke für die Einführung und fortwährende Hilfe beim Umgang mit Zellkulturen.
- Dr. Beatrice Schuster, Dr. Tim Seidl und Dr. Ina Alber für sehr freundschaftliche Gespräche, Aufmunterung und sehr unterhaltsame Strahlzeiten.
- allen Mitgliedern der Abteilung Materialforschung des GSI für eine großartige Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit.
- allen Mitgliedern der Abteilung Biophysik des GSI, speziell der DNA-Untergruppe, für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und sehr gute Zusammenarbeit.
- meinen Eltern Magdalene und Jakob Merk, meiner Schwester Luitgard Merk, meiner Nichte Leonie Merk und meinen Großeltern Lydia und Emanuel Merk.





Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



Veröffentlichungen

- **B. Merk**, K.-O. Voss, I. Müller, B.E. Fischer, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, C. Trautmann und M. Durante „Photobleaching Setup for the Biological End-Station of the Darmstadt Heavy-Ion Microprobe“ eingereicht in Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms (Im Druck Januar 2013)
- I. Müller, **B. Merk**, K.-O. Voss, N. Averbeck, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz „Species conserved DNA damage response at the inactive X chromosome“ eingereicht in Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis (Im Druck April 2013)
- V.S. Veeravalli, T. Polzer, A. Steininger, U. Schmid, M. Hofbauer, K. Schweiger, K. Schneider-Hornstein, H. Zimmermann, M. Hajek, K.-O. Voss und **B. Merk** „Towards an Accurate Characterization of Single-Event Transients in Digital Circuits“ eingereicht in Microprocessors and Microsystems (Eingereicht August 2012)
- M. Hofbauer, K. Schweiger, H. Dietrich, H. Zimmermann, K.-O. Voss, **B. Merk**, U. Schmid und A. Steininger „Pulse Shape Measurements by On-chip Sense Amplifiers of Single Event Transients Propagating through a 90 nm Bulk CMOS Inverter Chain“ IEEE Transactions on Nuclear Science 59 (2012) 2778-2784
- K. Schweiger, M. Hofbauer, H. Dietrich, H. Zimmermann, K.-O. Voss und **B. Merk** „Position dependent measurement of single event transient voltage pulse shapes under heavy ion irradiation“ Electronics Letters 48 (2012) 171-172
- B. Schuster, F. Fujara, **B. Merk**, R. Neumann, T. Seidl und C. Trautmann „Response behavior of ZrO₂ under swift heavy ion irradiation with and without external pressure“ Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 277 (2012) 45-52

Wissenschaftliche Ergebnisberichte der GSI

- **B. Merk**, K.-O. Voss, I. Müller, B.E. Fischer, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, C. Trautmann, and M. Durante „FRAP measurements after targeted irradiation of heterochromatin and euchromatin at the GSI microbeam“ Eingereicht in GSI Scientific Report 2012 (Eingereicht Februar 2013)
- **B. Merk**, K.-O. Voss, I. Müller, B.E. Fischer, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, C. Trautmann und M. Durante „An attempt to see chromatin structure change after heavy ion irradiation at the GSI microbeam“ GSI Scientific Report 2011 (2012) 488
- **B. Merk**, K.-O. Voss, B.E. Fischer, B. Jakob, G. Taucher-Scholz und M. Durante „A Laser Microbeam for the Heavy-Ion Microbeam Facility“ GSI Scientific Report 2010 (2011) 394
- **B. Merk**, B.E. Fischer, R. Neumann, F. Tobias und K.-O. Voss „Contrast enhancement for in-situ GFP microscopy at the microbeam“ GSI Scientific Report 2009 (2010) 457
- **B. Merk**, B.E. Fischer, R. Neumann, F. Tobias und K.-O. Voss „A new LED illumination system for the bio-endstation of the GSI microbeam“ GSI Scientific Report 2008 (2009) 361

Konferenzbeiträge

- **B. Merk**, K.-O. Voss, I. Müller, B.E. Fischer, G. Taucher-Scholz und Marco Durante „A laser system for the microprobe at GSI“ 13th ICNMTA, Mündlicher Vortrag (2012)
- **B. Merk**, K.-O. Voss, B.E. Fischer und M. Durante „Integration of a laser microbeam for the single heavy ion microbeam at GSI“ 10th International Workshop on Microbeam Probes of Radiation Response, Mündlicher Vortrag (2012)
- **B. Merk**, K.-O. Voss, B.E. Fischer, C. Trautmann und M. Durante „GSI heavy-ion microprobe applied in radiobiology“ GANIL - GSI Meeting, Mündlicher Vortrag (2011)
- **B. Merk**, K.-O. Voss, B.E. Fischer, C. Trautmann und M. Durante „GSI microprobe applied in radiobiology“ Ionen- und Positronenstrahlen Workshop, Mündlicher Vortrag (2011)
- **B. Merk**, K.-O. Voss und B.E. Fischer „Heavy-Ion Microprobe at GSI“ 12th ICNMTA, Posterpräsentation (2010)
- **B. Merk**, B.E. Fischer, R. Neumann und K.-O. Voss „Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von bestrahlten lebenden Zellen an der Schwerionen-Mikrosonde der GSI“ SNI, Posterpräsentation (2010)