

Entwicklung und Erprobung eines Aufbaus zur gezielten Bestrahlung einzelner biologischer Zellen an der Schwerionen-Mikrosonde der GSI

Vom Fachbereich Physik
der Technischen Universität Darmstadt

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

genehmigte Dissertation von
Dipl.-Phys. Markus Christian Heiß
aus Mosbach

Referent: Prof. Dr. G. Kraft
Korreferent: Prof. Dr. D. H. H. Hoffmann

Tag der Einreichung: 13.04.2004

Tag der Prüfung: 26.05.2004

Darmstadt 2004

D17

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Einleitung	1
Kapitel 2 Die Mikrosonde	4
2.1 Funktionsweise	4
2.2 Der Bestrahlungsaufbau	5
Kapitel 3 Der X-Y-Tisch	7
3.1 Aufbau	7
3.2 Bewegung	8
3.3 Einbau der Proben	10
Kapitel 4 Das Zellgefäß.....	12
4.1 Verwendete Materialien	13
4.1.1 Gehäuse	13
4.1.2 Folie	14
4.1.3 Dichtungsmaterial	15
4.1.4 Klebstoff	15
4.2 Design des Zellgefäßes	16
4.2.1 Erste Version	16
4.2.2 Zweite Version	17
4.2.3 Dritte Version	19
4.2.4 Vierte Version	20
4.3 Zellwachstum	21
4.3.1 Vorbehandlung der Folie	21
4.3.2 Vorbehandlung des Gehäuses	22
4.3.3 Montage des Zellgefäßes	22
4.3.4 Vorbehandlung der montierten Kammer	22
4.3.5 Einsaat und Kultivierung der Zellen	22
Kapitel 5 Das Vakuumfenster.....	24
5.1 Eigenschaften	24
5.1.1 Mechanische Eigenschaften	24
5.1.2 Eigenschaften zur Trefferdetektion	25
5.2 Getestete Materialien	26
5.2.1 B-dotierter CVD-Diamant	26
5.2.2 Siliziumnitrid (Si ₃ N ₄)-Folien beschichtet mit Gold und CsI	28
5.2.3 Materialauswahl	30

Kapitel 6 Zellerkennung	31
6.1 Hellfeld-Auflichtmikroskopie.....	31
6.2 Dunkelfeld-Auflichtmikroskopie.....	33
6.3 Differentieller Interferenzkontrast	34
6.4 Fluoreszenzmikroskopie	38
Kapitel 7 Die Steuerungssoftware	41
7.1 Datenaustausch	41
7.2 Kalibrierung der Strahlablenkung.....	41
7.3 Kalibrierung der Tischbewegung.....	43
7.4 Eingabe der Probandaten	44
7.4.1 Fläche der Probe	44
7.4.2 Eingabe der Referenzpunkte	44
7.5 Automatische Bestrahlung	45
7.5.1 Anfahren von Positionen.....	45
7.5.2 Objekterkennung.....	46
7.5.3 Objektauswahl.....	46
7.5.4 Strahl und Objekt ausrichten.....	46
7.5.5 Bestrahlung	47
7.5.6 Testbestrahlung.....	47
Kapitel 8 Erste Versuche	48
8.1 Trefferdetektion	48
8.2 Fokussierung des Strahls.....	49
8.3 Kalibrierung der Strahlablenkung.....	50
8.3.1 Kalibrierung mittels Szintillator	50
8.3.2 Kalibrierung mittels STIM.....	51
8.4 Bestrahlungen	51
8.4.1 Bestrahlung von Testproben	51
8.4.2 Testbestrahlung von Zellen.....	53
8.4.3 Zellbestrahlungen zu biologischen Fragestellungen	57
Kapitel 9 Zusammenfassung	59
Literaturverzeichnis.....	61

Kapitel 1

Einleitung

Nachdem Mikrosonden schon seit Längerem in den verschiedensten Gebieten wie Mikrostrukturierung, Lithographie oder der Untersuchung der Wirkung ionisierender Strahlung auf Mikroelektronik Anwendung finden, entwickelte sich in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren auch das Interesse der Radiobiologen an diesen Instrumenten. Die Vorteile der Benutzung einer Mikrosonde gegenüber einer Breitfeldbestrahlung liegen dabei auf der Hand: Sie bietet die Möglichkeit, eine definierte Anzahl Ionen in ausgewählten Bereichen einzelner Zellen zu platzieren und so die deponierte Dosis und sogar deren Verteilung innerhalb der Zelle präzise zu kontrollieren.

An den Instituten, an denen eine solche gezielte Bestrahlung bereits möglich ist, wird damit hauptsächlich an drei Gebieten gearbeitet:

- Die Untersuchung des Strahlenrisikos bei der Bestrahlung mit niedrigen Dosen
Hierbei geht es hauptsächlich um die Erforschung des Effektes, dass Zellen sehr empfindlich auf niedrige Dosen reagieren, während die Strahlenbeständigkeit für höhere Dosen zunimmt ("low-dose hypersensitivity") [MAR93]. Durch die gezielte Bestrahlung kann bei diesen Experimenten die bei der Breitfeldbestrahlung auftretende statistische Verteilung der Ionentreffer pro Zelle vermieden und so wesentlich genauere Aussagen über deren Empfindlichkeit gemacht werden.
- Die Untersuchung des "Bystander-Effekts"
In den letzten Jahren wurde in einer Reihe von Experimenten gezeigt, dass es Wechselwirkungen zwischen bestrahlten und benachbarten unbestrahlten Zellen gibt. Diese führen dazu, dass auch die unbestrahlten Zellen vergleichbare Strahlenschäden wie die bestrahlten zeigen (Bystander-Effekt) [MOT01][MOR03]. Ein typisches Beispiel dafür ist das Experiment von Nagasawa und Little [NAG92], in dem eine Zellpopulation mit einer konventionellen Alpha-Quelle so bestrahlt wurde, dass statistisch weniger als 1% der Zellen von einem Teilchen durchdrungen wurden und trotzdem mehr als 30% der Zellen einen erhöhten Grad an DNA-Schäden zeigten.
Die Fähigkeit, mit einer Mikrosonde während der Experimente die zu bestrahlenden Zellen nach gewissen Kriterien auszuwählen und daher bei der Auswertung sicher zu sein, dass in allen anderen Zellen keine Dosis deponiert wurde, ermöglicht die präzise Untersuchung der verschiedensten Aspekte dieses Effektes [MIC04].
- Untersuchung strahlenempfindlicher Regionen in den Zellen
Mit Mikrosonden können einzelne Ionen in bestimmten Bereichen innerhalb einer Zelle platziert werden, wodurch die Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit zellulärer Regionen möglich wird. So zeigten beispielsweise Untersuchungen am Gray Laboratory (Middlesex, UK) dass auch die Bestrahlung des Zytoplasmas bei menschlichen Fibroblasten zur Induktion von Schäden an der DNA führt [OZO00].

Bereits Mitte der 1980er Jahre wurde im Rahmen einer Promotion an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) eine Einzelionen-Bestrahlungsapparatur konstruiert und an Bakteriensporen erprobt [WEI87]. Mit Hilfe eines aus einer aufgezätzten Ionenspur in Glimmer bestehenden Kollimators konnten dabei bereits Ionen bis 1,4MeV/u mit einer

Genauigkeit von etwa $\pm 1,5\mu\text{m}$ auf der Probe platziert werden. Nach einer weiteren Doktorarbeit, die sich mit der Inaktivierung von Säugetierzellen nach Ionenbeschuss befasste [KRA91], wurde die Arbeit an der Bestrahlungsapparatur jedoch wieder eingestellt.

Die ersten heute noch routinemäßig für den Einsatz in der Radiobiologie genutzten Mikrosonden, die Zellbestrahlungen mit Protonen und α -Teilchen mit Energien bis zu 6MeV erlauben, wurden 1991 an der Columbia Universität (New York, USA) [GEA91] und 1997 am Gray Laboratory [FOL97a][FOL97b] in Betrieb genommen. Mit dem 2001 fertig gestellten Aufbau am Japan Atomic Energy Research Institute (Takasaki, Japan) [KAM01] ist dagegen die Bestrahlung mit allen Ionen von Wasserstoff bis Gold mit Energien bis zu 10MeV/u möglich.

Ähnlich wie die an der GSI entwickelte, nutzen diese drei Apparaturen Kollimatoren, um die gezielte Bestrahlung durchzuführen, wobei darin hauptsächlich Silizium-, Edelstahl- oder Glaskapillaren verwendet werden. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass es zu Streuungen der Teilchen an den Wänden des Kollimators kommt. Dies hat zum einen zur Folge, dass die Energie der Ionen, die die Probe erreichen, nicht mehr genau definiert ist, zum anderen wird der Strahlfokus durch die gestreuten Teilchen deutlich größer als der Durchmesser der Kapillare. So wird für die Mikrosonde am Gray Laboratory angegeben, dass bei der Benutzung einer Glaskapillare mit einer Länge von 1mm und einem Durchmesser von $1\mu\text{m}$ nur etwa 96% der eingestrahnten 3,5MeV Protonen mit einer Genauigkeit von $\pm 2,5\mu\text{m}$ platziert werden konnten [FOL97b]. Bei der Schwerionen-Mikrosonde am Japan Atomic Energy Research Institute liegen sogar nur etwa 85-90% der Teilchen innerhalb eines Bereiches mit $10\mu\text{m}$ Durchmesser [KAM01].

Diese Nachteile können mit fokussierenden Mikrosonden vermieden werden. Bei ihnen wird der Ionenstrahl durch eine Anordnung von Schlitzen und ionenoptischen Komponenten in einen Fokus mit wenigen hundert Nanometern Durchmesser gelenkt. Diese Systeme haben den zusätzlichen Vorteil, dass dieser Zielpunkt durch elektrische oder magnetische Felder bewegt werden kann. So ist es möglich, die Ionen mit Hilfe der Strahlablenkung auf die Positionen der Zellen zu zielen, wodurch die Bestrahlung im Vergleich zu den kollimierenden Mikrosonden, bei denen die Zellen vor die Mikroschlitze gefahren werden müssen, wesentlich schneller durchgeführt werden kann.

Diese Vorteile und das gestiegene Interesse von Radiobiologen an der gezielten Bestrahlung von Zellen sind die Gründe dafür, warum in den letzten Jahren an mehreren Instituten vorhandene fokussierende Mikrosonden so umgerüstet werden, dass damit Zellbestrahlungen möglich sind. So gibt es derartige Aktivitäten beispielsweise an der PTB in Braunschweig [GRE04], am CENBG in Bordeaux (Frankreich) [MOR01] und an der TU München [HAU04].

Ziel dieser Arbeit ist es, auch die Schwerionen-Mikrosonde an der GSI, mit der im Gegensatz zu allen anderen Mikrosonden mit allen Ionen von Kohlenstoff bis Uran mit Energien bis zu 11,4MeV/u gearbeitet werden kann, so zu modifizieren, dass damit Einzelzellbestrahlungen möglich sind. Dazu muss ein Weg gefunden werden, wie der fokussierte Ionenstrahl mit minimaler Streuung aus dem Vakuum des Strahlrohres auf die Zellen, die sich in normalem Umgebungsdruck befinden, gezielt werden kann. Daneben wird zur Bestrahlung mit einer definierten Teilchenanzahl ein zuverlässiger Trefferdetektor benötigt, der die Qualität des Mikrostrahls nicht zerstört. Aufgrund der horizontalen Strahllage muss außerdem ein Gefäß entwickelt werden, in dem die Zellen während der Bestrahlung in vertikaler Position gehalten werden können.

Bei diesen Modifizierungen ist zu beachten, dass an der Mikrosonde neben den radiobiologischen Untersuchungen auch weiterhin Experimente zu Strahlenschäden an Integrierten Schaltkreisen und zur Mikrostrukturierung durchgeführt werden sollen und deshalb ein einfacher Wechsel zwischen den dafür benötigten Bestrahlungsaufbauten möglich sein soll.

Kapitel 2

Die Mikrosonde

2.1 Funktionsweise

Die Mikrosonde, die sich am Ende des Linearbeschleunigers der GSI (UNILAC) befindet, ist ein Instrument, das die Fokussierung des Ionenstrahls bis auf fokale Durchmesser von etwa 500nm erlaubt [FIS85], mit dem aber auch einzelne Ionen mit der gleichen Genauigkeit auf einer Probe platziert werden können [FIS91]. Das dazu verwendete System aus Schlitzen und magnetischen Komponenten ist in Abb. 2.1 dargestellt.

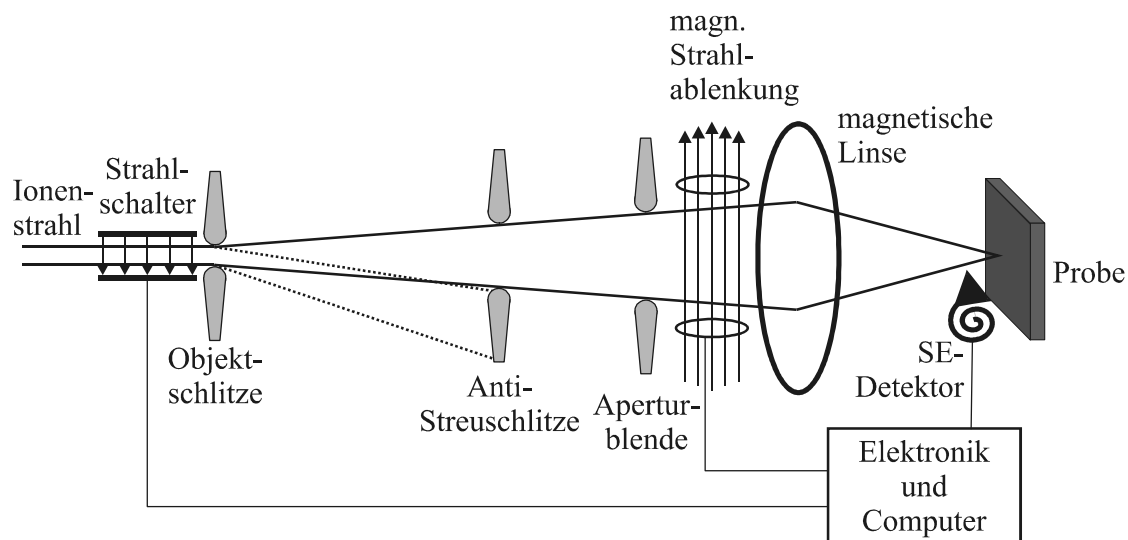


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau der Mikrosonde

Die Ionen gelangen durch die Objektschlitze, die üblicherweise eine Öffnungsfläche von etwa $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ besitzen und daher nur einen kleinen Teil des primären Ionenstrahls passieren lassen, in die Mikrosonde. Dort werden sie von einer magnetischen Quadrupol-Triplett-Linse auf die Probe fokussiert. Durch die Aperturblende mit einem Öffnungsdurchmesser von etwa $100 \mu\text{m}$, die sich direkt vor der Linse befindet, werden deren sphärische und chromatische Aberrationen begrenzt. Zusätzliche Anti-Streuschlitz sorgen dafür, dass nur wenige der an den Kanten der Objektschlitze gestreuten Ionen die Probe erreichen. Diese würden wegen ihrer veränderten Energie und des eventuell veränderten Ladungszustandes den Strahlfokus erheblich aufweiten. Vor der Linse befindet sich eine magnetische Strahlableitung, die es erlaubt, den Fokus in der Objektebene horizontal und vertikal zu bewegen.

Die Detektion der Ionen wird in den meisten Experimenten mit Hilfe der Sekundärelektronen durchgeführt, die beim Auftreffen der Teilchen von der Probe emittiert werden. Daher befindet sich direkt vor der Probe ein Detektor, der in der Lage ist, diese Elektronen nachzuweisen.

Mit dem elektrostatischen Strahlschalter, der sich vor den Objektschlitzen befindet, kann durch Anlegen von 400V der Ionenstrahl innerhalb von 200ns so weit ausgelenkt werden, dass keine Ionen mehr die Probe erreichen. Bei für unsere Versuche typischen Teilchenraten von etwa 1000 Ionen/s und Energien von bis zu 11,4 MeV/u liegt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich nach dem Anlegen der Abschaltspannung noch ein Ion hinter dem Strahlschalter befindet und so das Target erreicht, bei etwa $2,5 \times 10^{-4}$. Bei der Bestrahlung von biologischen Proben kann daher der Effekt von ungewollten Doppeltreffern, die auf die Abschaltzeit der Mikrosonde zurückzuführen sind, vernachlässigt werden.

2.2 Der Bestrahlungsaufbau

Um gezielte Bestrahlungen von Zellen durchführen zu können, mussten einige Veränderungen am Bestrahlungsaufbau hinter der Mikrosonde, in dem sich die Proben während der Experimente befinden, durchgeführt werden. Dieser ist in Abb. 2.2 schematisch mit allen wichtigen Komponenten dargestellt.

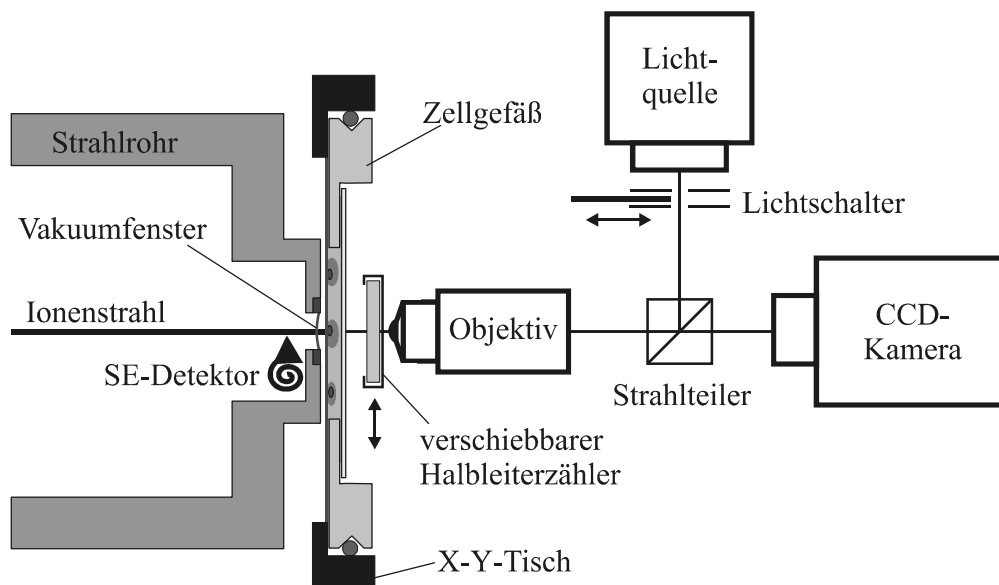


Abb. 2.2 Schematische Abbildung des Bestrahlungsaufbaus

Da die Zellen während der Bestrahlung in Nährmedium aufbewahrt werden sollen, kann der Bereich, in dem sie sich befinden, während der Experimente nicht evakuiert werden. Die Ionen können sich dagegen nur im Vakuum des Strahlrohres, in dem die Wahrscheinlichkeit für Stöße mit anderen Teilchen sehr gering ist, über längere Strecken geradlinig bewegen. Daher befindet sich am Ende des Strahlrohres ein dünnes Fenster, das Luftinbrüche in das Vakuum verhindert und das der fokussierte Ionenstrahl durchdringen kann, ohne allzu stark gestreut zu werden.

Durch die horizontale Lage des Strahls in der Mikrosonde wird ein Gefäß benötigt, das die Zellen während der Bestrahlung in einer Nährlösung in vertikaler Position hält. Der Boden dieses Gefäßes, an den sich die Zellen anhaften sollen und durch den sie auch bestrahlt werden, muss dabei möglichst dünn sein, um die Streuung des Strahls zu minimieren. Das Zellgefäß ist in einen X-Y-Tisch eingebaut, der die Bewegung der Probe mit einer

Genauigkeit von weniger als einem Mikrometer erlaubt. Hinter der Probe befindet sich ein optischer Aufbau, der neben Auflicht- und Nomarski- auch Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Durch einen Halbleiterzähler, der hinter die Probe bewegt werden kann, besteht außerdem die Möglichkeit, Scanning Transmission Ion Microscopy, ein Mikroskopieverfahren, bei dem der Energieverlust an jeder Stelle der Probe gemessen wird, durchzuführen.

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Komponenten dieses Aufbaus genauer beschrieben.

Kapitel 3

Der X-Y-Tisch

Da der Ionenstrahl mit Hilfe der magnetischen Strahlablenkung nur über einen Bereich von etwa einem Quadratmillimeter ausgelenkt werden kann, muss die Probe bei der Bestrahlung größerer Flächen vor dem Austrittsfenster des Strahls bewegt werden können. Hierzu dient der selbst konstruierte X-Y-Tisch, der sich auf dem Endflansch des Strahlrohres befindet, und in den die Proben während der Bestrahlung eingesetzt werden (siehe Abb. 3.1).

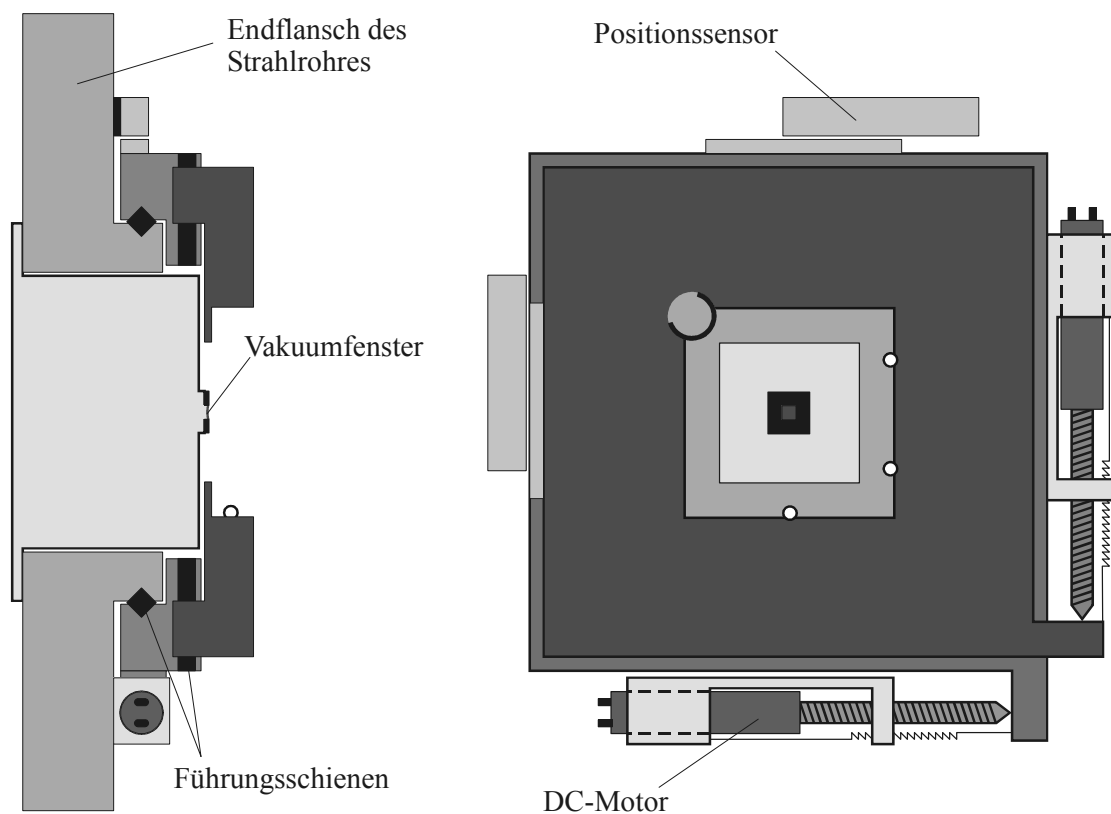


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des X-Y-Tisches (links: Seitenansicht; rechts: Draufsicht)

3.1 Aufbau

Der Tisch besteht aus zwei übereinander liegenden Formteilen aus Metall, die auf den Endflansch des Strahlrohres montiert sind. Diese Teile sind mit ihrer Unterlage jeweils über Führungsschienen verbunden, so dass sie gegen diese in eine Richtung frei bewegt werden können. Da diese beiden Bewegungsrichtungen senkrecht zueinander stehen, können Proben, die sich im oberen Formteil des Tisches befinden, durch entsprechende

Verschiebung der einzelnen Tischebenen sowohl horizontal als auch vertikal in einem Bereich von jeweils etwa 10mm verfahren werden.

In der Mitte der oberen Platte befindet sich eine quadratische Aussparung, in die die Proben eingesetzt werden können. Über eine kleine Feder in der linken oberen Ecke der Aussparung werden sie gegen drei an den gegenüberliegenden Seiten angebrachten Saphirkugeln gedrückt. Diese greifen in die an den Kanten der Proben angebrachten V-Nuten (siehe Kapitel 4 "Das Zellgefäß") und sorgen dafür, dass die Proben vollflächig auf dem unteren Anschlag aufliegen. So ist gewährleistet, dass der Abstand zwischen dem Vakuumfenster und der Unterkante der Probe nicht mehr als 100µm beträgt.

3.2 Bewegung

Zur Bewegung des Tisches dienen zwei Gleichspannungsmotoren, die jeweils eine Feingewindeschraube mit einer Steigung von 0,25mm/Umdrehung antreiben. Die aktuelle Position des Tisches kann über zwei Positionssensoren, die auf Basis der photoelektrischen Abtastung zweier gegeneinander verschiebbarer optischer Strichgitter arbeiten, eingelesen werden. Hierzu wurden die entsprechenden Glasmaßstäbe zweier Messtaster des Typs MT2501 der Firma HEIDENHAIN am Tisch angebracht. Diese Komponenten haben den Vorteil, dass jeweils ein integrierter Referenzpunkt eingebaut ist, über die der Tisch in eine definierte Ausgangsposition gefahren werden kann.

Die Motoren des Tisches werden direkt von der Steuerungssoftware über zwei analoge Spannungsausgänge am Computer (siehe Kapitel 7 "Die Steuerungssoftware") gesteuert. Um vorgegebene Koordinaten präzise und schnell anfahren zu können, werden dabei die angelegten Spannungen als Funktion der Differenz zwischen aktueller und Zielposition berechnet mit:

$$U_{x/y} = \begin{cases} 6V & \text{für } 8,5\mu\text{m} < d_{x/y} \\ 0,8V + \left(\frac{d_{x/y}^4}{1000\mu\text{m}^4} \right) V & \text{für } 0,05\mu\text{m} \leq d_{x/y} < 8,5\mu\text{m} \\ 0V & \text{für } d_{x/y} < 0,05\mu\text{m} \end{cases}$$

wobei mit $d_{x/y}$ der Abstand zwischen Soll- und Ist-Position in x- bzw. y-Richtung bezeichnet wird.

Wie im Graph dieser Funktion (Abb. 3.2) zu sehen ist, wird bis zu einem Abstand von etwa 8,5µm zwischen der aktuellen und der Zielposition die Maximalspannung von 6V an die Motoren angelegt, wodurch eine Fahrgeschwindigkeit von etwa 250µm/s erreicht wird. Erst beim Unterschreiten dieses Abstands wird die Motorspannung und damit die Geschwindigkeit der Tischbewegung kontinuierlich bis auf 0,8V reduziert und bei einem Abstand von 0,05µm auf 0V gesetzt, wodurch ein sehr präzises Anfahren der erwünschten Position möglich ist.

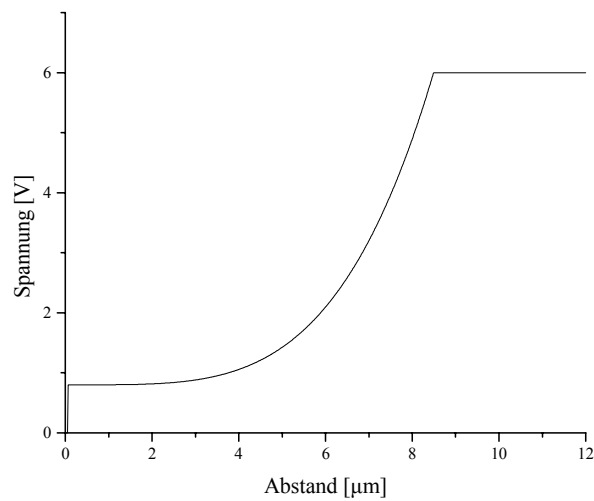


Abb. 3.2 Darstellung der beim Anfahren bestimmter Koordinaten an die Motoren angelegte Spannung als Funktion des Abstandes zwischen aktueller und Zielposition

Mit diesen Einstellungen wurden Versuche zur Präzision des Tisches beim Anfahren von Koordinaten durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 3.3 dargestellt sind.

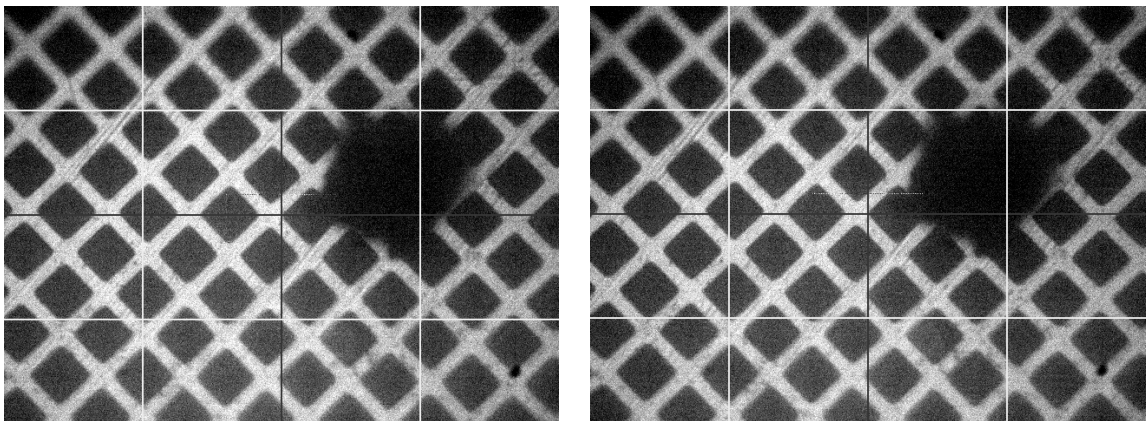


Abb. 3.3 Ergebnisse zur Untersuchung der Anfahrpräzision des Tisches: links: Ausschnitt der Probe (Kupfergitter, Gitterkonstante = $12,5\mu\text{m}$); rechts: Aufnahme der Probe, nachdem der Tisch bewegt wurde und die Koordinate der ursprünglichen Stelle wieder angefahren wurde. Der schwarze Punkt ist Schmutz auf der Probe, der zeigt, dass keine Verschiebung um ein Vielfaches der Gitterkonstanten stattgefunden hat

Das linke Bild zeigt den Ausschnitt eines Kupfergitters mit einer Gitterkonstante von $12,5\mu\text{m}$. Die Aufnahme im rechten Bild entstand, nachdem mit dem Tisch zehn verschiedene Positionen im gesamten erreichbaren Bereich und anschließend wieder die Koordinate des Ausgangspunktes angefahren wurden. Der dunkle Fleck in den Bildern ist Schmutz auf der Probe, der zeigt, dass es sich jeweils um den selben Ausschnitt der Probe handelt. Zum besseren Vergleich der Bilder sind darin dünne Linien eingezeichnet, die sich jeweils an der gleichen Position im Bild befinden. Die Differenz der Probenpositionen in

diesen beiden Bildern zeigt, dass die Präzision des Tisches beim Anfahren von Koordinaten im Bereich einiger zehntel Mikrometer liegt.

3.3 Einbau der Proben

Die im Unterkapitel 3.1 "Aufbau" beschriebene Probenhalterung im X-Y-Tisch soll gewährleisten, dass sich die Proben nach dem Einsetzen immer in der gleichen Position befinden. So bestünde die Möglichkeit, die Zellerkennung an einem externen Mikroskop mit gleicher Halterung durchzuführen und bei der Bestrahlung die dort bestimmten Koordinaten der Zellen zu übernehmen.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Versuche zur Reproduzierbarkeit der Positionierung beim Einsetzen der Probe durchgeführt. Hierzu wurde eine Probe vier Mal in die Halterung eingesetzt und jeweils eine Aufnahme von ihr gemacht. Die dabei entstandenen Bilder, in die wiederum Hilfslinien eingefügt wurden, sind in Abb. 3.4 zu sehen.

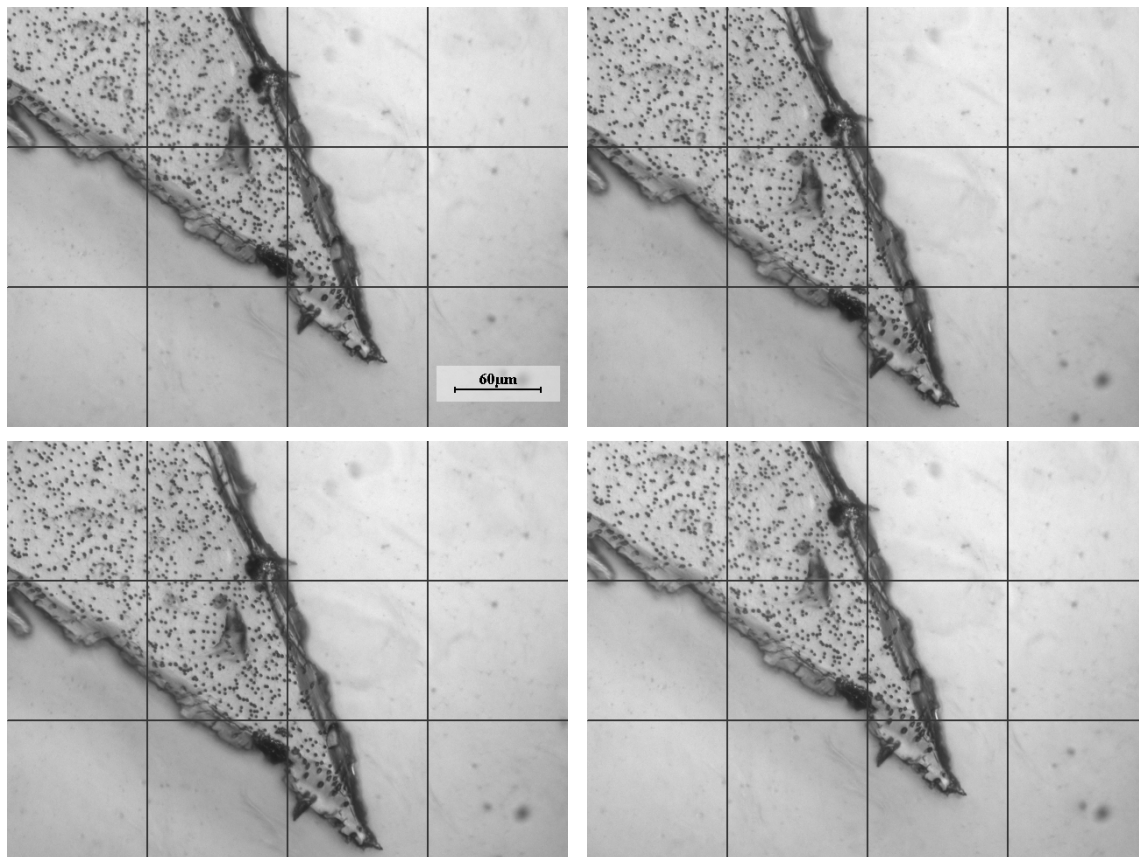


Abb. 3.4 Versuche zum reproduzierbaren Einbau der Probe: Die Probe wurde dreimal aus- und wieder eingebaut und jeweils eine Aufnahme gemacht

Der Vergleich dieser Bilder zeigt, dass sich die Position der Probe bei erneutem Einsetzen in die Halterung des Tisches um bis zu $40\mu\text{m}$ verändern kann. Bei solchen Schwankungen ist die direkte Übernahme der auf einem externen Mikroskop bestimmten Koordinaten von Zellkernen zur Bestrahlung nicht möglich. Da die Genauigkeit aber dennoch ausreicht, um

Objekte, deren Positionen bekannt sind, ins Bildfeld der Kamera zu fahren, können externe Koordinaten zum groben Anfahren der Objekte verwendet werden.

Dies ist bei solchen Experimenten interessant, bei denen nur wenige Zellen auf einer großen Probe verteilt sind. Dabei kann das sehr zeitaufwändige Absuchen der gesamten Probenfläche in der Mikrosonde mit einem Bildfeld von etwa $300\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ durch die wesentlich schnellere Bestimmung der Zellpositionen in einem entsprechenden externen Mikroskop ersetzt werden. Nach der Übernahme und dem Anfahren der dort bestimmten Koordinaten muss dann allerdings nochmals eine Objekterkennung in der Mikrosonde durchgeführt werden, bevor die Bestrahlung durchgeführt werden kann.

Obwohl bei dieser Methode die Zellerkennung zweimal durchgeführt werden muss, kann doch die Bestrahlungszeit und damit der Stress, dem die Zellen ausgesetzt sind, deutlich reduziert werden.

Kapitel 4

Das Zellgefäß

Das Zellgefäß, in dem die Zellen kultiviert und bestrahlt werden und in dem auch die Beobachtungen nach der Bestrahlung stattfinden, wurde speziell für die Experimente an der Mikrosonde konstruiert (siehe Abb. 4.1).

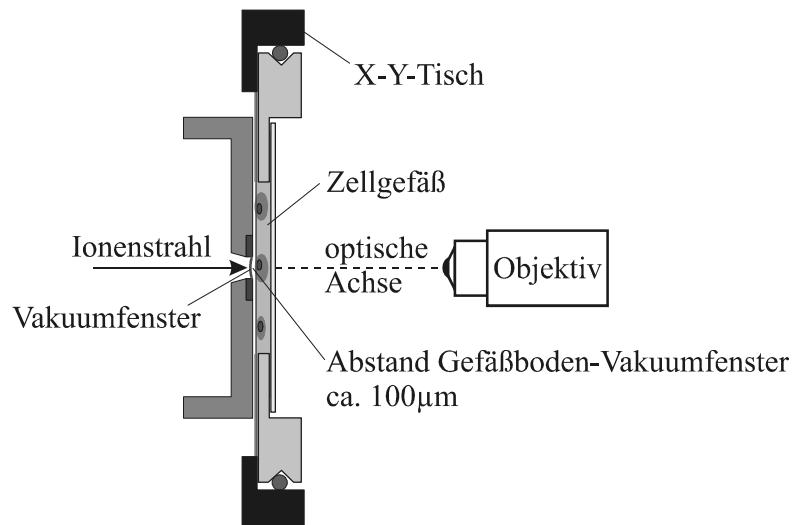


Abb. 4.1 Schematische Abbildung des eingebauten Zellgefäßes

Um die Präzision bei der gezielten Zellbestrahlung durch Streuung der Ionen in der Eintrittsfolie nicht mehr als notwendig zu beeinträchtigen, sollte der Boden des Zellgefäßes, auf dem sich die Zellen anheften und durch den sie bestrahlt werden, aus einer möglichst dünnen Folie bestehen. So kann die Wahrscheinlichkeit für nukleare Wechselwirkungen in diesem Material minimiert werden. Die Streuung der Teilchen durch elektronischen Energieverlust kann aufgrund der kurzen Distanz zwischen Streuzentrum und Objekten dagegen vernachlässigt werden.

Wegen der horizontalen Lage des Strahls in der Mikrosonde müssen die Zellgefäße verschließbar sein, sodass die Zellen senkrecht zum Strahl in einer Nährlösung gehalten werden können. Der dabei verwendete Deckel muss optisch transparent sein, da sich die Optik zur Zellerkennung hinter dem Zellgefäß befindet.

Die Zellgefäße sollten außerdem so gefertigt sein, dass sie präzise in den X-Y-Tisch passen. So kann zum einen sichergestellt werden, dass der Abstand zwischen Vakuumfenster und dem Boden der Kammer, der auch die Streuung der Ionen beeinflusst, gering ist. Zum anderen ermöglicht das reproduzierbare Einsetzen der Probe die Übernahme von auf einem externen X-Y-Tisch bestimmte Zellpositionen für die Bestrahlung.

Neben den technischen Eigenschaften ist es für biologische Experimente von sehr großer Bedeutung, dass sich die Zellen in den Kammern möglichst ähnlich verhalten, wie sie es auch in Standard-Petrischalen tun. Dies ist besonders bei der Materialauswahl und der

Vorbehandlung der Kammern zu berücksichtigen.

Im Folgenden wird die Entwicklung des aktuellen Zellgefäßes beschrieben, wobei bei der Darstellung der Versionen auf die bei der jeweiligen Konstruktion aufgetretenen Probleme eingegangen werden wird.

4.1 Verwendete Materialien

Neben der mechanischen Tauglichkeit ist der wichtigste Aspekt bei der Materialauswahl deren Einfluss auf die Zellen. Um diesen zu testen, wurden für einige wichtige Materialien Wachstumskurven von Zellen, die mit ihnen in Kontakt waren, aufgenommen und mit denen unbeeinflusster Zellen verglichen. Dazu wurden in Standard-Petrischalen (NUNC, Wiesbaden; Fläche = 8,5 cm²) je 500 CHO-K1 Zellen eingesät und das zu testende Material mit in das Nährmedium¹ gegeben. Etwa eine Stunde nach der Aussaat wurden in jeder Schale mit Hilfe eines computergesteuerten Verschiebetisches die Positionen von etwa 50 Zellen bestimmt und gespeichert. Im Abstand von etwa zwölf Stunden wurden diese Positionen wieder angefahren und die Anzahl der Zellen dort ermittelt. So konnte für jede Probe die Wachstumsrate direkt über die Zellzahlen bestimmt werden (siehe als Beispiel Abb. 4.2). Die Diagramme der entsprechenden Wachstumskurven sind bei den einzelnen Materialien im Vergleich zu den Referenzproben dargestellt.



Abb. 4.2 Aufnahmen einer Position 9, 45 und 80 Stunden nach Aussaat der Zellen zur Messung von Wachstumsraten

4.1.1 Gehäuse

Von Beginn an wurde für die Gehäuse und Deckel der Zellgefäße der an der GSI häufig eingesetzte Edelstahl 1.4301 verwendet. In entsprechenden Versuchen zeigte sich, dass das Zellwachstum durch den Kontakt des Nährmediums mit diesem Material nicht beeinflusst wird (siehe Abb. 4.3), weshalb es bei allen bisher produzierten Kammern verwendet wurde.

¹ CHO-K1-Zellen wurden in Hams F12 Medium (Biochrom, Berlin) mit 1% Penicillin/Streptomycin, 10% fötalem Kälberserum und 1% stabilem Glutamin bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 5%CO₂ kultiviert.

Die verwendeten humanen AG1522 Fibroblasten (Coriell Cell Repository, Camden, NJ, USA) wurden in EEMEM-Nährmedium (Bio-Whittaker, Belgien) mit 1% Penicillin/Streptomycin, 15% fötalem Kälberserum und 1% stabilem Glutamin bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 5%CO₂ kultiviert. Während der Bestrahlung wurde dieses Medium durch solches ersetzt, das 20mM HEPES (pH 7,2) enthielt.

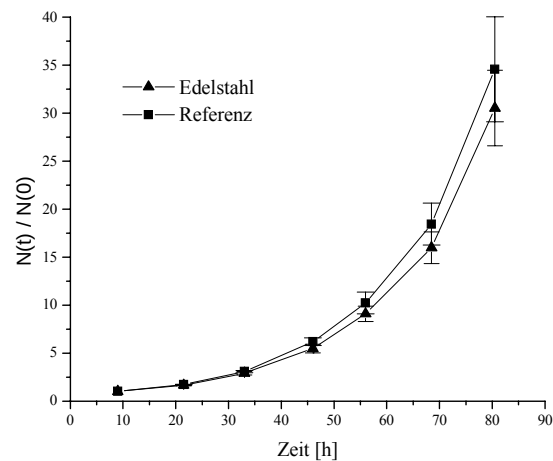


Abb. 4.3 Wachstumskurve unter dem Einfluss von Edelstahl im Vergleich zu einer Referenzschale

Der einzige Nachteil des Edelstahls liegt darin, dass er schwierig zu bearbeiten ist. Aus diesem Grunde wurde auch der Einsatz von Aluminium für Gehäuse und Deckel in Erwägung gezogen. Allerdings konnten aus zeitlichen Gründen bisher keine entsprechenden Wachstumskurven aufgenommen werden.

4.1.2 Folie

Die Folie, die den Boden des Zellgefäßes bildet, sollte möglichst dünn sein, um die Streuung der Ionen zu minimieren, muss dabei aber auch so stabil sein, dass sie im normalen Umgang nicht zerstört wird. Um die Zellerkennung vor und die Beobachtung nach der Bestrahlung nicht zu erschweren, sollte die Folie außerdem optisch transparent und nicht fluoreszierend sein. Wichtig ist zudem, dass sich die Zellen auf dem Material kultivieren lassen und in ihrem normalen Wachstum möglichst nicht beeinflusst werden.

Für diesen Zweck wurden mehrere Materialien in Erwägung gezogen:

- Polypropylen:
Dieses Material wird bei den Versuchen im Gray-Lab benutzt [FOL97a]. Es ist optisch transparent und besitzt keine Eigenfluoreszenz. Herstellungsbedingt besitzen dünne Folien dieses Materials optisch sichtbare Strukturen, die aber bei der verwendeten Zellerkennungsmethode nicht störend wirken. Die Folien sind ab einer Dicke von $4\mu\text{m}$ kommerziell erhältlich und auch in diesen Dicken noch sehr stabil.
- Mylar-Folie (Polyethylenterephthalat):
Auch dieses Material wird im Gray-Lab als Trägerfolie in den dort verwendeten Zellgefäßen verwendet [FOL97a]. Im optischen Bereich ist es transparent, zeigt aber bei Anregung mit UV-Licht Eigenfluoreszenzen, die speziell bei der Zellerkennung mit Fluoreszenzmethoden sehr störend sind. Dieses Material kann auch in Dicken unter $1\mu\text{m}$ erworben werden und ist mechanisch noch stabiler als Polypropylen.
- Biofolie:
Diese in den Zellkammern der PTB verwendete Trägerfolie [GRE04] wird eigens für die Benutzung im biologischen Bereich hergestellt [Vivascience, Hannover]. Optisch ist sie transparent und zeigt auch keine Eigenfluoreszenzen. Problematisch ist hingegen, dass sie erst in Dicken ab $11\mu\text{m}$ erhältlich ist.
- Polycarbonat und Polyimid:
Auch diese beiden Materialien wurden in Erwägung gezogen. Sie sind aber optisch

nicht transparent und zeigten bei Anregung mit UV-Licht starke Fluoreszenzerscheinungen, die spätestens bei der Auswertung der Proben große Probleme bereitet hätten.

Unter Berücksichtigung der Eigenschaften der einzelnen Materialien ist Polypropylen als Trägerfolie für die Zellgefäße am besten geeignet. Um darauf erfolgreich Zellen wachsen zu lassen, ist eine Vorbehandlung der Folie notwendig, die im Unterkapitel 4.3 „Zellwachstum“ beschrieben wird.

4.1.3 Dichtungsmaterial

In einigen Versionen der Zellkammern (siehe Unterkapitel 4.2 „Design des Zellgefäßes“) wurden Dichtungsringe zum Abdichten der Kammer oder zum Spannen der Bodenfolie verwendet. Nachdem sich herausstellte, dass das anfangs benutzte Dichtungsmaterial "Perbunan" toxisch ist, wurden Silikon und Teflon als Ersatz getestet. In Versuchen zum Zellwachstum zeigte sich, dass Teflon die Vermehrung der Zellen praktisch nicht beeinflusst (siehe Abb. 4.4), während bei Silikon ein leicht verringertes Wachstum festgestellt wurde. Teflon kann also problemlos in der Kammer eingesetzt werden, während bei Silikon darauf geachtet werden sollte, dass es möglichst nicht mit dem Nährmedium in Kontakt kommt.

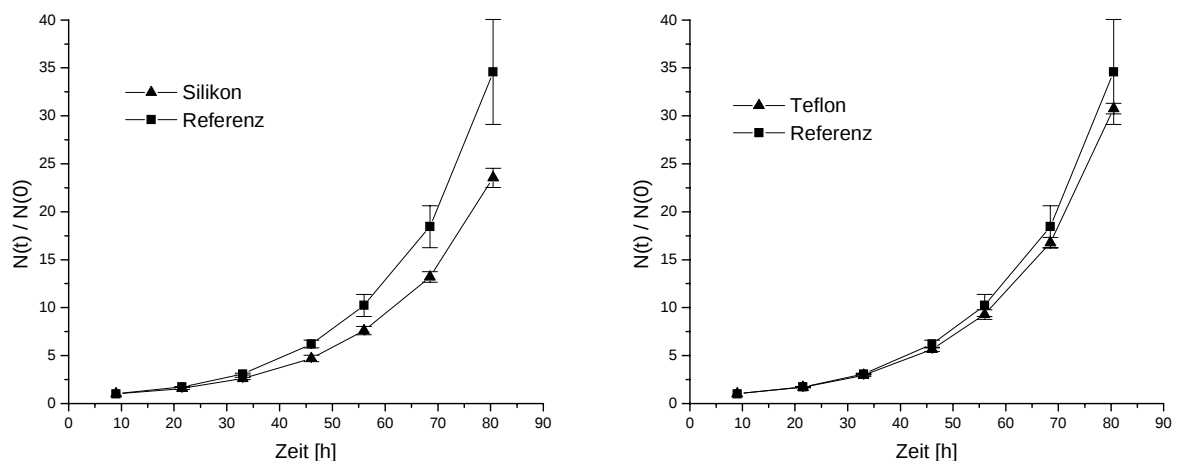


Abb. 4.4 Wachstumskurven unter dem Einfluss von Silikon (links) und Teflon (rechts) im Vergleich zu einer Referenzschale

4.1.4 Klebstoff

In den verschiedenen Varianten des Zellgefäßes wurde immer wieder Klebstoff verwendet, mit dem zuerst ein Glas im Deckel, später die Folie auf dem Boden der Kammer befestigt wurde. Bei dessen Auswahl war neben der Klebekraft wichtig, dass er wasserfest und vor allem nicht toxisch ist. Es stellte sich heraus, dass die Zellen absterben, wenn der an der GSI verwendete Standard-Klebstoff „UHU-Plus endfest 300“ mit dem Nährmedium in Kontakt ist.

Bei der Suche nach einem möglichst chemikalienfreien Klebstoff-Ersatz entstand die Idee, Wachs zu verwenden. Während sich in den Wachstumsversuchen Bienenwachs als nicht zellfreundlich herausstellte, zeigten die Zellen bei Kontakt mit handelsübliches Kerzenwachs (Stearin) keine Veränderungen in der Wachstumsrate (siehe Abb. 4.5)

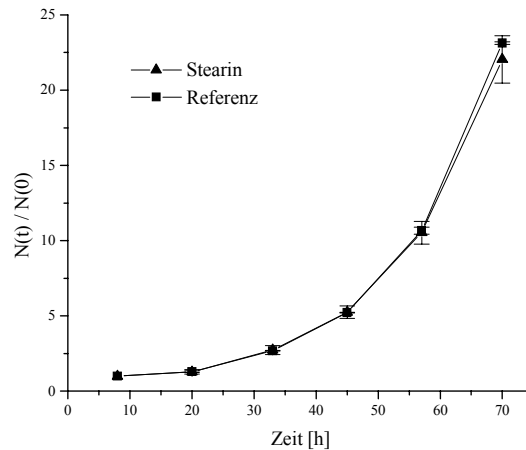


Abb. 4.5 Wachstumskurven unter dem Einfluss von Stearin im Vergleich zu einer Referenzschale

Da die Klebekraft des Stearin ausreicht, um die Polypropylenfolie auf dem Boden der Kammer zu befestigen und außerdem Klebstoffreste nach dem Gebrauch der Kammer sehr einfach durch Erhitzen entfernt werden können, wird in den aktuellen Versionen des Zellgefäßes nur noch dieser Klebstoff verwendet.

4.2 Design des Zellgefäßes

Das Design des Zellgefäßes veränderte sich im Laufe der Zeit entsprechend den jeweils gewonnenen Erfahrungen und Versuchsergebnissen. Hier sollen die wichtigsten Konstruktionen und Ergebnisse dargestellt werden.

4.2.1 Erste Version

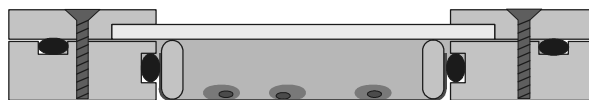


Abb. 4.6 Schematische Darstellung der ersten Version des Zellgefäßes

Bei der ersten Version der Zellkammer (siehe Abb. Abb. 4.6) wird die Bodenfolie zwischen einen Metallring und einen elastischen Dichtungsring geklemmt, um ein Verkleben des Bodens zu vermeiden und eine einfache Wiederverwendung des Zellgefäßes zu ermöglichen. Das Gefäß kann mit einem Deckel aus Edelstahl verschlossen werden, der in der Mitte ein mit einem Deckglas abgedichtetes Fenster besitzt, durch das die Zellen mikroskopiert werden können. Dieser Deckel wird mit vier Schrauben am Zellgefäß

befestigt, wobei ein weiterer Dichtungsring das Austreten von Flüssigkeit aus der Kammer verhindert.

Diese Konstruktion erlaubt eine sehr schnelle und einfache Montage der Folie in der Kammer (siehe Abb. 4.7). Da außerdem keine wärmeempfindlichen Materialien verwendet werden, können die montierten Zellgefäße komplett in einem Autoklaven sterilisiert werden.

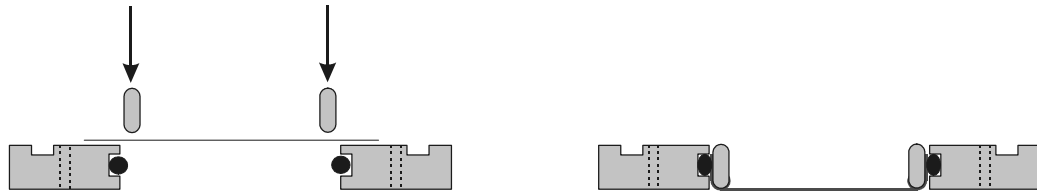


Abb. 4.7 Einbau der Bodenfolie in die erste Version des Zellgefäßes

Nachteilig an diesem Design ist, dass durch die Flexibilität des Dichtungsringes, mit der die Folie gespannt wird, diese nicht zwingend in der Ebene des Zellkörperbodens liegt. Dies hat zur Folge, dass der Luftspalt zwischen Vakuumfenster und Folie größer als die angestrebten 100µm sein kann. Außerdem ist bei einer Schiefelage der Folie ein Nachfokussieren der Optik beim Mikroskopieren der Zellen notwendig, wenn die Kammer im X-Y-Tisch bewegt wird.

Aus diesen Gründen und durch Anregung der in der PTB benutzten Kammer [FRA02] [GRE04], entschieden wir uns, die Folie auf den Boden des Zellgefäßes zu kleben.

4.2.2 Zweite Version

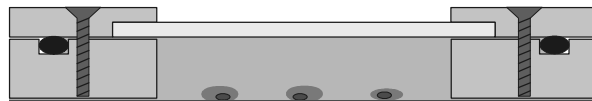


Abb. 4.8 Schematische Darstellung der zweiten Version des Zellgefäßes

Wie in Abb. 4.8 zu sehen ist, unterscheidet sich die zweite Version der Zellkammer von der ersten nur darin, dass die Folie, die den Boden der Kammer bildet, nicht geklemmt, sondern auf das Gefäß geklebt wird. Hierzu wird, wie in Kapitel 4.1 „Verwendete Materialien“ bereits erwähnt, Stearin verwendet, das einen Schmelzpunkt von ca. 60°C besitzt. Deshalb ist es nicht mehr möglich, die kompletten Zellgefäße im Autoklaven zu sterilisieren. Stattdessen wurden Anfangs die einzelnen Komponenten vor der Montage autoklaviert und danach nochmals in 70%igem Ethanol sterilisiert. Bald darauf stellten wir jedoch fest, dass die Sterilisation des montierten Gefäßes in Ethanol ausreicht (siehe auch Kapitel 4.3 „Zellwachstum“).

Mit diesen Zellgefäßen wurden dann die ersten Versuche im Bestrahlungsaufbau durchgeführt, wobei neue Schwierigkeiten auftraten:

- Beim Schließen des Deckels entsteht in der Kammer ein Überdruck, sobald der Deckel voll auf dem Dichtungsring aufliegt und die Befestigungsschrauben weiter angezogen werden (siehe Abb. 4.9). Dadurch kommt es zu einer Ausbeulung der Folie, die dazu führt, dass die Folie das Vakuumfenster berührt. Dabei besteht die Gefahr, dass das Zellgefäß

oder das Vakuumfenster beim Verfahren des Tisches zerstört werden.

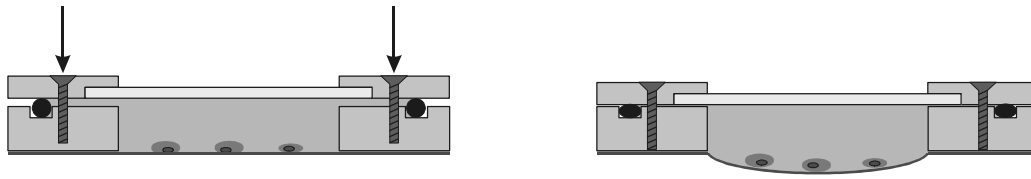


Abb. 4.9 Schematisch Darstellung der Folienausbeulung beim Schließen der Kammer

Abhilfe für dieses Problem schaffte ein kleines Loch im Deckel innerhalb des Dichtungsringes, das für konstanten Druck im Innern der Kammer sorgt. Diese Öffnung hat aber zur Folge, dass die Sterilität der Probe nicht mehr sichergestellt ist.

- Beim Einsetzen der Kammer in den X-Y-Tisch ist nicht gewährleistet, dass diese vollflächig an den Anschlägen des X-Y-Tisches anliegt. Dadurch kann der Luftspalt zwischen Vakuumfenster und Probe größer als die geplanten $100\mu\text{m}$ werden. Außerdem ist dann ein Nachfokussieren des Mikroskops beim Verfahren des Tisches notwendig. Dieses Problem wurde durch zwei V-förmige Nuten an den Seiten des Zellgefäßes, an denen es gegen die Saphirkugeln (siehe Kapitel 3 "Der X-Y-Tisch") gedrückt wird, gelöst. Diese sorgen dafür, dass eine zusätzliche Kraft auf die Kammer ausgeübt wird, die sie in Richtung der Anschläge drückt.

- Beim Schließen der Kammer kam es häufig vor, dass durch eingeklemmtes Dichtungsmaterial der Deckel nicht vollständig auf dem Gefäß auflag. Da er daher nach dem Einbau des Zellgefäßes in die Mikrosonde nicht ganz senkrecht zur optischen Achse der Optik stand, kam es zum in Abb. 4.10 dargestellten Fehler bei der Positionsbestimmung der Zellen.

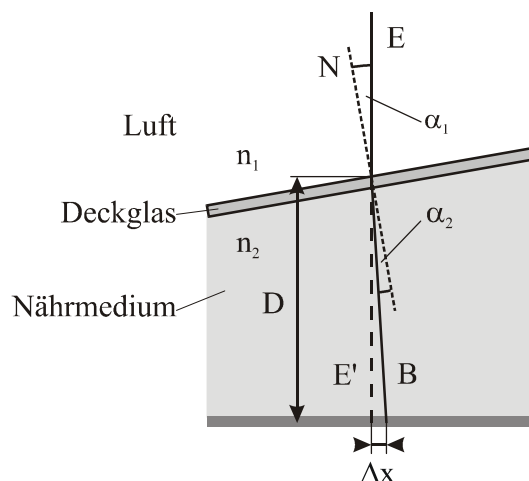


Abb. 4.10 Darstellung zum Fehler bei der Positionsbestimmung durch eine schiefe Oberfläche

Der einfallende Lichtstrahl E wird an der Grenzfläche Luft-Deckglas und Deckglas-Nährmedium gemäß dem Snelliusschen Brechungsgesetz

$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

zur Normalen N hin gebrochen. Dabei bezeichnen n_1 und n_2 die Brechungsindizes des Mediums, aus dem der Strahl kommt bzw. in das er eindringt. In unserer Betrachtung wird dabei nur die Brechung im Nährmedium betrachtet, da der zusätzliche Versatz im Deckglas wegen dessen geringer Dicke vernachlässigt werden kann.

Die Distanz zwischen wirklicher und beobachteter Position des Objektes, also der Abstand zwischen ungebrochenem Strahl E' und gebrochenem Strahl B in der Objektebene kann dann berechnet werden mit:

$$\Delta x = D \cdot \tan(\alpha_1 - \alpha_2)$$

Um den Einfluss dieses Fehlers abschätzen zu können, wurde Δx für einen einseitigen Abstand des Deckels von der Oberfläche des Gehäuses von 0,2mm berechnet. Dabei tritt mit den Abmessungen der zweiten Version des Zellgefäßes eine Bildverschiebung von etwa 5 μ m auf. Bei Zellkerndurchmessern im Bereich von etwa 10 μ m wäre durch eine solche Ungenauigkeit unklar, ob ein Ion, das auf das Zentrum des Zellkerns gezielt wurde, diesen überhaupt durchquert.

Um diesem Problem zu begegnen, wurde bei der nächsten Version darauf geachtet, dass der Deckel immer möglichst eben auf dem Metall aufsitzt.

- Die Dicke der Schicht des Nährmediums beeinträchtigt die Qualität, mit der die Zellen mikroskopiert werden können. Dies machte sich speziell bei der Fluoreszenzmikroskopie durch wesentlich längere Belichtungszeiten im Vergleich zu einer dünnen Mediumsschicht bemerkbar. Deshalb wurde die Schichtdicke des Nährmediums, von der auch der optische Versatz linear abhängt, verringert.

4.2.3 Dritte Version



Abb. 4.11 Schematische Darstellung der dritten Version des Zellgefäßes

Bei der dritten Version des Zellgefäßes (siehe Abb. 4.11) wurde die Schichtdicke des Nährmediums bei geschlossener Kammer von 2,0mm auf 0,5mm reduziert, was das Mikroskopieren vereinfacht und den optischen Fehler bei gekipptem Deckel im Vergleich zur vorhergehenden Version um den Faktor vier verkleinert.

In Anlehnung an das bei der PTB verwendete Zellgefäß [FRA02] [GRE04] wird die Kammer durch ein einfaches Deckglas verschlossen, das auf das Metall aufgelegt wird. So kann überflüssiges Nährmedium leicht entweichen und die Ausbeulung der Folie durch Überdruck verhindert werden.

Die Haftung des Deckglases wird durch die Oberflächenspannung des zwischen Glas und Metall eingeschlossenen Nährmediums gewährleistet. Da in diesem Fall keine äußeren

Kräfte auf das Deckglas einwirken, kann davon ausgegangen werden, dass es immer vollflächig auf dem Edelstahl aufliegt und damit nach dem Einbau des Gefäßes in die Mikrosonde senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops steht.

Bei Experimenten mit diesem Zellgefäß trat ein neues Problem auf: An den Rändern des Deckglases verdunstet Nährmedium, das durch die Kapillarkräfte, die in der dünnen Schicht zwischen Deckglas und Metall entstehen, aus dem Innern der Kammer ständig ersetzt wird. Dadurch entsteht in der Kammer ein Unterdruck, der eine Beulung der Folie nach innen bewirkt. Dies hat bei einer Bestrahlung den Nachteil, dass sich zum Einen der Luftspalt zwischen Vakuumfenster und Folie vergrößert, wodurch die Ionen stärker gestreut werden, zum Anderen dadurch ein Nachfokussieren der Optik beim Mikroskopieren notwendig wird.

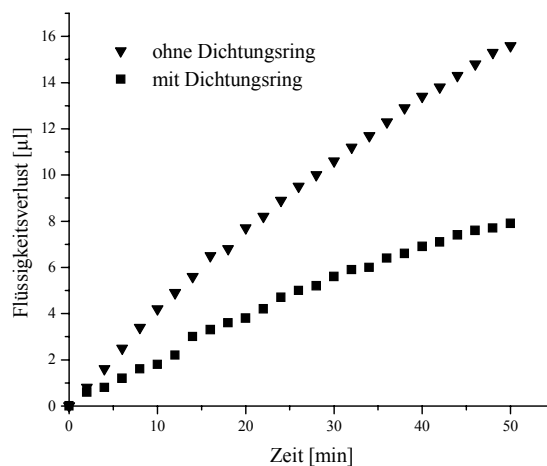


Abb. 4.12 Flüssigkeitsverlust in den Kammern

Der erste Versuch, dieses Problem zu beheben, bestand darin, einen Dichtungsring in die Kammer einzulegen, der sowohl am Deckglas als auch an einer Nut im Metallkörper anliegt und somit um den Rand des Deckglases ein abgeschlossenes Volumen erzeugt. Sobald die Luft darin mit Wasserdampf gesättigt ist, sollte kein weiterer Flüssigkeitsverlust mehr auftreten. Wie Abb. 4.12 zeigt, war dieser Versuch nur teilweise erfolgreich, was daran liegt, dass auch durch die dünne Bodenfolie Flüssigkeit entweicht.

Da sich dieser Flüssigkeitsverlust nicht vollständig vermeiden lässt, kann das Problem der Ausbeulung des Bodens nur durch eine Belüftung des Gefäßinnenraumes behoben werden. Diese wurde in der vierten Version des Zellgefäßes verwirklicht.

4.2.4 Vierte Version



Abb. 4.13 Schematische Darstellung der vierten Version des Zellgefäßes

In der vierten, zum Zeitpunkt dieser Dissertation aktuellen Version des Zellgefäßes wurde

die vorherige insofern erweitert, als der Innenraum des Gefäßes über eine Nut in der inneren Auflagefläche belüftet wird. Damit sich beim Verdunsten von Flüssigkeit keine Luftblasen zwischen Bodenfolie und Deckglas bilden, die zum einen erheblich bei der Mikroskopie stören würden und zum anderen zum Trocknen und damit zur Beschädigung von Zellen führen können, dient die Belüftungsnut auch als Vorratsgefäß für Nährlösung. Damit der Vorrat ausreicht um die während der Bestrahlung verdunstende Flüssigkeitsmenge zu ersetzen, war eine Erhöhung des Metallrandes und damit auch des Abstands zwischen Folie und Deckglas auf 0,8 mm erforderlich.

Der in der vorherigen Version eingeführte Dichtungsring wurde auch in diesem Design beibehalten, da dadurch die Verdunstungsrate deutlich gesenkt werden konnte. Durch ihn wird außerdem das Deckglas gleichmäßig auf die Metallfläche gedrückt, wodurch ein vollflächiges Aufliegen noch besser als in der vorherigen Version sichergestellt ist.

4.3 Zellwachstum

Für die Untersuchung biologischer Fragestellungen ist es von besonderer Bedeutung, dass sich die Zellen in den verwendeten Gefäßen möglichst genauso wie in Standard-Petrischalen verhalten. Die Suche nach den richtigen Materialien, der richtigen Vorbehandlung des Zellgefäßes und den optimalen Parametern bei der Aussaat und der Behandlung der Zellen nahm daher einen Großteil der Entwicklungsarbeit der Zellgefäße in Anspruch.

Problematisch bei dieser Optimierung war, dass im Gegensatz zur Messung von Wachstumsraten, wie sie bereits in Kapitel 4.1 bei der Materialauswahl dargestellt wurden, das Anhaftungsverhalten, die Morphologie und die Fähigkeit der Zellen, einen konfluenten (einschichtigen und dichten) Zellrasen zu bilden, nur schwer quantitativ messbar sind. Die Bewertung des Zustandes von Zellen in auf neue Art präparierten Gefäßen erfolgte daher hauptsächlich durch Vergleiche mit Zellen in erprobten Referenzgefäßen oder das Aussehen wurde nach Erfahrungswerten beurteilt.

Die Auswertung dieser Versuche führte zu einer ständigen Verbesserung der Präparationsmethode der Zellgefäße. Im Folgenden wird als Ergebnis unserer Arbeit die zum jetzigen Zeitpunkt als optimal betrachtete Methode dargestellt, die auch bei den Kammern für die aktuellen Mikrosonden-Experimenten angewandt wurde.

4.3.1 Vorbehandlung der Folie

Polypropylen, das als Bodenfolie für das Zellgefäß ausgewählt wurde, ist sehr hydrophob. In unseren Versuchen stellte sich heraus, dass die Zellen wesentlich besser anhaften und sich vermehren können, wenn die Folie durch Chemikalien etwas hydrophiler gemacht wird, bevor sie mit Cell-Tak beschichtet wird (siehe Kapitel 4.3.4 „Vorbehandlung der montierten Kammer“). Dazu wurden zwei Methoden getestet, die zu vergleichbaren Ergebnissen führten:

- ein etwa einstündiges Bad in 30%igem H_2O_2 bei einer Temperatur von 70°C
- waschen in einer 2%-igen Lipsol-Lösung (L.I.P., Shipley (UK)) für etwa 15 Stunden.

Nach beiden Prozeduren muss die Folie zum Entfernen der Chemikalien einige Stunden in destilliertem Wasser gewaschen werden. Danach kann die Folie getrocknet und in das Gehäuse des Zellgefäßes eingebaut werden. Auf diese Weise behandelte Folien können für mehrere Wochen aufbewahrt werden, ohne dass sich ihre Eigenschaften in Bezug auf die Zellanhaftung verschlechtern

Da die Methode mit der Lipsol-Lösung weniger arbeitsintensiv ist, wurde sie bei der Präparation der Zellgefäße für die Experimente benutzt.

4.3.2 Vorbehandlung des Gehäuses

Im Gegensatz zur Bodenfolie wird das Gehäuse des Zellgefäßes wieder verwendet. Bevor es jedoch neu montiert werden kann, durchläuft es einen vierstufigen Reinigungsprozess:

- In heißem destilliertem Wasser wird das alte Wachs entfernt, mit dem die Bodenfolie angeklebt wurde.
- Für eine allgemeine Reinigung wird das Gehäuse etwa 30 Minuten in eine 2%-ige Lipsol-Lösung (L.I.P., Shipley (UK)) gelegt.
- Um eine erste Sterilisation durchzuführen, wird das Gehäuse für etwa 10 Minuten in 70%-iges Ethanol gegeben.
- Danach werden die Kammern durch ein mehrstündiges Bad in destilliertem Wasser von den Chemikalien befreit.

Nach diesen Reinigungsschritten kann die Bodenfolie auf das Gehäuse aufgebracht werden.

4.3.3 Montage des Zellgefäßes

Zur Montage der Zellgefäße werden die Unterseiten der Gehäuse dünn mit Stearin beschichtet und mit dieser Seite nach oben auf eine beheizbare Metallplatte gelegt.

Die Bodenfolie wird auf einen Metallring aufgeklebt und dann so auf die Gehäuse gelegt, dass sie vollflächig auf ihnen aufliegt. Dabei sorgt die Gewichtskraft des Metallrings dafür, dass die Folie gespannt wird.

Nun wird die Metallplatte so lange geheizt, bis das Stearin zwischen Gehäuse und Folie schmilzt. Durch leichtes Andrücken der Folie mit einem weichen Gegenstand wird zum einen sichergestellt, dass das Wachs gut mit der Folie in Kontakt kommt, zum anderen können kleinere Luftblasen entfernt werden. Nach dem Abkühlen wird die Folie entlang der Ränder des Gehäuses mit einem Skalpell abgeschnitten.

4.3.4 Vorbehandlung der montierten Kammer

Nach der Montage muss das Zellgefäß sterilisiert werden. Hierzu wird es für 30 Minuten in 70%-iges Ethanol gegeben und danach in einer Flow-Box zum Trocknen aufgestellt. Die Benutzung eines Autoklavs zur Sterilisation ist nicht möglich, weil das Stearin, das zum Kleben der Folie auf das Gehäuse verwendet wird, bereits bei etwa 60°C schmilzt. Außerdem wurde festgestellt, dass sich die Oberfläche der Folie beim Autoklavieren so verändert, dass die Zellen daran nicht mehr anhaften.

Nach der Sterilisation wird die Folie mit Cell-Tak (BD Biosciences, Bedford (USA)), einer Proteinlösung, die die Anhaftung von Zellen auf Oberflächen verbessert, beschichtet. Diese Präparation wird auch von Folkard et al. [FOL97a] berichtet, die im Gray-Lab ebenfalls die Polypropylenfolie in ihren Zellgefäßen benutzen. Dabei wurde die Erfahrung gemacht, dass für die von uns verwendeten Zellarten eine Konzentration von 3,5 µg/cm² optimal ist.

Nach diesem Schritt können die Zellen in die Gefäße eingesät werden.

4.3.5 Einsaat und Kultivierung der Zellen

Bei unseren Versuchen wurden CHO-K1 Zellen und menschliche Fibroblasten (AG 1522) verwendet (siehe Fußnote Seite 13). Dabei stellte sich heraus, dass sich beide Zellarten umso besser entwickeln, je dichter die Zellen eingesät werden. Die Herstellung einer Probe mit dichtem Zellrasen ist daher leicht machbar. Problematisch ist bis jetzt noch die Kultivierung sehr vereinzelter Zellen (weniger als 50 pro Zellgefäß). Solche Proben werden

aber für die Untersuchung von Koloniebildungen nach der Bestrahlung benötigt. Daher werden in diese Richtung noch weitere Untersuchungen stattfinden müssen.

Bei den bisherigen Mikrosonden-Experimenten wurden ausschließlich Proben mit dichtem Zellrasen aus Fibroblasten verwendet. Um diesen zu erzeugen, wurden pro Gefäß zwischen 5000 und 8000 Zellen (automatische Zählung mittels Coulter-Counter) in einem Tropfen aus 40µl Nährlösung in der Mitte der Bodenfolie aufgebracht (centerplated). Erst nachdem die Zellen nach etwa 3 Stunden an der Bodenfolie anhafteten haben, wurde die Kammer mit weiteren 200µl Nährlösung gefüllt. Durch diese Behandlungsmethode ist nur der zentrale Bereich der Gefäße mit Zellen bedeckt. Die Zeit, die die Zellen benötigen, um dann einen konfluenten Zellrasen zu bilden, hängt stark von deren Alter ab und variiert zwischen zwei und vier Tagen.

Nach der Aussaat der Zellen werden die Kammern in sterilen Behältern in einen Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert. In unseren Versuchen stellte sich heraus, dass die Zellen wesentlich besser anhaften und wachsen, wenn die Luft innerhalb der Behälter mit zusätzlichem Wasserdampf gesättigt ist. Dies kann durch Zugabe einer Schale destillierten Wassers erreicht werden.

Kapitel 5

Das Vakuumfenster

Mit dem Vakuumfenster wird das evakuierte Strahlrohr, in dem sich der Ionenstrahl bewegen kann, ohne gestreut zu werden, gegen die Bestrahlungskammer abgeschlossen, in der sich die Zellen befinden und in der normaler Umgebungsdruck herrscht (siehe Abb. 5.1).

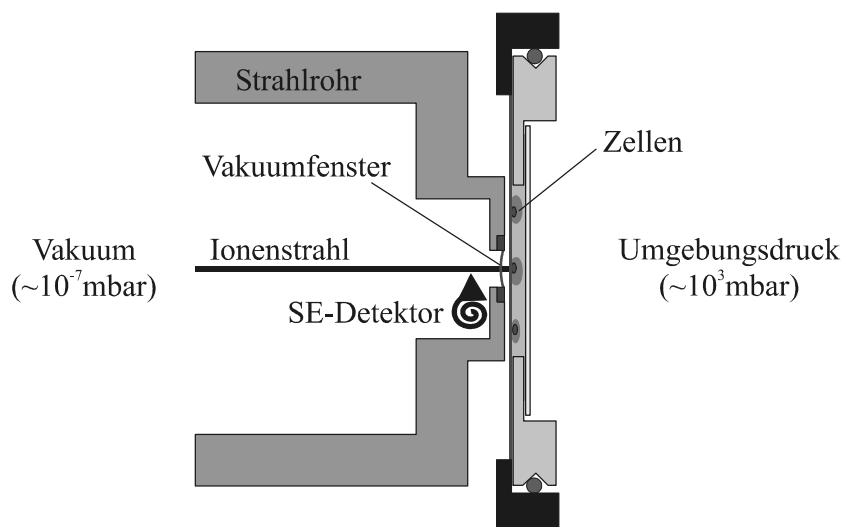


Abb. 5.1 Schema zur Position des Vakuumfensters im Bestrahlungsaufbau

Bei der Bestrahlung durchqueren die fokussierten Ionen dieses Fenster und erreichen dann nach einer Strecke von etwa $100\mu\text{m}$ das Zellgefäß, in dem die gezielte Energiedeposition in den Zellen stattfindet. Die beim Durchgang eines Ions vom Vakuumfenster emittierten Sekundärelektronen werden zur Trefferdetektion mit einem Channeltron nachgewiesen.

5.1 Eigenschaften

5.1.1 Mechanische Eigenschaften

Um die oben beschriebenen Aufgaben erfüllen zu können, muss das Vakuumfenster verschiedene mechanische Eigenschaften besitzen:

- Es muss sehr dünn sein, damit die fokussierten Ionen beim Durchgang möglichst wenig gestreut werden, denn bei einer Strecke von etwa $100\mu\text{m}$, die die Ionen zwischen dem Fenster und den Zellen zurücklegen müssen, führen schon kleine Streuwinkel zu deutlichen Abweichungen vom Zielpunkt.
- Es muss stabil genug sein, um den Druckunterschied von etwa einem Bar, der zwischen Strahlrohr und Umgebung besteht, aushalten zu können,
- Es muss strahlungsbeständig sein, da die lokale Fluenz der Ionen in dem Bereich, in dem sie das Fenster durchdringen, durch die Fokussierung sehr hoch ist.

5.1.2 Eigenschaften zur Trefferdetektion

Für die Wahl, die vom Vakuumfenster emittierten Sekundärelektronen zur Trefferdetektion zu verwenden, gibt es zwei Gründe:

- Ein Treffernachweis hinter dem Zellgefäß (siehe Kapitel 4 "Das Zellgefäß") ist nicht möglich, da es von den Ionen aufgrund seiner Dicke nicht durchdrungen werden kann.
- Zusätzliche Materialsichten wie Szintillatoren, Halbleiter- oder Gasdetektoren, mit denen der Treffernachweis vor der Probe durchgeführt werden kann, führen zu weiteren Streuungen der Ionen und verschlechtern damit die Zielgenauigkeit der Mikrosonde. Da das Vakuumfenster in unserem Aufbau ohnehin benötigt wird, wird bei der Trefferdetektion mit Hilfe der Sekundärelektronen der Strahlfokus nicht zusätzlich aufgeweitet.

Für den Nachweis der Sekundärelektronen wird ein Channeltron verwendet, dessen Aufbau in Abb. 5.2 schematisch dargestellt ist.

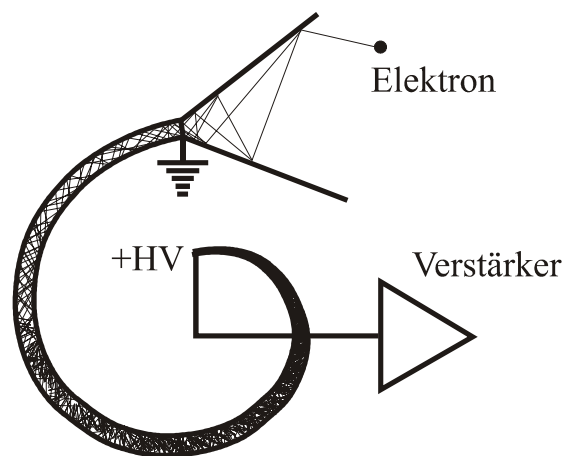


Abb. 5.2 Schema zu Aufbau und Wirkungsweise eines Channeltrons: Jedes Elektron, das auf die Wand des Channeltrons trifft, schlägt neue Elektronen frei. Diese werden durch eine positive Hochspannung zum inneren Ende hin beschleunigt und erzeugen auf ihrem Weg dorthin immer mehr freie Elektronen. So kann am inneren Ende des Channeltrons ein Stromimpuls detektiert werden

Sobald ein Elektron den Trichter des Channeltrons erreicht, wird es durch eine positive Hochspannung zum inneren Ende hin beschleunigt und schlägt bei jeder Berührung der Wand neue Elektronen frei. Durch die so entstehende lawinenartige Vermehrung der Elektronen kann am inneren Ende des Channeltrons ein Stromsignal abgegriffen werden, dessen Amplitude mit der Anzahl der primären Elektronen steigt. Da die Elektronenvermehrung jedoch nicht kontrolliert abläuft, gibt es für die gleiche Anzahl primärer Elektronen statistische Schwankungen der Signalhöhe.

In Abb. 5.3 ist das Amplitudenspektrum eines Channeltrons zu sehen, das bei der Bestrahlung von Gold mit Xe-Ionen (5,9 MeV/u) aufgenommen wurde. Darin kann deutlich zwischen zwei Signalhöhen unterschieden werden: Die Signale mit hoher Amplitude (um Kanal 2000) wurden durch die von der Goldoberfläche emittierten Sekundärelektronen erzeugt, während die Impulse mit niedriger Amplitude (um Kanal 250) durch einzelne, im Vakuum vorhandene Elektronen generiert wurden. Durch Anlegen eines Grenzwertes in diesem Spektrum kann klar zwischen Hintergrundsignalen und echten Ionentreffern unterschieden werden.

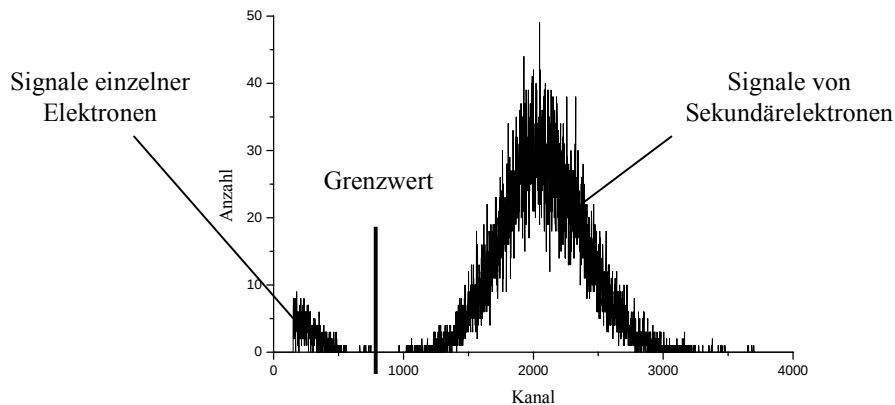


Abb. 5.3 Amplitudenspektrum eines Channeltrons, das bei Bestrahlung einer Goldoberfläche mit Xe-Ionen (5,9 MeV/u) aufgenommen wurde

Um bei der Zellbestrahlung eine zuverlässige Trefferdetektion durchführen zu können, müssen die Signale, die beim Durchgang von Ionen durch das Vakuumfenster entstehen deutlich höhere Amplituden besitzen, als die durch freie Elektronen erzeugten Impulse. Dies kann nur erreicht werden, wenn das Vakuumfenster eine hohe Sekundärelektronenausbeute besitzt und so bei jedem Teilchendurchgang viele primäre Elektronen das Channeltron erreichen.

5.2 Getestete Materialien

Bei der Suche nach einem geeigneten Material für das Vakuumfenster wurden Si_3N_4 -Folien und B-dotierter Diamant intensiv untersucht.

5.2.1 B-dotierter CVD-Diamant

Dieser CVD-Diamant, bei dessen Synthese geringe Mengen an Bor zugesetzt wurden, wurde vor allem aufgrund seiner hohen Sekundärelektronenausbeute bei Bestrahlung mit keV-Elektronen [SHI97] als Vakuumfenster in unserem Aufbau in Betracht gezogen.

Die durchgeführten Experimente zum Treffernachweis von Ionen zeigten, dass bei Ionen schwerer Elemente wie Xe deutlich zwischen Hintergrundsignalen und den durch Sekundärelektronen erzeugten Signalen unterschieden werden kann. Bei Bestrahlung mit Kohlenstoffionen war die Anzahl der emittierten Elektronen jedoch deutlich niedriger, so dass der Peak der Treffersignale im Amplitudenspektrum des Channeltrons zum Teil deutlich mit dem Hintergrundspektrum überlappt (siehe Abb. 5.4).

Bei diesen Experimenten wurde außerdem festgestellt, dass die Sekundärelektronenausbeute zwischen den einzelnen Fenstern stark variiert. Wie die Channeltron-Spektren in Abb. 5.4 zeigen, hängt die Anzahl der emittierten Elektronen dabei nicht vom angegebenen Bor-Gehalt in den Diamanten ab. Da dies aber die einzige Variable ist, in der sich die verschiedenen Proben unterscheiden sollen, muss davon ausgegangen werden, dass entweder die wahren Dotierungsraten bedingt durch den Herstellungsprozess nicht mit den angegebenen übereinstimmen, oder eine andere Eigenschaft des Diamanten für die Anzahl der emittierten Sekundärelektronen von Bedeutung ist, die von den Herstellern bisher nicht

beeinflusst werden kann. Dies bedeutet aber, dass jedes Fenster vor der Verwendung auf dessen Tauglichkeit für die Trefferdetektion getestet werden müsste.

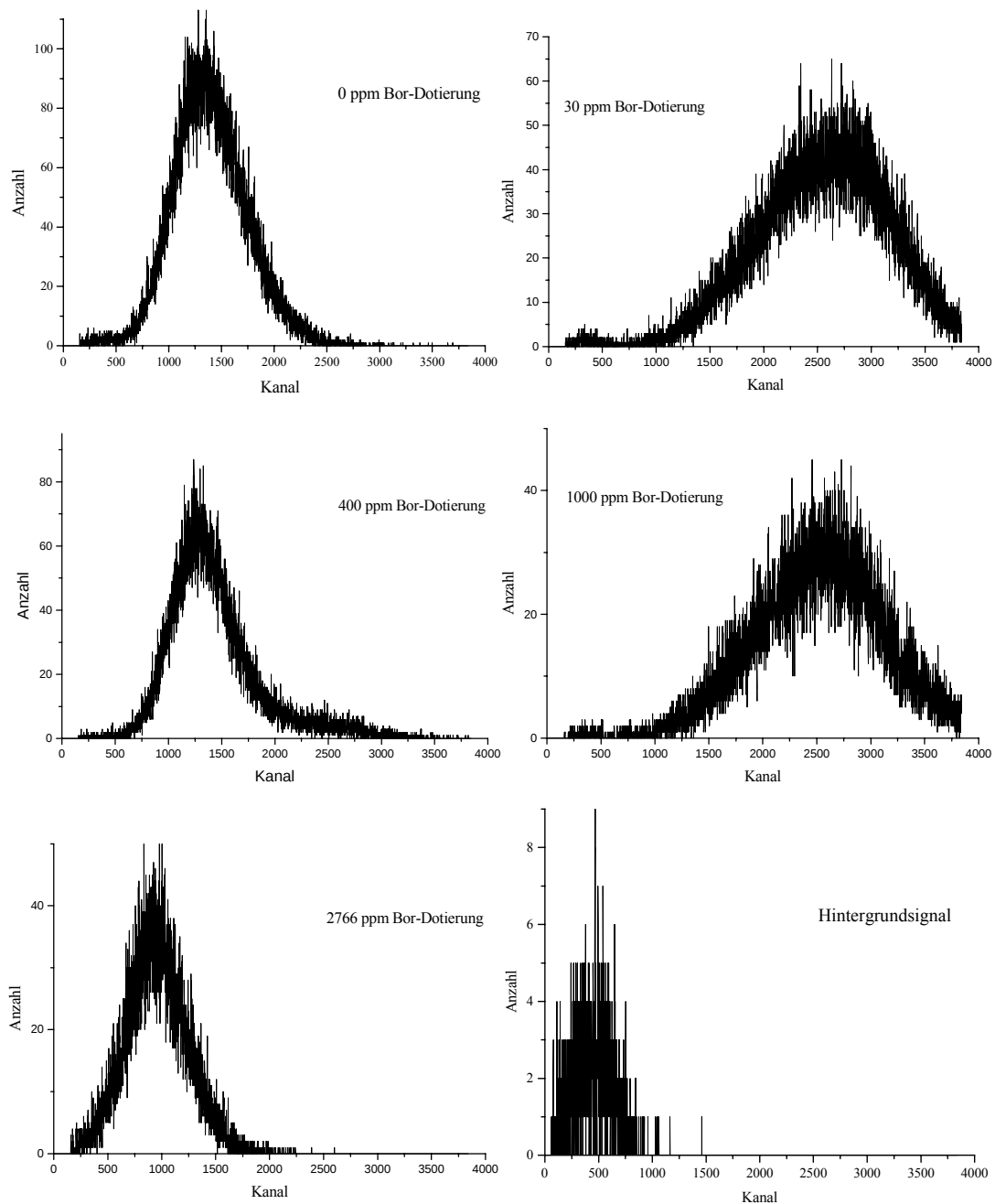


Abb. 5.4 Channeltron-Amplitudenspektren bei Bestrahlung von verschieden stark Bor-dotierten CVD-Diamanten mit 3,6MeV/u C-Ionen (die Ordinatenskalierung der Diagramme variiert)
Rechts unten: Hintergrund-Spektrum

Ein weiterer Nachteil der Bor-dotierten Diamanten ist die Tatsache, dass es dafür keine kommerziellen Hersteller gibt. Die von uns untersuchten Proben wurden von Jim Butler (Naval Research Labs., Washington, USA) und Paul May (University of Bristol, Bristol,

U.K.) zur Verfügung gestellt. Außerdem ist nach Aussage dieser Experten die Produktion von Fenstern mit Dicken unter einem Mikrometer nicht möglich. Um die Streuung der Ionen durch ein solches Fenster in unserem Aufbau abschätzen zu können, wurde sie mit SRIM-2003 [ZIE85] [SRIM2003] für C-Ionen (5MeV/u) durch ein 1µm dickes Diamantfenster und 100µm Luft simuliert. In Abb. 5.5 ist als Ergebnis die Abstandsverteilung der Ionen vom Zielpunkt zu sehen. Die sinkende Anzahl der Ionentreffer vom Maximum bei etwa 90nm zum Nullpunkt hin, ist durch die Abnahme der Trefferfläche zu erklären.

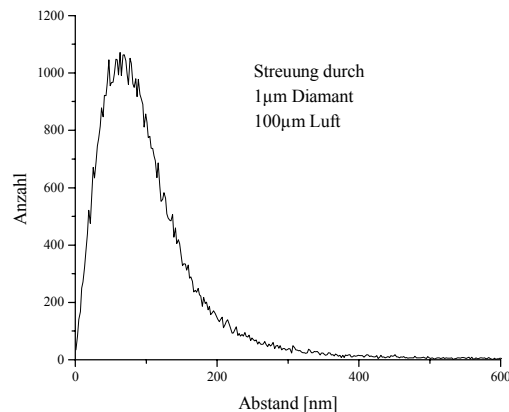


Abb. 5.5 Abstandsverteilung vom Zielpunkt eines 5MeV/u Kohlenstoff-Strahls bei Streuung durch ein 1µm dickes Diamantfenster und 100µm Luft

Da bei der GSI praktisch keine Bestrahlungen mit Ionen durchgeführt werden, die leichter als Kohlenstoff sind, und die Streuung für schwerere Teilchen geringer ist, kann nach obiger Simulation davon ausgegangen werden, dass beim Einbau eines 1µm dicken Diamantfensters 98 % der Teilchen nicht mehr als 400nm gestreut werden.

5.2.2 Siliziumnitrid (Si₃N₄)-Folien beschichtet mit Gold und CsI

Si₃N₄-Folie wird bereits seit einigen Jahren als Vakuumfenster in verschiedenen Aufbauten in denen ein fokussierter Ionenstrahl an Luft benötigt wird, als Vakuumfenster eingesetzt [LEF91] [CAL00]. Dort wurde bereits gezeigt, dass dieses Material ab Dicken von 100nm Druckunterschiede von einem Bar bei einer Fenstergröße von 1 x 1 mm² auch nach intensiver Bestrahlung mit Protonen und Alpha-Teilchen im MeV-Bereich standhält. Diese Strahlungsbeständigkeit wurde für schwerere Ionen durch eigene Versuche bestätigt, bei denen ein 200nm dickes Fenster mit $1 \cdot 10^{11}$ C-Ionen (3,6MeV/u)/cm² und $6 \cdot 10^8$ Fe-Ionen (4,8 MeV/u)/cm² bestrahlt wurde.

Zur Erhöhung der Sekundärelektronenausbeute beim Durchgang eines Ions wurde die Siliziumnitrid-Folie mit Gold und CsI beschichtet. Dabei sorgt das CsI für eine erhöhte Emission von Elektronen, während durch die darunter liegende leitende Goldschicht die Aufladung der Probe und damit eine Reduzierung der Elektronenausbeute verhindert wird. Die Untersuchung der zur maximalen Sekundärelektronenemission nötigen CsI-Schichtdicke (siehe Abb. 5.6) zeigte, dass diese bei etwa 20µg/cm² (entspricht etwa einer Dicke von 40nm) bei einer Goldschichtdicke von etwa 20nm erreicht wird. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die CsI-Schicht während der Bestrahlung durch Sputtern

dünnere wird, wurde bei allen weiteren Experimenten mit $50\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (ca. 100nm Dicke) gearbeitet.

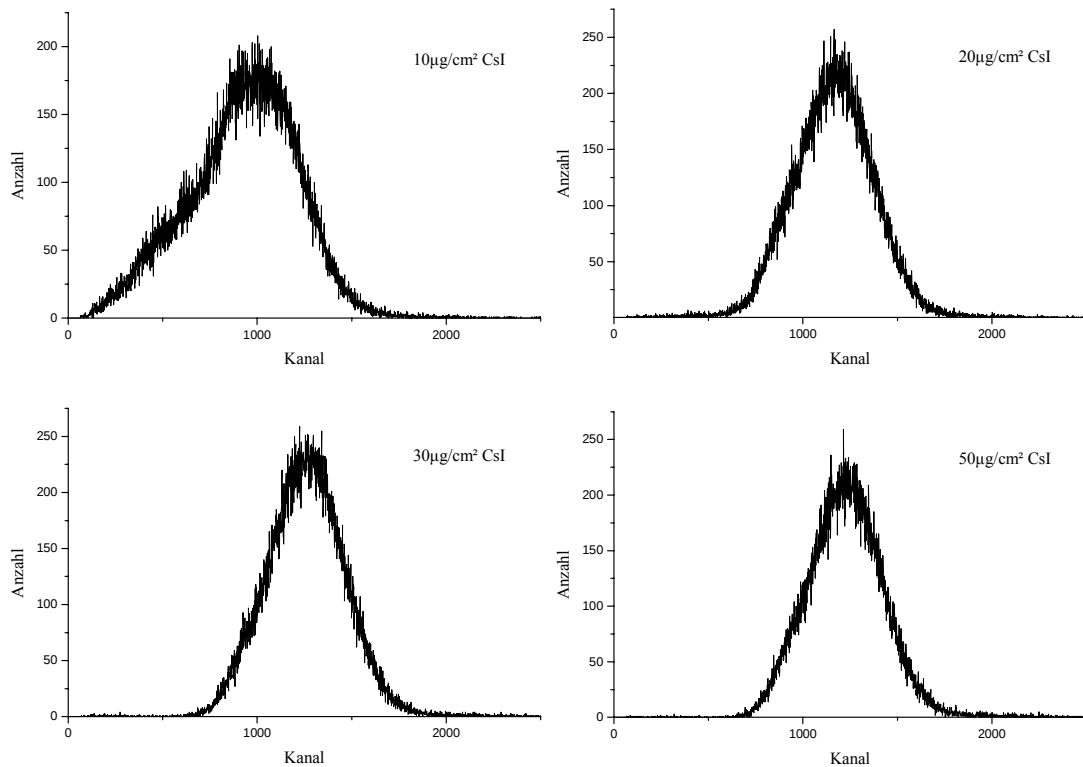


Abb. 5.6 Channeltron-Spektren von unterschiedlich dick CsI beschichteten Si₃N₄-Fenstern bei Bestrahlung mit 4,7MeV/u C-Ionen (die Ordinatenskalierung der Diagramme variiert)

Bei Bestrahlung mit 4,7MeV/u C-Ionen kann ab CsI-Dicken von etwa $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ der in Kapitel 5.1.2 beschriebene Grenzwert zur Diskriminierung der Ionensignalen von den Untergrundsignalen gesetzt werden (siehe Abb. 5.6). Da die Sekundärelektronenausbeute bei Bestrahlung mit schwereren Ionen steigt, eignet sich dieses Fenstermaterial ebenfalls zur Trefferdetektion.

Um die Streuung durch dieses Fenster abschätzen zu können, wurde sie für einen fokussierten Kohlenstoff-Ionenstrahl (5MeV/u) 100 μm hinter einem mit 100nm CsI und 20nm Gold beschichteten 200nm dicken Siliziumnitrid-Fenster mit SRIM-2003 simuliert (siehe Abb. 5.7).

Im Vergleich zu den simulierten Daten der Streuung durch ein Diamantfenster ist diese Verteilung etwas breiter. Beim Einbau eines solchen Vakuumfensters in unseren Aufbau kann davon ausgegangen werden, dass 98% der Teilchen nicht weiter als 650nm gestreut werden.

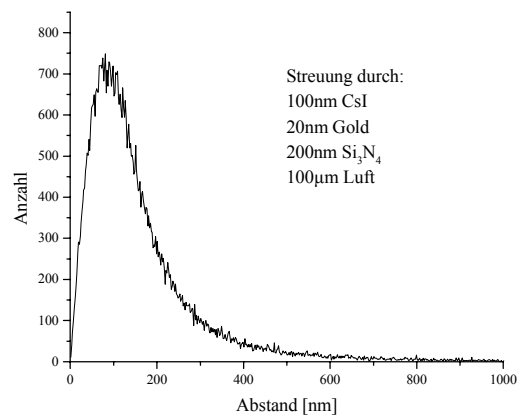


Abb. 5.7 Abstandsverteilung vom Zielpunkt eines 5MeV/u Kohlenstoff-Strahls bei Streuung durch ein 200nm dickes, mit 100nm CsI und 20nm Gold beschichtetes Si₃N₄-Fenster und 100µm Luft

5.2.3 Materialauswahl

Nach den in den vorigen Unterkapiteln beschriebenen Experimenten wurde sich dafür entschieden, die mit CsI und Gold beschichtete Si₃N₄-Folie als Vakuumfenster zu verwenden. Ausschlaggebend dafür war hauptsächlich die bessere Eignung als Trefferdetektor, wobei nicht nur die hohe Sekundärelektronenausbeute, sondern auch die Reproduzierbarkeit dieser Messung bei verschiedenen Fenstern von Bedeutung war.

Diese gleich bleibenden Eigenschaften können erreicht werden, da die Folie mit definierter Beschaffenheit kommerziell erworben werden kann und die Beschichtung mit Gold und CsI im Targetlabor der GSI durchgeführt wird. Da so die Versorgung mit qualitativ konstant hochwertigen Fenstern gesichert ist, ist es möglich, nach jeder Strahlzeit einen Fensterwechsel durchzuführen, wodurch eventuell durch die Bestrahlung oder Feuchtigkeitseinflüsse hervorgerufene Veränderungen der CsI-Schicht sofort behoben werden können.

Der Nachteil der im Vergleich zu den dünnst möglichen Diamantfenstern etwas größeren Streuung der Ionen bleibt dabei in einer Größenordnung, die bei der Bestrahlung einzelner Zellkerne mit durchschnittlichen Durchmessern von etwa 15µm nicht ins Gewicht fällt.

Kapitel 6

Zellerkennung

Die automatische Ermittlung der Zellpositionen ist eine der zentralen Aufgaben, wenn eine große Anzahl Zellen in kurzer Zeit gezielt bestrahlt werden soll. Die dafür einsetzbaren Mikroskopietechniken werden jedoch durch den Bestrahlungsaufbau stark eingeschränkt: Da sich das Zellgefäß während der Experimente direkt vor dem Vakuumfenster befindet, ist eine Beleuchtung von dieser Seite aus nicht möglich. Daher ist die Anwendung von Methoden, bei denen die Probe durchleuchtet werden muss, nicht möglich.

Daneben ist zu beachten, dass der zusätzliche Stress, dem die Zellen durch die Erkennung ausgesetzt sind, möglichst gering gehalten werden sollte. Das heißt, dass einerseits die zur Mikroskopie notwendigen schädlichen Einflüsse, wie Zellfarbstoffe oder UV-Licht, andererseits aber auch die zur Erkennung notwendige Zeit minimiert werden sollten.

Unter diesen Aspekten wurden verschiedene Mikroskopiemethoden auf ihre Tauglichkeit zur Zellkernerkennung untersucht. Diese Versuche fanden überwiegend an einem kommerziellen Mikroskop vom Typ „Nikon OPTIPHOT 2“ statt, das zusätzlich mit einer Auflichteinrichtung ausgestattet ist, die Hell- und Dunkelfeldmikroskopie sowie differentielle Interferenzkontrast-Mikroskopie erlaubt.

6.1 Hellfeld-Auflichtmikroskopie

Bei dieser Mikroskopiemethode wird die Probe durch das Objektiv, durch das sie auch betrachtet wird, beleuchtet (siehe Abb. 6.1). Zur Bilderzeugung wird dann das von der Probe ins Objektiv zurückreflektierte Licht verwendet.

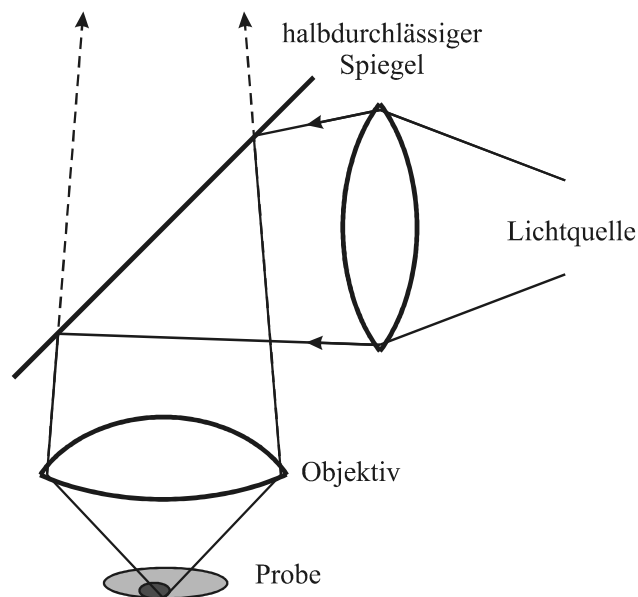


Abb. 6.1 Schematische Darstellung der Beleuchtung bei der Hellfeld-Auflichtmikroskopie

Diese Reflexionen finden in den biologischen Proben an den verschiedenen Grenzflächen wie Medium-Zytoplasma, Zytoplasma-Zellkern oder an kleineren Streuzentren innerhalb der Zelle statt. Das Verhältnis der Intensitäten von einfallender zu reflektierter Welle an einer solchen Grenzfläche kann dabei mit der Fresnelschen Formel berechnet werden:

$$I_r = I_e \cdot \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2$$

wobei mit I_r und I_e die Intensitäten der reflektierten bzw. einfallenden Lichtwelle und mit n_1, n_2 die Brechungsindizes der beiden Medien an den Grenzflächen bezeichnet werden.

Diese Formel zeigt, dass die Intensität des reflektierten Lichtes sehr stark von den Differenzen der Brechungsindizes abhängt und daher bei Werten von $n \approx 1,35$ für den Zellkern, $n \approx 1,34$ für das Zytoplasma und $n \approx 1,33$ für das Nährmedium [HAU01] mit dieser Mikroskopiemethode keine sehr kontrastreichen Bilder zu erwarten sind.

In Abb. 6.2 sind zwei typische Bilder von auf Polypropylen angewachsenen Zellen der beiden hauptsächlich untersuchten Arten zu sehen (siehe dazu auch Fußnote Seite 13).

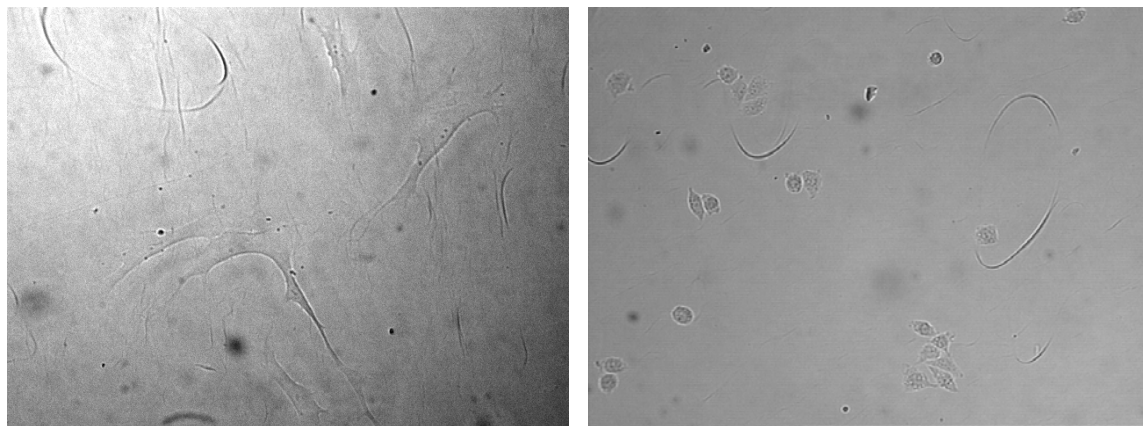


Abb. 6.2 Aufnahmen von Zellen mit Hellfeld-Auflichtmikroskopie; links: Fibroblasten; rechts: CHO-K1 Zellen

Neben den Zellen sind in diesen Bildern auch die typischen, ellipsenförmigen Strukturen der Folie zu sehen. Da in diesen Aufnahmen die Zellen wegen ihrer Kontrastarmut selbst für menschliche Betrachter nur schwer zu erkennen sind, wurde nicht weiter versucht, diese Mikroskopiemethode für eine automatische Zell- bzw. Zellkernerkennung zu verwenden.

6.2 Dunkelfeld-Auflichtmikroskopie

Im Gegensatz zur Hellfeld-Auflichtmikroskopie wird die Probe bei der Dunkelfeld-Auflichtmikroskopie nicht durch das Objektiv, sondern durch Prismen oder Spiegel an dessen Rand beleuchtet (siehe Abb. 6.3). Die Beleuchtung wird dabei so vorgenommen, dass das Licht, das an senkrecht zur optischen Achse stehenden Grenzflächen reflektiert wird, nicht ins Objektiv gelangt. Zur Abbildung der Objekte trägt daher hauptsächlich gestreutes Licht bei, das von der Probe nicht regulär reflektiert wird.

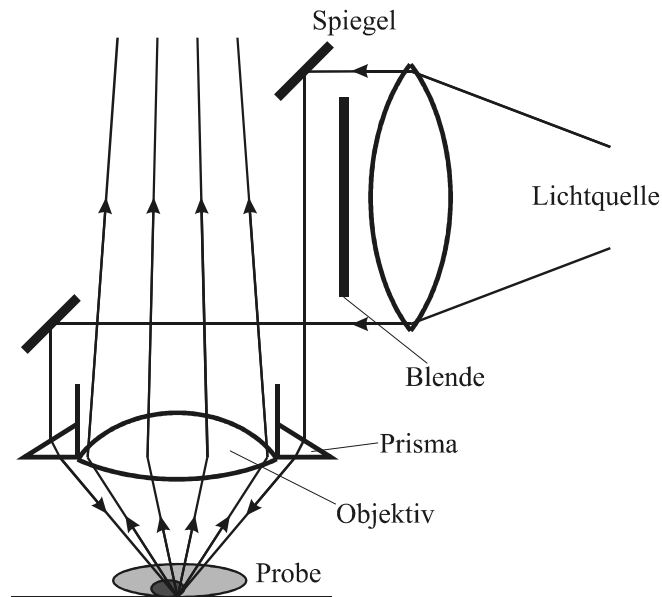


Abb. 6.3 Schematische Darstellung der Beleuchtung bei Dunkelfeld-Auflichtmikroskopie

In Abb. 6.4 werden für die beiden untersuchten Zellarten Aufnahmen gegenübergestellt, die mit Auflichtmikroskopie im Hell- und Dunkelfeldmodus gemacht wurden.

In den Bildern der Dunkelfeldmikroskopie erscheinen die Zytoplasmen der Zellen als helle Flächen, in denen teilweise die Zellkerne als dunkle Gebiete zu erkennen sind. Dies lässt darauf schließen, dass sich im Zytoplasma relativ viele Streuzentren befinden, während der Zellkern sehr homogen ist.

Problematisch für eine automatische Zellkernerkennung mit dieser Mikroskopiemethode ist, dass die Lichtmengen, die von Zytoplasmen und den Kernen der einzelnen Zellen gestreut werden, stark variieren und so eine zuverlässige Unterscheidung von Hintergrundreflexen, die von Streuzentren auf der Polypropylenfolie und im Nährmedium stammen, nicht möglich ist. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde nicht weiter versucht, diese Technik zur automatischen Zellkernerkennung einzusetzen.

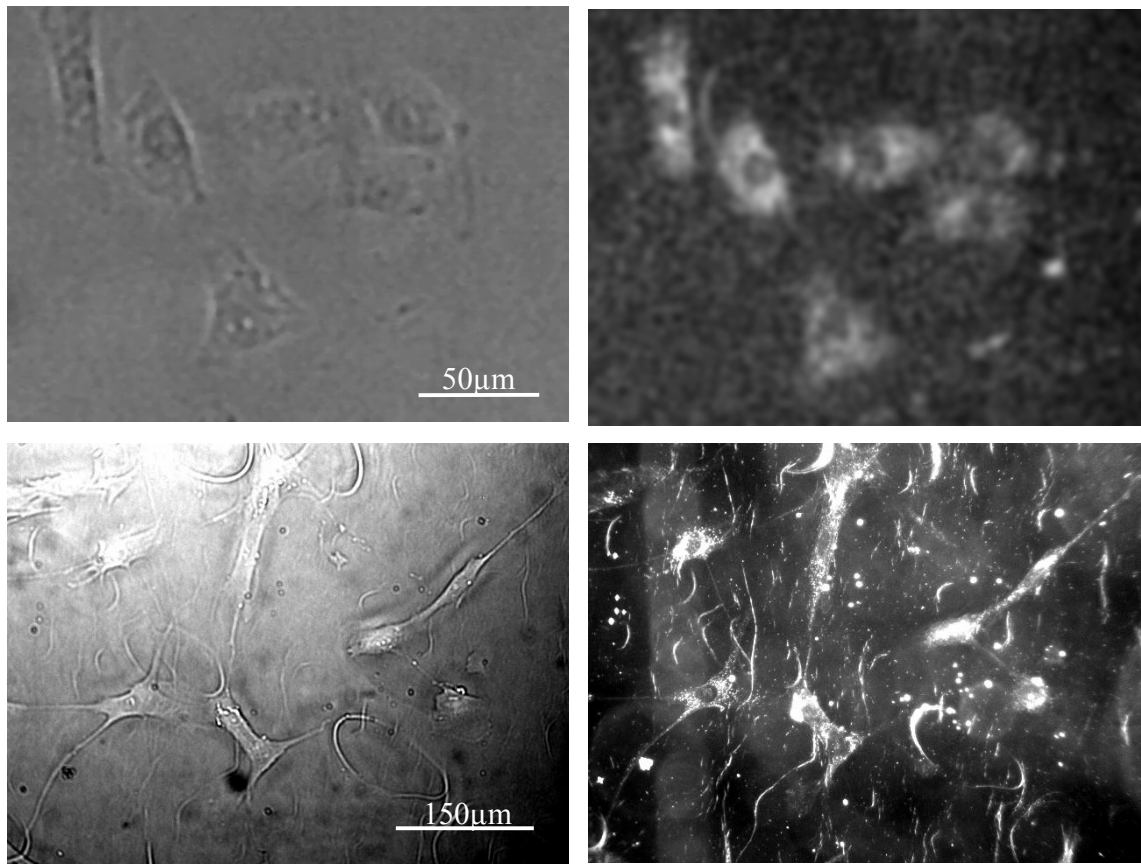


Abb. 6.4 Gegenüberstellung von Hellfeld- (links) und Dunkelfeld-Auflichtmikroskopie (rechts) der jeweils gleichen Stelle auf einer Probe. Oben: CHO-K1 Zellen; unten: Fibroblasten

6.3 Differentieller Interferenzkontrast

Beim Differentiellen Interferenzkontrast (DIC) nach Nomarski (siehe Abb. 6.5) durchläuft das Mikroskopierlicht zunächst einen Polarisationsfilter und wird danach durch ein Wollaston-Prisma in zwei Strahlen gleicher Amplitude aufgespalten, die senkrecht zueinander polarisiert sind. Diese beiden Strahlen verlaufen nach Passieren des Objektivs parallel, aber räumlich leicht versetzt und werden nach der Reflektion in der Probe im gleichen Wollaston-Prisma, in dem sie auch aufgespalten wurden, wieder zusammengeführt.

Wenn sich die Länge der optischen Wege, die die beiden Strahlen im Objekt zurückgelegt haben, unterscheiden, so sind ihre Phasen gegeneinander verschoben, was dazu führt, dass die Polarisationsrichtung der daraus zusammengesetzten Welle im Vergleich zur ursprünglichen Welle gedreht ist. Durch einen zweiten Polarisationsfilter (Analysator) hinter dem Prisma wird diese Drehung als Kontraständerung im Mikroskopiebild sichtbar gemacht.

Abb. 6.6 zeigt eine Gegenüberstellung zwischen Aufnahmen, die mit Hellfeld-Auflichtmikroskopie und Differentieller Interferenzmikroskopie gemacht wurden.

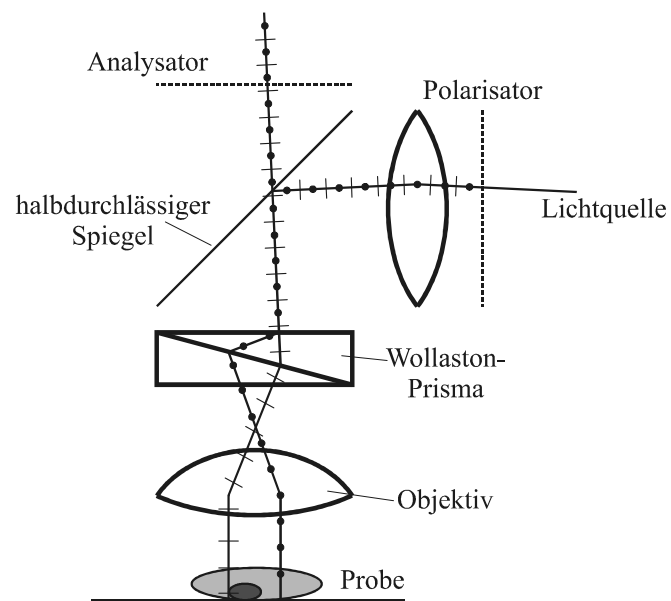


Abb. 6.5 Schematische Darstellung der Polarisation und Aufspaltung des Lichtes beim Differentiellen Interferenzkontrast nach Nomarski

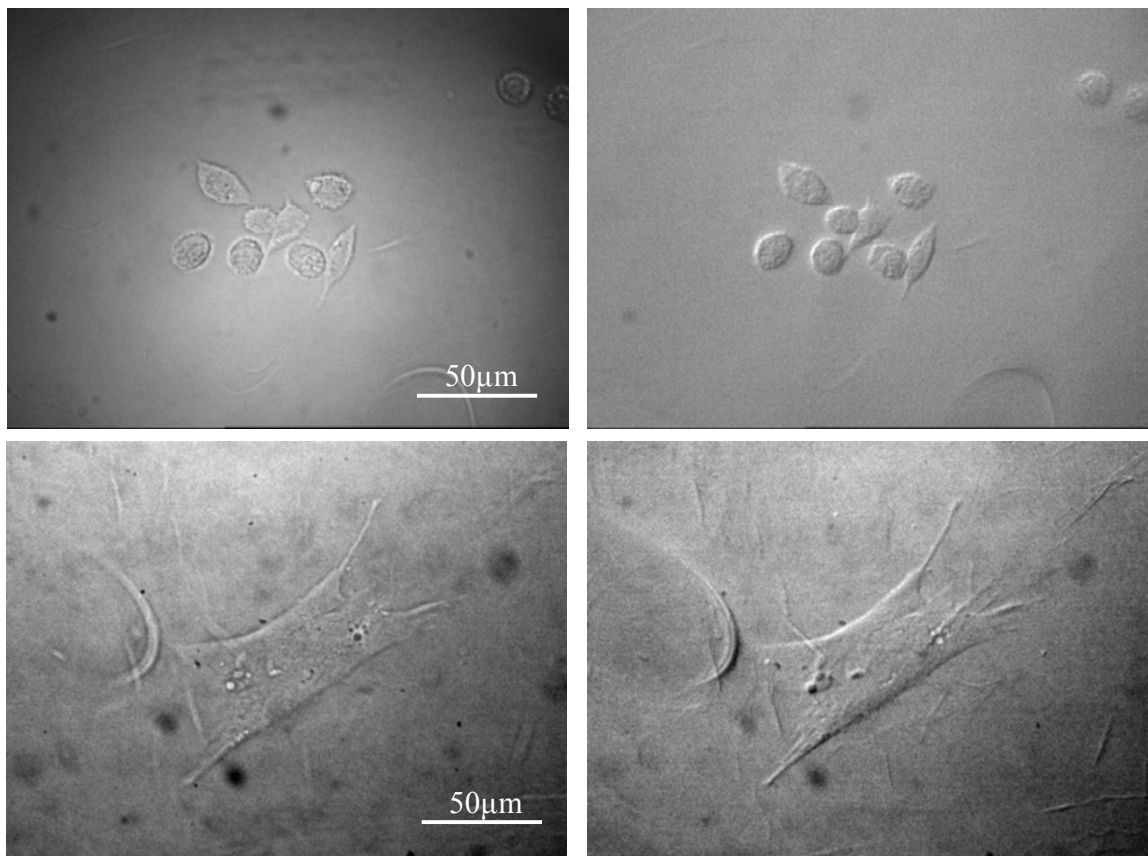


Abb. 6.6 Gegenüberstellung von Aufnahmen der Hellfeld-Auflichtmikroskopie (links) und Differentiellem Interferenzkontrast (rechts) der jeweils gleichen Stelle auf einer Probe.
Oben: CHO-K1 Zellen; unten: Fibroblasten

Im Vergleich zu den Hellfeld-Bildern erscheinen die Objekte in den mit DIC gemachten Aufnahmen dreidimensional und von oben links beleuchtet. Dieser Effekt wird durch die Wegdifferenz der beiden polarisierten Strahlen verursacht, die mit der Steigung der Grenzfläche zwischen Medien mit verschiedenen Brechungsindizes zunimmt (siehe Abb. 6.7). Diese Differenzen führen zu einer Drehung der Polarisationsrichtung der im Wollaston-Prisma zusammengesetzten Welle und durch den Analysator zu Kontraständerungen im Bild. Da die Steigung der Grenzflächen an den Kanten der Zellen am größten ist, kommt es dort auch zu den stärksten Intensitätsänderungen, die die in den Aufnahmen sichtbare Beleuchtungswirkung verursachen.

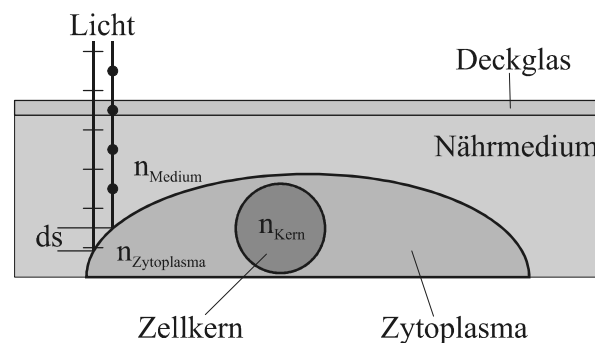


Abb. 6.7 Darstellung zu den Wegdifferenzen der polarisierten Strahlen in der Probe

Da trotz dieser Phaseninformation die Zellkerne in den DIC-Aufnahmen nicht besser zu sehen sind als in den Hellfeld-Bildern, wurde versucht, den Brechungsindex des Nährmediums dem des Zytoplasmas durch entsprechende Zusätze anzugleichen. Dadurch sollte dieser Teil der Zelle für die phasenempfindliche Interferenzmethode praktisch unsichtbar werden, so dass der Zellkern zu erkennen sein sollte.

In Abb. 6.8 werden Aufnahmen von Fibroblasten gezeigt, die sich in verschiedenen Mischungen aus Nährmedium und DMSO, einem in geringen Konzentrationen ungiftigem Lösungsmittel mit einem Brechungsindex von 1,47, befinden.

Die Aufnahmen zeigen, dass erwartungsgemäß der Kontrast der Zellen bis zu einem Brechungsindex des umgebenden Mediums von etwa 1,39 ab- und bei höheren Werten wieder zunimmt. Das erwartete Hervortreten des Zellkerns blieb jedoch aus, was im Nachhinein auf den zu kleinen Unterschied in den Brechungsindizes zwischen Zytoplasma und Zellkern zurückgeführt wird. Damit ist auch diese Methode zur zuverlässigen automatischen Erkennung von Zellkernen nicht geeignet.

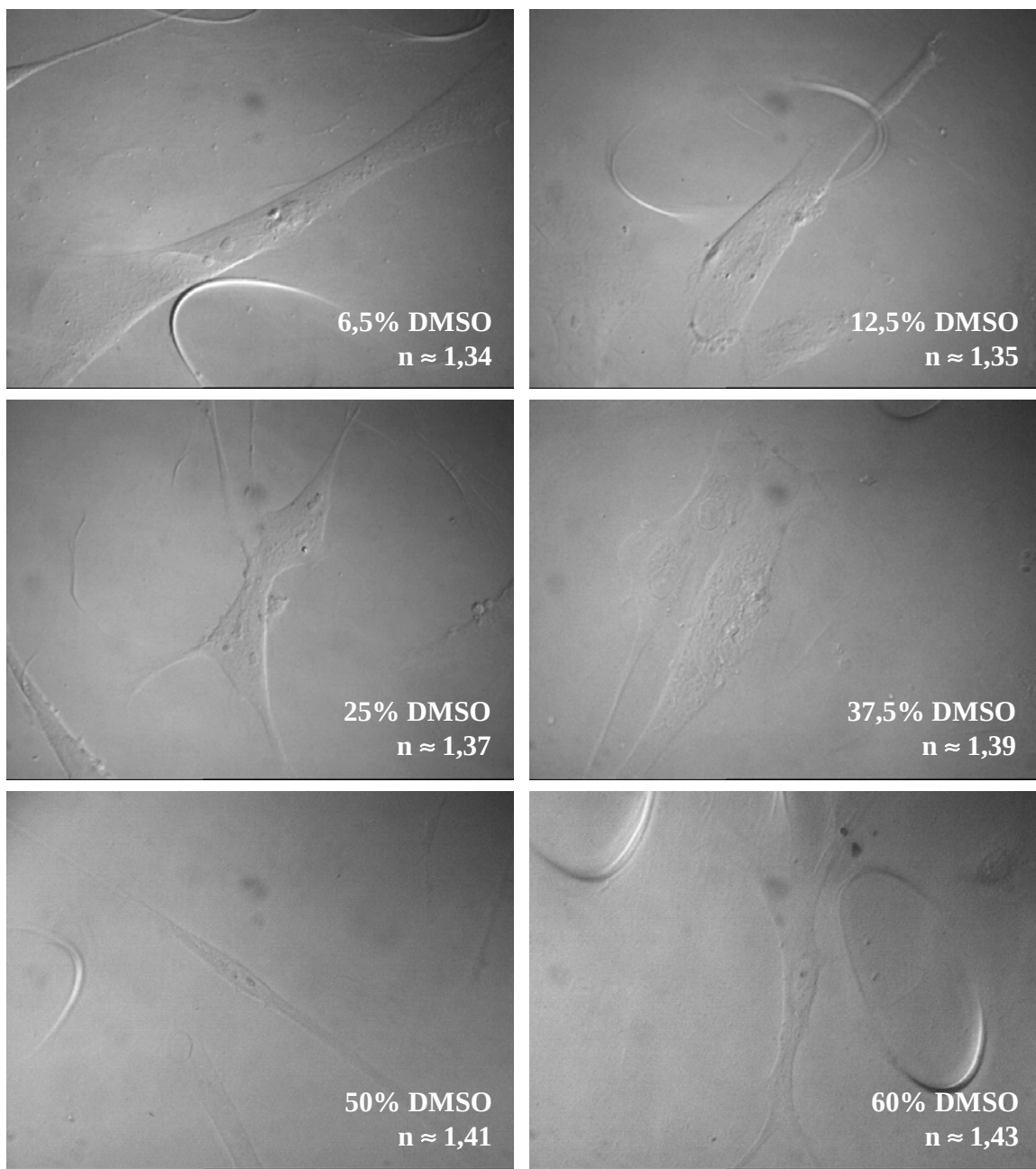


Abb. 6.8 Abbildung von Fibroblasten, die sich in Nährmedien mit unterschiedlichen Brechungsindizes befinden

6.4 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenz-Auflichtmikroskopie wird ein in der Probe befindlicher Farbstoff mit kurzwelligem Licht angeregt. Das daraufhin von diesem Farbstoff emittierte langwelligere Licht wird zur Bilderzeugung verwendet. Die Beleuchtung der Probe erfolgt dabei wie bei der Hellfeld-Auflichtmikroskopie (siehe Abb. 6.9), mit dem Unterschied, dass sich direkt hinter der Lichtquelle ein Filter befindet, der nur das kurzwellige Licht passieren lässt, das zur Anregung des Farbstoffs benötigt wird. Dagegen lässt ein weiterer Filter im Beobachtungsstrahlengang nur das vom Farbstoff emittierte langwellige Licht passieren, das dann zur Bilderzeugung verwendet wird.

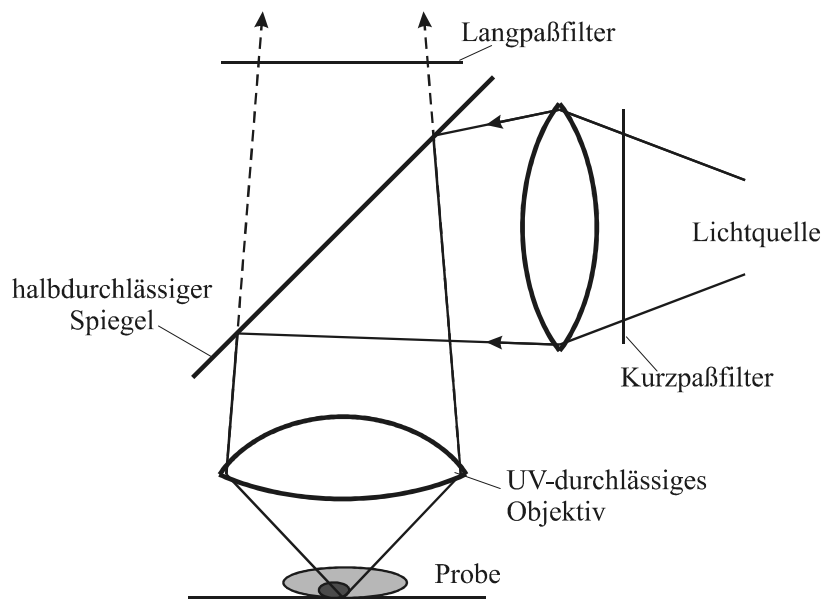


Abb. 6.9 Schematische Darstellung der Beleuchtung und Anordnung der Filter bei der Fluoreszenzmikroskopie

In Abb. 6.10 sind einige der mit dieser Methode aufgenommenen Bilder von Fibroblasten dargestellt. Die hellen Bereiche in diesen Aufnahmen markieren die Kerne der Zellen, die kurz zuvor für eine Stunde in Nährmedium, das 200nM des DNA-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 enthielt, kultiviert wurden. In diesen Bildern ist eine automatische Zellkernerkennung leicht möglich, indem alle zusammenhängenden Gebiete ab einer gewissen Größe, deren Pixel einen gewissen Helligkeitsgrenzwert überschreiten, als Zellkerne detektiert werden.

Da unter den getesteten Mikroskopieverfahren die Fluoreszenzmikroskopie die einzige ist, mit der eine zuverlässige Zellkernerkennung vorgenommen werden kann, wurde sie zu diesem Zweck in den bisher durchgeführten Experimenten (siehe Kapitel 8 "erste Versuche") eingesetzt.

Dabei wurden die Zellen jeweils kurz vor der Bestrahlung für eine Stunde in einem 200nM Hoechst 33342 enthaltenden Nährmedium kultiviert. Während der Zellerkennung wurde durch das zur Anregung des Farbstoffes benötigte UV-Licht eine Energie von etwa 300J/m² deponiert.

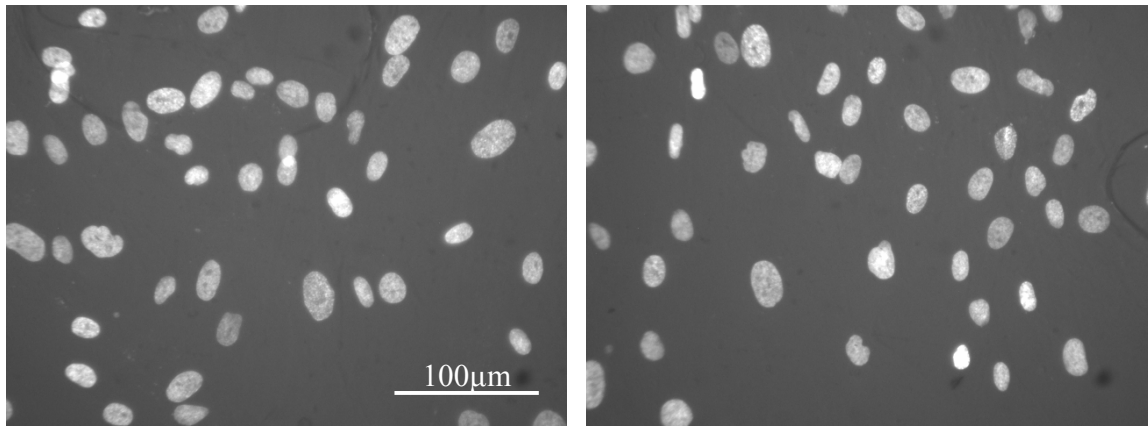


Abb. 6.10 Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von mit Hoechst 33342 gefärbten Fibroblasten. Die hellen Stellen markieren die Zellkerne, an deren DNA sich der Farbstoff anlagerte

Aus biologischer Sicht besteht bei dieser Methode jedoch die Gefahr, dass die zu untersuchenden Reaktionen der Zellen nach der Bestrahlung durch den in den Zellkernen vorhandenen Farbstoff beeinflusst werden. Daneben besteht die Gefahr, dass das zur Anregung des Farbstoffes benutzte UV-Licht ($\lambda = 355\text{nm}$ für Hoechst 33342) zusätzliche Schäden in der Zelle verursacht.

Um den Einfluss des Farbstoffes auf das Zellwachstum zu überprüfen, wurden nach der bereits in Kapitel 4.1 beschriebenen Methode Wachstumskurven für CHO-K1 Zelle, die mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen gefärbt wurden, aufgenommen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 6.11 zu sehen.

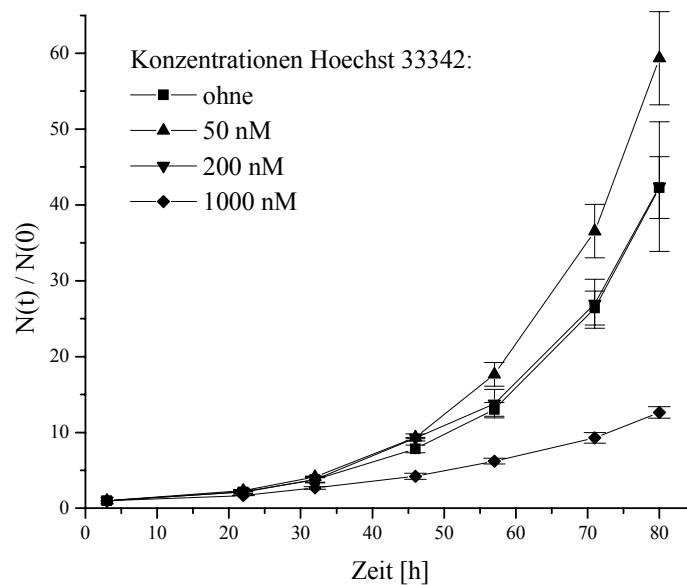


Abb. 6.11 Wachstumskurven für CHO-K1 Zellen, die jeweils eine Stunde in Nährmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen des DNA-Farbstoffs Hoechst 33342 kultiviert wurden

Man erkennt, dass die Wachstumskurve bei einer Farbstoffkonzentration von 200nM praktisch mit der Referenzkurve übereinstimmt, während die Zellen bei Färbung mit einer Konzentration von 50nM schneller wuchsen. Da diese Kurven jedoch mit relativ geringer

Statistik aufgenommen wurden (jeweils 2 Petrischalen mit je ca. 30 Zellkolonien) und in diesen Diagrammen nur der Fehler des arithmetischen Mittelwertes aufgetragen ist, wird davon ausgegangen, dass die erhöhte Wachstumsrate nicht durch den Farbstoff, sondern durch andere, nicht mehr nachvollziehbare äußere Einflüsse verursacht wurde. Dagegen wird die deutlich niedrigere Wachstumsrate bei einer Farbstoffkonzentration von 1mM als direkten Effekt der Färbung interpretiert. Das bedeutet aber, dass zumindest bei der Untersuchung des Einflusses von ionisierender Strahlung auf die Wachstumsrate eine Farbstoffkonzentration von 200nM bei der Präparation der Zellen nicht überschritten werden sollte.

In einer zweiten Messreihe sollte der Einfluss des UV-Lichtes auf die Zellen gemessen werden. Hierzu wurden Wachstumskurven von CHO-K1 Zellen aufgenommen, die mit der in den Bestrahlungsexperimenten verwendeten Konzentration von 200nM Hoechst 33342 gefärbt und zusätzlich unterschiedlich lange mit UV-Licht beleuchtet wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 6.12 dargestellt.

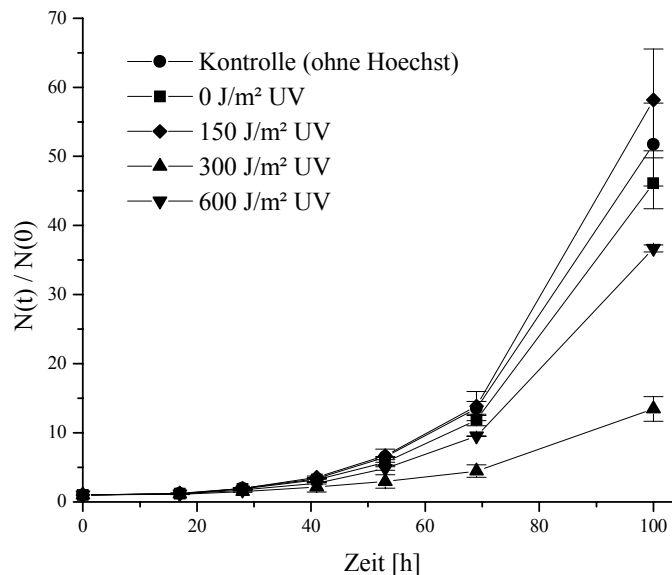


Abb. 6.12 Wachstumskurven für CHO-K1 Zellen, die mit 200nM Hoechst 33342 gefärbt und unterschiedlich stark mit UV-Licht bestrahlt wurden

Darin ist zu erkennen, dass die Wachstumsraten für die mit 0J/m² und 150J/m² bestrahlten Zellen innerhalb der Fehlergrenzen mit denen der Kontrollzellen übereinstimmen. Bei den beiden mit höheren Energien bestrahlten Zellen ist dagegen ein geringeres Wachstum zu verzeichnen, wobei bei der Probe mit 300J/m² aufgrund der extremen Abweichung und der Tatsache, dass die mit 600J/m² doppelt so stark bestrahlten Zellen sich deutlich besser vermehren, davon ausgegangen wird, dass das geringe Wachstum durch andere Einflüsse verursacht wurde.

Trotzdem zeigen diese Messungen, dass auch die Belichtungsdauer und damit die durch das UV-Licht deponierte Energie das Verhalten der Zellen beeinflussen kann. Bei den bisherigen Bestrahlungsexperimenten (siehe Kapitel 8 "Erste Versuche") wurde deshalb darauf geachtet, dass die zur Zellkernerkennung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie notwendige Belichtungszeit möglichst kurz ist.

Kapitel 7

Die Steuerungssoftware

Die Steuerungssoftware ist in Verbindung mit der externen Elektronik für die komplette Regelung der Bestrahlung zuständig. Dazu werden die Daten von den verschiedenen Komponenten des Aufbaus abgerufen, miteinander verknüpft und danach die für die automatische Bestrahlung notwendigen Steuersignale ausgegeben.

Da die Zellerkennung der aufwändigste Teil des Programms ist, wurde als Basis der Softwareentwicklung das Bildverarbeitungsprogramm ImagePro Plus der Firma MediaCybernetics verwendet. Das zugehörige Software Development Kit (SDK) ermöglicht es, die Steuerungssoftware in Visual C++ zu entwerfen und direkt in das Bildverarbeitungsprogramm zu integrieren.

In diesem Kapitel werden die einzelnen Komponenten dieser Software genauer betrachtet.

7.1 Datenaustausch

Für den Datenaustausch mit den externen Komponenten stehen neben Tastatur, Maus und Bildschirm, über die die Dateneingabe des Benutzers erfolgt, mehrere PCI-Karten im Rechner zur Verfügung:

- Eine IK220-Karte der Firma HEIDENHAIN um die Positionen der beiden Wegsensoren am X-Y-Tisch einzulesen
- Eine Karte der Firma PCO, über die die gesamte Kommunikation mit der PixelFly-Kamera durchgeführt wird
- Eine PCI-6713-Karte der Firma National Instruments mit 8 bipolaren analogen Ausgängen, 8 digitalen Aus-/Eingängen und zwei Hardware-Zählern. Je zwei der analogen Ausgänge werden für Bewegung der Tischmotoren bzw. die Ansteuerung der Strahlablenkung verwendet, während für die Kommunikation mit der Bestrahlungselektronik sieben der digitalen Aus-/Eingänge benötigt werden.

7.2 Kalibrierung der Strahlablenkung

Wie bereits in Kapitel 2 "Die Mikrosonde" beschrieben, besitzt die Mikrosonde eine magnetische Strahlablenkung, die die Bewegung des Strahlfokus in der Objektebene ermöglicht. Diese Strahlablenkung kann über zwei Spannungen, je eine für die horizontale und die vertikale Verschiebung, gesteuert werden.

Um bei der automatischen Bestrahlung die Ionen auf die erkannten Objekte lenken zu können, muss die Position des Strahlfokus im Kamerabild als Funktion der angelegten Steuerspannungen bestimmt werden (siehe Abb. 7.1).

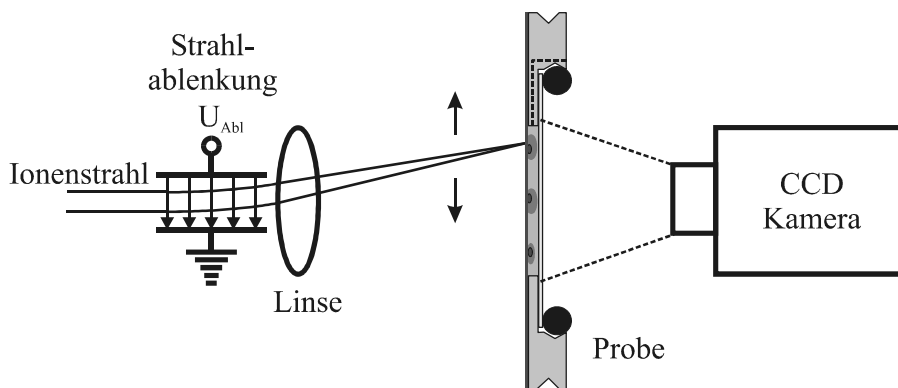


Abb. 7.1 Schema zur Position des Strahlfokus im Kamerabild als Funktion der Ablenkspannung (in der Mikrosonde wird eine magnetische Ablenkung verwendet, die über Spannungen gesteuert wird).

Bei der Kalibrierung wird davon ausgegangen, dass die Verschiebung des Strahls in beide Richtungen linear von den angelegten Spannungen abhängt. In mehreren Versuchen wurde gezeigt, dass der durch diese Näherung gemachte Fehler bei Strahlauslenkungen von unter einem Millimeter, wie sie in den Experimenten vorgesehen sind, vernachlässigt werden kann. Damit kann die Umrechnung von Bildkoordinaten der Kamera in Steuerspannungen der Strahlablenkung als Transformation zwischen linearen Koordinatensystemen betrachtet werden (siehe Abb. 7.2).

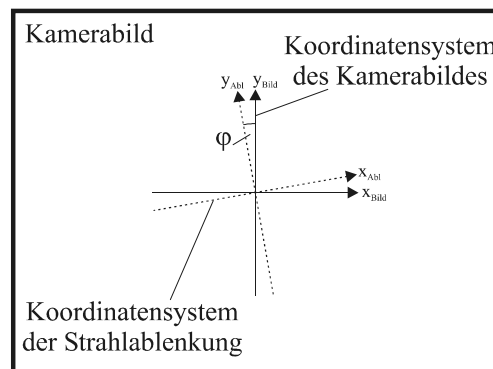


Abb. 7.2 Schema zur Koordinatentransformation zwischen Kamerabild und Strahlablenkung

Die Berechnung erfolgt dann mit:

$$\begin{pmatrix} U_x \\ U_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} U_x \\ U_y \end{pmatrix}_{x=y=0} + \begin{pmatrix} c_x \cdot \cos \varphi & -c_y \cdot \sin \varphi \\ c_x \cdot \sin \varphi & c_y \cdot \cos \varphi \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{Bild}$$

Dabei bezeichnen:

$\begin{pmatrix} U_x \\ U_y \end{pmatrix}$ den Vektor der anzulegenden Strahlspannungen,

$\begin{pmatrix} U_x \\ U_y \end{pmatrix}_{x=y=0}$ anliegende Spannungen, wenn der Strahl im Ursprungspunkt des Bildes ist,
 $\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{Bild}$ die Position des Objektes, das bestrahlt werden soll.

$c_{x/y}$ sind Kalibrierungskonstanten für beide Richtungen mit der Dimension Volt/Pixel. φ ist der Winkel zwischen den Achsen in denen der Strahl ausgelenkt wird und dem Koordinatensystem im Kamerabild.

Für die Berechnung der Konstanten in dieser Gleichung müssen die Strahlpositionen im Kamerabild für drei linear unabhängige Spannungsvektoren bestimmt werden. Wie diese Positionsbestimmung technisch durchgeführt werden kann, wird in Kapitel 8 "Erste Versuche" dargestellt.

7.3 Kalibrierung der Tischbewegung

Ziel der Kalibrierung der Tischbewegung ist es, die Tischkoordinaten, also den Abstand zum Referenzpunkt des Tisches, der im Kamerabild erkannten Objekte, berechnen zu können. Diese Berechnung wird bei der Eingabe der Probanddaten, der Ausrichtung von zu bestrahlenden Objekten und Ionenstrahl und bei der Bestimmung der Koordinaten dieser Objekte benötigt.

Um die Berechnung durchführen zu können, muss die Position des Tisches, die sich gerade im Ursprungspunkt des Bildkoordinatensystems befindet, von den Positionssensoren (siehe Kapitel 3 "Der X-Y-Tisch") eingelesen werden. Aus dem Abstand der Objekte zu diesem Ursprungspunkt können dann deren Tischkoordinaten berechnet werden (siehe Abb. 7.3).

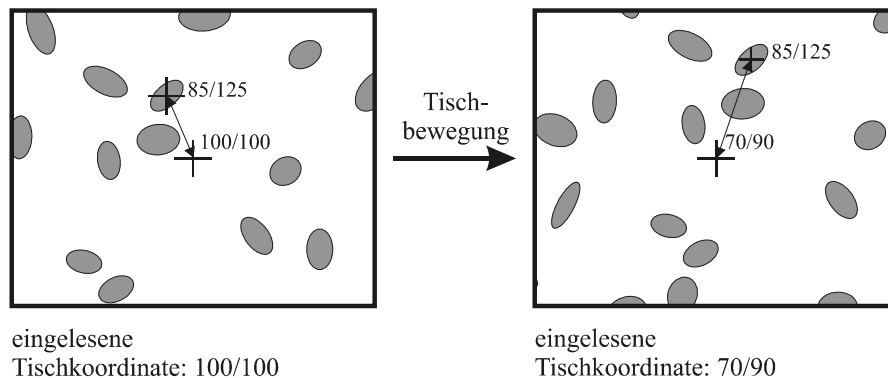


Abb. 7.3 Schema zur Berechnung der Tischkoordinate eines Objektes im Kamerabild. Die Position des Punktes im Zentrum des Bildes wird von den Positionssensoren eingelesen. Die anderen Koordinaten können dann über den Abstand im Bild berechnet werden

Bei der Umrechnung zwischen den beiden linearen Koordinatensystemen kann folgende Formel verwendet werden:

$$\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{Tisch} = \begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix}_{Tisch} + c \cdot \begin{pmatrix} \cos \varphi & -\sin \varphi \\ \sin \varphi & \cos \varphi \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{Bild}$$

Dabei bezeichnen:

- $\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{Tisch}$ die zu berechnende Tischkoordinate eines Bildpunktes,
- $\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{Bild}$ die Bildkoordinate, deren Tischposition bestimmt werden soll und
- $\begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix}_{Tisch}$ die Tischkoordinate des Ursprungspunktes im Koordinatensystem des Bildes.

Mit ϕ wird der Winkel zwischen den Achsen der beiden Koordinatensysteme bezeichnet. Im Gegensatz zur Umrechnung bei der Strahlspannung wird hier nur eine Kalibrationskonstante c mit der Dimension $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ benötigt, da bei beiden Achsen des Tisches die Bewegung in Mikrometern gemessen wird und die Kamerapixel quadratisch sind. Die Position des Ursprungs des Bild-Koordinatensystems wird direkt von den Positionssensoren des Tisches (siehe Kapitel 3 "Der X-Y-Tisch") aufgenommen, entspricht also der aktuellen Tischposition.

Zur Berechnung der Konstanten in dieser Formel muss die Bildposition eines Punktes auf der Probe für zwei verschiedene Tischstellungen bestimmt werden. Hierzu muss der Benutzer einen Punkt der Probe im Kamerabild anklicken, den Tisch so verfahren, dass dieser Punkt noch im Bild sichtbar ist und ihn daraufhin erneut anklicken.

7.4 Eingabe der Probendaten

Die Eingabe der Probendaten erfolgt durch den Benutzer und beinhaltet sowohl die Fläche der Probe, die bestrahlt werden soll, als auch zwei Referenzpunkte auf der Probe, die es ermöglichen, die Koordinaten der bestrahlten Objekte auch mit anderen Tischen wieder anzufahren.

7.4.1 Fläche der Probe

Die Steuerungssoftware unterstützt sowohl runde als auch rechteckige Probeflächen. Diese können über einen Dialog definiert werden, in dem für runde Proben deren Mittelpunkt und der Radius, für rechteckige Proben die Koordinate der linken oberen Ecke sowie Höhe und Breite eingegeben werden müssen. Daneben besteht die Möglichkeit, direkt am Bildschirm durch Anklicken geeigneter Stellen auf der Probe deren Fläche zu bestimmen. Für runde Proben müssen dazu drei Punkte auf deren Rand, bei rechteckigen Proben ein Punkt auf jeder der vier Kanten angeklickt werden. Mit diesen Informationen ist die Probenfläche jeweils eindeutig definiert.

7.4.2 Eingabe der Referenzpunkte

Da die Auswertung der bestrahlten Proben nicht in der Mikrosonde erfolgt, ist es notwendig, die in der Mikrosonde bestimmten Koordinaten der bestrahlten Stellen in das Koordinatensystem eines anderen Tisches umzurechnen. Hierbei kann wieder die bereits bei der Kalibrierung des Tisches benutzte Formel zur Umrechnung zwischen zwei linearen Koordinatensystemen benutzt werden:

$$\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{neu} = \begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix}_{neu} + c \cdot \begin{pmatrix} \cos \varphi & -\sin \varphi \\ \sin \varphi & \cos \varphi \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{Mikrosonde}$$

Hierbei sind:

- $\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{neu}$ die zu berechnende Koordinate im neuen Tischsystem,
- $\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}_{Mikrosonde}$ die Koordinate im Tischsystem der Mikrosonde und
- $\begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix}_{neu}$ die Koordinate des Ursprungpunktes des Mikrosontisches im neuen System.

φ bezeichnet den Winkel zwischen den beiden Systemen und c ist eine Kalibrierungskonstante, die eine Umrechnung zwischen verschiedenen Maßeinheiten erlaubt.

Eine recht einfache Methode, diese Parameter zu bestimmen, besteht darin, in beiden Systemen die Koordinaten von zwei ausgezeichneten Punkten auf der Probe aufzunehmen. Die Auswahl solcher Referenzpunkte auf der Probe ist in Kapitel 8 "Erste Versuche" genauer beschrieben.

Alternativ dazu kann durch eine geeignete Halterung im neuen Tischsystem, die diejenigen im X-Y-Tisch der Mikrosonde entspricht (siehe Kapitel 3 "Der X-Y-Tisch") dafür gesorgt werden, dass $\varphi = 0$ wird. Messen außerdem beide Tische in metrischen Einheiten, so wird die Konstante $c = 1$ und die Umrechnung zwischen den beiden Systemen beschränkt sich auf die Addition eines konstanten Vektors. An einer solchen Halterung wird zur Zeit gearbeitet.

7.5 Automatische Bestrahlung

Bei der automatischen Bestrahlung können Bilder von der gesamten oder von Teilen der Probe aufgenommen werden. In den Einzelbildern wird dann sofort die Objekterkennung, -auswahl und die Bestrahlung durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte mit den verschiedenen Variationsmöglichkeiten dargestellt, die Bestrahlungen entsprechend der biologischen Fragestellung ermöglichen.

7.5.1 Anfahren von Positionen

Bei der Auswahl der zu bestrahlenden Fläche in der Probe stehen zwei Optionen zu Auswahl:

- Gesamte Probe:
Hierbei werden die Positionen so angefahren, dass sich die dort aufgenommenen Einzelbilder leicht überlappen und zusammen die gesamte Probe bedecken.
- Eine bestimmte Anzahl von Feldern in der Probe:
Bei dieser Option wird eine vom Benutzer vorgegebene Anzahl von Positionen auf der Probe angefahren. Diese Positionen werden von der Software zu Beginn der Bestrahlung aus Probenfläche und Anzahl so berechnet, dass sie gleichmäßig auf der gesamten Probe verteilt sind.

7.5.2 Objekterkennung

Wie bereits in Kapitel 6 "Zellerkennung" beschrieben, wird in den Experimenten Fluoreszenzmikroskopie zur Erkennung der Zellen verwendet. Dabei emittiert ein Farbstoff in den Zellkernen Fluoreszenzlicht, wodurch deren Positionen in den Bildern durch die Bestimmung der hellen Objekte leicht ermittelt werden können. Da sich aber Größe und Helligkeit der Kerne für verschiedene Zellarten unterscheiden und zudem auch Testobjekte wie z.B. vorgeätzte Spuren in CR39 (siehe Kapitel 8 "Erste Versuche") durch ihren Kontrast erkannt werden sollen, kann der Erkennungsalgorithmus über verschiedene Optionen an die entsprechenden Objekte angepasst werden:

- Hintergrundkorrektur des Bildes:
Wenn diese Option gewählt ist, werden durch eine im Softwarepaket von ImagePro Plus vorhandene Funktion die Intensitätsschwankungen der Hintergrundpixel vermindert. So können Effekte im Bild, die beispielsweise von einer ungleichmäßigen Ausleuchtung herrühren, korrigiert werden.
- Einstellung der Intensitätsgrenzen:
Um Objekte über ihren Kontrast erkennen zu können, müssen die Grenzen, innerhalb derer die Grauwerte dieser Objekte liegen, definiert werden. Dazu kann der Benutzer entweder feste Werte vorgeben oder die Grenzen werden als Summe von Mittelwert und Standardabweichung des Bildhistogrammes, die jeweils mit einem Faktor multipliziert werden, berechnet.
- Bestimmung von Auswahlkriterien:
Unter allen Objekten, deren Pixelintensitäten innerhalb der gesetzten Grenzen liegen, können durch weitere Merkmale diejenigen herausgefiltert werden, die wirklich von Interesse sind. ImagePro Plus stellt dabei eine Reihe verschiedener Kriterien wie Fläche, Durchmesser, etc zur Verfügung.
- Trennung von überlappenden Objekten:
Ist diese Option gewählt, so wird die im Softwarepaket von ImagePro Plus vorhandene "Watershed-Split"-Funktion zur Trennung sich überlappend erkannter Objekte auf das Bild angewandt.

7.5.3 Objektauswahl

Da es bei biologischen Experimenten nicht immer sinnvoll ist, alle Zellen zu bestrahlen, kann der Benutzer Kriterien bestimmen, nach denen die zu bestrahlenden Objekte ausgewählt werden:

- Alle:
bei dieser Auswahl werden alle erkannten Objekte bestrahlt.
- Anzahl pro Einzelbild
Hier wird in jedem Bildfeld eine vorgegebene Anzahl von Objekten bestrahlt
- Prozent der Objekte
Bei dieser Option wird in der gesamten Probe ein vorgegebener Prozentsatz der Objekte bestrahlt.

7.5.4 Strahl und Objekt ausrichten

Vor der Bestrahlung müssen der Strahl und die Objekte ausgerichtet werden. Dazu können zwei Methoden verwendet werden:

- Die Objekte werden mit Hilfe des Tisches an die Position gefahren, an der sich der Strahlfokus befindet.

- Der Ionenstrahl wird mit Hilfe der Strahlablenkung zu der Position bewegt, an der sich das Objekt befindet.

Beide Methoden eignen sich grundsätzlich dazu, Strahl und Objekt auszurichten, allerdings kann der Strahl wesentlich schneller an die gewünschte Position bewegt werden, als dies mit dem Tisch möglich ist.

7.5.5 Bestrahlung

Bei der Bestrahlung selbst kann neben der Anzahl der Ionen auch das Muster bestimmt werden, in dem die Ionen das Objekt treffen sollen. Dabei besteht die Wahlmöglichkeit, alle Ionen ins Zentrum der Zelle zu lenken, sie auf einer Geraden mit gleichem Abstand zu platzieren oder sie in Form eines Kreuzes anzuordnen.

Dies kann zum Einen dazu genutzt werden, die Dosis innerhalb eines Zellkerns bewusst an verschiedenen Stellen zu deponieren, zum Anderen können beim Treffernachweis regelmäßige Muster in den Zellkernen leicht von zufälligen Schäden unterschieden werden, wodurch die Erkennung der bestrahlten Zellen wesentlich erleichtert wird (siehe Kapitel 8 "Erste Versuche").

Um die eigentliche Bestrahlung durchzuführen, muss der Strahlschalter vor den Objektschlitz der Mikrosonde (siehe Kapitel 2 "Die Mikrosonde") geöffnet und nach der Detektion der gewünschten Anzahl Ionen wieder geschlossen werden. Da die Steuerung dieses Ablaufs sehr schnell vor sich gehen muss, eignet sich dafür ein Rechner, in dem die Signale erst aufwändig verarbeitet werden müssen, nicht. Stattdessen übernimmt eine eigens dafür entworfene Steuerelektronik diese Aufgabe. Diese erhält vom Rechner lediglich einen Startimpuls und regelt danach die Bestrahlung mit einer - an einem Binärzähler einstellbaren - Anzahl von Ionen. Danach wird am Rechner ein Signal angelegt, das das Ende der Bestrahlung anzeigt.

7.5.6 Testbestrahlung

Neben der gezielten Bestrahlung von Objekten besteht zu Testzwecken und zur Herstellung biologischer Referenzproben auch die Möglichkeit, größere Flächen auf der Probe mit einem regelmäßigen Punktmuster zu bestrahlen (siehe Kapitel 8 "Erste Versuche").

Kapitel 8

Erste Versuche

Mit dem in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Aufbau wurden bereits einige Experimente zur Zellbestrahlung durchgeführt. Während bei den ersten Versuchen das Hauptaugenmerk auf die Tauglichkeit des Systems für diese Zwecke gerichtet war und Verbesserungen angestrebt wurden, wurden in der letzten Strahlzeit auch erste biologische Fragestellungen untersucht.

In diesem Kapitel werden die bisherigen Experimente dargestellt, wobei neben den Ergebnissen auch auf die bei der Durchführung angewandten Methoden, aufgetretenen Probleme und mögliche Problemlösungen eingegangen wird.

8.1 Trefferdetektion

Wie schon in Kapitel 5 „Das Vakuumfenster“ beschrieben, werden zur Trefferdetektion die Sekundärelektronen, die beim Durchgang eines Ions durch das Vakuumfenster entstehen, mit einem Channeltron nachgewiesen. Da sich das Amplitudenspektrum von dessen Signalen für verschiedene Ionen und Energien stark unterscheidet, muss zu Beginn jeder Strahlzeit der Grenzwert zur Unterscheidung echter Treffer von durch einzelne Elektronen erzeugten Hintergrundsignalen neu bestimmt werden. Hierzu wird ein Sekundärelektronenspektrum des unfokussierten Ionenstrahls auf dem Vakuumfenster aufgenommen (siehe Abb. 8.1), in dem der Grenzwert abgelesen werden kann. Dieser wird dann am Single Channel Analyser, mit dem die Signale des Channeltrons ausgewertet werden, als Schwelle eingestellt.

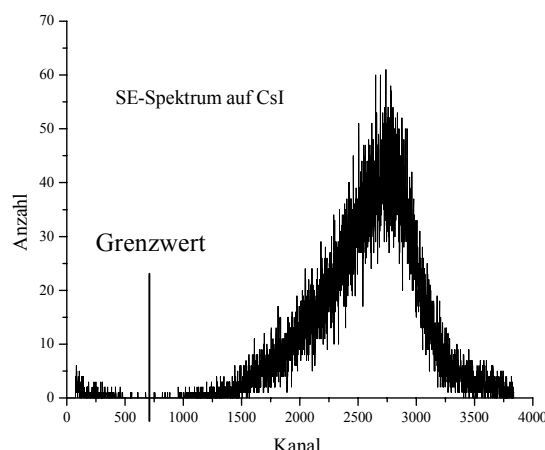


Abb. 8.1 Amplitudenspektrum eines Channeltrons bei Bestrahlung einer CsI-Oberfläche mit C-Ionen (4,8MeV/u). Die senkrechte Linie markiert den Grenzwert zur Unterscheidung von echten Ionentreffern und Hintergrundsignalen

8.2 Fokussierung des Strahls

Bevor an der Mikrosonde gezielte Bestrahlungen durchgeführt werden können, müssen die Ströme der magnetischen Linse so eingestellt werden, dass der Fokus des Ionenstrahls in der Objektebene liegt. Diese Einstellung, die im Folgenden näher beschrieben wird, wird mit Hilfe der so genannten Scanning Transmission Ion Microscopy (STIM) durchgeführt.

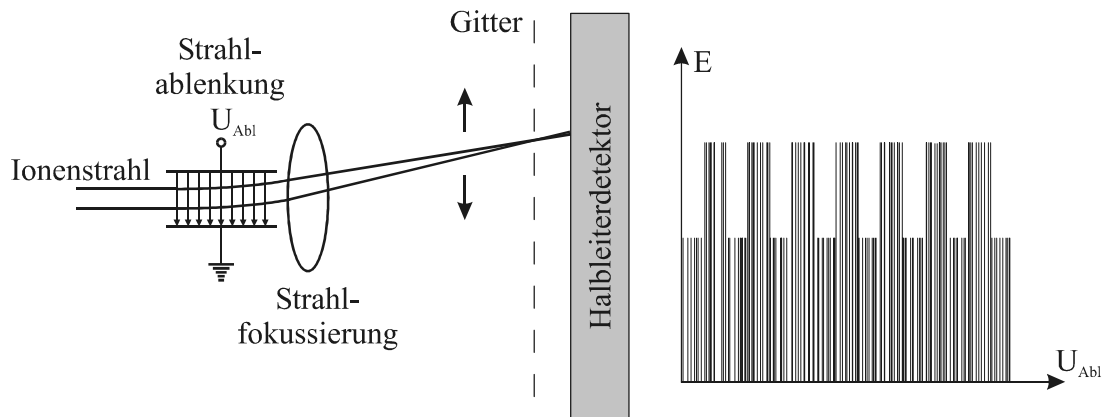


Abb. 8.2 Schematische Darstellung der STIM: Der Ionenstrahl wird mittels der Strahlablenkung über ein Kupfergitter gerastert. Dabei wird die Energie der Ionen hinter dem Gitter mit einem Halbleiterdetektor gemessen. Das Diagramm, in dem die gemessenen Energien als Funktion der Ablenkspannung aufgetragen sind (rechts), spiegelt den Energieverlust in der Probe wider

Bei der Strahlfokussierung mittels STIM wird der Ionenstrahl, wie in Abb. 8.2 links dargestellt, mit Hilfe der Strahlablenkung über ein dünnes Kupfergitter gerastert während der Halbleiterdetektor hinter dem Gitter die Energie der auftreffenden Teilchen misst.

Trägt man die gemessene Energie als Funktion der Ablenkspannung auf, so erhält man ein Diagramm der Energieverteilung hinter der Probe (siehe Abb. 8.2 rechts), das den lokalen Energieverlust darin widerspiegelt. Zur Erzeugung eines zweidimensionalen STIM-Bildes der Probe werden in einem Diagramm nur die Positionen der Ionen eingezeichnet, die im Gitter Energie verloren. In Abb. 8.3 ist das STIM-Bild eines Kupfergitters mit einer Gitterkonstanten von 12,5µm dargestellt.

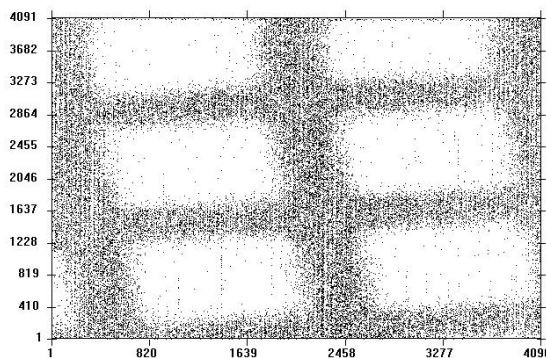


Abb. 8.3 STIM-Bild eines Gitters mit einer Gitterkonstante von 12,5µm

Die Konturen des STIM-Bildes werden umso unschärfer, je weiter der Strahlfokus von der Objektebene entfernt ist, da dann an den Kanten der Probe sowohl Ionen mit voller, als

auch verminderter Energie den Detektor erreichen (siehe Abb. 8.4). Zur Fokussierung des Ionenstrahls in die Objektebene werden daher die Linsenströme so eingestellt, dass die Konturen des Kupfergitters im STIM-Bilder so scharf wie möglich sind (siehe als Beispiel Abb. 8.3).

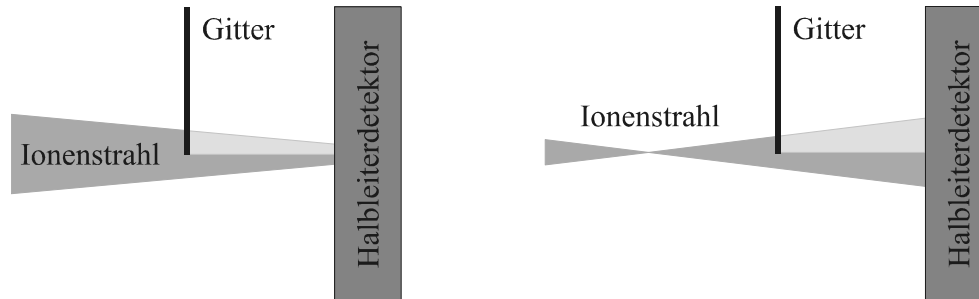


Abb. 8.4 Schematische Darstellung der Energieverteilung der Ionen bei unfokussiertem Strahl

8.3 Kalibrierung der Strahlablenkung

Um die Ionen mit Hilfe der Strahlablenkung auf die im Kamerabild erkannten Zellen lenken zu können, ist eine Kalibrierung der Strahlablenkung notwendig (siehe Kapitel 7 "Die Steuerungssoftware"). Dazu müssen für drei unterschiedliche Einstellungen der Steuerspannungen die Positionen des Ionenstrahls im Kamerabild bestimmt werden. Bei den bisherigen Strahlzeiten wurden hierfür zwei unterschiedliche Methoden angewandt.

8.3.1 Kalibrierung mittels Szintillator

Bei dieser Methode wird das Licht, das ein Szintillator bei der Bestrahlung mit Ionen aussendet, zur Bestimmung der Strahlposition benutzt. Bei unseren Versuchen wird hierzu ein Szintillatorplättchen vom Typ NE111 mit einer Dicke von etwa 600µm verwendet, bei dem die bestrahlte Fläche zur Erhöhung der Lichtausbeute mit Gold beschichtet ist. Nach dem Einbau der Probe in den X-Y-Tisch wird die Optik auf die reflektierende Goldschicht fokussiert, in deren Bereich die Energie der Ionen in Lichtblitze umgewandelt wird.

Danach werden drei unterschiedliche Steuerspannungen für die Ablenkung eingestellt, wonach jeweils der Strahl eingeschaltet und ein Bild der Probe bei maximaler Integrationszeit der Kamera aufgenommen wird. Wenn der Ionenstrahl intensiv genug ist, entstehen dabei Bilder, wie in Abb. 8.5 gezeigt, in denen die Positionen des Strahls klar erkennbar sind. Diese können dann zur Kalibrierung der Strahlablenkung benutzt werden.

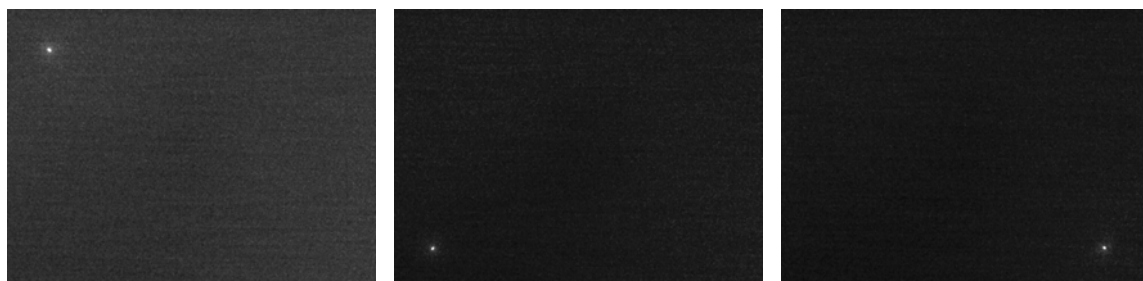


Abb. 8.5 Bilder eines Szintillators bei Bestrahlung mit C-Ionen (4,8 MeV/u) für unterschiedliche Strahlablenkungen. Die hellen Stellen in den Bildern entstanden durch vom Ionenstrahl im Szintillator erzeugten Photonen und markieren daher die Position des Strahlfokus

8.3.2 Kalibrierung mittels STIM

Neben der gerade beschriebenen Methode kann die Strahlauslenkung auch mit Hilfe eines STIM-Bildes kalibriert werden. Dieser Weg ist wesentlich zeitaufwändiger, kann dafür aber auch angewandt werden, wenn die Strahlintensität so niedrig ist, dass das Signal eines Szintillators nicht zur Positionsbestimmung ausreicht.

Bei dieser Methode wird ein STIM-Bild von einem Gitter mit einer ausgezeichneten Stelle aufgenommen. Dabei wird die Strahlablenkung in beide Richtungen mit Spannungen von exakt -5V bis $+5\text{V}$ gesteuert. Die Differenz von 10V wird von der Aufnahmeelektronik auf jeweils 4096 Kanäle aufgeteilt. So kann im in Abb. 8.6 links dargestellten STIM-Bild zu jeder Position die entsprechende Steuerspannung berechnet werden. Die Kalibrierung der Strahlablenkung erfolgt dann durch Zuordnung dieser Spannungen zu den entsprechenden Punkten im optischen Bild.

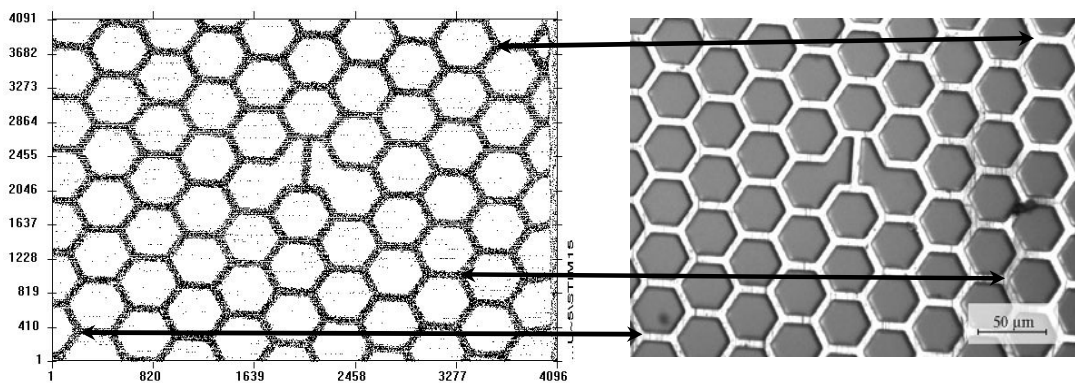


Abb. 8.6 STIM-Bild und das dazugehörige optische Bild zur Kalibrierung der Strahlablenkung

Bei den Kalibrierungen der Strahlablenkung wurde bisher während der Strahlzeiten eine Drift der Optik gegenüber Probe und Strahl von einigen Mikrometern pro Stunde festgestellt. Die Ursache dafür wird in einer thermischen Ausdehnung des Tisches vermutet, auf dem die Optik aufgebaut ist. Daneben könnte auch ein Absinken des Objektivs dafür verantwortlich sein, das zur Ausrichtung auf die Strahlmitte nicht starr eingebaut ist.

Um den Fehler durch diese Drift möglichst gering zu halten, wurde vor jeder gezielten Bestrahlung eine erneute Kalibrierung durchgeführt.

8.4 Bestrahlungen

8.4.1 Bestrahlung von Testproben

Für die Überprüfung der Genauigkeit der Mikrosonde, aber auch um den reibungslosen Ablauf der Objekterkennung und automatischen Bestrahlung zu testen, wurden in den bisherigen Strahlzeiten einige Testbestrahlungen durchgeführt, bei denen angeätzte Spuren in CR39-Plastik als Ziele dienten. Die Ergebnisse dieser Bestrahlungen konnten dann leicht durch erneutes Ätzen sichtbar gemacht werden. Dabei unterschieden sich die neu hinzugekommenen Spuren deutlich von den wesentlich größeren ursprünglichen Ätzgruben, auf die gezielt wurde.

In Abb. 8.7 sind Bilder einer Testprobe zu sehen, bei der jede vorgeätzte Spur mit einem Kreuz, bestehend aus 5 Punkten pro Achse, bestrahlt wurde. Der Abstand zwischen den Punkten, die durch jeweils drei Ionen erzeugt wurden, beträgt dabei $2\mu\text{m}$. Außerdem wurde

der bei der Bestrahlung sichtbare Bereich durch ein mit Ionen geschriebenes Rechteck markiert.

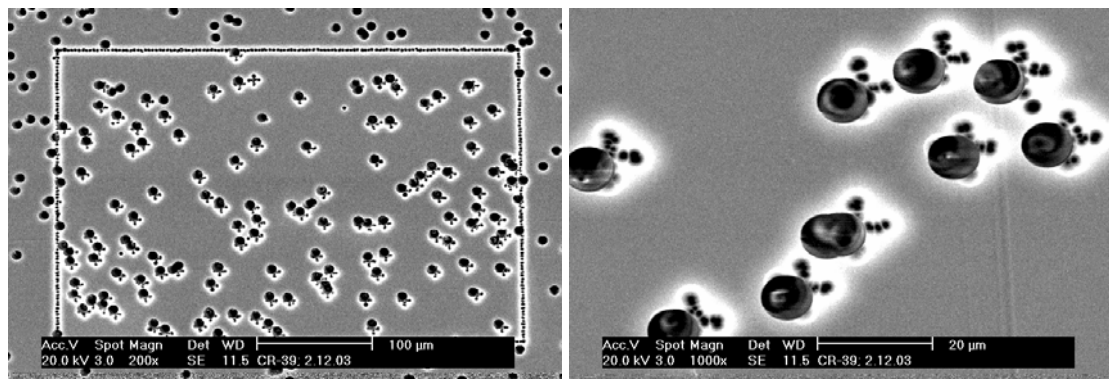


Abb. 8.7 CR39-Testprobe, bei denen vorgeätzte Spuren mit Kreuzen aus Ionentreffern bestrahlt wurden

In diesen Bildern ist zu erkennen, dass abgesehen von einer konstanten Abweichung von etwa $5\mu\text{m}$, die auf eine Krümmung in der Probe und dem damit zusammenhängenden optischen Fehler zurückgeführt wird, die geätzten Spuren zuverlässig bestrahlt wurden. Im Gegensatz dazu beschäftigte uns lange Zeit ein Problem, das in Abb. 8.8 dargestellt ist. Bei dieser Probe sollte jede Markierung mit genau einem Ion zentral bestrahlt werden. In dem nach der Bestrahlung aufgenommenen Bild ist jedoch erkenbar, dass es innerhalb des ursprünglichen Bildfeldes nur einen Punkt gibt, in dem die geätzten Spuren genau getroffen werden. Mit steigendem Abstand von diesem Punkt nimmt die Abweichung zwischen Ziel und getroffener Stelle zu.

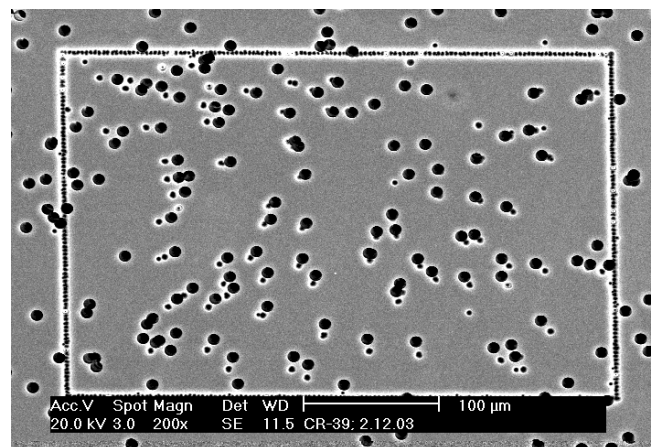


Abb. 8.8 CR39-Testprobe mit steigender Abweichung zwischen Ziel und getroffener Stelle

Ursache für diesen Fehler war, dass die Optik auf das Spiegelbild der Probe im Vakuumfenster fokussiert war (siehe dafür Abb. 4.1). Durch dessen Beschichtung mit Gold sind die beiden Bilder praktisch nicht zu unterscheiden. Da das Vakuumfenster aber leicht gebogen ist, gibt es eine kleine Verzerrung zwischen Original und Spiegelbild, die zu den oben beschriebenen Abweichungen führte.

Zur Verdeutlichung ist in Abb. 8.9 links ein Bild der Oberfläche und rechts das entsprechende Spiegelbild dargestellt. Unten wurden die Spuren dieser beiden Bilder farblich markiert überlagert. Man erkennt darin die gleichen Abweichungen, die auch in Abb. 8.8 zu sehen sind.

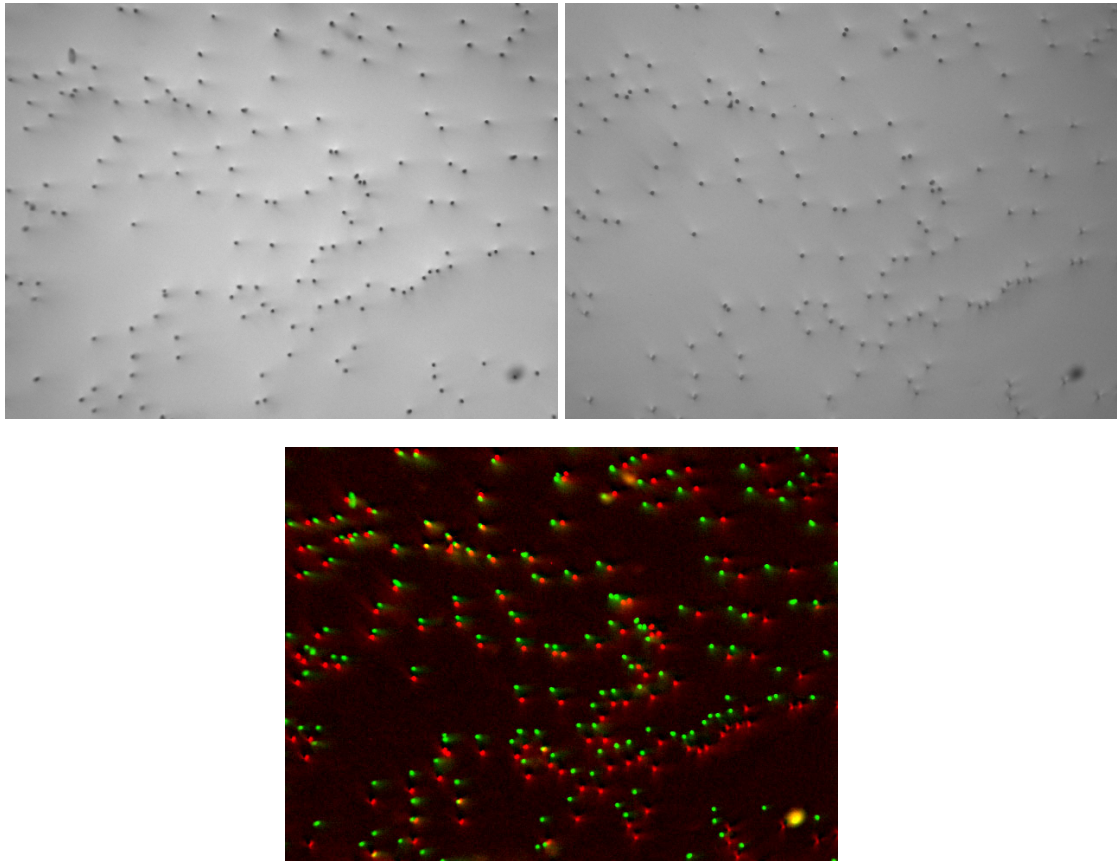


Abb. 8.9 Oben: Originale und gespiegelte Oberfläche einer CR39-Testprobe. Unten: Überlagerung der beiden Bilder

Um diesen Fehler bei weiteren Bestrahlungen zu vermeiden, wurde daraufhin nach dem Einsetzen jeder neuen Probe die Optik so weit von ihr entfernt, dass beim darauf folgenden Annähern die erste scharfe Abbildung die richtige Oberfläche darstellte.

8.4.2 Testbestrahlung von Zellen

Um zu zeigen, dass neben Testproben auch biologische Zellen präzise bestrahlt werden können, wurden ähnlich Versuche wie bei den CR39-Proben auch mit konfluenten, also in einer Schicht dicht aneinander liegender Fibroblasten (siehe dazu Fußnote Seite 13) durchgeführt. Die Ionentreffer in den Zellen wurden dabei mit Hilfe von p21 und 53BP1, zwei Proteinen, die am zellulären Reparaturmechanismus von Strahlenschäden an der DNA beteiligt sind, nachgewiesen. Wie in [SCH01] gezeigt, konzentriert sich p21 an den Stellen, an denen die Ionen den Zellkern durchqueren, während 53BP1 an DNA-Schadenstellen bindet [RAP01] und damit ein Marker für ioneninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche ist. Diese Proteine können mit Hilfe der Immunofluoreszenz-Färbung sichtbar gemacht werden. Dazu werden den bestrahlten und fixierten Zellen Antikörper zugesetzt, die spezifisch an diese Proteine binden. Nach Zugabe eines Zweit-Antikörpers, der mit einem

Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und an den ersten Antikörper bindet, können dann die Positionen der Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden [JAK00].

Die Färbungen aller in dieser Arbeit dargestellten bestrahlten Zellen wurden von Frau G. Becker aus der Abteilung Biophysik der GSI durchgeführt. Bei der Mikroskopie der Proben am konfokalen Lasermikroskop war Herr Dr. B. Jakob, ebenfalls Biophysik, maßgeblich beteiligt.

Da vor den ersten Experimenten nicht klar war, ob eine gezielte Bestrahlung von Zellen mit diesem Aufbau möglich ist, sollte zunächst die Eignung der Färbemethode als Treffernachweis und die Größe des Strahlfokus in den Zellen untersucht werden. Dazu wurde ein größeres Gebiet auf der Probe mit einem regelmäßigen Punktmuster bedeckt, bei dem die einzelnen Punkte durch ein oder mehrere Ionen erzeugt wurden. Der Abstand zwischen den Punkten wurde dabei mit $7\mu\text{m}$ so gewählt, dass jeder im bestrahlten Gebiet vorhandene Zellkern mindestens einmal getroffen wird.

In Abb. 8.10 ist das Ergebnis einer solchen Musterbestrahlung zu sehen, wobei jeder Punkt durch 10 C-Ionen mit einer Energie von $4,8\text{MeV/u}$ erzeugt wurde. Das Protein 53BP1 fluoresziert in diesen Bildern gelb, während die DNA der Zellkerne mit Propidium-Iodid rot gefärbt wurde.

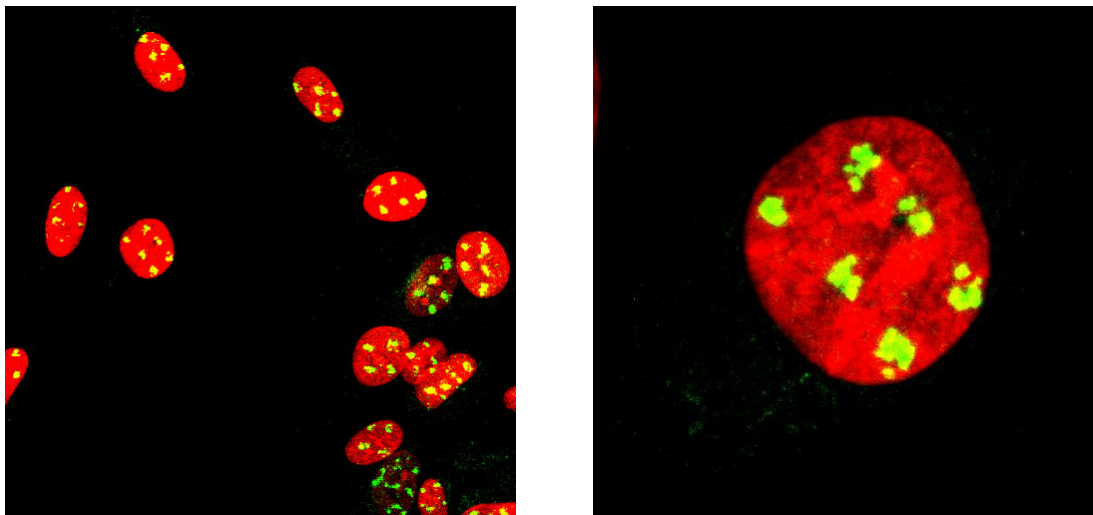


Abb. 8.10 Regelmäßiges Ionenmuster (gelb) in Zellkernen (rot). Jeder Punkt wurde dabei mit 10 C-Ionen ($4,8\text{MeV/u}$) bestrahlt. Der Abstand zwischen den Punkten beträgt $7\mu\text{m}$. Rechts: Ausschnittsvergrößerung

Das regelmäßige Muster, das in beiden Bildern deutlich zu erkennen ist, lässt darauf schließen, dass die gewählte Färbemethode dazu geeignet ist, Ionenspuren in den Zellen sichtbar zu machen. Dass im linken Bild nicht alle Muster in den einzelnen Kernen die gleiche Ausrichtung besitzen, liegt an der etwa dreistündigen Inkubationszeit zwischen Bestrahlung und Fixierung, in der sich die Zellen noch recht stark bewegen können.

Im rechten Bild ist eine der Zellen vergrößert dargestellt. Darin streuen die einzelnen Treffer um den gemeinsamen Schwerpunkt mit einer Abweichung von $\pm 1,5\mu\text{m}$.

Direkt im Anschluss an die Musterbestrahlung wurden auch die ersten Versuche zur gezielten Bestrahlung von Zellen durchgeführt. Hierzu wurde auf der Probe ein Gebiet festgelegt, in dem alle erkannten Zellen zentral bestrahlt werden sollten.

In Abb. 8.11 ist links eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von gefärbten Zellkernen zu sehen, die während des Experiments an der Mikrosonde gemacht wurde. Darin sind die erkannten und bestrahlten Zellkerne mit einem roten Kreuz markiert. Im rechten Bild ist die gleiche Stelle der Probe nach der Bestrahlung mit jeweils 16 C-Ionen (4,8MeV/u) und Färbung des 53BP1-Proteins zu sehen. Die leichten Veränderungen in der Lage der Zellen zueinander wurde wieder auf deren Wanderung während der Inkubationszeit zurückgeführt. In den Zellen 1 bis 4 kann man deutlich die gelben 53BP-Foci erkennen, die denen in Abb. 8.10 entsprechen. Dass in den unbestrahlten Zellen 5 und 6 diese Punkte nicht zu sehen sind, zeigt, dass die Färbungen in den Zellen 1-4 keine zufälligen Foci darstellen und damit die Bestrahlung erfolgreich war.

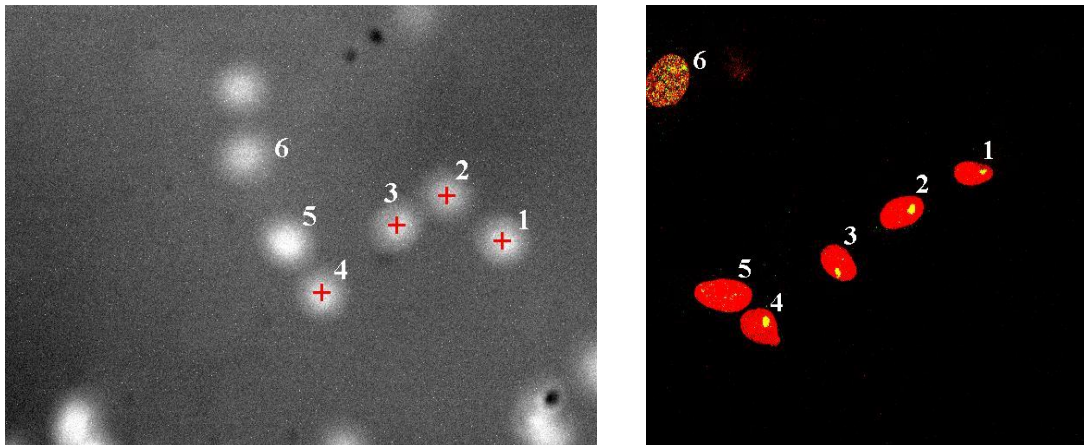


Abb. 8.11 Links: Bild zur Erkennung der Zellkerne, aufgenommen an der Mikrosonde. Erkannte und bestrahlte Zellen sind mit rotem Kreuz markiert. Rechts: Gleiche Stelle nach der Bestrahlung und Färbung

Um diese Messung zu präzisieren, wurden in der darauf folgenden Strahlzeit einzelne Zellen in einem konfluenten Zellrasen mit einem leicht wiedererkennbaren Muster bestrahlt. Hierbei wurde ein Kreuz gewählt, bei dem jede Achse aus drei Punkten mit einem Abstand von je $3\mu\text{m}$ besteht und jeder Punkt durch fünf C-Ionen (4,8 MeV/u) erzeugt wurde. In Abb. 8.12 wird eine der auf diese Weise bestrahlten Zellen gezeigt. Das linke Bild ist dabei die an der Mikrosonde zur Erkennung der Zellkerne aufgenommene Aufnahme, in der die bestrahlte Zelle mit einem Kreuz gekennzeichnet ist. Im rechten Bild ist die gleiche Stelle nach Bestrahlung und Färbung zu sehen. Hier wurden mittels Immunofluoreszenz-Doppelfärbung die Proteine 53BP rot und p21 grün dargestellt. Das klar erkennbare Kreuz im bestrahlten Kern verdeutlicht die Präzision der Zellbestrahlung.

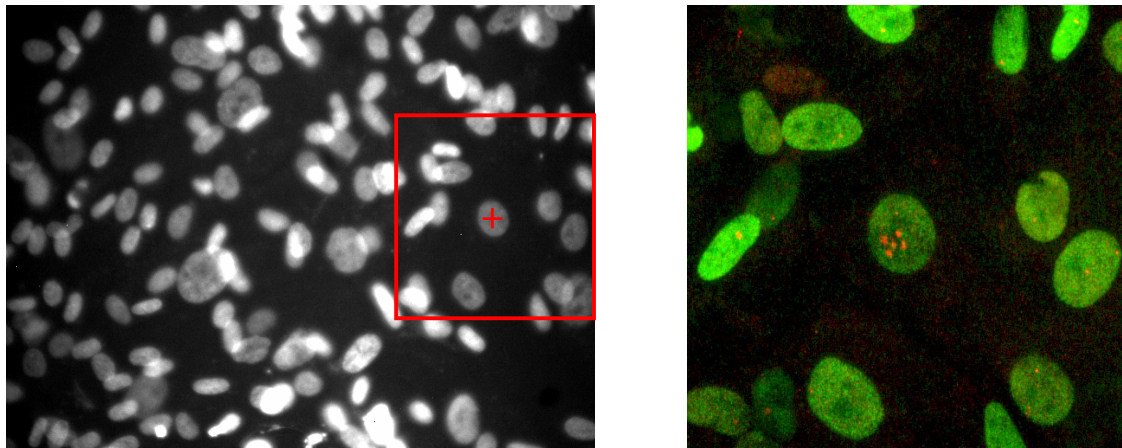


Abb. 8.12 Links: Bild zur Erkennung von Zellkernen, aufgenommen an der Mikrosonde. Die bestrahlte Zelle ist mit einem roten Kreuz markiert. Der rote Rahmen kennzeichnet den im linken Bild dargestellten Bereich. **Rechts:** Gleiche Stelle der Probe nach Bestrahlung und Färbung

Ein Problem, das lange Zeit das Auffinden der bestrahlten Zellen bei der Auswertung der Experimente erschwerte, stellte die Suche nach geeigneten Referenzpunkten auf der Probe dar. Wie in Kapitel 7 "Die Steuerungssoftware" beschrieben, werden diese Referenzpunkte benötigt, um die gespeicherten Positionsdaten der Zellen in die Koordinaten des Tisches am Auswerte-Mikroskop umzurechnen und so das Auffinden wesentlich zu erleichtern.

Eine Erschwernis bei der Suche nach geeigneten Referenzpunkte ist, dass sie von beiden Seiten der Probe aus sichtbar sein müssen, da die Zellen bei der Erkennung in der Mikrosonde von oben, bei der Auswertung jedoch von unten mikroskopiert werden. Daher wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, entsprechende Markierungen auf der Bodenfolie aufzubringen. Da dafür bis zu den ersten Experimenten keine geeignete Lösung gefunden wurde, wurden in jeder Probe zwei der bei der Produktion der Folie entstandenen Strukturen (siehe Abb. 8.13 links) als Referenzpunkte verwendet. Diese hatten jedoch die Nachteile, dass sie nicht sehr präzise, sehr kontrastarm und schwer wieder zu finden waren. Eine Verbesserung konnte durch Aufkleben zweier kleiner Dreiecke aus Polycarbonatfolie mit einer Dicke von 10 µm erreicht werden, auf denen sich geätzte Ionenspuren befanden (siehe Abb. 8.13 rechts). Durch die Auswahl einzelner Punkte im Dreieck konnten die Referenzpunkte sehr präzise bestimmt und nach den Experimenten durch ihren hohen Kontrast und die Position an der Spitze des Polycarbonat-Dreiecks sehr leicht wiedergefunden werden.

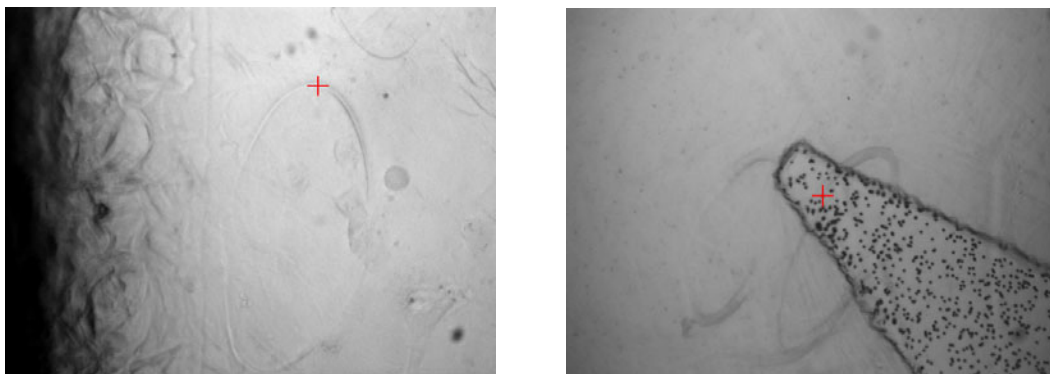


Abb. 8.13 Mögliche Referenzpunkte auf der Probe. Links: Struktur im Polypropylen. **Rechts:** Aufgeklebte Polycarbonat-Spitze mit geätzten Spuren

Eine Alternative zu den Referenzpunkten auf der Probe bietet eine Halterung im Tisch des Auswerte-Mikroskops, in die die Proben reproduzierbar eingesetzt werden können. Dabei sind die Zellgefäße genauso ausgerichtet wie im X-Y-Tisch der Mikrosonde. Da damit eine Drehung der Probe vermieden wird und alle Tische die Positionen in metrischen Einheiten messen, müssen zur Umrechnung von Koordinaten in die verschiedenen Systeme nur konstante Vektoren addiert werden, die einmalig bestimmt werden müssen. Diese Halterung wurde erst nach den letzten Experimenten fertig gestellt, so dass damit bisher noch keine praktischen Erfahrungen vorliegen.

8.4.3 Zellbestrahlungen zu biologischen Fragestellungen

Parallel zu den im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Bestrahlungstests wurde in der letzten Strahlzeit ein erstes Experiment zu einer biologischen Fragestellung durchgeführt, das hier kurz dargestellt wird.

Da bisher noch keine poly(ADP-ribose)-Foci (PAR-Foci) nach Schwerionenbestrahlung nachgewiesen werden konnten, sollte in unserem Experiment überprüft werden, ob sie durch Bestrahlung eines Punktes im Zellkern mit mehreren Kohlenstoffionen erzeugt werden können, und ob ein Dosisgrenzwert entsprechend dem, der von Tartier et al. [TAR03] für Protonen gefunden wurde, existiert.

In unserem Experiment wurden C-Ionen mit einer Energie von 4,8MeV/u (linearer Energietransfer LET = 300keV/μm) verwendet, für die die in den Zellen deponierte Dosis nach [TAU99] berechnet werden kann mit:

$$\text{Dosis[Gy]} = \text{Fluenz[Ionen/cm}^2\text{]} \cdot \text{LET[keV/}\mu\text{m]} \cdot 1,602 \cdot 10^{-9} \cdot (1/\rho)[\text{cm}^3/\text{g}]$$

wobei ρ die Dichte der Probe ist. Bei einer mittleren Fläche eines Zellkerns von 230μm² und einer Dichte von 1g/cm³ deponiert dann jedes Ion eine Dosis von etwa 0,2Gy im Zellkern.

Bei den Versuchen wurden in zwei Proben die Zellkerne konfluenter Fibroblasten mit je 25 bzw. 100 C-Ionen bestrahlt, was einer Dosis von 5Gy bzw. 20Gy entspricht. In Abb. 8.14 sind die Ergebnisse dieser Bestrahlungen zu sehen, wobei links jeweils das an der Mikrosonde erstellte Bild zu sehen ist, in dem die bestrahlten Zellen mit roten Kreuzen markiert sind und rechts die entsprechenden Stellen auf der Probe nach Bestrahlung und Immunofluoreszenz-Färbung der PAR-Gruppe gezeigt werden.

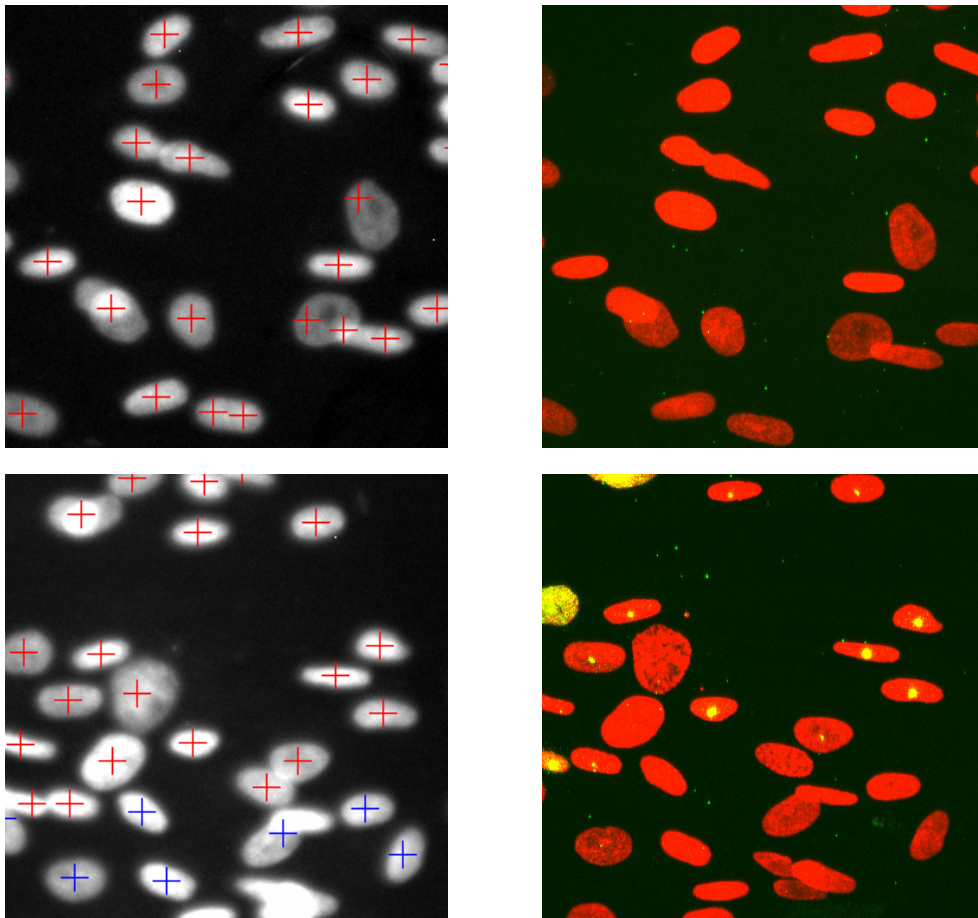


Abb. 8.14 Links: Aufnahmen, die an der Mikrosonde zur Zellerkennung gemacht wurden. Die mit roten Kreuzen markierten Stellen wurden oben mit 25 Ionen unten mit 100 Ionen bestrahlt. **Rechts:** Gleiche Stellen auf den Proben nach der Bestrahlung und Färbung von poly(ADP-ribose)

Im Bild rechts unten zeigen fast alle der mit 100 Ionen (20Gy) bestrahlten Zellkerne (rot) PAR-Foci (gelb), während sie rechts oben in den mit 25 Ionen (4Gy) bestrahlten Zellen nicht zu beobachten sind.

Bei der Nachweisreaktion der PAR-Proteine verhalten sich also mit Kohlenstoffionen bestrahlte Zellen genauso, wie es von protonenbestrahlten Zellen bei gleicher Dosis berichtet wurde.

Genauere Untersuchungen zu diesem Effekt, vor allem auch mit schwereren Ionen, sind in den nächsten Strahlzeiten geplant.

Kapitel 9

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Schwerionen-Mikrosonde an der GSI so modifiziert, dass damit die Bestrahlung einzelner Zellen mit einer definierten Anzahl von Ionen möglich ist. Dazu mussten verschiedene neue Komponenten entwickelt werden, die den besonderen Anforderungen entsprechen:

Es wurde ein Zellgefäß entworfen, in dem die Zellen vor und nach den Experimenten kultiviert und in dem sie während der Bestrahlung vertikal in einer Nährlösung gehalten werden können. Der Boden dieses Gefäßes, auf dem die Zellen anwachsen und durch den sie auch bestrahlt werden, besteht dabei aus einer nur 4µm dicken Polypropylenfolie, wodurch die Streuung der Ionen minimiert wird. Um zu gewährleisten, dass alle im diesem Gefäß eingesetzten Materialien unschädlich für die Zellen sind, wurden Wachstumskurven aufgenommen, mit denen dies überprüft werden konnte.

Ein selbst konstruierter X-Y-Tisch, in den das Zellgefäß eingebaut wird, erlaubt eine präzise Bewegung der Probe über einen Bereich von etwa 1cm² und ermöglicht so die Bestrahlung größerer Gebiete.

Bei der Suche nach einem geeigneten Vakuumfenster wurden verschiedene Materialien getestet. Von Bedeutung war dabei neben der mechanischen Stabilität bei möglichst geringer Dicke und der Strahlungsbeständigkeit auch die Sekundärelektronenemission bei Durchgang eines Ions, da diese für den Treffernachweis verwendet werden. Dabei zeigte eine mit Gold und Cäsiumjodid beschichtete 200nm dicke Siliziumnitrid-Folie die besten Eigenschaften.

Für eine automatische Objekterkennung, die während der Bestrahlung die Bestimmung der Zellpositionen ermöglicht, wurden verschiedene Mikroskopiemethoden getestet. Dabei führte nur die Fluoreszenzmikroskopie, bei der die Zellkerne mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt werden, zu zuverlässigen Ergebnissen.

Zur Automatisierung des Bestrahlungsablaufs wurde eine Software auf Basis des kommerziellen Bildverarbeitungsprogramms ImagePro Plus entworfen. Dies führt während der Bestrahlung die Zellerkennung aus, steuert die Bewegung des Tisches und des Strahls und übernimmt die Kommunikation mit der externen Elektronik, die für das Öffnen und Schließen des Strahlschalters sowie für die Trefferdetektion zuständig ist. Mit dieser Software kann bei jedem Experiment die Probenfläche, die Objektauswahl und die Bestrahlungsart gewählt werden, wodurch eine möglichst gute Anpassung an die biologischen Fragestellungen gewährleistet ist.

Erste Testbestrahlungen an CR39 und Fibroblasten mit diesem Aufbau zeigten, dass eine Bestrahlung mit einer Genauigkeit von wenigen Mikrometern möglich ist, wobei der Durchmesser des Strahlfokus durch die Streuung der Ionen im Vakuumfenster der Bodenfolie des Zellgefäßes auf etwa 2µm aufgeweitet wird. Das sich daran anschließende Experiment zur Induktion von poly(ADP-ribose) nach Schwerionenbestrahlung lieferte erste Ergebnisse bezüglich eines Dosis-schwellwertes zur Bildung dieses Proteins. Dieser soll in weiteren Strahlzeiten genauer untersucht werden.

Mit der so umgebauten Mikrosonde steht der Biologieabteilung der GSI ein Instrument zur Verfügung, mit dem Zellen gezielt mit schweren Ionen bestrahlt werden können und das so

eine Reihe von Untersuchungen in den verschiedenen Gebieten der Strahlenbiologie erlaubt.

Literaturverzeichnis

- [CAL00] T. Calligaro, J.-C. Dran, E. Ioannidou, B. Moignard, L. Pichon, J. Salomon, Development of an external beam nuclear microprobe on the Aglae facility of the Louvre museum, *Nucl. Instr. and Meth. B* **161-163**, 328-333 (2000).
- [FIS85] B. E. Fischer, The scanning heavy ion microscope at GSI, *Nucl. Instr. and Meth. B* **10/11**, 693-696 (1985).
- [FIS91] B. E. Fischer, Single-particle techniques, *Nucl. Instr. and Meth. B* **54**, 401-406 (1991).
- [FOL97a] M. Folkard, B. Vojnovic, K.M. Prise, A. G. Bowey, R.J. Locke, G. Schettino, B. D. Michael, A charged-particle microbeam: I. Development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles. *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 375-385 (1997).
- [FOL97b] M. Folkard, B. Vojnovic, K. J. Hollis, A. G. Bowey, S. J. Watts, G. Schettino, K. M. Prise, B. D. Michael, A charged-particle microbeam: II. A single-particle micro-collimation and detection system, *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 387-395 (1997).
- [FRA02] D. Frankenberg (Abteilung klinische Strahlenbiologie und klinische Strahlenphysik, Universität Göttingen), persönliches Gespräch November 2002
- [GEA91] C. R. Geard, D. J. Brenner, G. Randers-Pehrson, S. A. Marino, Single-particle irradiation of mammalian cells at the Radiological Research Accelerator Facility: induction of chromosomal changes, *Nucl. Instr. and Meth. B* **54**, 411-416 (1991)
- [GRE04] K.-D. Greif, H. J. Brede, D. Frankenberg, U. Giesen, The PTB single ion microbeam for irradiation of living cells, *Nucl. Instr. and Meth. B* (in press)
- [HAU01] M. Hausmann (Instut für molekulare Biotechnologie, Jena), persönliches Gespräch April 2001
- [HAU04] A. Hauptner, S. Dietzel, G. A. Drexler, P. Reichart, R. Krücken, T. Cremer, A. A. Friedl, G. Dollinger, Microirradiation of cells with energetic heavy ions, *Radiat. Environ. Biophys.* **42**, 237-245 (2004)
- [JAK00] B. Jakob, M. Scholz, G. Taucher-Scholz, Immediate Localized CDKN1A (p21) Radiation Response after Damage Produced by Heavy-Ion Tracks, *Radiat. Res.* **154**, 398-405 (2000).

-
- [KAM01] T. Kamiya, W. Yokota, Y. Kobayashi, M. Cholewa, M. S. Krochmal, G. Laken, I. D. Larsen, L. Fiddes, G. Parkhill, K. Dowsey, Development of an automated single cell irradiation system combined with a high-energy heavy ion microbeam system. *Nucl. Instr. and Meth. B* **181**, 27-31 (2001)
- [KRA91] F. Kraske, Inaktivierung von Säugetierzellen nach Beschuss mit örtlich korrelierten Ionen, Doktorarbeit, Technische Hochschule Darmstadt (1991)
- [LEF91] H. W. Lefevre, R. M. S. Schofield, D. R. Ciarlo, Thin Si₃N₄ windows for energy loss STIM in air, *Nucl. Instr. and Meth. B* **54**, 47-51 (1991).
- [MAR93] B. Marples, M. C. Joiner, The Response of Chinese Hamster V79 Cells to Low Radiation Doses: Evidence of Enhanced Sensitivity of the Whole Cell Population, *Radiat. Res.* **133**, 41-51 (1993).
- [MIC04] Proceedings of the 6th International Workshop / 12th L. H. Gray Workshop: Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, *Radiat. Res.* **161**, 87-119 (2004).
- [MOR01] P. Moretto, C. Michelet, A. Balana, P. Barberet, W. Przybylowicz, J. P. Slabbert, V. M. Prozesky, C. Pineda, G. Brut, G. Laurent, F. Lhoste, Development of a single ion irradiation system at CENBG for applications in radiation biology, *Nucl. Instr. and Meth. B* **181**, 104-109 (2001)
- [MOR03] W. F. Morgan, Non-targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: I. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects *In Vitro*, *Radiat. Res.* **159**, 567-580 (2003).
- [MOT01] C. Mothersill, C. Seymour, Radiation-Induced Bystander Effects: Past History and Future Directions, *Radiat. Res.* **155**, 759-767 (2001).
- [NAG92] H. Nagasawa, J. B. Little, Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α -particles, *Cancer Res.* **52**, 6394-6393 (1992)
- [OZO00] A. Ozols, K. M. Prise, K-R. Trott, M. Folkard, B. D. Michael, The Role of Oxidative Stress and DNA Damage in Genomic Instability: Targeted Microbeam Studies in Primary Human Fibroblasts, *Radiat. Res.* **153**, 229-230 (2000). [extended abstract]
- [RAP01] I. Rappold, K. Iwabuchi, T. Date, J. Chen, Tumor Suppressor p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is Involved in DNA Damage-signaling Pathways, *Journal of Cell Biology* **153**, 613-620 (2001)
- [SCH01] M. Scholz, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, Direct Evidence for the Spatial Correlation between Individual Particle Traversals and Localized CDKN1A (p21) Response Induced by High-LET Radiation, *Radiat. Res.* **156**, 558-563 (2001)
- [SHI97] A. Shih, J. Yater, C. Hor, R. Abrams, Secondary electron emission studies, *Appl. Surface Science* **111**, 251-258 (1997).

[SRIM2003] "www.srim.org"

[TAR03] L. Tartier, C. Spenlehauer, H. C. Newman, M. Folkard, K. M. Prise, B. D. Michael, J. Ménissier-de Murcia, G. de Murcia, Local DNA damage by proton microbeam irradiation induces poly(ADP-ribose) synthesis in mammalian cells, *Mutagenesis* **18**, 411-416 (2003).

[TAU99] G. Taucher-Scholz, G. Kraft, Influence of Radiation Quality on the Yield of DNA Strand Breaks in SV40 DNA Irradiated in Solution, *Radiat. Res.* **151**, 595-604 (1999).

[WEI87] U. Weisbrod, Konstruktion, Aufbau und Erprobung einer Einzelionen-Bestrahlungsapparatur und Untersuchung der Inaktivierung von Sporen von *Bacillus Subtilis* durch einzelne sehr schwere Ionen ($Z > 27$) in Abhängigkeit vom Stossparameter, Doktorarbeit, Universität Frankfurt (1987)

[ZIE85] J. F. Ziegler, J. P. Biersack, U. Littmark, The stopping and Range of Ions in Solids, *Pergamon Press, New York* (1985).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön geht an...

..... Gerhard Kraft dafür, dass ich diese Arbeit in seiner Gruppe durchführen durfte und für seine andauernde Unterstützung.

..... Herrn Hoffmann für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

..... Herrn Fischer dafür, dass er mir immer freie Hand bei der Umsetzung meiner Ideen an der Mikrosonde gab und bei technischen Problemen immer guten Rat und schnelle Hilfe bot.

..... Gisela Taucher-Scholz für die konstruktive Zusammenarbeit während dieses Projektes und die Zeit, die sie investierte, um mein biologisches Verständnis zu verbessern.

..... Gudrun Becker für ihre Geduld, als sie mir den Umgang mit Zellen beibrachte, sowie für die Herstellung unzähliger Proben.

..... Burkhard Jakob für viele gute Ratschläge für die Optik der Mikrosonde sowie die Hilfe bei der Auswertung der ersten bestrahlten Proben am konfokalen Mikroskop.

..... Maik Lang, Kay-Obbe Voss, Christian Müller, Birgitta Schiedt, Thomas Cornelius, Dagmar Baur und Ayman Sherif El-Said für viele schöne Stunden und fruchtbare Diskussionen im Besprechungs-(Kaffee-)Raum der Materialforschungsgruppe der GSI.

..... den Seniors der Materialforschung für ihr Interesse an meiner Arbeit.

..... Klaus Greif und Dieter Frankenberg für die Offenheit, mit der sie mir ihren Bestrahlungsaufbau an der PTB zeigten und erklärten.

..... Nicole von Grabczewski, Heidrun Eyermann und Melanie Roth dafür, dass sie diese Arbeit von vielen Rechtschreibfehlern befreiten und etliche Formulierungen verbesserten.

Lebenslauf

Persönliches

Geburtsdatum	12. November 1974
Geburtsort	Mosbach
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1981 bis 1985	Clemens-Brentano-Grundschule Neckarelz
1985 bis 1991	Realschule Obrigheim
1991 bis 1994	Technisches Gymnasium Mosbach, Abschluss: Abitur

Studium

10/1994 bis 09/2000	Physik-Studium an der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg, Abschluss: Diplom mit Gesamtnote: "Sehr gut"
08/1999 bis 08/2000	Diplomarbeit an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI), Darmstadt, zum Thema „Untersuchung von Röntgen- und Ionen-bestrahlter DNA mittels Rasterkraftmikroskopie“

Promotion

seit 10/2000	Doktorarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
--------------	---

Fernstudium

04/2001 bis heute	wirtschaftswissenschaftlicher Zusatzstudiengang für Ingenieure und Naturwissenschaftler an der Fernuniversität Hagen
03/2003	Vordiplom mit Gesamtnote „Gut“