

Nanoskopische Analyse von DNA Doppelstrangbrüchen in menschlichen Krebszellen nach Ionenbestrahlung

M.Sc. Judith Reindl

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Gutachter/Gutachterin:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Christian J. Kähler

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Günther Dollinger

2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Harry Scherthan

Die Dissertation wurde am 08. Mai 2017 bei der Universität der Bundeswehr München eingereicht und durch die Fakultät für Luft- und Raumfahrttechnik am 17. Mai 2017 angenommen. Die mündliche Prüfung fand am 22. September 2017 statt.

Zusammenfassung

Ionisierende Strahlung induziert beim Durchgang durch menschliche Zellen Doppelstrangbrüche mit unterschiedlicher Dichte und Komplexität abhängig vom Linearen Energietransfer (LET) der Teilchen. Diese Arbeit beschreibt die quantitative, höchstauflösende STED (engl.: stimulated emission depletion) Mikroskopie an menschlichen Zellen mit einer lateralen Auflösung von ~ 100 nm. Die Zellen wurden hierzu am Rasterionenmikroskop SNAKE am 14 MV Tandembeschleuniger in Garching oder der α -Bestrahlungsquelle an der Universität der Bundeswehr München bestrahlt.

Damit konnten strukturelle und funktionale Domänen der Anlagerung von Proteinen, welche für das Auffinden und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen verantwortlich sind, detailliert untersucht werden. Weitergehend konnten diese Domänen mit der Chromatinstruktur höherer Ordnung, also der Lage der DNA innerhalb des Zellkerns, verknüpft werden. Hierzu wurde die Korrelation der wichtigen Reparaturproteine 53BP1, γ H2AX, Rad51 sowie Brca1 nach hoch- und niedrig-LET Bestrahlungen untersucht. Hierbei zeigen γ H2AX und 53BP1, obwohl sie der gleichen Reparaturdomäne, dem sogenannten „flanking chromatin“ zugeordnet werden nur teilweise Korrelation, welche unabhängig vom linearen Energietransfer der Teilchen ist. 53BP1 und Rad51 schließen sich ebenso LET unabhängig gegenseitig aus, was deren unterschiedliche Rolle während der Reparatur und die Zugehörigkeit zu verschiedenen Domänen widerspiegelt. Als Mediator zwischen den beiden Proteinen und somit Domänen wurde Brca1 identifiziert, welches ähnliche Zeitverläufe, wie Rad51 zeigt, jedoch nur teilweise räumlich mit Rad51 korreliert. Weitergehend wurden bei den Proteinen 53BP1 und γ H2AX, welche sich nach Kohlenstoffbestrahlung in (540 ± 60) nm großen IRIF (engl.: ionizing radiation induced foci) und nach Protonenbestrahlung in (410 ± 30) nm großen IRIF anlagern, Nanostrukturen innerhalb der IRIF identifiziert. Diese Strukturen haben unabhängig vom LET eine Größe von 120 nm - 140 nm und entsprechen der ebenso LET unabhängigen IRIF Größe von Rad51 von (142 ± 13) nm, welche selbst keine Nanostruktur zeigen. Diese Strukturen in Kombination mit den Korrelationsmessungen

lassen sich mit der Chromatinstruktur höherer Ordnung verbinden. So konnte Rad51 als direkte Markierung des Schadensorts identifiziert werden, welche in einer Region von dekondensierter DNA liegt, dem sogenannten Perichromatin. Dies hat eine Breite von 100 nm - 200 nm und wird um den Schaden in einem größeren Bereich durch das Protein 53BP1 stabilisiert. Das phosphorylierte Histon H2AX (γ H2AX) markiert hingegen direkt die Chromatin Territorien und somit die DNA.

Als zweites wesentliches Ergebnis wurde die initiale Anzahl an IRIF des Schadensmarkers DNA-PKcs wenige Minuten nach Bestrahlung mit Hilfe höchstauflösender STED Mikroskopie bestimmt. Die IRIF haben eine mittlere Größe von ~ 190 nm, was die Trennung von DSB ermöglicht, welche nur durch solch kleine Abstände getrennt sind. Für 27 MeV Kohlenstoffbestrahlung ($\text{LET} = 500 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) am Rasterionenmikroskop SNAKE in Garching wurden $(4,5 \pm 0,9) \frac{\text{IRIF}}{\mu\text{m}}$ und für 20 MeV Lithiumbestrahlung ($\text{LET} = 116 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) wurden $(2,8 \pm 0,5) \frac{\text{IRIF}}{\mu\text{m}}$. Beides verbessert nicht nur bisherige Messungen um einen Faktor ~ 3 sondern übersteigt auch die Anzahl von durch Monte-Carlo basierten Simulationen mit PARTRAC vorhergesagten Schadenszahlen um einen Faktor 2 - 2,5. Diese Messungen stellen damit eine gegenüber bisherigen Messungen essentiell verbesserte Datenbasis dar, um die erhöhte relative biologische Wirksamkeit von hoch-LET Strahlung besser modellieren und damit verstehen zu können.

Abstract

Ionizing radiation induces double strand breaks of different density and complexity dependent on the linear energy transfer (LET), while traversing human cells. This work describes the quantitative, super resolution STED (stimulated emission depletion) microscopy of human cells with a lateral resolution of ~ 100 nm. For this the cells were irradiated at the ion microprobe SNAKE at the 14 MV tandem accelerator in Garching or at the α -source at the Universität der Bundeswehr München.

The combination of irradiation and nanoscopy allows to investigate structural and functional domains of damage recognition and repair protein accumulations. These domains could be connected to the higher order chromatin structure, which describes the position of the DNA in the cell nucleus. For this correlation analysis of the important repair proteins 53BP1, γ H2AX, Rad51 as well as Brca1 after high- and low-LET radiation was performed. γ H2AX und 53BP1 show, although both are part of the „flanking chromatin“, LET independent only partial correlation. 53BP1 and Rad51 show also LET independent mutual exclusion, which reflects their different functions throughout repair as well as their belonging to different repair compartments, where Brca1 was identified as mediator between 53BP1 and Rad51. Furthermore 53BP1 and γ H2AX show nanostructure inside the IRIF (ionizing radiation induced foci). These structures are LET independent and have a size of 120 nm-140 nm, which match the IRIF size of Rad51 of (142 ± 13) nm. These structures in combination with the correlation analysis can connect the protein accumulation with higher order chromatin structure. Rad51 as direct damage labeling lies in a region of decondensed DNA, the so called perichromatin, which has a size of 100 nm-200 nm. 53BP1 stabilizes this region in a larger area around the damage. the phosphorylated Histone H2AX (γ H2AX) instead labels the chromatin territories and therefore the DNA.

In the second main result the number of initial DNA-PKcs IRIF after irradiation was counted using super resolution STED microscopy. The IRIF have a mean size of ~ 190 nm, which allows the differentiation of DSB, which are separated by such

small distances. For 27 MeV Carbon ion irradiation $\left(\text{LET} = 500 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}\right)$ $(4, 5 \pm 0, 9) \frac{\text{IRIF}}{\mu\text{m}}$ and for 20 MeV lithium irradiation $\left(\text{LET} = 116 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}\right)$ $(2, 8 \pm 0, 5) \frac{\text{IRIF}}{\mu\text{m}}$ were counted. Both improves previous data by a factor of ~ 3 . The measurements done in this work give a data base for modelling and understanding the enhanced relative biological effectiveness of high-LET particles, which is essentially enhanced compared to previous measurements.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Biologischer Hintergrund	7
2.1	Chromatinordnung im Zellkern	9
2.2	Zellzyklus und Zelltod	10
2.3	DNA Doppelstrangbruch Reparatur	11
2.3.1	Homologe Rekombination	12
2.3.2	Nicht-homologe Endenverknüpfung	12
2.3.3	Alternative Pfade	14
2.4	DNA Schadensmarker	14
2.4.1	γ H2AX	15
2.4.2	53BP1	15
2.4.3	DNA-PK	15
2.4.4	Brca1	16
2.4.5	Rad51	16
3	Wechselwirkung von Ionen mit biologischer Materie	17
3.1	Energieverlust von Ionen	17
3.1.1	Linearer Energietransfer	19
3.1.2	Radiale Dosisverteilung	20
3.2	DNA Doppelstrangbrucherzeugung durch energetische Ionen	23
4	Höchstaflösende STED Mikroskopie	27
4.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie	27
4.1.1	Fluoreszenz	27
4.1.2	Punktantwort und optische Auflösung	29
4.1.3	Nyquistkriterium zur Bildaufnahme	33

4.2	Konfokale Mikroskopie	35
4.3	Prinzip der STED Mikroskopie	38
4.3.1	Laterale Auflösungsverbesserung	38
4.3.2	Axiale Auflösungsverbesserung	42
4.3.3	Erzeugung des doughnutförmigen Intensitätsprofils	43
4.4	Auflösungsverbesserung durch Entfaltung	46
4.5	Fluorophore zur STED Mikroskopie	47
4.5.1	Anforderungen an Fluorophore	47
4.5.2	Theoretische Betrachtung des Cross-talk	49
4.6	Weitere höchstauflösende Mikroskopiemethoden	50
5	Zellbestrahlung und Datenaufnahme	53
5.1	Bestrahlung an SNAKE	53
5.1.1	Aufbau	54
5.1.2	Experimentdurchführung	57
5.2	Bestrahlungen an der α -Bestrahlungsquelle	62
5.2.1	Aufbau	62
5.2.2	Experimentdurchführung	63
5.3	Zellpräparation	64
5.4	Mikroskopie	66
5.4.1	Farbstoffe zur Mikroskopie mit einem STED Laser	66
5.4.2	Mikroskopie mit mehreren STED Lasern und z-Doughnut	68
5.4.3	Konzentrationsbestimmung	68
5.4.4	Pixelgröße	71
5.4.5	Stabilität des Systems	71
5.4.6	Cross-talk Bestimmung	74
5.4.7	Entfaltung der Rohdatenbilder	76
6	Datenanalyse	79
6.1	Korrelationsanalyse	79
6.1.1	Überblick	79
6.1.2	Orstaufgelöste Korrelationsanalyse mittels „reduced Product of the Differences from the Mean“	81
6.1.2.1	Bereichsdefinition	81
6.1.2.2	rPDM Analyse	83

6.1.2.3	Statistische Betrachtung der rPDM Auswertung . . .	86
6.2	Größenbestimmung von IRIF mit dem Van Steensel Ansatz	87
6.3	Statistische Bewertung der Ergebnisse	89
6.3.1	Poolen von Proben bei Varianzgleichheit	90
6.3.2	Statistische Signifikanz mit dem T-Test	91
7	Ergebnisse	93
7.1	Zeitliche Charakterisierung der Anlagerung der Reparaturproteine 53BP1, Rad51 und Brca1	93
7.2	Korrelationsmessungen verschiedener Reparaturfaktoren	100
7.2.1	53BP1 und γ H2AX zeigen nanoskopisch Teilkorrelation	100
7.2.2	Gegenseitiger Ausschluss von 53BP1 und Rad51 am Schadensort	104
7.2.3	Zeitlicher Verlauf der Korrelation von Rad51 und 53BP1	113
7.2.4	Brca1 als Mediator zwischen Rad51 und 53BP1	116
7.3	Nanostruktur von ioneninduzierten Foci bildet Chromatinstruktur ab .	118
7.4	Intrazelluläre Mikrodosimetrie von hoch-LET Ionentracks	123
8	Ausblick	129
	Literaturverzeichnis	134
	A Designzeichnungen des Halters zur Deckglasbestrahlung an SNAKE149	
	B Protokoll zur Zellpräparation	151
	Publikationsliste	153
	Danksagung	157

Kapitel 1

Einleitung

Natürliche und künstliche Strahlung begleitet jeden Menschen während seines gesamten Lebens als erbgutschädigende Belastung. Die natürliche Strahlenbelastung in Deutschland beträgt im Mittel ca. 2,4 mSv pro Jahr und setzt sich zusammen aus terrestrischer Strahlenbelastung und Höhenstrahlung [1]. Die natürliche Strahlung schwankt je nach geographischer Lage sehr stark. Dabei ist die kosmische Strahlung abhängig von der Höhe über dem Meeresspiegel und steigt von ca. 0,4 mSv/a in 1000 m Höhe bis ca. 1,1 mSv/a in 3000 m Höhe [2]. In Deutschland ist die terrestrische Strahlung hauptsächlich auf inkorporiertes Radon zurückzuführen, welches als Gas aus dem Boden kommt. Es gibt weltweit Gebiete, wo der Boden Uran und Thorium und deren Zerfallsprodukte enthält, welche die Strahlenbelastung zusätzlich erhöhen. So ist im Iran die Belastung durch terrestrische Strahlung im Gegensatz zum deutschen Mittel von 2,1 mSv/a im Maximum um das 200-fache und im Mittel um das 9-fache erhöht [2]. Die künstliche Strahlenbelastung in Deutschland beträgt im Mittel ca. 1,9 mSv pro Jahr und ist somit ähnlich groß wie die mittlere natürliche Strahlenbelastung [1]. Zum Großteil stammt sie aus medizinischen Anwendungen der Diagnostik und Therapie. Auswirkungen von Strahlung auf gesamte Organismen, die von Langzeitschäden wie erhöhtes Krebsrisiko bis hin zu akuten Schäden wie Haarausfall reichen, können nur in epidemiologischen Studien untersucht werden. Hierzu werden meist Daten aus den Atomwaffenabwürfen auf Hiroshima und Nagasaki im zweiten Weltkrieg [3] und aus Reaktorunfällen wie Tschernobyl 1986 [4] und Fukushima 2011 [5] verwendet. Oder aber es werden auch geographische Besonderheiten wie z. B. die lokale Radonkonzentration, welche eine unterschiedliche terrestrische Strahlenexposition bedingen, mit erhöhten Krebsrisiken verglichen [6].

Für viele andere Fragestellungen ist eine epidemiologische Betrachtung jedoch nicht möglich, da meist die einzelnen Fälle nicht vergleichbar sind und somit die Gesamtzahl der Fälle für eine statistische Auswertung nicht ausreicht. Ein Beispiel hierfür ist die Bestrahlung von Tumoren mit ionisierender Strahlung. Hier wird dem Tumor in mehreren Sitzungen eine Strahlendosis verabreicht, die die Zellen absterben lässt. Normalerweise erfolgt die Bestrahlung von außen, was zur Folge hat, dass auch gesundes Gewebe Strahlung verabreicht bekommt. Dies führt zu Schädigungen in diesen Bereichen. Diese reichen von akuten Schäden wie Hautrötung, Entzündungen und Haarausfall bis hin zu Langzeitschäden wie gestörte Funktion der Talgdrüsen und strahleninduziertem Tumorwachstum. Moderne Tumorbestrahlungen werden immer häufiger mit Protonen mit niedriger Ionisierungsdichte, aber auch mit Ionen mit hohen Ionisierungsdichten, vor allem Kohlenstoffionen, durchgeführt. Die Teilchenbestrahlung hat im Vergleich zur konventionellen Photonenbestrahlung den Vorteil, dass durch die unterschiedlichen Tiefenprofile der Energieabgabe das gesunde Gewebe besser geschont werden kann. Außerdem ist die Wirkung der ionisierenden Strahlung abhängig von der Ionisierungsdichte, was durch die relative biologische Wirksamkeit (englisch: relative biological effectiveness, RBE) beschrieben wird [7–9]. Bei der Tumortherapie mit Teilchenbestrahlung ist die Schonung des gesunden Gewebes bei höherer Effektivität der Tumorbestrahlung, insbesondere bei den dichtionisierenden Ionen, besser gewährleistet [10].

Zusätzlich ist die Strahlentherapie von Tumoren eine höchst personalisierte Therapieform und wird für jeden Patienten angepasst und im Laufe des Therapiefortschritts immer wieder kontrolliert. Dies macht epidemiologische Vergleiche äußerst schwierig bis unmöglich. Um schädigende Effekte der während der Therapie applizierten Strahlung abzuschätzen, ist es zwingend notwendig andere Herangehensweisen als epidemiologische zu verwenden. Dies ist essentiell um Effekte einzelner Bestrahlungen untersuchen und entsprechende Vergleiche unterschiedlicher Therapiemethoden durchführen zu können.

Hierzu ist es notwendig, die grundlegenden Mechanismen der Reparaturantwort von Zellen auf ionisierende Strahlung verschiedener Qualität aufzuklären. Dies stellt ein umfangreiches Gebiet für die angewandte bio- und medizinphysikalische Forschung dar, wobei für die Erforschung von Strahleneffekten in der Zelle der Zellkern als interessantes Ziel identifiziert wurde [11]. Er beinhaltet die DNA⁽¹⁾, welche das

⁽¹⁾Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid

menschliche Erbgut kodiert. Ein kritischer Schaden für das Überleben der Zelle stellt der DNA Doppelstrangbruch (DSB) dar, bei dem die DNA vollständig durchtrennt wird [12]. Eine fehlerhafte Reparatur solcher Schäden kann zum Verlust von einzelnen Kodierungssequenzen, sogenannten Mutationen, führen, welche zum Zelltod oder zur Karzinogenese, d. h. Tumorentwicklung, führen können. Diese Mechanismen legen die Grundlage für die Schädigung von Gewebe bei der Bestrahlung.

Dies ist ein genauso schwieriges wie interessantes Vorhaben, da die Antwort der Zellen auf Schäden höchst komplex ist und viele Faktoren beinhaltet. Schon in den 1960er Jahren wurden Forschungen dazu begonnen, welche in der Entdeckung eines DNA Reparaturweges, der sogenannten Base Excision Repair, und dem Nobelpreis für Chemie 2015 mündeten. Seit dieser Zeit wurde die Erforschung der Wege der DNA Reparatur immer populärer und viele grundlegende Fragen wurden bis heute geklärt. Die Komplexität der Mechanismen in der Zelle führt aber dazu, dass trotz allem die genauen Mechanismen unbekannt sind.

Für eine vollständige Aufklärung der Reparaturmechanismen ist es zunächst wichtig, die beteiligten Reparaturproteine und deren Anlagerung an die DSB aufzuklären. Die meisten verwendeten Analysemethoden wie Western Blot und Pulsfeld-Gelelektrophorese nutzen eine Lösung aus den interessanten Proteinen und Molekülen der Zelle und bestimmen so deren Konzentrationen und Größen [13, 14]. Bei diesen Methoden geht aber die Information über die Lokalisation des DSB und der Reparaturproteine innerhalb des Zellkerns verloren. Somit ist es schwierig auf die direkte Funktionalität der einzelnen Proteine und Moleküle zu schließen. Dies macht mikroskopische Untersuchungen unerlässlich, die die genaue Lokalisation der Reparaturproteine betrachten. Dies ist möglich durch die Markierung der Proteine, die an DSB akkumulieren und sogenannte Foci bilden, mit fluoreszierenden Farbstoffen. Diese können mikroskopisch betrachtet werden und ermöglichen lokalisierte Analysen von DSB und deren Reparatur im Zellkern [15, 16].

Die Größe der Foci liegt im Submikrometer-Bereich und wird seit Jahrzehnten mit Epifluoreszenz und konfokaler Mikroskopie analysiert, welches beide beugungsbegrenzte Mikroskopiemethoden sind. Sie liefern für biologische Proben eine Auflösung von im besten Fall ~ 250 nm in x-y-Richtung und $\sim 600 - 800$ nm in der Tiefe. Diese Methoden sind damit ein gutes Werkzeug, um die Anlagerung von Proteinen an DSB aufzuklären. Es wurden damit viele Reparaturproteine und ihre Aufgaben in der Reparatur identifiziert [15–17]. Mit der Entwicklung von optischen Mikroskopiemethoden

mit immer besserer Auflösung und Sensitivität wurden auch die Analysen der Foci immer genauer. Zum einen kann durch die gesteigerte Sensitivität der Beginn und die Kinetik der Akkumulationen für einige Proteine bestimmt werden [15]. Doch viel entscheidender kann die Lokalisation von Proteinen am Schaden genauer untersucht werden und somit deren Funktion in der Reparatur aufgeklärt werden [18–20].

Zwei wichtige Fragestellungen, welche sich unter anderem an unserem Institut in den letzten Jahren herauskristallisiert haben, liegen dieser Arbeit zugrunde: Zunächst wurden in mit konventioneller Mikroskopie aufgenommenen Daten Hinweise auf eine mögliche räumliche Strukturierung der Proteinanlagerungen gefunden, allerdings war die bisher erreichte optische Auflösung zu schlecht um diese Strukturierung genau aufzulösen. Die detaillierte Untersuchung der vierdimensionalen Proteinanlagerungen ermöglicht es erstmals die zugrundeliegenden Mechanismen der DNA Strukturierung und der Bindung der Proteine in der Schadensregion zu untersuchen. Außerdem können damit Hinweise auf die Interaktion verschiedener Proteine lokal am Schadensort gefunden und Unterschiede und Gemeinsamkeiten von DNA Schäden unterschiedlicher Komplexität identifiziert werden.

Die zweite essentielle Fragestellung ist die nach der Anzahl der induzierten DSB für Ionen mit unterschiedlichem linearem Energietransfer (LET). Für niedrig-LET Strahlung, also $LET < 10 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$, korreliert die Anzahl der DSB mit der Anzahl an Foci, welche mit konventioneller Mikroskopie aufgelöst werden können. Die Anzahl an DSB kann verwendet werden um Dosimetrie zu betreiben und auch um die Induktion von DSB in Zusammenhang mit der Wirkung von Strahlung auf Gewebe zu bringen. Für hoch-LET Strahlung ($LET \geq 10 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) schlägt das Zählen der Foci fehl, da sich in einem in der Mikroskopie sichtbaren Fokus mehrere DSB befinden können. Somit ist bis heute nicht geklärt, wieviele DSB bei dem Durchgang eines hoch-LET Ions durch eine Zelle pro μm Weglänge entstehen. Diese Größe ist aber essentiell um die Wirkung von hoch-LET Strahlung auf Gewebe verstehen zu können. Ein Kernpunkt der Untersuchung von ioneninduzierten DSB ist also das Zählen derselben, was nur mit mikroskopischer Auflösung jenseits des Beugungslimits möglich ist.

In dieser Arbeit wurden zur Klärung der oben genannten Fragestellungen Reparaturregionen mit höchstauflösender, dreidimensionaler STED Mikroskopie untersucht, welche die Auflösung unter die Beugungsgrenze auf ca. 100 nm in x-y-Richtung und 200-300 nm in z-Richtung verkleinert. Dies ermöglicht erstmals die Analyse von Strukturen in Zellen mit Auflösungen kleiner der Wellenlänge des optisch sichtbaren

Lichts. Außerdem ist es möglich ganze Zellkerne, durch sequentielle Aufnahme der Zelle in verschiedenen Tiefen, zu mikroskopieren und zu analysieren. Somit ist diese Methode hervorragend geeignet, um höchst lokalisiert die Anlagerung von Proteinen an den DNA Schaden zu messen.

Für die Untersuchung von strahleninduzierten Foci (engl: ionizing radiation induced foci, IRIF) wurden Zellen mit Protonen mit niedrigem LET, und mit hoch-LET α -Teilchen, Lithium- und Kohlenstoffionen bestrahlt. Dazu wurden zwei Bestrahlungseinrichtungen benutzt: Einerseits wurden Zellen am Rasterionenmikroskop SNAKE mit Protonen, Lithium- und Kohlenstoffionen bestrahlt. Andererseits wurden Zellen an einer α -Bestrahlungsquelle, entwickelt von H. Roos und A.M. Kellerer [21], bestrahlt. Dies ermöglicht eine senkrechte Bestrahlung von Zellen mit hoch-LET α -Teilchen. Diese beiden Bestrahlungseinrichtungen bieten die einzigartige Möglichkeit, Studien an ioneninduzierten DNA Schäden unterschiedlicher Komplexität durchzuführen.

Die vorliegende Arbeit ist wie folgt gegliedert: Kapitel 2 beschäftigt sich mit den biologischen Grundlagen zur Chromatinstruktur, Zellzyklus, DNA Doppelstrangbruchreparatur und dafür relevanter Schadensmarker. Kapitel 3 beschreibt allgemein die physikalischen Grundlagen der Wechselwirkung von Ionen mit biologischer Materie. Kapitel 4 geht auf die grundlegenden Prinzipien der Fluoreszenzmikroskopie mit besonderem Augenmerk auf der höchstauflösenden STED Mikroskopie ein.

Aufbau und Durchführung der Zellbestrahlung mit niedrig- und hoch-LET Strahlung wird in Kapitel 5 charakterisiert. Kapitel 6 beschreibt die Methoden der Datenanalyse, welche speziell für die Experimente dieser Arbeit entwickelt wurden. Die ersten biologischen Ergebnisse, die aus der höchstauflösenden Mikroskopie gewonnen wurden, werden in Kapitel 7 vorgestellt. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf Kinetiken der Anlagerung, Korrelation verschiedener Proteine und Strukturgrößen innerhalb strahleninduzierter Foci und dem Zählen von DSB in hoch-LET Teilchenspuren. Abgeschlossen wird die Arbeit mit einer Zusammenfassung und dem Ausblick in Kapitel 8.

Kapitel 2

Biologischer Hintergrund

Die Kerne menschlicher Zellen tragen den Bauplan des Lebens, die DNA in sich. Sie ist der Träger der Erbinformation und im menschlichen Organismus in 46 Chromosomen organisiert [22]. Die DNA jedes Chromosoms ist ein langes Molekül und besteht aus zwei gegenüberliegenden Strängen, die jeweils aus einem Phosphatdesoxyribose Rückgrat und daran angeschlossene Verstrebungen, die sogenannten Basen, bestehen. Insgesamt gibt es vier verschiedene Basen: Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G). Zueinander passende Basen (A und T oder C und G) verbinden die beiden DNA-Stränge über Wasserstoffbrückenbindungen. Die dadurch entstehende Leiterstruktur der DNA, schematisch dargestellt in Abbildung 2.1, bildet die allseits bekannte Doppelhelix mit einem Durchmesser von ca. 2 nm [23]. Die Reihenfolge der Basen entlang des Stranges kodieren das Erbgut des Menschen. Da die gegenüberliegenden Basen zueinander passende Basenpaare ausbilden sind die beiden Stränge immer Positiv und Negativ derselben Codesequenz. Zur Teilung der Zellen werden die beiden Stränge aufgespalten und dupliziert, sodass eine DNA Kopie entsteht. Die beiden Duplikate werden dann in der Mitose in die Tochterzellen aufgeteilt und zwei identische Zellkopien entstehen [24].

Schäden an der DNA können wie andere Zellschäden durch unterschiedliche äußere Einwirkungen entstehen. Solche Schadensinduktoren sind zum Beispiel Chemikalien, Drogen, Medikamente und Stress, wie Temperaturerhöhung oder Sauerstoffmangel, aber auch ionisierende Strahlung. Sie erzeugen Schäden, wie die Verletzung der Zellmembran, Defekte in den Mitochondrien oder auch Deformierungen an der DNA. Letztere sind für Zellen und Organismen die gefährlichsten Beeinträchtigungen, da die darin kodierte Erbinformation verändert oder zerstört werden kann.

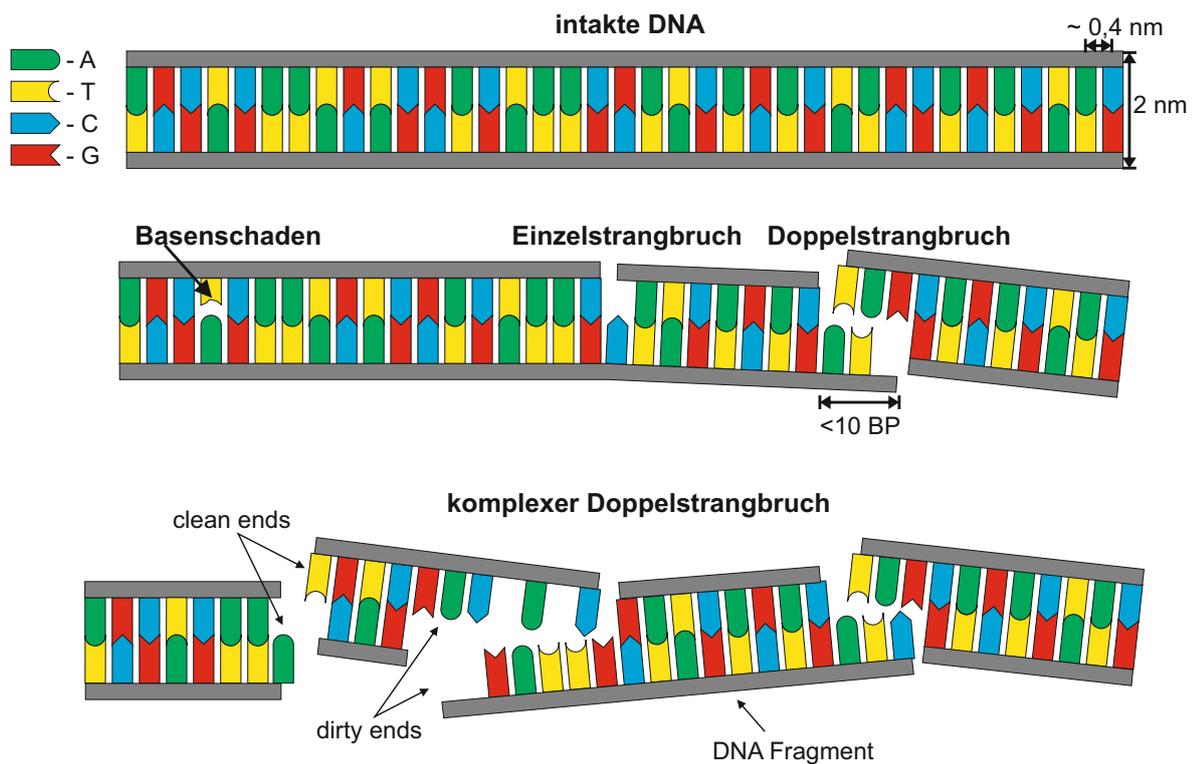


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des DNA Doppelstrangs. Zunächst intakt, dann mit möglichen Schäden, wie Basenschaden, Einzelstrangbruch und Doppelstrangbruch. Zuletzt der komplexe Doppelstrangbruch, der aus vielen DSB nebeneinander besteht und kleine DNA Fragmente erzeugt. „Clean ends“ sind DSB Enden, die nicht kaputt sind und durch einfache Ionisationen entstehen. „Dirty Ends“ sind DSB Enden, bei welchen auch noch Basen fehlen oder zerstört sind.

Zu den möglichen Defekten an der DNA zählen Basenschäden, Einzel- und auch Doppelstrangbrüche (vgl. Abb. 2.1). Schäden an einzelnen Basen können sehr einfach repariert werden, da die komplementäre Base noch vorhanden ist und die dazugehörige Base ersetzt wird. Ähnlich unkompliziert ist die Reparatur von Einzelstrangbrüchen, da dort der noch vorhandene Strang als Vorlage zum Ersetzen der verlorengegangenen Sequenzen dient. Seltener als diese Schäden tritt der Doppelstrangbruch (DSB) auf, wobei man von einem DSB spricht, wenn zwei gegenüberliegende Einzelstrangbrüche nicht weiter als 10 Basenpaare auseinander sind [25]. Er ist jedoch auch sehr viel komplizierter zu reparieren, da die komplette DNA auseinanderbricht und somit im Normalfall keine Vorlage für das Ersetzen zerstörter oder verlorengegangener Sequenzen zur Verfügung steht. Dies macht den DSB für Organismen sehr gefährlich, da bei falscher oder nicht erfolgter Reparatur von DNA Schäden Zelltod oder Mutationen im Genom die Folgen sein können. Letzteres kann zur Tumorbildung oder zu irreversiblen Organschäden führen. Solche Fehler können zu Mutationen und somit Karzinogenese oder zum Zelltod führen.

Die Effektivität und Funktionalität der DSB Reparatur hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie die räumliche Anordnung des Chromatins um den Schaden oder aber die Zellzyklusphase, in der sich die Zelle während der Schadensinduktion befindet. Letzteres bestimmt grundlegend, welche Reparaturmechanismen möglich sind.

2.1 Chromatinordnung im Zellkern

Ein gängiges und durch viele Studien bestätigtes Modell über die räumliche Aufteilung des Chromatins in der Zelle ist das Chromatin Territory - Interchromatin Compartment (CT-IC) Modell von T. Cremer [26–30]. Dieses Modell teilt die Organisation des Chromatins im Zellkern im wesentlichen in drei Bereiche auf: die Chromatin Territorien (CTs), das Interchromatin Compartment (IC) und die Perichromatin Region. Die Chromatin Territorien beschreiben die Region, in der die DNA in ~ 1 Mbp (Megabasenpaar) großen Chromatindomänen kompaktiert ist. Es wird vermutet, dass diese Domänen wiederum aus ~ 100 kbp (Kilobasenpaar) großen Chromatinschleifen bestehen [30]. Die Chromatin Territorien sind inaktive Zellkernregionen, in denen keinerlei aktive Prozesse, welche die Zelle für das Überleben und für die Teilung benötigt, stattfinden, sondern sich dort nur das Chromatin befindet. Das Interchromatin Compartment und die Perichromatin Region hingegen bilden die aktive Zellkernregion [28]. Das Interchro-

matin Compartment ist ein Netzwerk aus Kanälen und Nischen, welche die Chromatin Territorien umgeben, keine DNA beinhalten und zusätzlich mit den nukleären Poren verbunden sind. Es ist verantwortlich für Proteinaustausch mit dem Zytoplasma [30]. In den Nischen befinden sich Proteine und Botenstoffe, die für die Prozesse der Zelle, wie beispielsweise Replikation oder Reparatur notwendig sind. Das Interchromatin Compartment breitet sich zwischen einzelnen Chromatin Territorien aber auch innerhalb deren dreidimensionaler Struktur aus und wird durch die Perichromatin Region von den Chromatin Territorien getrennt [30]. Die Perichromatin Region ist ca.100-200 nm breit und besteht hauptsächlich aus dekondensiertem Chromatin. Sie ist die Region, in der hauptsächlich Transkription, also die Herstellung von Proteinen, Replikation und Reparatur der DNA stattfinden [28]. Die drei Regionen sind in der Zelle nicht statisch, sondern wandeln sich ständig abhängig von äußeren Faktoren wie Schadensinduktion oder inneren Faktoren wie dem Zellzyklus.

2.2 Zellzyklus und Zelltod

Eine Zelle durchläuft während ihres Lebens ständig verschiedene Phasen, den sogenannten Zellzyklus. Zunächst befindet sich die Zelle in der G1-Phase, in welcher Zellbestandteile und Proteine, welche für den Stoffwechsel und auch für das spätere Verdoppeln des Chromosomensatzes notwendig sind, erzeugt werden. Die G1-Phase dauert in menschlichen Zellen ca. 8 h [23, 31]. Teilt sich eine Zelle nicht mehr weiter, verharrt sie in dieser Phase und produziert Stoffe, die für das Überleben der Zelle und der Funktion im Organismus notwendig sind. Dies bezeichnet man auch als G0-Phase. Soll sich eine Zelle weiter teilen, so geht sie nach der G1-Phase über in die Synthesephase (S-Phase), in der die DNA Stück für Stück durch Proteinkomplexe abgelesen und dupliziert wird. Die Synthese findet an mehreren Orten an der DNA gleichzeitig statt [32]. Die S-Phase dauert in menschlichen Zellen in etwa 6 h [23, 31]. Wenn die DNA vollständig dupliziert ist, tritt die Zelle in die G2-Phase ein, in der die Mitose, also die Zellteilung vorbereitet wird. Hier werden dazu nötige Proteine synthetisiert und Kontakte zu Nachbarzellen gelöst. Nach dieser ca. 4,5 h [23, 31] dauernden Vorbereitung tritt die Zelle in die Mitose ein und teilt sich innerhalb von 1 h in zwei Tochterzellen. Diesen ca. 20 h dauernden Zellzyklus durchlaufen die Zellen immer wieder von vorne, solange bis sie entweder Signale zum Teilungsstopp erhalten oder nicht mehr teilungsfähig sind. Eine schematische Darstellung des Zellzyklus findet sich in Abbildung 2.2. Tumorzelllinien in Kultur, wie

sie in dieser Arbeit für Experimente verwendet werden, teilen sich solange exponentiell weiter, bis sie irreparabel geschädigt werden und absterben, da hier der Mechanismus für das natürliche Wachstumsende ausgeschaltet ist. Der schadensinduzierte Zelltod erfolgt entweder geordnet in der Apoptose, dem programmierten Zelltod, wo sich die Zelle kontrolliert zersetzt. Oder aber findet unkontrolliert in der Nekrose, also der pathologischen Zerstörung der Zellen, statt. Beide Todesarten können unter Anderem als Folge falsch oder nicht reparierter DSB auftreten.

2.3 DNA Doppelstrangbruch Reparatur

Zellen haben vielseitige und komplexe Methoden entwickelt, um DSB zu reparieren und gänzlich wiederherzustellen und somit Apoptose oder Nekrose zu entgehen. Ein einfacher Weg ist die nicht-homologe Endenverknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ), welche während des gesamten Zellzyklus auftreten kann. NHEJ findet aber hauptsächlich in der G1 Phase statt. In der S und G2-Phase, wenn als Vorlage das Schwesterchromatid zur Verfügung steht (S/G2-Phase), werden DSB hauptsächlich über die homologe Rekombination (HR) repariert (vgl. Abb. 2.2). Sollten beide Pfade fehlschlagen, gibt es noch alternative Reparaturpfade, welche die getrennten Enden wieder zusammenfügen. Die Forschung zur Reparatur von DSB ist ein seit Jahrzehnten intensiv erforschtes Feld, sodass sich viele wissenschaftliche Reviews und Lehrbücher

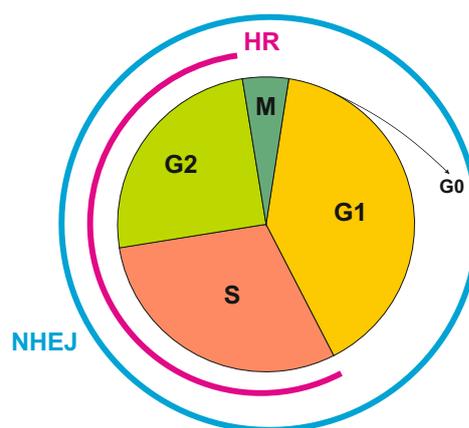


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Zellzyklus, der sich aufteilt in die Mitose oder Zellteilung (M), G1 Phase, Synthesephase (S) und G2 Phase. Zellen die sich nicht mehr weiter teilen, können in die G0 Phase übergehen. Die DNA Reparatur über homologe Rekombination (HR) kann in S und G2 Phase stattfinden. Nicht-homologe Endenverknüpfung (NHEJ) kann während des gesamten Zellzyklus stattfinden.

damit beschäftigen. Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Eigenschaften und spezifischen Vor- und Nachteile der Reparaturmethoden finden sich in den Reviews von G. Iliakis et al. [33] sowie T. Iyama und D.M. Wilson [34].

2.3.1 Homologe Rekombination

In der homologen Rekombination wird das Schwesterchromatid als Vorlage zur Reparatur verwendet und kann somit nur in S- und G2-Phase stattfinden (vgl. Abbildung 2.3). Hier werden erst die überstehenden Strangenden sauber abgeschnitten. Dies involviert verschiedene Proteinkomplexe und endet darin, dass die Enden als Einzelstränge vorliegen (single-stranded DNA, ssDNA) und mit dem Replikationsprotein A (RPA) stabilisiert werden. Um das Schwesterchromatid verwenden zu können, müssen sich dessen beide Stränge trennen und die defekten ssDNA Stücke mit den jeweiligen komplementären Strängen verbunden werden. Ein dafür wichtiges Protein ist Rad51, welches charakteristisch für die HR ist. Danach wird die DNA an beiden Strängen kopiert, die Verbindung zum Schwesterchromatid wird gelöst und die nun vollständigen, komplementären Strangenden werden zusammengefügt. In der HR sind noch viele weitere Proteine involviert, welche aber in dieser Arbeit für das Verständnis nicht relevant sind. Diese Art der Reparatur führt zu einer fehlerfreien Wiederherstellung der Ausgangsequenzen. Die HR funktioniert auch bei komplexen DSB, bei denen die Enden nicht sauber durchtrennt sind oder mehrere DSB hintereinander an einem Strang liegen. Allerdings dauert die HR, bedingt durch ihre Komplexität, sehr lange (mehrere Stunden [33]) und sie kann nur in G2 und S-Phase stattfinden, da das Schwesterchromatid benötigt wird.

2.3.2 Nicht-homologe Endenverknüpfung

In der nicht-homologen Endenverknüpfung (NHEJ) werden die beiden Enden eines DSB durch Enzymreaktionen wieder verbunden (vgl. Abb. 2.3), ohne dass ein Schwesterchromatid gebraucht wird. In der G1 und frühen S-Phase der Zellen tritt NHEJ als primärer Reparaturweg auf, da kein (G1) oder nur begrenzt Schwesterchromatid (frühe S) zur Verfügung steht. NHEJ kann aber auch in allen anderen Phasen des Zellzyklus vorkommen und als Back-up fungieren, falls HR nicht funktioniert. Sie ist mit Reparaturzeiten von bis zu 15-30 min [35, 36] sehr schnell, allerdings auch fehlerbehaftet, da die überstehenden Enden der DSB nach einer Resektion der nicht passenden Über-

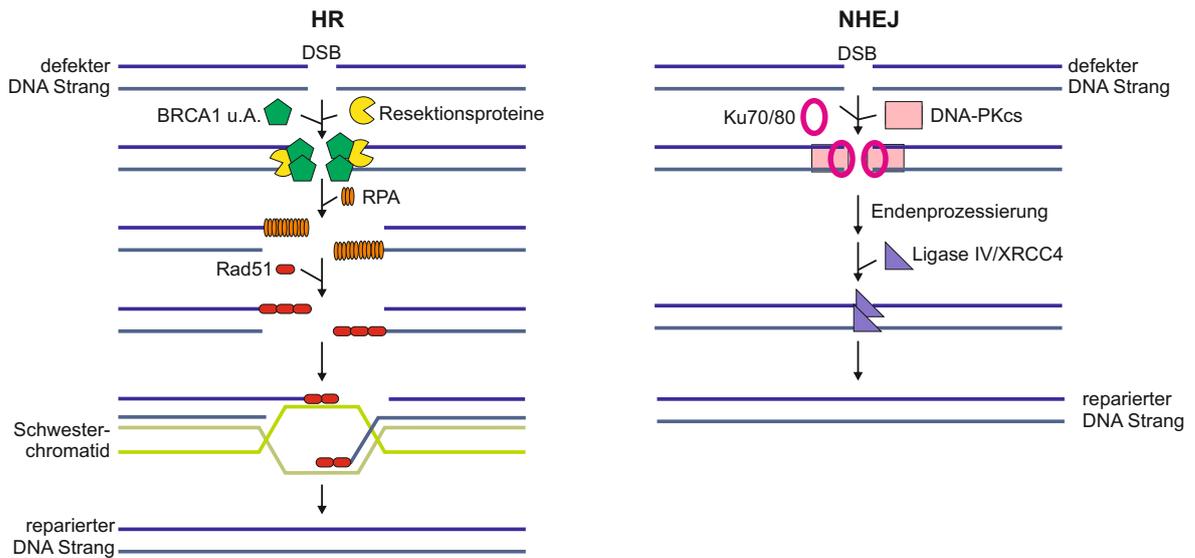


Abbildung 2.3: Schematischer Vergleich der DSB Reparatur durch homologe Rekombination (HR) und nicht-homologe Endenverknüpfung (NHEJ).

stände einfach zusammengefügt werden. Bei einfachen Doppelstrangbrüchen, bei denen die DNA sauber durchtrennt ist, ist dies ein nicht sehr schwerwiegendes Problem, da dort kaum überstehende Enden auftreten. Steigende Komplexität der DSB kann zu „ausgefranzten“ Bruchenden (dirty ends) führen, welche erst durch DNAsen wie beispielsweise die Endonuklease Mre11 abgeschnitten und durch Glycosylasen gesäubert werden müssen, was zum Verlust von einzelnen Basen und somit zu Mutationen in der reparierten DNA führt. Bei der NHEJ fehlt ein Kontrollmechanismus um solche Fehler zu vermeiden, da keine Vorlage zur Wiederherstellung der Ausgangsbasensequenzen vorhanden ist.

Kurz zusammengefasst werden die freien DNA Strangenden durch Proteine erkannt und am Schadensort lokalisiert gehalten. Danach werden sie durch andere Proteine gesäubert und ohne weitere Kontrolle wieder zusammengefügt. Wichtige Akteure hierbei sind die Ku70/80 Heterodimere, welche an den beiden freien Enden binden und sie dadurch möglichst lokalisiert zusammenhalten. Durch diese Bindung wird DNA-PKcs, eine Protein Kinase, an den Schaden rekrutiert. Dies manipuliert und säubert die überstehenden Enden so, dass sie nun prozessiert werden können. Nachdem die Enden gesäubert sind, werden sie über den Ligase IV/XRCC4 komplex verbunden und der DSB ist repariert [33].

2.3.3 Alternative Pfade

In manchen Fällen kann es passieren, dass die beiden Hauptreparaturwege HR und NHEJ nicht funktionieren. Um der Zelle trotzdem ein Voranschreiten im Zellzyklus zu ermöglichen, gibt es auch noch andere alternative Reparaturpfade (alternative End-Joining, alt-EJ). Sie fungieren als letzter Ausweg und sind meist nicht sehr effektiv und extrem fehleranfällig. Diese Reparaturmechanismen können, ähnlich wie bei NHEJ, Enden wieder zusammenführen, sind allerdings sehr fehleranfällig und führen häufig zu Mutationen. Über die genauen Mechanismen dieser alternativen Reparaturwege ist noch wenig bekannt, da sie erst in den letzten Jahren nach und nach entdeckt wurden. In G1 Zellen folgt bei nicht funktionierender NHEJ das alt-EJ, da homologe Rekombination hier nicht stattfinden kann. In G2 und S-Phase Zellen wäre die Reihenfolge HR, NHEJ und dann alt-EJ [33]. Die alternativen Pfade sollen hier der Vollständigkeit halber angesprochen sein, da sie allerdings noch nicht genauer erforscht sind, werden sie nicht weiter diskutiert.

2.4 DNA Schadensmarker

DSB werden direkt nach Entstehung über Ladungsverschiebungen, welche durch die Ionisationen am DNA Molekül ausgelöst werden, detektierbar. Entweder entsteht durch die Ladungsverschiebung die Möglichkeit zur Phosphorylierung von Histonen, also den Strukturen, um welche die DNA gewickelt ist, oder die Möglichkeit zur Detektion der entstandenen Ladungen durch so genannte DNA Reparaturproteine. Diese Schadenserkennung beginnt sofort nach Entstehung und mündet idealerweise nach einer langen Signalkaskade in der Reparatur der Brüche. Abhängig vom Zellzyklus werden unterschiedliche Proteine an den Schaden rekrutiert, um diesen zu reparieren. Schadensmarker, die in der DSB Erkennung und Reparatur eine Rolle spielen, können im wesentlichen in zwei Gruppen aufgeteilt werden [37]. Das sogenannte flanking chromatin beschreibt diejenigen Proteine, die in der Nähe des Schadens relativ großflächig (~ 1 Mbp) binden. Das single-stranded DNA compartment (ssDNA) bezeichnet diejenigen Proteine, welche direkt an Einzelstrangenden am Doppelstrangbruch binden und somit kleine Signallakkumulationen, sogenannte Foci bilden [37]. In dieser Arbeit wird die Aktivierung des Histons H2AX und die Akkumulation von bestimmten Proteinen aus flanking chromatin und ssDNA verwendet, um mikroskopisch einzelne Teile der Signalkaskade zu untersuchen. Konkret wird zum einen der unmittelbare Beginn der

NHEJ repräsentiert durch DNA-PK Rekrutierung und zum anderen der Übergang zwischen der Schadensdetektion und der Entscheidung für die HR untersucht. Wichtige Proteine dafür sind γ H2AX, 53BP1, DNA-PK, Brca1 und Rad51, deren Funktionsweisen und Anlagerungsmechanismen an die DSB im Folgenden kurz dargestellt werden.

2.4.1 γ H2AX

Histone sind sehr kleine Proteine, welche aufgrund ihrer positiven Ladung die negativ geladene DNA binden [38]. Zweimal vier Histone (H2A, H2B, H3 und H4) bilden einen Histonkern, um den sich die DNA wickelt und ein sogenanntes Nukleosom bildet. In 10 % der Fälle ist H2A durch ein eng verwandtes Histon H2AX ersetzt. Nach der Induktion eines DSB wird das Histon H2AX an Serin 139 phosphoryliert, somit aktiviert und es entsteht γ H2AX. Diese Aktivierung findet in Megabasenpaar großen Regionen um den DNA Schaden statt und kann durch Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht werden [39]. γ H2AX ist ein typischer Vertreter des flanking chromatin. Innerhalb dieser durch γ H2AX markierten Region findet die Akkumulation der DSB Reparaturproteine statt, deshalb ist es bestens geeignet, um ioneninduzierte Schadensorte zu markieren.

2.4.2 53BP1

Eines der wichtigsten Proteine, welches an allen durch γ H2AX markierten Schadensorten akkumuliert, ist das p53 Bindeprotein 1 (53BP1). 53BP1 spielt eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulierung nach Bestrahlung [40], in der Reparatur von DSB durch NHEJ [41–43], und in der Stabilisierung der Schadensregion bei HR [18]. 53BP1 gehört auch zu den Vertretern des flanking chromatin. Die Akkumulation an den Schaden beginnt bereits nach ca. 1,5-3 min [15]. 53BP1 wird von den direkten Schadens-Orten verdrängt, wenn Proteine akkumulieren, welche die einzelnen Strangenden prozessieren [18, 44, 45].

2.4.3 DNA-PK

Ein Protein, welches nach wenigen Sekunden schon an den Schaden rekrutiert wird, ist DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit). Es bindet an die DSB bindenden Proteine KU70/80 [46]. Dieser Komplex aus KU70, KU80 und DNA-PKcs bildet die DNA-abhängige Proteinkinase DNA-PK. Er blockiert die Ligation der Strang-Enden bis entstandene Einzelstrangüberhänge durch DNAsen und Glycosyla-

sen gesäubert sind und NHEJ möglich ist, oder bis HR beginnt. Durch die Bildung von je einem DNA-PK an jedem Ende des DSB wird ein Auseinanderdriften der Strangenden begrenzt und die Wahrscheinlichkeit für das Zusammenfügen falscher Enden wird minimiert [46]. Durch Phosphorylierung wird DNA-PKcs aus dem Komplex gelöst und ist nun als pDNA-PKcs für die Färbung zur Fluoreszenzmikroskopie zugänglich. So ist es möglich, alle DSB indirekt zu markieren.

2.4.4 Brca1

Brca1 (Breast cancer associated protein 1) übernimmt während der Reparatur regulatorische Aufgaben und fungiert als Mediator zwischen NHEJ und HR [45]. Brca1 ist mit verantwortlich, dass 53BP1 vom direkten Schadensort verdrängt wird [45, 47]. Dies ermöglicht das Binden von Proteinen, die zur Prozessierung der DSB-Enden für die homologe Rekombination notwendig sind, wie RPA und später Rad51 [45]. Dies macht Brca1 zu einem guten Zielprotein für Korrelationsanalysen um den Übergang zwischen NHEJ und HR im Detail zu verstehen. Erste Brca1 Akkumulationen wurden bereits 10 min nach Bestrahlung beobachtet [48].

2.4.5 Rad51

Die DNA-Rekombinase Rad51 ist ein typischer Vertreter des ssDNA und bildet filamentöse Strukturen an fertig prozessierten Einzelstrangenden. Diese Strukturen verbinden die Einzelstrangenden mit den komplementären Schwesterchromatiden, wo die Rekonstruktion der DNA Sequenzen stattfindet [49]. Die beobachtete Kinetik von Rad51 ist sehr viel langsamer. In dieser Arbeitsgruppe wurden für alle verwendeten Strahlenarten erste Akkumulationen nach 13-15 min beobachtet [44, 48].

Kapitel 3

Wechselwirkung von Ionen mit biologischer Materie

Energiereiche Ionen gehören, wie elektromagnetische Wellen mit Energien größer als die Ionisierungsenergie der bestrahlten Atome, zur ionisierenden Strahlung. Die Grundlagen der Wechselwirkung von Ionen mit biologischem Zielmaterial werden im Folgenden eingeführt. Besonderes Augenmerk liegt auf der räumlichen Verteilung der Energiedeposition und damit der entstehenden Schädigung in Zielmaterial.

3.1 Energieverlust von Ionen

Ionen geben ihre Energie in Materie durch zwei Prozesse ab, durch elektronische und nukleare Wechselwirkungen. Der elektronische Energieverlust ist bedingt durch Coulombwechselwirkung der Ionen mit den Elektronen der Atome der bestrahlten Materie. Der nukleare Energieverlust hingegen ist im Wesentlichen durch elastische Streuung der Ionen im abgeschirmten Coulombpotential der Atomkerne des Zielmaterials und durch starke Wechselwirkung beim zentralen Stoß mit Energien oberhalb der Coulombschwelle beschrieben. Abhängig von der Ionenenergie tragen diese beiden Energieverluste unterschiedlich bei, wie in Abbildung 3.1 für Kohlenstoff dargestellt.

Bei Ionen mit Energien ab einigen Megaelektronenvolt pro Nukleon, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, erfolgt der Energieübertrag hauptsächlich durch elektronische Anregung oder Ionisationen. Dies kann den Verlust eines oder mehrerer Elektronen in einem Atom verursachen, was die Bindungen einzelner Atome in Molekülen lösen und somit ganze Moleküle zerstören kann [51, 52]. Bei dieser Energie (vgl. bei-

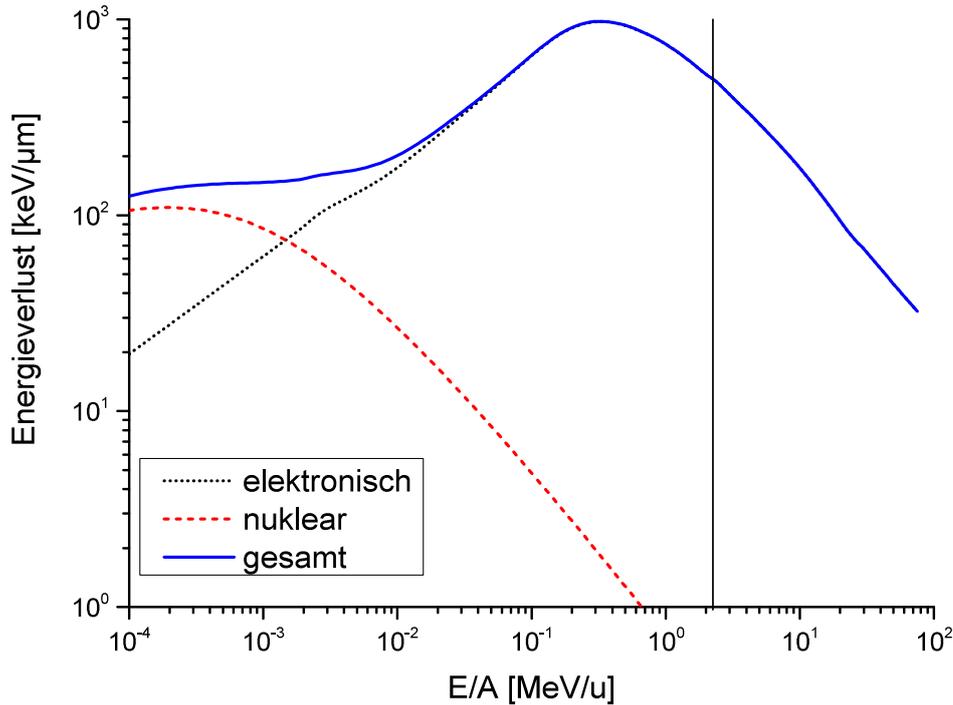


Abbildung 3.1: Vergleich von nuklearem und elektrischem Energieverlust für Kohlenstoffionen in Abhängigkeit ihrer Energie, bezogen auf die Massenzahl A berechnet mit SRIM [50]. Die schwarze Linie markiert die Energie ($2,25 \frac{\text{MeV}}{u}$) der Kohlenstoffionen, die in dieser Arbeit verwendet werden. Bei diesen Energien kann der nukleare Energieverlust vernachlässigt werden.

spielsweise senkrechte schwarze Linie in Abbildung 3.1) ist der nukleare Energieverlust ca. 1000 mal geringer als der elektronische Energieverlust und wird daher im Weiteren nicht betrachtet.

Die Dosis

$$D = \frac{\Delta E}{\Delta m} \quad (3.1)$$

gibt die in einem Volumenelement der Masse Δm deponierte Energie ΔE an. Sie wird in der Einheit Gray, $1\text{Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}}$, gemessen. Die Abgabe der Dosis im Material ist nicht homogen, da die zugrundeliegenden Prozesse einerseits statistischer Natur sind. Dies führt dazu, dass die gemessene Dosis in kleinen Volumina im Mikro- oder Nanometer Bereich schwankt, was im Bereich der Mikrodosimetrie betrachtet wird [53]. Andererseits variiert die mittlere Energiedeposition entlang der Einstrahlrichtung und auch senkrecht dazu, wie im Folgenden beschrieben.

3.1.1 Linearer Energietransfer

Der lineare Energietransfer (LET) beschreibt den Energieübertrag eines Ions in Materie entlang der Bewegungsrichtung. Der LET ergibt sich aus der Energieabgabe des Ions auf die Materie ΔE pro Weglänge Δx :

$$\text{LET} = \frac{\Delta E}{\Delta x} \quad (3.2)$$

Aufgrund der Energieerhaltung hängt der LET eng mit dem Bremsvermögen $\frac{dE}{dx}$, dem Energieverlust pro Weglänge, zusammen, wobei beim LET jedoch der Energieverlust durch Bremsstrahlung nicht berücksichtigt wird. Der Beitrag der Bremsstrahlung zum Energieverlust ist jedoch beim Durchgang von MeV-Ionen durch Materie sehr gering. Mit dem Bremsvermögen der Ionen, die in dieser Arbeit verwendet werden, wird somit der LET (Einheit: $\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) sehr gut beschrieben. Der LET ist abhängig von der Teilchenart und -energie und variiert über mehrere Größenordnungen, wie in Abbildung 3.2 für die in dieser Arbeit verwendeten Ionen dargestellt.

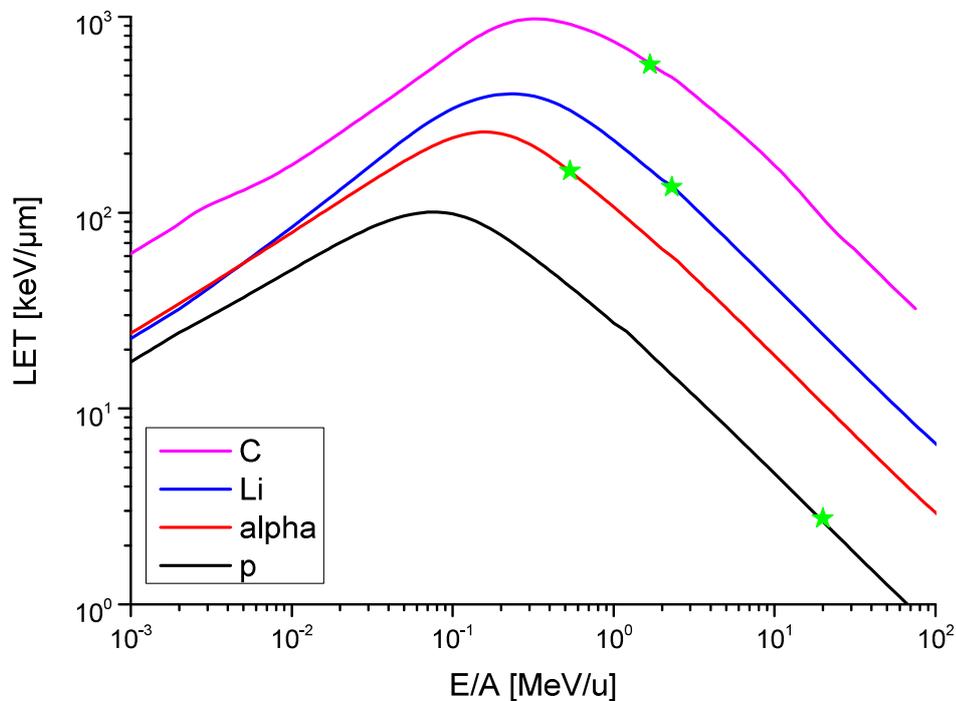


Abbildung 3.2: Linearer Energietransfer für die in dieser Arbeit verwendeten Ionen. Die Sterne markieren die Energien, die verwendet wurden. Berechnet mit SRIM [50].

Der LET ist außerdem abhängig vom Zielmaterial, wobei für biologische Materie Wasser verwendet wird, welches eine sehr gute Näherung ist, da biologische Materie hauptsächlich aus Wasser besteht. Für in dieser Arbeit verwendete Ionen war der LET in Wasser $2,6 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ für 21 MeV Protonen, $116 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ für 20 MeV Lithiumionen, $150 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ für 2 MeV α -Teilchen und $500 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ für 27 MeV Kohlenstoffionen. Zur LET Berechnung können verschiedenen Programme verwendet werden, welche den Energieübertrag auf ca. 5% genau bestimmen können. In dieser Arbeit werden die LET Berechnungen in Wasser mit dem Programm SRIM [50] durchgeführt.

Ionisierungsdichte

Der LET bietet ein Maß für die Ionisierungsdichte im Zielmaterial und kann somit bei biologischen Experimenten als charakterisierende Eigenschaft für unterschiedliche Teilchen verwendet werden. Man unterscheidet niedrig- und hoch-LET Strahlung, wobei die Grenze bei $\text{LET} = 10 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ definiert ist. Locker ionisierende Strahlung mit $\text{LET} < 10 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ erzeugt vereinzelte Ionisationen [16]. Beispiele hierfür sind Röntgenstrahlung, Photonen und Protonen mit einer Energie größer als $\sim 4 \text{ MeV}$. Dicht ionisierende Strahlung, wie Schwerionen, erzeugt mit steigendem LET immer dichter beieinander liegende Ionisationen entlang einzelner Ionenspuren [16].

Dosisberechnung für Ionen

Bestrahlt man eine Probe der Dichte ρ mit Ionen mit definiertem LET und der Fluenz F (Teilchenzahl pro Fläche), so wird folgende Dosis deponiert:

$$D = \frac{F \cdot \text{LET}}{\rho} \quad (3.3)$$

3.1.2 Radiale Dosisverteilung

Die Energie, die das Ion bei der Wechselwirkung mit Materie abgibt, wird zum Teil als kinetische Energie auf Sekundärelektronen übertragen. Dieser Energieübertrag ist begrenzt und variiert je nach Ionenenergie und Stoßwinkel und ist maximal beim zentralen Stoß. Die Sekundärelektronen sind wiederum ionisierende Strahlung und deponieren ihre Energie bis zur maximalen Reichweite im Nano- bis Mikrometerbereich. Somit findet die Energiedeposition des Ions in Materie nicht nur direkt entlang des Ionendurchgangs statt, sondern auch in dessen Umgebung. Zur Beschreibung dieser radialen Dosisverteilung gibt es abgesehen von aufwendigen Monte-Carlo-Simulationen auch analytische

Modelle. Diese unterscheiden oftmals zwischen dem Kern („Core“) der Ionenspur und der Penumbra, also dem Bereich der Ionisationen durch Sekundärelektronen. In der Penumbra fällt die lokal gemittelte Dosis invers quadratisch mit dem Abstand bis zu einem maximalen r_{\max} ab [54]. Für den maximalen Abstand gilt nach [55]:

$$r_{\max} = 0,0616 \mu\text{m} \left(\frac{\text{MeV}}{\text{u}} \right)^{-1,7} \cdot (E/A)^{1,7} \quad (3.4)$$

wobei E die Energie der Ionen und A die Massenzahl ist. r_{\max} für die in dieser Arbeit verwendeten Ionen ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Dies definiert den Bereich um den Ionendurchgang, in dem Ionisationen entstehen.

Ion	E in MeV	A in u	LET in $\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$	β	r_{\max} in μm	r_{\min} in nm
C	27	12	500	0,07	0,24	2,8
C	36	12	416	0,08	0,40	3,2
Li	20	7	116	0,08	0,86	3,2
p	21	1	2,6	0,21	10,90	8,4
α	2	4	150	0,03	0,02	1,2

Tabelle 3.1: Energie E , Massenzahlen A , LET, Geschwindigkeit $\beta = \frac{v}{c}$, maximaler und minimaler Radius der in dieser Arbeit verwendeten Ionen. Die Energie entspricht der Energie der Ionen an den Zellen.

Eine Messung für den Core ist im Gegensatz zur Penumbra, die indirekt durch orts aufgelöste Messungen in gewebeäquivalenten Gasen bestimmt werden kann [54], nicht möglich und nur durch Modellierung zugänglich. Für diese Modellierung gibt es verschiedene Ansätze. Eine Möglichkeit ist die gleiche Aufteilung der Energiedeposition in die durch direkte elektronische Anregungen durch das Ion selbst übertragene Energie und die von den Sekundärelektronen übertragene Energie [56]. In dieser Arbeit jedoch wird zur Dosisberechnung das Local Effect Model (LEM) [57] verwendet. In diesem Modell liegen Daten aus Zellüberlebensexperimenten der Modellierung zu Grunde. Das LEM nutzt eine homogene Dosisverteilung innerhalb eines bestimmten Radius r_{\min} mit

einem kontinuierlichen Übergang in den invers-quadratischen Abfall:

$$D(\vec{r}) = \begin{cases} \frac{\lambda}{r_{\min}^2} & |\vec{r}| < r_{\min} \\ \frac{\lambda}{|\vec{r}|^2} & r_{\min} < |\vec{r}| < r_{\max} \\ 0 & |\vec{r}| > r_{\max} \end{cases} \quad (3.5)$$

Wobei der maximale Radius nach Gleichung 3.4 und der minimale Radius r_{\min} durch die Geschwindigkeit $\beta = \frac{v}{c}$ des Ions definiert ist [57]:

$$r_{\min} = 40 \text{ nm} \cdot \beta \quad (3.6)$$

Die Geschwindigkeiten und minimalen Radien der verwendeten Ionen finden sich in Tabelle 3.1. λ ist eine Normierungskonstante die sicherstellt, dass das radiale Integral den LET reproduziert und ist somit abhängig vom LET des Teilchens und der Dichte des Zielmaterials. Sie errechnet sich zu:

$$\lambda = \frac{\text{LET}}{\pi \rho \left[1 + 2 \ln\left(\frac{r_{\max}}{r_{\min}}\right) \right]} \quad (3.7)$$

Um die tatsächliche Schädigung in der Zelle betrachten zu können, muss noch eine Verschmierung des Energieübertrags durch die Entstehung und Diffusion von Radikalen mit einbezogen werden. Dies erfolgt im LEM durch die zweidimensionale Faltung der Dosisverteilung mit einer Gaußverteilung der Breite $\sigma = 4 \text{ nm}$, welches der typischen Diffusionslänge in der zellulären Umgebung entspricht [58]. Somit ergibt sich die effektive Dosis \hat{D} als:

$$\hat{D}(\vec{r}) = \int_{\mathbb{R}^2} D(\vec{r}') \exp\left(-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{2\sigma^2}\right) d^2\vec{r}' \quad (3.8)$$

Dieses Integral ist nicht analytisch sondern nur numerisch lösbar. Die numerische Integration wurde von C. Greubel mittels der QAG adaptive integration routine der GNU Scientific Library [59] durchgeführt. Die radialen Dosisverteilungen sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die effektive Dosis der lockerionisierenden Protonen hat den

größten Radius. Lithium und Kohlenstoff haben ähnliche radiale Reichweiten, da sie ähnliche Geschwindigkeiten haben, unterscheiden sich jedoch in der anfänglichen Dosis um eine Größenordnung, was auf den unterschiedlichen LET zurückzuführen ist. Obwohl die α -Teilchen und Lithiumionen einen ähnlichen LET haben, sieht ihre Dosisverteilung aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeit gänzlich unterschiedlich aus. Die Dosis im Kern der Ionenspur für die α -Teilchen ist um 1 Größenordnung größer und liegt im Bereich der Kohlenstoffionen. Die radiale Ausdehnung ist bei den α -Teilchen allerdings um 1 Größenordnung kleiner, als bei den Lithiumionen.

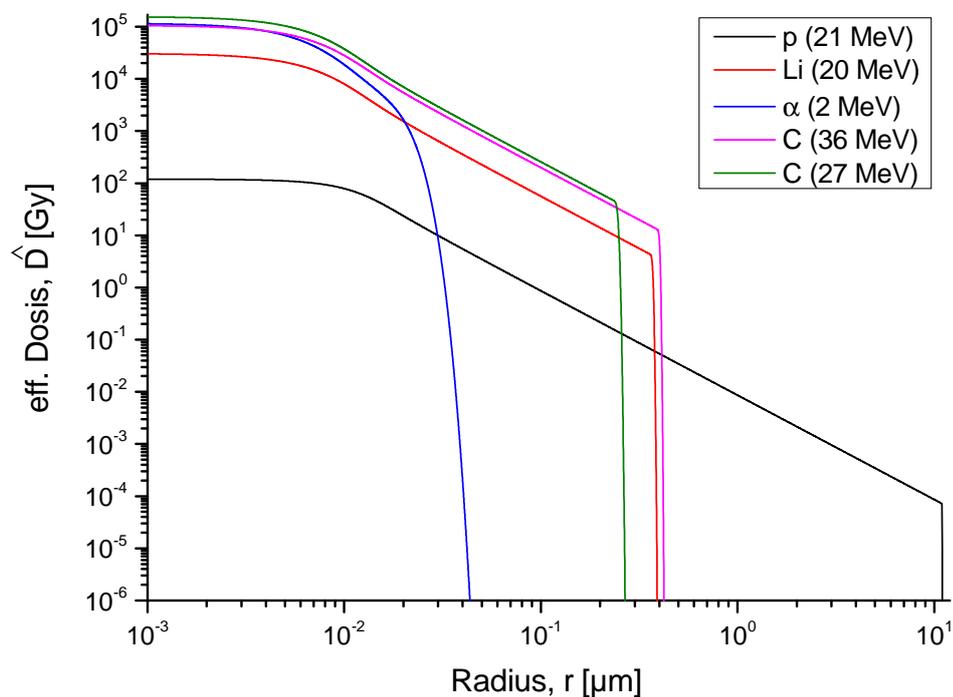


Abbildung 3.3: Radiale Dosisverteilungen der verwendeten Ionen nach Gleichung 3.8

3.2 DNA Doppelstrangbrucherzeugung durch energetische Ionen

Durch Ionisationen entlang ihrer Flugstrecke können energetische Ionen abhängig von ihrem LET unterschiedlich viele Ionisationen am DNA Molekül erzeugen, wenn sie Zellkerne penetrieren. Die Erzeugung von DSB erfolgt durch zwei unterschiedliche Prozesse. Die direkte Schadensinduktion erfolgt durch Ionisationen direkt am Desoxyribose-Rückgrat der DNA, wohingegen die indirekte Schadensinduktion durch die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erfolgt, welche durch Ionisation von Wassermolekülen entstehen.

lekülen in der Zelle erzeugt werden. Die ROS können ihrerseits wiederum die DNA ionisieren. Niedrig-LET Strahlung erzeugt einzelne DSB, welche statistisch im Zellkern verteilt sind. Einzelne 21 MeV Protonen mit einem LET von $2,6 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ erzeugen mit einer Wahrscheinlichkeit von 10 % einen Doppelstrangbruch auf dem senkrechten Weg durch einen Zellkern. Das bedeutet, es sind 10 Protonen notwendig, um im Mittel 1 DSB zu erzeugen. Im Gesamten erzeugen ~ 360 21 MeV Protonen eine Dosis von $1\text{Gy} = \frac{6 \cdot 10^{-25} \text{J}}{6 \cdot 10^{-25} \text{kg}}$ und ca. 30-40 DSB [60].

Hoch LET Strahlung erzeugt bei gleicher Dosis mehr DSB [60] und hat somit eine höhere Effektivität. Dichtionisierende Strahlung erzeugt mit steigendem LET immer mehr Ionisationen direkt in den Atomen der DNA entlang der Ionenspur. Die indirekte Schadensinduktion durch ROS ist hier weniger relevant. Die vermehrte direkte Schadenserzeugung führt zu immer häufiger und zunehmend geclustert auftretenden DSB bis hin zur vollständigen Ionisation entlang der Ionenspur. Dies bedeutet, dass der mittlere Abstand zweier Ionisationen durch die Teilchen genau dem 2 nm Abstand der DNA Stränge entspricht. Weitere Steigerung der Ionisierungsdichte führt nicht zu einer Erhöhung der DSB, da die DNA lokal schon vollständig ionisiert ist. Dies bezeichnet man als „overkill“-Effekt für die Doppelstrangbruchinduktion. Das bedeutet, es können nicht mehr DSB entlang der Ionenspur auftreten und eine höhere Dosisdeposition bringt keinen höheren Effekt. Es bleibt zu bemerken, dass eine Erhöhung der Ionisierungsdichte zu zusätzlichen Schäden an Basen der DNA in der Nähe der erzeugten DSB führen kann. Hier entstehen die sogenannten „Dirty Ends“, komplizierte Schäden der DNA, welche verschiedene Schadensarten an einem Ort vereinen (vgl. Kapitel 2). Diese Schäden sind schwieriger zu reparieren als einfache DSB, können zunächst aber von einfachen Schäden nicht unterschieden werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten hoch-LET Ionen haben radiale Dosisreichweiten im Bereich von 20-900 nm und erzeugen somit definierte Schadenstracks entlang ihres Durchgangs durch die Zellen. DSB-Dichten variieren für die verwendeten Ionen im LET Bereich von $100\text{-}500 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ von $2 \frac{1}{\mu\text{m}}$ bis $10 \frac{1}{\mu\text{m}}$ [16]. Die steigende Dichte der DSB führt dazu, dass vermehrt DSB-cluster (vgl. Abb. 2.1) auftreten. Dies erhöht zusätzlich die Effektivität der Strahlung im Hinblick auf die Induktion von Zelltod und Mutationen.

Relative Biologische Wirksamkeit

Die relative biologische Wirksamkeit (engl.: relative biological effectiveness, RBE) bezeichnet die Wirksamkeit einer Bestrahlungsart im Vergleich zu einer Kontrollbestrah-

lung, typischerweise Röntgen oder Gammastrahlung. Um den RBE zu bestimmen, benötigt man die Dosen der Gammabestrahlung (D_γ) und der gewünschten Zielstrahlung (D_{Ziel}) für den gleichen Effekt. Der RBE ist dann definiert als

$$\text{RBE} = \frac{D_\gamma}{D_{\text{Ziel}}} \quad (3.9)$$

Der RBE von dicht ionisierenden Ionen ist im Normalfall größer als 1. Man benötigt also weniger Dosis für den gleichen Effekt. Biologisch interessante Effekte zur Bestimmung der RBE wären beispielsweise 50 % Zellüberleben, Induktion von Chromosomenabberationen oder die Anzahl an DSB.

Kapitel 4

Höchstaflösende STED Mikroskopie

Höchstaflösende STED (engl.: **S**timulated **E**mission **D**epletion = Bleichen durch stimulierte Emission) Mikroskopie ist eine Nanoskopiemethode, um an fluoreszenzgefärbten Proben Mikroskopie jenseits des optischen Auflösungslimits, wie von Ernst Abbe formuliert, zu betreiben. Im Folgenden werden zuerst die physikalischen Grundlagen zur Fluoreszenz und zum Auflösungsvermögen diskutiert. Im Anschluss wird die STED Nanoskopie basierend auf der konfokalen Laserscanningmikroskopie im Detail beschrieben, wobei unter anderem auf Prinzip, Aufbau und daraus resultierender Auflösung eingegangen wird.

4.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Zunächst liegt der Fokus auf den prinzipiellen Grundlagen zur Fluoreszenzmikroskopie. Dabei stehen die der Fluoreszenz zugrundeliegenden physikalischen und chemischen Prinzipien und die damit mit konventionellen Methoden erreichbare Auflösung im Mittelpunkt.

4.1.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist das Phänomen der Emission elektromagnetischer Strahlung, z.B. von sichtbarem Licht, einer Substanz in Folge von Absorption elektromagnetischer Strahlung. In der Natur kommt Fluoreszenz unter anderem bei bestimmten Quallenarten vor [61]. Diese natürliche Fluoreszenz wurde 1962 von O. Shimomura und Kollegen bei

der Aequorea Qualle [62] entdeckt. Heutzutage werden sowohl diese natürlichen, als auch künstlich hergestellte Fluoreszenzfarbstoffe in der Biologie eingesetzt, um Proteine und andere Strukturen in Zellen zu markieren und somit sichtbar zu machen.

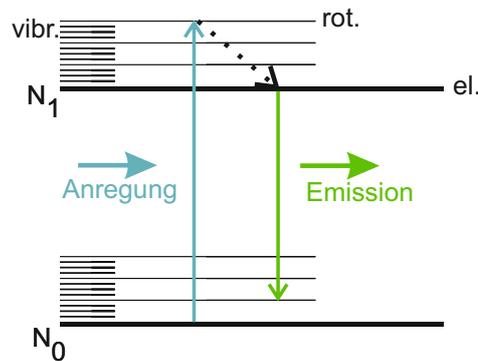


Abbildung 4.1: Vereinfachte schematische Darstellung von Absorption und Emission bei fluoreszierenden Stoffen: Durch Absorption eines Photons geht das Molekül vom Grundzustand N_0 in einen angeregten Zustand N_1 über. Die Energie des Photons muss der Energiedifferenz $\Delta N = N_1 - N_0$ der Zustände entsprechen. Ist die Energie größer als die benötigte Energiedifferenz werden Rotations- und Vibrationsniveaus angeregt, welche in den Zustand N_1 relaxieren, danach kann die Emission eines Photons geringerer Energie und somit größerer Wellenlänge stattfinden.

Bei der Absorption von Licht werden Elektronen eines Farbstoffmoleküls durch Aufnahme der Energie des Lichts in einen angeregten Zustand übergeführt (Abbildung 4.1). Im Allgemeinen sind die angeregten Zustände nicht monoenergetisch, sondern aufgeteilt in Vibrations- und Rotationszustände, welche strahlungsfrei in das energieärmste Niveau des angeregten Zustands relaxieren. Nach einer molekülabhängigen Lebensdauer von typischerweise wenigen Nanosekunden relaxieren die Elektronen in den Grundzustand, indem sie ihre restliche Energie durch Emission eines Photons abgeben. Das abgegebene Licht ist durch die vorangegangene Relaxation der Vibrations- und Rotationszustände energieärmer, als das absorbierte Licht. Außerdem erfolgt der Übergang in höhere Rotations- oder Vibrationszustände des Grundzustands, dies resultiert in einer weiteren Reduktion der Energie der abgegebenen Photonen gegenüber dem Anregungslicht. Dies macht eine Reabsorption der Photonen unmöglich. Das emittierte Licht wird dadurch im Mikroskop als langwelligeres Licht gegenüber dem Anregungslicht detektierbar. Das Phänomen der Wellenlängenverschiebung bei Fluoreszenz heißt Stokes-Verschiebung [63], nach dem Mathematiker und Physiker Sir George Gabriel Stokes, der diese Gesetzmäßigkeit 1852 entdeckte [64]. Diese Wellenlängenverschiebung

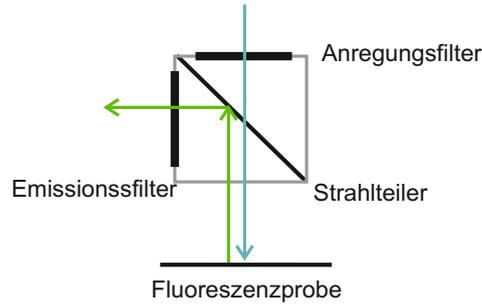


Abbildung 4.2: Vereinfachte schematische Darstellung eines Filterwürfels, wie er in der Epifluoreszenzmikroskopie verwendet wird. Der Anregungsfilter lässt nur Licht der gewünschten Anregungswellenlänge durch, welches durch den Strahlteiler auf die Probe trifft. Das emittierte Licht wird am Strahlteiler reflektiert und durch den Emissionsfilter gelassen. Danach kann es detektiert werden.

kann in der Fluoreszenzmikroskopie ausgenutzt werden, um Anregung und Emission eines Farbstoffs zu trennen. Hierzu werden Anregungs- und Emissionsfilter in den Strahlengang eingebracht, welche durchlässig für die gewünschten und reflektiv für alle anderen Wellenlängen sind (vgl. Abb. 4.2). So kann die kurzwellige Anregung von der langwelligen Emission effektiv getrennt werden.

4.1.2 Punktantwort und optische Auflösung

Zweidimensionale Punktantwort und Auflösung

Eine leuchtende Punktquelle, wie beispielsweise ein fluoreszierendes Molekül, die durch ein optisches System abgebildet wird, hat ein charakteristisches Intensitätsprofil. Dieses Profil kann durch eine Airyfunktion beschrieben werden [65] und ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Man nennt diese Intensitätsverteilung Punktantwort oder Punktspreizfunktion (engl.: point spread function, PSF). Die Airyverteilung, die die Intensitätsverteilung $I(\nu(r))$ in Abhängigkeit der radialen optischen Koordinate $\nu(r)$ darstellt, welche wiederum eine Funktion des radialen Abstandes r ist, ist gegeben durch:

$$I(\nu(r)) = (\pi N^2) \left[\frac{2J_1(\nu(r))}{\nu(r)} \right]^2 \quad (4.1)$$

mit $\nu(r) = \frac{2\pi NA}{\lambda} r$ bei einer Wellenlänge λ und einer Numerischen Apertur $NA = n \sin \alpha$ wobei n der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Probe

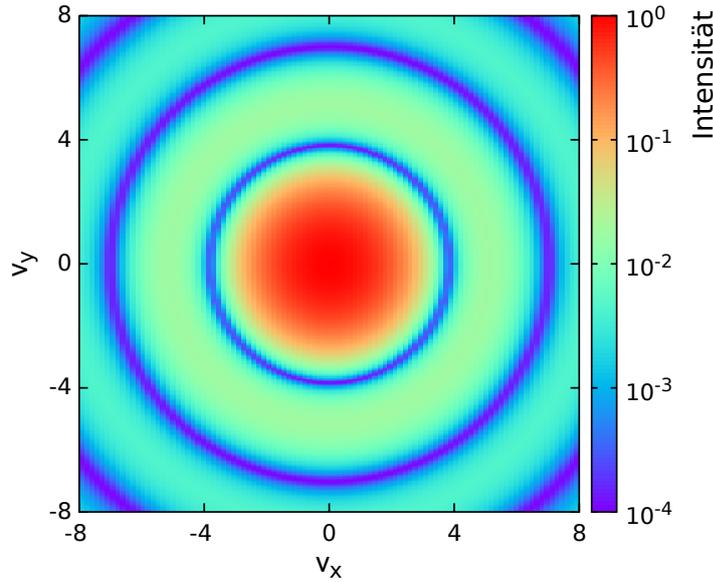


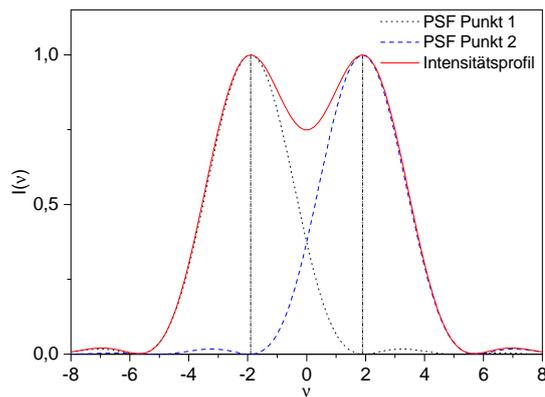
Abbildung 4.3: Airyscheibe ein punktförmigen Lichtquelle, wobei ν , die optische Radialkoordinate in x - und y -Komponente, die Abszisseneinheit und die normalisierte Intensität die Ordinateneneinheit ist.

ist. α ist der halbe Winkel der Apertur des Objektivs (vgl. [15]). $N = \frac{(NA)^2}{f\lambda}$ ist die Fresnelzahl bei der Fokusslänge f und $J_1(\nu(r))$ ist die Besselfunktion erster Ordnung bei der Radialkoordinate $\nu(r)$ [66].

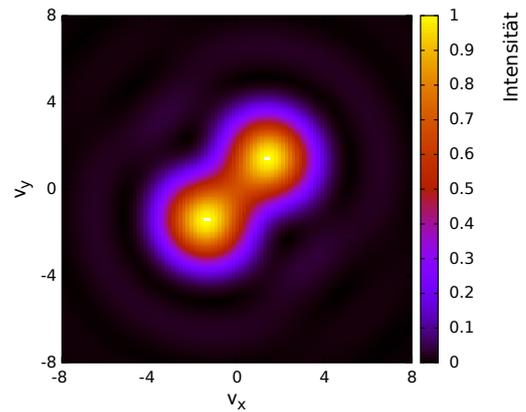
Die laterale Auflösung eines Systems lässt sich nun bestimmen als kleinstmöglicher Abstand d_{min} zweier Punktquellen, die in der Abbildung noch unterschieden werden können. Die Definition der Unterscheidbarkeit ist nicht eindeutig, folglich gibt es verschiedene Kriterien, wie zum Beispiel die Auflösung nach dem Rayleigh- oder dem Sparrowkriterium. Nach dem Rayleighkriterium geht man davon aus, dass zwei Punkte dann noch unterscheidbar sind, wenn das Maximum der einen PSF genau auf dem Minimum der anderen PSF liegt [67], wie in Abbildung 4.4(a) dargestellt. Dies entspräche bei einer gegebenen Wellenlänge λ einer Auflösung von:

$$d_{\min, \text{Rayleigh}} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA} \quad (4.2)$$

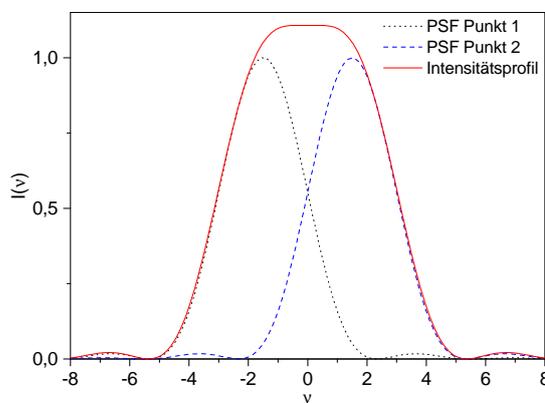
Das Sparrowkriterium liefert einen für das menschliche Auge realistischeren Fall und besagt, dass zwei Punkte gerade nicht mehr aufgelöst werden können, wenn die Summe der beiden PSF kein Intensitätsminimum in der Mitte mehr hat (vgl. Abb. 4.4(c)) [68].



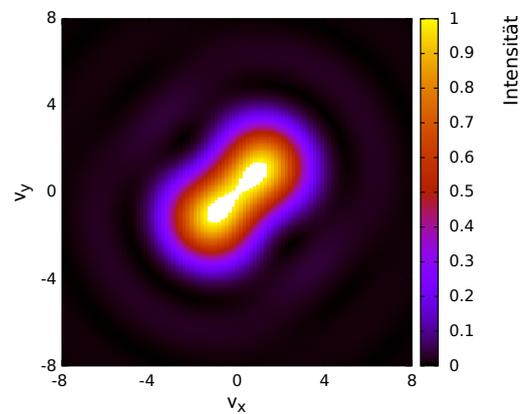
(a) Rayleighkriterium: Zwei Punkte können aufgelöst werden, wenn das Hauptmaximum der PSF des einen Punkts auf dem ersten Minimum des anderen Punkts liegt.



(b) Intensitätsverteilung von zwei Punkten, die genau das Rayleighkriterium erfüllen.



(c) Sparrowkriterium: Zwei Punkte können gerade nicht mehr aufgelöst werden, wenn die Summe der Intensitätsverteilungen kein Minimum in der Mitte mehr hat.



(d) Intensitätsverteilung zweier Punkte, die nach Sparrow gerade nicht mehr auflösbar sind.

Abbildung 4.4: Auflösungskriterien nach Rayleigh and Sparrow.

Dies liefert eine Auflösung von:

$$d_{\min, \text{Sparrow}} = \frac{0.47 \cdot \lambda}{\text{NA}} \quad (4.3)$$

Die Intensitätsverteilungen für zwei Punkte die nach dem Rayleigh- bzw. Sparrowkriterium auflösbar sind, sind in Abbildung 4.4(b) und 4.4(d) dargestellt. Die beiden Punkte nach dem Rayleighkriterium sind auch visuell noch gut ausflösbar, wohingegen die Punkte entsprechend dem Sparrowkriterium nicht mehr als zwei unterschiedliche Punkte wahrgenommen werden können, allerdings durch die Form der Intensitätsverteilung als zwei Punkte identifizierbar wären.

Man kann sagen, dass die Auflösung ungefähr $d_{\min} \approx \frac{\lambda}{2\text{NA}}$ entspricht. Schon Ernst Abbe (1840-1905) beschrieb dies 1873, als er den beugungsbedingten Zusammenhang zwischen Auflösung, numerischer Apertur eines Objektivs und Wellenlänge des Lichts untersuchte [68]. Seine auf Experimenten mit der Darstellung von Doppelspalt und Gittern durch optische Systeme beruhende Schlussfolgerung, das so genannte Abbe-Limit der Mikroskopie besagt, dass die Auflösung eines optischen Systems nicht besser sein kann als:

$$d_{\min, \text{Abbe}} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2\text{NA}} \quad (4.4)$$

Für heute benutzte sehr gute Öljektivs kann die numerische Apertur einen Wert von bis zu $\text{NA} = 1.4$ haben, was nach Abbe mit dem Brechungsindex von Öl $n=1.518$ zu einer Auflösung von $d_{\min} \approx \frac{\lambda}{3}$ führen würde. Dieser Fall ist in der Praxis jedoch kaum erreichbar, da die optischen Systeme nicht als perfekt angenommen werden können und Material- und Justageunsicherheiten die Auflösung verschlechtern. Als Faustregel für die meisten optischen Systeme gilt $d_{\min} \approx \frac{\lambda}{2}$, was in etwa dem Rayleighkriterium entspricht. In der Mikroskopie verwendet man deshalb auch das Intensitätsprofil um zu bestimmen, ob man zwei Punkte auflösen kann. Wenn ein sichtbares Minimum der Intensität auftritt, so kann man zwei Strukturen auflösen.

Für die Mikroskopie von wenige 10 nm bis 100 nm großen Strukturen ist die Auflösung bei sichtbarem Licht zu schlecht. Beispielsweise ergibt sich für rotes Licht ($\lambda_{\text{rot}} \approx 600 \text{ nm}$) eine Auflösung von $d_{\min} \approx 300 \text{ nm}$ in x- und y-Richtung. Sogar für kurzwelliges blaues Licht ($\lambda \approx 450 \text{ nm}$) ist die Auflösung mit $d_{\min} \approx 225 \text{ nm}$ zu schlecht.

Dreidimensionale Punktantwort und Auflösung

Die Intensität eines dreidimensionalen Objekts, das durch ein optisches System abgebildet wird, ist jedoch nicht nur in zwei Dimensionen beschränkt. Die tatsächliche Intensitätsverteilung der PSF ist sowohl über die laterale, also x-y-Richtung, als auch die axiale, also z-Richtung ausgedehnt. Die Form und Größe der PSF hängt von der Qualität des optischen Systems ab, je besser die Komponenten und die Anordnung, desto kleiner ist die PSF. Die PSF eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 4.5(a) dargestellt. Im Fokus folgt die Intensitätsverteilung der Airyscheibe. Je weiter man sich in axialer Richtung vom Fokus entfernt, desto diffuser wird das Signal. Die Airyringe treten deutlicher hervor.

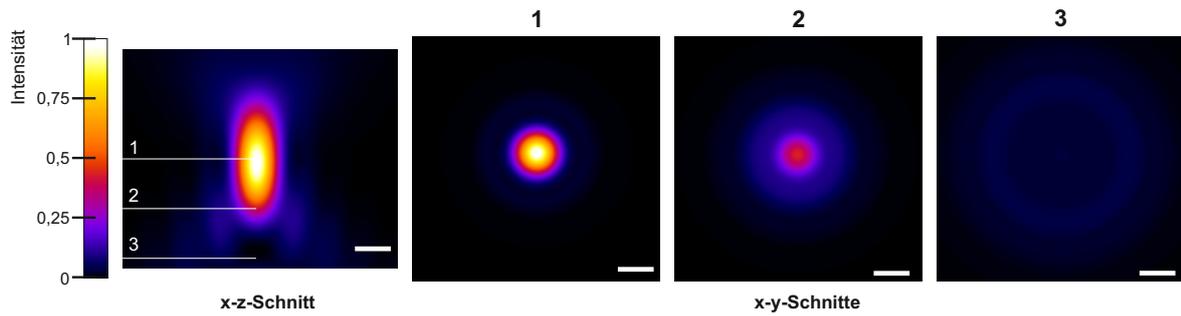
Es lässt sich nun auch in axialer Richtung die Auflösung angeben. Sie ist schlechter als in lateraler Richtung und man nutzt hier die Halbwertsbreite der PSF bei gegebenem Brechungsindex n und numerischer Apertur des Objektivs NA [70]:

$$d_{\min,axial} = \frac{0,88\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad (4.5)$$

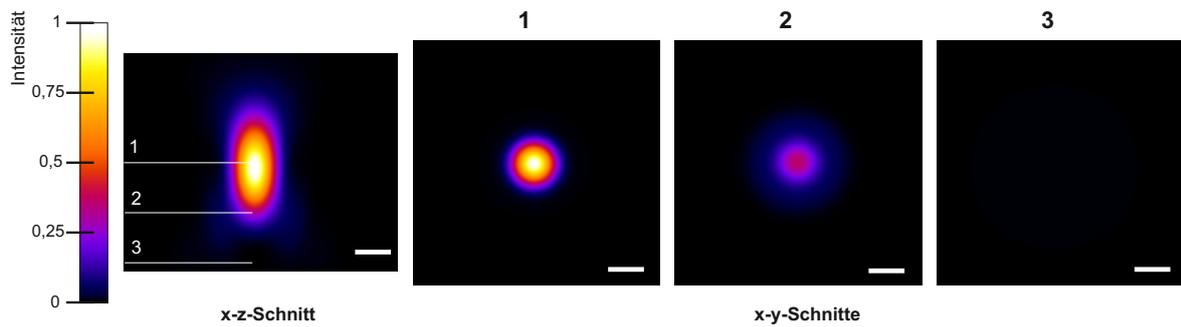
Somit ergibt sich in axialer Richtung für die beiden oben verwendeten Wellenlängen eine Auflösung von $d_{\min,axial} \approx 560 \text{ nm}$ bzw. $d_{\min,axial} \approx 425 \text{ nm}$. Auch in axialer Richtung ist diese Auflösung zu schlecht um Strukturen von einigen 10 bis 100 nm aufzulösen. Deshalb wird schon seit Jahren versucht, optische Mikroskopie jenseits des Abbe-Limits zu betreiben, wie im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

4.1.3 Nyquistkriterium zur Bildaufnahme

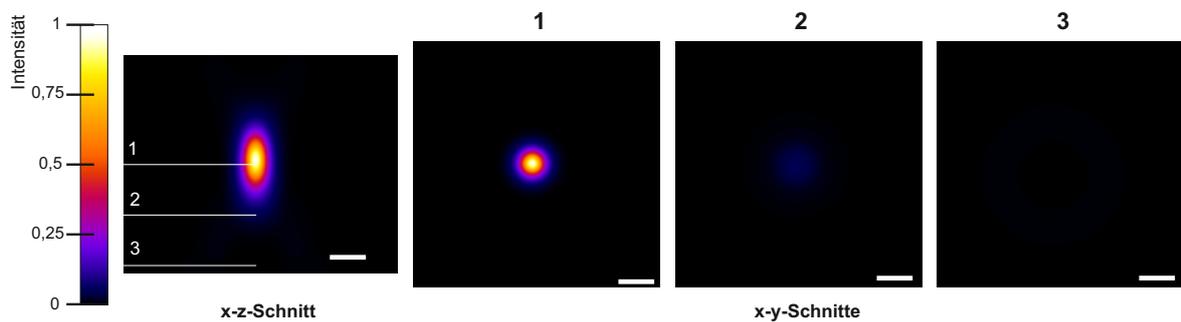
Zur Bildaufnahme müssen die Voxelgrößen, die Größen der x-y-Pixel in einer Ebene einer bestimmten Dicke z , unabhängig von der Mikroskopiemethode so gewählt werden, dass sie dem sogenannten Nyquistkriterium genügen [71]. Dies besagt, dass die Pixelgröße mindestens $\frac{1}{2}$, idealerweise $\frac{1}{2,3}$ der Auflösung entsprechen soll, um die Auflösung dann auch im Bild zu erreichen. Der Nenner 2,3 wird bestimmt durch den nach dem Rayleigh Kriterium minimal auflösbaren Abstand zweier Punkte [71]. Wird die Pixelgröße noch weiter verkleinert (oversampling), so ist die Zahl der Photonen pro Pixel und somit das Signal zu Rauschen Verhältnis kleiner. Man erreicht so bei gleicher Belichtungszeit wieder eine Verschlechterung der Bildqualität und der nutzbaren Auflösung.



(a) PSF eines konventionellen Epifluoreszenzmikroskops.



(b) PSF eines konfokalen Laserscanningmikroskops.



(c) PSF eines STED Mikroskops.

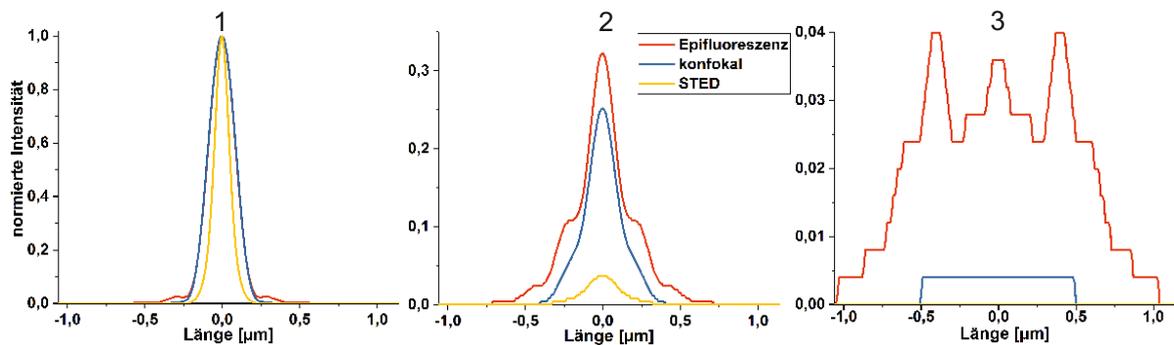
(d) Projektionen der Intensitäten entlang einer Linie durch die Mitte der x - y -Schnitte. Die Intensität ist auf den jeweils hellsten Pixel im Fokus (Schnitt 1) normiert.

Abbildung 4.5: PSF verschiedener Mikroskope. Gezeigt ist jeweils die PSF in x - z -Richtung und drei x - y -Schnitte auf Höhe der weißen Linien sowie die Projektionen entlang einer Linie durch die Mitte der x - y -Schnitte. Die PSF wurden mit der Huygenssoftware von SVI [69] basierend auf den Daten experimenteller Bilder mit Fluoreszenz bei ca. 500 nm theoretisch berechnet. Maßstab: $1 \mu\text{m}$

Bei einer Erhöhung der Belichtungszeit wird die Fluoreszenz immer mehr zerstört, das sogenannte Bleichen (vgl. Kapitel 4.5). Die Erhöhung der Belichtungszeit ist nur so lange möglich, wie noch genug Fluoreszenz detektiert werden kann. Ist die Pixelgröße jedoch zu groß (undersampling) wird die Auflösung verschlechtert, da durch das optische System getrennt erscheinende Strukturen im Bild in ein Pixel zusammengefasst werden [71].

4.2 Konfokale Mikroskopie

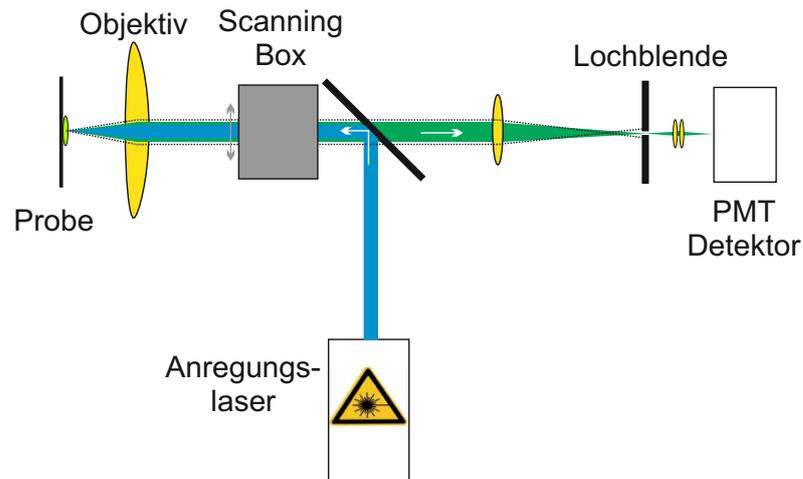
1955 erfand Marvin Minsky die konfokale Mikroskopie, bei der nicht mehr das ganze Probenvolumen auf einmal beleuchtet wurde, sondern zu einem Zeitpunkt nur ein kleiner Teil [72]. Zunächst noch mit Lichtbogenlampen als Anregungslicht wurden Ende der 1960er und Anfang der 1970er Jahre die ersten konfokalen Laserscanning Mikroskope entwickelt [73, 74]. Diese Mikroskope bewegten noch den Probentisch in x- und y-Richtung um eine Abrasterung der Probe zu erreichen, wohingegen die heutigen Mikroskope angefangen 1985 mit einem Mikroskop von W.B. Amos, J.G. White und Kollegen, den Laserpunkt über die Probe rastern [75].

In der konfokalen Laserscanning Mikroskopie (im Folgenden konfokale Mikroskopie genannt) werden Proben Punkt-für-Punkt mit einem Anregungslaser beleuchtet. Die mit einem Photomultiplier aufgenommenen Fluoreszenzintensitäten werden am PC mit den Strahlpositionsdaten verknüpft und zu Mikroskopiebildern rekonstruiert. Die Abrasterung erfolgt durch ein Ablenken des Strahls in einer Scanning Box, in der sich oszillierende Spiegel befinden (vgl. Abb. 4.6(a)). Der Vorteil von laserbasierten konfokalen Mikroskopen ist, dass der Laser in definierte z-Tiefen der Proben fokussiert werden kann um einzelne z-Schnitte aufzunehmen, das sogenannte „optical sectioning“. Im konfokalen Mikroskop werden z-Stapel realisiert, indem die Probe definiert in z-Richtung verfahren wird und in jeder Tiefe ein optischer Schnitt aufgenommen wird. Im Detektionsstrahlengang findet eine zusätzliche Filterung des Lichts durch eine Lochblende statt, so wird gewährleistet, dass nur Licht aus dem beleuchteten Probenvolumen detektiert wird (vgl. [76]). Dies ermöglicht das Abbilden von Licht aus definierten z-Ebenen, ohne störendes Streulicht aus anderen Ebenen. Die dadurch entstehende PSF ist in Abbildung 4.5(b) dargestellt.

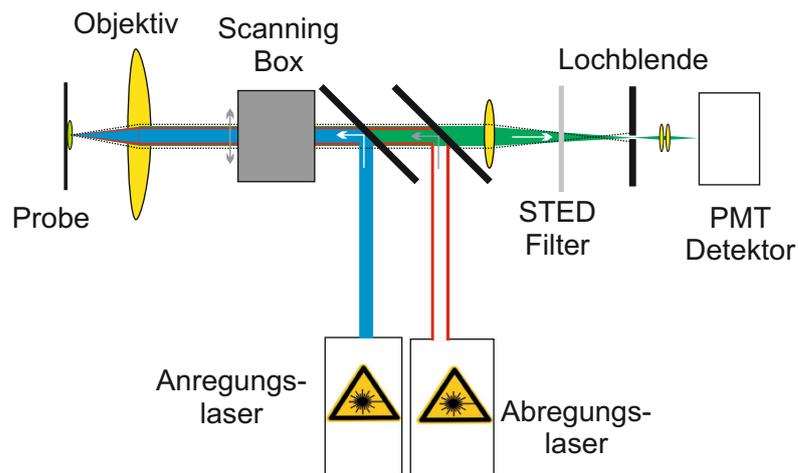
Die Größe der PSF an sich ist nicht unterschiedlich zur PSF konventioneller Epifluoreszenzmikroskope (vgl. Abb. 4.5(a)). Die nicht-fokussierten, diffusen Helligkeitsausläu-

fer werden jedoch herausgefiltert. Dadurch wird das Signal zu Untergrund Verhältnis drastisch verbessert. Dies führt in der Realität zu einer verbesserten Auflösung der konfokalen Mikroskopie gegenüber der konventionellen Mikroskopie. Im konventionellen Fall verschlechtert das Licht aus Nicht-Fokusebenen die Bildqualität und somit die Auflösung [76]. Sehr gute konfokale Mikroskope erreichen eine Auflösung nahe am Beugungslimit in x- und y-Richtung. Zusätzlich kann die Lochblendengröße variiert werden, wobei die Auflösung, wenn der Durchmesser auf dem ersten Minimum der PSF liegt (1 Airy Unit (1 AU)), dem nicht konfokalen Fall entspricht. Macht man die Lochblende kleiner als 1 AU, so wird die Auflösung zwar besser, allerdings geht Intensität verloren. Für helle und bleich-stabile Proben kann die Lochblende auf 0,25 AU verkleinert werden, was im besten Fall für violettes Licht ($\lambda = 400 \text{ nm}$) einer lateralen Auflösung von ca. 130 nm entsprechen würde [70]. Für normale biologische Proben allerdings ist die Lichtausbeute viel zu gering und ein größerer Lochblendendurchmesser muss gewählt werden (ca. 1 AU). Dies führt zu einer bestmöglichen Auflösung von knapp unter 200 nm in x- und y-Richtung.

Auch die axiale Auflösung ist kaum verschieden und liegt für große Lochblendendurchmesser bei ca. $1,0 \lambda$ und für kleine Lochblendendurchmesser bei ca. $0,73 \lambda$ ($n=1,51$, $NA=1,4$ (vgl. Kapitel 4.1.2))[70]. Die Auflösung der konfokalen Mikroskopie ist immer noch beugungsbegrenzt und die Auflösung von Strukturen von ungefähr 100 nm Größe ist nicht möglich.



(a) Aufbau eines konfokalen Mikroskops: Der Anregungslaser wird in den Strahlengang eingekoppelt und ist auf der Probe fokussiert. Mit der Scanning Box kann der Strahl orts aufgelöst in x - und y -Richtung über die Probe gerastert werden. Der Photomultiplier (PMT) detektiert die Photonen und am Computer wird das Bild mit der Ortsinformation der Anregung rekonstruiert (nicht dargestellt).



(b) Aufbau eines STED Mikroskops: Basierend auf einem konfokalen Mikroskop wird zusätzlich zum Anregungslaser ein Abregungslaser eingekoppelt. Dieser Laser hat ein doughnutförmiges Intensitätsprofil, welches im Inneren ein Intensitätsminimum hat und im äußeren Rand ein Intensitätsmaximum hat (vgl. Abb. 4.7). Der Abregungs- oder auch STED Laser regt die Fluorophore zu stimulierter Emission an. Man erreicht damit und mit einem zusätzlichen Filter eine Verkleinerung des Anregungs- bzw. Emissionspunktes und somit eine verbesserte Auflösung.

Abbildung 4.6: Schematische Darstellung eines konfokalen und eines STED Mikroskops.

4.3 Prinzip der STED Mikroskopie

Die STED Mikroskopie wurde 1994 von Stefan W. Hell entwickelt, wofür er 2014 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Mit dieser Art der Mikroskopie erreicht man eine Auflösung besser als das Beugungslimit [77]. Bei der „stimulated emission depletion“ Mikroskopie, also Bleichen durch stimulierte Emission, wird basierend auf einem konfokalen Mikroskop ein zusätzlicher Laser in den Strahlengang eingekoppelt (siehe Abb. 4.6(b)). Dieser Laser dient dazu, Fluorophore in einem bestimmten Bereich zu stimulierter Emission anzuregen, um sie somit für die normal auftretende Fluoreszenz zu löschen. Wenn das Intensitätsprofil dieses Lasers geschickt gewählt wird, kann somit erreicht werden, dass natürliche Fluoreszenz nur noch in einem Bereich passiert, der kleiner ist als das Beugungslimit. Dazu muss er jedoch ein Doughnut förmiges Intensitätsprofil besitzen, was bedeutet, dass in der Mitte die Intensität null und im äußeren Rand maximal ist, wie in Abbildung 4.7(a) dargestellt.

4.3.1 Laterale Auflösungsverbesserung

Im Inneren des STED Doughnuts findet nun weiterhin Fluoreszenz statt (Abb. 4.7(b) links) und im hellen Rand des Laserdoughnuts stimulierte Emission (Abb. 4.7(b) rechts). Die Änderung der Besetzungszahl im ersten angeregten Zustand $\frac{\delta N_1}{\delta t}$ lässt sich durch folgende Ratengleichung beschreiben:

$$\frac{\delta N_1}{\delta t} = N_0 r_A - N_1 (r_{sp} + r_{st}) \quad (4.6)$$

Hierbei ist $N_0 = N - N_1$ die Anzahl der Fluorophore im Grundzustand mit N der Gesamtzahl der Fluorophore und N_1 der Zahl der Fluorophore im ersten angeregten Zustand. Außerdem ist $r_A = I_A \sigma_A$ die Rate der Anregung. Sie ist abhängig von der Intensität des Anregungslasers I_A und dem Wirkungsquerschnitt für die Anregung σ_A . $r_{sp} = \frac{1}{\tau}$ beschreibt die Übergangsrate durch spontane Emission vom ersten angeregten Zustand in den Grundzustand und entspricht dem Inversen der natürlichen Lebensdauer des angeregten Zustands. $r_{st} = I_{STED} \sigma_{st}$ ist die Rate der stimulierten Emission, wobei I_{STED} die Intensität des STED Lasers und σ_{st} der Wirkungsquerschnitt der stimulierten Emission ist. Im Gleichgewichtszustand ist die Anregung vom Grundzustand in den angeregten Zustand gleich der Abregnung vom angeregten Zustand in den Grundzustand

Die Anregung und spontane Emission sind unabhängig von der Intensität des STED Lasers somit vereinfacht sich der Ausdruck 4.8 zu $\sigma_{\text{st}} I_{\text{STED}} \rightarrow \infty$. Im äußeren Bereich des STED Lasers muss gelten [79]:

$$I_{\text{STED}} \gg \frac{r_{\text{st,S}}}{\sigma_{\text{st}}} = I_{\text{S}} \quad (4.9)$$

I_{S} wird als Sättigungsintensität bezeichnet und ist die Intensität, bei der der erste angeregte Zustand zur Hälfte entvölkert ist [80]. Die dazugehörige Übergangsrate ist $r_{\text{st,S}}$. In zwei oder drei Dimensionen ist das ein sogenanntes Doughnut-förmiges Intensitätsprofil. Zur Veranschaulichung der Intensitätsverhältnisse soll zunächst aber ein eindimensionales Intensitätsprofil betrachtet werden. Die Bedingung von $I_{\text{STED}} = 0$ im Inneren und $I_{\text{STED}} = \text{max.}$ im äußeren Bereich wird in einer Dimension am besten durch ein Profil, das der Funktion $I(x) = I_0 \sin^2\left(\frac{2\pi n x}{\lambda}\right)$ folgt, erfüllt. In Abbildung 4.8 wird das Intensitätsprofil und die relative Bevölkerung des ersten angeregten Zustands dargestellt. Ab $I_{\text{max}} > I_{\text{S}}$ wird die stimulierte Emission zunehmend effektiver. Man sieht, dass mit zunehmender Maximalintensität die Breite der Verteilung der Bevölkerung, die mit einer Gaußverteilung beschrieben werden kann [79], schmaler wird. Die laterale Auflösung des STED Mikroskops lässt sich analog zur Auflösung konventioneller Mikroskope (vgl. Abschnitt 4.1.2) folgendermaßen berechnen:

$$d_{\text{min,STED}} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I_{\text{max}}}{I_{\text{S}}}}} \quad (4.10)$$

Hier unterscheidet sich die Auflösung im Vergleich zur Auflösung konventioneller Systeme, welche nur von der Wellenlänge λ , dem Brechungsindex n und dem Öffnungswinkel des Objektivs α abhängt, nur um den Faktor $\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{I_{\text{max}}}{I_{\text{S}}}}}$. Für unendlich hohe Laserintensitäten gilt $\frac{I_{\text{max}}}{I_{\text{S}}} \rightarrow \infty$ und somit $d_{\text{min,STED}} \rightarrow 0$ [80]. In der Praxis ist die maximale Laserintensität allerdings durch das Signal zu Rauschen Verhältnis des Bildes begrenzt, welche zum Großteil von der Helligkeit und Qualität der Färbung bestimmt wird. Wird die Intensität des Abregungslasers zu hoch gewählt, so werden zu viele Moleküle stimuliert abgeregt. Das restliche Fluoreszenzsignal ist nun niedrig und das Signal zu Rauschen Verhältnis schlecht. Für ein ausreichend gutes Bild sind in etwa 15 bis 20 Photonen pro hellem Voxel notwendig.

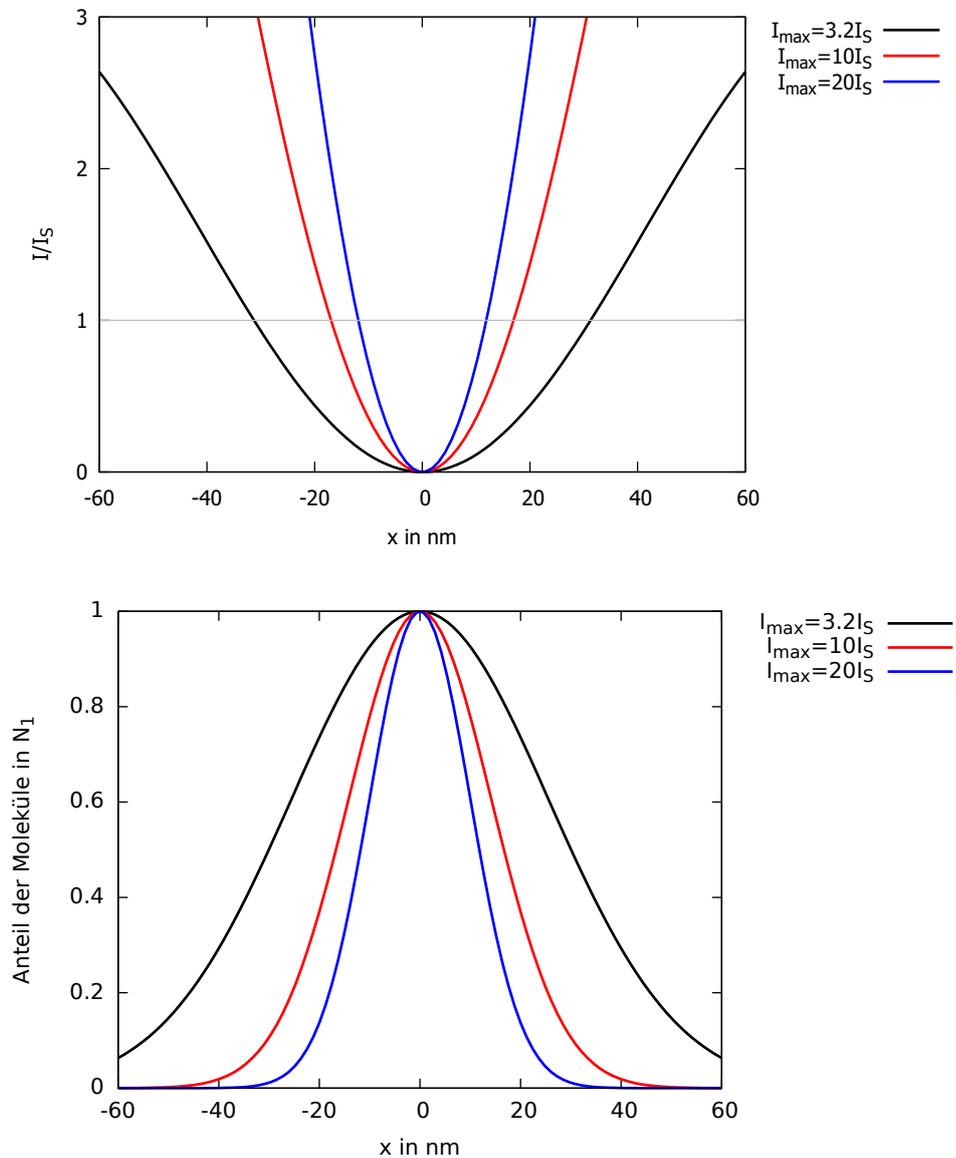


Abbildung 4.8: Intensitätsverteilung des STED Lasers in einer Dimension (oben) und dazugehörige relative Bevölkerung des ersten angeregten Zustands (unten). Die drei Kurven zeigen verschiedene Maximalintensitäten, wobei bei $I_{\max} = 3,2I_S$ die Auflösung die der Messungen dieser Arbeit entspricht.

Um sicherstellen zu können, dass Gleichung 4.9 erfüllt werden kann, muss gewährleistet sein, dass die Wellenlänge des STED Lasers in einem Energiebereich liegt, der sich im Emissionsspektrum der Fluorophore befindet, also der Wirkungsquerschnitt für die stimulierte Emission $\sigma_{\text{st}} \neq 0$. Außerdem muss die Wellenlänge weit genug weg vom Maximum der Anregung der Fluorophore liegen, um zusätzliche Anregungen zu verhindern, d.h. $\sigma_{\text{A,STED}} = 0$. Für gebräuchliche Farbstoffe führt diese Bedingung zu einer geringen Effizienz für die Induktion der stimulierten Emission (σ_{st} klein). Dies ist der Grund dafür, dass die Intensität des STED Lasers sehr hoch gewählt werden muss, um überhaupt eine Auflösungsverbesserung zu erreichen. Es muss allerdings eine Balance zwischen Auflösung und Zerstörung der Fluorophore durch zu hohe Intensitäten gefunden werden, da eine Zerstörung der Fluorophore, wie oben beschrieben, zu einer zu geringen Lichtausbeute führen kann [78, 81].

Eine Auflösungsverbesserung in zwei Dimension kann durch dieses Prinzip nur dann erreicht werden, wenn das Intensitätsprofil des STED Lasers doughnutförmig ist und somit der fluoreszierende Bereich ein runder, immer kleiner werdender Fleck ist. Dies wird erreicht durch Aufprägen einer transversalen Mode auf den Laserstrahl, welche dazu führt, dass sich Minima und Maxima der Intensität im Gaußförmigen Laserpunkt ausbilden. Das Intensitätsprofil folgt idealerweise der Laguerre-Gauß-Mode LG(0,1), die ein solches Doughnut-förmiges Profil aufweist [82].

4.3.2 Axiale Auflösungsverbesserung

Auch die axiale Auflösung kann durch den STED-Ansatz verbessert werden. In diesem Fall muss ein Intensitätsprofil erzeugt werden, welches oberhalb und unterhalb der Fokusebene hohe Intensitäten und in der Fokusebene niedrige Intensität hat. Mit diesem Ansatz ist eine bis zu 3,5 fache Verbesserung der Auflösung möglich[83]. Kombiniert man beide STED-Varianten, erhält man die bestmögliche Auflösung sowohl in lateraler als auch axialer Richtung.

Die durch STED Mikroskopie in drei Dimensionen entstehende PSF ist in Abbildung 4.5(c) dargestellt. Die PSF ist deutlich verkleinert gegenüber der konfokalen PSF (Abb. 4.5(b)).

4.3.3 Erzeugung des doughnutförmigen Intensitätsprofils

Die Erzeugung von STED Moden zur lateralen und axialen Auflösungsverbesserung wird im Folgenden beschrieben.

Die Erzeugung eines Doughnuts in lateraler Richtung kann durch einen örtlichen Phasenmodulator realisiert werden. Die Phasenverschiebung einer solchen Phasenplatte ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Sie verändert die Phase azimuthal von 0 bis 2π und erzeugt eine sogenannte helikale Phase.

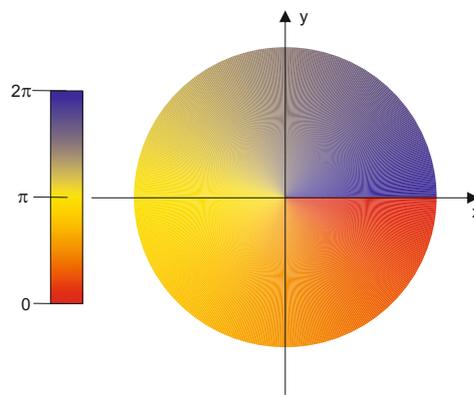


Abbildung 4.9: *Phasenverschiebung einer spiralen Phasenplatte zur Erzeugung einer Doughnutmode.*

Phasenmodulatoren, die Verwendung finden sind zum Beispiel Systeme, bei denen Flüssigkristalle auf Silizium Chips aufgebracht werden (z.B. Liquid Crystal on Silicon-Spatial Light Modulator LCOS-SLM, Hamamatsu Photonics K.K., Japan). Das Licht wird auf den Chip eingestrahlt und reflektiert. Je nach Anordnung der Atome im Flüssigkristall ändert sich die Phasenmodulation im reflektierten Licht. Die Polarisation des Lichts bleibt davon unabhängig. Die Ausrichtung des Flüssigkristalls wird Pixel für Pixel über einen Halbleiterchip über den PC gesteuert. So kann jede beliebige Phasenmodulation auf den LCOS Chip geprägt werden.

Der Phasenmodulator muss optisch konjugiert zur Probe in den Fokus des Objektivs gestellt werden, dann erzeugt eine Fokussierung auf die Probe ein Doughnut-förmiges Intensitätsprofil, wie in Abbildung 4.10 dargestellt [84, 85]. Die Fokussierung führt nahe des Zentrums dazu, dass sich die gegenüberliegenden Phasen gerade aufheben, somit ist die Intensität gleich 0. Je weiter man sich radial von der Mitte entfernt, desto mehr überwiegt die Überlagerung gleicher oder ähnlicher Phasen und die Intensität nimmt zu.

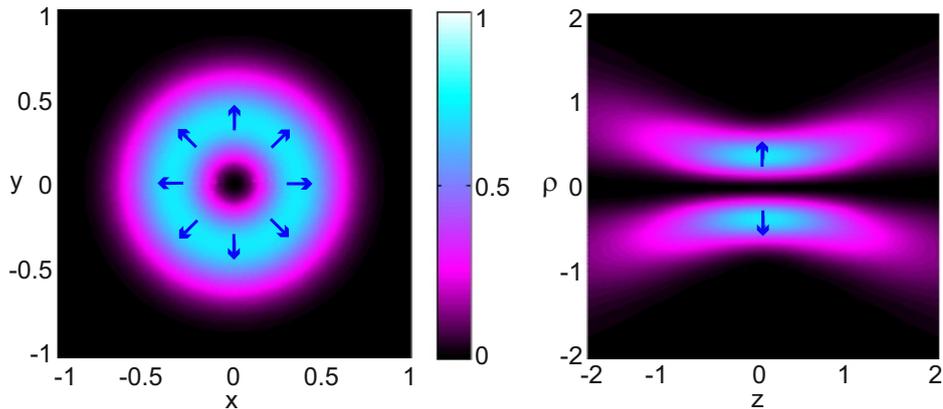


Abbildung 4.10: Normierte Intensität der transversalen Komponente des Lasers im Fokus (links) und entlang der Ausbreitungsrichtung durch den Fokus (rechts). Aus [84]

Die Effektivität des STED Lasers ist stark abhängig von seiner Polarisation, da eine rotationssymmetrische Fokussierung durchgeführt wird. Ein linear polarisierter Strahl kann nicht effektiv so fokussiert werden [85]. Deshalb ist es von Vorteil, zirkular polarisierte Strahlen zu verwenden [86], welche sich effektiv rotationssymmetrisch in eine Doughnutmode fokussieren lassen (blaue Pfeile in Abb 4.10).

Das durch diese Methoden erzeugte Intensitätsminimum ist zunächst immer noch beugungsbegrenzt. Durch die Erhöhung der Laserintensität wird die Steigung der Flanken des Doughnut-Minimums vergrößert (vgl. Abbildung 4.8). Dies führt zu einer Verkleinerung des fluoreszierenden Flecks unter das Abbe-Limit (vgl. Abschnitt 4.3.1). Die Fluoreszenz in der Mitte des Doughnuts wird dadurch auch verringert, da das Minimum des Lasers nicht exakt null Intensität besitzt. Es verbleibt jedoch genug Fluoreszenz um genug Photonen (ca.15 Photonen pro Voxel) zu detektieren um Bilder generieren zu können, bevor die Farbstoffe vollständig gebleichen sind [87].

Doch nicht nur eine Auflösungsverbesserung durch einen Bleichlaser in x-y-Richtung ist wünschenswert, sondern auch in axialer Richtung kann eine Verbesserung erzeugt werden. Man nutzt hierbei eine mit MgF_2 bedampfte Glasplatte als Verzögerungsplatte, welche z.B. nur in der Mitte beschichtet ist. Dies führt zu einer Phasenverschiebung lediglich in den inneren Bereichen, nicht aber außen (vgl. Abb. 4.11). Eine Phasenverschiebung um π in der Mitte des Laserstrahls führt dazu, dass das elektrische Feld des Lasers innen und Außen genau entgegen gerichtet ist [88]. Die Breite der Phasenverschiebung muss genau $1,65 w$ entsprechen, wobei w die Waist des Gaußstrahls ist und der Breite entspricht, bei der die Intensität auf $\frac{1}{e^2}$ abgefallen ist. Dies entspricht

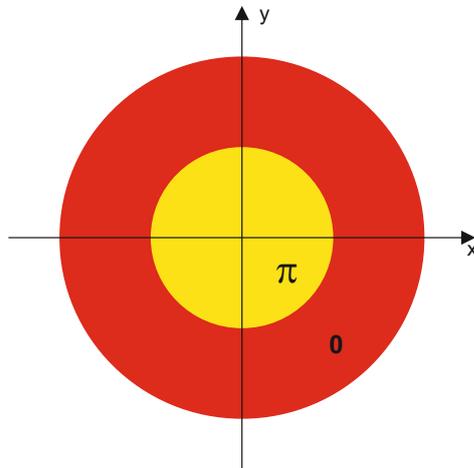


Abbildung 4.11: Die Phasenplatte erzeugt eine Phasenverschiebung um π in der Mitte des Laserstrahls.

genau der Fläche, bei der die Hälfte des elektrischen Felds phasenverschoben wird und die andere Hälfte nicht [88, 89]. Beim Fokussieren dieses phasenverschobenen Strahls ergibt sich ein Intensitätsminimum in der Mitte und Maxima im äußeren Rand des Fokus in allen drei Raumrichtungen [87–89]. Die Intensitätsverteilung im Fokus (x-y-Richtung) und durch den Fokus (x-z-Richtung) ist in Abbildung 4.12 dargestellt.

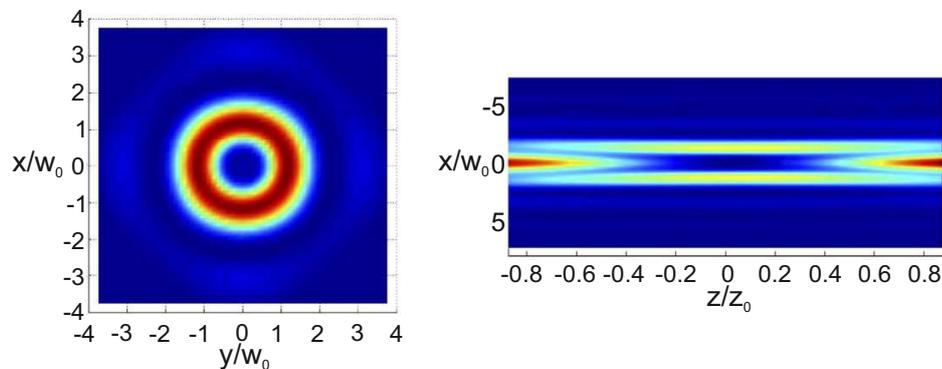


Abbildung 4.12: Normierte Intensität des Lasers im Fokus (links) und entlang der Ausbreitungsrichtung durch den Fokus (rechts). Aus [89]

Die Intensität in x-y-Richtung ist nicht besonders hoch ($\sim 8\%$ von I_{STED}) und erzeugt somit kaum Auflösungsverbesserungen in lateraler Richtung. In axialer Richtung ist die Intensität fast um einen Faktor 4 höher und es wird eine Auflösungsverbesserung erreicht [88]. In Realität erreicht man eine Auflösung von ca. 200 nm in z-Richtung für grünes Licht ($\lambda = 500$ nm), allerdings kann durch Erhöhung der Bleichstabilität diese Auflösung weiter gesteigert werden.

Eine Kombination der lateralen und axialen Phasenmodulation führt zu Doughnutmoden des STED Lasers in allen drei Raumrichtungen. Zur nicht-beugungsbegrenzten Fluoreszenzmikroskopie, müssen die Detektionsfilter nun so gewählt werden, dass kein STED Licht detektiert wird. Damit kann man Fluoreszenzpunkte erzeugen, die in allen Raumrichtungen nicht mehr beugungsbegrenzt sind.

4.4 Auflösungsverbesserung durch Entfaltung

Eine weitere Auflösungsverbesserung erhält man, wenn es gelingt, die PSF aus den aufgenommenen Bildern herauszurechnen, um das ursprüngliche Signal zu erhalten. Die Entfaltung ist eine iterative Methode um dies zu erreichen. In Abschnitt 4.1.2 wurde bereits beschrieben, dass ein leuchtender Punkt nach einem Mikroskop nicht mehr punktförmig ist sondern entsprechend der PSF geformt. Der hierbei auftretende Prozess kann mathematisch als Faltung beschrieben werden, wobei gilt:

$$g = f * h = \int_{\mathbb{R}^3} f(\bar{x}) h(\bar{r} - \bar{r}') d^3\bar{r}' \quad (4.11)$$

g ist das Bild, h die PSF und f die Ausgangsstruktur. Das Ortsintegral in 3 Dimensionen bedeutet, dass jede gemessene Intensität an einem bestimmten Ort $\bar{r}' = (x, y, z)^T$ aus dem tatsächlichen Signal aller Punkte in der Struktur, gewichtet mit der PSF, abhängig vom Abstand zum Ort \bar{x} ist. Berechnen kann man diese Faltung indem man g , f und h zu G , F und H fouriertransformiert und berechnet

$$G = F \cdot H \quad (4.12)$$

Das Signal lässt sich im Fourierraum als Quotient $F = \frac{G}{H}$ berechnen. Eine Rücktransformation in den Ortsraum ergibt das ursprüngliche Signal. Bei mikroskopischen Daten ist allerdings H bandbegrenzt und enthält 0 Werte. Die Division $F = \frac{G}{H}$ ist somit nicht definiert. Außerdem treten bei der Messung der Bilder Photonen- und elektronisches Rauschen auf, welche eine direkte Fouriertransformierung und Quotientenberechnung stören. Es muss demnach nicht mehr Gleichung 4.12 gelöst werden sondern:

$$G = F \cdot H + \epsilon \quad (4.13)$$

Hierbei beschreibt ϵ das im Bild auftretende Rauschen. In modernen Detektoren ist das Rauschen durch die Elektronik zu vernachlässigen und so dominiert das Photonenrauschen. Als Photonenrauschen bezeichnet man die durch die Teilchennatur des Lichts poissonverteilte Detektion [90]. Die Bildqualität ist proportional zur Anzahl der detektierten Photonen. Die Bandbegrenzung der PSF und das Rauschen machen eine analytische Lösung des Faltungsproblems unmöglich. Die einzige Möglichkeit zur Lösung ist ein iteratives Verfahren, dessen Effizienz wiederum von der Bildqualität abhängt. Zusätzlich sind für die Entfaltung von Bildern z-stacks essentiell, da das vollständige Signal eines Punktes, auch das in anderen z-Ebenen außerhalb der Fokusebene in die Berechnung einfließen müssen.

4.5 Fluorophore zur STED Mikroskopie

4.5.1 Anforderungen an Fluorophore

Die STED Mikroskopie stellt durch ihre besonderen Charakteristika hohe Anforderungen an die verwendeten Fluorophore. Wie im vorhergehenden Kapitel besprochen sind Laserintensitäten meist sehr hoch im Bereich von 100 mW. Außerdem müssen die Wirkungsquerschnitte für die stimulierte Emission, bei gleichzeitig geringen Wirkungsquerschnitten für die Anregung durch den STED Laser, möglichst hoch sein. Im Folgenden werden die Auswahlkriterien für geeignete Farbstoffe und die Auswirkung der STED Mikroskopie auf die Farbstoffe besprochen.

In Kapitel 4.1.1 wurde beschrieben, dass sich die Elektronen von Fluorochromen mit geeignetem Licht in einen höheren Energiezustand anregen lassen. Diese Anregung in einen Singulettzustand hat eine definierte Lebensdauer im Bereich von Nanosekunden, bevor die Elektronen unter Aussendung eines energieärmeren Photons wieder in den Grundzustand relaxieren. In manchen Fällen kann aber das Elektron auch in einen langlebigen Triplettzustand gehoben werden. Dieser ist einerseits mit einer Lebensdauer im Bereich von Mikrosekunden vergleichsweise langlebig, wobei die dabei stattfindende Lichtemission als Phosphoreszenz bezeichnet wird. Andererseits ist der Zustand chemisch sehr reaktiv [91]. Während sich das Fluorophor im Triplettzustand befindet kann es durch Absorption von weiteren Photonen in noch höhere Triplettzustände übergehen, welche noch langlebiger sind. Ein Fluorophor, welches sich in einem Triplettzustand befindet, kann nicht für die Mikroskopie genutzt werden. Somit schwächt

dieser Übergang die Lichtausbeute der Mikroskopie [91]. Viel schlimmer jedoch sind die Reaktionen der Moleküle im Triplettzustand mit in der Probe vorhandenem Sauerstoff, welche zu irreversiblen Schäden an den Molekülen und damit zur Zerstörung der Fluorophore führen können [92]. Dieses Phänomen ist unter anderem abhängig von den eingestrahlten Laserintensitäten und, vor allem in der STED Mikroskopie ein Problem, da die eingestrahlten Laserleistungen hier bis zu 100-fach erhöht sind gegenüber konfokaler Mikroskopie. Die unter anderem durch das eben beschriebene Phänomen begrenzte Lebensdauer eines Fluorophores ($1 \cdot 10^4$ bis $4 \cdot 10^4$ Fluoreszenzzyklen) hängt unter anderem mit der Quanteneffizienz (QE) der Moleküle zusammen. Diese ist definiert als:

$$\text{QE} = \frac{\# \text{ Fluoreszenzphotonen}}{\# \text{ absorbierte Photonen}} \quad (4.14)$$

Je mehr Anregungen zur gewollten Abregung durch Fluoreszenz führen, desto weniger Triplettzustände treten auf und desto länger ist das Fluorophor intakt [91]. Langwellige Farbstoffe weisen meist eine höhere Quanteneffizienz auf als kurzwellige. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe haben eine Quanteneffizienz von 0,29 (Abberior STAR 440SX(P)) [93] und 0,30 (Chromo505) [94]. Eine andere Farbstoffwahl ist nicht möglich, da dies die einzigen Farbstoffe sind, welche Zweifarben STED Mikroskopie mit dem vorhandenen STED Laser ermöglichen. Allerdings sind die Quanteneffizienzen niedrig verglichen mit weit verbreiteten Farbstoffen wie Alexa488, welches eine Effizienz von 0,92 hat [95]. Somit sind die gewählten Farbstoffe wegen ihrer Kurzlebigkeit nicht ideal um mit hohen Laserintensitäten gut arbeiten zu können. In dem in den meisten Messreihen dieser Arbeit verwendeten Mikroskopopaufbau mit nur einem STED Laser können allerdings keine anderen Farbstoffe gewählt werden. Hat man nur einen STED Laser zur Verfügung und möchte trotzdem Zweifarbenmikroskopie betreiben, dann müssen sich die Emissionsspektren der beiden Farbstoffe stark überlappen. Die Emissionsspektren müssen so gewählt sein, dass der STED Laser noch stimulierte Emission induzieren kann. Das bedeutet, man benötigt Farbstoffe mit gleicher Emission, die dann nur durch die Anregung getrennt werden können. Hierzu nimmt man zwei Farbstoffe mit unterschiedlich großem Stokesshift, so stellt man sicher, dass die Anregung getrennt werden kann.

4.5.2 Theoretische Betrachtung des Cross-talk

Ein Problem, das bei der Zweifarbenmikroskopie nicht zu vernachlässigen ist, ist die Detektion von Fluoreszenz vom nicht-betrachteten Farbstoff, der sogenannte Cross-talk. Dies ist besonders ausgeprägt, wenn sich entweder die Anregungs- oder Emissionsspektren der Fluorophore überlagern, wie es in den Experimenten dieser Arbeit der Fall ist. Die Entstehung des Cross-talk wird im Folgenden beschrieben. Sei N_A bzw. N_B die Anzahl der Fluorophore von Farbstoff A bzw. B in einem bestimmten Volumen. Außerdem seien I_A bzw. I_B die Intensitäten der Anregungslaser für Farbstoff A und B. Dann werden im Detektionskanal für Farbstoff A das Signal S_A gemessen und im Kanal B S_B . σ_{xy} sei die Wahrscheinlichkeit pro Zeit, dass bei einer bestimmten Laserleistung in y ein Fluorophor x angeregt wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon von Fluorophor x in Kanal y detektiert wird, sei d_{xy} . Die Signale in Kanal A und B setzen sich dann wie folgt zusammen:

$$S_A = N_A \sigma_{AA} I_A d_{AA} + N_B \sigma_{BA} I_A d_{BA} \quad (4.15)$$

$$S_B = N_B \sigma_{BB} I_B d_{BB} + N_A \sigma_{AB} I_B d_{AB} \quad (4.16)$$

Durch dividieren der Cross-talk freien Konstanten erhält man folgende Größen:

$$\tilde{S}_A = \frac{S_A}{\sigma_{AA} I_A d_{AA}} \quad (4.17)$$

$$\tilde{S}_B = \frac{S_B}{\sigma_{BB} I_B d_{BB}} \quad (4.18)$$

Die Gleichungen aus 4.15 und 4.16 lassen sich mit den Größen aus 4.17 und 4.18 in Matrixform zusammenfassen:

$$\begin{pmatrix} \tilde{S}_A \\ \tilde{S}_B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & \frac{\sigma_{AB} d_{AB}}{\sigma_{BB} d_{BB}} \\ \frac{\sigma_{BA} d_{BA}}{\sigma_{AA} d_{AA}} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_A \\ N_B \end{pmatrix} \quad (4.19)$$

Auf der Hauptdiagonalen der Matrix stehen die Cross-talk freien Signale und auf der Nebendiagonalen ist der Cross-talk bestimmt. Hierbei ist $\frac{\sigma_{YX}}{\sigma_{XX}}$ das Verhältnis von falscher zu richtiger Anregung bei gleicher Laserleistung. $\frac{d_{BA}}{d_{AA}}$ bezeichnet den Cross-talk in der Detektion, also das Verhältnis von falscher zu richtiger Detektion. Hat man diese

Matrix bestimmt, so kann man die aufgenommenen Bilder spektral entmischen, also den Cross-talk aus den Bildern herausrechnen. Die theoretische Bestimmung der Matrix basierend auf den Spektren der Farbstoffe kann problematisch sein, da die verwendeten Laserleistungen mit einbezogen werden müssen. Außerdem sind die Spektren meist normiert und somit nicht quantitativ vergleichend verwendbar. Die einzige Möglichkeit sinnvoll die Cross-talk Matrix zu bestimmen, ist durch Messen unter der Verwendung von Kalibrationsproben. Dies ist für die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe in Kapitel 5.4.6 im Detail beschrieben.

4.6 Weitere höchstaflösende Mikroskopiemethoden

Abgesehen von der STED Mikroskopie gibt es noch andere Nanoskopiemethoden, die Aufnahmen ermöglichen, die nicht mehr beugungsbegrenzt sind.

Einerseits kann man in konventionellen Mikroskopen mit hohen Beleuchtungsintensitäten den Übergang der Fluorophore in den langlebigen Triplettzustand ausnutzen. Die Fluorophore werden dabei gezielt gebleicht und fallen abhängig von der Zustandslebensdauer statistisch wieder in den Grundzustand zurück, wo sie wieder leuchten, um nach gewisser Zeit wieder in den Dunkelzustand zurückzukehren, das sogenannte Blinken. Nach der mehrere Minuten dauernden Bildaufnahme, in der mehrere tausend Einzelaufnahmen gemacht werden, werden die Schwerpunkte der Blinkereignisse bestimmt und somit das Bild rekonstruiert [96]. Der Schwerpunkt eines einzelnen Blinking Ereignisses repräsentiert den Ort eines Fluorophores. Er lässt sich sehr genau bestimmen und ist nicht Abbe begrenzt. Diese Eigenschaft wird bei Methoden wie PALM (photoactivated localization microscopy) [97, 98], STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) [99, 100] oder SPDM (spectral precision distance/position determination microscopy) [101, 102] ausgenutzt. Diese Methoden erreichen im Idealfall eine Auflösung in x- und y-Richtung von wenigen Nanometern [103], wobei hier Auflösung die Genauigkeit der Ortsbestimmung der Fluorophore bezeichnet. Für solche Methoden sind sehr stabile und helle Proben notwendig, da genug Blinkereignisse gezählt werden müssen, um aussagekräftige Bilder zu erzeugen. Aufgrund der in dieser Arbeit betrachteten Strukturen aus nur wenigen Fluoreszenzmolekülen kann die nötige Probenqualität nicht erreicht werden und somit können diese Methoden hier keine Anwendung finden [104].

Eine weitere Methode, um optische Auflösung besser als die Auflösungsgrenze zu erreichen ist SSIM (saturated structured-illumination microscopy), wo durch das Platzieren eines Gitters im Anregungsstrahlengang Moiré Ringe im emittierten Licht erzeugt werden. Das detektierte Signal hat nun niedrigere Ortsfrequenzen, welche vom Mikroskop detektiert werden können [104]. Zusammen mit einer Bildrekonstruktion erzeugt dies eine bis zu zweifach verbesserte Auflösung [105]. Wird nun noch die Ausleuchtung sinusförmig moduliert mit Maximalintensitäten, die eine Sättigung der Fluorophore erreichen, kann eine weitere Auflösungsverbesserung erreicht werden [105]. In bisherigen Experimenten wurde für gelbes Licht ($\lambda \approx 550 \text{ nm}$) eine Auflösung von 150 nm erreicht [104]. Diese Auflösung ist vergleichbar mit der bisher erreichten Auflösung in den STED Experimenten kann jedoch systembedingt kaum noch verbessert werden. Theoretisch ist mit SSIM maximal eine Auflösungsverbesserung um den Faktor 2 möglich [106], also in diesem Fall $\sim 110 \text{ nm}$. Somit ist dies nicht ideal für weitere Experimente, welche eine Auflösung im Idealfall von unter 100 nm benötigen.

Kapitel 5

Zellbestrahlung und Datenaufnahme

Zur Bestrahlung von menschlichen Zellen wurden in dieser Arbeit zwei Bestrahlungsaufbauten verwendet, welche im Folgenden im Detail erklärt werden sollen. Zum einen der Schrägbestrahlungsaufbau am Rasterionenmikroskop SNAKE und zum anderen eine α -Bestrahlungsquelle am Institut für angewandte Physik und Messtechnik in Neubiberg. Danach wird auf die Präparation der Proben und die für die Mikroskopie nötigen Parameter genauso wie auf die Bildaufbereitung durch Entmischung und Entfaltung eingegangen.

5.1 Bestrahlung an SNAKE

Das Rasterionenmikroskop SNAKE [107] am 14 MV Tandembeschleuniger auf dem Universitätscampus in Garching wird ebenso für 3-D-Wasserstoffmikroskopie durch Proton-Proton-Streuung [108, 109] wie für strahlenbiologische Experimente genutzt. Für die Strahlenbiologie können einzelne Zellkerne, komplexe Gewebe und sogar Tiere mit einer definierten Anzahl von Ionen an definierten Orten im Gewebe oder sogar an definierten Stellen in einzelnen Zellkernen bestrahlt werden [8, 17, 110–113]. Zur Zellbestrahlung an SNAKE stehen Ionen in einem großen LET Bereich zur Verfügung, von 20 MeV Protonen ($\text{LET} \approx 2,6 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) bis zu 55 MeV Kohlenstoffionen ($\text{LET} \approx 316 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$). Diese können auf Strahlgrößen von unter $1 \mu\text{m}$ fokussiert und gezielt in Zell- oder Gewebeproben appliziert werden. Dies ermöglicht Bestrahlungen mit definierter Dosis und selbstdefiniertem Bestrahlungsfeld von ca. $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$, mit definiertem Abstand zwischen den Bestrahlungspunkten [60, 114]. Außerdem können für rein mikroskopische

Anwendungen, wie in dieser Arbeit, Großfeld Bestrahlungen mit einer Feldgröße von ca. 4 mm·4 mm, durchgeführt werden [44]. Diese Anwendung zielt ausschließlich auf die mikroskopische Untersuchung von DNA Schäden induziert von Ionen in einem großen LET Bereich ab.

5.1.1 Aufbau

Die Strahlführung für biologische Bestrahlungen ist in Abbildung 5.1 dargestellt. In einer Ionenquelle werden die gewünschten Ionen mit einfach negativer Ladung ($q = -e$) erzeugt und zum positiv geladenen Hochspannungsterminal ($V_{\max} = +14 \text{ MV}$), das in der Mitte des Van-de-Graaff-Beschleunigers platziert ist, beschleunigt. Am Terminal passieren sie eine Kohlenstoffstripperfolie [115], welche die Elektronen der äußeren Schalen statistisch verteilt abstreift. Nach dem Terminal besteht der Strahl aus positiv geladenen Ionen mit unterschiedlichen Ladungszuständen. Diese werden nun vom positiv geladenen Hochspannungsterminal abgestoßen und somit noch einmal über die angelegte Spannung zum Ende des Gerätes hin beschleunigt [15]. Der an den Tandembeschleuniger angeschlossene 90° Ablenkmagnet bewirkt eine Impuls über Ladungsauswahl zur Selektion des gewünschten Ladungszustands. Dadurch erhält man einen monoenergetischen Ionenstrahl im Strahlrohr, der zum Experiment SNAKE geführt wird. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Großfeld Bestrahlungen wird durch das Objekt- und Divergenzschlitzsystem eine möglichst homogene und vollständige Ausleuchtung des Linsenrohres der supraleitenden Linse gewährleistet. Die supraleitende Linse ist bei den Versuchen in dieser Arbeit nicht in Betrieb. Mit den vor der Linse platzierten Experimentschlitzen wird ein ca. 16 mm^2 großes, quadratisches Feld zur Bestrahlung präpariert. Hinter dem Kryostat, wo der Strahl durch eine $7,5 \mu\text{m}$ dicke Kaptonfolie aus dem Vakuum austritt, werden die Proben zur Bestrahlung positioniert.

Hinter dem Probenhalter befindet sich ein Ionendetektor, wo präzise die Zählrate und somit die Bestrahlungsdosis bestimmt werden kann. Mit dem Hochspannungsschalter (Chopper) vor der Linse kann der Strahl abgelenkt und somit an der Probe „ausgeschaltet“ werden. Für die in dieser Arbeit verwendeten Ionen beträgt die Ablenkspannung 2 kV. Die Proben werden in einem Winkel von 9° zur Strahlachse eingebaut, um eine schräge Bestrahlung der Zellen zu gewährleisten (vgl. Abb. 5.2), wie sie notwendig ist, um die sehr gute x-y-Auflösung der Mikroskopie ausnutzen zu können.

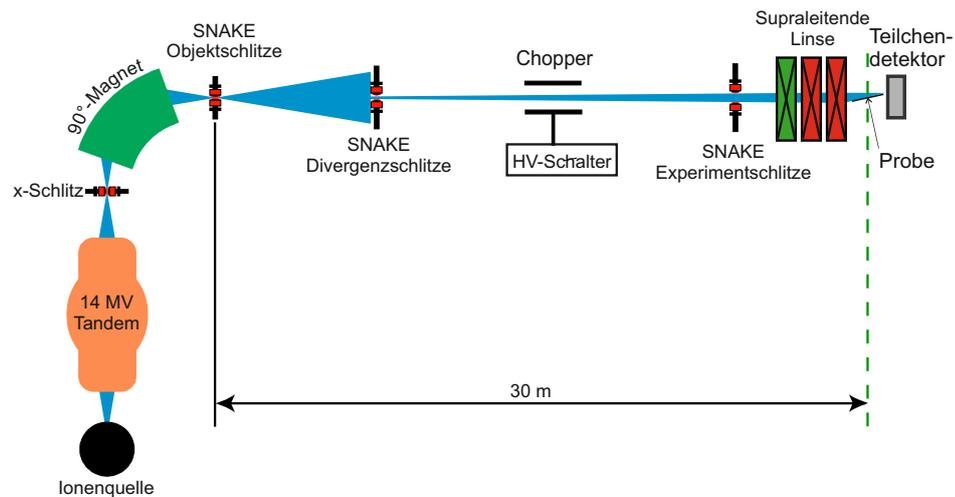


Abbildung 5.1: SNAKE Strahlführung (nach V. Hable[15]): Der Ionenstrahl wird mit Hilfe des Schlitzsystems präpariert. Hinter der supraleitenden Linse, welche in diesem Aufbau nicht in Betrieb ist, werden die Zellproben mittig zum Ionenstrahl positioniert. Mit dem am Chopper angebrachten HV-Schalter kann der Strahl abgelenkt und somit an der Probe „ausgeschaltet“ werden.

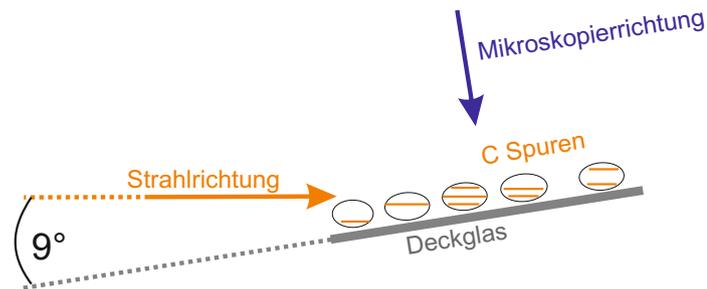


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Bestrahlungsgeometrie für eine schräge Bestrahlung mit Kohlenstoffionen auf Deckgläschen. Die Ionen treffen von links kommend unter 9° auf die Zellen. Die Ionisationen erfolgen dann entlang des Ionendurchgangs durch die Zelle. So entstehen so genannte tracks, welche für die später von oben stattfindende Mikroskopie in x-y-Richtung laufen.

Zur Bestrahlung von Zellen, die auf quadratischen Deckgläschen mit einer Seitenlänge von 22 mm wachsen, wurde der in Abbildung 5.3 dargestellte Halter konstruiert. Die Konstruktionszeichnungen finden sich in Anhang A. Die ausgefrästen Partien dienen einerseits zum Positionieren der Proben mit einer Pinzette auf dem Halter und andererseits kann, zusammen mit einem Loch in der Rückseite, die Zählrate und die Position des Halters mittig zum Bestrahlungsfeld überprüft werden. Dies ist allerdings nur ohne Probe möglich, da die Energie der Ionen gering ist und sie hinter den Zellen im Deckglas gestoppt werden. Folglich ist keine direkte Dosismessung parallel zur

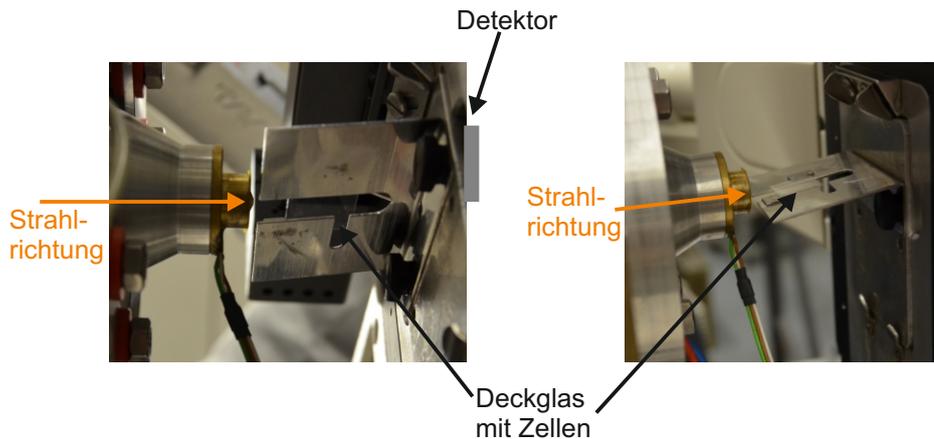


Abbildung 5.3: Schrägbestrahlungshalter für Deckglasbestrahlungen eingebaut im Probenhalter am Rasterionenmikroskop SNAKE.

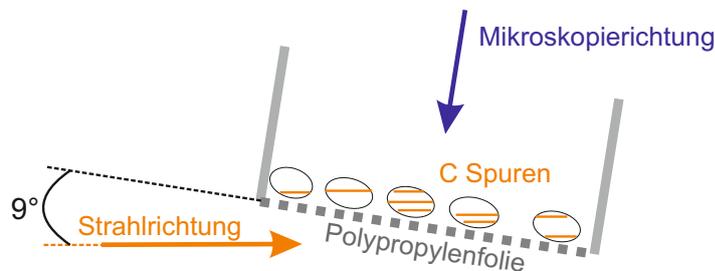


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Bestrahlungsgeometrie für eine schräge Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in Ringen. Das Setup ist ähnlich zur Deckglasbestrahlung, allerdings wachsen die Zellen auf Folie und werden von unten bestrahlt. Die Ionen treffen von links kommend unter 9° auf die Zellen. Die Ionisationen erfolgen dann entlang des Ionen durchgangs durch die Zelle. So entstehen so genannte tracks, welche für die später von oben stattfindende Mikroskopie in x-y-Richtung laufen.

Bestrahlung möglich. Die Dosisbestimmung erfolgt bei stabiler Zählrate über die Bestrahlungsdauer und wird regelmäßig überprüft. Um die Positionierung der Proben zu erleichtern, wurden Erhöhungen aufgesetzt, welche als seitlicher und unterer Anschlag dienen.

Eine weitere Möglichkeit zur flächigen Bestrahlung unter kleinen Winkeln bietet die Ringbestrahlung wie in [44, 104] beschrieben und in Abbildung 5.4 dargestellt. Hier wachsen die Zellen auf einer $4,7\ \mu\text{m}$ dicken Polypropylenfolie, welche in zwei Edelstahlringe gespannt wird. Die Bestrahlung erfolgt in waagrechter Richtung durch die leicht schräggestellte Folie. Diese Bestrahlung führt zur gleichen Schadensinduktion in den Zellkernen wie die Deckglasbestrahlung. Der Vorteil liegt darin, dass die Zellen im Medium bestrahlt werden können. Jedoch ist die Folie als Zellsubstrat nur bedingt

geeignet da die optische Auflösung deutlich limitiert wird.

Zu Beginn der Studie zur höchstauflösenden Mikroskopie wurde dieser Aufbau verwendet, da die Bestrahlung und Zellpräparation dort gut etabliert war. Während der Weiterentwicklung wurde die Ringbestrahlung durch die Deckglasbestrahlung ersetzt. Zur Zellbestrahlung werden Protonen mit 21 MeV ($\text{LET} = 2,56 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$), Lithiumionen mit 33 MeV ($\text{LET} = 78 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) und Kohlenstoffionen mit 55 MeV ($\text{LET} = 310 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) benutzt.

5.1.2 Experimentdurchführung

Deckglasbestrahlung

24 Stunden vor der Bestrahlung werden menschliche HeLa Zellen auf für die Mikroskopie optimierten Deckgläschen mit einer Fläche von $22 \text{ mm} \cdot 22 \text{ mm}$ und einer Dicke von $(170,00 \pm 0,05) \mu\text{m}$ ausgesät und bis zur Bestrahlung in mit Medium (RPMI⁽¹⁾ mit Penicillin und Streptomycin) gefüllten 6-well Platten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Zur Zeit der Bestrahlung, welche nur wenige Sekunden dauern sollte, um mögliche Schäden durch Austrocknung zu verhindern, bilden die Zellen eine nahezu konfluente Monolage und befinden sich in der exponentiellen Wachstumsphase.

Die Bestrahlungen in dieser Arbeit wurden mit drei Ionensorten durchgeführt, welche auf die genannten Energien beschleunigt wurden: 55 MeV Kohlenstoffionen, 21 MeV Protonen und 33 MeV Lithiumionen. Aufgrund der $7,5 \mu\text{m}$ Kaptonfolie und 2 cm Luft zwischen Strahlaustrittsnase und Probe verlieren die Ionen Energie. Für 55 MeV Kohlenstoffionen, welche den größten Energieverlust und die geringste Reichweite der gewählten Ionen besitzen, beträgt der Energieverlust 6,6 MeV, was zu einer restlichen Reichweite der Ionen in Wasser von ca. $96 \mu\text{m}$ führt. Um eine Bestrahlung der Zellen, welche eine durchschnittliche Höhe von $7,6 \mu\text{m}$ haben, durch die Mediumschicht gewährleisten zu können, darf diese maximal $8,4 \mu\text{m}$ dick sein. Dies ergibt aufgrund des Bestrahlungswinkels von 9° eine von den Ionen zu durchfliegende Strecke von $\frac{8,4 \mu\text{m}}{\sin 9^\circ} = 54 \mu\text{m}$. Nach dieser Strecke ist die Reichweite der Ionen noch ausreichend, um durch die Zellen zu kommen. Folglich müssen die Proben vor Bestrahlung aus dem Medium genommen und an Luft getrocknet werden, sodass die verbleibende Mediumschicht unter $10 \mu\text{m}$ beträgt. Hierbei ist zu beachten, dass keine vollständige Austrocknung stattfindet, da die Zellen andernfalls absterben und

⁽¹⁾Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

sich vom Deckglas lösen. Um die benötigte Abtrocknungszeit abschätzen zu können, wurde die Abtrocknungsrate bei zwei Deckgläschen bestimmt. Hierzu wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen für 10 min an Raumluft im Beschleunigerlabor auf einer Waage getrocknet. Während dieser Zeit wurde alle 15-30s das Gewicht der Deckgläschen abgelesen. Nach ca. 8 min war die Flüssigkeit vollständig abgetrocknet. Zur Bestimmung der Mediumdicke wurde nun das Gewicht nach Trocknung vom gemessenen Gewicht zu jeder Zeit subtrahiert, dies ergibt die Mediummasse. Über die Formel

$$d_{\text{Medium}} = \frac{m_{\text{Medium}}}{\rho_{\text{Wasser}} \cdot A_{\text{DG}}} \quad (5.1)$$

kann die Dicke des Mediums berechnet werden, wobei $\rho_{\text{Wasser}} = 1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ und $A_{\text{DG}} = 2,2 \text{ cm} \cdot 2,2 \text{ cm} = 4,84 \text{ cm}^2$ ist. Die Dicken wurden gegen die Abtrocknungszeiten aufgetragen und mit einem exponentiellen Abfall ($d_{\text{Medium}} = d_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$) gefittet, um die Abtrocknungsrate τ zu bestimmen, dargestellt in Abbildung 5.5. Die Messung wurde einmal wiederholt und ergibt eine Abtrocknungsrate von $\tau = (4,2 \pm 0,4) \frac{1}{\text{min}}$.

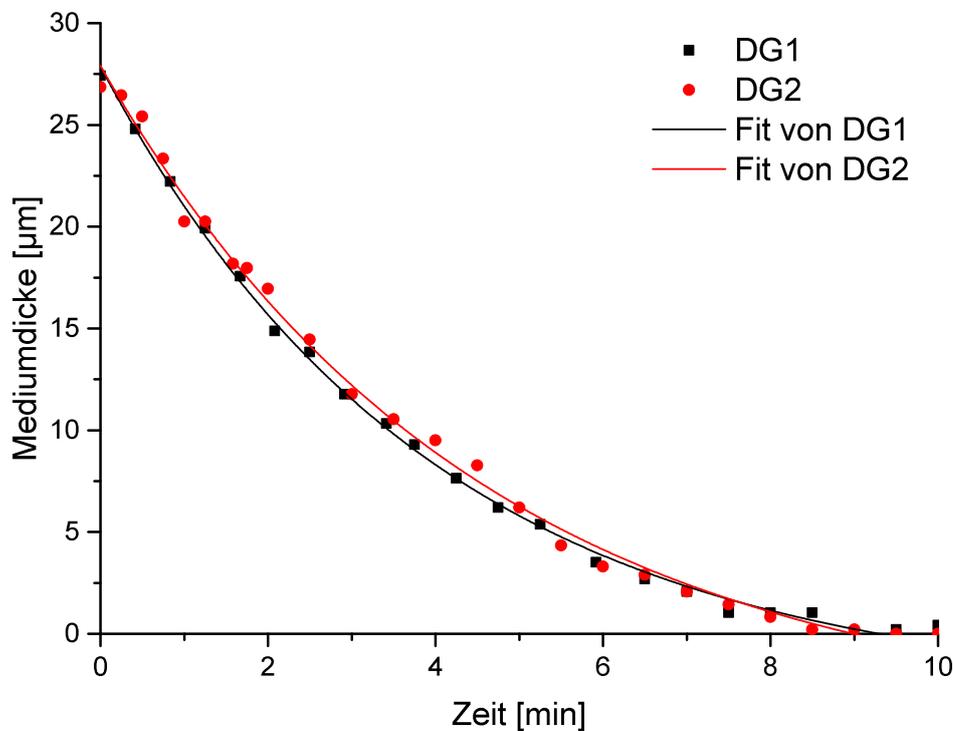


Abbildung 5.5: Abtrocknungsraten bestimmt für zwei Deckgläschen, wobei $\tau_{\text{DG1}} = 3,97 \frac{1}{\text{min}}$ und $\tau_{\text{DG2}} = 4,51 \frac{1}{\text{min}}$ ist.

Diese Messung ergab außerdem, dass die Abtrocknung von außen beginnt und bei Abtrocknungszeiten $>1,5$ min die äußeren Zellen beginnen abzusterben. Aus diesem Grund muss nach dem Entfernen aus dem Medium möglichst viel Medium mit einem Tuch abgetupft werden, dass die Ausgangsdicke nur ca. $15 \mu\text{m}$ beträgt. Danach wird das Deckglas noch 1-1,5 min an Luft getrocknet. Die Mediumdicke liegt nun bei $(7,5 \pm 2,5) \mu\text{m}$, womit einerseits gewährleistet ist, dass genug Zellen für die mikroskopische Auswertung bestrahlt werden können und andererseits genug Flüssigkeit übrig bleibt, um eine Austrocknung zu verhindern. Mit der Kapton-, Luft- und Wasserschicht zwischen Austritt aus dem Vakuum und Zellen ergibt sich nun eine Energie der bestrahrenden Kohlenstoffionen von $(27 \pm 8) \text{ MeV}$, was zu einem LET Wert von $(500 \pm 80) \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ führt. Für den Fehler des LET wurde nur der Fehler der Energie berücksichtigt.

Für 21 MeV Protonen liegt der gesamte Energieverlust bei etwa 200 keV, was zu einer Energie von 20,8 MeV und somit einem nur geringfügig höherem LET Wert von $2,57 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ führt. Die restliche Reichweite in Wasser ist 4,8 mm. Somit ist die Mediumschicht nicht limitierend, allerdings wird mit den Deckgläschen für alle Ionenbestrahlungen gleich verfahren, um eine Vergleichbarkeit der Resultate sicherzustellen. 33 MeV Lithiumionen haben nach der Kapton-, Luft- und Wasserschicht eine Energie von $(20 \pm 3) \text{ MeV}$ und einen LET von $(116 \pm 10) \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$.

Ringbestrahlung

Für die Ringbestrahlung werden die Zellen analog zur Deckglasbestrahlung in mit $4,7 \mu\text{m}$ gespannten Edelstahlingen ausgesät und kultiviert. Die Bestrahlung erfolgt hier unter 9° von unten durch die Folie. Die Zellen werden dabei im Medium bestrahlt und nach der wenige Sekunden dauernden Bestrahlung wieder zurück in den Brutschrank verbracht. Der Energieverlust bei der Ringbestrahlung ist geringer und definierter, als bei der Deckglasbestrahlung. Für Protonenbestrahlung ändert sich weiterhin nur sehr wenig und der Energieunterschied ist vernachlässigbar, für Kohlenstoff allerdings ist die Energie an den Zellen 36 MeV ($\text{LET} = (414 \pm 8) \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$). Die Energie ist vergleichbar mit der Energie für die Deckglasbestrahlung, somit sind die erzielten Ergebnisse beider Bestrahlungsarten vergleichbar.

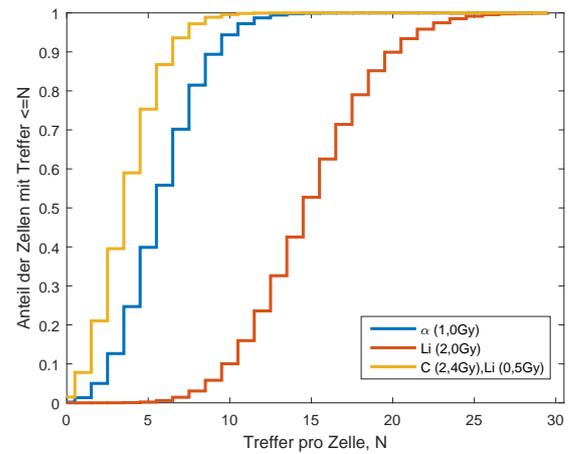
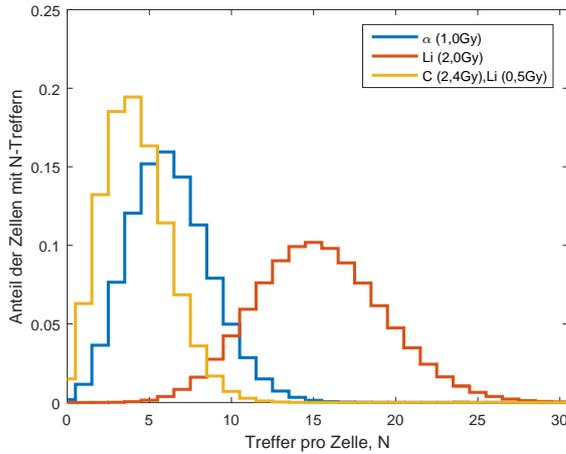
Bestrahlungsdosis

Die Bestrahlung soll mit 2-3 Gy durchgeführt werden, da hier gewährleistet ist, dass möglichst alle Zellen mit mindestens einem Ion bestrahlt werden und die Dosis nicht während des betrachteten Zeitraums tödlich ist. Die Berechnungen für die Dosis wurden nach Gleichung 3.3 durchgeführt und sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Die Parameter werden beispielhaft für 27 MeV Kohlenstoffionen (DG Bestrahlung) erklärt. Eine Fluenz von $0,03 \frac{\text{Ionen}}{\mu\text{m}^2}$ führt nach Gleichung 3.3 zu einer Dosis von $D_C = (2,4 \pm 0,3) \text{ Gy}$, was einer Bestrahlung mit $4,8 \cdot 10^5$ Ionen pro 16 mm^2 Feld entspricht. Die gleiche Fluenz führt bei 36 MeV Kohlenstoffionen (Ringbestrahlung) zu einer Dosis von $D_C = (1,9 \pm 0,3) \text{ Gy}$. Bei einer typischen Zählrate von 120 kHz und einer Feldgröße von $\approx 16 \text{ mm}^2$ entspricht dies einer Bestrahlungsdauer von 4 s.

Ion	E in MeV	LET in $\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$	F in $\frac{\text{Ionen}}{\mu\text{m}^2}$	Zählrate in kHz	Dauer in s	Ionen pro Feld	Dosis in Gy
C	27 ± 8	500 ± 80	0,03	120	4	$4,8 \cdot 10^5$	$2,4 \pm 0,4$
C	36 ± 1	414 ± 8	0,03	120	4	$4,8 \cdot 10^5$	$2,0 \pm 0,3$
Li	20 ± 3	116 ± 10	0,11	350	5	$1,8 \cdot 10^6$	$2,04 \pm 0,18$
Li	20 ± 3	116 ± 10	0,03	100	4	$4,8 \cdot 10^5$	$0,56 \pm 0,05$
p	$20,8 \pm 0,2$	$2,57 \pm 0,10$	5	2000	30	$6 \cdot 10^7$	$2,06 \pm 0,01$

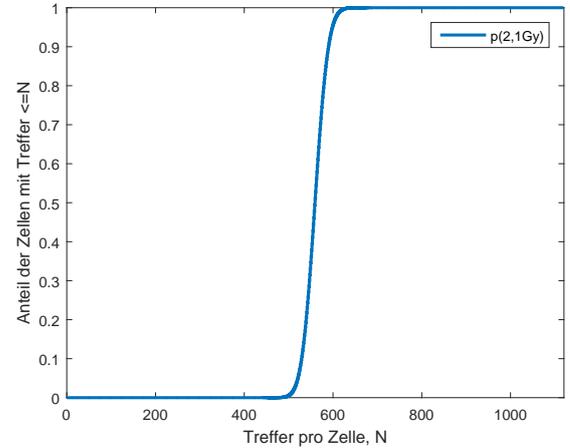
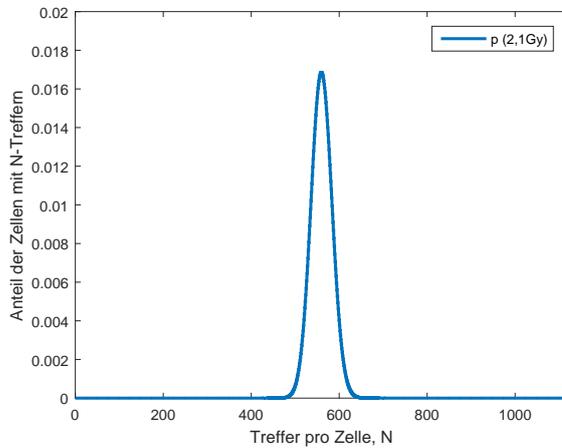
Tabelle 5.1: Bestrahlungsdosis und Parameter für die Bestrahlung bei einem Großfeld von $\approx 16 \text{ mm}^2$

In Abbildung 5.6 ist die Anzahl der Treffer in einem Zellkern für die unterschiedlichen Bestrahlungen, welche sich aus der Poissonstatistik der Fluenz ergeben, dargestellt. Als Zellkernfläche wird $(140 \pm 5) \mu\text{m}^2$ angenommen, wie sie von A. Hauptner [16] für die verwendeten HeLa Zellen vermessen wurde. Zur Verifikation wurde in dieser Arbeit eine Stichprobe von 8 Zellen vermessen. Die hierbei bestimmte Fläche von $(140 \pm 30) \mu\text{m}^2$ stimmt mit den Daten von A. Hauptner überein. Für die Trefferstatistik wird der Fehler der Zellkerngröße nicht berücksichtigt. Bei 2,0 Gy Lithium- und Protonenbestrahlung werden nahezu alle Zellen getroffen, bei Kohlenstoff und 0,5 Gy Lithium werden 2% der Zellen nicht getroffen (Abb. 5.6(a) und 5.6(c)). Der Anteil der Zellen die mehr als das 2-3-fache der Dosis bekommen und somit möglicherweise abgetötet werden, ist in jedem Fall $<2\%$ (Abb. 5.6(b) und 5.6(d)).



(a) Anteil der Zellen mit entsprechender Trefferzahl für die verwendeten Ionen und einer Zellkernfläche von $140 \mu\text{m}^2$. Bei der α -Bestrahlung mit 1 Gy werden im Mittel 6,3 Ionendurchgänge pro Zelle beobachtet, bei 2,0 Gy Lithium 15,4 und bei 2,4 Gy Kohlenstoff 4,2. Dosen die letal sind, kommen für die drei Bestrahlungsarten nahezu nicht vor. Der Anteil der Zellen, welche Dosen > 6 Gy abbekommen (37,8 Treffer für α -Teilchen, 10,5 Treffer für Kohlenstoff und 46,2 für Lithium) liegt bei $< 2\%$.

(b) Akkumulierter Anteil an Zellen mit Mindesttrefferzahlen. Bei der α -Bestrahlung werden 0,5% der Zellen nicht getroffen, bei Kohlenstoff 1% und bei Lithium erhalten alle Zellen mindestens einen Treffer.



(c) Anteil der Zellen mit entsprechender Trefferzahl für Protonen. Es werden bei 2,1 Gy im Mittel 560 Protonen pro Zelle appliziert. Dosen die letal sind kommen für diese Bestrahlung nahezu nicht vor. Der Anteil der Zellen mit Dosen > 4 Gy, ist $<< 1\%$.

(d) Akkumulierter Anteil an Zellen mit Mindesttrefferzahlen für Protonbestrahlung. Der Anteil der Zellen die keinen Treffer haben, ist $<< 1\%$.

Abbildung 5.6: Trefferstatistik nach der Poissonverteilung für die verwendeten hoch-LET (Abb. 5.6(a),Abb. 5.6(b)) und niedrig-LET (Abb. 5.6(c),Abb. 5.6(d)) Bestrahlungen mit 2 Gy mittlerer Dosis.

Eine weitere Lithiumbestrahlung wurde mit der gleichen Fluenz wie Kohlenstoff ($0,03 \frac{\text{Ionen}}{\mu\text{m}^2}$) durchgeführt, was zu einer Dosis von 0,5 Gy führt. Diese geringe Bestrahlungsdosis wurde gewählt, da für eine Bestrahlung mit ≈ 2 Gy 15,4 Ionendurchgänge durch einen Zellkern mit der Fläche $140 \mu\text{m}^2$ erreicht werden. Dies sind zu viele Treffer, um noch sinnvoll einzelne Spuren auswerten zu können. Für diese Bestrahlung werden die Zählraten durch Zufahren der Divergenzschlitze auf 100 kHz reduziert, um die Bestrahlungszeit von 4 s zu halten. Aufgrund von Schwankungen in der Stabilität des Ionenstrahls und somit der Zählrate kann es zu zusätzlichen Dosischwankungen von bis zu 10% kommen. Die gesamte Unsicherheit der Dosis bedingt durch Strahlschwankungen und LET Unsicherheiten durch die Wasserschicht von bis zu 20% ist insofern akzeptabel, da die Auswertungen auf subzellulärer Ebene stattfinden und somit nur gewährleistet werden muss, dass genug Zellen bestrahlt sind und dass die Dosis nicht letal ist. Nach Bestrahlung werden die Proben zurück in das Medium gelegt und im Brutschrank inkubiert.

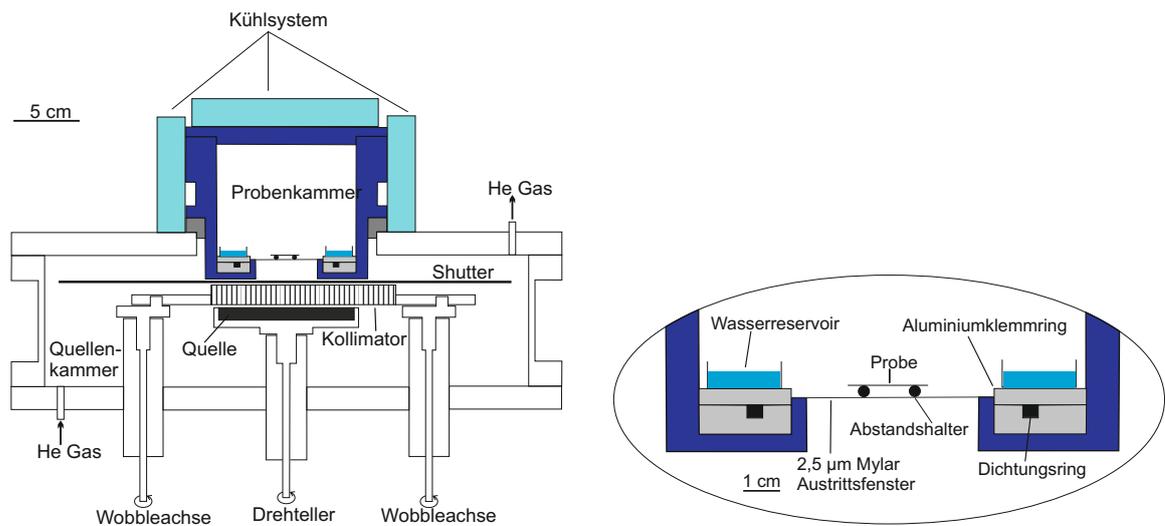
5.2 Bestrahlungen an der α -Bestrahlungsquelle

Um Bestrahlungen im mittleren LET Bereich durchzuführen wurde eine α -Bestrahlungsquelle benutzt, die von H. Roos und A.M. Kellerer [21] entwickelt wurde. Diese Quelle wurde an das institutseigene Biologie-, Mikroskopie- und Bestrahlungslabor in Neubiberg transportiert und dort in Betrieb genommen. Sie kann somit perfekt für Bestrahlungen zum Testen der Färbung und der Antikörper genutzt werden. Außerdem können Experimente durchgeführt werden, die zum Vergleich mit Ionenbestrahlungen an SNAKE dienen.

5.2.1 Aufbau

Der Aufbau der Bestrahlungseinheit ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Die Americium 241 ($\varnothing 85$ mm) Quelle mit einer Aktivität von 0,37 GBq emittiert α -Teilchen mit einer Energie von 5,49 MeV (85% aller Teilchen). Durch Energieverluste in der Quelle und der passivierenden 2 μm dicken Gold-Palladium-Schicht reduziert sich die Energie auf ca. 4 MeV.

Durch die Heliumbegasung der abgeschlossenen Kammer wird gewährleistet, dass kaum Streueignisse stattfinden und somit der Energieverlust der Teilchen minimal



(a) Schematische Darstellung der α -Bestrahlungsquelle: (b) Schematische Darstellung der Probenkammer

Abbildung 5.7: α Bestrahlungseinrichtung: Die Quellenkammer ist mit Helium im Durchfluss begast, um die Streueignisse der α -Teilchen zu minimieren. Die ^{241}Am Quelle mit einem Durchmesser von 8,5 cm befindet sich in der Mitte der Kammer und kann rotiert werden. Der Kollimator ist über der Quelle platziert und ist über zwei Streben beweglich (Wobbler). Als Abschluss der Kammer dient ein Shutter aus Aluminium, welcher für die Zeit der Bestrahlung geöffnet wird. Die Proben werden auf einer über der Kammer gespannten 2,5 μm dicken Mylarfolie auf einem Abstandshalter platziert. Das Kühlsystem hält die Temperatur bei 4°C und unter gesättigter Wasseratmosphäre, sichergestellt durch die Wasserreservoirs.

bleibt. Um die Austrittsfolie möglichst dünn wählen zu können, findet die Begasung bei Normaldruck statt, wodurch die Abdeckfolie keine Druckdifferenzen ausgleichen muss. Durch einen Kollimator gelangen die Ionen unter kleinen Winkeln, maximal 12° zur Oberflächennormalen, auf die Proben. Der Wobbler bewegt den Kollimator über die Probe und gewährleistet dadurch eine homogene Bestrahlung der gesamten Fläche. Nach der zur Probenhalterung gespannten 2,5 μm dicken Mylarfolie haben die α -Teilchen noch eine Energie von 2,7 MeV mit einem LET von $138 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$. Die Fluenzrate beträgt $4,7 \cdot 10^{-3} \frac{\text{Ionen}}{\mu\text{m}^2 \text{min}}$ [116]. Dies entspricht einer Dosisleistung von $\sim 0,10 \frac{\text{Gy}}{\text{min}}$.

5.2.2 Experimentdurchführung

Zur Bestrahlung werden HeLa Zellen mehrere Stunden vorher auf $(22 \cdot 22) \text{ mm}^2$ großen Deckgläschen mit definierter Dicke $(170,00 \pm 0,05) \mu\text{m}$ ausgesät, sodass die Zellen zur Bestrahlung eine nahezu konfluente Schicht bilden und sich noch in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Proben werden bis zur Bestrahlung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 in 6-well Platten analog zu Bestrahlungen an SNAKE (Ab-

schnitt 5.1.2) inkubiert. Kurz vor Bestrahlung wird je ein einzelnes Deckgläschen für 30 s in 4 °C temperiertes Medium gebracht, welches mit 0,25% Hepes als Puffer versetzt wurde. Der Puffer dient dazu, die fehlende CO₂ Begasung während der Bestrahlung auszugleichen. Danach wird das Deckgläschen aus dem Medium genommen und getrocknet. Es muss gewährleistet sein, dass die Wasserschicht dünn genug ist, dass die Ionen die Zellen erreichen können, ohne vorher vollständig gebremst zu werden. Das Deckgläschen wird mit einem Vakuumstift angesaugt und mit den Zellen nach unten auf einem O-Ring mit einer Dicke von 3 mm aufgebracht und bestrahlt. Der O-Ring dient als Abstandshalter zur Austrittsfolie, wodurch sich die Energie der Teilchen auf ca. 2,3 MeV ($\text{LET}=150 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) und die Reichweite zu $\sim 12 \mu\text{m}$ verringert. Durch die zusätzliche Abbremsung und den dadurch vergrößerten LET liegt die Dosis bei 10 min Bestrahlung bei 1,2 Gy. Es werden ca. 1 % der Zellen nicht getroffen und 1 % bekommen eine Dosis von mehr als 2 Gy (vgl. Abb. 5.6(a) und 5.6(b)). Die Bestrahlung erfolgt bei 4 – 6 °C, da bei dieser Temperatur die Reparatur weitestgehend unterdrückt ist, und somit trotz der langen Bestrahlungszeiten (mehrere Minuten) kurze Reparaturzeiten gemessen werden können. Außerdem wird die Probenkammer in gesättigter Wasser Atmosphäre gehalten, da so das Austrocknen der Proben verhindert werden kann. Nach Bestrahlung müssen die Proben zügig zurück in das 37 °C warme Medium gebracht werden. Hierdurch wird eine vollständige Austrocknung verhindert und eine zügige Anpassung an die für die Zellen ideale Temperatur von 37 °C ermöglicht. Dies ist nötig, um den Zeitfehler der Messungen so gering wie möglich zu halten. Die Proben werden nach Bestrahlung bis zur Fixierung im Brutschrank weiter inkubiert.

5.3 Zellpräparation

Nach der definierten Inkubationszeit nach Bestrahlung im Medium bei 37 °C werden die Zellen fixiert und immunfluoreszent markiert. Die Präparation erfolgt gemäß dem Immunfluoreszenzprotokoll (vgl. Anhang B) welches auf dem in Du et al. [17] beschriebenen Protokoll basiert. Zur Fixierung für höchstauflösende Mikroskopie müssen die Wasch- und Blockierungsschritte besonders sorgfältig durchgeführt werden. Kurz zusammengefasst werden die Zellen in PFA (Paraformalaldehyd), welches in 2% Lösung in PBS (phosphate buffered saline) vorliegt, für 15 min fixiert. Danach werden die Zellen in PBS + 0,15% Triton (Triton X-100, Chemische Formel: C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n) permeabilisiert und in PBS, Glycin und BSA (bovine serum albumin) blockiert. (Alle

Chemikalien von ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) Durch die Fixierung und Blockierung wird der Zustand der Zelle konserviert und keine strukturelle Veränderung mehr zugelassen. Danach wird der primäre Antikörper zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Markierung der Proteine werden Antikörper verwendet, die durch Auslösen einer Immunreaktion in Mäusen bzw. Hasen gegen menschliche Proteine gezüchtet werden [117, 118]. Die Kombination der Antikörper erfolgt immer so, dass ein anti-mouse und ein anti-rabbit Antikörper auf der Probe vorhanden sind. Zweimal der gleiche Rezeptor würde dazu führen, dass der sekundäre Antikörper an beide binden kann und man die unterschiedlichen Proteine nicht mehr auseinander halten kann. Nach weiteren Wasch-, Permeabilisier- und Blockierschritten wird der sekundäre Antikörper aufgebracht und bei Raumtemperatur für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper sind in Ziegen gewonnene Antikörper gegen Maus- bzw. Hasenantikörper. Danach folgen weitere Waschschrte, bevor die Proben mit ProlongGold (lifetechnologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) auf einem Objektträger fixiert und somit konserviert werden. Die Proben sind nun bei 4 °C für mehrere Wochen haltbar. Die speziellen in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 5.2 und die verwendeten sekundären in Tabell 5.3 aufgelistet.

primärer AK	Verdünnung	Hersteller
r-a-53BP1	1:350	Novus Biologicals, Littleton, USA
r-a-Rad51	1:350	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, GER
m-a-Rad51	1:350	GeneTex Inc., Irvine, USA
m-a- γ H2AX	1:350	Novus Biologicals, Littleton, USA
m-a-Brcal	1:500	abcam, Cambridge, GB
m-a-DNA-PKcs	1:250	abcam, Cambridge, GB

Tabelle 5.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper mit Verdünnung

sekundärer AK	Reaktivität	Hersteller
STAR 440SX(P)	Hase	Abberior, Göttingen, GER
STAR440SX(P)	Maus	Abberior, Göttingen, GER
STAR 635P	Maus	Abberior, Göttingen, GER
Oregon Green 488	Hase	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Chromeo 505	Maus	ActiveMotif [®] , Carlsbad, USA
Chromeo 505	Hase	ActiveMotif [®] , Carlsbad, USA

Tabelle 5.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper

5.4 Mikroskopie

Die Bilder dieser Arbeit wurden mit einem kommerziellen Leica TCS SP8 CW STED 3X, bei dem die STED Wellenlänge bei 592 nm liegt, erstellt. Das Mikroskop nutzt zur Anregung einen Weißlicht Laser, der einstellbar von 470 nm bis 670 nm ist und zur Detektion eine Anordnung von Prismen, sodass der zu detektierende Wellenlängenbereich flexibel einstellbar ist. Als Detektor werden Hybriddetektoren (HyD) aus Photomultiplier und Avalanche Photodiode genutzt, welche sehr gute Sensitivität mit guter Rauschunterdrückung verbinden.

5.4.1 Farbstoffe zur Mikroskopie mit einem STED Laser

Zur STED Mikroskopie mit einem STED Laser sind nur bestimmte Farbstoffe geeignet. Sie müssen bei der Verwendung eines STED Lasers unterschiedliche Anregungs- und ähnliche Emissionsspektren haben. Außerdem muss der STED Laser noch im Emissionsbereich der Farbstoffe liegen, jedoch nicht mehr im Anregungsspektrum. Diese Bedingungen sind in Abschnitt 4.3 im Detail erklärt. Zweifarbenmikroskopie mit einem STED Laser ist schwierig, da die Farben nicht wie sonst durch Anregungs- und Emissionsspektren getrennt werden können. Da der STED Laser eine fixe Wellenlänge hat, muss das Emissionsspektrum der beiden Farbstoffe möglichst ähnlich und an den Laser angepasst sein. Um also Zweifarbenmikroskopie machen zu können, d.h. zwei Farben trennen zu können, müssen die Anregungsspektren der beiden Farbstoffe getrennt sein. Einer der beiden Farbstoffe muss somit einen großen Stokesshift haben (large Stokes shift dyes, LSD). Solche Farbstoffe sind selten und erst mit dem Aufkommen der STED Mikroskopie wurde deren Entwicklung vorangetrieben. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich als normaler Farbstoff der Chromeo505 Farbstoff von ActiveMotif® (Carlsbad, USA) und für den LSD der AbbSTAR440SX(P) von Abberior (Göttingen, Deutschland) benutzt. Die dazugehörigen Spektren sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Der erstere hat sein Anregungsmaximum bei 505 nm und das Emissionsmaximum bei 525 nm, wohingegen der zweitere das Anregungsmaximum bei 435 nm und das Emissionsmaximum bei 515 nm hat. Der STED Laserlinie liegt für beide Farbstoffe mit 15-20 % der Emission bei AbbSTAR440SX(P) und 7-11 % bei Chromeo505 am Ende des Emissionsspektrums (vgl. Abb. 5.8). Die Wirkungsquerschnitte sind noch ausreichend, um stimulierte Emission zu erzeugen. Mit dieser Konfiguration ist der STED Prozess möglich, allerdings wäre er effektiver, wenn die STED Wellenlänge näher am

Maximum der Emission wäre. Dies ist jedoch nicht möglich, da der Laser sonst mit den Anregungsspektren überlappen würde, was zusätzliche Anregung bewirkt und die Auflösung verschlechtern würde. Zur Detektion der beiden Farbstoffe werden die Anregungswellenlängen auf 470 nm für Abber STAR440SX(P) und 514 nm für Chromeo505 und die Detektionsfenster analog auf 473 nm - 504 nm und 518 nm - 580 nm gesetzt. Dies gewährleistet möglichst geringe spektrale Überlappungen der beiden Farbstoffe in den Bildern.

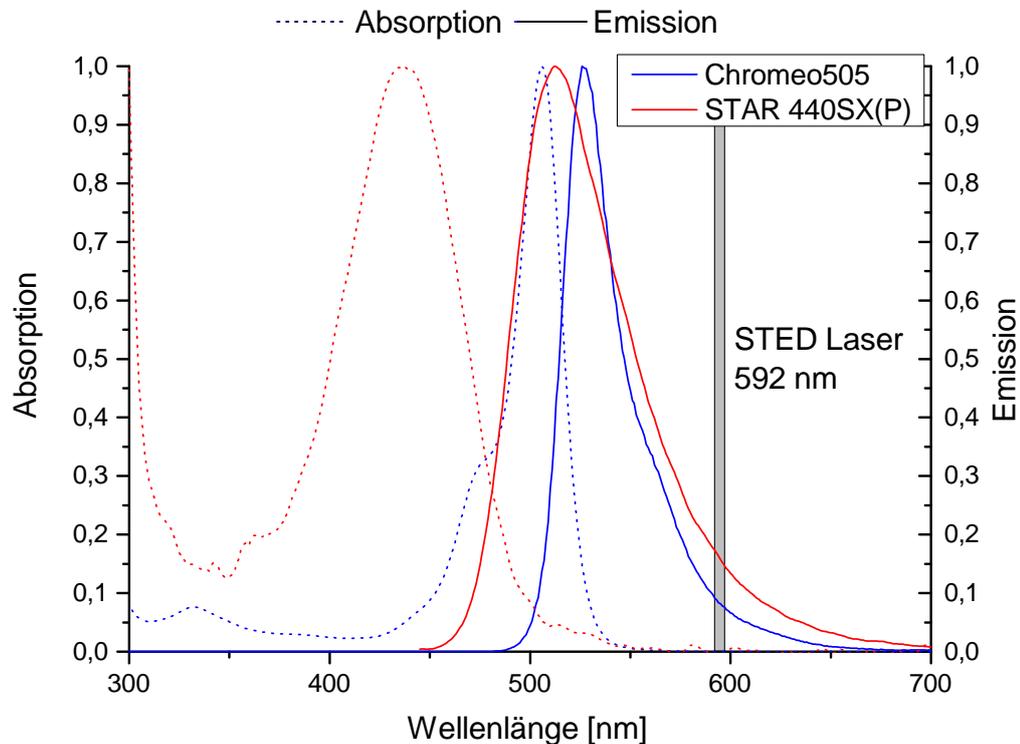


Abbildung 5.8: Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe. Der Farbstoff Abberior STAR440SX(P) (rot) hat ein Anregungsmaximum bei 435 nm und ein Emissionsmaximum bei 515 nm. Der Farbstoff Chromeo505 (blau) hat ein Anregungsmaximum bei 505 nm und ein Emissionsmaximum bei 525 nm. Die Emissionsspektren sind überlagert mit dem STED Wellenlängenbereich (graue Box).

5.4.2 Mikroskopie mit mehreren STED Lasern und z-Doughnut

In einer 2015 erfolgten Aufrüstung des vorhandenen Leica TCS SP8 CW STED Mikroskops wurde dieses um zwei STED Laser erweitert. Das Mikroskop ist nun ausgerüstet mit zwei CW (continuous wave) STED Lasern mit Wellenlängen von 592 nm und 660 nm. Außerdem steht ein gepulster STED Laser mit einer Wellenlänge von 775 nm zur Verfügung. Diese Aufrüstung macht es möglich, STED Mikroskopie mit nahezu allen kommerziell verfügbaren Farbstoffen durchzuführen. Dies stellt eine enorme Verbesserung im Vergleich zur Mikroskopie mit nur einem STED Laser dar, da nun Farbstoffe gewählt werden können, die sich sowohl im Anregungs- als auch im Emissionsspektrum möglichst nicht überlappen. Dies stellt eine nahezu Cross-talk freie Mikroskopie sicher. Der Nachteil liegt darin, dass bei Mehrfarbenmikroskopie die langwelligeren Farbstoffe meist durch den kurzwelligeren STED Laser vollständig gebleicht werden. Dies macht eine sequentielle Aufnahme der gesamten z-Stapel für je ein Fluorophor unerlässlich. Diese Neuerung wurde nur in einem der durchgeführten Experimente verwendet, da bei den anderen Experimenten eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu älteren Daten, durch das Verwenden gleicher Farbstoffe sichergestellt werden sollte.

Weiterhin wurde in dieser Aufrüstung eine z-STED Option eingebaut. Diese ermöglicht es das STED Laserlicht sowohl in x-y-Richtung als auch in z-Richtung zum Doughnut zu formen und zur Auflösungsverbesserung zu nutzen. Die Aufteilung der STED Intensität auf x-y-Richtung und z-Richtung kann individuell für jede Aufnahme angepasst werden. In den durchgeführten Experimenten wurde 60 % der anfänglichen Intensität in z-Richtung verwendet. Aufgrund des weniger definierten z-Doughnut Profils im Gegensatz zum x-y-Doughnut resultiert dies in STED Abregung zu gleichen Teilen in x-y- und z-Richtung. Diese Option wurde ab Inbetriebnahme im Februar 2015 in allen Experimenten verwendet und ermöglicht in den hier durchgeführten Experimenten eine Auflösung von 105 nm in lateraler und ca. 200 nm in axialer Richtung.

5.4.3 Konzentrationsbestimmung

Um das Signal zu Rauschen Verhältnis möglichst groß und gleichzeitig das Bleichen der Fluoreszenz über einen z-Stapel möglichst gering zu halten, ist es notwendig, Testproben zu bestrahlen. Hier muss die optimale Konzentration der sekundären Antikörper bestimmt werden, bei der die genannten Kriterien zutreffen. Hierzu wurden bestrahlte

Proben mit Verdünnungsserien der sekundären Antikörper nach den Empfehlungen der Hersteller zu den jeweiligen primären Antikörpern gefärbt und 5 z-Ebenen mit einem Abstand von 250 nm aufgenommen. Für die Auswertung wurden immer 5 α -bestrahlte Zellen mikroskopiert. Das Bleichverhalten der Farbstoffe bei konfokalen Aufnahmen wurde bestimmt, indem die Anzahl der Photonen im hellsten Pixel in jeder Aufnahme gezählt wurden.

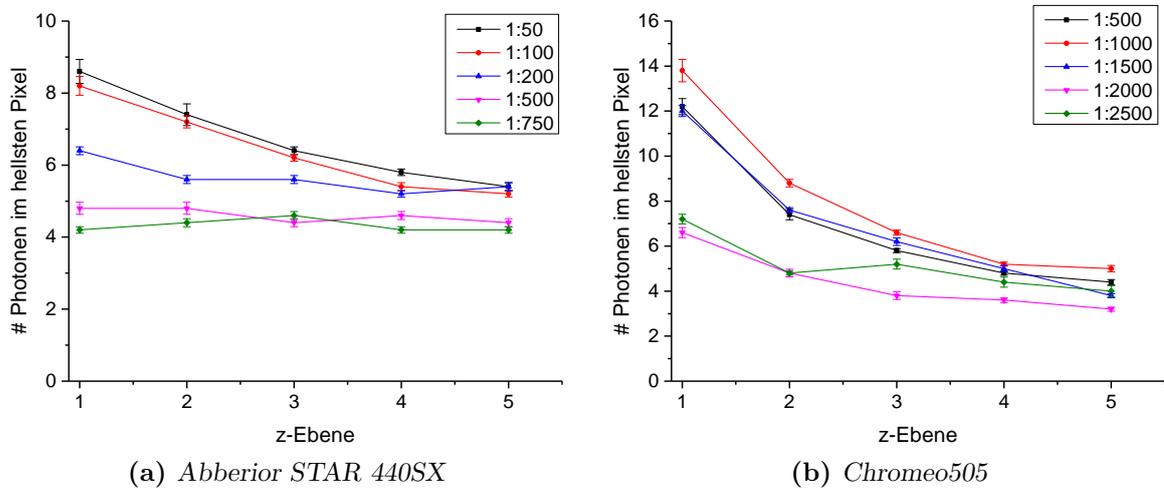


Abbildung 5.9: Vergleich der Verdünnungsserien für die Farbstoffe Abberior STAR 440SX und Chromeo 505 am Beispiel des Proteins 53BP1. Die hellsten Bilder werden generiert mit einer Verdünnung von 1:50 für Abberior STAR 440SX und 1:1000 für Chromeo505.

In Abbildung 5.9 sind die Verdünnungsserien für die beiden verwendeten Farbstoffe Abberior STAR 440SX(P) und Chromeo 505 dargestellt. Für den Abberior STAR 440SX(P) sind die Färbungen für Verdünnung 1:500 und 1:750 am dunkelsten, wobei man kein Bleichen sichtbar machen kann (vgl. Abb. 5.9(a)). Zwischen 1:200 und 1:50 nimmt die Anzahl der Photonen im hellsten Pixel zu, wobei 1:100 und 1:50 gleiche Anfangsphotonenanzahlen zeigen (ca. $8,5 \pm 1,0$). Das Bleichverhalten ist sehr ähnlich und resultiert in $5,5 \pm 0,3$ Photonen im hellsten Pixel in der fünften z-Ebene. Diese Messung zeigt, dass für den Abberior STAR 440SX(P) gefärbt zu 53BP1 1:100 die beste Variante ist, da sie gleiche Stabilität und Helligkeit zeigt, wie die 1:50 Verdünnung, jedoch weniger Farbstoff gebraucht wird. Für die Färbung von Chromeo 505 mit 53BP1 (vgl. Abb. 5.9(b)) wurde die Verdünnungsserie von 1:500 bis 1:2500 durchgeführt. Hier ist die Färbung mit 1:1000 am besten geeignet.

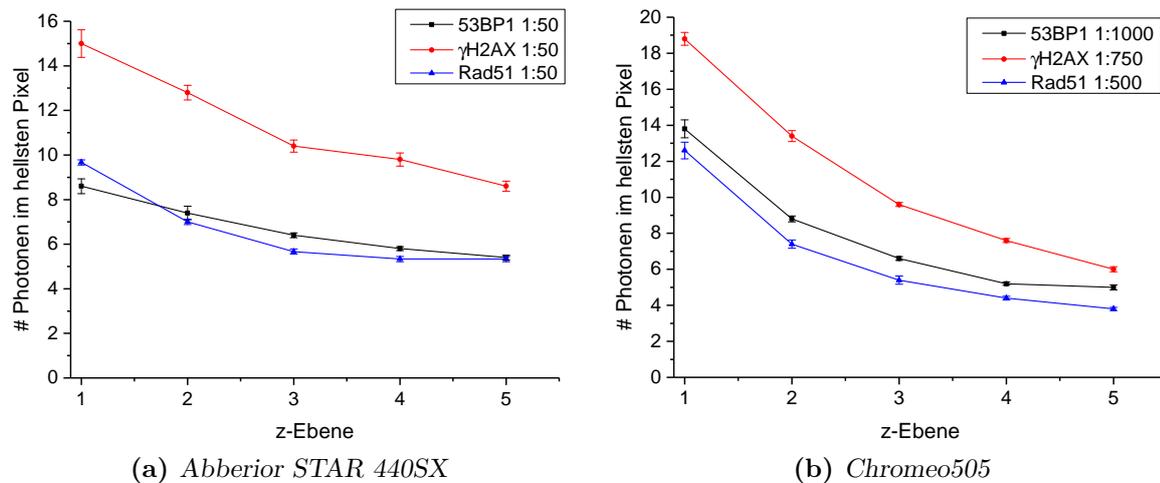


Abbildung 5.10: Vergleich der hellsten Verdünnungen für die Proteine 53BP1, γ H2AX und Rad51.

Die Kalibrierexperimente wurden für die Proteine Rad51, 53BP1 und γ H2AX durchgeführt. Nun werden die so bestimmten besten Verdünnungen für jede Antikörperkombination miteinander verglichen, um so die besten Färbekombinationen herauszufinden. Die Vergleiche sind in Abbildung 5.10 dargestellt. Die verwendeten Farbstoff- und Proteinkombinationen sind in Tabelle 5.4 aufgelistet. Hier wurden zusätzlich die Antikörperkombinationen für Brca1 mit Rad51 und 53BP1 und DNA-PKcs mit 53BP1 aufgelistet, die hier in den Graphen nicht dargestellt sind.

Protein 1	sekundärer AK 1	Protein 2	sekundärer AK 2
53BP1	Chromeo505	Rad51	STAR440SX(P)
53BP1	Chromeo505	γ H2AX	STAR440SX(P)
53BP1	Chromeo505	Brca1	STAR440SX(P)
Brca1	Chromeo505	Rad51	STAR440SX(P)
53BP1	STAR635P	DNA-PKcs	Oregon Green 488

Tabelle 5.4: Protein- und Farbstoffkombinationen wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bei der Bestimmung der Verdünnungen wurde die Färbung an den Ringen durchgeführt. Diese Färbung war nicht sehr bleichstabil, da durch die Polypropylenfolie Sauerstoff in die Proben eindringen konnte, welcher das Bleichen unterstützt. Bleichstabile Proben erhält man, wenn die Ringe durch Deckgläschen ersetzt werden. Hier kann die Anzahl der Aufnahmen von 5 auf bis zu 30 gesteigert werden, ohne dass Bleichen problematisch wird. An den relativen Messungen zueinander ändert sich aber nichts. Im Laufe dieser Arbeit konnte durch sorgfältiges Anpassen des Färbeprotokolls und durch

Verwendung der Deckglasbestrahlung die Gesamthelligkeit der Proben auf Ausgangs-photonenausbeuten von 25-30 gesteigert werden. Bleichen findet auch hier statt und reduziert die Ausbeute auf mittlere Helligkeiten von ~ 20 Photonen. Die Steigerung der Gesamtzahl der detektierten Photonen verbessert das Signal zu Rauschen Verhältnis wesentlich. Somit ist die Bildverarbeitung durch Entfaltung sehr viel einfacher und weniger fehleranfällig.

5.4.4 Pixelgröße

Die z-Stapel Aufnahmen werden mit einer Pixelgröße von $40 \text{ nm} \times 40 \text{ nm}$ in lateraler Richtung und einem Abstand der z-Ebenen von 130 nm bis 250 nm gemacht. Die Voxelgrößen müssen so gewählt werden, dass sie dem Nyquistkriterium (Pixelgröße = $\frac{1}{2,3}$ Auflösung), wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, genügen. Die optimale Dicke von 130 nm kann nicht immer erreicht werden, da die Qualität der Färbung nicht immer für so viele Aufnahmen ausreicht, so wurde in einigen Datensätzen der Abstand auf 250 nm erhöht. Die adäquate Wahl der Pixelgröße ist für eine spätere Bildprozessierung durch Entfaltung unabdingbar (vgl. Abschnitt 4.4). Aufgrund der Überlagerung der Anregungsspektren der beiden Farbstoffe werden die Bilder sequentiell, also hintereinander aufgenommen, d.h. für jede Ebene wird zunächst das Bild des langwelligeren Fluorophores und dann das des kurzwelligeren aufgenommen. Damit wird der „cross-talk“, also das Übersprechen eines Farbstoff in das zu detektierende Spektrum, minimiert. Der übrigbleibende cross-talk kommt daher, dass mit den ausgesuchten Wellenlängen eine in diesem Zusammenhang falsche Anregung des nicht zu detektierenden Farbstoffes stattfindet (z.B. Anregung von Chromeo505 mit 470 nm). Dies allein wäre für die Bildaufnahme noch kein Problem, allerdings liegen die Emissionsspektren der beiden Farbstoffe so nahe zusammen, dass die falsch angeregten Bereiche auch detektiert werden. Somit hat man falsche Signale in den einzelnen Kanälen, die im Nachhinein korrigiert werden müssen, wie in Abschnitt 4.5.2 und Abschnitt 5.4.6 beschrieben wird.

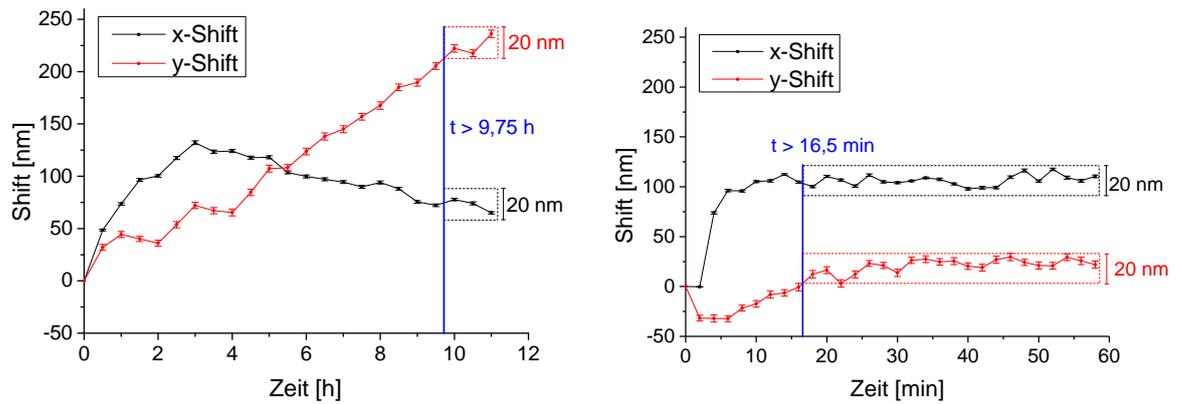
5.4.5 Stabilität des Systems

Die mechanische und thermische Stabilität des Mikroskopiesystems ist von essentieller Bedeutung um eine optimale Auflösung erreichen zu können. Als stabil wird das System angenommen, wenn die Bewegung in der Probe innerhalb einer Minute weniger als

20 nm beträgt. Um die Stabilität zu bestimmen werden in definierten Zeitabständen Bilder einzelner α -bestrahlter Zellen aufgenommen. Danach werden die Bilder jeweils zweier hintereinander aufgenommenen Zeitpunkte überlagert und solange gegeneinander verschoben, bis erkennbare Strukturen direkt übereinander liegen. So kann die Verschiebung in x- und y-Richtung bestimmt werden. Die Messungen wurden ähnlich wie später in Kapitel 6.2 beschrieben durchgeführt. Kurz beschrieben, wird die Korrelation zweier Bilder für Verschiebungen der Bilder in x- und y-Richtung gegeneinander bestimmt. Bilden beide Bilder die gleiche Struktur ab, so ist das Maximum bei einer Verschiebung von 0 Pixeln in x- und y-Richtung. Der Versatz des Maximums zeigt den shift in der Probe an, wobei Verschiebungen größer der Pixelgröße relevant sind. Bei einer Pixelgröße von 20 nm ist also ein Versatz >20 nm entscheidend. Ist die Verschiebung über ≈ 1 h sowohl in x- als auch in y-Richtung <20 nm, so wird die Probe als stabil angenommen. Jede Messung wurde dreimal wiederholt.

Bei einer Temperatur von 23°C stimmt der Brechungsindex des Immersionsöls ($n=1,518$) am besten mit dem des Einbettmediums (ProtonGold, $n=1,5$), des Deckglases ($n=1,524$) und des Objektivs ($n=1,512$) überein. Zunächst wurde bestimmt, wie lange das Mikroskop benötigt, um bei konstanter Temperierung von 23°C Temperaturstabilität zu erreichen. Die Instabilität rührt daher, dass sich die Materialien des Mikroskops bei Temperaturerhöhung unterschiedlich stark ausdehnen. Eine Temperaturstabilität kann erst nach 9,75 h erreicht werden (vgl. Abb. 5.11(a)). Aus diesem Grund muss die Klimakammer mit der Temperaturregelung am Tag vor den Aufnahmen eingeschaltet werden. Eine weitere mögliche Instabilität kann dadurch verursacht werden, dass sich die Proben, welche im Kühlschrank gelagert werden, noch an die Temperatur anpassen müssen und sich dabei ausdehnen. Dies kann auch wieder Verschiebungen verursachen. Die Stabilitätsmessung hierzu ist in Abbildung 5.11(b) dargestellt und zeigt Stabilität nach 16,5 min. Die Proben müssen also rechtzeitig vor der Mikroskopie aus dem Kühlschrank in die Klimakammer verbracht werden.

Das Mikroskop steht auf einem schwingungsgedämpften Tisch auf einem bis 30 m tief vom Gebäudefundament entkoppelten Fundament, jedoch können äußere Einflüsse, wie Türeenschlagen oder Bewegung rund um das Mikroskop, ein Problem darstellen. Um dies auszuschließen, wurde auch hierzu eine Messung durchgeführt. Dazu wurde zum Zeitpunkt 5,5 min die Tür auf- und zugemacht. Zum Zeitpunkt 15 min sind 2 Personen 2 min lang um das Mikroskop gegangen, gelaufen und gesprungen. Die Messungen zu den äußeren Einflüssen zeigen in x-Richtung keine Abweichungen über

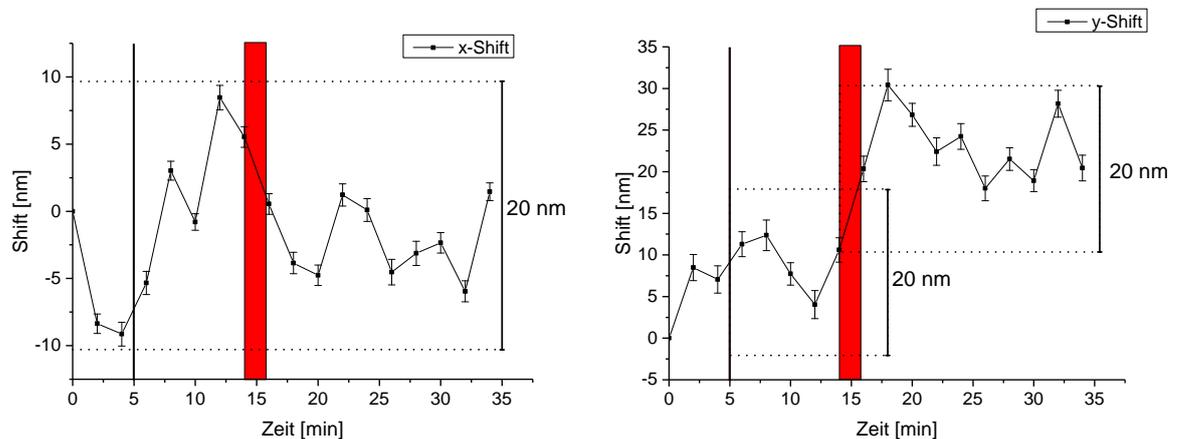


(a) Messung der Temperaturstabilität für die Stabilisierung des Mikroskopsystems bei der Temperierung durch die Klimakammer. Stabilität wird nach 9,75 h erreicht.

(b) Messung der Temperaturstabilität für die Stabilisierung der Probe beim Aufwärmen aus dem Kühlschrank. Stabilität wird nach 16,5 min erreicht.

Abbildung 5.11: Temperaturstabilität

20 nm (vgl. Abb. 5.12(a)). In y-Richtung hat das Türenschlagen (Ereignis 1 in Abbildung 5.12(b)) auch keinen Einfluss. Für die häufigen Bewegungen um das Mikroskop liegt die Verschiebung auch noch im Rahmen der 20 nm, allerdings liegt sie an der Grenze. Aus diesem Grund sollte zu viel Bewegung um das Mikroskop während der Aufnahmen vermieden werden.



(a) X-Shift bei externen Ereignissen. Die Stabilität bleibt erhalten.

(b) Y-Shift bei externen Ereignissen. Die Stabilität bleibt erhalten, ist jedoch kritisch für Bewegungen um das Mikroskop.

Abbildung 5.12: Mechanische Stabilität gegen äußere Einflüsse. Zum Zeitpunkt 5 min wurde die Tür auf- und zugeschlagen. Zum Zeitpunkt 14 min wurde 2 min lang Bewegung um das Mikroskop erzeugt.

Zuletzt kann die mechanische Stabilität des Mikroskoptisches die Stabilität beeinflussen. Dazu wurde der Mikroskoptisch mit Maximalgeschwindigkeit über mindesten 1 cm in x- und y-Richtung verfahren und danach Aufnahmen gemacht. Stabilität wird nach 7,5 min erreicht. Es sollte also vermieden werden, dass weite Strecken mit dem Tisch verfahren werden, bevor Mikroskopaufnahmen gemacht werden.

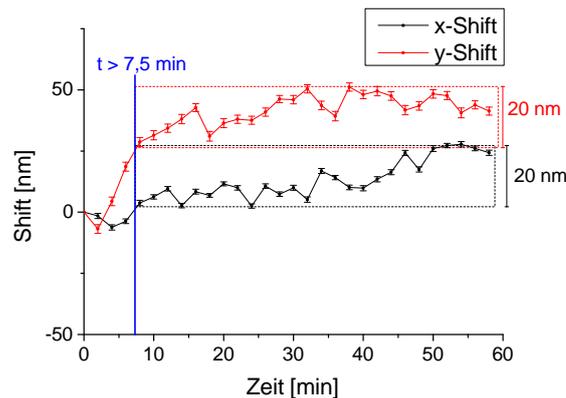


Abbildung 5.13: Tischstabilität beim schnellen Verfahren des Tisches um mehr als 1 cm in x- und y-Richtung. Stabilität wird nach 7,5 min erreicht.

5.4.6 Cross-talk Bestimmung

Bei der Mikroskopie von Proben, die mit mehreren Farben markiert sind, können in den einzelnen Bildaufnahmen Artefakte entstehen, da Signal aus den anderen Kanälen in den gemessenen Kanal übersprechen können. Dies wird Cross-talk genannt und prinzipiell in Abschnitt 4.5.2 beschrieben. Das Übersprechen hat zur Folge, dass an Stellen Signal detektiert werden kann, wo im gemessenen Kanal kein Signal ist. Dadurch erhöht sich artifiziell die Korrelation der einzelnen Kanäle. Man kann den Cross-talk vermeiden, indem man Farbstoffe verwendet, die klar getrennte Anregungs- und Emissionsspektren haben, wie es für die Kombination Oregon Green 488 und STAR635P der Fall ist. Bei den meisten in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten jedoch musste aufgrund des STED Laser Setups (vgl. Abschnitt 5.4.1) eine Farbstoffkombination verwendet werden, bei der sich Anregungs- und Emissionsspektren sehr stark überlagern (vgl. Abbildung 5.8). Um nun den Cross-talk zu Bestimmen gibt es zwei Möglichkeiten. Zunächst kann man die Spektren heranziehen, wie sie von den Hersteller Firmen zur Verfügung gestellt werden und theoretisch für die gewählten Anregungs- und Detektionswellenlängen den Crosstalk berechnen. Für die in dieser Arbeit verwen-

deten Farbstoffe Chromeo505 (Anregung: 514 nm; Detektion: 518 nm - 580 nm) und STAR440SX(P) (Anregung: 470 nm; Detektion: 473 nm - 504 nm) soll das kurz durchgesprochen werden. Die falsche Anregung des Chromeo505 mit 470 nm liegt bei 56 % und gleichzeitig wird 6,3 % falsch detektiert. Dies berechnet sich zu einem theoretischen Cross-talk von 3,5 %. Die falsche Anregung von STAR440SX(P) durch die Anregung mit 514 nm liegt bei 7,5 % der Anregung von Chromeo505. Die Detektion liegt bei 63 % und der berechnete Cross-talk bei 4,7 %. Diese Methode wird meist verwendet, um den Cross-talk zu bestimmen. Allerdings hat diese Methode offensichtliche Nachteile. Zunächst mal sind die Anregungs- und Emissionsspektren auf 1 normiert und geben nicht die absoluten Helligkeiten wieder. Außerdem ist die Quanteneffizienz der Farbstoffe und somit die Effektivität der Umsetzung von eingestrahlttem Licht in Fluoreszenz unterschiedlich. Man kann so den Cross-talk nicht korrekt bestimmen.

Die einzige Möglichkeit besteht darin, Kalibrationsproben zu präparieren und den Cross-talk tatsächlich zu messen. Hierzu verwendet man zwei unterschiedliche Proben, eine gefärbt mit STAR440SX(P) und die andere gefärbt mit Chromeo505. Danach führt man für jede Probe die Messung in beiden Kanälen durch. Dies ergibt für die erste Probe das tatsächliche Signal des STAR440SX(P) Farbstoffs und den Cross-talk desselben im Chromeo505 Kanal. Bei der zweiten Probe ist es genau umgekehrt und man bekommt das tatsächliche Chromeo505 Signal und den Cross-talk in den STAR440SX(P) Kanal. Es ergeben sich die Helligkeiten, wie in Tabelle 5.5 aufgelistet.

	Kanal 1	Kanal 2
Chromeo505	141,41	28,50
AbbSTAR440SX	1,66	81,70

Tabelle 5.5: *Gemessener Cross-talk*

Zur Bestimmung der Cross-talk Matrix müssen nach Abschnitt 4.5.2 die Einträge der Hauptdiagonalen auf 1 normiert werden. Dies ergibt dann die Cross-talk Matrix $A = \begin{pmatrix} 1 & 0,349 \\ 0,082 & 1 \end{pmatrix}$. Wichtig ist, dass der Cross-talk von Chromeo505 in den STAR440SX(P) Kanal bei 34,9 % liegt, also um den Faktor 10 höher, als bei der theoretischen Berechnung (3,5 %). Beim Cross-talk von STAR440SX(P) ist er noch um den Faktor 1,74 höher, 8,2 % zu 4,7 %. Es ist also essentiell den Cross-talk zu messen und nicht zu berechnen.

Hat man die Matrix A bestimmt, kann man den Cross-talk aus den zu untersuchenden Bildern herausrechnen, das sogenannte Entmischen. Man muss hierzu die Matrix invertieren und mit den gemessenen Signalen multiplizieren. Das Ergebnis sind die Cross-talk freien Signale. Dies muss für jedes Bild durchgeführt werden, bevor eine weitere Prozessierung durch Entfaltung oder eine Auswertung der Daten stattfinden kann. In dieser Arbeit wird für die Entmischung der von Leica MircoSystems in dem LASAF Programm zur Verfügung gestellte Algorithmus genutzt. Hier muss nur die durch die Kalibrationsproben bestimmte Cross-talk Matrix eingelesen werden und das Programm führt die Entmischung automatisch durch.

5.4.7 Entfaltung der Rohdatenbilder

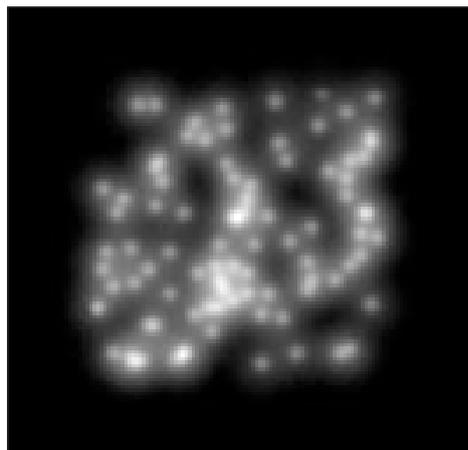
Die entmischten Rohdatenbilder werden zur weiteren Auflösungsverbesserung noch entfaltet. Die Entfaltung rechnet iterativ die PSF aus den gemessenen Bildern heraus und steigert damit die Auflösung, wie in Abschnitt 4.4 beschrieben.

In dieser Arbeit wurde die Entfaltung mit dem Huygens Professional Entfaltungsprogramm der Firma Scientific Volume Imaging B.V. (Hilversum, Niederlande) durchgeführt. Dieses Programm nutzt für die Entfaltung eine aus den Bilddaten wie Voxelgröße, Anregungs- und Emissionswellenlängen etc. theoretisch berechnete PSF. Der Algorithmus zur Entfaltung ist ein klassischer Maximum-Likelihood (CMLE) Algorithmus. Hier wird in erster Iteration ein Bild aus dem vorhandenen Bild und der vorhandenen PSF abgeschätzt. Für dieses neue Bild wird dann der Unterschied zum alten Bild berechnet. Im nächsten Schritt wird dieses Bild als Ausgangsbild benutzt und wieder ein neues Bild abgeschätzt. Wiederum wird der Unterschied der beiden Bilder berechnet. Dies erfolgt solange, bis sich die Bilder nicht mehr ändern. Für diese Art der Berechnung ist die Signal-to-noise ratio (SNR, Signal zu Rauschen Verhältnis) der kritische Faktor für ein erfolgreiches, artefaktfreies Entfalten. Wird das Kriterium für die SNR zu niedrig gewählt, dann ergibt sich keine Auflösungsverbesserung. Wird jedoch das Kriterium für die SNR zu hoch gesetzt, werden statistische Fluktuationen als Signal interpretiert und es tauchen artifizielle Strukturen im Bild auf. Bei der Huygens Software ist das Noise, in diesem Falle das Photonenrauschen, definiert als \sqrt{N} , mit N der maximal in einem Pixel auftauchenden Photonen. Somit ergibt sich für $SNR = \frac{N}{\sigma} = \frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N}$, da $\sigma = \sqrt{N}$ der Fehler des Erwartungswertes N für einen Pixel bei einer Poissonverteilung ist. Diese Rechnung gibt einen ersten Anhaltspunkt über die SNR, muss aber zur konkreten Bestimmung gemessen werden. Dazu werden

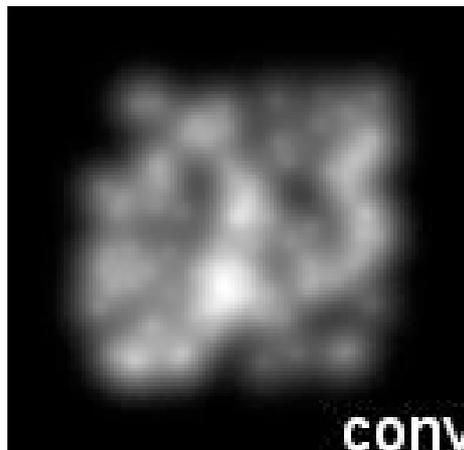
verschiedene Entfaltungssequenzen mit sukzessive erhöhtem SNR durchgeführt, solange bis Artefakte, wie die Überschätzung von Noise, auftreten. Das höchste SNR ohne Artefakt ergibt die bestmögliche Auflösung. Dies wurde in dieser Arbeit für ein künstlich erzeugtes Bild durchgeführt, da hier die zugrundeliegende Struktur als Vergleich mit den entfalteten Bildern bekannt ist.

Konkret wurden ~ 100 Punkte auf einem Bild mit Pixelgröße von 20 nm verteilt und mit einem zweidimensionalen 60 nm (fwhm) Gauß gefaltet (vgl. Abb. 5.14(a)). Danach wurde das Bild mit der aus den Mikroskopdaten theoretische berechneten PSF gefaltet und dadurch ein z-Stapel mit 5 Ebenen erzeugt (vgl. Abb. 5.14(b)). Das Bild wurde erstellt, sodass die maximale Photonenzahl in einem Voxel typisch gemessenen Photonenzahlen von 20 Photonen pro Voxel entspricht. Danach wurde der z-Stapel noch mit Photonenrauschen verrauscht (vgl. Abb. 5.14(c)). Somit konnte ein Bild mit gleicher maximaler Helligkeit und gleichem Rauschen erzeugt werden, wie die gemessenen biologischen Bilder. Der einzige Unterschied besteht darin, dass nun das tatsächliche Ursprungsbild bekannt ist und als Referenz für die Funktionstüchtigkeit des Algorithmus verwendet werden kann. Als Einstieg für die Festlegung der SNR wird nach der Berechnung von oben 4,5 gewählt. Im Gesamten wurde die Entfaltung mit SNR von 1 - 100 durchgeführt, wobei bei SNR=5 ein artefaktfreies Ergebnis erzeugt werden konnte, wohingegen bei steigendem SNR Artefakte entstehen. In Abbildung 5.14(d)-5.14(f) sind die kritischen SNR=1, 5, 10 dargestellt. SNR=1 erzeugt auch ein artefaktfreies Bild, wobei hier aber die Auflösung schlechter ist als bei SNR=5. Bei $\text{SNR} \geq 10$ sind Artefakte wie Darstellung von Noise als Signal und Entstehung heller, ringförmiger Strukturen deutlich erkennbar.

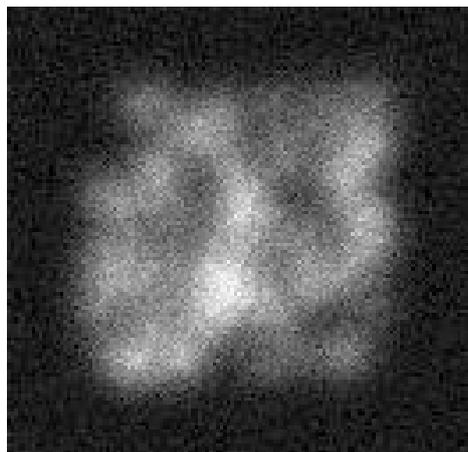
Somit wird für die STED Bilder, welche immer ähnlich hell aufgenommen wurden, für die Entfaltung SNR=5 gewählt. Bilder mit größeren Photonenausbeuten können mit größerem SNR entfaltet werden. Auch hier muss auf die Entstehung von Artefakten geachtet werden. Für eine weitere detaillierte Beschreibung der Verwendung des SVI Algorithmus wird dringend auf die SVI Seite [69] hingewiesen.



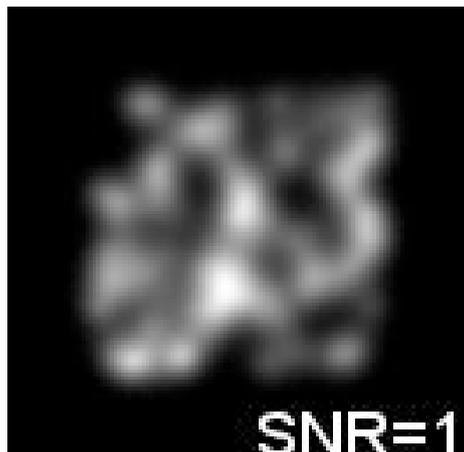
(a) Gaußförmige Punkte verteilt in einem Bild als Referenzbild für den Entfaltungstest.



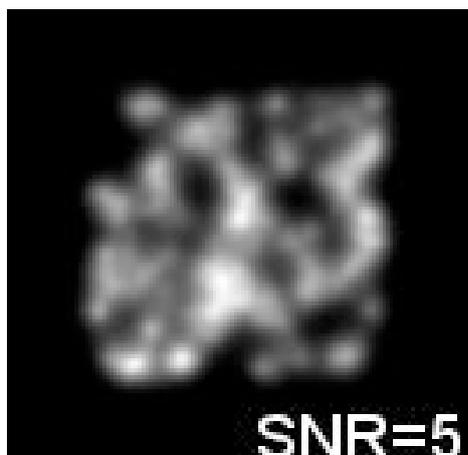
(b) Gaußförmige Punkte verteilt in einem Bild gefaltet mit der theoretisch berechneten PSF



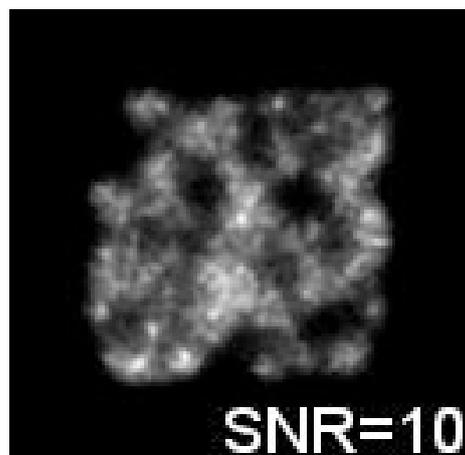
(c) Verrauschtes Bild (zentrale z-Ebene)



(d) Entfaltung mit SNR=1



(e) Entfaltung mit SNR=5



(f) Entfaltung mit SNR=10

Abbildung 5.14: Test des Entfaltungsalgorithmus.

Kapitel 6

Datenanalyse

Die mit STED Mikroskopie aufgenommenen Bilder wurden mit quantitativen Auswertemethoden analysiert. Zum einen wurde die lokale Korrelation der Reparaturproteine innerhalb der IRIF untersucht und zum anderen die intrinsischen Größen der IRIF gemessen. Im folgenden Kapitel wird zuerst ein Überblick über die Methoden der Korrelationsanalyse gegeben und dann im Speziellen das neu entwickelte Analyseverfahren für die orstaufgelöste als auch globale Korrelationsanalyse dargestellt. Danach wird die Bestimmung von Größen in mikroskopischen Auswertungen durch die Autokorrelationsfunktion (AKF), welche mit dem Van-Steensel Ansatz erzeugt wird, erläutert.

6.1 Korrelationsanalyse

6.1.1 Überblick

Die Korrelationsanalyse zweier Mikroskopiebilder ist die Bestimmung der Abhängigkeit der Signalintensität in einem Kanal von der Signalintensität im zweiten Kanal. Das heißt, ob bei hohen Signalintensitäten in Kanal 1 auch hohe Intensitäten in Kanal 2 sichtbar sind. Dies würde genauso Korrelation bedeuten wie wenn in beiden Kanälen niedrige Signalintensitäten zu finden sind. Oder ob bei hohen Intensitäten in Kanal 1 niedrige Intensitäten in Kanal 2 am gleichen Ort sichtbar sind (Antikorrelation). Für eine solche Analyse können verschiedene Ansätze gewählt werden. Zum einen kann der Grad der Korrelation durch einen einzigen Wert ausgedrückt werden, wie es beim Pearsonschen Korrelationskoeffizienten [119] oder auch beim Überlappkoeffizienten [120] der Fall ist. Andere Methoden erzeugen zwei Koeffizienten, je einen für jeden Kanal, wie die Manders Koeffizienten [121]. Alle diese Methoden haben den Nachteil, dass die

Korrelation durch nur einen Wert ausgedrückt wird, der sich global aus dem ganzen Bild ergibt, jedoch keinerlei detaillierte lokale Information birgt.

Eine zweite Gruppe der Korrelationsanalysen sind Methoden, wo jeder Pixel bewertet und in einen Graphen eingetragen wird. Hier wäre als grundlegendstes Prinzip der sogenannte Scatterplot zu nennen. Hier wird auf der Abszisse die Intensität, also der Pixelwert im Kanal 1 und auf der Ordinate der Pixelwert in Kanal 2 aufgetragen. In diesem Graphen können nun vier Gruppen von Pixeln identifiziert werden. Pixel mit hohen Pixelwerten in beiden Kanälen, Pixel mit niedrigen Intensitäten in beiden Kanälen und Pixel mit hohem Signal in einem und niedrigem Signal im anderen Kanal. Eine weitere Methode dieser Art der Korrelationsanalyse ist die sogenannte intensity correlation analysis (ICA) [122], bei der für beide Kanäle separat auf der Abszisse das Produkt aus den Differenzen der einzelnen Pixelwerte zum Mittelwert (product of the differences from the mean) und auf der Ordinate der Pixelwert aufgetragen wird. Aus der Form der entstehenden Graphen kann auf die Art der Korrelation zurückgeschlossen werden. Diese Arten der pixelbasierten Auswertungen liefern zwar theoretisch detaillierte Informationen über die Art der Korrelation, haben aber zwei Nachteile: 1. eine klare Aussage über die Art der Korrelation kann nur bei nicht verrauschten Bildern getroffen werden, die zusätzlich in fast allen Pixeln die gleiche Art der Korrelation aufweisen müssen. 2. Sie enthalten keinerlei Ortsinformation.

Ein weiterer Ansatz der Korrelationsanalyse sind Linienplots. Hier wird eine Linie über eine bestimmte Region gelegt, entlang derer dann die Signalintensitäten in einen Graphen gezeichnet werden. Dabei kann man lokal an einer Stelle den genauen Verlauf der Signalintensitäten betrachten. Diese Methode kann allerdings nur selektiv an bestimmten Orten eingesetzt werden, da sie ausschließlich lokale Information bietet. Linienplots bieten nur eindimensionale, qualitative Informationen.

Um orts aufgelöste Korrelationsanalyse zu betreiben, benötigt man eine Methode die für jeden Pixel des Bildes die lokale Korrelation angibt und auch im Bild markiert. Qualitativ findet dies statt, indem die beiden Bilder als roter und grüner Kanal eines RGB (Rot-Grün-Blau) Bildes übereinander gelegt werden. Regionen, die nur eine der beiden Farben beinhalten erscheinen rot bzw. grün, Regionen die keine der Farben beinhalten sind schwarz und Regionen mit beiden Farben gelb. Um jedoch eine quantitative Bewertung machen zu können muss ein lokaler Koeffizient berechnet werden, der für Korrelation und Antikorrelation unterschiedliche Färbung zeigt. Die ICA Analyse von Li et al. 2004 [122] bietet auch hier einen guten Ansatz. Für jeden Pixel

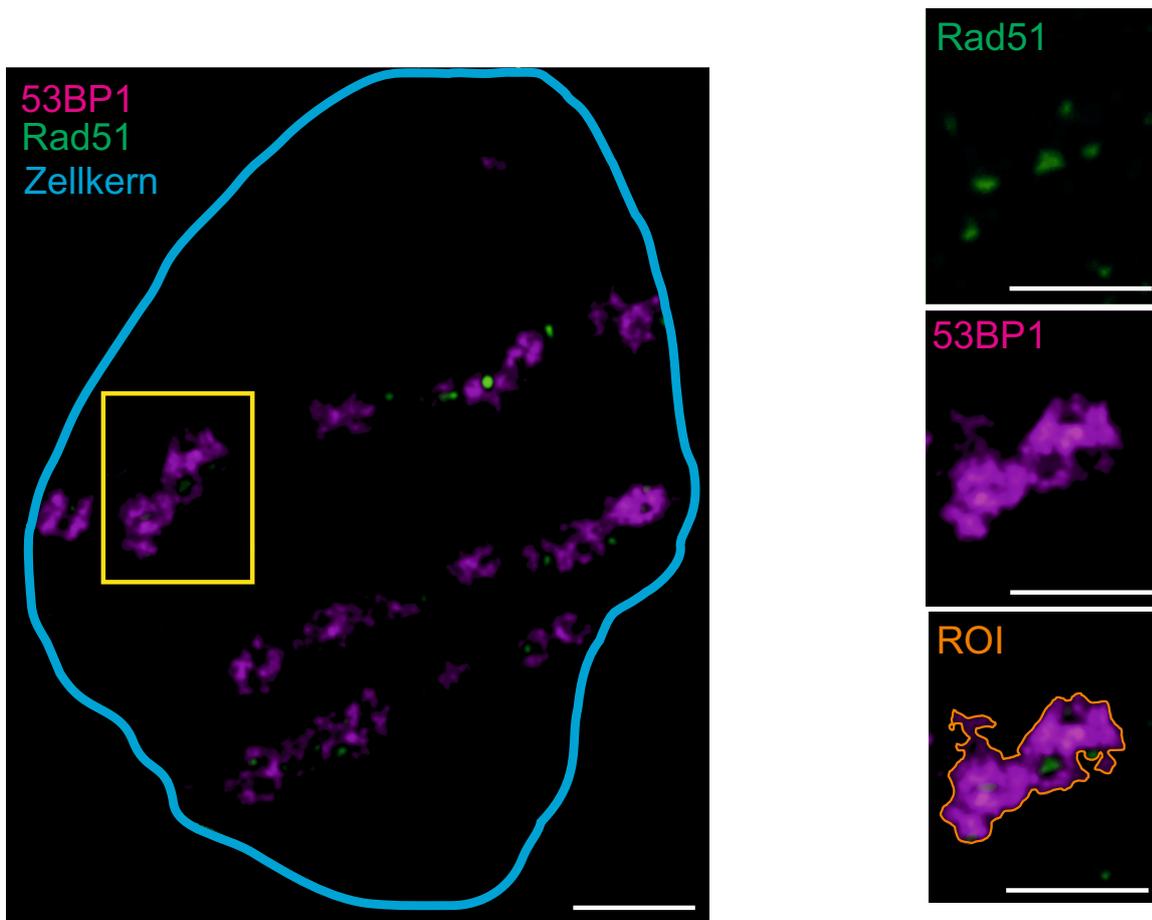
wird das Produkt der Differenzen der einzelnen Werte vom Mittelwert (PDM) ausgerechnet, also $(A_i - \bar{a})(B_i - \bar{b})$, wobei A_i und B_i die Intensitäten im aktuellen Pixel in Kanal 1 (A) und Kanal 2 (B) und \bar{a} und \bar{b} die jeweiligen Mittelwerte bezeichnet. Für Pixel mit Intensitäten über dem Mittelwert in beiden Kanälen oder auch für Pixel mit Intensitäten unter dem Mittelwert, welche positiv korreliert sind, ergibt sich ein positives Vorzeichen des PDM. Für alle anderen Pixel ergibt sich ein negatives Vorzeichen oder 0. Diese Werte können dann in ein neues Bild gezeichnet werden, wobei die Orstinformation von den einzelnen Pixeln genommen wird, welche dann je nach Vorzeichen mit unterschiedlichen Farben eingefärbt werden. Dieser Ansatz ist für die in dieser Arbeit nötigen Analysen der vielversprechendste, doch hat die ICA Analyse auch klare Nachteile, was Darstellung, Definition des interessanten Bereichs und Berechnung betrifft, wie von der Autorin schon in einer früheren Arbeit beschrieben [104]. Aus diesem Grund wurde basierend auf dem ICA Ansatz eine Auswertemethode entwickelt, die rPDM (reduced Product of the Differences From the Mean, deutsch: reduziertes Produkt der Differenzen vom Mittelwert)) Analyse.

6.1.2 Orstaufgelöste Korrelationsanalyse mittels „reduced Product of the Differences from the Mean“

In der rPDM Analyse wird orstaufgelöst die Korrelation zweier Farbkanäle betrachtet. Bei der Analyse ioneninduzierter Foci ergibt sich das Problem, dass das Signal lokal begrenzt ist und große Bereiche des abgebildeten Zellkerns kein Signal beinhalten (Abb. 6.1(a)). Der Anteil der Regionen ohne Signal im Zellkern ist sehr viel höher als die Bereiche mit Signal. Bei einer zellkernübergreifenden Korrelationsanalyse ergibt sich also immer das Problem, dass diese Bereiche die Korrelationsanalyse dominieren. In diesen Bereichen sind beide Signale korreliert, da in keinem der beiden Kanäle Signal vorhanden ist. Jegliche Korrelationsanalyse würde also immer positive Korrelation ergeben. Es ist somit unerlässlich die Bereiche der IRIF zu definieren und die Analyse nur dort durchzuführen.

6.1.2.1 Bereichsdefinition

Die Definition des interessanten Bereichs (engl.: region of interest, ROI) in diesem Fall des IRIF, ist ein kritischer Schritt bei dieser Art der Korrelationsanalyse. Dafür wird eine Helligkeitsschwelle S_E gesetzt, mit welcher Pixel mit einer Helligkeit H oberhalb



(a) STED Bild eines Zellkerns (blaue Linie) Bestrahlung mit 3 27 MeV Kohlenstoffionen. Magenta: 53BP1, Grün: Rad51. Die gelbe Umrandung markiert einen IRIF.

(b) IRIF als Vergrößerung mit definierter ROI

Abbildung 6.1: Darstellung der Definition der ROI. Massstab: $2\ \mu\text{m}$

dieser Schwelle ($H \geq S_E$) dem IRIF, und Pixel mit Helligkeiten darunter ($H < S_E$) dem nicht interessanten Bereich zugeordnet werden. Um diese Schwelle für jeden IRIF festlegen zu können, wurde in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, das eine standardisierte Definition der ROI ermöglicht.

Das Verfahren besteht aus einem neu entwickelten Plugin für ImageJ, bei dem die ROI Definition für jedes Bild standardisiert durchgeführt wird. Hierzu wird zunächst händisch durch Setzen einer initialen Schwelle S_I und der Definition einer Mindestgröße für Signale sichergestellt, dass nur tatsächliches Signal zur ROI Definition verwendet wird. Dafür werden die Bilder eingelesen und zu Beginn für den Schwellwert $S = 1$ jeweils zusammenhängende Pixel mit $H \geq S$ definiert und die entstandenen Regionen R_i mit $i \in (1..n)$ nummeriert, wobei n die Anzahl der Regionen ist. Die Schwelle

wird so lange erhöht, bis das entstandene Graustufenbild Rauschen als Signal ausschließt. Dies wird als initiale Schwelle S_I gesetzt (vgl. Abb. 6.2(a) mit $S_I = 10$). S_I sollte nicht zu hoch gewählt werden, da sie nur dazu dient um grob die Region des IRIF identifizieren zu können. Im Anschluss wird noch eine Mindestgröße für R_i definiert (vgl. Abb. 6.2(b)), um zu kleine Signalakkumulationen auszuschließen. Im Normalfall liegt ab einer Fläche von 50-60 Pixel echtes, ioneninduziertes Signal vor. Nach dem Setzen der initialen Schwelle und der Mindestgröße wird die endgültige Schwelle S_E definiert. Hierzu wird die Gesamtfläche der ROI $F_{\text{ROI}}(S)$ und deren Änderung $\frac{dF_{\text{ROI}}(S)}{dS}$ für einen Schwellwert S mit $S_I \leq S \leq 255$ berechnet und geplottet. Dies ist in Abbildung 6.2 dargestellt. Aus der Abbildung lässt sich ein Plateau bei der Schwellenänderung erkennen, bei der $\frac{dF_{\text{ROI}}(S)}{dS} \leq 5\%$ ist. Der Beginn dieses Plateaus wird als S_E gesetzt, da Helligkeiten mit $H < S_E$ als Hintergrundsignal definiert werden und Helligkeiten $H \geq S_E$ als IRIF Signale. Diese Methode stellt eine standardisierte Möglichkeit zur Bestimmung von S_E dar.

Die ROI Bestimmung kann so für beide Farbkanäle durchgeführt werden. Für die weitere Analyse wird für jeden Kanal ein Bild erzeugt, bei dem Pixel mit Helligkeiten $H < S_E$ für jeden Kanal separat mit $H = 0$ also schwarz gesetzt werden. Als ROI für die rPDM Analyse wird die Vereinigung der resultierenden Flächen mit $H > 0$ in mindestens einem der beiden Kanäle benutzt.

6.1.2.2 rPDM Analyse

Zunächst wird für jeden Farbkanal für alle Pixel der ROI und gleichzeitig $H > 0$ in dem entsprechenden Kanal die mittlere Helligkeit berechnet, bevor dann der eigentliche rPDM Wert der einzelnen Pixel der ROI wie folgt berechnet wird:

$$\text{rPDM} = \begin{cases} d & \text{für } A_i < \bar{a} \wedge B_i < \bar{b} \\ \frac{(A_i - \bar{a})(B_i - \bar{b})}{(A_{\text{max}} - \bar{a})(B_{\text{max}} - \bar{b})} & \text{sonst} \end{cases} \quad (6.1)$$

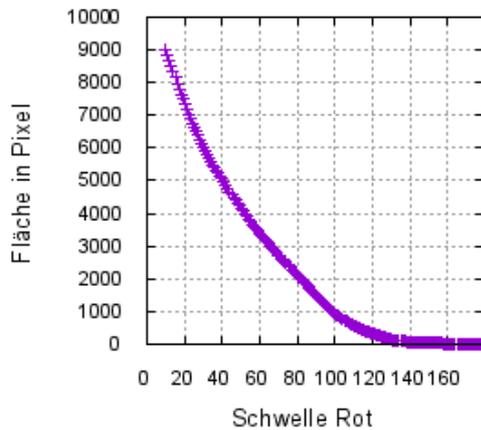
wobei d ein beliebiger Wert außerhalb des Wertebereichs des PDM, A_i und B_i die Intensitäten im aktuellen Pixel in Kanal 1 (A) und Kanal 2 (B), \bar{a} und \bar{b} die jeweiligen Mittelwerte und A_{max} und B_{max} die dazugehörigen Maximalwerte bezeichnet. Durch die Division durch den größtmöglichen Wert $(A_{\text{max}} - \bar{a})(B_{\text{max}} - \bar{b})$ wird eine Normierung auf den Bereich $[-1,1]$ erreicht.



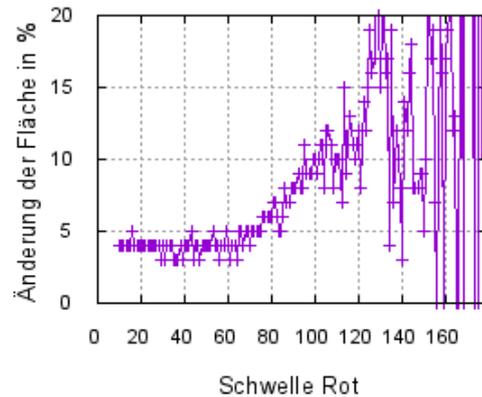
(a) Grauwertbild bei einer initialen Schwelle von 10 für den roten Kanal.



(b) Die initiale ROI des roten Kanals nachdem zu kleine Gebiete (<50 Pixel) gelöscht wurden.



(c) Flächen $F_{\text{ROI}}(S)$ in Pixel für die in (b) bestimmte Fläche, die Schwelle S wird geändert von der initialen Schwelle S_I bis zum maximalen Grauwert im Bild.

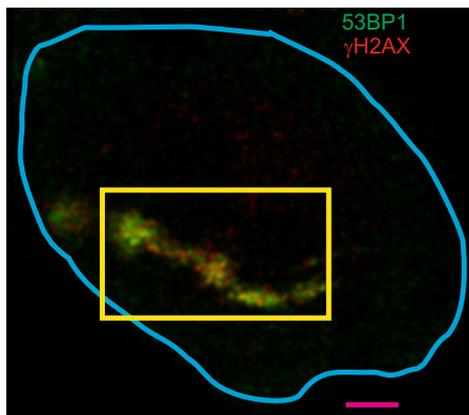


(d) Flächenänderungsplot $\frac{dF_{\text{ROI}}(S)}{dS}$ in % für die in (b) bestimmte Fläche, die Schwelle wird geändert von der initialen Schwelle bis zum maximalen Grauwert im Bild. Hieraus wird die tatsächliche Schwelle S_E bestimmt.

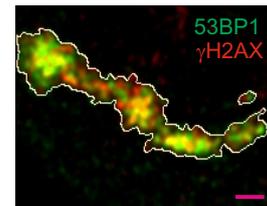
Abbildung 6.2: Graphische Aufbereitung der Bestimmung der ROI am Beispiel des Fokus aus Abbildung 6.1. Dargestellt, sind die Bilder und Graphen, wie sie im ImageJ Plugin in der Ausgabe erscheinen.

Pixeln mit beiden Helligkeitswerten unter dem Mittelwert wird ein beliebiger Wert $d \in \mathbb{R} \setminus [-1, 1]$ zugeordnet, was bedeutet, dass diese für die weitere Analyse ausgeschlossen werden. Dies geschieht, da für die Korrelationsanalyse nur die Bereiche von Interesse sind, in denen mindestens ein Kanal ein Signal oberhalb des Mittelwerts zeigt. Die anderen Bereiche sind für die Analyse nicht interessant, da in beiden Kanälen nur wenig Intensität vorliegt und diese Art von Korrelation die eigentliche Information über Korrelation und Antikorrelation verwässern würde. Pixel in denen beide Signale

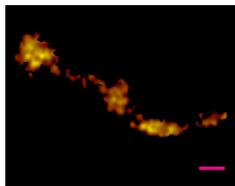
über den Mittelwerten sind haben einen rPDM Wert im Bereich $]0,1]$ und sind positiv korreliert. Die anderen Pixel mit Signalen bei einem Kanal über und bei dem anderen unter dem Mittelwert haben einen $rPDM = [-1,0[$ und sind antikorreliert. Pixel, mit Signalen gleich dem Mittelwert in mindestens einem Kanal haben einen rPDM Wert von 0 und sind weder klar korreliert, noch antikorreliert. Die rPDM Werte können nun in ein neues Bild übertragen werden. Die korrelierten Pixel werden in einer Farbskala von rot (schwach korreliert) bis gelb (stark korreliert) (vgl. Abb. 6.3(c)) dargestellt, die antikorrelierten Pixel dagegen in einer Farbskala von blau (schwach antikorreliert) bis weiß (stark antikorreliert) (vgl. Abb. 6.3(d)). Die Pixel mit Wert 0, dargestellt in Abbildung 6.3(e) werden für die Auswertung vernachlässigt und im finalen Bild schwarz (Hintergrundfarbe) markiert. Das Finale rPDM Bild ist in Abbildung 6.3(f) zu sehen.



(a) Bei dem Mikroskopbild des Zellkerns (blaue Linie) wird der bestrahlte Bereich grob ausgeschnitten (Gelber Kasten)



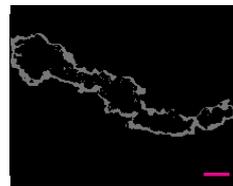
(b) Der für die Auswertung relevante Bereich wird als ROI definiert (hellgelbe Linie)



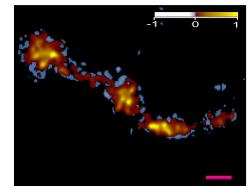
(c) Korrelierte Pixel der rPDM Analyse.



(d) Antikorrelierte Pixel der rPDM Analyse.



(e) Diese Pixel werden in der rPDM Analyse nicht berücksichtigt.



(f) Ergebnisbild der rPDM Analyse mit korrelierten und antikorrelierten Pixeln.

Abbildung 6.3: Darstellung der rPDM Analyse. Maßstab: $1 \mu m$

Diese Form der Auswertung erlaubt es, gezielt Stellen zu finden, welche korreliert oder antikorreliert sind. Dies ist wichtig um auf biologisch funktionale Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zweier Reparaturproteine rückschließen zu können. Diese

Analyse ist immer zunächst nur IRIF basiert. Die rPDM Auswertung und die ROI Definition wurde in dem gleichen Plugin für ImageJ durchgeführt.

6.1.2.3 Statistische Betrachtung der rPDM Auswertung

Für jede ROI können die Prozentsätze der korrelierenden und antikorrelierenden Pixel für jeden Kanal bestimmt werden. Dadurch können verallgemeinerte Aussagen über die Korrelationen getroffen werden, die quantitative Vergleiche zwischen mehreren IRIF, Zellen und verschiedenen Proben ermöglichen. Dabei können vier für die Auswertung relevante Gruppen von Pixeln definiert werden, wie in Tabelle 6.1 gezeigt ist.

	Kanal A	Kanal B
Antikorrelation	$A_i \geq \bar{a} \wedge \text{rPDM} \leq 0$	$B_i \geq \bar{b} \wedge \text{rPDM} \leq 0$
Korrelation	$A_i \geq \bar{a} \wedge \text{rPDM} \geq 0$	$B_i \geq \bar{b} \wedge \text{rPDM} \geq 0$

Tabelle 6.1: Sortierung der rPDM Werte für die verallgemeinerte Auswertung

In der ersten Zeile stehen alle Pixel mit Signal in Kanal A ($A_i \geq \bar{a}$), die auch mit Kanal B korreliert sind. Darunter die Pixel mit Signal in Kanal A ($A_i \geq \bar{a}$), die gleichzeitig mit Kanal B antikorreliert sind. In der zweiten Spalte finden sich die gleichen Pixelgruppen für Kanal B. Nach der Aufteilung der Pixel in die verschiedenen Gruppen kann für alle IRIF eines Experiments daraus der mittlere Prozentsatz korrelierter bzw. antikorrelierter Pixel bezogen auf einen der beiden Kanäle A oder B bestimmt werden. Für Aussagen über Korrelation bezogen auf Kanal A wird Spalte 1 benötigt, für Aussagen über Kanal B Spalte 2. Dies erlaubt eine Zusammenfassung aufwendiger Bilddaten in zwei Werten und damit den Vergleich verschiedener Experimente. Um jedoch eine detaillierte räumliche Korrelation zu erkennen, ist es unerlässlich die rPDM Bilder einzeln zu betrachten.

6.2 Größenbestimmung von IRIF mit dem Van Steensel Ansatz

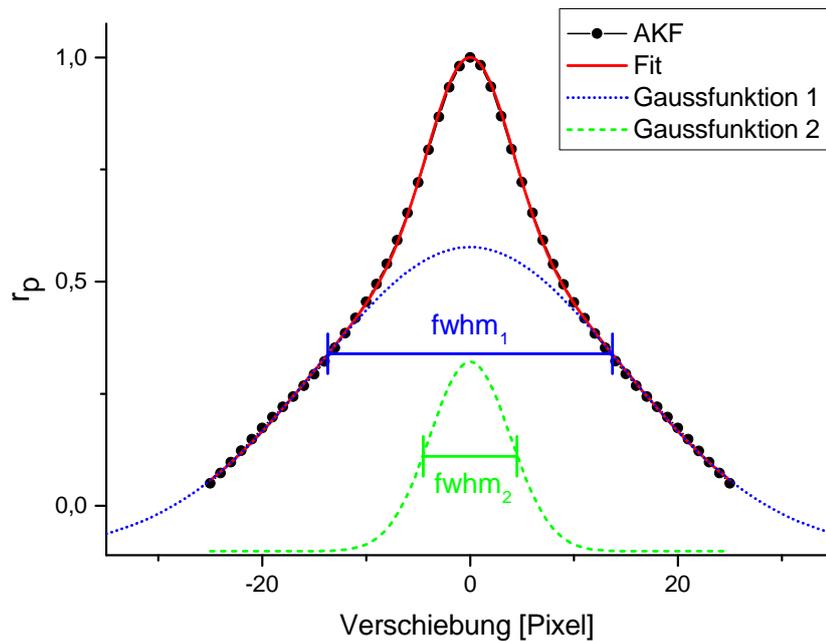
Wiederkehrende Strukturgrößen in Mikroskopbildern können mit der Autokorrelationsfunktion (AKF) analysiert werden. Die AKF ist nichts anderes als die Kreuzkorrelationsfunktion (KKF) für ein und dasselbe Bild. Die KKF wird über einen Ansatz bestimmt, den van Steensel et al. [123] 1996 eingeführt haben. Hier werden die zwei zu vergleichenden Bilder in x- und y-Richtung Pixel für Pixel von $-\Delta x$ bis Δx und von $-\Delta y$ bis Δy gegeneinander verschoben und für jede Verschiebung der Pearson Korrelationskoeffizient berechnet. Dieser ist wie folgt definiert:

$$r_P(\Delta x, \Delta y) = \frac{\sum_i (A_i - \bar{a})(B_i - \bar{b})}{\sqrt{\sum_i (A_i - \bar{a})^2 \sum_i (B_i - \bar{b})^2}} \quad (6.2)$$

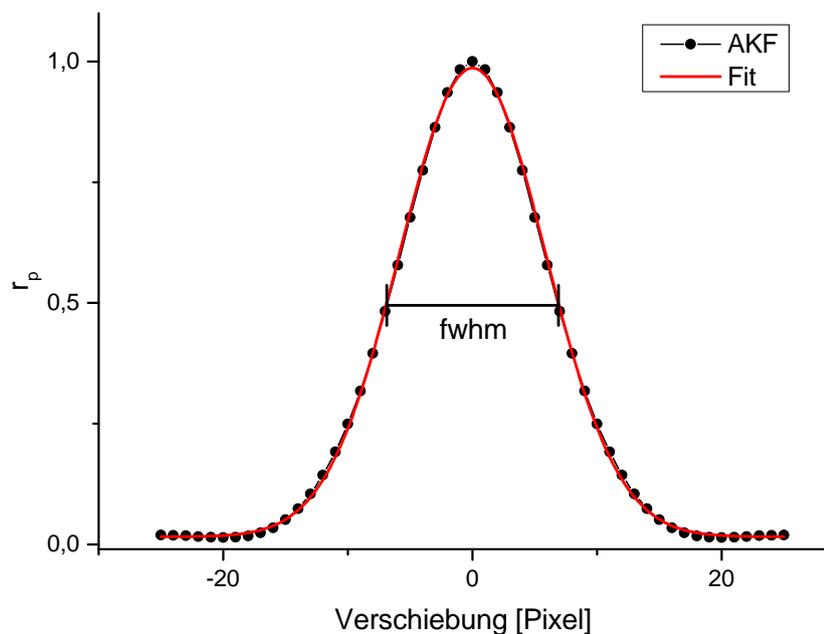
wobei A_i und B_i die Intensitäten im aktuellen Pixel i in Kanal 1 (A) und Kanal 2 (B) und \bar{a} und \bar{b} die jeweiligen Mittelwerte sind. Der Pearson Korrelationskoeffizient liegt in einem Wertebereich von $[-1,1]$, wobei -1 vollständige Antikorrelation bedeutet und 1 vollständige Korrelation. Das Ergebnis der Berechnungen ist eine Korrelationsmatrix, die 2D Kreuzkorrelationsfunktion. Aus dieser können Projektionen geplottet werden (z. B. alle y-Verschiebungen für $\Delta x = 0$ oder alle x-Verschiebungen für $\Delta y = 0$).

Für die AKF wird als zweites Bild das Duplikat des ersten Bildes verwendet. Für die Verschiebung $\Delta x = 0$ und $\Delta y = 0$ ist der Pearson Koeffizient mit einem Wert von 1 maximal. Wenn die Verschiebung in beide Richtungen größer wird, nimmt der Korrelationskoeffizient ab. Diese Abnahme ist abhängig von den mittleren Größen der Strukturen, welche in den Bildern vorkommen. Die Schnitte ($r_P(\Delta x, \Delta y = 0)$) der 2D AKF für einen 53BP1 IRIF und einen Rad51 IRIF sind in Abbildung 6.4 dargestellt.

Die AKF ist ein symmetrisches Korrelationsproblem und kann somit zu einem Faltungsproblem vereinfacht werden [124]. Diese Faltung ist eine Faltung der lokalen Intensitätsverteilung eines IRIF mit sich selbst, welche als gaussförmig angenommen werden. Die Faltung zweier Gaussfunktionen ist wiederum eine Gaussfunktion mit einer Breite von $\sigma = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$, wobei σ_1 und σ_2 die Standardbreiten der beiden zugrundeliegenden Gaussfunktionen sind [125]. Bei der AKF einer Struktur mit nur einer charakteristischen Größe der Breite σ_1 wird eine Gaussfunktion mit sich selbst gefaltet. Die AKF



(a) Autokorrelationsfunktion für einen 53BP1 IRIF bei $\Delta y = 0$ dargestellt in schwarz. Die Funktion hat das Maximum mit 1 bei $\Delta x = 0$. Der Fit mit der Überlagerung von zwei Gaußfunktionen (rote Linie) passt sehr gut zu den Daten. Die breite Gaußfunktion (gepunktete blaue Linie) steht für die breite Struktur im Bild. Und die schmale Gaußfunktion (gestrichelte grüne Linie) steht für die kleine Struktur im Bild. Die Halbwertsbreiten (full width at half maximum, FWHM) der Funktionen und somit die Breite der Strukturen sind dargestellt als $fwhm_1$ und $fwhm_2$.



(b) Autokorrelationsfunktion für einen Rad51 IRIF bei $\Delta y = 0$ dargestellt in schwarz. Hier ist der Fit mit einer Gaußfunktion (rote Linie) passend. Die Breite ist als $fwhm$ eingezeichnet.

Abbildung 6.4: Autokorrelationsfunktionen für 53BP1 und Rad51 mit unterschiedlichen zugrundeliegenden Strukturen. 53BP1 zeigt zwei unterschiedliche Strukturen und Rad51 eine Struktur.

ist dann wiederum eine Gaussfunktion mit der Standardbreite $\sigma = \sqrt{2}\sigma_1$ und Halbwertsbreite (engl.: full width at half maximum, fwhm) $fwhm = 2\sqrt{2\ln 2}\sigma$. So kann aus der Breite der AKF die Breite der zugrundeliegenden Struktur als $b_s = \frac{fwhm}{\sqrt{2}}$ berechnet werden.

Sind in einem Bild mehrere Strukturen unterschiedlicher Größe sichtbar, so ergibt sich eine Summe der Faltung mehrerer Gaussfunktionen. Die Anzahl der benötigten Funktionen entspricht der Anzahl der Strukturen im Bild. Werden zu viele Gaussfunktionen definiert, so wird entweder deren Amplitude oder deren Breite gleich 0, sodass sie verschwinden. In den in dieser Arbeit analysierten Bildern war die maximale Anzahl der identifizierbaren Strukturen zwei, weshalb folgende Funktion für den Fit verwendet wurde:

$$f(x) = y_0 + Ae^{\frac{-x^2}{2\sigma_1^2}} + (1 - A - y_0)e^{\frac{-x^2}{2\sigma_2^2}} \quad (6.3)$$

wobei y_0 der mittlere Pearsonkorrelationskoeffizient für große Verschiebungen und A die Amplitude einer der beiden Gaussfunktionen ist. Da der größte Wert 1 ist, ist die Amplitude der zweiten Gaussfunktion $(1 - A - y_0)$. σ_1 und σ_2 sind die Standardbreiten der beiden Gaussfunktionen aus dem Fit, mit denen die Halbwertsbreiten als $fwhm_1 = 2\sqrt{2\ln 2}\sigma_1 \approx 2,35\sigma_1$ und $fwhm_2 \approx 2,35\sigma_2$ definiert sind. Die Strukturbreiten ergeben sich, wie oben beschrieben zu $b_{S,1} = \frac{fwhm_1}{\sqrt{2}}$ und $b_{S,2} = \frac{fwhm_2}{\sqrt{2}}$.

6.3 Statistische Bewertung der Ergebnisse

Das Ziel der Korrelationsanalysen und der Größenbestimmung mittels dem van Steensel Ansatz war der Vergleich der Korrelation unterschiedlicher Reparaturfaktoren und der IRIF-Größen aus verschiedenen Experimenten. Dazu wurde untersucht, ob die Daten aus einzelnen Experimenten miteinander verglichen werden und zusammengefasst werden dürfen. Die statistische Bewertung der Ergebnisse gliedert sich in zwei Teile:

1. Bewertung der Daten für ein Protein und eine Bestrahlungsart
2. Vergleich zwischen den Proteinen und Bestrahlungsarten

6.3.1 Poolen von Proben bei Varianzgleichheit

Bei der mehrfachen Durchführung gleicher Messungen muss entschieden werden, ob diese gepoolt als ein Datensatz behandelt werden dürfen oder getrennt und dann später gemittelt werden müssen. Dies wird in dieser Arbeit mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (engl.: analysis of variance, ANOVA) [126, 127] durchgeführt.

Normalerweise wurde jedes Experiment in dieser Arbeit doppelt durchgeführt, um Unsicherheiten hinsichtlich der Experimentdurchführung auszuschließen. In jedem Experiment wurden dann mehrere Zellen aufgenommen, welche wiederum mehrere IRIF beinhalten. Die Auswertung wurde zunächst auf IRIF Ebene durchgeführt. Die ANOVA Analyse wurde genutzt um zu beurteilen, ob für die endgültigen Ergebnisse alle IRIF gepoolt betrachtet oder ob über Zellen oder einzelne Experimente separat ausgewertet werden müssen. Hierzu lautet bei einer Anzahl I der einzelnen Stichproben i (beispielsweise die Daten aus $I=10$ analysierten IRIF) die Nullhypothese $H_0 : \mu_1 = \dots = \mu_I$, also dass es keinen Unterschied bei den Mittelwerten μ_i der einzelnen Stichproben i gibt.

Die Voraussetzungen, dass diese ANOVA Analyse gemacht werden darf, sind, dass die Stichproben unabhängig voneinander erhoben worden sind, jede Stichprobe einer Normalverteilung folgt und die Varianz in allen Stichproben gleich ist [128]. Die Varianzanalyse beruht dann auf der Idee, dass wenn H_0 nicht gilt, die Abweichung der Gruppenmittel zum Gesamtmittel hoch ist im Vergleich zur Abweichung der Messungen zum Gruppenmittel. Ist dies der Fall, dann müssen die verschiedenen Stichproben getrennt voneinander betrachtet werden.

Man berechnet die dazugehörigen mittleren Quadratsummen \overline{G} für die Abweichung der Gruppenmittel vom Gesamtmittel und \overline{E} zur Abweichung der Einzelmessung vom Gruppenmittel:

$$\overline{G} = \frac{I}{I-1} \cdot \sum_{i=1}^I (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \quad (6.4)$$

$$\overline{E} = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad (6.5)$$

Danach definiert man die zu prüfende Größe als:

$$F = \frac{\overline{G}}{\overline{E}} \quad (6.6)$$

Diese Größe folgt einer F-Verteilung und die Nullhypothese kann mit zu großem F abgelehnt werden. Der Test wird auf einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt und kann für jede Prüfung in einer Fisher-Tafel nachgeschlagen werden. Die Auswertung wird hier aber nicht händisch sondern mit Hilfe des IBM SPSS Statistics Programm [129] durchgeführt.

6.3.2 Statistische Signifikanz mit dem T-Test

Zum Vergleich der Ergebnisse und Aufdeckung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen zwei Proteinen oder zwei Bestrahlungsarten wurde der Zweistichproben T-Test verwendet. Hier ist die Nullhypothese, dass der Mittelwert des ersten Experiments μ_1 gleich dem Mittelwert des zweiten Experiments μ_2 ist: $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ und die Alternativhypothese, dass dies nicht der Fall ist ($H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$). Hier wird nun der t-Wert wie folgt berechnet:

$$t = \sqrt{\frac{nm}{n+m}} \frac{\mu_1 - \mu_2}{s} \quad (6.7)$$

Wobei n die Anzahl der Werte in Experiment 1 und m die Anzahl der Werte in Experiment 2 sind. s ist die gewichtete Varianz und lässt sich aus den einzelnen Varianzen s_1 und s_2 berechnen als:

$$s = \sqrt{\frac{(n-1)s_1^2 + (m-1)s_2^2}{n+m-2}} \quad (6.8)$$

Die kritischen Werte der T-Verteilung lassen sich wiederum in Tabellen nachschlagen. Für die automatische Berechnung wurde auch hier das IBM SPSS Statistics Programm [129] verwendet.

Kapitel 7

Ergebnisse

Die in den vorangegangenen Kapitel beschriebenen Methoden der Bestrahlung, Mikroskopie und Auswertung ermöglichen nun die räumlich und zeitlich definierte Untersuchung der DNA Doppelstrangbruchreparatur. Hierzu wurden verschiedene interessante Fragestellungen definiert und untersucht. Zunächst wurde die zeitliche Anlagerung der Proteine 53BP1, Rad51 und Brca1 untersucht, um eine Abschätzung für die zeitlichen Abläufe der verschiedenen Reparaturwege zu erhalten. Danach wurde die Korrelation der Proteine γ H2AX und 53BP1, 53BP1 und Rad51 sowie Brca1 und Rad51 für die Bestrahlung mit hoch- und niedrig-LET Teilchen und deren zeitlicher Verlauf betrachtet. Dies ermöglicht die konkrete Untersuchung der Beteiligung der Proteine an verschiedenen Reparaturwegen und möglicher Interaktionen am Schadensort. Die zusätzliche Vermessung der in den IRIF auftretenden Strukturen eröffnet die Perspektive, die Anlagerung der Proteine mit der zugrundeliegenden DNA Struktur zu verbinden. Abschließend wurde durch die Untersuchung der Lokalisierung von DNA-PKcs entlang von Ionenspuren unterschiedlicher Ionisierungsdichte die Anzahl durch hoch-LET Strahlung induzierten DSB bestimmt.

7.1 Zeitliche Charakterisierung der Anlagerung der Reparaturproteine 53BP1, Rad51 und Brca1

Das Ziel dieser Studie war es, die Anlagerung von Reparaturproteinen an ioneninduzierten DSB im zeitlichen Verlauf von wenigen Minuten bis zu 24 Stunden aufzuklären. Die Geschwindigkeit, mit der Proteine an einen DNA Schaden rekrutiert werden, gibt Aufschluss über die Kinetik der Reparatur. Daraus kann auf die Beteiligung der Pro-

teine an unterschiedlichen Reparaturwegen und weitergehend auf die Komplexität der induzierten Schäden geschlossen werden. Dies ermöglicht ein tieferes mechanistisches Verständnis über Induktion und Reparatur von DSB, insbesondere induziert durch hoch-LET Strahlung.

Die Analyse der Anlagerung wurde für die Reparaturproteine 53BP1, Rad51 und Brca1 an α -bestrahlten Zellen durchgeführt. Für jedes der Proteine wurde der Anteil von Zellen bestimmt, welche nach Bestrahlung IRIF dieser Proteine zeigen. Dazu wurden in Abhängigkeit der Zeit nach Bestrahlung alle Zellen in einem Bereich einer fixierten Probe gezählt und kategorisiert, ob sie für das bestimmte Protein IRIF zeigen oder nicht. Um die Ungenauigkeiten gering zu halten, wurden pro Zeitpunkt mehrere hundert Zellen, mindestens jedoch 100 Zellen ausgezählt (2 Replikate mit je 200-400 Zellen pro Zeitpunkt für 53BP1 und 100-200 Zellen pro Zeitpunkt für Rad51 und Brca1). Aus den gezählten Zellen wurden die Anteile an signalpositiven Zellen bestimmt und gegen die Zeit geplottet (vgl. Abb. 7.1). Für 53BP1, dargestellt in Abbildung 7.1(a), sind bei der Fixierung direkt nach Bestrahlungsende (0 min) schon in $\approx 37\%$ aller Zellen IRIF sichtbar. Maximal sieht man in 99% aller Zellen Reparaturfoci. Nachdem nach 20 min das Maximum erreicht wird, nimmt der Anteil an IRIF positiven Zellen mit zunehmender Reparaturzeit ab.

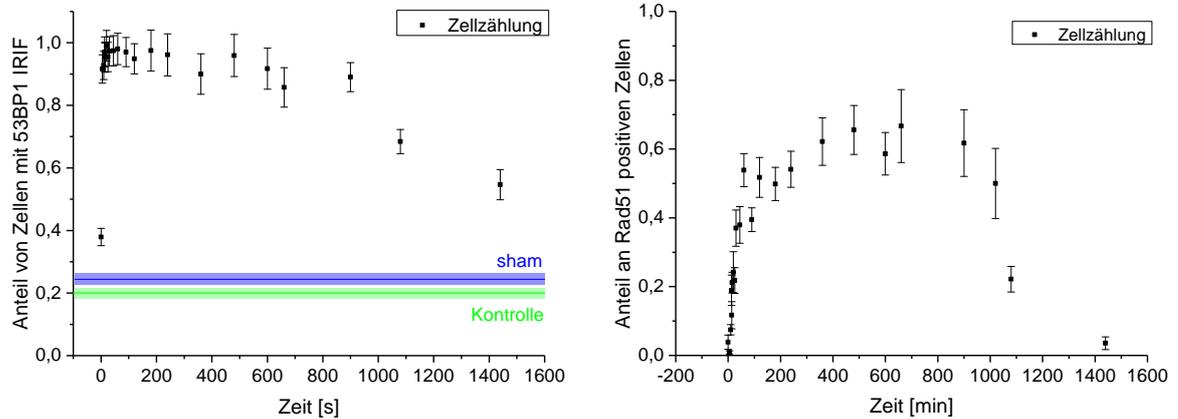
Für Rad51, dargestellt in Abbildung 7.1(b), beginnt die Anlagerung 13 min nach Bestrahlung, wobei maximal 60%-67% der Zellen IRIF zeigen. Das Plateau wird nach 6 h erreicht und der Abbau beginnt 11 h nach Bestrahlung.

Für Brca1, dargestellt in Abbildung 7.1(c), beginnt die Anlagerung 10 min nach Bestrahlung. Im Maximum nach 1 h zeigen 72% der Zellen Brca1 IRIF, danach nimmt der Anteil wieder kontinuierlich ab.

Zur Quantifizierung der zeitlichen Charakteristik wurde ein Modell erstellt, welches den Anteil an Zellen mit IRIF und die Abnahme der Zellen mit IRIF anpasst:

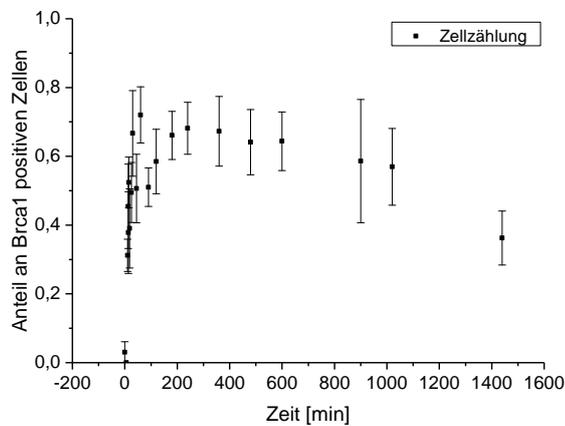
$$I_{rel}(t) = \begin{cases} 0 & \text{für } t \leq T_0 \\ I_1 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t-T_0}{\tau_1}}\right) \cdot e^{-\frac{t-T_0}{\tau_2}} & \text{für } T_0 < t < T_1 \\ e^{-\frac{t-T_1}{\tau_3}} & \text{für } t > T_1 \end{cases} \quad (7.1)$$

Die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 beschreiben die Anlagerung an den Schaden und den dazu konkurrierenden Abbau durch Fertigstellung der Reparatur, für schnell reparierbare Schäden. τ_3 beschreibt die Abnahme der Foci für die am langsamsten reparierten



(a) Anteil der 53BP1 positiven Zellen aus einer Zählung an α -bestrahlten Zellen. Bei Fixierung direkt nach Bestrahlung ist die Anzahl der positiven Zellen signifikant gegenüber den sham-bestrahlten und den Kontrollzellen erhöht. Sham-Bestrahlung erzeugt keine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrolle.

(b) Anteil der Rad51 positiven Zellen aus Zählungen an α -bestrahlten Zellen. 13 min nach Bestrahlung sind die ersten Rad51 IRIF sichtbar.



(c) Anteil der Brca1 positiven Zellen aus einer Zählung an α -bestrahlten Zellen. 10 min nach Bestrahlung sind die ersten Brca1 IRIF sichtbar.

Abbildung 7.1: Anlagerungskinetiken für 53BP1, Rad51 und Brca1 an fixierten Zellen nach α -Teilchen Bestrahlung.

Schäden in den Zellen. T_0 beschreibt den Offset bis zum Einsetzen der Anlagerung und T_1 den Offset bis auch die letzten Schäden repariert werden. Eine schematische Darstellung der Anpassungsfunktion findet sich in Abbildung 7.2.

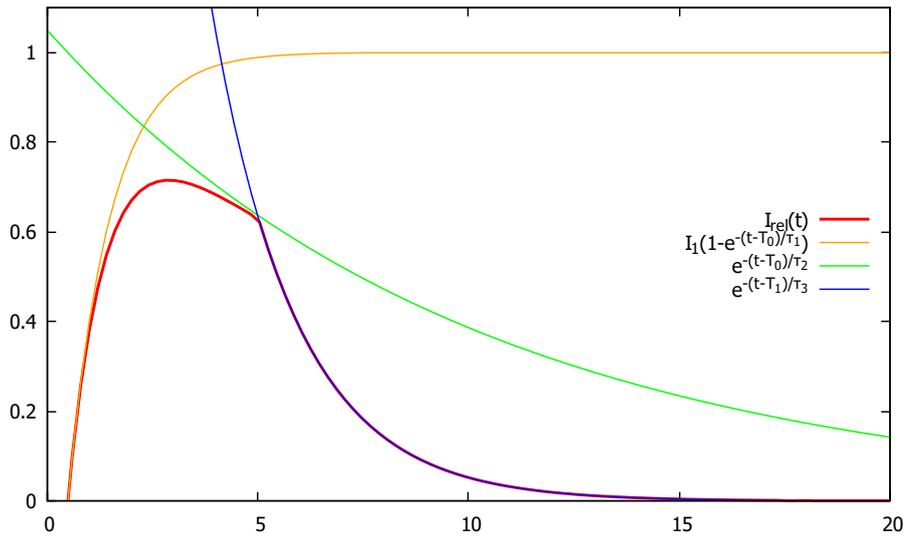


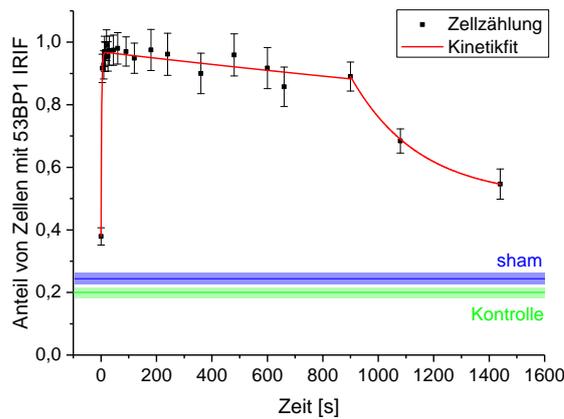
Abbildung 7.2: Anpassungsfunktion für die zeitliche Charakterisierung der IRIF Bildung von Reparaturproteinen.

Die Anpassung des Modells an die Daten sind in Abbildung 7.3 dargestellt. Für 53BP1 (Abb. 7.3(a)) und Brca1 (Abb. 7.3(c)) sieht man eine zügige Anlagerung der Proteine am Schaden, was für Rad51 mit einer langsameren Zeitkonstante τ_1 passiert. Für 53BP1 sieht man eine zügig beginnende Abnahme der IRIF positiven Zellen in ca. 10%-20% der Zellen, welche für Brca1 und Rad51 nicht sichtbar ist. Allen drei Proteinen ist gemeinsam, dass die letzten reparierten Schäden mit einer relativ zügigen Kinetik (ca. 200 min-400 min) zu späten Zeiten, sichtbar ab ca. 15 h, erfolgt. Die aus den Fits resultierenden Parameter sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

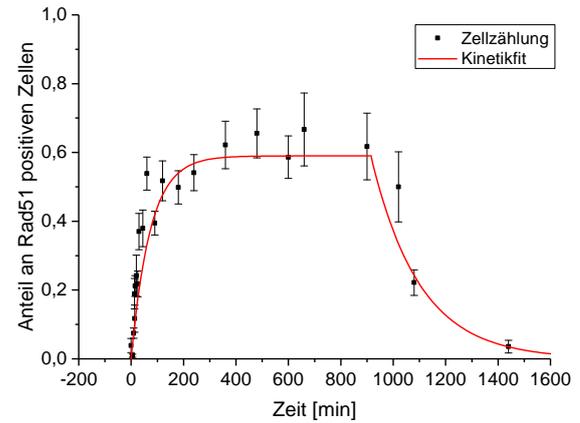
	T_0 in min	τ_1 in min	τ_2 in min	T_1 in min	τ_3 in min
53BP1	< 0	$2,2 \pm 0,4$	5685 ± 1183	666 ± 50	246 ± 40
Rad51	13 ± 5	73 ± 12	—	817 ± 43	186 ± 36
Brca1	10 ± 5	16 ± 4	—	547 ± 123	380 ± 90

Tabelle 7.1: Kinetikparameter Zeit-Offset T_0 für den Anstieg, Anstiegszeit τ_1 , Zeit-Offset für den Abfall T_1 und Abbaupzeit τ_3 zusätzliche Abbaupzeit für 53BP1 τ_2 .

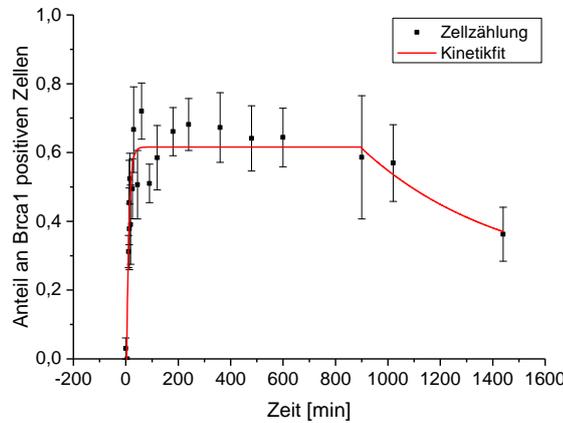
Der Zeit-Offset für den Anstieg T_0 für 53BP1 liegt bei kleiner 0, da ein vollständiges Ausschalten der Reparatur über die 10 min α -Bestrahlung nicht möglich ist, und einzel-



(a) Anpassung des Modells aus Gleichung 7.1 an die 53BP1 Messdaten.



(b) Anpassung des Modells aus Gleichung 7.1 an die Rad51 Messdaten.



(c) Anpassung des Modells aus Gleichung 7.1 an die Brca1 Messdaten.

Abbildung 7.3: Anlagerungskinetiken für 53BP1, Rad51 und Brca1 an fixierten Zellen nach 1 Gy α -Teilchen Bestrahlung.

ne Zellen direkt nach Ende der Bestrahlung schon IRIF zeigen. Der Anstieg mit einer Zeitkonstanten von $\tau_1 = (2,2 \pm 0,4)$ min ist sehr kurz. Die erste Abbauphase τ_2 ist mit (5685 ± 1183) min sehr lang und kann nicht sehr genau bestimmt werden, da sie einer mittleren Reparaturzeit entspricht, welche in den Zellen sehr verschieden sein kann. Die Zeitkonstante τ_3 für das Verschwinden der letzten 53BP1 IRIF liegt bei (246 ± 40) min. Bei Rad51 ist die initiale Anlagerung an den Schaden um $T_0 = (13 \pm 2)$ min zeitverschoben und die Anlagerung findet sehr viel langsamer statt ($\tau_1 = (73 \pm 12)$ min). Danach findet sich ein Plateau, in dem keine weitere Anlagerung, aber auch kein Abbau des Proteins sichtbar ist. Der Abbau des Proteins nach $T_1 = (817 \pm 43)$ min ist dann vergleichsweise zügig ($\tau_3 = (186 \pm 36)$ min). Brca1 liegt mit dem Anlagerungsbeginn und der Anstiegszeit zwischen 53BP1 und Rad51, auch hier bleibt das Protein

für lange Zeit am Schaden. Der Abbau an den letzten IRIF erscheint sehr langsam $\tau_3 = (380 \pm 90)$ min konnte aufgrund der wenigen, mit großen Fehlern behafteten Datenpunkte allerdings nicht gut angepasst werden.

Diskussion der Ergebnisse

53BP1

Die Anlagerung von 53BP1 an den Schaden ist sehr zügig ($\tau_1 = (2,2 \pm 0,4)$ min), was die frühe Rolle in der DSB Schadensantwort in eukaryotischen Zellen bestätigt. Außerdem zeigen im Maximum nahezu alle Zellen 53BP1 IRIF (99 % nach 20 min). Dies bestätigt, dass 53BP1 in allen bestrahlten Zellen IRIF zeigt. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer früheren Messreihe erzielt. Hier wurde die Kinetik der Intensität von IRIF in lebenden HeLa Zellen beobachtet [15]. Dort wurde der relative Anstieg der IRIF Helligkeiten bestimmt, nicht wie in dieser Arbeit die Raten der IRIF positiven Zellen. Es wurde gezeigt, dass 53BP1 nach $(1,48 \pm 0,13)$ min an den Schaden rekrutiert wird, was gut mit der hier gemessenen Zeit übereinstimmt. Es zeigt sich, dass die gemittelte Anstiegskinetik der IRIF Anzahl über viele Zellen in guter Übereinstimmung ist mit dem Anstieg der Signalintensität einzelner IRIF (Messung durch V. Hable [15]).

Es konnte gezeigt werden, dass mit einer einfachen Messmethodik Aussagen über den Zeitpunkt des Beginns der Anlagerung und deren Geschwindigkeit für 53BP1 getroffen werden können. Außerdem wurde gezeigt, dass 53BP1 auch für langsam und somit vermutlich mit HR reparierte Schäden am Schadensort verbleibt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit aktuellen Studien, welche 53BP1 eine stabilisierende Funktion bei der Reparatur von Schäden mit HR zuweist [18]. Außerdem kann der Abbau des Proteins für diese Schäden gut quantifiziert werden. In den Zeiten zwischen Anlagerung und Abbau sieht man eine zusätzliche leichte Abnahme der IRIF positiven Zellen. Dies sind vermutlich ausschließlich G1 Zellen, welche alle Schäden schnell mit NHEJ reparieren. Nach 24 h nach Bestrahlung verbleiben in den Zellen sogenannte „residual“ 53BP1 IRIF, welche sich durch eine Überhöhung der IRIF positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor ~ 3 zeigen und auch schon in anderen Studien gemessen wurden [130–133]. Es ist bisher noch nicht aufgeklärt, ob diese „residual“ IRIF nicht oder noch nicht reparierte DSB darstellen oder ob nach der Reparatur in der Umgebung mancher DSB Strukturänderungen auftreten, die ein Ablösen von 53BP1 vom ehemaligen Schadensort unmöglich machen.

Rad51

Die Anlagerungskinetik von Rad51 ist fast 30-mal langsamer als die von 53BP1 ($T_0 = (13 \pm 5)$ min gegenüber $T_0 < 0$ min und $\tau_1 = (73 \pm 12)$ min gegenüber $\tau_1 = (2, 2 \pm 0, 4)$ min). Die Anlagerung scheint in der betrachteten Zellpopulation in den ersten ~ 6 h nach Bestrahlung abgeschlossen zu sein. Die Charakteristik der Anlagerung von Rad51 an den Schaden liegt an dessen Funktion in der DSB Reparatur ausschließlich während der HR. Auch ist keine Verringerung der IRIF positiven Zellen nach kurzen Zeiten sichtbar, was die Aussage stützt, dass Rad51 nur an der Reparatur von Schäden mittels der langsamen HR beteiligt ist. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass nur in 60 %-67 % aller Zellen überhaupt Rad51 IRIF zu finden sind, da HR nur in der S-/G2-Phase stattfindet. Die Reparatur der komplexen Schäden durch HR dauert dann noch mehrere Stunden an und der Abbau von Rad51 nach Beendigung der Reparatur (~ 11 h nach Bestrahlung) erfolgt wiederum über eine Zeit von mehreren Stunden, wobei die Zeitkonstante der Anlagerung halb so groß ist, wie die des Abbaus ($\tau_2 = (186 \pm 36)$ min). Der Abbau des Proteins beginnt nach $(13, 6 \pm 0, 8)$ h, was als Mindestdauer der HR interpretiert werden kann. Die Kinetik von Anlagerung und Abbau ist dadurch begründet, dass die Reparatur durch HR sehr viele definierte Schritte beinhaltet, die alle definierte Zeiten brauchen und somit zeitlich langsam aber definiert sind. Nach der Reparatur der Schäden wird Rad51 am Schaden rasch abgebaut und nach 24 h sind nahezu alle Schäden durch HR repariert. Es gibt hier keine „residual“ IRIF als Zeichen von schwierig oder nicht zu reparierender Schäden. Das bedeutet alle Schritte der Reparatur, die eine Invasion des gebrochenen Strangs in das Schwesterchromatid notwendig machen, was durch Rad51 möglich wird, sind nach 24 h abgeschlossen.

Brca1

Die Anlagerungskinetik von Brca1 liegt mit den Zeitkonstanten der Anlagerung genau zwischen 53BP1 und Rad51 ($\tau_1 = (16 \pm 4)$), dies festigt die Vermutung einer Funktion in der Signalkaskade als Übermittler zwischen NHEJ und HR. Auch hier ergibt sich ein Plateau ohne Abnahme der IRIF positiven Zellen. Dies ist wiederum darin begründet, dass hier Schäden, welche mit der langsamen HR repariert werden, markiert sind. Es scheinen hier aber auch „residual“ IRIF aufzutreten, wie sie ähnlich auch schon anderweitig gefunden wurden [134, 135].

7.2 Korrelationsmessungen verschiedener Reparaturfaktoren

Korrelationsmessungen von Reparaturproteinen sind eine gute Möglichkeit, um örtlich aufgelöst die Lage verschiedener Proteine zueinander in der Nähe eines DSB Schadensortes zu bestimmen. Ausgehend von sehr bekannten und einfach zugänglichen Schadensmarkern γ H2AX und 53BP1 wurden in dieser Arbeit detaillierte räumliche und zeitliche Analysen an kleineren Focibildnern wie Rad51 und Brca1 durchgeführt.

7.2.1 53BP1 und γ H2AX zeigen nanoskopisch Teilkorrelation

Die Korrelation von γ H2AX und 53BP1 am DSB Schadensort wird schon lange wissenschaftlich untersucht und oft als Standardmethode zur Identifizierung und Charakterisierung von DSB verwendet [136, 137]. Mit Entwicklung der höchstauflösenden Mikroskopie wurden jedoch Hinweise gefunden, dass keine vollständige Korrelation der beiden Schadensmarker am DSB vorhanden ist [17, 104]. Um dies zu verifizieren und zu quantifizieren wurde die Korrelation von γ H2AX und 53BP1 1 h nach Bestrahlung mit 36 MeV Kohlenstoffionen an SNAKE betrachtet. Diese Studie wurde in zwei unabhängigen Experimenten mit je 8 Zellen und insgesamt 27 Tracks durchgeführt. Die Mikroskopie wurde mit einer lateralen Auflösung von 105 nm und einer axialen Auflösung von ~ 300 nm durchgeführt. Die Zelle in Abbildung 7.4 wurde mit 1 Kohlenstoffion bestrahlt. Die Vergrößerung der Ionenspur zeigt deutlich, dass beide Schadensmarker auf einer Skala von $\sim 1\mu\text{m}$ am Schaden korrelieren, jedoch in der nanoskopischen Auflösung unterschiedliche Strukturen bilden. Sowohl γ H2AX als auch 53BP1 bilden innere Nanostrukturen, helle Punkte oder Linien, die sich jedoch unterscheiden. Allerdings findet man trotzdem noch Regionen, in welchen beide Signalintensitäten hoch sind und die beiden Schadensmarker korrelieren. Weitere Beispielzellen finden sich in Abbildung 7.5

Die Quantifizierung wurde mit allen IRIF gemeinsam gepoolt durchgeführt, da eine statistische Analyse der Varianzen (vgl. Abschnitt 6.3) zeigt, dass sich diese weder für die verschiedenen Experimente, noch für verschiedene Zellen signifikant ($p > 0,05$) unterscheiden. Der Unterschied der Proben ist in der Darstellung der korrelierenden Pixel nach Experiment für die Kohlenstoffbestrahlung in Abbildung 7.6 visualisiert.

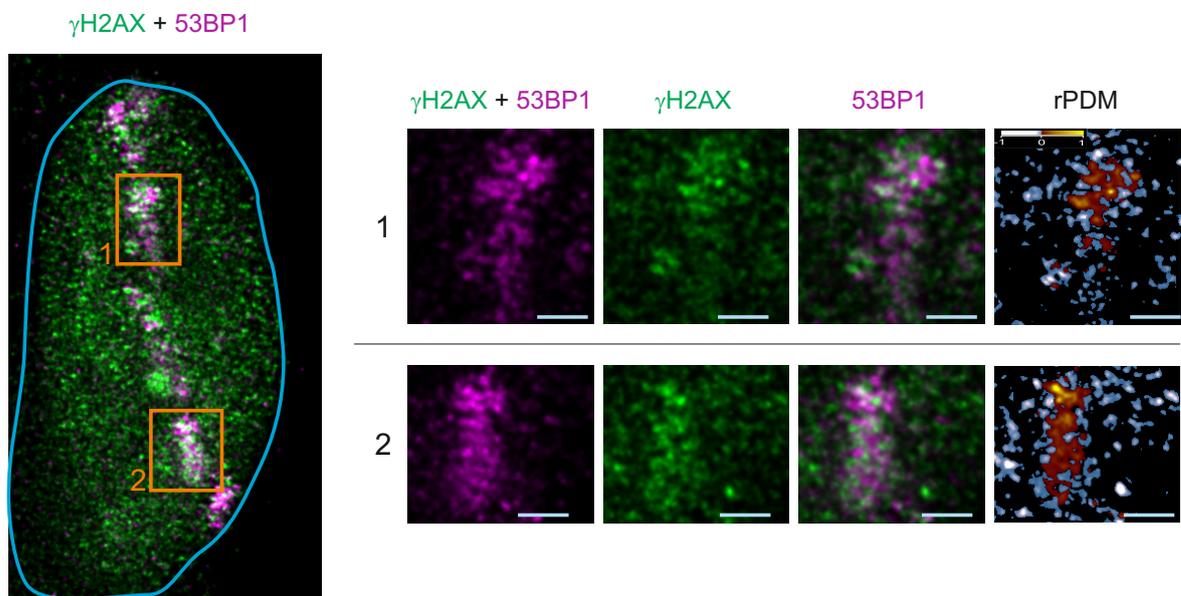


Abbildung 7.4: HeLa Zelle bestrahlt mit einem Kohlenstoffion und fixiert 1 h nach Bestrahlung. In Grün ist γH2AX und in Magenta 53BP1 angefärbt. Die Vergrößerungen 1 und 2 sind außerdem mit rPDM Auswertung dargestellt. Massstab: $1\ \mu\text{m}$

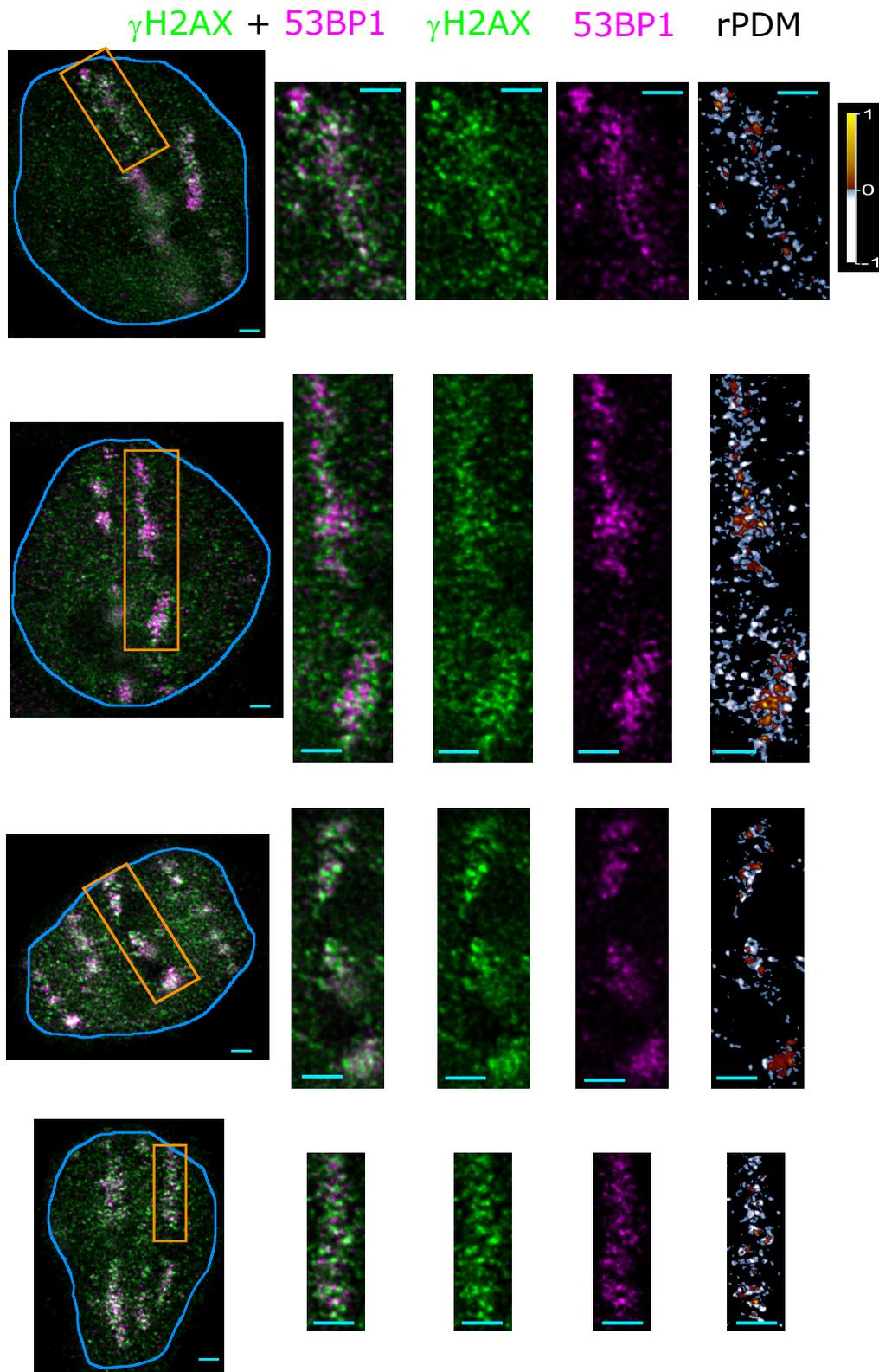
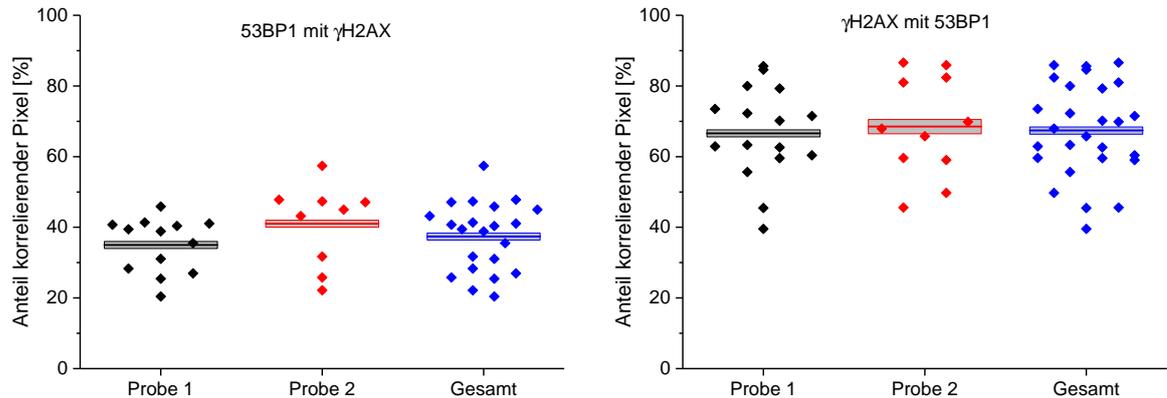


Abbildung 7.5: 4 HeLa Zellen bestrahlt mit Kohlenstoffionen und fixiert 1 h nach Bestrahlung. In Grün ist γ H2AX und in Magenta 53BP1 angefärbt. Die Vergrößerungen sind außerdem mit rPDM Auswertung dargestellt. Massstab: 1 μ m



(a) Anteil der 53BP1 Pixel, die mit γ H2AX Pixeln korrelieren für zwei unabhängige Experimente.

(b) Anteil der γ H2AX Pixel, die mit 53BP1 Pixeln korrelieren für zwei unabhängige Experimente.

Abbildung 7.6: Anteil der korrelierenden Pixel aufgeschlüsselt nach Experiment für Kohlenstoffbestrahlung. Dargestellt sind die einzelnen Tracks als Punkte und die Mittelwerte und Standardabweichungen des Mittelwertes für jede Probe und gepoolt.

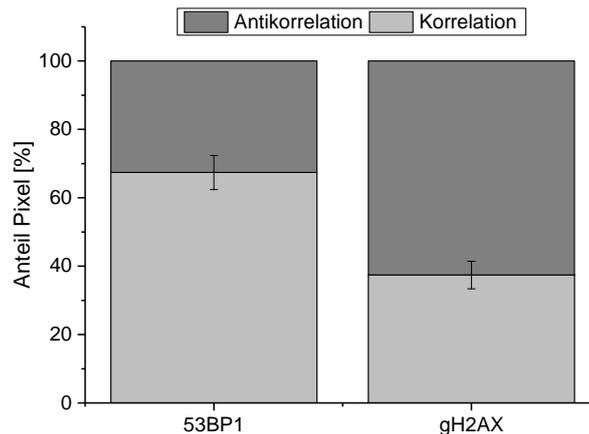


Abbildung 7.7: Anteil an korrelierenden und antikorrelierenden Pixel für γ H2AX (gH2AX) mit 53BP1 nach 1 h für Kohlenstoffbestrahlung. Es wurden ~ 100000 Pixel für 53BP1 und ~ 150000 für γ H2AX ausgewertet.

Es ist festzustellen, dass sich die Mittelwerte kaum unterscheiden. Quantifiziert man die Bereiche der Korrelation so sieht man, dass $(67 \pm 5)\%$ der 53BP1 Pixel mit γ H2AX korrelieren. Die Korrelation für γ H2AX positive Pixel zeigt nur gut die Hälfte des Wertes von 53BP1 an korrelierenden Pixel, nämlich $(37 \pm 4)\%$.

Diskussion der Ergebnisse

Die beiden Schadensmarker γ H2AX und 53BP1 binden 1 h nach Bestrahlung nicht, wie früher mit konventioneller Mikroskopie dargestellt, homogen und vollständig korreliert

an den Schaden, sondern sie bilden innere Nanostrukturen aus, die nicht vollständig miteinander korrelieren. Dies ist in guter Übereinstimmung mit aktuellen Studien, welche IRIF mit sehr guter Auflösung betrachtet haben [17, 104]. Die Quantifizierung der korrelierenden Pixel zeigt, dass für 53BP1 zwei Drittel der Pixel korrelieren. Diese Korrelation zeigt, dass sich 53BP1 in unmittelbarer Nachbarschaft zu γ H2AX anlagert, allerdings nicht direkt daran.

Die Ergebnisse dieser Studie konnten zum einen die Resultate früherer Studien zur unterschiedlichen Anlagerung von 53BP1 und γ H2AX an DSB verifizieren und zusätzlich weiter ausbauen. Zum anderen liefern sie deutliche Hinweise auf unterschiedliche Zuständigkeiten von 53BP1 und γ H2AX während der DSB Erkennung und Reparatur. Diesen Hinweisen wurde in einer weiteren Studie dieser Arbeit, welche in Kapitel 7.3 beschrieben ist, nachgegangen.

Um noch genauere Aussagen über Korrelationen treffen zu können, ist es unerlässlich, mit besserer axialer Auflösung zu mikroskopieren. In diesem Experiment war die z-Auflösung ~ 300 nm, dies kann dazu führen, dass korrelierende Regionen gemessen werden, die aufgrund der Auflösung und nicht aufgrund der tatsächlichen Anlagerung korrelieren. Konkret bedeutet das, dass Fluoreszenzmoleküle der unterschiedlichen Proteine, die übereinander in einem Abstand von weniger als 300 nm liegen, in den Bildern korreliert erscheinen, obwohl sie tatsächlich übereinander liegen. Der geringere Anteil an korrelierenden γ H2AX Pixeln ist darauf zurückzuführen, dass γ H2AX im Zellkern zusätzlich zu den IRIF Signalen immer großflächig Signale zeigt. Diese waren in den analysierten Bildern intensiv und von der Helligkeit vergleichbar mit dem IRIF Signal. Somit wurden zusätzlich Pixel ausgewertet, welche nicht direkt in der Ionenspur liegen. Dieses sogenannte pannukleäre Signal ist für γ H2AX normal und tritt immer auf [39]. γ H2AX eignet sich also nur bedingt zur direkten Charakterisierung von Ionenspuren.

7.2.2 Gegenseitiger Ausschluss von 53BP1 und Rad51 am Schadensort

Ziel dieser Studie war es, Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Aktivität der Reparaturproteine Rad51 und 53BP1 während der DSB Erkennung und Reparatur aufzuklären. Unter anderem soll geklärt werden, ob 53BP1 während der HR in der Nähe des DNA Schadens oder gar direkt an den Schaden clustert. Hierzu wurde die ortsabhängige Korrelation von Rad51 und 53BP1 innerhalb der IRIF untersucht.

Die LET abhängige Korrelationsanalyse von Rad51 mit 53BP1 wurde zum Teil in

Reindl et al. 2015 [44] und Reindl et al. 2017 [138] veröffentlicht und soll im Folgenden nochmals dargestellt werden. Es wurden Proben analysiert, welche mit 21 MeV Protonen ($\text{LET}_p = 2.6 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) oder 36 MeV ($\text{LET}_C = 416 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) Kohlenstoffionen an SNAKE in Ringen (vgl. Abschnitt 5.1.1) bestrahlt wurden. Die dort verwendete Kleinwinkelbestrahlung führt im dichtionisierenden hoch-LET Fall zu sogenannten Tracks mit vielen geclusterten Doppelstrangbrüchen. Diese sind in der x-y-Ebene ausgerichtet und somit als Spuren in den Bildern sichtbar. Im lockerionisierenden niedrig-LET Fall führt sie zu einer zufälligen Verteilung von einzelnen Doppelstrangbrüchen in der Zelle. Die bestrahlte Dosis von ~ 2 Gy entspricht im Mittel 3 Ionendurchgängen pro Zellkern für Kohlenstoff und ~ 250 für Protonen. Zusätzlich wurden Zellen analysiert, welche mit 1,2 Gy 2,3 MeV α -Teilchen ($\text{LET}_\alpha = 166 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) an der α -Quelle in Neubiberg (vgl. Kapitel 5.2) bestrahlt wurden. Hier sind die im Mittel 6,6 Ionenspuren pro Zellkern senkrecht zur Zellebene ausgerichtet. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit nach Bestrahlung von 1 h fixiert und für 53BP1 und Rad51 gefärbt. Abbildung 7.8 zeigt exemplarisch je eine Zelle für Kohlenstoff-, Protonen- und α -Bestrahlung.

Die Bestrahlung mit 1,2 Gy α -Teilchen (Abb. 7.8(a)) zeigt im Zellkern (blaue Linie) sechs 53BP1 IRIF mit je einem Rad51 IRIF, da die Ionenspuren in die Bildebene hineingehen. Die Vergrößerung von vier der sechs einzelnen Foci zeigt, dass 53BP1 großflächige Verteilungen zeigt, welche intensitätsmoduliert sind. Das heißt, es gibt Bereiche mit hoher Signalintensität und innerhalb der IRIF auch Bereiche mit geringerer Signalintensität. Die Rad51 Foci hingegen bilden kleinere, nahezu runde und homogenere Strukturen. Die Rad51 IRIF liegen innerhalb der größeren 53BP1 IRIF, allerdings immer in den Bereichen mit geringer Signalintensität von 53BP1. Um diese gegenseitige örtliche Lage und somit die Korrelation quantifizieren zu können, wurden die IRIF mit dem rPDM, wie in Kapitel 6.1.2 beschrieben ausgewertet. Hier zeigt sich dieses Verhalten deutlich, da hauptsächlich antikorrelierende blaue und weiße Regionen sichtbar sind. Trotzdem aber gibt es noch Regionen der Korrelation (rot und gelb) in der Mitte der IRIF. Weitere beispielhafte Zellen sind in Abbildung 7.9 dargestellt. Eine pixelweise Quantifizierung von 51 53BP1 IRIF (38121 Pixel) aus zwei unabhängigen Experimenten führt zu einem Korrelationswert von Rad51 mit 53BP1 von $(48 \pm 7) \%$ und somit weder zu Antikorrelation noch zu Korrelation. Die IRIF wurden gepoolt, da die Varianzanalyse (vgl. Abschnitt 6.3) keine signifikanten Unterschiede zeigt ($p > 0,05$). Man nutzt die Korrelation bezogen auf Rad51, da die Rad51 IRIF sehr viel kleiner sind und den genaueren Schadensort bezeichnen. Würde man die 53BP1 Regionen als Refe-

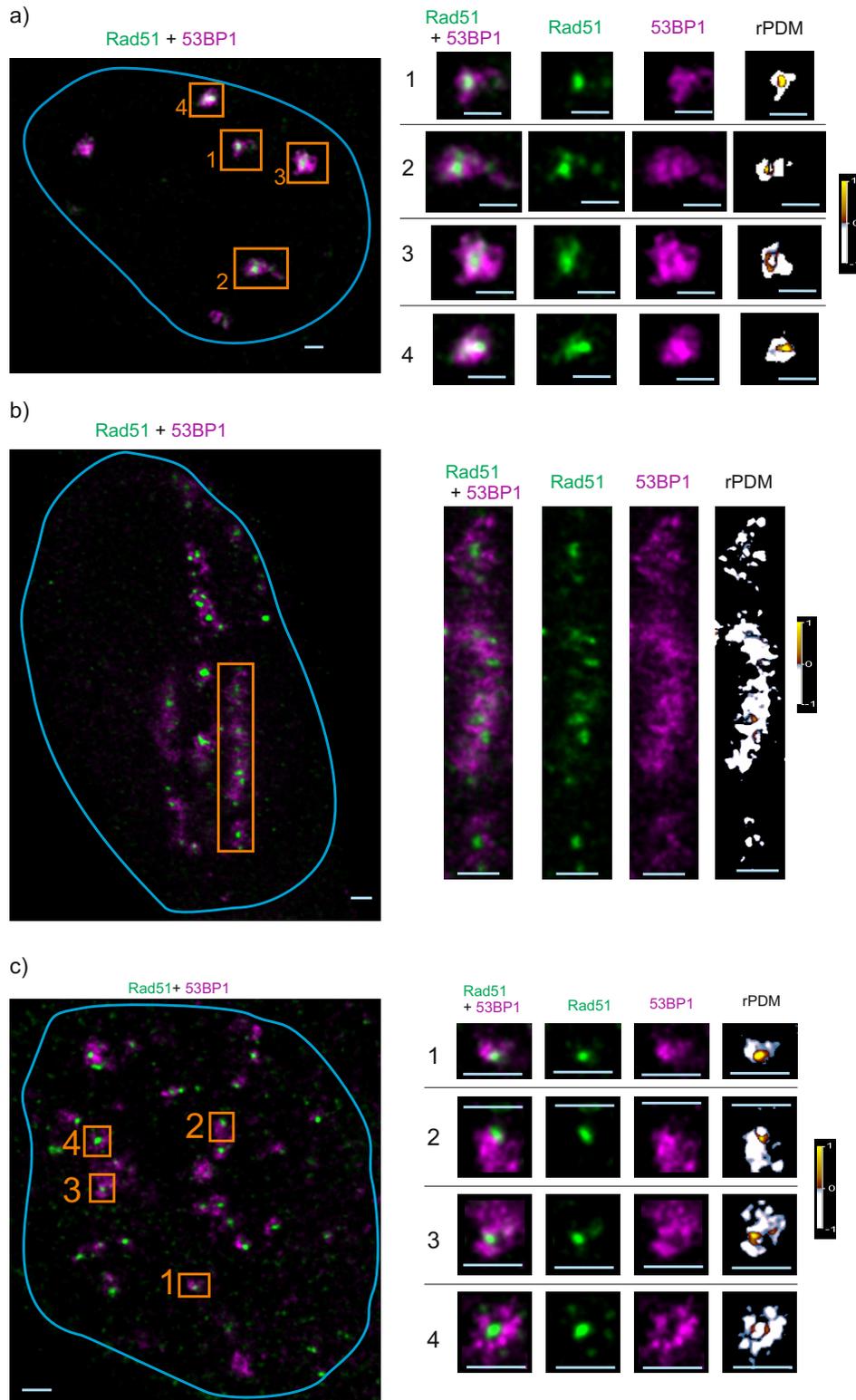


Abbildung 7.8: Korrelationsanalyse für Rad51 und 53BP1 1h nach Bestrahlung mit α -Teilchen (a), Kohlenstoffionen (b) und Protonen (c). Massstab: $1 \mu\text{m}$

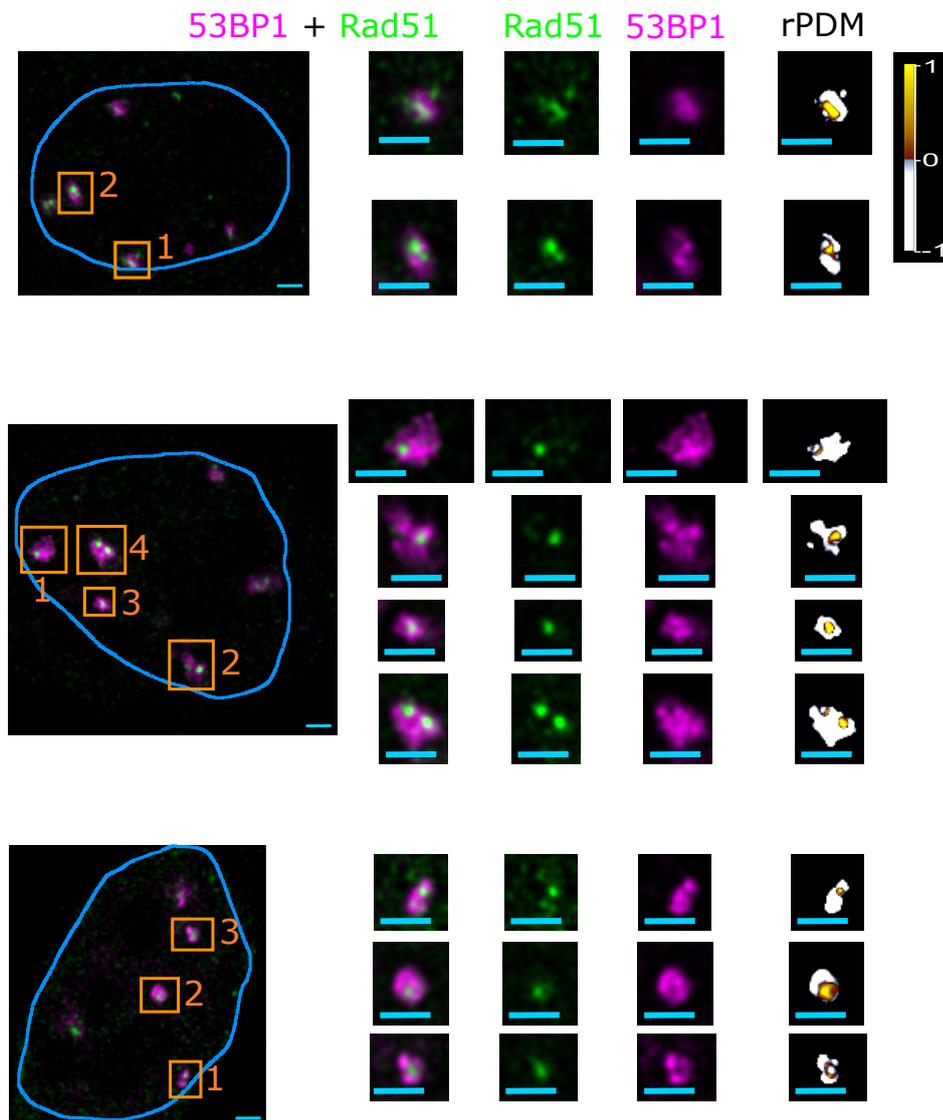


Abbildung 7.9: Zellen bestrahlt mit α -Teilchen und fixiert 1 h nach Bestrahlung. In grün ist Rad51 und in magenta 53BP1 gefärbt. Massstab: $1\ \mu\text{m}$

renz nehmen, dann würde man immer einen Großteil antikorrelierter Regionen, alleine durch die Größe der 53BP1 IRIF finden.

Die gemeinsame Färbung von Rad51 mit 53BP1 für eine mit Kohlenstoffionen bestrahlte Zelle ($D_{\text{mittel}} = 2,4\ \text{Gy}$) ist dargestellt in Abbildung 7.8(b). Das 53BP1 Signal zeigt die Spuren von 3 Ionen. Innerhalb der 53BP1 IRIF finden sich mehrere Rad51 IRIF. Die Vergrößerung eines Tracks zeigt, dass die 53BP1 IRIF eine Nanostruktur zeigen, mit punkt- oder linienförmigen Intensitätsmaxima und dazwischen liegenden Intensitätsminima. Die Rad51 IRIF bilden einzelne, runde, helle und homogene Struk-

turen, welche aus dem Rad51 Hintergrundsignal auftauchen. Wiederum befinden sich diese in den Intensitätsminima der 53BP1 IRIF, was sich auch in der rPDM Analyse durch nahezu ausschließlich blaue und weiße, antikorrelierende Regionen zeigt. Zusätzliche Beispielzellen finden sich in Abbildung 7.10. Die quantitative, pixelweise Analyse von 30 Tracks aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 3-10 Rad51 IRIF (105154 Pixel) ergibt $(83 \pm 5) \%$ antikorrelierender Rad51 Pixel [44]. Die IRIF wurden wiederum, aufgrund der Varianzanalyse (vgl. Abschnitt 6.3) gepoolt.

Die Bestrahlung mit 20,8 MeV Protonen (2,1 Gy) führt zu einer statistischen Verteilung der DSB innerhalb eines Zellkerns. Die dargestellte Zelle wurde von ~ 500 Ionen getroffen, wobei die Anzahl an zu erwartenden DSB pro Proton bei 0,2 liegt [60], was zu ~ 100 DSB in der Zelle und somit zu genauso vielen IRIF führt. In diesem Bild sind nicht alle DSB sichtbar, da nur eine 250 nm dicke Ebene des $\sim 5 \mu\text{m}$ dicken Zellkerns abgebildet ist. Ein IRIF erstreckt sich in ca. 3 Ebenen, weswegen man nur ~ 15 IRIF pro Ebene sehen kann (vgl. Abb. 7.8(c)). Hier sieht man, dass in jedem 53BP1 IRIF 1 oder, wenn die IRIF größer sind, maximal 2 Rad51 IRIF sichtbar sind. Die Vergrößerung einzelner IRIF zeigt, dass 53BP1 innerhalb der IRIF Nanostrukturen mit linien- oder punktförmigen Intensitätsmaxima und dazwischenliegenden Intensitätsminima zeigt. Die Rad51 IRIF bilden runde, homogene Intensitätsverteilungen ohne innere Nanostruktur. Die Rad51 IRIF sind genau in den Intensitätsminima von 53BP1 gelegen, wobei die pixelweise, gepoolte Quantifizierung von 9 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 10-20 Rad51 IRIF (109453 Pixel) zeigt, dass $(89 \pm 3) \%$ der Rad51 Pixel mit 53BP1 antikorrelieren [44]. Zusätzliche Beispielzellen sind in Abbildung 7.11 dargestellt.

Diskussion der Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde die lokale Korrelation der Reparaturfaktoren Rad51 und 53BP1 1 h nach Bestrahlung mit unterschiedlichem LET untersucht. Die mikroskopische Schadensverteilung im Zellkern ist höchst unterschiedlich. Für hoch-LET α - und Kohlenstoffbestrahlung sind die DSB um den Ionendurchgang in Tracks lokalisiert, wohingegen für niedrig-LET Protonenbestrahlung die Schadensverteilung in einzelnen, statistisch verteilten DSB innerhalb des Zellkerns manifestiert ist. Die nanoskopische Analyse hingegen zeigt gleiche Merkmale bezüglich der Korrelation am Schaden sowohl für hoch-LET Kohlenstoff- als auch für niedrig-LET Protonenbestrahlung. Dies zeigt

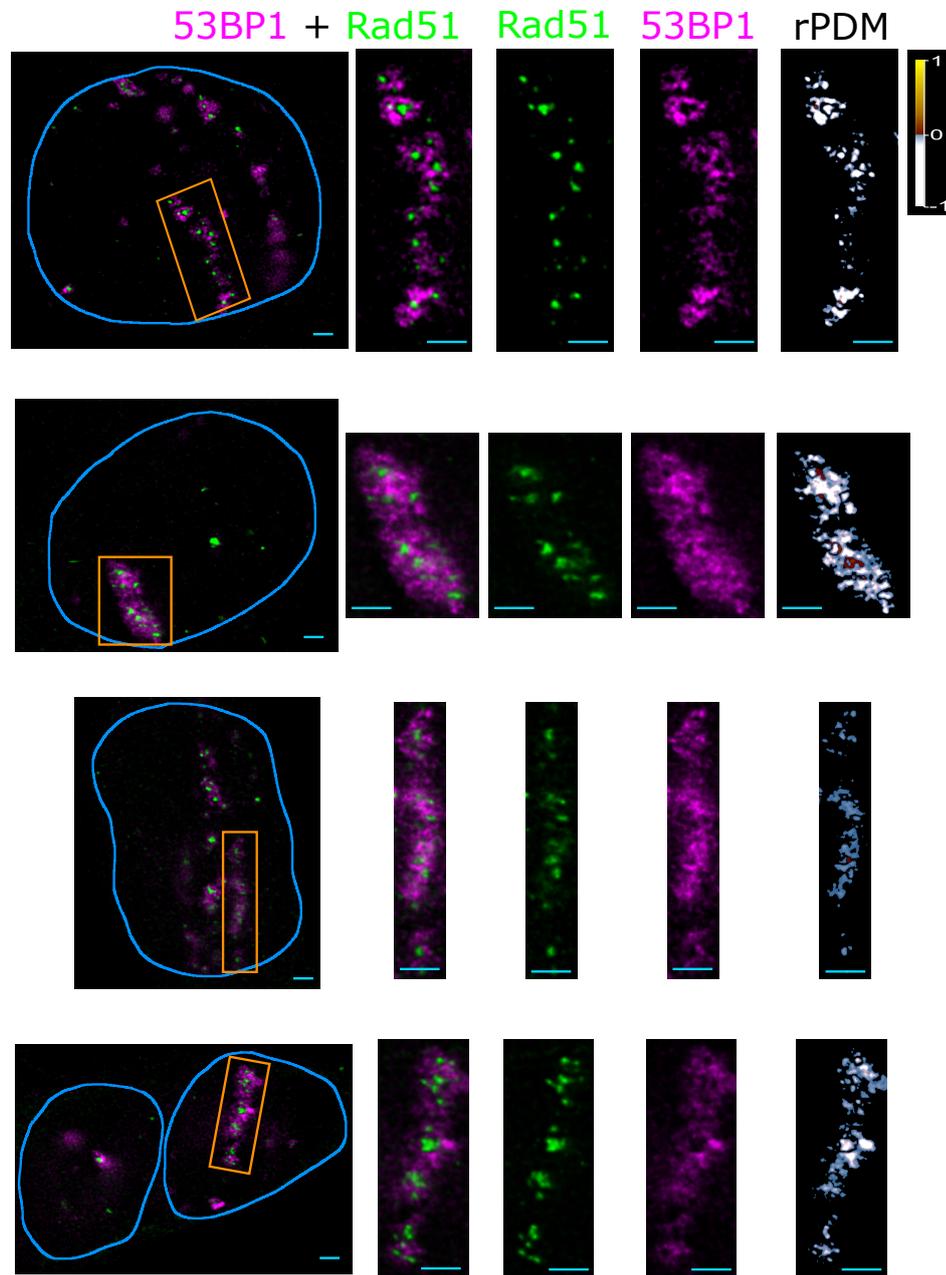


Abbildung 7.10: Zellen bestrahlt mit Kohlenstoffionen und fixiert 1 h nach Bestrahlung. In grün ist Rad51 und in magenta 53BP1 gefärbt. Massstab: $1\ \mu\text{m}$

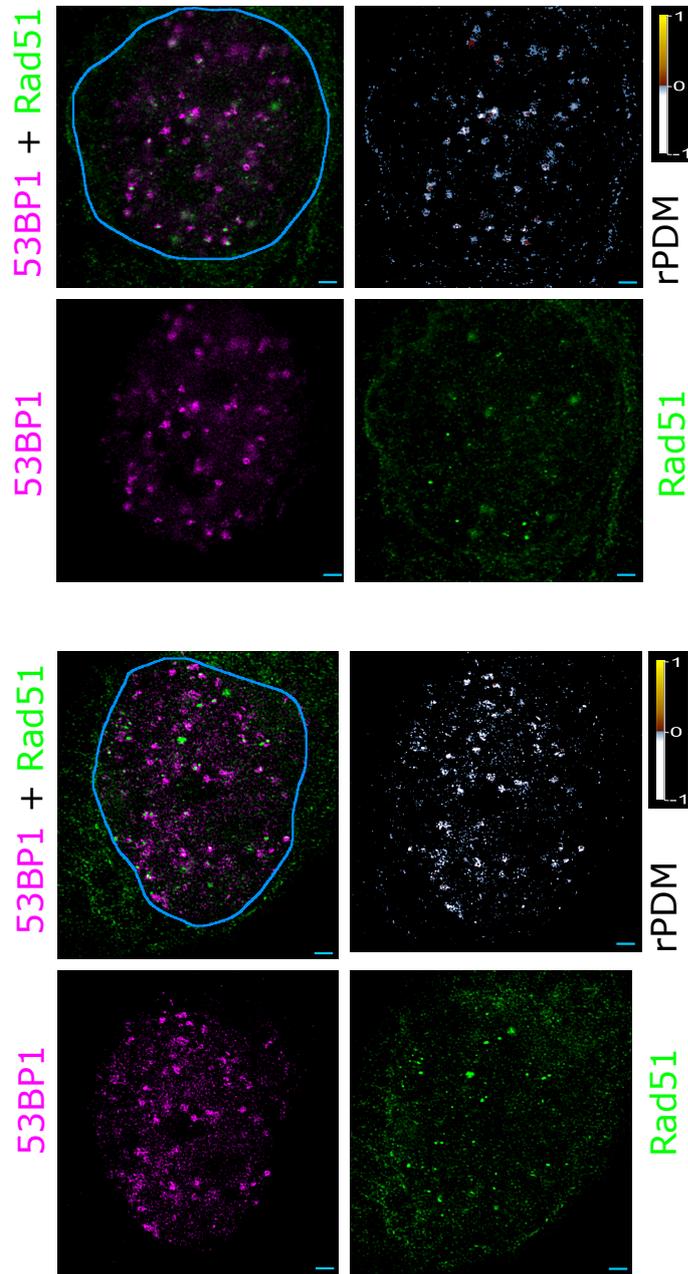


Abbildung 7.11: Zellen bestrahlt mit Protonen und fixiert 1 h nach Bestrahlung. In grün ist Rad51 und in magenta 53BP1 gefärbt. Massstab: $1\ \mu\text{m}$

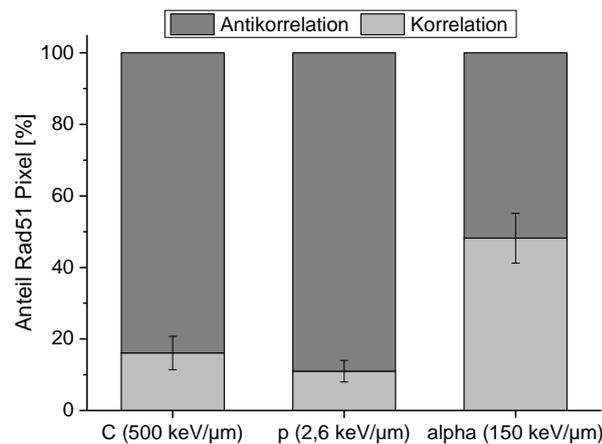
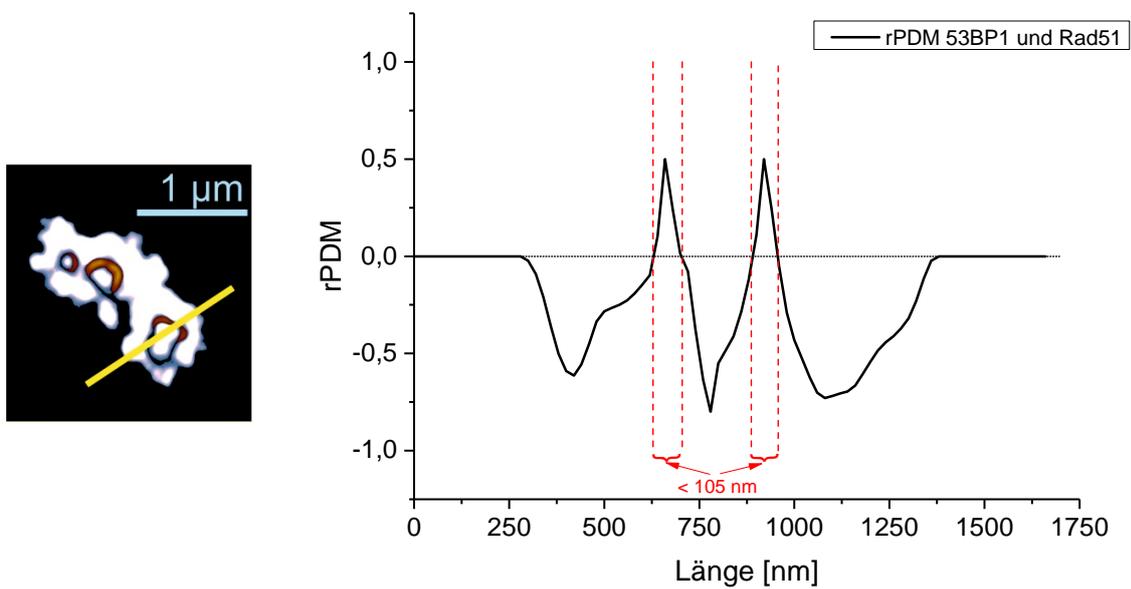


Abbildung 7.12: Anteil an korrelierenden und antikorrelierenden Pixel für Rad51 mit 53BP1 nach 1h für Kohlenstoff-, α - und Protonenbestrahlung.

auch die pixelweise Quantifizierung, welche in Abbildung 7.12 zusammengefasst ist, die den gleichen Anteil antikorrelierender Pixel für Kohlenstoff- und Protonenbestrahlung zeigt. Der Anteil korrelierender Pixel von 11 %-17 % ist immer am Rand der Rad51 IRIF zu finden und ist schmaler als die Auflösung.

In Abbildung 7.13 ist dies beispielhaft visualisiert, indem der rPDM entlang der gelben Linie des dargestellten IRIF geplottet wurde. Außerhalb des IRIF ist der rPDM definitionsgemäß 0. Es folgen Bereiche mit Anitkorrelation. dies sind die Bereiche, in denen nur 53BP1 Signal vorhanden ist. Analog dazu findet sich in der Mitte der antikorrelierte Bereich mit ausschließlich Rad51 Signal. Dazwischen existieren zwei Bereiche mit Korrelation, welche jeweils schmaler sind als 80 nm, was etwas kleiner ist als die gemessene Auflösung von 105 nm. Dies bedeutet, dass diese Korrelation hauptsächlich durch die Auflösung bedingt ist. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Proteine nicht doch an unterschiedlichen Orten liegen, man dies aber nicht auflösen kann.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass sich Rad51 und 53BP1 unabhängig vom LET direkt am Schaden gegenseitig ausschließen [44]. Aus den gewonnenen Daten kann außerdem einerseits geschlossen werden, dass 53BP1 bei der homologen Rekombination und insbesondere bei der Invasion des gebrochenen Strangs in das Schwesterchromatid direkt keine Rolle spielt. Andererseits verschwindet 53BP1 währenddessen nicht vollständig aus der Umgebung des Schadens, sondern nur vom direkten Schadensort. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit anderen aktuellen Studien [18, 41–43].



(a) rPDM Bild eines 53BP1-Rad51-IRIF 1 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen.

(b) rPDM Linienplot entlang der gelben Linie aus a)

Abbildung 7.13: Visualisierung der korrelierenden Bereiche 53BP1-Rad51-IRIF. Die korrelierenden Bereiche entlang der gelben Linie sind kleiner als 80 nm und somit kleiner als die mikroskopische Auflösung.

Zusammengenommen deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass 53BP1 als Stabilisator der räumlichen DNA Strukturen während der homologen Rekombination wirkt, um den aktiv beteiligten Reparaturproteinen den Zugang und die Wirkung am Schaden zu ermöglichen. Für die senkrechte α -Bestrahlung sind 1 h nach Bestrahlung ~ 3 -4 mal so viele ($(48 \pm 7) \%$) korrelierende Pixel als für die schräge Bestrahlung mit Protonen und Kohlenstoffionen sichtbar. Dieser Unterschied erweist sich als signifikant ($p < 0,01$). Um zu klären, ob dieser Unterschied allgemein für die gesamte Dauer der Reparatur vorhanden ist, ob bei der Reparatur von α -induzierten Schäden temporär andere Mechanismen wirken oder ob er ein Resultat der schlechteren axialen Auflösung, die vor allem für die Mikroskopie der senkrechten α -Teilchen Tracks eine Rolle spielt, wurden in der folgenden Studie Korrelationszeitreihen von α und Kohlenstoff bestrahlten Zellen gemessen.

7.2.3 Zeitlicher Verlauf der Korrelation von Rad51 und 53BP1

In dieser Studie war das Ziel, den zeitlichen Verlauf der zuvor für 1 h aufgedeckten Unterschiede in der Aktivität der Reparaturfaktoren Rad51 und 53BP1 während der DSB Reparatur zu bestimmen. Außerdem soll geklärt werden, ob der LET einen Einfluss auf den Verlauf dieser Kinetiken hat. Hierzu wurden Korrelationskinetiken mit fixierten Zellen in einem Zeitraum von 13 min bis 24 h für α -Bestrahlung und 0 min bis 12 h für Kohlenstoffionen in je zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die gemessenen Korrelationskinetiken sind in Abbildung 7.14 visualisiert. Die Auswertung wurde an je 100-200 Rad51 IRIF für Kohlenstoff und je ~ 50 IRIF für α -Teilchen durchgeführt. Es wurden die Anteile der korrelierenden Pixel betrachtet, wobei wieder die IRIF (~ 10 -50 pro Zeitpunkt) je zweier Experimente, aufgrund der Varianzanalyse, welche keinen Unterschied der Varianzen zeigt, gepoolt wurden. Für die α -Bestrahlung beginnt eine sichtbare Anlagerung von Rad51 13 min nach Bestrahlung mit einer Korrelation gegenüber 53BP1 von $(39 \pm 8) \%$ und steigt dann bis 45 min nach Bestrahlung bis zu einer Korrelation von $(52 \pm 5) \%$. Zu späteren Reparaturzeiten ist ein signifikanter Abfall ($p < 0,01$) der Korrelation auf $(20 \pm 8) \%$ nach 3 h zu verzeichnen. Danach erfolgt ein langsamer Anstieg auf $(48 \pm 5) \%$ für 15 h und 18 h nach Bestrahlung. 24 h nach Bestrahlung scheint wieder ein Abfall zu passieren, welcher aber nicht signifikant ist. Für Kohlenstoffbestrahlung ist der zeitliche Verlauf etwas anders. Hier beginnt die Korrelationsmessung 0 min nach Bestrahlung, was als Kontrolle anzusehen ist, da hier noch

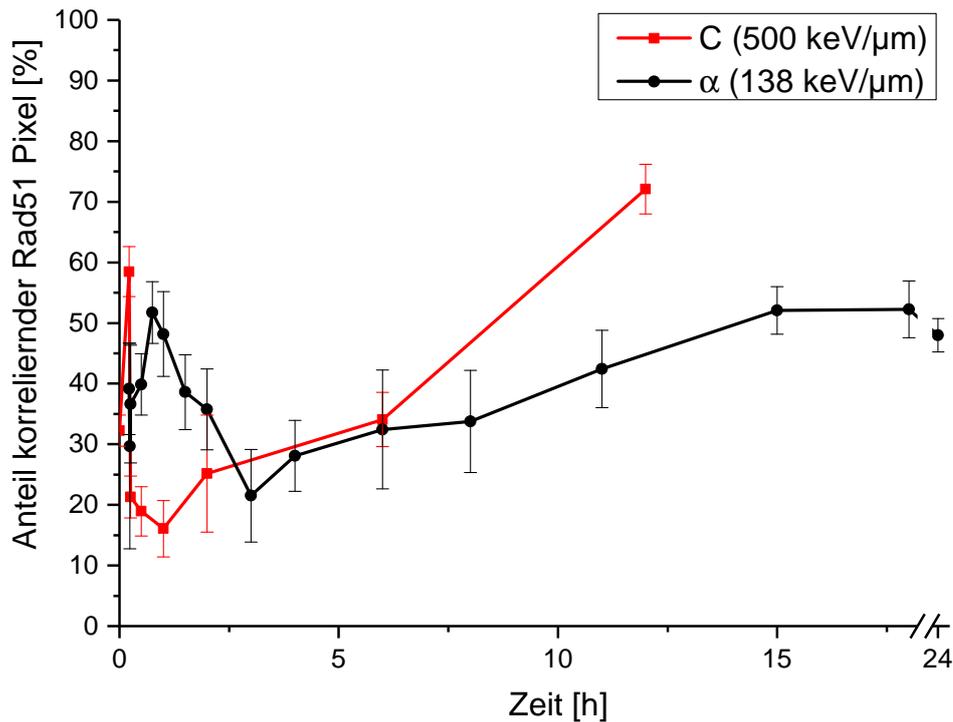


Abbildung 7.14: Zeitlicher Verlauf der Korrelationskinetik für Rad51 mit 53BP1 für α -Bestrahlung (schwarz) und Kohlenstoffbestrahlung (rot) über 24 h.

keine eindeutig strahleninduzierten Rad51 Foci sichtbar sind. Die auftretende Korrelation kommt vom in der Zelle natürlich vorhandenen Rad51 Signal. Auch hier beginnt die Rad51 Akkumulation ~ 13 min nach Bestrahlung. Hier sieht man ein Maximum der Korrelation von (58 ± 4) %. Danach erfolgt ein Abfall in der Korrelation bis 1 h auf (17 ± 5) % und danach ein stetiger Anstieg bis 12 h nach Bestrahlung bis zu einer Korrelation von (72 ± 5) %. Zusätzlich lässt sich für alle Strahlenarten die Beobachtung machen, dass 53BP1 initial im gesamten Schadensbereich, also auch im Inneren bindet und erst mit der Zeit vom direkten Schadensort ablagert.

Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, dass sich Rad51 und 53BP1 zumindest in der Kernreparaturzeit, ~ 15 min bis ~ 6 h für Kohlenstoffionen und ~ 1 h bis ~ 11 h für α -Teilchen gegenseitig am Schaden ausschließen.

Diskussion der Ergebnisse

Senkrechte α -Teilchen ($\text{LET} = 138 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) Bestrahlung zeigt eine sehr unterschiedliche Kinetik der Korrelation von Rad51 mit 53BP1 als die Kohlenstoffbestrahlung. Die Kinetik scheint langsamer vonstatten zu gehen. Das Minimum der Korrelation wird erst

	α -Teilchen	Kohlenstoff	Faktor $\frac{\alpha}{C}$
Initiales Maximum	45 min	13 min	3,4
Minimum	3 h	1 h	3

Tabelle 7.2: Zeiten des Korrelationsmaximum und -minimum für α -Teilchen und Kohlenstoff Bestrahlung.

2 h später erreicht als bei der Kohlenstoffbestrahlung, ist jedoch genauso ausgeprägt. Der Anstieg zu langen Zeiten ist bei Kohlenstoff auch sehr viel schneller und zusätzlich noch ausgeprägter. Die Reparatur zu frühen Zeiten folgt einer ähnlichen, wenn auch langsameren Ausprägung. Es lässt sich sagen, dass zwischen den Zeitpunkten der Maxima und Minima der Korrelation zwischen Kohlenstoff und α -Bestrahlung immer ein Faktor von ~ 3 liegt, wie in Tabelle 7.2 dargestellt.

Die andere Korrelationskinetik deutet darauf hin, dass α -Teilchen induzierte Schäden langsamer repariert werden als Kohlenstoff induzierte Schäden. Dies könnte den erhöhten RBE für z.B. Zellüberleben gegenüber hoch-LET Kohlenstoffionen aber auch niedrig-LET Protonen [139] erklären. Bei einem LET von $\sim 100 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ ist die Dichte der Ionisationen genau passend, um am effektivsten DSB zu erzeugen [10]. Eine weitere Erhöhung des LET erzeugt keine weiteren DSB, was dazu führt, dass nicht mehr Schaden induziert wird und somit auch der RBE sinkt („overkill“ Effekt)[140]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zusätzlich darauf hin, dass die Reparatur der Schäden für den sehr hohen LET schneller und somit einfacher vonstatten geht. Es ist möglich, dass für den hohen LET die Enden radikal abgeschnitten werden und herausgebrochene Stücke nicht mehr eingefügt werden. Dies würde die Reparatur schneller machen. Diese Ergebnisse sollten aber zur Verifikation auch für die α -Bestrahlung am Schrägbestrahlungsaufbau am SNAKE wiederholt werden, da die Durchführung an unterschiedlichen Aufbauten eine vollständige Vergleichbarkeit aus zwei Gründen schwierig macht:

1. Die Mikroskopierichtung gegenüber dem Ionendurchgang ist unterschiedlich, senkrecht zur Strahlrichtung für Schrägbestrahlung und parallel zur Strahlrichtung für die senkrechte α -Bestrahlung. Zusätzliche Korrelationen können durch die schlechte axiale Auflösung bei der senkrechten Bestrahlung erzeugt werden.
2. Die Bestrahlung an der α -Quelle dauert 120-mal so lange wie die Kohlenstoffbestrahlung. Aus diesem Grund wird die Bestrahlung bei 4°C durchgeführt, was zu einem Stillstand der Reparaturmechanismen während der Bestrahlung führen

soll. Dies kann im Nachhinein auch dazu führen, dass eine Verlangsamung der initialen Schadenserkennung stattfindet.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie ist ein nahezu vollständiger gegenseitiger, lokaler Ausschluss von Rad51 und 53BP1 am direkten Schadensort unabhängig vom LET während der Kernreparaturzeit der homologen Rekombination. Die hier gewonnenen Ergebnisse sind in vollständiger Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien zur DNA Reparatur. Es werden den Proteinen Rad51 und 53BP1 sowohl durch die hier angewandte direkte Beobachtung der Korrelation als auch durch Studien, die Formierung von Rad51 IRIF nach dem Ausschalten von 53BP1 (engl. knock-down) beobachten [141], unterschiedliche und zum Teil gegensätzliche Rollen während der Reparatur zugewiesen. 53BP1 ist ein Kernfaktor des NHEJ und wirkt als Stabilisator der Bruchregion in der HR [18, 41–43] und Rad51 ist ein wichtiger Faktor der Stranginvasion während der HR [49]. Außerdem bestätigen die hier gewonnenen Daten das von Bekker-Jensen et al. [37] aufgestellte Modell, dass 53BP1 zu dem den DSB großräumig umgebenden „flanking chromatin“ zählt. Dies ist lokal zu dem Einzelstrangenden bindenden „ssDNA compartment“ abgegrenzt, wofür Rad51 ein Repräsentant ist.

7.2.4 Brca1 als Mediator zwischen Rad51 und 53BP1

Das Ziel der Untersuchung der Anlagerung von Brca1 in Zusammenhang mit Rad51 war, die Mechanismen, welche der zeitlichen Änderung in der Korrelation von Rad51 und 53BP1 zugrunde liegen, näher aufzuklären. Als aussichtsreicher Kandidat wurde Brca1 identifiziert, da es als verantwortlich für das Lösen von 53BP1 vom direkten Schadensort identifiziert wurde (vgl. Kapitel 2.4.4). Brca1 wirkt dadurch als Mediator zwischen NHEJ und HR [45] und könnte somit durch eine andere Korrelationskinetik die Entscheidung zwischen den beiden Reparaturwegen widerspiegeln. Hier wurden die Korrelationen von Rad51 mit Brca1, welche im Rahmen der Masterarbeit von B. Schwarz [48] gemessen wurden, mit Korrelationen von 53BP1 mit Rad51 verglichen. Die Messungen wurden nur an α -Teilchen bestrahlten Zellen durchgeführt, um die Auswirkungen unterschiedlicher Bestrahlungsaufbauten zu umgehen. Der zeitliche Verlauf der Korrelation von Rad51 und Brca1 ist in Abbildung 7.15 in rot dargestellt. Auch hier wurden die IRIF je 10 Zellen mit jeweils 3-6 IRIF pro Zeitpunkt gepoolt. Zum Vergleich wurde die Korrelationskinetik von 53BP1 und Rad51 in schwarz dazu eingezeichnet. Es fällt auf, dass über den ganzen Reparaturverlauf von 24 h Rad51 mit Brca1 eine

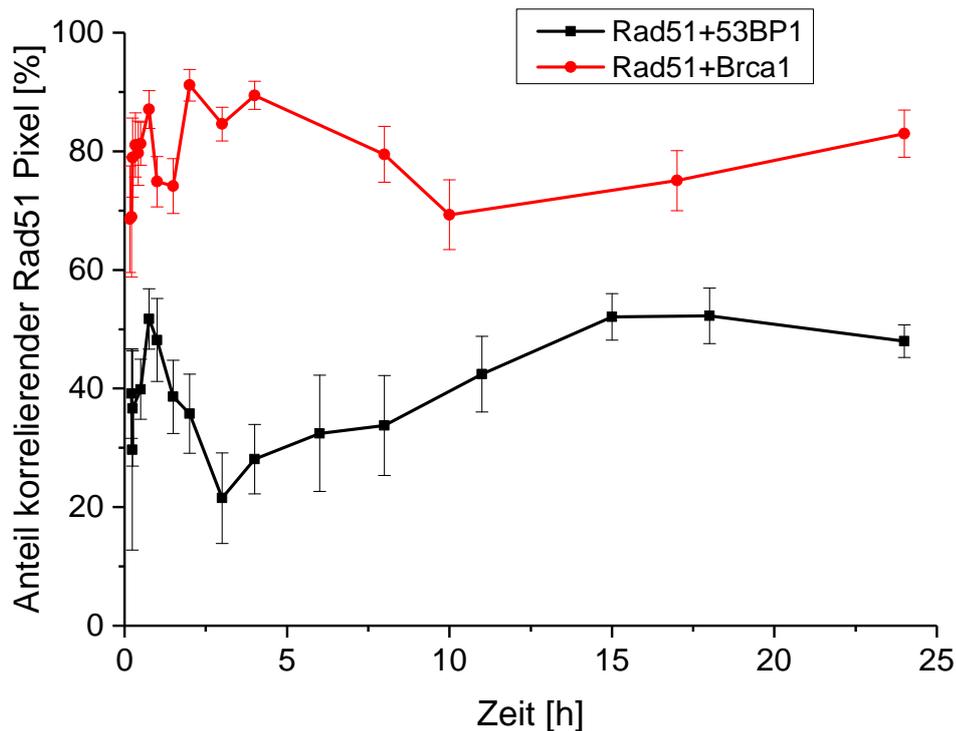


Abbildung 7.15: Zeitlicher Verlauf der Korrelationskinetik für Rad51 mit 53BP1 und Rad51 mit Brca1 in linearer (a) und logarithmischer (b) Darstellung.

signifikant höhere ($p < 0,05$) Korrelation aufweist als Rad51 mit 53BP1. 10 min nach Bestrahlung zeigen Rad51 und Brca1 eine Korrelation von $(69 \pm 10) \%$ gefolgt von einem signifikanten Anstieg auf $(87 \pm 3) \%$ nach 45 min. Zwischen 1 h und 1,5 h nach Bestrahlung zeigt sich ein signifikantes Minimum der Korrelation von $(75 \pm 5) \%$, gefolgt von einem Anstieg auf $(91 \pm 3) \%$ nach 2 h. Der langsame Abfall bis 10 h nach Bestrahlung auf $(69 \pm 6) \%$ wird wieder gefolgt von einem leichten Anstieg der Korrelation bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 24 h.

Diskussion der Ergebnisse

Die beobachtete Korrelation von Brca1 mit Rad51 bestätigt die Ergebnisse früherer Studien, welche Brca1 als verantwortlich für den Umschaltprozess zwischen NHEJ und HR bei der DSB Reparatur sehen [45, 47]. Zunächst ist festzustellen, dass Brca1 und Rad51 im allgemeinen Korrelation zeigen. Weiterhin ist der zeitliche Verlauf der Korrelation im Verhältnis zur Korrelation von 53BP1 mit Rad51 interessant. Zu kurzen Reparaturzeiten zeigen beide Korrelationen signifikante Anstiege. Dies lässt sich interpretieren als Mediationsschritt, bei dem, ausgelöst durch Brca1, die Verdrängung von 53BP1 vom Schaden und die Bindung von Rad51 ermöglicht wird. Während dieser

Zeit gibt es örtliche Überlagerungen, da eine räumliche Umstrukturierung am Schaden stattfindet. Ist dieser Schritt abgeschlossen, fallen beide Korrelationen wieder ab und für 53BP1 und Rad51 ist der Ausschluss dann nahezu komplett. Dies hält an, bis bei fertig reparierten Zellen eine erneute Umstrukturierung und Ablösung von Proteinen erfolgt, was wiederum zu verstärkter Korrelation führt. Im Gegensatz dazu findet man bei Brca1 und Rad51 nach 2 h ein weiteres Maximum der Korrelation, was auf eine zusätzliche kooperative Aufgabe der beiden Proteine am Schaden bestätigt, wie sie zum Beispiel von Cousineau et al. [142] beschrieben wurde. Mit Fortschreiten der Reparatur nimmt die Kooperation an den Schäden und somit die Korrelation wieder ab und geht zu späten Zeiten in die Korrelation durch die fertige Reparatur und den Abbau der Proteine über.

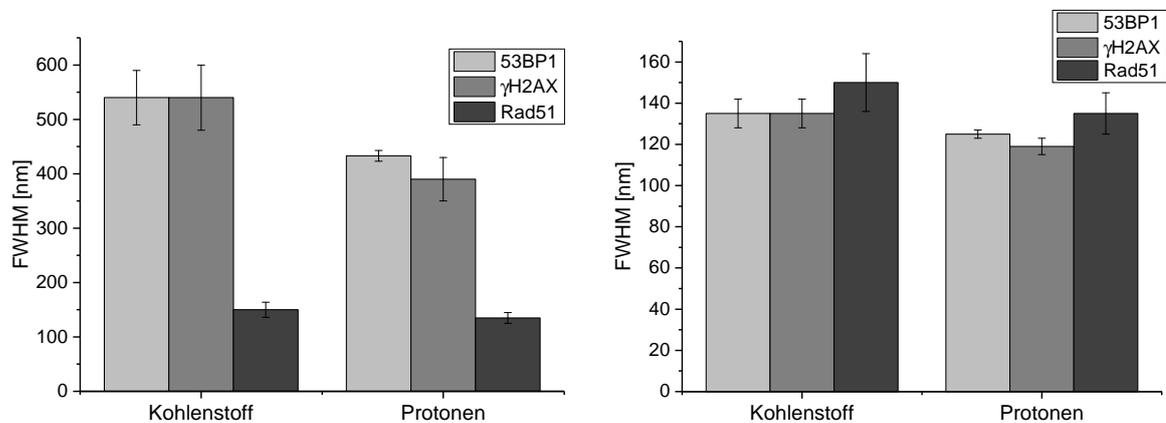
7.3 Nanostruktur von ioneninduzierten Foci bildet Chromatinstruktur ab

Die Korrelationsanalyse ist nicht die einzige Möglichkeit um durch höchstauflösende Mikroskopie einen Zugang zu den grundlegenden Mechanismen der DSB Reparatur zu finden, sondern auch die Messung spezifischer Größen können Aufschluss darüber geben. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden in Reindl et al. 2017 [138] veröffentlicht. Ausgehend vom Auffinden einer Nanostruktur in den IRIF von γ H2AX und 53BP1, nicht aber Rad51, wurden deren Größen als weitere Charakteristik der Schadensreparatur verwendet. Dazu wurden unter Verwendung der Autokorrelationsfunktion die Größenskalen in einzelnen IRIF wie in Kapitel 6.2 beschrieben für Kohlenstoff- und Protonenbestrahlung (je zwei unabhängige Experimente mit gepoolten 20-50 IRIF) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.3 zusammengefasst. Abbildung 7.16(a) zeigt die Größen der IRIF für 53BP1, Rad51 und γ H2AX. Sowohl für Kohlenstoff- als auch für Protonenbestrahlung sind die Größen von γ H2AX und 53BP1 mit (540 ± 60) nm und (540 ± 50) nm für Kohlenstoffbestrahlung sowie (390 ± 40) nm und (433 ± 10) nm für Protonenbestrahlung im Rahmen der Fehler gleich. Jedoch sind die Größen für Kohlenstoffbestrahlung nach Abschnitt 6.3 signifikant größer als für Protonenbestrahlung ($p < 0.05$). Die Größe von Rad51 ist um ungefähr den Faktor 3 kleiner, als die Größen der anderen beiden Schadensmarker, jedoch ist diese unabhängig vom LET bei (143 ± 13) nm. Eine Nanostruktur ist in den Rad51 IRIF nicht sichtbar und messbar. Für 53BP1 und γ H2AX sind die Nanostrukturgrößen zusammen mit der Rad51 Fo-

kusgröße in Abbildung 7.16(b) dargestellt. Die Nanostrukturgrößen sind sowohl vom analysierten Protein unabhängig, als auch vom LET der Teilchen und entsprechen mit (129 ± 7) nm ziemlich genau der Rad51 IRIF Größe.

Protein	Kohlenstoff		
	IRIF Größe in nm	Nanostrukturgröße in nm	# IRIF
53BP1	540 ± 50	135 ± 7	40
γ H2AX	540 ± 60	135 ± 7	20
Rad51	150 ± 14		50
Protein	Protonen		
	IRIF Größe in nm	Nanostrukturgröße in nm	# IRIF
53BP1	433 ± 10	125 ± 2	40
γ H2AX	390 ± 40	119 ± 4	19
Rad51	135 ± 10		20

Tabelle 7.3: IRIF und Nanostrukturgrößen für 53BP1, γ H2AX und Rad51 nach Kohlenstoff- und Protonenbestrahlung.



(a) Fokusgrößen von 53BP1 und Rad51 für Kohlenstoff- und Protonenbestrahlung und γ H2AX für Kohlenstoffbestrahlung. Die Fokusgrößen für 53BP1 und γ H2AX sind gleich. Für Protonenbestrahlung nimmt die 53BP1 Fokusgröße ab. Die Rad51 Fokusgröße ist LET-unabhängig und ungefähr um den Faktor 3 kleiner als die Größen der anderen beiden Proteine.

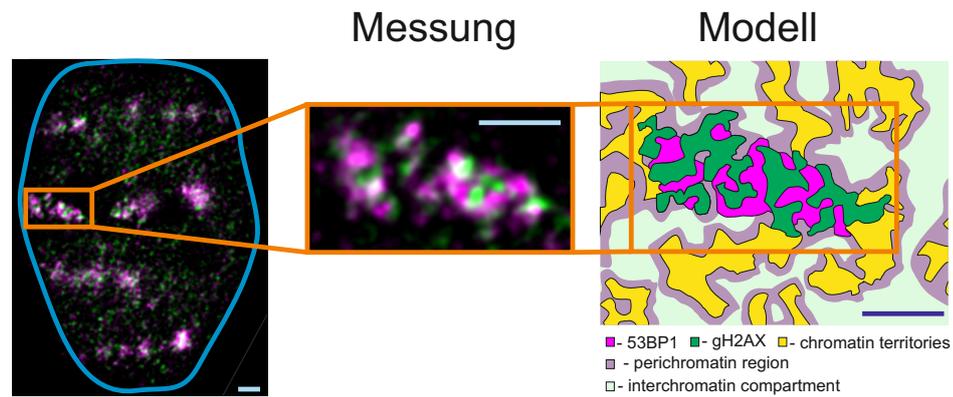
(b) Nanostrukturgrößen von 53BP1 für Kohlenstoff- und Protonenbestrahlung und γ H2AX für Kohlenstoffbestrahlung. Als Größenvergleich ist die Fokusgröße von Rad51 dazu eingezeichnet. Die kleinste vorkommende Struktur ist Protein- und LET-unabhängig.

Abbildung 7.16: Halbwertsbreiten (FWHM) der durch die Anpassung der Autokorrelationsfunktion bestimmten Größen

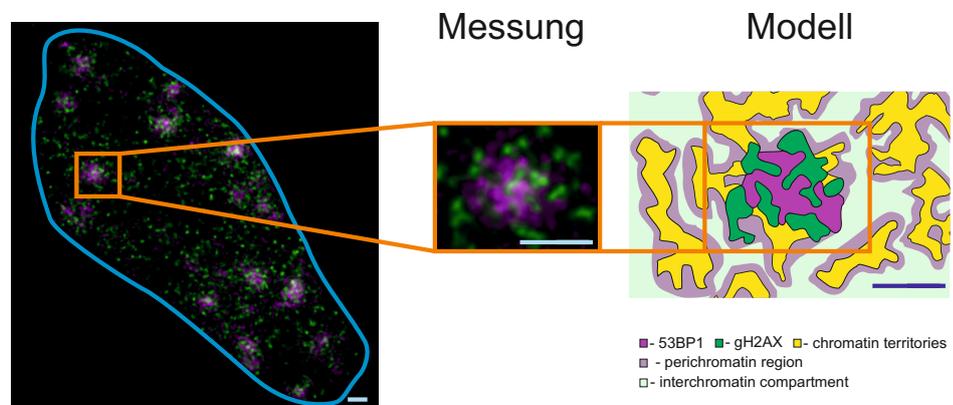
Diskussion der Ergebnisse

Die Messung von IRIF- und Nanostrukturgrößen ergab, dass sich in den IRIF unterschiedlicher Proteine eine charakteristische Nanostrukturgröße von ~ 120 - 140 nm unabhängig vom LET wiederfindet. Sie kann, unter Hinzuziehen der Ergebnisse der lokalen Korrelation durch die rPDM Analyse, in Verbindung gebracht werden mit der Chromatinfaltung höherer Ordnung. Hierzu wird das CT-IC Modell (vgl. Kapitel 2.1) betrachtet, welches kurz zusammengefasst ein Modell zur Ordnung der Chromatinstruktur im Zellkern ist. Die Chromatinstruktur ist in drei Gruppen aufgeteilt, einerseits die Chromatinterritorien, welche den Bereich der DNA bezeichnen. Zum anderen noch das Interchromatin Compartment, der Bereich in dem sich Proteine und wichtige Stoffe für die Zelle befinden. Die Perichromatin Region verbindet die beiden genannten Bereiche. Sie ist die Region in der Transkription, Replikation und DNA Reparatur stattfinden und beinhaltet die dafür dekomprimierte DNA. Diese Region wurde mit einer Größe von 100 - 200 nm bestimmt und kann damit sehr gut mit der in dieser Studie gemessenen Nanostrukturgröße in Verbindung gebracht werden. Dies erlaubt eine Interpretation der Strukturen der Anlagerung der betrachteten Schadensmarker γ H2AX, 53BP1 und Rad51. γ H2AX als Histon markiert das Chromatin selbst während der Reparatur. 53BP1 bindet in der Perichromatin Region um das Chromatin herum und ermöglicht so eine Stabilisierung der Schadensregion. Rad51 markiert direkt den Schaden und bindet somit das dekomprimierte Chromatin in der Perichromatin Region direkt am Bruch. Diese Interpretation wurde in das CT-IC Modell schematisch in Abbildung 7.17 und Abbildung 7.18 übertragen. Dazu wurden 4 tatsächlich bestrahlte IRIF, γ H2AX mit 53BP1 und 53BP1 mit Rad51 je eine für Kohlenstoffbestrahlung und eine für Protonenbestrahlung, so bearbeitet, dass jeder Kanal binär dargestellt ist, schwarz an Stellen ohne Signal und einheitlich farbig an Stellen mit Signal. Dies vereinfacht die Darstellung, vernachlässigt jedoch unterschiedliche Intensitäten, die unterschiedliche Proteindichten widerspiegeln würden. Diese vereinfachten IRIF Darstellungen wurden nun passend zum aufgestellten Modell in das CT-IC Modell eingepasst.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung bieten die Möglichkeit, das Modell zur Struktur der DSB Reparatur, wie es durch Messungen in dieser Arbeit bestätigt wurde mit dem CT-IC Modell der Chromatinstruktur zusammenzubringen. Es sind allerdings noch einige Fragen zu klären, bis dieser Zusammenhang zur Gewissheit werden kann. Um das Modell zu bestätigen, sollten noch Messungen mit direkter Chromatinfärbung und möglichst auch abhängig vom Zellzyklus durchgeführt werden, da sich abhängig vom



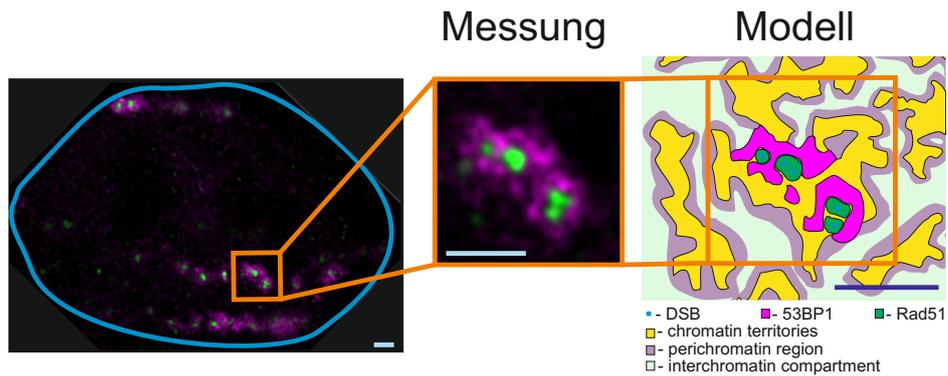
(a) Einpassung eines 53BP1 und γ H2AX IRIF in das CT-IC Modell. Die Fixierung der Proben erfolgte 1 h nach Kohlenstoffbestrahlung.



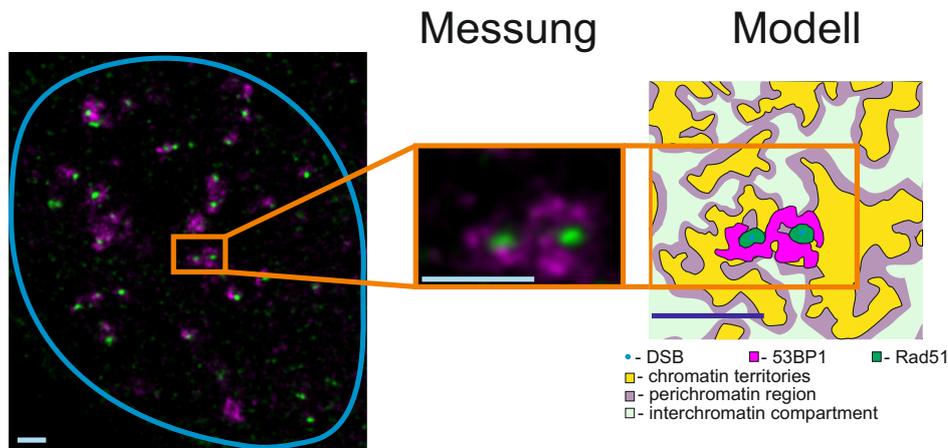
(b) Einpassung eines 53BP1 und γ H2AX IRIF in das CT-IC Modell. Die Fixierung der Proben erfolgte 1 h nach Protonenbestrahlung.

Abbildung 7.17: Schematisches Modell für die Einpassung der Daten für 53BP1 und γ H2AX in das CT-IC-Modell 1 h nach Bestrahlung. Maßstab: 1 μ m

Zellzyklus die Kompaktierung der DNA im Zellkern ändert. Außerdem wäre es sinnvoll, die DSB direkt zu färben, um eine noch genauere Lokalisierung des Schadens zu gewährleisten.



(a) Einpassung eines 53BP1 und Rad51 IRIF in das CT-IC Modell. Die Fixierung der Proben erfolgte 1 h nach Kohlenstoffbestrahlung.



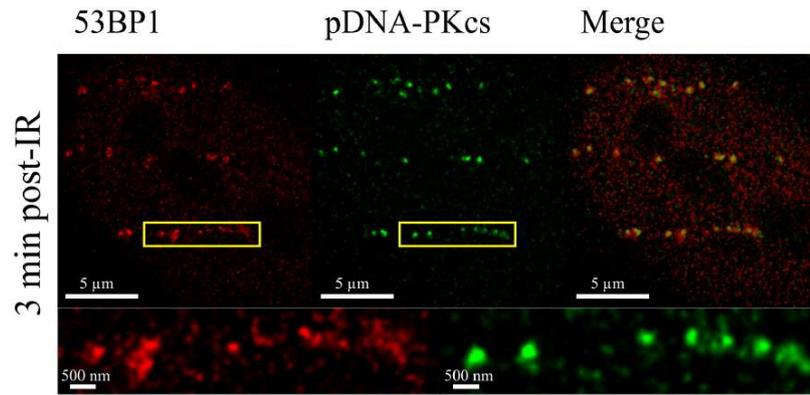
(b) Einpassung eines 53BP1 und Rad51 IRIF in das CT-IC Modell. Die Fixierung der Proben erfolgte 1 h nach Protonenbestrahlung.

Abbildung 7.18: Schematisches Modell für die Einpassung der Daten für 53BP1 und Rad51 in das CT-IC-Modell 1 h nach Bestrahlung. Maßstab: 1 μ m

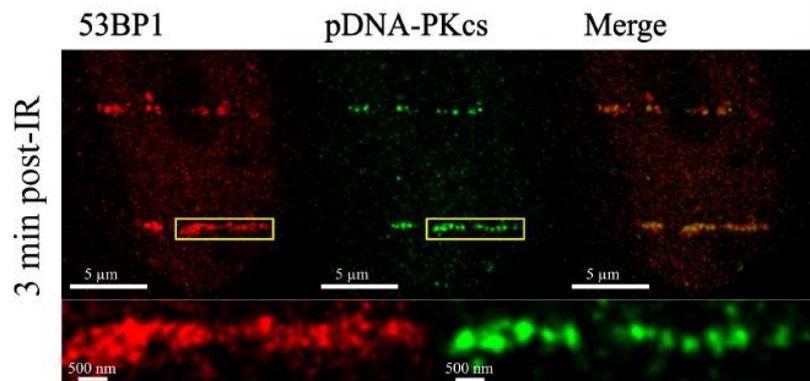
7.4 Intrazelluläre Mikrodosimetrie von hoch-LET Ionenstrahlen

Eine wichtige Fragestellung, welche für ein tiefergehendes Verständnis der Reparatur von DSB essentiell ist, bezieht sich auf die Anzahl der von hoch-LET Teilchen induzierten DSB entlang der Teilchenspur. Die Verbesserung der optischen Auflösung der STED Mikroskopie im Vergleich zu konventioneller Epifluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit der Markierung von DSB durch den frühen, kleine IRIF bildenden Schadensmarker pDNA-PKcs verspricht, dies möglich zu machen. pDNA-PKcs bildet ähnlich kleine IRIF wie Rad51, hat jedoch den Vorteil, dass es nahezu sofort nach Induktion alle DSB markiert, was aufgrund der speziellen Funktion von DNA-PKcs während der Reparatur (vgl. Abschnitt 2.4.3) anzunehmen ist. Im Rahmen der Masterarbeit von J. Huber [116] wurden dazu Zellen 2-10 min nach Lithium- und Kohlenstoffbestrahlung an SNAKE fixiert und für 53BP1 und pDNA-PKcs gefärbt. 53BP1 dient hierbei als Markierung für die Ionenspur und pDNA-PKcs für die DSB innerhalb der Spur. Die Anzahl der pDNA-PKcs IRIF pro μm Spurlänge in den STED Bildern wurde mit Simulationen der Schadensinduktion mit dem Monte-Carlo-basierten Programm PARTRAC [143] verglichen. Crosstalk zwischen den beiden Proteinfärbungen konnte nahezu völlig vermieden werden, indem eine Aufrüstung des Mikroskops mit zusätzlichen STED Lasern (vgl. Abschnitt 5.4.2) voll ausgenutzt wurde. Für diese Proben wurden die Farbstoffe OregonGreen (Anregung: 501 nm, Detektion: 505 nm-560 nm, STED: 592 nm) und AbberiorSTAR635 (Anregung: 635 nm, Detektion: 640 nm-795 nm, STED: 775 nm) verwendet. Zwei repräsentative Zellen sind in Abbildung 7.19 dargestellt. Für Kohlenstoffbestrahlung (Abb. 7.19(b)) sieht man zwei 53BP1 Spuren, die aus vielen nahezu vollständig separierten, teilweise untereinander verbundenen pDNA-PKcs IRIF bestehen. Für Lithiumbestrahlung (Abb. 7.19(a)) ist die 53BP1 Spur etwas lockerer und auch die pDNA-PKcs IRIF sind vereinzelt und klar gegeneinander abgegrenzt. Gezählt wurden pDNA-PKcs IRIF, welche sich im Bereich des 53BP1 tracks befanden. Die Zählung ergab für alle Zeiten zwischen 2 min und 10 min im Rahmen des Fehlers das gleiche Ergebnis. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der verschiedenen Zeiten zusammengefasst. Für Lithium entstanden im Mittel $(2,8 \pm 0,5) \frac{\text{IRIF}}{\mu\text{m}}$ und für Kohlenstoff $(4,5 \pm 0,9) \frac{\text{IRIF}}{\mu\text{m}}$. Die Daten konnten mit Vorhersagen aus Simulationen des Monte-Carlo basierten Programms PARTRAC [143] verglichen werden.

Die Simulationen wurden für verschiedene Ionen in einem großen LET Bereich



(a) HeLa Zelle 3 min nach Lithiumbestrahlung (3 Ionendurchgänge) gefärbt mit 53BP1 (rot) und pDNA-PKcs (grün). Der vergrößerte Ausschnitt (unten) zeigt einen einzelnen Ionendurchgang.



(b) HeLa Zelle 3 min nach Kohlenstoffbestrahlung (2 Ionendurchgänge) gefärbt mit 53BP1 (rot) und pDNA-PKcs (grün). Der Vergrößerte Ausschnitt (unten) zeigt einen einzelnen Ionendurchgang.

Abbildung 7.19: Vergleich der Färbung von pDNA-PKcs und 53BP1 für Kohlenstoff und Lithium Bestrahlung aus [116].

durchgeführt [144] und für diese Arbeit von W. Friedland adaptiert und zur Verfügung gestellt. PARTRAC simuliert zunächst die initial entstandenen DSB pro Gigabasenpaar und Dosis in einem Modell menschlicher Fibroblasten (vgl. Abbildung 7.20). Da die Messung nicht direkt an den DSB durchgeführt wurde, sondern an IRIF definierter Größe bezogen auf die Spurlänge, wurden die Simulationsdaten nochmals in Clustergrößen zusammengenommen. In Abbildung 7.21 sind die Anzahl der Cluster pro μm Spurlänge in Abhängigkeit der Clustergröße für die in dieser Arbeit verwendeten 20 MeV Lithiumionen und 27 MeV Kohlenstoffionen dargestellt und in Tabelle 7.4 zusammengefasst.

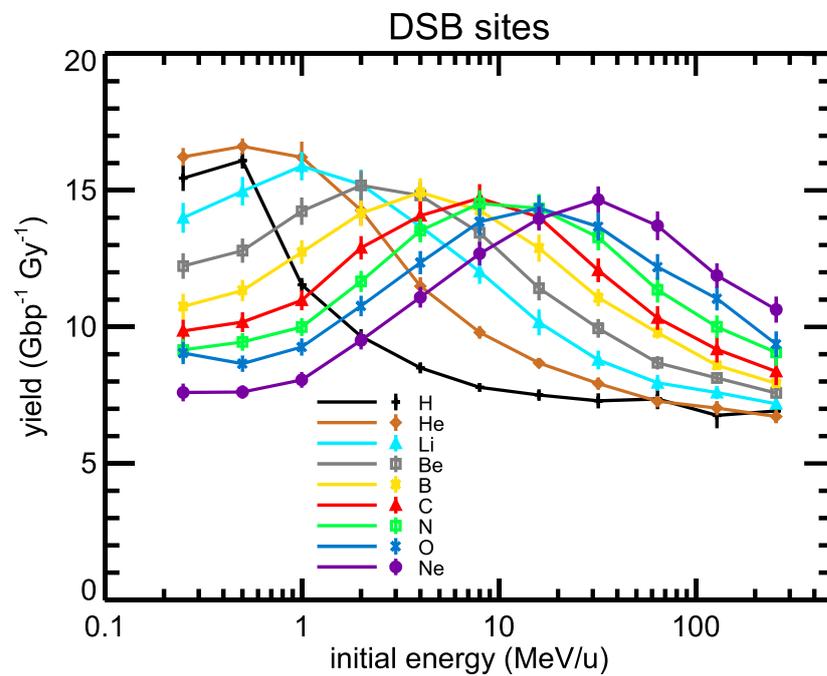


Abbildung 7.20: Die Ausbeute an DSB pro Gigabasenpaar DNA und Dosis für verschiedene Ionen in Abhängigkeit der Ionenenergie. Grafik und Simulation zur Verfügung gestellt von W. Friedland

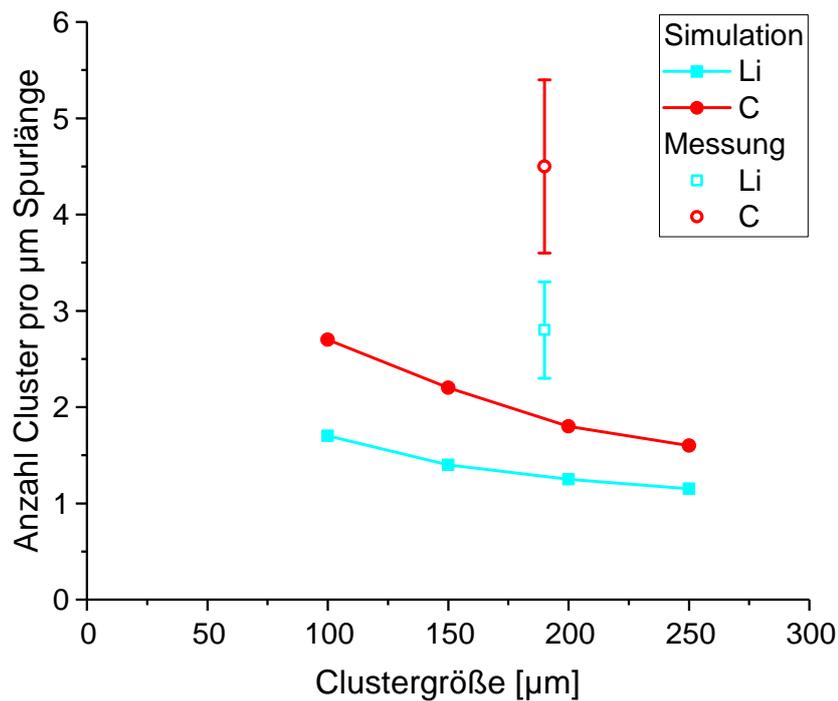


Abbildung 7.21: Anzahl der DSB Cluster in Abhängigkeit von der Clustergröße aus der Simulation mit PARTRAC. Die Anzahl gemessener pDNA-PKcs IRIF (offene Symbole) liegt sowohl für Lithium als auch für Kohlenstoff über den von der Simulation vorhergesagten Werten (volle Symbole mit durchgezogener Linie). Simulation zur Verfügung gestellt von W. Friedland.

Ion	IRIF/ μm Messung	150 nm DSB cluster/ μm PARTRAC	200 nm DSB cluster/ μm PARTRAC
Lithium	$2,8 \pm 0,5$	1,4	1,3
Kohlenstoff	$4,5 \pm 0,9$	2,2	1,8

Tabelle 7.4: Vergleich der gemessenen IRIF Anzahlen mit simulierten und extrapolierten Werten für Lithium ($\text{LET} = 116 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$) und Kohlenstoff ($\text{LET} = 500 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$)

Jeder Cluster repräsentiert die Überlagerung aller DSB, welche näher als die Clustergrößen zusammenliegen und ist in dieser Interpretation mit einem IRIF gleich zu setzen. Als IRIF Größe wurde die aus der Messung bestimmte mittlere Größe von $\sim 190 \text{ nm}$ verwendet.

Zum Vergleich mit der Simulation, werden 150 nm und 200 nm Cluster verwendet, da dies die der Messung am nächsten liegenden simulierten Werte sind. Die Vorhersage durch PARTRAC für Lithium ist $1,4 \frac{150\text{nm DSB Cluster}}{\mu\text{m}}$ und $1,3 \frac{200\text{nm DSB Cluster}}{\mu\text{m}}$.

Die gemessene Anzahl an IRIF pro μm Spurlänge ist mehr als doppelt so hoch ($(2,8 \pm 0,5) \frac{\text{IRIF}}{\mu\text{m}}$). Die Diskrepanz zwischen Messung und Simulation zeigt insbesondere, dass mehr DSB und somit auch mehr DSB Cluster induziert werden als PARTRAC vorhersagt. Es ist ein erstes Indiz dafür, dass die Simulation in den zugrundeliegenden Annahmen, beispielsweise der Chromatinstruktur, Fehler aufweist.

Für Kohlenstoff zeigt sich eine ähnliche Tendenz. Die Simulation sagt $2,2 \frac{150\text{nm DSB Cluster}}{\mu\text{m}}$ und $1,8 \frac{200\text{nm DSB Cluster}}{\mu\text{m}}$ vorher. Die Zahl der gemessenen IRIF ist um einen Faktor von ca. 2,5 erhöht ($(4,5 \pm 0,9) \frac{\text{IRIF}}{\mu\text{m}}$). Es bestätigen sich die schon bei der Lithiumbestrahlung sichtbaren Diskrepanzen zwischen Messung und Simulation.

Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Versuche mikroskopisch die Anzahl der DSB für hoch-LET Bestrahlung mit auflösungsbegrenzten Epifluoreszenzmikroskopen zu quantifizieren [16, 145], durch verbesserte optische Auflösung und der Verkleinerung der angefärbten Regionen zum Erfolg geführt werden können. Mit dieser Methode ist es möglich, eine untere Abschätzung für die Anzahl der DSB für hoch-LET Teilchenbestrahlung zu geben, welche um einen Faktor von ca. 3 für Lithium und ca. 5 für Kohlenstoff besser ist als bisherige Studien [60, 146]. Dies eröffnet die Möglichkeit der intrazellulären Mikrodosimetrie von ioneninduzierten DSB und stellt damit die Mittel bereit, phänomenologische Effekte von hoch-LET Strahlung, wie vermindertes Zellüberleben oder erhöhte Induktion von genetischen Schäden [7], verbessert zu modellieren. Für eine noch genauere Messung der DSB Anzahl ist vermutlich die Größe der IRIF ($\sim 190 \text{ nm}$) weiter limitierend, um wirklich die einzelnen DSB auflösen zu können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Annahmen in PARTRAC für die Induktion der DSB und deren Lokalisation womöglich fehlerhaft sind. PARTRAC verwendet für die Struktur der DNA nur die Strukturierung durch Nukleosome und Chromatinfibers mit einer Größe von wenigen 10 nm [143], nicht aber die Chromatinstruktur höherer Ordnung. Deren Existenz wurde in unabhängigen Studien gezeigt [26–29, 138] und hat Einfluss auf die Induktion und Lokalisation von DSB innerhalb des Zellkerns und sollte bei Simulationen hinzugezogen werden.

Kapitel 8

Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es das Verständnis der Reparaturantwort von menschlichen Zellen auf ionisierende Strahlung zu vertiefen. Dazu wurde durch Korrelations- und Größenmessungen verschiedener DSB Reparaturproteine die vierdimensionale Proteinanlagerung in der Schadensregion untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass sich die Proteine Rad51 und 53BP1 gegenseitig am Schadensort ausschließen und die Interaktion beider Proteine durch das Mediatorprotein Brca1 stattfindet. Weitergehend konnte erstmals die Anlagerung von Reparaturproteinen mit der Chromatinstruktur höherer Ordnung in Einklang gebracht werden. Durch Färbung und Analyse der Anlagerung verschiedener Proteine konnten Chromatinterritorien, der genaue Schadensort und die Regionen der eigentlichen Reparatur, mit dekodensierter DNA identifiziert werden. Davon ausgehend spielt insbesondere 53BP1, nicht wie bisher angenommen während der homologen Rekombination keine, sondern eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der Chromatinstruktur am Schadensort. Dies zeigt generell eine komplexere Verknüpfung der Reparaturproteine verschiedener DNA Doppelstrangbruch Reparaturwege, als bisher angenommen.

Darüber hinaus war es erstmals möglich, intrazelluläre Mikrodosimetrie für hoch-LET Ionen durchzuführen und bisherige Ansätze um einen Faktor ~ 3 zu verbessern. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Erhöhung der relativen biologischen Wirksamkeit für hoch-LET Bestrahlung im Bezug auf Zellüberleben, der Induktion von genetischen Schäden oder anderer biologischer Endpunkte nach Beginn der Schadensinduktion genauer zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit entwickelte Verbindung von höchstauffösender, optischer Nanoskopie mit präziser Bestrahlung mit hoch- und niedrig-LET Teilchen bietet die einzigartige Möglichkeit, die Induktion und Reparatur von DSB im Detail und höchst lokalisiert

um den Schadensort direkt zu untersuchen. Dies ermöglicht es, das Verständnis zur DSB Reparatur in menschlichen Zellen deutlich zu erweitern.

Ausgehend von den in dieser Arbeit getätigten Entwicklungen und ersten biologischen Anwendungen sind weitere Folgeprojekte denkbar.

Eine wichtige Fragestellung ist weiterhin die räumlich-zeitliche Abfolge der Reparaturprozesse und dadurch bedingt die Anlagerung und der Abbau verschiedener Reparaturproteine am Schadensort und die Korrelation der Proteine zueinander. Außerdem muss untersucht werden, wie aus der zeitlichen Entwicklung der Nanostruktur und der Korrelation der Proteine auf deren Funktion und Interaktion geschlossen werden kann.

1. Zunächst wäre eine noch detailliertere Untersuchung der Anlagerung und des Abbaus der in dieser Arbeit schon untersuchten Proteine und der Veränderung der Proteinstrukturen zueinander interessant. Dazu ist es essentiell, in einem ersten Schritt stabilere Antikörperfärbungen zu entwickeln, welche es einerseits erlauben die Antikörperkomplexe durch primäre Antikörperfärbung zu verkleinern und andererseits durch eine stabil hohe Photonenausbeute die Auflösung zu verbessern. Vielversprechendste Kandidaten für solche Farbstoffe sind anorganische QuantumDots. Diese Halbleiterkugeln emittieren je nach Größe Licht unterschiedlicher Wellenlänge und können an primäre Antikörper zur Proteindetektion gekoppelt werden. Außerdem sind diese Kristallstrukturen unempfindlich gegen das bei organischen Fluorophoren auftretende Bleichen. Das ermöglicht mehr Aufnahmen bei höherer STED Laserintensität Auflösung und somit besserer Auflösung bei gleichbleibend hoher Photonenausbeute. Dies kann zu einer weiteren Auflösungsverbesserung um den Faktor 2-3 also bis 40-50 nm führen.
2. Ausgehend davon ist es möglich die Probleme, welche in dieser Arbeit durch die zu schlechte Auflösung aufgetreten sind, wie beispielsweise mögliche zusätzliche Korrelation weitestgehend zu vermeiden.
3. Die zeitliche Anlagerung kann allerdings mit diesem Ansatz nur begrenzt untersucht werden, da auch hier fixierte Zellen verwendet werden müssen. Aus diesem Grund ist ein äußerst wichtiger Schritt für zukünftige Untersuchungen die Entwicklung von Färbungen, welche für lebende Zellen geeignet sind, wie beispielsweise die Verwendung von genetisch veränderten Zellen oder die

Verwendung von Lebendzellantikörpern, sogenannten Chromobodies. Diese Färbemethoden existieren bereits und werden für konventionelle Epifluoreszenzmikroskopie auch standardmäßig verwendet. Die existierenden Konstrukte sind für die Verwendung mit höchstauflösender Mikroskopie allerdings nur begrenzt nutzbar und können somit nur als Ausgangspunkt für weitere Entwicklungen dienen. Unter anderem ist es nötig, bei der Lebendzellfärbung sicherzustellen, dass nur endogene, also natürlich in der Zelle vorhandene Proteine gefärbt werden und nicht durch die Veränderung zusätzliche Proteinkopien entstehen. Außerdem muss die Stabilität der Färbung auch hier weiter optimiert werden, um eine stabile Photonenausbeute bei hohen Laserintensitäten zu garantieren. Dies ist essentiell, um überhaupt STED Messungen mit verbesserter Auflösung durchführen zu können.

Sobald die genannten Probleme sowohl für die Färbung von fixierten als auch von lebenden Zellen beseitigt sind, steht der tiefergehenden zeitlich und räumlich strukturierten Analyse nichts mehr im Wege.

4. Hier könnten die Anlagerungskinetiken, welche in dieser Arbeit sehr vereinfacht begonnen wurden, an lebenden Zellen durchgeführt werden, was zwei Hauptvorteile bietet: Zum einen können die Analysen mit sehr guter zeitlichen Auflösung von Minuten oder gar Sekunden durchgeführt werden, was ein Nachverfolgen einzelner Schadensregionen möglich macht, ähnlich wie es in verschiedenen Studien am Experiment SNAKE mit Epifluoreszenzmikroskopie schon durchgeführt wurde. Zum anderen können die Analysen auf mehrere Tage ausgeweitet werden, um das Auftreten und die Charakteristik der „residual“ IRIF besser zu charakterisieren. Solch lange Zeitserien werden trotz der Farbstoffentwicklungen mit maximaler Auflösung schwierig sein, da die Zellen bei zu hoher Gesamtlichtintensität durch sogenannte Phototoxizität absterben können. Dies kann aber umgangen werden, indem beispielsweise für die räumliche Korrelation interessante Zeiten in den Übersichtszeitserien mit geringerer Lichtintensität und somit schlechterer Auflösung ausgewählt werden und dann nochmals mit bestmöglicher Auflösung an Zellen nur genau für die interessanten Zeiten Aufnahmen angefertigt werden. Durch diese Kombination können die Vorteile beider Verfahren, sehr gute zeitliche Auflösung der Lebendzellmikroskopie und sehr gute räumliche Auflösung bei der STED Mikroskopie ideal verbunden werden.

5. Zur detaillierten Aufklärung der Reparaturmechanismen menschlicher Zellen ist es außerdem weitergehend essentiell weitere Schadensfaktoren zu identifizieren und zu untersuchen, welche relevant sind, um das Bild der Reparatur zu vervollständigen. Mögliche Kandidaten sind die in dieser Arbeitsgruppe in früheren Studien schon verwendeten Proteine Mdc1, Mre11, Rad52 oder auch ATM, welche alle bekanntermaßen wichtige Rollen in der DSB Reparatur einnehmen.
6. Im Rahmen dieser Arbeit und anderer am Institut durchgeführten Studien hat sich ein zweites Themengebiet als interessant und vielversprechend herauskristallisiert: Die Untersuchung der Abhängigkeit der Schadensdichte und Struktur der Proteinanlagerungen von der DNA-Dichte, Chromatinstruktur und nukleärer Substrukturen. Ausgehend davon ist die Frage zu klären, ob es innerhalb des Zellkerns, der als insgesamt strahlensensitiver Bereich der Zelle bekannt ist, nochmals Unterschiede in der Strahlensensitivität der verschiedenen subnukleären Regionen, beispielsweise der Nukleoli oder Bereiche der DNA-Bindung an die Zellkernmembran, gibt. Hierzu ist es notwendig, verlässliche Färbungen für das Chromatin und für die zu untersuchenden Bereiche zu etablieren. Diese können dann mit dem am Mikrostrahl SNAKE vorhandenen Zielbestrahlungsaufbau gezielt bestrahlt werden [147]. Es können dann ähnliche Untersuchungen, wie oben beschrieben, durchgeführt werden. Dies schafft und vertieft das Verständnis zur Effektivität der Reparatur und der Bedeutung verschiedener Regionen für die Schadensinduktion und Reparatur. Wird nun zusätzlich noch untersucht, wie sich die gezielte Bestrahlung verschiedener Bereiche auf die Strahlensensitivität der Zellen, wie etwa Zellüberleben oder Induktion genetischer Schäden, auswirkt. Da mit dem vorhandenen Bestrahlungsaufbau am SNAKE im Vergleich zu Standardbestrahlungen (100 000 - 10 000 000 Zellen pro Experiment) nur geringe Zellzahlen (10 - 1 000 Zellen pro Experiment) bestrahlt werden können, muss die Analyse der Endpunkte adaptiert werden. Gelingt dies, wäre es erstmals möglich, die Chromatinstruktur, die Reparatur und die phänomenologische Zellantwort in Zusammenhang zu bringen. Dies würde das Verständnis der Zellantwort auf ionisierende Strahlung entscheidend weiterbringen.
7. Zuletzt bieten die in dieser Arbeit getätigten Entwicklungen die Möglichkeit erstmals Mikrosdosimetrie innerhalb menschlicher Zellen an hoch-LET Ionenspuren zu tätigen und wertvolle Daten, welche für die Simulation zur Schadensinduktion nötig sind, zu liefern. Die ersten biologischen Anwendungen zeigen allerdings, dass

noch weitere Entwicklungen notwendig sind, um wirklich einzelne DSB auflösen zu können. Für zukünftige Studien sind zwei Herangehensweisen möglich: zum einen sollte nochmals nach kleinen IRIF bildenden Proteinen gesucht werden, welche an alle DSB binden. Zusammen mit den verbesserten Färbemethoden sollte es dann möglich sein, die IRIF Größen mindestens nochmals auf ca. 70-100 nm zu halbieren. Zum anderen besteht die Möglichkeit DSB direkt mit PCR Proben zu markieren, welche wiederum durch QuantumDots angefärbt sind. Diese PCR Proben bestehen aus Haarnadelstrukturen, welche eine definierte Anzahl an Fluorophoren am Kopf der Nadel tragen. Die andere Seite trägt eine Sequenz, welche an die Doppelstrangenden eines DSB binden kann. Hierzu werden zunächst die Enden mit Hilfe von zugegebenen Polymerasen glatt abgeschnitten und die Haarnadelstrukturen mittels Ligasen mit den Strangenden verbunden. Dies könnte es möglich machen alle DSB möglichst direkt nach Bestrahlung zu finden und zu zählen. Die Studien wären nur noch durch die erreichbare Auflösung bei der Mikroskopie und nicht mehr durch Anlagerungsprozesse der Proteine begrenzt. Dies würde das Verständnis der relativen biologischen Wirksamkeit, welche die Überhöhung von Schaden durch hoch-LET Teilchen bezeichnet, maßgeblich weiterbringen. Zusätzlich bietet sich dadurch die einzigartige Möglichkeit, durch Bestrahlung mit verschiedenen Ionen mit unterschiedlichen LET eine Datenbasis zu schaffen, welche für die Simulation der DSB Induktion essentiell ist und dafür dringend benötigt wird.

Die hier vorgestellten weiterführenden Projekte sind äußerst umfangreich und würden den Rahmen dieser Arbeit sowohl experimentell, als auch analytisch sprengen. Sie zeigen jedoch auch das Potential, welches die in dieser Arbeit entwickelten Methoden bieten, um strahlenbiologische Fragestellungen zu beantworten.

Literaturverzeichnis

- [1] N. Abolmaali, M. Asmussen et al., *Praktische Röntgendiagnostik Orthopädie und Unfallchirurgie: Indikation, Einstelltechnik, Strahlenschutz*, Georg Thieme Verlag, 2014.
- [2] Spektrum Akademischer Verlag, *Lexikon der Physik — natürliche Strahlenbelastung*, 1998, [Online; Stand 21.Dezember 2016].
- [3] T. Straume, G. Rugel et al., Measuring fast neutrons in Hiroshima at distances relevant to atomic-bomb survivors, *Nature* **424** (2003) 539–542.
- [4] G. J. Vargo, V. Poyarkov et al., The Chernobyl accident: a comprehensive risk assessment, (1999).
- [5] World Health Organization, *Health risk assessment from the nuclear accident after the 2011 Great East Japan earthquake and tsunami, based on a preliminary dose estimation*, World Health Organization, 2013.
- [6] J. D. Appleton, J. C. H. Miles, A statistical evaluation of the geogenic controls on indoor radon concentrations and radon risk, *Journal of environmental radioactivity* **101** (2010) 799–803.
- [7] T. E. Schmid, W. Friedland et al., Sub-micrometer 20MeV protons or 45MeV lithium spot irradiation enhances yields of dicentric chromosomes due to clustering of DNA double-strand breaks, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **793** (2015) 30–40.
- [8] T. E. Schmid, C. Greubel et al., Low LET protons focused to submicrometer shows enhanced radiobiological effectiveness, *Physics in medicine and biology* **57** (2012) 5889.

- [9] M. Suzuki, Y. Kase et al., Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams, *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* **48** (2000) 241–250.
- [10] G. Kraft, Tumor therapy with heavy charged particles, *Progress in Particle and Nuclear Physics* **45** (2000) S473–S544.
- [11] T. R. Munro, The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts, *Radiation research* **42** (1970) 451–470.
- [12] K. K. Khanna, S. P. Jackson, DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nature genetics* **27** (2001) 247–254.
- [13] K. R. Nairy, N. N. Bhat et al., Studies on electron beam induced DNA damage and repair kinetics in lymphocytes by alkaline comet assay, *Int. J. Radiat. Res* **13** (2015) 213–220.
- [14] K. Rothkamm, S. Horn et al., Laboratory intercomparison on the γ -H2AX foci assay, *Radiation research* **180** (2013) 149–155.
- [15] V. Hable, *Echtzeitbeobachtung schneller Reaktionskinetiken in lebenden Zellen nach Ionenmikrobestrahlung*, Doktorarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2011.
- [16] A. Hauptner, *Mikroskopisch genaue Zellbestrahlung mit hochenergetischen Ionen*, Doktorarbeit, TU München, 2006.
- [17] G. Du, G. A. Drexler et al., Spatial dynamics of DNA damage response protein foci along the ion trajectory of high-LET particles, *Radiation research* **176** (2011) 706–715.
- [18] F. Ochs, K. Somyajit et al., 53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair, *Nature Structural & Molecular Biology* (2016).
- [19] T. Oike, A. Niimi et al., Visualization of complex DNA double-strand breaks in a tumor treated with carbon ion radiotherapy, *Scientific reports* **6** (2016).
- [20] R. Lopez Perez, G. Best et al., Superresolution light microscopy shows nanostructure of carbon ion radiation-induced DNA double-strand break repair foci, *The FASEB Journal* (2016) fj-201500106R.

- [21] H. Roos, A. M. Kellerer, Design criteria and performance parameters of an alpha irradiation device for cell studies, *Physics in Medicine and Biology* **34** (1989) 1823.
- [22] J. C. Venter, M. D. Adams et al., The sequence of the human genome, *Science* **291** (2001) 1304–1351.
- [23] K. Munk, *Grundstudium Biologie - Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution*, Spektrum akademischer Verlag, 2000.
- [24] B. Lewin, K. Beginnen et al., *Molekularbiologie der Gene*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, 2002.
- [25] W. Friedland, M. Dingfelder et al., Calculated DNA double-strand break and fragmentation yields after irradiation with He ions, *Radiation Physics and Chemistry* **72** (2005) 279–286.
- [26] T. Cremer, C. Cremer, Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells, *Nature reviews genetics* **2** (2001) 292–301.
- [27] T. Cremer, M. Cremer, Chromosome territories, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2** (2010) a003889.
- [28] T. Cremer, M. Cremer et al., The 4D nucleome: Evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and inactive nuclear compartments, *FEBS letters* **589** (2015) 2931–2943.
- [29] Y. Markaki, M. Gunkel et al., Functional nuclear organization of transcription and DNA replication - A topographical marriage between chromatin domains and the interchromatin compartment, in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, Vol. 75, pp. 475–492, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010.
- [30] H. Albiez, M. Cremer et al., Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks, *Chromosome research* **14** (2006) 707–733.
- [31] R. Huch, K. D. Jürgens, *Mensch, Körper, Krankheit*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier, 2011.

- [32] J. A. Huberman, A. D. Riggs, On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes, *Journal of molecular biology* **32** (1968) 327–334.
- [33] G. Iliakis, T. Murmann, A. Soni, Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **793** (2015) 166–175.
- [34] T. Iyama, D. M. Wilson, DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells, *DNA repair* **12** (2013) 620–636.
- [35] K. Rothkamm, I. Krüger et al., Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 5706–5715.
- [36] S. J. DiBiase, Z.-C. Zeng et al., DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus, *Cancer Res.* **60** (2000) 1245–1253.
- [37] S. Bekker-Jensen, C. Lukas et al., Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks, *The Journal of cell biology* **173** (2006) 195–206.
- [38] B. Alberts, D. Bray et al., *Molekularbiologie der Zelle*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.
- [39] L. H. Thompson, Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **751** (2012) 158–246.
- [40] T. A. Mochan, M. Venere et al., 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage, *DNA repair* **3** (2004) 945–952.
- [41] F. Darroudi, A. T. Natarajan, Cytogenetical characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells, xrs 5 and xrs 6 IV. Study of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by restriction endonucleases and inhibitors of DNA topoisomerase II, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **212** (1989) 137–148.

- [42] A. Soni, M. Siemann et al., Marked contribution of alternative end-joining to chromosome-translocation-formation by stochastically induced DNA double-strand-breaks in G 2-phase human cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **793** (2015) 2–8.
- [43] A. T. Natarajan, F. Palitti, DNA repair and chromosomal alterations, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **657** (2008) 3–7.
- [44] J. Reindl, G. A. Drexler et al., Correlation analysis of Rad51 and 53BP1 in cancer cells after ion irradiation using STED microscopy, *Physical biology* **12** (2015) 066005.
- [45] A. Kakaroukas, P. A. Jeggo, DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism, *The British journal of radiology* **87** (2014) 20130685.
- [46] A. J. Davis, B. P. C. Chen, D. J. Chen, DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway, *DNA repair* **17** (2014) 21–29.
- [47] J. R. Chapman, P. Barral et al., RIF1 is essential for 53BP1-dependent non-homologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection, *Molecular cell* **49** (2013) 858–871.
- [48] B. Schwarz, *Feinstruktur von BRCA1 und Rad51 Foci nach α -Bestrahlung*, Master-/Diplomarbeit, LMU München, 2016.
- [49] J. Zhang, The role of BRCA1 in homologous recombination repair in response to replication stress: significance in tumorigenesis and cancer therapy, *Cell & bioscience* **3** (2013) 1.
- [50] J. F. Ziegler, PARTICLE INTERACTIONS WITH MATTER, SRIM - The Stopping and Range of Ions in Matter.
- [51] W. Demtröder, *Experimentalphysik 3 – Atome, Moleküle und Festkörper*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2000.
- [52] W. Zinth, H.-J. Körner, *Physik III – Optik, Quantenphänomene und Aufbau der Atome*, Oldenbourg Verlag, München, 1994.
- [53] H. H. Rossi, The role of microdosimetry in radiobiology, *Radiation and environmental biophysics* **17** (1979) 29–40.

- [54] M. N. Varma, J. W. Baum, A. V. Kuehner, Radial dose, LET, and \bar{W} for ^{16}O ions in N_2 and tissue-equivalent gases, *Radiation research* **70** (1977) 511–518.
- [55] J. Kiefer, H. Straaten, A model of ion track structure based on classical collision dynamics (radiobiology application), *Physics in medicine and biology* **31** (1986) 1201.
- [56] A. Chatterjee, H. J. Schaefer, Microdosimetric structure of heavy ion tracks in tissue, *Radiation and environmental biophysics* **13** (1976) 215–227.
- [57] T. Elsässer, M. Krämer, M. Scholz, Accuracy of the local effect model for the prediction of biologic effects of carbon ion beams in vitro and in vivo, *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* **71** (2008) 866–872.
- [58] T. Elsässer, M. Scholz, Cluster effects within the local effect model, *Radiation research* **167** (2007) 319–329.
- [59] M. Galassi, J. Davies et al., GNU Scientific Library Reference Manual, ISBN 0954612078, Library available online at <http://www.gnu.org/software/gsl> (2015).
- [60] A. Hauptner, W. Friedland et al., Spatial distribution of DNA double-strand breaks from ion tracks, in *Ion Beam Science: Solved and Unsolved Problems*, Vol. 52 of *Matematisk-fysiske Meddelelser*, pp. 59–85, Royal Danish Academy of Sciences and Letters, Copenhagen, 2006.
- [61] R. Y. Tsien, The green fluorescent protein, *Annual review of biochemistry* **67** (1998) 509–544.
- [62] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *Journal of cellular and comparative physiology* **59** (1962) 223–239.
- [63] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular fluorescence: principles and applications*, John Wiley & Sons, 2012.
- [64] Wikipedia, Stokes-Verschiebung — Wikipedia, Die freie Enzyklopädie, 2015, [Online; Stand 30. April 2015].
- [65] G. B. Airy, On the diffraction of an object-glass with circular aperture, *Transactions of the Cambridge Philosophical Society* **5** (1835) 283.

- [66] M. Gunkel, *Lokalisationsmikroskopie mit mehreren Farben und ihre Anwendung in biologischen Präparaten*, Doktorarbeit, Universität Bielefeld, 2011.
- [67] J. W. Rayleigh, B. Strutt, *Scientific Papers: 1887-1892*, Vol. 3, University Press, 1902.
- [68] S. G. Lipson, H. S. Lipson, D. S. Tannhauser, *Optik*, Springer-Verlag, 2013.
- [69] Scientific Volume Imaging B.V., Huygens Profesional.
- [70] B. Amos, G. McConnell, T. Wilson, Confocal microscopy, *Comprehensive Biophysics*. Amsterdam: Elsevier (2012).
- [71] G. Cox, *Optical imaging techniques in cell biology*, CRC Press, 2012.
- [72] M. Minsky, Memoir on inventing the confocal scanning microscope, *Scanning* **10** (1988) 128–138.
- [73] P. Davidovits, Scanning laser microscope, *Nature* **223** (1969) 831.
- [74] P. Davidovits, M. D. Egger, Scanning laser microscope for biological investigations, *Applied Optics* **10** (1971) 1615–1619.
- [75] W. B. Amos, J. G. White, How the confocal laser scanning microscope entered biological research, *Biology of the Cell* **95** (2003) 335–342.
- [76] J. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer Science & Business Media, 2010.
- [77] S. W. Hell, J. Wichmann, Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy, *Optics letters* **19** (1994) 780–782.
- [78] M. Dyba, S. W. Hell, Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission, *Applied optics* **42** (2003) 5123–5129.
- [79] S. W. Hell, M. Dyba, S. Jakobs, Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy, *Current opinion in neurobiology* **14** (2004) 599–609.
- [80] S. W. Hell, Toward fluorescence nanoscopy, *Nature biotechnology* **21** (2003) 1347–1355.

- [81] L. Kastrup, S. W. Hell, Absolute optische Wirkungsquerschnitte fluoreszierender Einzelmoleküle, *Angewandte Chemie* **116** (2004) 6814–6818.
- [82] L. Allen, M. W. Beijersbergen et al., Orbital angular momentum of light and the transformation of Laguerre-Gaussian laser modes, *Physical Review A* **45** (1992) 8185.
- [83] K. I. Willig, B. Harke et al., STED microscopy with continuous wave beams, *Nature methods* **4** (2007) 915–918.
- [84] K. S. Youngworth, T. G. Brown, Focusing of high numerical aperture cylindrical-vector beams, *Optics Express* **7** (2000) 77–87.
- [85] P. Török, P. R. T. Munro, The use of Gauss-Laguerre vector beams in STED microscopy, *Optics express* **12** (2004) 3605–3617.
- [86] K. I. Willig, J. Keller et al., STED microscopy resolves nanoparticle assemblies, *New Journal of Physics* **8** (2006) 106.
- [87] T. A. Klar, S. Jakobs et al., Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** (2000) 8206–8210.
- [88] J. L. Chaloupka, D. D. Meyerhofer, Characterization of a tunable, single-beam ponderomotive-optical trap, *JOSA B* **17** (2000) 713–722.
- [89] O. Boyko, T. A. Planchon et al., Adaptive shaping of a focused intense laser beam into a doughnut mode, *Optics communications* **246** (2005) 131–140.
- [90] J.-B. Sibarita, Deconvolution microscopy, in *Microscopy Techniques*, pp. 201–243, Springer, 2005.
- [91] J. W. Lichtman, J.-A. Conchello, Fluorescence microscopy, *Nature methods* **2** (2005) 910–919.
- [92] S. Doose, M. Sauer, Fluoreszenz bringt Licht ins Dunkel, *Physik Journal* **6** (2007) 55–61.
- [93] abberior, Abberior STAR 440 SXP, 2015, [Online; Stand 30. April 2015].
- [94] Active Motif, ChromeoTM505, 2015, [Online; Stand 30. April 2015].

- [95] M. T. Z. Spence, I. D. Johnson, *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*, Life Technologies Corporation, 2010.
- [96] S. W. Hell, M. Kroug, Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit, *Applied Physics B: Lasers and Optics* **60** (1995) 495–497.
- [97] H. Zhong, Photoactivated localization microscopy (PALM): An optical technique for achieving ~ 10 -nm resolution, *Cold Spring Harbor Protocols* **2010** (2010) pdb-top91.
- [98] S.-H. Lee, J. Y. Shin et al., Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM), *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109** (2012) 17436–17441.
- [99] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), *Nature methods* **3** (2006) 793–796.
- [100] B. Huang, W. Wang et al., Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy, *Science* **319** (2008) 810–813.
- [101] C. Cremer, P. Edelmann et al., 40 principles of spectral precision distance confocal microscopy for the analysis of molecular nuclear structure, (1999).
- [102] R. Kaufmann, *Lokalisationsmikroskopie an biologischen Proben*, Master-/Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2008.
- [103] L. Schermelleh, R. Heintzmann, H. Leonhardt, A guide to super-resolution fluorescence microscopy, *The Journal of cell biology* **190** (2010) 165–175.
- [104] J. Seel (Reindl), *Super resolution microscopy of repair foci after ion irradiation of human HeLa cells*, Master-/Diplomarbeit, LMU München, 2012.
- [105] M. G. L. Gustafsson, Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (2005) 13081–13086.
- [106] M. G. L. Gustafsson, Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy, *Journal of microscopy* **198** (2000) 82–87.

- [107] G. Datzmann, *Aufbau und Charakterisierung des Hochenergie Rasterionenmikroskops SNAKE*, Doktorarbeit, TU München, 2002.
- [108] K. Peeper, M. Moser et al., Three-dimensional microscopy of deuterium in tungsten, *Physica Scripta* **2014** (2014) 014070.
- [109] P. Reichart, G. Datzmann et al., Three-dimensional hydrogen microscopy in diamond, *Science* **306** (2004) 1537–1540.
- [110] V. Hable, C. Greubel et al., The live cell irradiation and observation setup at SNAKE, *NIMB* **267** (2009) 2090–2097.
- [111] A. Hauptner, S. Dietzel et al., Microirradiation of cells with energetic heavy ions, *Radiat. Environ. Biophys.* **42** (2004) 237–245.
- [112] G. A. Drexler, C. Siebenwirth et al., Live cell imaging at the Munich ion microbeam SNAKE—a status report, *Radiation Oncology* **10** (2015) 42.
- [113] O. Zlobinskaya, S. Girst et al., Reduced side effects by proton microchannel radiotherapy: study in a human skin model, *Radiation and environmental biophysics* **52** (2013) 123–133.
- [114] C. Greubel, *Einfluss der zeitlichen und räumlichen Fokussierung auf die strahlenbiologische Wirksamkeit von Protonen*, Doktorarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2013.
- [115] G. Dollinger, *Kohlenstoffolien als Stripper für schwere Ionen*, Doktorarbeit, TU München, 1990.
- [116] J. Huber, *Microdosimetry of High-LET Particle Tracks in Human HeLa Cells*, Master-/Diplomarbeit, TU München, 2016.
- [117] B. A. Askonas, A. R. Williamson, B. E. G. Wright, Selection of a single antibody-forming cell clone and its propagation in syngeneic mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **67** (1970) 1398–1403.
- [118] OpenWetWare, Griffin:Antibody Basics — OpenWetWare, 2014, [Online; accessed 8-April-2015].

- [119] E. M. M. Manders, F. J. Verbeek, J. A. Aten, Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images, *Journal of Microscopy* **169** (1993) 375–382.
- [120] S. Bolte, F. P. Cordelieres, A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy, *Journal of microscopy* **224** (2006) 213–232.
- [121] E. M. Manders, J. Stap et al., Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy, *Journal of cell science* **103** (1992) 857–862.
- [122] Q. Li, A. Lau et al., A syntaxin 1, Gao, and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization, *The Journal of neuroscience* **24** (2004) 4070–4081.
- [123] B. van Steensel, E. P. van Binnendijk et al., Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons, *Journal of cell science* **109** (1996) 787–792.
- [124] J. Ohm, H. D. Lüke, *Signalübertragung: Grundlagen der digitalen und analogen Nachrichtenübertragungssysteme*, Vol. 12, Springer-Verlag, 2014.
- [125] L. Papula, *Mathematische Formelsammlung für Ingenieure und Naturwissenschaftler*, Vol. 11, Springer, 2014.
- [126] L. Fahrmeir, A. Hamerle, G. Tutz, *Multivariate statistische verfahren*, Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 1996.
- [127] R. G. Miller Jr, *Beyond ANOVA: basics of applied statistics*, CRC Press, 1997.
- [128] G. W. Snedecor, W. G. Cochran, *Statistical methods*, ed. 6, Ames, Iowa, 1967, Iowa State University Press, Section **12** 349–352.
- [129] IBM Corp., *IBM SPSS Statistics for Windows*, 2016.
- [130] O. Nuta, N. Somaiah et al., Correlation between the radiation responses of fibroblasts cultured from individual patients and the risk of late reaction after breast radiotherapy, *Cancer letters* **374** (2016) 324–330.

- [131] S. Horn, S. Barnard et al., Combined analysis of gamma-H2AX/53BP1 foci and caspase activation in lymphocyte subsets detects recent and more remote radiation exposures, *Radiation research* **180** (2013) 603–609.
- [132] E. Marková, J. Torudd, I. Belyaev, Long time persistence of residual 53BP1/ γ -H2AX foci in human lymphocytes in relationship to apoptosis, chromatin condensation and biological dosimetry, *International journal of radiation biology* **87** (2011) 736–745.
- [133] E. Markova, N. Schultz, I. Y. Belyaev, Kinetics and dose-response of residual 53BP1/ γ -H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival, *International journal of radiation biology* **83** (2007) 319–329.
- [134] Y. Hu, R. Scully et al., RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci, *Genes & development* **25** (2011) 685–700.
- [135] N. T. Martin, S. A. Nahas et al., Assessing radiosensitivity with kinetic profiles of γ -H2AX, 53BP1 and BRCA1 foci, *Radiotherapy and Oncology* **101** (2011) 35–38.
- [136] W. M Bonner, C. E. Redon et al., γ H2AX and cancer, *Nature Reviews Cancer* **8** (2008) 957–967.
- [137] K. Rothkamm, S. Barnard et al., DNA damage foci: meaning and significance, *Environmental and molecular mutagenesis* **56** (2015) 491–504.
- [138] J. Reindl, S. Girst et al., Chromatin organization revealed by nanostructure of irradiation induced γ H2AX, 53BP1 and Rad51 foci, *Scientific Reports* **7** (2017).
- [139] M. Scholz, G. Kraft, Track structure and the calculation of biological effects of heavy charged particles, *Advances in Space Research* **18** (1996) 5–14.
- [140] H. Wulf, W. Kraft-Weyrather et al., Heavy-ion effects on mammalian cells: Inactivation measurements with different cell lines, *Radiation Research* **104** (1985) S122–S134.
- [141] K. A. Wilson, D. F. Stern, NFBD1/MDC1, 53BP1 and BRCA1 have both redundant and unique roles in the ATM pathway, *Cell Cycle* **7** (2008) 3584–3594.

- [142] I. Cousineau, C. Abaji, A. Belmaaza, BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis., *Cancer research* **65** (2005) 11384–11391.
- [143] W. Friedland, M. Dingfelder et al., Track structures, DNA targets and radiation effects in the biophysical Monte Carlo simulation code PARTRAC, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **711** (2011) 28–40.
- [144] W. Friedland, E. Schmitt et al., Comprehensive track-structure based evaluation of DNA damage by light ions from radiotherapy-relevant energies down to stopping, *Scientific Reports* **7** (2017).
- [145] S. Bekker-Jensen, N. Mailand, Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells, *DNA repair* **9** (2010) 1219–1228.
- [146] T. Neumaier, J. Swenson et al., Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109** (2012) 443–448.
- [147] C. Siebenwirth, *Gezielte Bestrahlung zellulärer und nukleärer Substrukturen am Ionenmikrostrahl SNAKE*, Doktorarbeit, Universität der Bundeswehr München, 2017.

Anhang A

Designzeichnungen des Halters zur Deckglasbestrahlung an SNAKE

Auf den nächsten beiden Seiten ist die Designzeichnung zum Deckglashalter an SNAKE dargestellt. Sie zeigt schematisch die Nase und den Halter mit allen relevanten Maßen. Alle Maßangaben sind in mm. Die Darstellung ist 1:1 auf DIN A2 Papier.

Anhang B

Protokoll zur Zellpräparation

- Vor Fixierung: Medium entfernen und die Probe mit 2 ml PBS (phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung)
- Zellen 15 min bei Raumtemperatur mit 2 % PFA (Paraformaldehyd) (2 % PFA wird bei 72°C in PBS gelöst)
- 1× schnell PBS waschen
- 3 × 5 min mit 2 ml PBS + 0.15 % Triton waschen
- 3 × 10 min mit 2 ml PBS⁺ (PBS⁺ ist eine Lösung aus 100 ml PBS, 0.15 g Glycin und 1 g BSA (bovine serum albumin, Rinderserumalbumin)) blocken
- 95 μ l der primären Antikörperlösung in PBS⁺ auf einer glatten, mit Parafilm ausgelegten Oberfläche tropfen und Deckgläser mit Zellen nach unten darauf legen
- Inkubation über Nacht bei 4°C
- 5 min mit 2 ml PBS waschen
- 10 min mit 2 ml PBS + 0.15 % Triton waschen
- 5 min mit 2 ml PBS waschen
- 7 min mit 2 ml PBS⁺ blocken
- **Ab jetzt müssen alle Schritte im Dunkeln erfolgen!!!**

- 95 μl der sekundären Antikörperlösung in PBS⁺ auf einer glatten, mit Parafilm ausgelegten Oberfläche tropfen und Deckgläser mit Zellen nach unten darauf legen
- 1-2 h bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 \times 5 min mit 2 ml PBS+0.15 % Triton waschen
- 2 \times schnell mit PBS waschen
- 2 \times mit 2 ml PBS⁺ waschen
- 95 μl der EdU Färbelösung auf einer glatten, mit Parafilm ausgelegten Oberfläche tropfen und Deckgläser mit Zellen nach unten darauf legen
- 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 1 \times schnell mit PBS waschen
- 500 μl Hoechstlösung in PBS (1:2000) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 2 \times schnell mit PBS waschen
- 20 μl ProlongGold auf einen Objektträger geben und abgetropftes Deckglas mit den Zellen nach unten darauf platzieren
- über Nacht trocknen lassen und dann im Kühlschrank aufbewahren

Publikationsliste

2012

1. RECRUITMENT KINETICS OF DNA REPAIR PROTEINS MDC1 AND RAD52 BUT NOT 53BP1 DEPEND ON DAMAGE COMPLEXITY
V. Hable, G. A. Drexler, T. Brüning, C. Burgdorf, C. Greubel, A. Derer, **J. Seel (Reindl)**, H. Strickfaden, T. Cremer, A. A. Friedl, G. Dollinger, *PLoS ONE* **7.7** (2012) e41943

2015

2. DETERMINATION OF THE ACCURACY FOR TARGETED IRRADIATIONS OF CELLULAR SUBSTRUCTURES AT SNAKE
C. Siebenwirth, C. Greubel, S. E. Drexler, S. Girst, **J. Reindl**, D. W. M. Walsh, G. Dollinger, A. A. Friedl, T. E. Schmid, G. A. Drexler, *Nucl. Instr. Meth. B* **348** (2015) 137
3. IMPROVED NORMAL TISSUE PROTECTION BY PROTON AND X-RAY MICROCHANNELS COMPARED TO HOMOGENEOUS FIELD IRRADIATION
S. Girst, C. Marx, E. Bräuer-Krisch, A. Bravin, S. Bartzsch, U. Oelfke, C. Greubel, **J. Reindl**, C. Siebenwirth, O. Zlobinskaya, G. Multhoff, G. Dollinger, T. E. Schmid, J. J. Wilkens, *Physica Medica* **31** (2015) 615
4. THE INFLUENCE OF THE CHANNEL SIZE ON THE REDUCTION OF SIDE EFFECTS IN MICROCHANNEL PROTON THERAPY
S. Girst, C. Greubel, **J. Reindl**, C. Siebenwirth, O. Zlobinskaya, G. Dollinger, T. E. Schmid, *Radiat. Environ. Biophys.* **54** (2015) 335

5. PROTON MINIBEAM RADIOTHERAPY REDUCES SIDE EFFECTS IN AN IN-VIVO MOUSE EAR MODEL
S. Girst, C. Greubel, **J. Reindl**, C. Siebenwirth, O. Zlobinskaya, D. W. M. Walsh, K. Ilicic, M. Aichler, A. Walch, J. J. Wilkens, G. Multhoff, G. Dollinger, T. E. Schmid, *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* (2015)
6. NANOSCOPIC EXCLUSION BETWEEN RAD51 AND 53BP1 AFTER ION IRRADIATION IN HUMAN HeLA CELLS
J. Reindl, G. A. Drexler, S. Girst, C. Greubel, C. Siebenwirth, S. E. Drexler, G. Dollinger, A. A. Friedl *Physical Biology* **12.6** (2015) 066005
7. SUB-MICROMETER 20 MEV PROTONS OR 45 MEV LITHIUM SPOT IRRADIATION ENHANCES YIELDS OF DICENTRIC CHROMOSOMES DUE TO CLUSTERING OF DNA DOUBLE-STRAND BREAKS
T. E. Schmid, W. Friedland, C. Greubel, S. Girst, **J. Reindl**, C. Siebenwirth, K. Ilicic, E. Schmid, G. Multhoff, E. Schmitt, P. Kundrat, G. Dollinger, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **793** (2015) 30-40

2016

8. SIMULATION OF CELL SURVIVAL FOR PROTON BROAD AND MINIBEAM RADIOTHERAPY WITH HEXAGONAL AND SQUARE MINIBEAM ALIGNMENT
M. Sammer, S. Girst, C. Greubel, **J. Reindl**, C. Siebenwirth, J. J. Wilkens, T. E. Schmid, G. Dollinger, *Radiotherapy & Oncology* **118.1** (2016) 93-94
9. REDUCED SIDE EFFECTS BY PROTON MINIBEAM RADIOTHERAPY IN A MOUSE EAR MODEL
T. E. Schmid, S. Girst, C. Greubel, **J. Reindl**, C. Siebenwirth, K. Ilicic, D. W. M. Walsh, G. Dollinger, J. J. Wilkens, G. Multhoff, S. E. Combs, *Radiotherapy & Oncology* **118.1** (2016) 95
10. A NEW NANOBODY-BASED BIOSENSOR TO STUDY ENDOGENOUS PARP1 IN VITRO AND IN LIVE HUMAN CELLS

-
- A. Buchfellner, L. Yurlova, S. Nüske, A. M. Scholz, J. Bogner, B. Ruf, K. Zolghadr, S. E. Drexler, G. A. Drexler, S. Girst, C. Greubel, **J. Reindl**, C. Siebenwirth, T. Romer, A. A. Friedl, U. Rothbauer, *PLoS ONE* **11.3** (2016) e0151041
11. SUPERRESOLUTION LIGHT MICROSCOPY SHOWS NANOSTRUCTURE OF CARBON ION RADIATION-INDUCED DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR FOCI
R. Lopez Perez, G. Best, N. H. Nicolay, C. Greubel, S. Rossberger, **J. Reindl**, G. Dollinger, K.-J. Weber, C. Cremer, P. E. Huber, *The FASEB Journal* (2016) fj-201500106R
12. DEPLETION OF HISTONE DEMETHYLASE JARID1A RESULTING IN HISTONE HYPERACETYLATION AND RADIATION SENSITIVITY DOES NOT AFFECT DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR
C. Penterling, G. A. Drexler, C. Böhnland, R. Stamp, C. Wilke, H. Braselmann, R. B. Caldwell, **J. Reindl**, S. Girst, C. Greubel, C. Siebenwirth, W. Y. Mansour, K. Borgmann, G. Dollinger, K. Unger, A. A. Friedl, *PLoS ONE* **11.6** (2016) e0156599
13. LOW LET PROTON MICROBEAM TO UNDERSTAND HIGH-LET RBE BY SHAPING SPATIAL DOSE DISTRIBUTION
C. Greubel, K. Ilicic, T. Rösch, **J. Reindl**, C. Siebenwirth, M. Moser, S. Girst, D. W. M. Walsh, T. E. Schmid, G. Dollinger *Nucl. Instr. Meth. B* (2016) doi:10.1016/j.nimb.2016.11.032

2017

14. CHROMATIN ORGANIZATION REVEALED BY NANOSTRUCTURE OF IRRADIATION INDUCED γ H2AX, 53BP1 AND RAD51 FOCI
J. Reindl, S. Girst, D. W. M. Walsh, C. Greubel, B. Schwarz, C. Siebenwirth, G. A. Drexler, A. A. Friedl, G. Dollinger *Sci. Rep.* **7** (2017) 40616

15. LIVE CELL IMAGING OF MITOCHONDRIA FOLLOWING TARGETED IRRADIATION IN SITU REVEALS RAPID AND HIGHLY LOCALIZED LOSS OF MEMBRANE POTENTIAL
D. W. M. Walsh, C. Siebenwirth, C. Greubel, K. Ilicic, **J. Reindl**, S. Girst, G. Muggiolu, M. Simon, P. Barberet, H. Seznec, H. Zischka, G. Multhoff, T. E. Schmid, G. Dollinger *Sci. Rep.* (2017) in press

Danksagung

Als erstes möchte ich Professor Dr. Günther Dollinger für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe LRT2 durchzuführen und für seine umfassende Betreuung und Unterstützung danken. Seine Ideen, seine Offenheit für Neues und sein klarer Blick für wissenschaftliche Zusammenhänge haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen in der SNAKEBio Gruppe für den tollen Teamgeist während und zwischen den Strahlzeiten und die uneigennützig Zusammenarbeit. Meiner langjährigen Kollegin, guten Freundin und Dienstreisegefährtin Stefanie Girst möchte ich für die Zusammenarbeit während langer Nachtschichten während der Strahlzeiten, das Korrekturlesen so manches Manuskripts und für die intensiven Diskussionen und Gespräche danken. Mein besonderer Dank gilt Christoph Greubel, der mir immer mit seinem kompetenten Rat zur Seite steht und nie müde wird mir zu zuhören. Sein Überblick zu SNAKE und seine Akribie sind mir eine große Hilfe. Außerdem Danken möchte ich Benjamin Schwarz, Matthias Sammer, Christian Siebenwirth und Dietrich Walsh für die Mithilfe (nicht nur) während der Strahlzeiten. Bedanken möchte ich mich auch bei Anderas Bergmaier für das Korrekturlesen der Arbeit und Werner Egger für manche Diskussion zur Auswertung.

Mein Dank gilt auch den vielen Kooperationspartnern, die hier nicht vollständig aufgezählt werden können. Zuerst möchte ich mich bei Anna Friedl bedanken, deren kompetente Beiträge zu Ideen und Diskussionen meine Arbeit stets bereichern und voranbringen. Außerdem danken möchte ich Guido Drexler für die Geduld beim lehren der Zellpräparation und für die Mithilfe nicht nur bei Strahlzeitexperimenten. Dank gilt auch Katarina Ilicic für die Mithilfe bei der Durchführung von Strahlzeiten und Thomas Schmid für so manche fruchtbare Diskussion. Außerdem danken möchte ich Werner Friedland für die spontane Anpassung der Simulation an meine Parameter und das zur Verfügung stellen der Daten für meine Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt allen Operateuren des Beschleunigers, allen voran Sigfried

Koschartz, für die kompetente Arbeit zur Durchführung der Strahlzeiten. Dank gilt auch Wolfgang Engl und Ralf Schubert in der LRT2-Werkstatt für zahlreiche kurzfristige Anfertigungen und Änderungen meist ohne ausgereifte Skizzen.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern, Kollegen und Kollaborationspartnern für die großen und kleinen Dinge des (Arbeits-)Alltags.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie. Allen voran meinem Mann Julian Reindl, der so manche Nacht- und Wochenendschicht ohne murren akzeptiert, mich immer unterstützt und mir den Rücken freihält. Außerdem meiner Schwester Ursula Wiesgickl, die mich mit ihrer liebevollen Art immer wieder erden kann, wenn der Stress mich zu überwältigen droht und ihrem Mann Sebastian und meinem Neffen Leopold. Vor allem danke meinen Eltern Robert und Cornelia Seel für die unglaubliche Unterstützung, die sie mir schon immer zuteil werden lassen. Ihr Glaube an mich und meine Ziele hat mich immer beflügelt.