Experimentelle Physik

Aufbau und Durchführung eines Streuexperimentes zur Bestrahlung von Plasmid–DNA mit niederenergetischen α–Teilchen

Diplomarbeit
von
Volker Scholz

Juni 1995

Fachbereich Physik der
Westfälischen Wilhelms–Universität Münster

Institut für Kernphysik

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **5**

2 Wechselwirkung geladener Teilchen mit Materie **9**

2.1 Primärprozesse der Energieabsorption 9

2.2 Die Bethe–Bloch–Gleichung 10

2.3 Bahnspur geladener Teilchen 13

2.4 Strahlenschäden in DNA–Molekülen 14

2.4.1 Struktur der DNA 14

2.4.2 Strahlenchemische Veränderungen 16

3 Biologische Methoden **19**

3.1 Auswahl einer geeigneten DNA 19

3.2 Vermehrung und Isolierung der Plasmid–DNA 21

3.2.1 Kompetente Zellen 21

3.2.2 Transformation 21

3.2.3 Anzucht der transformierten Bakterien 22

3.2.4 Plasmidisolierung über Jet–Star–Säulen 22

3.3 Photometrische Reinheits– und Konzentrationsbestimmung . 23

3.4 DNA–Analyse 24

3.4.1 Gelelektrophorese 24

3.4.2 Färben und Fotografieren der Gele 25

3.4.3 Laserdensitometrie 26

3.5 Probenpräparation 26

3.5.1 Erstellen homogener DNA–Proben 26

3.5.2 Vakuumtest und Rückgewinnung 29

3.6 Bestimmung der induzierten Strangbrüche 29

4 Aufbau des Streuexperimentes 33
4.1 Der Ionenbeschleuniger 33
4.2 Aufbau der Streuanordnung 35
4.3 Auswerteelektronik 39

5 Durchführung der Bestrahlung 41
5.1 Test und Optimierung der Bestrahlungsapparatur 41
5.1.1 Strahlqualität 41
5.1.2 Strommessung 46
5.1.3 Elektronik 47
5.2 Aufnahme von Streuspektren 48
5.3 DNA–Bestrahlung 48
5.4 Auswertung der Streuspektren 49
5.4.1 Bestimmung der Targetdicke 49
5.4.2 Energiekalibrierung 51
5.4.3 Dosisbestimmung 56

6 Auswertung der Plasmid–Bestrahlungen 61
6.1 Bestrahlungs–Übersicht 61
6.2 Laserdensitometrische Analyse der bestrahlten DNA 62
6.3 Berechnung der induzierten Strangbrüche 64
6.4 Verhältnisse der Strangbruchraten 68
6.5 Energieüberträge pro Strangbruchereignis 70
6.6 G–Werte 72

7 Diskussion 73

8 Zusammenfassung 77

A Chemikalien 79

B Targetdickenbestimmung 81

C Energiekalibrierung 83

D Laserdensitometrie und Dosisbestimmung 85

1. Einleitung

Die Biosphäre ist seit ihrer Entstehung einem breiten Spektrum aus kosmischer und terrestrischer Strahlung ausgesetzt. Die kosmische Strahlung ist eine komplex zusammengesetzte Teilchenstrahlung mit einer Intensität von zwei bis vier Teilchen/s$\cdot$cm^2 außerhalb der Erdatmosphäre. Ihre primäre Komponente ist eine hochenergetische Nukleonenstrahlung kosmischen bzw. solaren Ursprungs. Der kosmische Anteil stammt wahrscheinlich aus Supernovae–Ereignissen und Neutronensternen und besteht zu 90% aus einem annähernd isotropen und zeitlich konstanten Fluß von Protonen, die Energien bis zu etwa 10^{14} MeV besitzen. Weitere Anteile sind α-Teilchen, schwere Ionen bis hin zum Eisen und zu etwa 1% auch hochenergetische Elektronen und Photonen. Die solare Komponente, die in Abhängigkeit von der Sonnenfleckenaktivität stark schwanken kann, besteht fast ausschließlich aus Protonen und zu einem kleineren Anteil auch aus α–Teilchen [Mus88].
Bei der Wechselwirkung der primären Komponente mit den Atomen in den oberen Schichten der Erdatmosphäre erfolgt ein kaskadenförmiger Aufbau sekundärer kosmischer Strahlung. Über Spallations–und Teilchenerzeugungsreaktionen, die hauptsächlich an den O– und N–Atomen der Atmosphäre stattfinden, entstehen sekundäre Protonen, Neutronen, Pionen, Kaonen und α–Teilchen (Nuklearkomponente). Infolge weiterer Kernprozesse wird die tertiäre kosmische Strahlung gebildet, die schließlich auf die Erdoberfläche trifft. Zu ihr gehören Myonen (harte Komponente), Neutrinos und vor allem Photonen, die über Paarbildung Elektronen und Positronen (weiche Komponente) produzieren.
Die zweite Komponente des Strahlenspektrums, die terrestrische Strahlung, setzt sich zusammen aus den in der Erdatmosphäre entstehenden kosmogenen Radionukliden, zu denen das ^{14}C–Isotop und das Tritium gehören, und den Nukliden der natürlichen Zerfallsreihen. Hierzu zählen die Mutternuklide ^{232}Th, ^{238}U und ^{235}U und deren Zerfallsprodukte, die α–, β– und γ–Strahlung emittieren und in der Erdkruste vorkommen. Eine große Bedeutung hat dabei das in allen drei Zerfallsreihen auftretende Edelgas Radon, da es sich als Gas über die Luft verbreitet und so lokal zu einer erheblichen Erhöhung der natürlichen Strahlenexposition führen kann. Messungen

Belastungsart	Art der Quellen	H_W/mSv	Anteil
Natürliche	Kosmische Strahlung		
Strahlen–	(in Meereshöhe)	0.3	
belastungen	Terrestrische Strahlung von außen	0.4	
	Inhalation von Ra–Folgeprodukten	1.4	
	Ingestion natürlicher Radionuklide	0.3	60%
Zivilisations-	Medizinische Diagnostik	1.5	
bedingte	kerntechnische Anlagen	< 0.01	
Strahlen–	Globale Fallouts	< 0.02	
belastungen	Tschernobyl	0.02	
	Andere Quellen	< 0.02	40%
Summe		≈ 4.0	100%

Tabelle 1.1: Mittlere effektive Dosis der Bevölkerung in der Bundesrepublik im Jahr 1993. Die Gesamtdosis beträgt ca. 4 mSv [Bun93].

---

in Wohnräumen in der Bundesrepublik Deutschland haben ergeben, daß in etwa 2% der Fälle die Radonkonzentration in der Raumluft über einem Wert von 250 Bq/m^3 liegt [Bun93]. Die Inhalation von ^{222}Ra und seinen kurzlebigen Folgeprodukten ist mit einem Anteil von 35% an der gesamten Strahlenbelastung die dominierende Komponente natürlicher Strahlenexposition der deutschen Bevölkerung (vgl. Tabelle 1.1). Ähnlich hohe Belastungen durch Radon und seine Folgeprodukte findet man in Belgien, England, Skandinavien, Kanada und den USA [Naz88].
Zu den natürlichen kommen seit einigen Jahrzehnten immer mehr zivilisatorisch bedingte Strahlenexpositionen hinzu, wobei die medizinische Strahlenbelastung durch diagnostisches Röntgen mit einem Anteil von 40%[1] die dominierende Rolle spielt (vgl. Tabelle 1.1).
Die Wirkung der verschiedenen Strahlenarten auf biologische Systeme ist sehr unterschiedlich. Sie hängt ab von der Energie der Teilchen, ihrer Masse und ihren Wechselwirkungsmechanismen in Materie. Außerdem muß zwischen äußerer und innerer Strahlenbelastung unterschieden werden. Letztere entsteht durch Inhalation oder Ingestion von Radionukliden, zu denen die natürlichen α–Strahler Radium, Thorium, Polonium und Radon gehören, aber auch β–Strahler wie ^{87}Rb und ^{40}K. Diese sind praktisch ubiquitär,

[1] Eine neueste Zusammenstellung der Strahlenbelastung durch medizinische Maßnahmen mit Ausnahme der therapeutischen Anwendungen kommt zu dem Ergebnis, daß es sogar 50% sind [Adz90].

und somit in vielen Baumaterialien, im Wasser und in der Luft vorhanden. Ihr Anteil an der Gesamtstrahlenbelastung liegt bei etwa 45% (vgl. Tabelle 1.1).
Bei der Inhalation von Radon kommt es zu einer Abscheidung der kurzlebigen Radon–Folgeprodukte im Gewebe des Atemtraktes. Dies führt zu einer permanenten Belastung der umliegenden Zellen durch dichtionisierende Strahlung, deren Wirkung auf Säugerzellen schon seit einigen Jahrzehnten Gegenstand vieler Untersuchungen ist. Die beobachteten exponentiellen Überlebenskurven nach α–Bestrahlung wurden treffertheoretisch so interpretiert, daß bereits ein Durchgang eines α–Teilchens durch die kritische Struktur der Zelle, d.h. den Zellkern, zum Verlust ihrer Teilungsfähigkeit führt [Bar60].
Ergebnisse jüngerer Studien zur Wirkung von α–Teilchen in Säugerzellen kamen zu Ergebnissen, die Anlaß zu einer Modifizierung dieser Interpretation geben. Im einzelnen wurde festgestellt, daß

- 10 bis 20 Zellkerndurchgänge zur Abtötung von C3H 10T1/2 Zellen erforderlich sind [Llo79],
- α–Teilchen, die im Zellkern abgestoppt werden (E_α <1 MeV), nur halb so letal sind, wie den Zellkern durchdringende Teilchen [Raj93],
- nach Bestrahlung der Stammzellen des blutbildenden Systems bei Mäusen chromosomale Aberrationen in den Tochterzellen induziert wurden [Kad92],
- in CHO–Zellen nach Dosen unter 1 mGy Schwesterchromatid–Austauschvorgänge stattfinden [Nag92].

Diese Ergebnisse liefern deutliche Hinweise auf eine mutagene Wirkung von α–Teilchen, insbesondere am Ende ihrer Bahnspur. Letzteres ist z.B. bei den α–Teilchen der Fall, die von inkorporierten Strahlern im Gewebe emittiert werden und in den Zellen, die in etwa der Reichweite der α–Teilchen liegen und bei Erreichen des Bragg–Maximums ihre gesamte Restenergie von bis zu 700 keV im Zellkern deponieren. Da diese Energie in Form von dichten Ionisationen in die DNA der Zelle deponiert wird, werden mit großer Wahrscheinlichkeit primäre DNA–Veränderungen stattfinden, die neben schweren Schäden, die für die Zelle letal sind, auch 'einfachere', reparable Schäden sein können. Die molekulare Struktur primärer DNA–Veränderungen ist

nur schwer nachzuweisen. Wechselwirkungen dichtionisierender Teilchen mit DNA–Molekülen haben oft den Bruch eines oder beider DNA–Stränge zur Folge, wobei die Wahrscheinlichkeit für einen Strangbruch mit abnehmender Teilchenenergie wächst [Cha89]. Eine Möglichkeit, das Schadensspektrum von α–Teilchen mit Energien unterhalb des Bragg–Maximums zu bestimmen, besteht daher in der Ermittlung des Verhältnisses von induzierten Einzel– zu Doppelstrangbrüchen. Ist dieses groß, werden im Mittel Schäden produziert, die für die Zelle von geringer biologischer Relevanz sind [Goo94]. Ist es klein gegen 1, entstehen auch Orte hoher Schadensdichte, die für die Zelle nur schwer reparierbar sind [War85]. Fehlerhaft reparierte Schäden können Ausgangspunkte von Mutationen sein. Das Zusammenspiel mehrerer solcher Veränderungen in speziellen Genbereichen kann schließlich zu einer Entartung der Zelle und damit zur Entstehung einer Krebszelle führen.
In der vorliegenden Arbeit wurde die direkte Strahlenwirkung von α–Teilchen mit Energien um 400 keV in Plasmid–DNA untersucht. Dazu wurde diese isoliert, eingetrocknet und im Vakuum bestrahlt, um Reparatureffekte auszuschließen. Anschließend erfolgte die Analyse auf induzierte ESB und DSB, aus denen das Verhältnis von ESB zu DSB berechnet werden konnte. Für die Bestrahlung der Plasmid–DNA mit α–Teilchen im Energiebereich von 300 bis 500 keV wurde am 400 kV–Ionenbeschleuniger im Institut für Kernphysik der Universität Münster eine Streukammer aufgebaut. Diese Bestrahlungsanordnung hatte gegenüber der Verwendung von radioaktiven Quellen den Vorteil, daß die Einstellung der Teilchenenergien über die Beschleunigungsspannung, und nicht durch Abschwächung mit Hilfe von Mylarfolien erfolgte [Eis91]. Dadurch ergab sich für den gewählten Energiebereich, daß die Teilchen auch nach der Streuung eine Energieauflösung $\frac{\Delta E}{E}$ besaßen, die etwa um den Faktor 40 besser war als die vergleichbarer Experimente mit radioaktiven Quellen.

2. Wechselwirkung geladener Teilchen mit Materie

Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen der Wechselwirkung geladener Teilchen mit Materie, die zum Verständnis der Entstehung von Strahlenschäden und dem Aufbau des Streuexperimentes notwendig sind, dargestellt.

2.1 Primärprozesse der Energieabsorption

Die Wechselwirkungsprozesse, die beim Durchgang von Teilchen durch Materie stattfinden, hängen im wesentlichen von der Masse, der Ladung und der kinetischen Energie der Teilchen ab. Dabei bestehen grundsätzliche Unterschiede zwischen Elektronen ('leichte' Teilchen) und allen übrigen geladenen Teilchen ('schwere' Teilchen). Die Primärprozesse, durch die α–Teilchen und Protonen im Energiebereich von etwa 20 keV bis 1 MeV beim Eintreten in einen Festkörper im wesentlichen abgebremst werden, sind

1. unelastische Stöße mit den Hüllenelektronen der Targetatome und

2. elastische Kernstöße mit den Targetatomen.

Dabei dominiert der unter 1 angegebene Primärprozeß stark (vgl. Abbildung 2.1). Beide Prozesse finden infolge reiner Coulombwechselwirkung statt. Im ersten Fall werden die Targetatome ionisiert (Ionisationsbremsung), im zweiten überträgt das Ion infolge Coulombstreuung einen Teil seines Impulses an den Rückstoßkern. Die Gewichtung beider Prozesse am Gesamtenergieverlust hängt sowohl von der Geschwindigkeit und der Ladung des einfallenden Ions als auch von der Ladungszahl der Targetkerne ab. Sie ist durch das Verhältnis ξ der Ionengeschwindigkeit im Target zur Geschwindigkeit der Hüllenelektronen der K-Schale

$$\xi = \frac{v}{Z_K \cdot c \cdot \frac{1}{137}} = 137 \cdot \frac{\beta}{Z_K} \tag{2.1}$$

bestimmt. Dabei ist Z_K die Ladung der Kerne des Bremsmediums, v die

Ionengeschwindigkeit und $\frac{1}{137}$ die Feinstrukturkonstante. Für schwere Teilchen können die im folgenden diskutierten Grenzfälle unterschieden werden. Bei einfacher Teilchenladung und hoher Teilchenengeschwindigkeit, d.h.

$$\xi > 1 \; , \tag{2.2}$$

erfolgt die Abbremsung der Ionen durch Ionisation der Targetatome. Das Teilchen durchläuft das Bremsmedium nahezu geradlinig, und die Teilchenladung bleibt konstant.
Bei großer Teilchenladung und kleiner Teilchengeschwindigkeit mit

$$\xi \leq 1 \tag{2.3}$$

ist v vergleichbar mit der Geschwindigkeit der Hüllenelektronen der K–Schale, und die Wahrscheinlichkeit des Einfangs eines Hüllenelektrons durch das Ion ist nicht mehr vernachlässigbar. Es treten Umladungsprozesse auf, die die effektive Ladung der Ionen kontinuierlich reduzieren. Die Energieverluste durch Ionisation nehmen ab, und die elastischen Kernstöße der Ionen mit den Targetkernen spielen eine zunehmende Rolle [Mus88].
Dieser Fall trifft für α–Teilchen mit kinetischen Energien von 1 MeV und weniger zu, die in einem Kohlenstofftarget (Z_K=6) abgebremst werden. Für sie gilt

$$\xi = \frac{137}{Z_K} \cdot \sqrt{\frac{2\,E_{kin}}{mc^2}} \approx 0.53 \leq 1 \; , \tag{2.4}$$

wobei mc^2=3727.3 MeV die Ruhemasse des α–Teilchens ist [Att68].

2.2 Die Bethe–Bloch–Gleichung

Der Energieverlust geladener Teilchen in Materie durch Ionisation wird durch die Bethe–Bloch–Gleichung

$$-\left(\frac{dE}{dx}\right) = \frac{Z_T^2 e^4 n_e}{4\pi\epsilon_0^2 v^2 m_e}\left\{ln\frac{2m_e v^2}{\left\langle E_B^{(e)}\right\rangle} - ln(1-\beta^2) - \beta^2\right\} \tag{2.5}$$

beschrieben [Mus88]. Dabei ist Z_T die Ladung des Teilchens, e die Elementarladung, n_e die Elektronendichte im Medium, v die Teilchengeschwindigkeit, $m_e = 0.511 MeV/c^2$ die Elektronenmasse und $\left\langle E_B^{(e)} \right\rangle \cong 13,5 \cdot Z\ eV$ das mittlere Ionisationspotential des Mediums [Mus88].
Gleichung 2.5 zeigt, daß der mittlere differentielle Energieverlust, abgesehen von den Eigenschaften des Mediums, nur von der Teilchenladung Z_T und der Teilchengeschwindigkeit v abhängt. Für α–Teilchen unter 1 MeV können die beiden letzten Terme in Gleichung 2.5, die relativistische Effekte beschreiben, wegen $\beta \ll 1$ (vgl.Gleichung 2.4) vernachlässigt werden, und es folgt

$$-\left(\frac{dE}{dx}\right) = \frac{Z_T^2 e^4 n_e}{4\pi\epsilon_0^2 v^2 m_e} \cdot ln \frac{2\, m_e v^2}{\left\langle E_B^{(e)} \right\rangle} \tag{2.6}$$

$$= \frac{Z_T^2 e^4 m_T n_e}{8\pi\epsilon_0^2 E_T m_e} \cdot ln \frac{4\, m_e E_T}{\left\langle E_B^{(e)} \right\rangle \cdot m_t}\ , \tag{2.7}$$

wobei v^2 durch die Teilchenenergie $E_T = \frac{1}{2} m_T v^2$ ersetzt wird.
Daß die Bethe–Bloch–Gleichung in der oben angegebenen Form 2.6 nicht uneingeschränkt gültig ist, zeigt die Betrachtung sehr kleiner Ionengeschwindigkeiten, bei denen der differentielle Energieverlust beliebig hohe Werte annehmen würde. Dabei handelt es sich jedoch nur um einen scheinbaren Widerspruch zur Realität, da in Gleichung 2.6 die Teilchenladung unabhängig von der Teilchengeschwindigkeit ist. Aus der Diskussion von Gleichung 2.3 folgt jedoch, daß bei Ionen, die diese Gleichung erfüllen, eine effektive Ionenladung Z_T^{eff} berücksichtigt werden muß, die mit sinkender Ionengeschwindigkeit v so gegen 0 geht, daß die rechte Seite in Gleichung 2.6 verschwindet. Protonen z.B. bewegen sich nach Elektroneneinfang zeitweise als neutrale Atome durch den Festkörper. Dies ist der Grund dafür, daß der differentielle Energieverlust bei kleinen Energien nicht divergiert, sondern ein Maximum (Bragg–Maximum) durchläuft und dann gegen 0 geht. Dies muß besonders bei der Berechnung von Energieverlusten sehr niederenergetischer Ionen mit Computerprogrammen berücksichtigt werden, die ausschließlich den Bethe–Bloch–Formalismus benutzen.
Ein Problem ist die Ermittlung des funktionellen Zusammenhangs zwischen Energie und effektiver Ionenladung. Aufgrund der Komplexität des quantenmechanischen Problems ist er meistens nur empirisch ermittelbar. Ein

Beispiel dafür ist die 'Barkas–Formel' [Bar63]

$$Z_T^{eff} = Z_T \cdot (1 - e^{(-125\beta \cdot Z_T^{-\frac{2}{3}})}) \, . \tag{2.8}$$

Mathematisch kann gezeigt werden, daß der nach Gleichung 2.6 berechnete differentielle Energieverlust mit der von Barkas angegebenen Relation für Ionengeschwindigkeiten $v \to 0$ gegen 0 geht. Für α–Teilchen im Energiebereich von 0.2 bis 1 MeV weichen die nach Gleichung 2.8 berechneten Werte jedoch um 10 bis 25% von den von Whaling ermittelten ab [Wha58]. Aus diesem Grund wurde zur Berechnung sämtlicher Energieverluste in dieser Arbeit der Computercode ASTAR [Ber92] herangezogen. Das Programm ermittelt den auf die Materialdichte normierten differentiellen Energieverlust von α–Teilchen in zahlreichen Elementen durch Interpolation experimentell bestimmter Energieverluste. Dabei werden für α–Teilchen mit Energien von

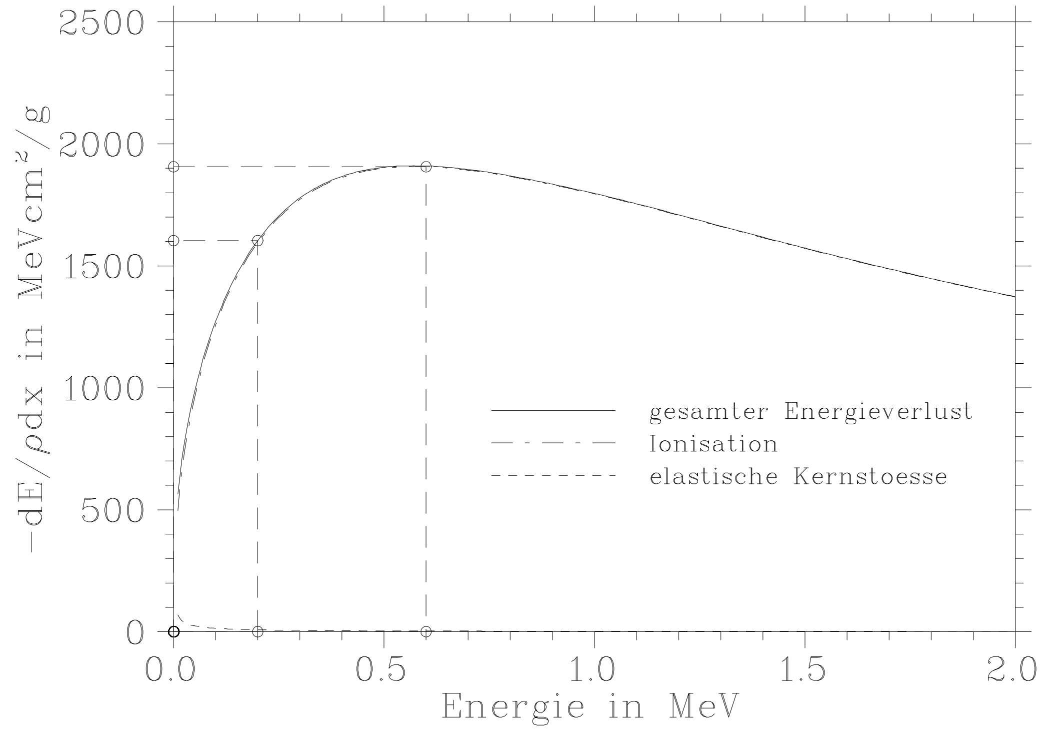

Abbildung 2.1: Dichtenormierter differentieller Energieverlust von α–Teilchen in Kohlenstoff, bestimmt mit ASTAR. Zusätzlich getrennt aufgetragen sind die Anteile, die durch Ionisation und durch elastische Kernstöße entstehen. Alle Streuexperimente wurden im Energiebereich von 200 bis 600 keV durchgeführt.

300 bis 600 keV Fehler um 7% angegeben.
Abbildung 2.1 zeigt den dichtenormierten differentiellen Energieverlust von α–Teilchen in Kohlenstoff $\frac{dE}{\rho dx}$ in $MeVcm^2/g$. Auffällig ist der sehr kleine Anteil, der durch elastische Kernstöße entsteht.

2.3 Bahnspur geladener Teilchen

Ionisierende Teilchen übertragen ihre Energie beim Durchgang durch Materie in Form diskreter Primärereignisse. Ihre Bahnspur besteht aus einer diskontinuierlichen Folge ionisierter Gebiete, deren Abstand a näherungsweise nach

$$a = \frac{E_P}{\left(\frac{dE}{dx}\right)_T} \tag{2.9}$$

mit E_P, der mittleren pro Ereignis übertragenen Energie, und $\left(\frac{dE}{dx}\right)_T$, dem linearen Energietransfer (LET) der Teilchen, berechnet werden kann [Kie89]. Der LET ist der Quotient aus der lokal vom Medium absorbierten Energie und der vom Teilchen durchlaufenen Wegstrecke. Hierbei bedeutet 'lokal', daß nur solche vom Teilchen im Medium deponierten Energiebeträge berücksichtigt werden, die im betrachteten Volumenelement tatsächlich Ionisationen und Anregungen produzieren [Kie89]. Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, daß der häufigste Primärprozeß beim Durchgang eines α–Teilchens durch Materie eine Ionisation der Valenzelektronen ist (vgl. Abbildung 2.1). Ein Primärereignis ist daher die Entstehung mehrerer Ionenpaare in einem kleinen Volumenelement aufgrund ein und derselben primären Wechselwirkung des einfallenden Teilchens [Der69]. Die räumliche Ausdehnung eines solchen Ionenhaufens, der durch die Primärionisation entstanden ist, wird durch die Reichweite der produzierten Sekundärelektronen bestimmt. Diese ist eine Funktion der auf das Elektron übertragenen Energie, seines Ablenkwinkels bezüglich der Ionenbahn und des LET der Elektronen in der Materie, die aufgrund der Komplexität der Materie (Bindungsenergien der Elektronen in den DNA–Molekülen etc.) theoretisch nur sehr schwer zugänglich ist. Im folgenden Beispiel wird die Struktur der Bahnspur von 1 MeV α–Teilchen in Wasser grob abgeschätzt. Für diese ergibt sich nach Gleichung 2.9 bei einer mittleren pro Ereignis übertragenen Energie von 60 eV [Der69] und einem LET von 220 keV/μm (berechnet mit ASTAR) ein mittlerer Abstand

a der Primärionisationen von 0.27 nm. Unter der Annahme eines konstanten gemittelten LET von 10 keV/μm von Elektronen in Wasser [Kie89] wird diese Distanz schon von Sekundärelektronen erreicht, die Energien von 3 eV und mehr besitzen. α–Teilchen dieser Energien produzieren daher Primärionisationen, deren mittlerer Abstand a kleiner ist als die Reichweite der entstehenden Sekundärelektronen. Ihre Bahnspur in Materie entspricht einem durchgehenden Ionisationskanal.

2.4 Strahlenschäden in DNA–Molekülen

2.4.1 Struktur der DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl. DNA) ist der Träger der gesamten genetischen Information eines Individuums. Aus diesem Grund ist sie ein

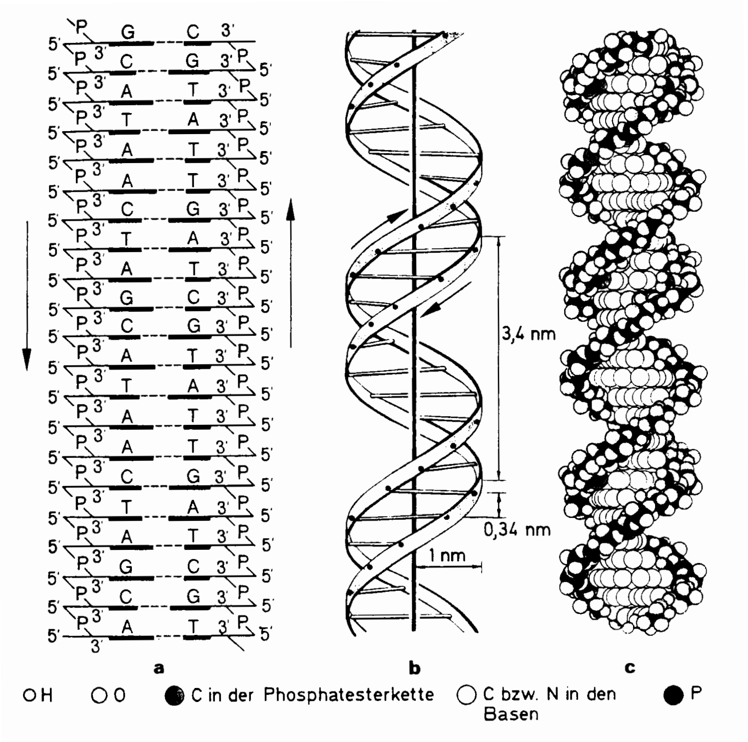

Abbildung 2.2: Struktur der DNA–Doppelhelix. **a** antiparalleler Verlauf der beiden Einzelstränge. **b** Dimension der Doppelhelix: eine vollständige Windung verläuft über 3.4 nm und enthält 10 Basenpaare. **c** Ein raumausfüllendes Modell der Doppelhelix [Kni90].

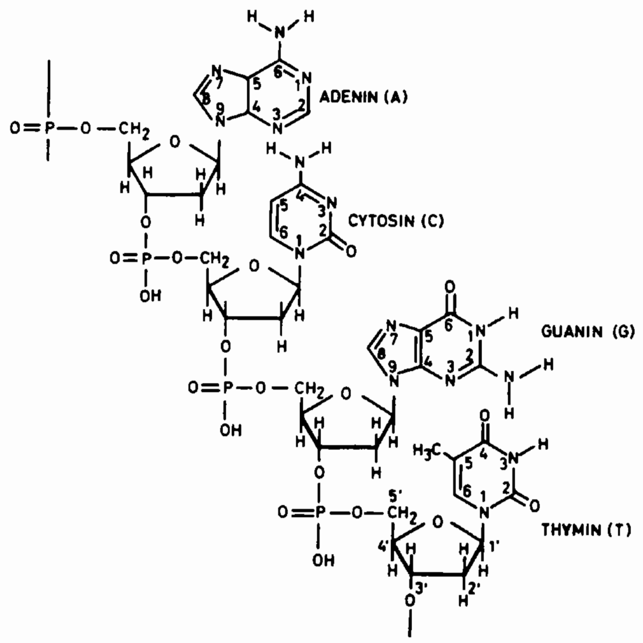

Abbildung 2.3: DNA–Segment, bestehend aus vier Nukleotiden mit den in der DNA vorkommenden Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin.

---

sehr wichtiges Objekt strahlenbiologischer Untersuchungen, denn Veränderungen in diesem Molekül haben Auswirkungen auf die gesamte Zelle, bzw. können deren Absterben bedeuten. Der Aufbau eines DNA–Moleküls ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Die DNA ist ein doppelsträngiges helikales Molekül, deren monomere Bausteine die Nukleotide sind. Ein Nukleotid besteht aus einer Purin– oder Pyrimidin–Base, die N–glykosidisch an eine Pentose (Desoxyribose) gebunden ist (vgl. Abbildung 2.3). Am 5'-C–Atom des Zuckers befindet sich über eine Esterbindung ein Phosphatrest. In der DNA kommen die beiden Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C) vor. Im polymeren Nukleinsäure–Molekül sind die einzelnen Nukleotide über Phosphat–Brücken miteinander verbunden. Auf diese Weise entstehen lange unverzweigte Polynukleotid–Ketten, die durch das Zucker–Phosphat–Rückgrat zusammengehalten werden. Die Verbindung der beiden Einzelketten zu einem doppelsträngigen DNA–Molekül besteht in Wasserstoff–Brückenbindungen zwischen den gegenüberliegenden

Basen. Die genetische Information ist durch die Basensequenz festgelegt. Diese ist in den beiden DNA–Strängen komplementär, d.h. einem Adenin entspricht auf dem anderen Strang ein Thymin, bzw. ein Guanin einem Cytosin.
Der Durchmesser der DNA–Doppelhelix beträgt etwa 2 nm, ihre Länge, die meist durch die Anzahl der Basenpaare (BP) angegeben wird, variiert zwischen $5 \cdot 10^3$ BP (ca. 1 μm) bei Phagen und $3 \cdot 10^9$ BP (ca. 1 cm) bei Säugern [Kni90].

2.4.2 Strahlenchemische Veränderungen

Ionisierende Teilchen produzieren in DNA–Molekülen ein breites Spektrum an Schäden, die, sofern sie von der Zelle nicht repariert werden, die Replikation und die Transskription zum Stillstand bringen. Schäden, die mit solch ausreichender Häufigkeit in der DNA auftreten, daß sie biologische Folgen für die Zelle haben, sind Ionisationscluster, die als Summe einzelner Ionisationen bzw. Anregungen der Atome in den DNA–Molekülen entstehen. Dies ist das Ergebnis umfangreicher Analysen von Bahnspuren geladener Teil-

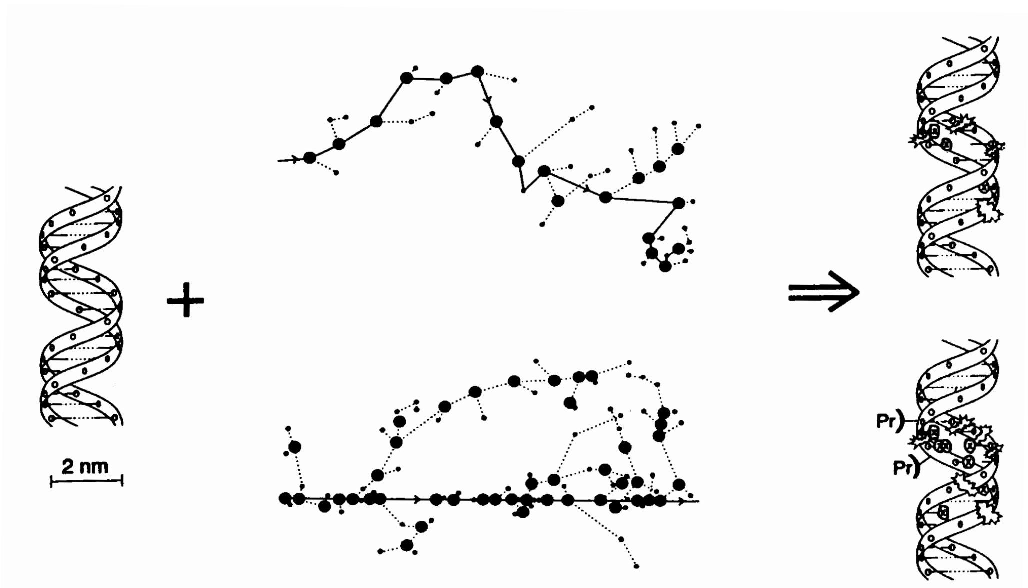

Abbildung 2.4: Ein DNA-Segment und die zweidimensionale Projektion der simulierten Spur eines 500 eV Elektrons (oben), bzw. eines 4 MeV α–Teilchens (unten), dargestellt im selben Maßstab. Die Überlagerung der beiden Spuren mit der DNA zeigt, daß ein breites Spektrum an Trümmerbrüchen entstehen kann.

chen in DNA, die mit Hilfe von Monte–Carlo–Simulationen durchgeführt wurden [Goo94]. Dabei wurde der gesamte Bahnverlauf jedes einzelnen Teilchens einschließlich seiner sekundären Elektronen auf der Ebene atomarer Ionisationen und Anregungen simuliert. Im Falle eines 4 MeV α–Teilchens entsteht eine Spur dichter Ionisationen; die erzeugten Sekundärelektronen entfernen sich nur einige nm von der Teilchenbahn (Abbildung 2.4). Nur in ganz wenigen Fällen erhalten die sekundären Elektronen soviel Energie, daß sie eine eigene Bahnspur von mehr als 100 nm hinterlassen. Durch mehrfache, zufällige Überlagerung der simulierten Spur mit einem Segment des DNA–Moleküls kann das mögliche Spektrum der auftretenden DNA–Schäden erhalten werden. Hierzu gehören im einzelnen

- **komplexe Kombinationen von Strangbrüchen**, die von direkten Ionisationen im Zucker–Phosphat–Rückgrat der DNA oder durch den Angriff in der Nähe der DNA entstandener Radikale herrühren,
- **Basenschäden**, durch direkte Ionisation oder Radikalangriff,
- **DNA–Protein–Vernetzungen** mit angrenzenden geschädigten Proteinen und
- **intramolekulare DNA–Vernetzungen**.

Diese Schäden treten meist in Kombinationen auf und entstehen durch hohe Ionendichten, die in der DNA inhomogen verteilte Trümmerbrüche hervorrufen. Sowohl dünn als auch dicht ionisierende Strahlung produziert diese Orte hoher Schadensdichte, wobei die Wahrscheinlichkeit für solche Ereignisse mit wachsendem LET steigt. Dies steht in Übereinstimmung mit der etwa um den Faktor 20 größeren relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) von Hoch–LET–Strahlung und den vielen Hinweisen, daß die zellulären Konsequenzen dicht ionisierender Strahlung weniger oder gar nicht durch Faktoren wie Dosisrate, O_2–Konzentration oder Reparaturkapazität modifizierbar sind, wie es z.B. bei γ–Strahlung der Fall ist. So werden z.B. von α–Teilchen an Orten hoher Schadensdichte produzierte 'DSB' schlechter repariert als die von γ–Strahlung hervorgerufenen glatten DSB [Jen93], und die Anzahl der letalen DSB in einer bestimmten Zellinie variiert zwischen 20 für langsame α–Teilchen und etwa 100 für harte Röntgenstrahlung [Fox92]. Ein Vergleich der Anzahl der Bahnspuren dicht und dünn ionisierender Strahlung

bei einer im Zellkern deponierten Dosis von 1 Gy zeigt, daß diese für die sekundären Elektronen von γ–Strahlung $\approx$1000, für α–Teilchen dagegen nur $\approx$4 beträgt [Goo88]. Durch dicht ionisierende Strahlung werden daher weniger Schäden produziert als durch dünnionisierende derselben Dosis, diese sind aber effektiver, da sie wesentlich dichtere und für die Zelle schwerwiegendere Zerstörungen darstellen.
Bei Bestrahlungsexperimenten 'in vitro' werden Trümmerbrüche als DSB gezählt. Dabei geht jedoch die Information über die Schwere des Schadens verloren.
Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Komplexität der durch dichtionisierende Strahlung in DNA hervorgerufenen Schäden liefern Modellrechnungen, bei denen die Anzahl der in einem modellierten DNA–Segment produzierten Ionisationen entlang der Bahnspur eines geladenen Teilchens direkt in Relation zu sechs verschiedenen Arten von Einzel– und Doppelstrangbrüchen gesetzt wird [Cha89]. Dabei wurde zugrundegelegt, daß bei Deposition von 17.5 eV oder mehr im Zucker–Phosphat–Rückgrat der DNA ein Einzelstrangbruch erfolgt. Treten zwei ESB auf den gegenüberliegenden Strängen auf, die maximal 10 BP voneinander entfernt sind, ist dies ein Doppelstrangbruch. Mit Hilfe der Wahrscheinlichkeiten für die Deposition vorgegebener unterschiedlich hoher Energiebeträge innerhalb eines DNA–Segmentes, konnte die Anzahl an ESB bzw. DSB pro Einheitsdosis und Dalton berechnet werden.
Die Ergebnisse zeigen, daß die Komplexität der Strangbrüche mit wachsender Größe des Energieübertrags zunimmt. Während Brüche, bei denen nur ein ESB erfolgt, hauptsächlich im Energieintervall von 20 bis 80 eV liegen, treten DSB bevorzugt auf, wenn Energien zwischen 80 und 200 eV übertragen werden. Dabei ist die Ausbeute an Vielfachbrüchen (mehr als 3 einzelne Strangbrüche pro DNA–Segment, die zu einem DSB führen) ca. 20 mal größer als die an 'einfachen' DSB. Außerdem nimmt das Verhältnis von ESB zu DSB mit sinkender Energie der Teilchen ab. Für α–Teichen mit 1.2 MeV kinetischer Energie werden nach dieser Methode ESB–Ausbeuten von ca. $1{\cdot}10^{-10}\ \frac{ESB}{Gy\cdot Dalton}$ erhalten, die gut mit experimentell ermittelten Ergebnissen übereinstimmen. Die DSB–Ausbeuten sind mit etwa $2.7{\cdot}10^{-11}\ \frac{ESB}{Gy\cdot Dalton}$ größer als experimentell bestimmte.

3. Biologische Methoden

In diesem Kapitel werden sowohl die Funktionsweise des biologischen Testsystems, als auch die Methoden für die Gewinnung, die Probenpräparation und die Analyse der DNA beschrieben.

3.1 Auswahl einer geeigneten DNA

Für die Bestrahlungen war ein biologisches Testsystem erforderlich, welches getrennt auf induzierte Einzel– und Doppelstrangbrüche analysierbar ist. Diese Forderung erfüllt ringförmig geschlossene DNA, die in Zellen als superzirkulares (sc) DNA–Molekül vorliegt [Kni90]. Superzirkulare DNA ist gegenüber einem ringförmig geschlossenen offenzirkularen (oc) DNA–Molekül zusätzlich um seine Helix–Achse gedreht (vgl. Abbildung 3.1). Die sc–Struktur bildet sich aus, weil die Verwindung der Einzelstränge nicht dem energetisch günstigsten Verhältnis entspricht und es dadurch zu einer relaxierenden Verdrillung der DNA–Doppelstränge kommt. Neben der sc–

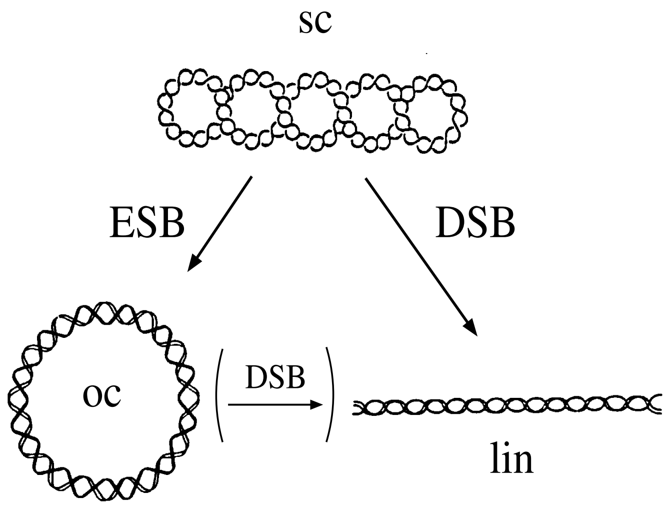

Abbildung 3.1: Übergänge zwischen den drei topoisomeren DNA–Formen superzirkular (sc), offenzirkular (oc) und linear (lin) durch Induktion von Einzelstrangbrüchen (ESB) und Doppelstrangbrüchen (DSB).

und der oc–Struktur gibt es als dritte topoisomere Form das lineare (lin) DNA–Molekül, bei dem der Doppelstrang an gegenüberliegenden Stellen der Einzelstränge aufgebrochen ist.
Zwischen diesen drei DNA–Formen gibt es Übergänge, die durch Strangbrüche induziert werden. Wie aus Abbildung 3.1 zu entnehmen ist, führt ein ESB die sc–Form in die lineare über. Ein DSB in einem sc– oder oc–Molekül überführt dieses in ein lineares.
Die drei topoisomeren Formen können aus einem Gemisch aller DNA–Formen aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit in einer Gelmatrix getrennt werden (vgl. Kapitel 3.4).
Plasmid–DNA weist diese Topoisomerie auf. Plasmide sind doppelsträngige, ringförmig geschlossene DNA–Moleküle, deren Größe zwischen $1 \cdot 10^3$ und $2 \cdot 10^5$ Basenpaaren variiert. Sie sind wahrscheinlich rudimentäre Viren und kommen in einer Vielzahl von Bakterien vor, sind für diese jedoch nur bedingt essentiell. Ihre Replikation und Transskription erfolgt unabhängig vom Genom der Bakterien. Hierfür nutzen sie die Enzyme des Wirts in Verbindung mit ihren eigenen Kontrollgenen. Aus diesem Grund kommen einige Plasmide im Baktrium im Gegensatz zu dessen Genom, welches in der Zelle nur einmal vorhanden ist in einer Vielzahl von Kopien vor (bis zu 700 mal pro Bakterium). Für das Bakterium bedeuten die Plasmide meist einen Selektionsvorteil, da sie Resistenzgene und Fertilitätsfaktoren tragen können, die im Genom nicht vorhanden sind. Da Plasmide oft dazu benutzt werden, in Bakterienzellen fremde Gene einzubringen, werden sie auch Transformations–Vektoren genannt [Sam89]. Die ringförmig geschlossene Struktur und die im Verhältnis zu Säuger–DNA etwa um den Faktor $1 \cdot 10^5$ kleineren Größen bewirken, daß Plasmid–DNA–Moleküle sehr stabil in bezug auf Isolierungs– und Analyseverfahren sind.
Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein modifizierter pUC–Vektor ausgewählt. Dieser bestand aus dem 2690 BP großen Plasmid–Vektor pUC 18, in den ein Insert von 4490 BP Länge kloniert war. Das gesamte Plasmid hatte somit eine Größe von 7180 BP. pUC–Vektoren gehören zu den Plasmiden, die das Ampizillinresistenzgen tragen und je nach Wirt in bis zu 700 Kopien in diesem vorkommen.

3.2 Vermehrung und Isolierung der Plasmid–DNA

Die Vermehrung von Plasmiden erfolgt mit Hilfe von Bakterien, die mit der Plasmid–DNA transformiert werden. Bei der Teilung der Bakterienzellen werden die Plasmide an die Tochterzellen weitergegeben. Auf diese Weise werden mit Hilfe der Bakterien die erforderlichen Plasmid–DNA–Mengen produziert. Im folgenden werden die Arbeitsvorschriften der dazu notwendigen Schritte ausführlich beschrieben. Alle hierfür erforderlichen Chemikalien sind in Anhang A aufgeführt.

3.2.1 Kompetente Zellen

Als Aufzuchtstamm diente der E. coli Bakterienstamm HB101, der eine hohe Transformationsrate besitzt und für Plasmidisolierungen großer Ausbeuten benutzt wird.
Zuerst mußten die Bakterien für die Aufnahme der Plasmid–DNA vorbereitet werden [Sam89]. Dazu wurden 5 ml LB–Medium mit einer Bakterienkolonie HB101 beimpft, und die Kultur wurde bei 37° C im Schüttler über Nacht inkubiert. Ein ml dieser Übernacht–Kultur wurde in 100 ml LB–Medium gegeben und bei 37° C im Schüttler inkubiert, bis die Kultur eine optische Dichte von 0.3 bis 0.5 bei 600 nm hatte. Danach wurde die Kultur 5 min. auf Eis abgekühlt und anschließend die Zellen 5 min. bei 3500 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment (Pellet) wurde in 10 ml 50 mM $CaCl_2$ bei 0° C suspendiert und 45 min. bei 0° C inkubiert. Es folgte eine zweite Zentrifugation für 5 min. bei 3500 rpm und ein erneutes Lösen des Pellets in 2 ml 50 mM $CaCl_2$. Die so behandelten Bakterien wurden bis zur Transformation bei 0° C gelagert.

3.2.2 Transformation

Unter Transformation versteht man die Übertragung von DNA, gegebenenfalls rekombinanter DNA auf Bakterien oder höhere Zellen [Win85]. In den transformierten Bakterien wird die Plasmid–DNA repliziert und bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Für die Transformation wurden zu 200 μl der kompetenten HB101–Zellen etwa 50 ng der Plasmid–DNA gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 30 min. bei 0° C inkubiert. In einem auf 42° C vorgeheizten Wasserbad wurden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock ausgesetzt und danach sofort 5 min. auf 0° C heruntergekühlt. Zur Aktivierung der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen nach Zugabe von 900 μl LB–Medium 30 min. in einem 37° C warmen Wasserbad inkubiert. Zuletzt wurden jeweils 300 μl des Transformationsansatzes auf ampizillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37° bebrütet. Durch die Verwendung der Selektionsnährböden wurde erreicht, daß nur transformierte Bakterien Kulturen bilden konnten.

3.2.3 Anzucht der transformierten Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmid–DNA wurden 15 ml ampizillinhaltiges LB–Medium (50 μg/ml Ampizillin) mit einer transformierten HB101–Kultur beimpft und bei 37° C unter Belüftung 7 bis 8 Stunden inkubiert. Jeweils 5 ml dieser Vorkultur wurden in 140 ml LB–Medium gegeben und über Nacht bei 37° C inkubiert.

3.2.4 Plasmidisolierung über Jet–Star–Säulen

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen unterteilt sich im wesentlichen in die beiden Schritte Lyse der Bakterien und Trennung der Plasmide von den hochmolekularen Zellbestandteilen, insbesondere von der genomischen Bakterien–DNA. Das hier ausgewählte Verfahren basiert auf der optimierten alkalischen–Lysis–Methode von Birnboim und Doly [Bir83]. Die Bakterienzellen werden dabei mit NaOH und SDS in Gegenwart von RNase lysiert. Das SDS denaturiert die zellulären Proteine, während unter den alkalischen Bedingungen die chromosomale und die Plasmid–DNA denaturieren. Durch Zugabe von saurem Kaliumacetat hoher Salzkonzentration wird das Lysat neutralisiert und gleichzeitig die denaturierten Proteine, die chromosomale DNA, die Zellbruchstrücke und das SDS gefällt. Die niedermolekulare Plasmid–DNA renaturiert unter diesen Bedingungen und bleibt in Lösung. Außerdem wird bei diesem Schritt die Bakterien–RNA verdaut. Durch Zentrifugation werden die ausgefällten Zellbestandteile pelletiert, so daß sich im wesentlichen nur noch die Plasmide im Überstand befinden. Dieser wird auf eine equilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben, in der sich aufgrund der Salzkonzentration im Lysat nur DNA an das Austauscherharz bindet (selektive Elution bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen). Mit ei-

nem Puffer hoher Salzkonzentration wird die gereinigte Plasmid–DNA aus der Säule eluiert, mit Isopropanol gefällt und mit 70%-igem Ethanol noch vorhandenes Salz entfernt. Das DNA–Pellet wird nach Verdunsten des Ethanols bei Raumtemperatur (etwa 10–15 min.) in TE–Puffer gelöst.
Für die Plasmidisolierung wurde das JET Star Midi Plasmid Purification System der Firma Genomed [JET94] benutzt. Dafür wurden 140 ml der über Nacht gewachsenen Hauptkultur 20 min. bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand komplett vom Pellet entfernt. Die weitere Durchführung erfolgte streng nach der Isolierungsanleitung von Genomed. Mit diesem Verfahren konnten pro verwendeter Säule etwa 150 μg Plasmid–DNA isoliert werden, die zu etwa 90% superzirkular und zu 10% offenzirkular vorlag.

3.3 Photometrische Reinheits– und Konzentrationsbestimmung

Von der isolierten und in TE–Puffer gelösten DNA wurde mit einem Spektralphotometer die optische Dichte bei den Wellenlängen

- 260 nm (OD_{260}, Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und
- 280 nm (OD_{280}, Absorptionsmaximum von Proteinen)

bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer DNA–Konzentration von 50 μg/ml [Sam89]. Werden höhere Konzentrationen als 50 μg/ml erwartet, muß die DNA entsprechend verdünnt werden, um maximale OD–Werte von etwa 1 zu erhlten. Der Quotient $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$, der ein Maß für die Reinheit der isolierten DNA ist, sollte ≥ 1.8 sein.
Für die Bestrahlungen wurde Plasmid–DNA aus zwei Isolierungen benutzt, deren Werte für Konzentration und Reinheit in Tabelle 3.1 aufgelistet sind.

Proben–Nr.	Konzentration	$\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$
P1	588±20 ng/μl	1.9
P2	455±20 ng/μl	2.0

Tabelle 3.1: Konzentration und Reinheit der für die Bestrahlungen verwendeten in TE–Puffer gelösten Plasmide.

3.4 DNA–Analyse

3.4.1 Gelelektrophorese

Zur Trennung, Isolierung und Identifizierung von DNA–Fragmenten hat sich die Gelelektrophorese als Standardmethode durchgesetzt. Es handelt sich dabei um ein biophysikalisches Trennverfahren, welches auf der Bewegung der negativ geladenen DNA–Moleküle im elektrischen Feld beruht. Dabei wird ausgenutzt, daß sich lineare, doppelsträngige DNA in einem Agarosegel bei einer Feldstärke von max. 5 V/cm^2 so durch die Gelmatrix bewegt, daß sich ihre zurückgelegte Strecke umgekehrt proportional zum $\log_{10}$ ihres Molekulargewichtes verhält [Sam89]. Da die Konformation der DNA–Moleküle einen direkten Einfluß auf ihre Beweglichkeit in der Gelmatrix hat, kann ein Gemisch aus superzirkularer, linearer und offenzirkularer DNA in die einzelnen Formen aufgetrennt werden [Kni90].
Die Gelelektrophoresen wurden submarin in TAE-Puffer in einer Pharmacia GNA 200–Gelkammer durchgeführt, deren schematischer Aufbau in Abbildung 3.2 gezeigt ist. Jeweils 18 μl DNA–Lösung wurden mit 3 μl Färbemix vermischt und in die Slots des Agarosegels pipettiert. Die Gele waren 0.8%-

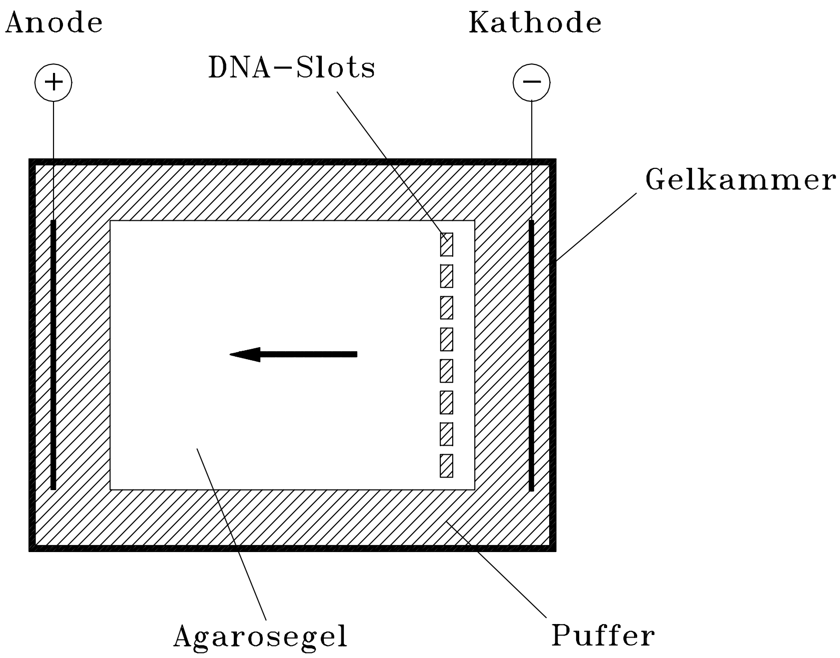

Abbildung 3.2: Schematische Zeichnung der Gel–Elektrophoresekammer. Der Pfeil gibt die Laufrichtung der DNA–Moleküle an.

ige Agarosegele, hatten eine Größe von 200 × 200 × 5 mm und wurden bei 50° C gegossen. Die Elektrophoresen fanden bei einer Feldstärke von 4 V/m bei 4° C statt und dauerten ca. 3 Stunden.

3.4.2 Färben und Fotografieren der Gele

Zur weiteren Auswertung mußten die DNA–Banden im Gel angefärbt werden. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid benutzt, der in die DNA–Moleküle interkaliert und nach Anregung mit UV–Licht der Wellenlänge 254 nm eine orange–rote Fluoreszenzstrahlung aussendet. Der Färbevorgang dauerte 15 min. und erfolgte in einem EtBr–Bad der Konzentration 4 μ g/ml. Danach wurden die Gele 30 min. gewässert, um EtBr–Rückstände aus der Agarose zu entfernen.
Von diesen gefärben Gelen wurden Plattennegative (AgfaPan AP 400 professional, 10.2 × 12.7 cm) angefertigt, die laserdensitometrisch ausgewertet werden konnten. Die Gewährleistung der Linearität zwischen DNA–Menge und Schwärzung des Negativs wurde mit Hilfe eines Graukeils mit linearen Graustufen überprüft. Die Belichtungszeit wurde solange variiert, bis die Intensitäten der auftretenden DNA–Banden im linearen Bereich des auf dem

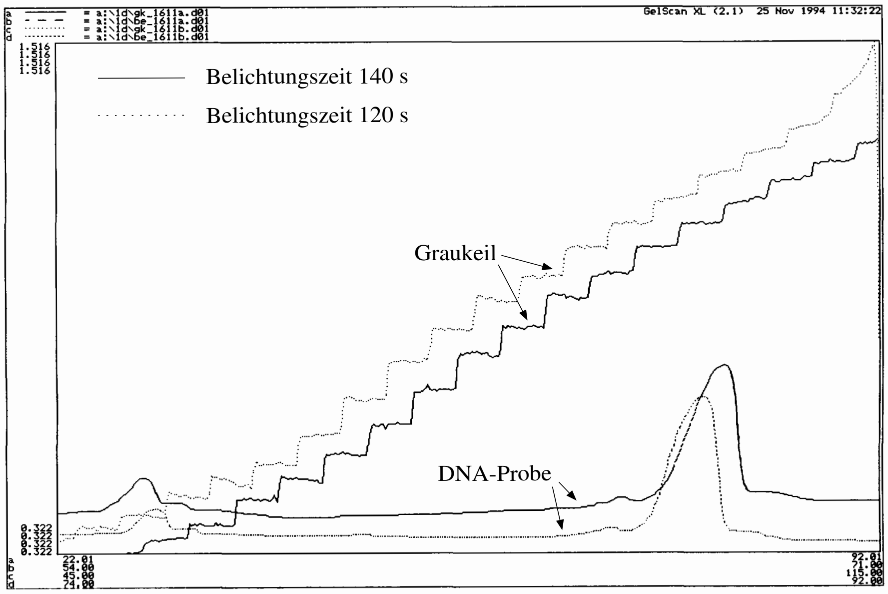

Abbildung 3.3: Laserdensitometrische Auswertung einer Plasmid–DNA–Probe derselben Menge, wie sie bei den Bestrahlungen benutzt wurde.

Negativ abgebildeten Graukeils lagen. Abbildung 3.3 zeigt, daß dies für eine Belichtungszeit von 140 s erfüllt war. Dabei ist jedoch zu bemerken, daß die minimal und maximal auftretenden Höhen der Grauabstufungen dieses Bereichs etwa im Verhältnis 4:5 variieren, was durch den Entwicklungsprozeß bedingt war.

3.4.3 Laserdensitometrie

Die Schwärzungen der DNA–Banden auf den Plattennegativen wurden mit einem LKB Bromma Ultascan XL Enhanced Laserdensitometer gemessen. Hierbei wird das Negativ in einem vorgegebenen Bereich entlang der Laufstrecke der DNA–Banden von einem Laserstrahl abgetastet und der Schwärzungsgrad der Banden gegen die Laufstrecke aufgetragen. Durch Anpassen einer Gaußfunktion an die Peaks der superzirkularen, offenzirkularen und linearen Bande wurde die Peak–Fläche bestimmt, aus der die in den Banden enthaltene DNA–Menge bestimmt werden konnte.

3.5 Probenpräparation

3.5.1 Erstellen homogener DNA–Proben

Die Bestrahlung der Proben im Vakuum erforderte ein Eintrocknen der gelösten Plasmid–DNA. Um für die bestrahlte DNA eine einheitliche Dosis bestimmen zu können, mußte diese bei einem definierten Probendurchmesser möglichst homogen über die Probenoberfläche verteilt sein. Zu diesem Zweck wurden in Vorversuchen jeweils 5 bzw. 6 μl angefärbter TE–Puffer in die Probenaufnahme–Vertiefungen (Wells) verschiedener Mikrotiterplatten pipettiert. Wells, die einen flachen Boden hatten, waren ungeeignet, da nach dem Verdunsten des Puffers der Farbstoff in einem Kreisring konzentriert war, und nicht wie gefordert auf einer Kreisfläche verteilt war. Dies lag daran, daß der TE–Puffer auf dem hydrophoben Boden des Wells einen gewölbten Tropfen bildete. Beim Verdunsten entsteht im Tropfen ein Konzentrationsgradient, der bewirkt, daß die Farbstoffmoleküle in die Randbereiche strömen und sich außen in einem Kreisring ablagern. Bei Wells, deren Wände trichterförmig geneigt waren, verteilte sich der Farbstoff über die gesamte Probenoberfläche, wenn der Flüssigkeitsspiegel bis an den oberen Rand der Wells gezogen wurde (vgl. Abbildung 3.5). Um zu überprüfen, ob

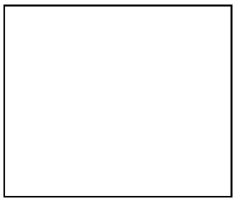

Abbildung 3.4: Verteilung der gefärbten DNA–Moleküle in den trichterförmigen Wells.

sich die DNA–Moleküle genauso verhalten wie der Farbstoff, wurden 5 μl der Plasmid–DNA, die mit dem Fluoreszensfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt waren, sowie 5 μl–Proben angefärbter TE–Puffer (Nullproben) in den Wells eingetrocknet und unter UV–Licht fotografiert. Abbildung 3.4 zeigt, daß die Wände der Wells bis auf eine kleine Fläche in der Mitte von DNA belegt sind. Da jedoch auch bei den Vergleichsproben eine Anfärbung der Wells zu erkennen ist, wurde von der Mikrotiterplatte ein Negativ gemacht und sowohl die Wells mit der angefärbten DNA als auch die Vergleichsproben mit dem Laserdensitometer gemessen. Abbildung 3.6 zeigt den Intensitätsverlauf einer Probe über den Probendurchmesser der eingetrockneten DNA

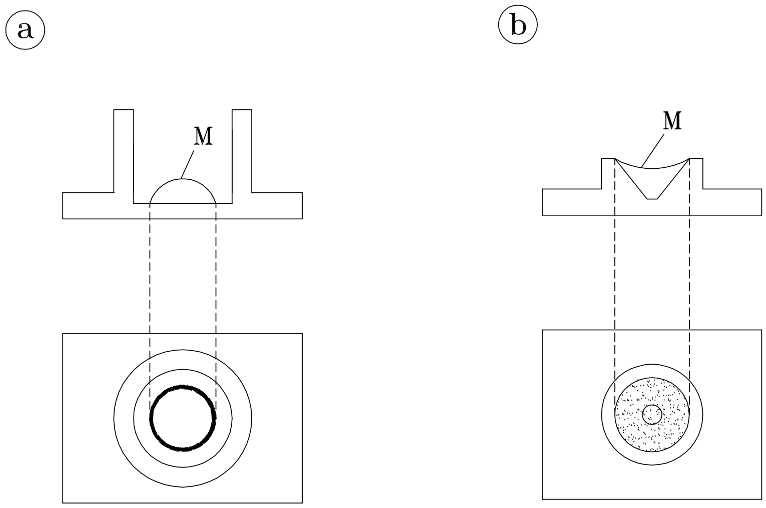

Abbildung 3.5: Wells zweier Mikrotiterplatten, mit flachem Boden (a) und mit geneigten Wänden (b). M ist der Meniskus der in die Wells pipettierten Probenvolumina. Die schraffierten Flächen zeigen die DNA–Verteilung nach dem Eintrocknen der Proben.

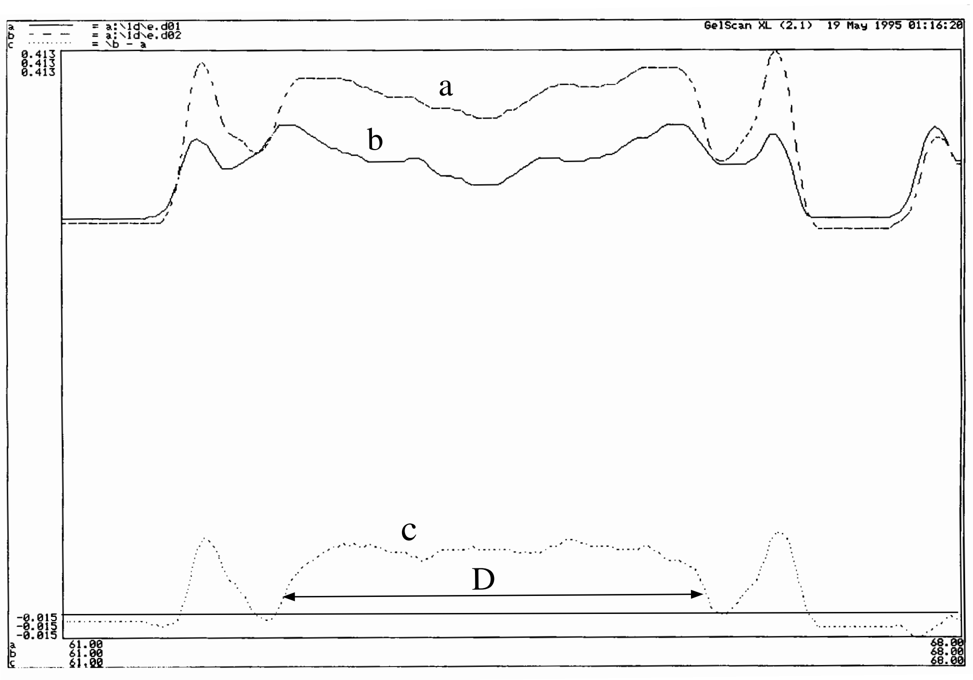

Abbildung 3.6: Verteilung der eingetrockneten DNA–Moleküle über den Probendurchmeser in einem trichterförmigen well. (Kurve a: Intensitätsverlauf der gefärbten DNA, Kurve b: Intensitätsverlauf der Nullprobe, c: Differenz DNA – Nullprobe. D ist der Probendurchmesser.

(Kurve a) und der Nullprobe (Kurve b). Darunter ist die Differenzkurve von DNA und Nullprobe dargestellt, die nur die von der DNA hervorgerufene Fluoreszenz wiedergibt. Die Kurve c zeigt, daß die DNA über den gesamten Probendurchmesser gleichmäßig verteilt ist und an den Rändern im Bereich von 0.3 mm auf 0 abfällt. Dies weist auf eine homogene Verteilung der Plasmid–Moleküle im DNA–Salz–Gemisch hin. Zwischen den beiden Punkten, bei denen die Kurve auf 30% der mittleren Maximalintensität abgefallen ist, wurde der Probendurchmesser bestimmt. Dies wurde für insgesamt 9 Proben wiederholt, und daraus wurde ein mittlerer Probenradius von 1.67±0.05 mm bestimmt.
Die Probenschichten, die sich beim Eintrocknen von 5 μl der in TE–Puffer gelösten DNA ergaben, besaßen eine Massenbelegung von insgesamt 124.1±7.6 $\mu g/cm^2$ (Plasmidprobe P1) mit einem DNA–Anteil von 27% bzw. 116.1±7.1 $\mu g/cm^2$ (Plasmidprobe P2) mit einem DNA–Anteil von 22%. Für die Bestrahlungen wurden als Probenträger Stücke mit 6 Wells aus der Mi-

krotiterplatte ausgesägt (vgl. Abbildung 4.6).

3.5.2 Vakuumtest und Rückgewinnung

Es mußte nun sichergestellt werden, daß durch Eintrocknen, Lagerung der Proben im Vakuum während der Bestrahlung und Wiederauflösen der DNA die Plasmid–DNA nicht zusätzlich degradiert wurde. Dazu wurden 5 μl–Proben der isolierten in TE–Puffer gelösten Plasmid–DNA in die Wells eines Probenträgers pipettiert, in einem Exsikkator 2 Stunden getrocknet und in den Probenhalter der Streukammer geschoben. Die Kammer wurde evakuiert, und die DNA–Proben wurden 30 min. im Vakuum gelassen. Nach Belüften der Kammer wurden die DNA–Proben in 8 μl doppelt distilliertem Wasser (bidest) bei 4° C 2 Stunden gelöst. Von der gelösten Probe wurden 5 μl 1:40 verdünnt und davon 10 μl gelelektrophoretisch analysiert. Die zusätzliche Degradation, die durch die Probenbehandlung bedingt war, konnte vernachlässigt werden. Um ein möglichst einfaches biologisches Testsystem zu haben, wurde die Plasmid–DNA zunächst in Kaliumphosphat–Puffer gelöst. Vorversuche ergaben jedoch, daß hierbei eine etwa 60%-ige Degradation der sc DNA auftrat und sogar lineare Plasmide entstanden. Aus diesem Grund wurde für die Bestrahlungen nur in TE–Puffer gelöste Plasmid–DNA verwendet.

3.6 Bestimmung der induzierten Strangbrüche

Bei der Berechnung der induzierten ESB und DSB wurde vorausgesetzt, daß die Wahrscheinlichkeiten für das Eintreten der Strangbrüche durch eine Poisson–Verteilung gegeben sind. Eine Zufallsgröße heißt *poissonverteilt*, wenn sie abzählbar unendlich viele mögliche Werte 0, 1, 2, ... mit den Wahrscheinlichkeiten

$$P(n) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda} \ , \quad \lambda \geq 0 \ , \quad k = 0, 1, ... \tag{3.1}$$

annimmt [Bro91]. Die Poisson–Verteilung ist gültig bei seltenen Ereignissen in vielen Messungen. Diese Bedingungen sind bei der DNA–Bestrahlung erfüllt, da die Anzahl der bestrahlten Objekte groß ist gegen die Anzahl der auftretenden Treffer (vgl. Kapitel 6.5). Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von genau n Treffern ist

$$P(n) = \frac{(n_{ESB} + n_{DSB})^n}{n!} \cdot e^{-(n_{ESB}+n_{DSB})} , \tag{3.2}$$

wobei n_{ESB} bzw. n_{DSB} die mittlere Anzahl der ESB, bzw. DSB pro Plasmid–Molekül ist. $(n_{ESB}+n_{DSB})$ ist die mittlere erfolgte Trefferzahl. Da bei den sc Plasmid–Molekülen bereits ein Treffer (ESB oder DSB) das Molekül in die offenzirkulare oder lineare Form überführt (Ein–Treffer–Kinetik), kann der Anteil der nach Bestrahlung noch intakten Moleküle aus der Wahrscheinlichkeit für 0 erfolgte Treffer

$$\frac{N}{N_0} = P(0) = e^{-(n_{ESB}+n_{DSB})} \tag{3.3}$$

berechnet werden. Dabei ist N_0 die Anzahl der insgesamt bestrahlten und N die Zahl der nach der Bestrahlung noch vorhandenen sc–Plasmide. Damit folgt für die Summe der ESB und DSB pro Plasmid–Molekül

$$n_{ESB} + n_{DSB} = ln\frac{N_0}{N} . \tag{3.4}$$

Die Anzahl der DSB pro Plasmid–Molekül kann aus der Fraktion der linearen Moleküle F_{lin} berechnet werden. Da diese genau einen DSB erhalten haben, können sie aus dem ersten Term der Poisson–Verteilung berechnet werden. Aus Gleichung 3.2 folgt mit n_{ESB}=0

$$F_{III} = P(1) = n_{DSB} \cdot e^{-n_{DSB}} , \quad mit \quad F_{III} = \frac{F_{lin}}{(F_{sc} + F_{oc})_{nach\,Bestr.}} , \tag{3.5}$$

wobei F_{sc} die Fraktion der superzirkularen, F_{oc} die der offenzirkularen Plasmid–Moleküle ist. Da die Funktion $f(n_2) = n_2 \cdot e^{-n_2}$ nicht nach n_2 auflösbar ist, wurde n_2 durch Iteration nach dem Newton–Verfahren berechnet [Bro91]. Die drei Fraktionen F_{sc}, F_{oc} und F_{lin} wurden aus den relativen Zunahmen der sc–Plasmid–Form bzw. den Abnahmen der oc– und lin–Form der bestrahlten Proben gegenüber den unbestrahlten Nullproben berechnet. Dadurch wurden ausschließlich die durch α–Teilchen und Protonen induzierten Veränderungen der DNA–Fraktionen erhalten. Wegen der

Berechnung der DSB nach dem Newton–Verfahren und der nur ungenauen Abschätzung der Fehler der laserdensitometrisch bestimmten DNA–Anteile (vgl. Kapitel 3.4.2), war eine korrekte Fehlerrechnung nicht mögliche. Daher wurde für die ermittelten ESB und DSB pro Plasmidmolekül ein absoluter Fehler von ± 0.01 angenommen, durch den die Ungenauigkeiten bei der Bestimmung kleiner DNA–Anteile berücksichtigt wurden und ein relativer Fehler von 15%, durch den die Untergrundeffekte der Negativentwicklung erfaßt wurden.

4. Aufbau des Streuexperimentes

Die Bestrahlung der Plasmid–DNA mit α–Teilchen fand am 400 kV–Ionenbeschleuniger im Institut für Kernphysik der Universität Münster statt. Da die im direkten Strahlbetrieb minimal erreichbaren Teilchenflüsse von etwa 10^{12}/s für die DNA–Bestrahlung um 6 bis 7 Größenordnungen zu hoch waren, wurden zur Bestrahlung der Proben die an einem Kohlenstofftarget elastisch gestreuten α–Teilchen genutzt. Durch die Wahl des Streuwinkels, unter dem die Probe das Target sah, und durch Variation des Raumwinkels, den die Probe einnahm, konnte der Teilchenstrom im Bereich von 10^3–10^5/s kontinuierlich eingestellt werden. Zur Dosisbestimmung wurde ein Detektor unter demselben Streuwinkel wie die DNA–Probe symmetrisch zur Strahlachse in der Streuebene plaziert. Ein weiterer Vorteil war, daß durch die Streuung der Teilchen mögliche Inhomogenitäten der Teilchendichte im Primärstrahl eliminiert wurden.
Im folgenden werden der Ionenbeschleuniger, die Streuanordnung und die Auswerteelektronik beschrieben.

4.1 Der Ionenbeschleuniger

Abbildung 4.1 zeigt den schematischen Aufbau des 400 kV–Ionenbeschleunigers der Universität Münster [Sch89].
Als Ionenquelle steht eine Penningquelle zur Verfügung, die neben einfach geladenen He^+–Zuständen auch doppelt geladene He^{++}–Zustände liefert. Diese werden mit einem Extraktionssystem vorbeschleunigt, mit einer elektrostatischen Einzellinse fokussiert und anschließend in einem Analysiermagneten von den übrigen Ionen separiert. Der Analysiermagnet besteht aus einem 90°–Ablenkmagneten, hinter dem sich ein Separationsspalt befindet. Über die Ortsablenkung der Ionen im Magnetfeld, die eine Funktion der Magnetfeldstärke und der Strahlsteifigkeit ist, wurden die verschiedenen Ionensorten getrennt. Die Strahlsteifigkeit R ist eine Eigenschaft der Ionen

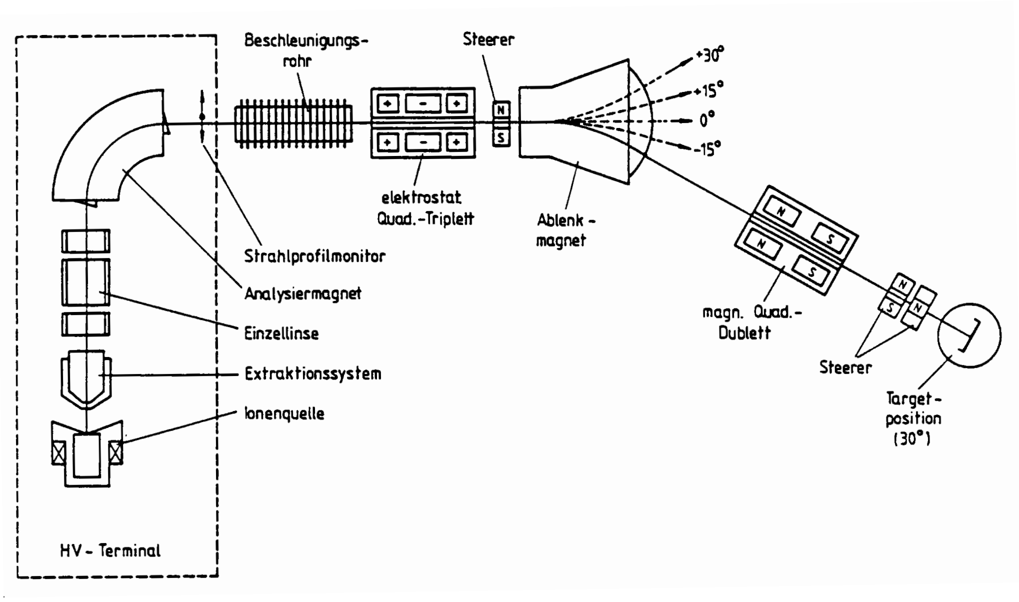

Abbildung 4.1: Schematische Zeichnung des gesamten Strahltransportsystems des 400 kV–Ionenbeschleunigers [Sch89]. Das magnetische Quadrupol–Dublett stand am +30° Strahlrohr, an dem die Experimente stattfanden, nicht zur Verfügung.

---

und definiert als

$$R = \sqrt{\frac{A \cdot E_{kin}}{q^2}} \tag{4.1}$$

mit A, der Ionenmasse, E_{kin}, der kinetischen Energie der Ionen, und q, der Ionenladung. Da die kinetische Energie der extrahierten Ionen abhängig ist von ihrem Ladungszustand, d.h. $E_{kin} = U_0\, q$ (U_0: Beschleunigerpotential), erfolgte die Separation der Ionen effektiv nach ihrem A/q–Verhältnis

$$R = \sqrt{\frac{A \cdot U_0 \cdot q}{q^2}} \sim \sqrt{\frac{A}{q}}\ . \tag{4.2}$$

Mit Hilfe eines Spaltes und eines Strahlprofilmonitors, der sowohl das Profil des Strahles vor als auch hinter dem Spalt aufnahm, konnte durch Variation des Magnetfeldes jede Ionensorte ausgefiltert werden. Die Identifikation einer Ionensorte mit einem bestimmten A/q–Verhältnis erfolgte durch Abzählen der Maxima, die beim Hochregeln des Magnetfeldes in der Response des Monitors auftraten.

Auf der nachfolgenden Beschleunigungsstrecke wurden die He^{++}–Ionen auf maximal 600 keV beschleunigt. Dabei war die Energieschärfe, die sich aus der Restwelligkeit der Beschleunigungsspannung, der Extraktionsspannung und der Energieverteilung der Teilchen aus der Penningquelle zusammensetzte, kleiner als 100 eV. Über ein Transportsystem, zu dem ein elektrostatisches Quadrupol–Triplett, ein Ablenkmagnet, und mehrere Steerer gehörten, wurde der Ionenstrahl zum Experiment auf der Position +30° gelenkt.

4.2 Aufbau der Streuanordnung

Der Aufbau der Streukammer am +30° Experimentierplatz des Beschleunigers ist in Abbildung 4.3 zu erkennen, eine schematische Zeichnung der Streuanordnung zeigt Abbildung 4.2.
Der in die Kammer eintretende Primärstrahl wurde von zwei Tantal–Blenden B1 und B2, die mit Hilfe eines Theodoliten optisch auf der Strahlachse positioniert wurden, auf einen Durchmesser von etwa 6 mm kollimiert (Abbildung 4.4). Damit wurde sichergestellt, daß der Strahl durch die Eintrittsöffnung des das Target umschließenden Faraday–Cups hindurch auf

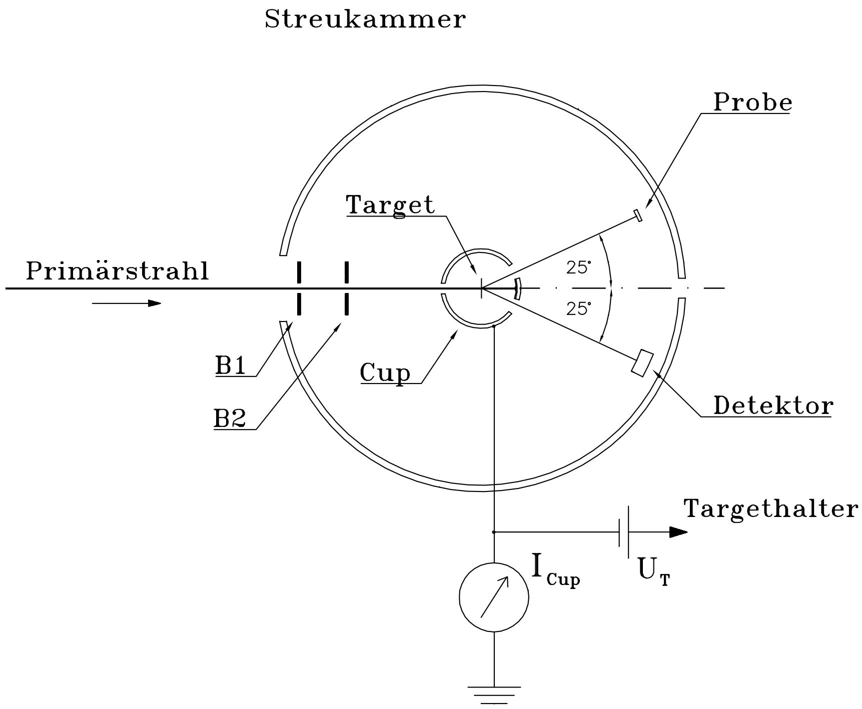

Abbildung 4.2: Schematische Zeichnung der Streukammer.

Abbildung 4.3: Ansicht des Strahlrohres mit angeschlossener Streukammer.

Abbildung 4.4: Blick in die geöffnete Streukammer: Zu erkennen sind die beiden Blenden (re.), sowie der Detektor (li.unten) und der Probenhalter (re.unten).

Abbildung 4.5: Photo des Faraday–Cups mit Targethalter ((1) Cupöffnung für Primärstrahl, (2) Öffnungen für die gestreuten Teilchen, (3) Kohlenstofftarget).

Abbildung 4.6: Symmetrische Anordnung von Detektor und Probenhalter zur Strahlachse. Zu erkennen ist die Detektorhalterung mit Blende (li.) und die der DNA–Probenhalter mit Blende für die Nullproben (re.).

die Targetmitte zentriert wurde, und keine einlaufenden Teilchen den Cup von außen trafen. Der Targethalter, auf dem das Kohlenstofftarget befestigt war, und der Faraday–Cup waren elektrisch isoliert am Kammerdeckel montiert. Das Target bestand aus einem Aluminiumrähmchen, auf das eine Kohlenstoffolie aufgeschwemmt war. Neben der Eintrittsöffnung besaß der Cup zwei weitere Austrittsöffnungen für die gestreuten Teilchen (Abbildung 4.5). Symmetrisch zur Strahlachse unter gleichem Streuwinkel waren der Probenhalter und der Detektor angeordnet (Abbildung 4.6). Der Detektor, ein Oberflächensperrschichtzähler vom Typ ORTEC BA-017-025-100 mit einer aktiven Fläche von 25 mm^2, konnte α–Teilchen mit Energien bis 12 MeV bei einer Auflösung besser 17 keV detektieren. Er saß elektrisch isoliert hinter einer Blende in einer den gesamten Zähler umschließenden Halterung. In den Probenhalter konnten die Trägerplättchen für die DNA–Proben senkrecht von oben hereingeschoben werden, wobei die beiden untersten Probenpositionen für die Nullproben durch ein Aluminiumplättchen verdeckt waren. Die Streukammer wurde mit einer Turbomolekularpumpe, die unter der Kammer montiert war, evakuiert. Der nach etwa 40 min erreichte Enddruck betrug $5 \cdot 10^{-6}$ mbar. Zum Belüften konnte die Kammer durch einen Handschieber vom Strahlrohr abgetrennt werden. Mit Hilfe eines Magnetschiebers konnte der Primärstrahl vom Kontrollraum des Beschleunigers aus gesteuert werden.

Ø Streukammer	37.5±0.1	cm
Höhe Streukammer	18.6±0.1	cm
Abstand Target–Probe	13.3±0.2	cm
Abstand Target–Detektor	13.4±0.2	cm
Ø 1. Blende	6.0±0.1	mm
Ø 2. Blende	7.0±0.1	mm
Ø Cupöffnung für Primärstrahl	10.0±0.1	mm
Ø Cup (innen)	5.2±0.1	cm
Ø Kohlenstofftarget	9.0±0.1	mm
Ø Detektorblende	0.120±0.003	mm
Ø DNA–Probe	1.67±0.05	mm
Detektorraumwinkel	2.50±0.18	μsr
Probenraumwinkel	495±45	μsr

Tabelle 4.1: Abmessungen einzelner Komponenten der Streuanordnung.

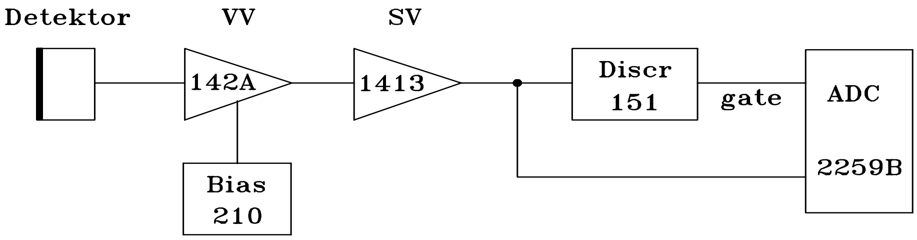

Abbildung 4.7: Schaltskizze der Auswerteelektronik

Funktion	Typ
Detektor	ORTEC BA–017–025–100
Detector Control	ORTEC 210
Vorverstärker (VV)	ORTEC 142A
Spektroskopieverstärker (SV)	CANBERRA 1413
Diskriminator (Discr)	CHRONETICS 151
ADC	LeCroy 2259B
CAMAC–Controller	WIENER CC16

Tabelle 4.2: Zusammenstellung der elektronischen Komponenten

4.3 Auswerteelektronik

Eine Schaltskizze der Elektronik, die für die Auswertung der Detektorsignale zur Verfügung stand, ist in Abbildung 4.7 gezeigt. Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht über die elektronischen Komponenten. Die Detektorsignale wurden zuerst von einem Vorverstärker (VV), über den auch die Biasspannung des Sperrschichtzählers von 53.5 V angelegt wurde, vorverstärkt. Diese Signale wurden vom nachfolgenden Spektroskopieverstärker (SV) integriert und sowohl einem Analog–Digital–Wandler (ADC) als auch einem Diskriminator (Discr) zugeführt. Letzterer erzeugte die Gates für den ADC. Der ADC befand sich in einem CAMAC–Crate und wurde über den Crate–Controller von einem PC ausgelesen. Die Steuerung des Crate–Controllers, die Auslese des ADC sowie die histographische Darstellung der akkumulierten Daten erfolgte mit Hilfe der Meß–Software MULTI [Wie93].
Der einfallende primäre Teilchenstrom wurde mit einem Integrator gemessen, der die Summe aus Cup– und Targetstrom in Form einer Impulsfolge ausgab (vgl. Kapitel 5.1.2).

5. Durchführung der Bestrahlung

Bevor die eigentliche DNA–Bestrahlung durchgeführt werden konnte, mußte die Streuanordnung und die Auswerteelektronik getestet und optimiert werden. Zur Bestimmung der Parameter, die zur Berechnung der in die DNA–Proben deponierten Dosis notwendig sind, wurden Streuspektren aufgenommen, die der Ermittlung der Targetdicke und der Energiekalibrierung der gestreuten Teilchen dienten. Danach erfolgten fünf DNA–Bestrahlungsserien mit α–Teilchen und Protonen jeweils zwei verschiedener Energien. Die Ergebnisse der Auswertung der Streuspektren, die die Bestimmung der Targetdicke sowie die Energie– und Dosiskalibrierung beeinhalten, folgen im letzten Kapitel.

5.1 Test und Optimierung der Bestrahlungsapparatur

5.1.1 Strahlqualität

Ein wichtiges Kriterium für die Qualität des Primärstrahles ist die zeitliche Konstanz des Teilchenstromes. Diese hing vor allem von der Stabilität der Penningquelle ab. Experimente zeigten, daß die Anodenspannung der Quelle nach Einstellung des Brennmodus nicht konstant blieb, sondern für eine bestimmte Dauer weiter anstieg, und damit auch der gemessene Strahlstrom zunahm. Dieser Einbrennvorgang dauerte etwa eine Stunde. Während dieser Zeit mußte die Anodenspannung stetig nachgeregelt werden, um einen stabilen Brennmodus zu erreichen. Erst nach dieser Einbrennphase fanden die Bestrahlungsexperimente statt.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Analyse der Zusammensetzung des Primärstrahles. In Kapitel 4.1 wurde gezeigt, daß die aus der Quelle extrahierten Ionensorten im Analysemagneten nach ihrem A/q–Verhältnis separiert werden. Alle Ionensorten, deren A/q–Verhältnis mit dem am Analysiermagneten eingestellten übereinstimmte, traten folglich im Primärstrahl

O_2	$\leq$ 5 vpm
N_2	$\leq$20 vpm
H_2O	$\leq$ 5 vpm
C_nH_m	$\leq$ 1 vpm
Ne	$\leq$10 vpm

Tabelle 5.1: Verunreinigungen im Heliumgas (Herstellerangaben).

auf. Dessen Zusammensetzung hängt von der Reinheit des Quellengases ab. Für die hier durchgeführten Experimente wurde Heliumgas verwendet, dessen Verunreinigungen im ppm–Bereich lag (Tabelle 5.1). Die Produktion von Ionen mit Massenzahlen A$\geq$4 konnte daher vernachlässigt werden. Eine zusätzlich zu den in Tabelle 5.1 aufgeführten Stoffen auftretende Verunreinigung ist H_2. Dieser ist aufgrund seines hohen Diffusionsvermögens in Metallen sowohl im Quellengas als auch im Beschleuniger, der zudem während 50% seiner Betriebszeit mit Wasserstoff betrieben wird, immer vorhanden. Bei fest eingestellter Beschleunigungsspannung U_0 wurden von der Quelle daher die in Tabelle 5.2 aufgeführten Ionensorten produziert. Zur Separation der für die Bestrahlungen erforderlichen α–Teilchen wurde am Analysiermagneten ein A/q–Verhältnis von 2 eingestellt, indem durch Hochregeln des Ablenkmagneten mit dem Strahlprofilmonitor das zweite auftretende Maximum gesucht wurde. Dies bedeutete, daß sowohl die He^{++}–Ionen als auch die H_2^+–Molekülionen den Analysiermagneten passieren konnten und beschleunigt wurden. Der primäre α–Teilchenstrahl war daher mit Wasserstoffmolekülionen verunreinigt, die die halbe kinetische Energie der α–Teilchen besaßen.

Bei der Streuung des Primärstrahles an einem Kohlenstofftarget werden daher zwei Peaks im Streuspektrum erwartet: ein Peak bei hohen Energien,

Ionensorte	p	He^{++}	H_2^+	He^+
A/q–Verhältnis	1	2	2	4
E_{kin}	U_0e	2 U_0e	U_0e	U_0e

Tabelle 5.2: Von der Penningquelle produzierte Ionensorten unter Vernachlässigung der Verunreinigungen im Heliumgas.

der von den He^{++}–Ionen stammt, und einer bei niedrigen Energien, der von den H_2^+–Molekülionen hervorgerufen wird. Letzterer stammt jedoch nicht von den H_2^+–Molekülionen selbst, sondern von jeweils einem der beiden Protonen, in die die Molekülionen bei der Streuung aufbrechen. Dieser Effekt beruht auf den Bindungsverhältnissen der Protonen im Wasserstoffmolekülion.
Die Bindungsenergie der beiden Protonen im H_2^+–Molekülion beträgt 2.8 eV, ihr Bindungsabstand $1.06 \cdot 10^5$ fm [Gas89]. Die Coulomb–Wechselwirkungsenergie, die bei der Streuung von Protonen an Kohlenstoffkernen auftritt, kann durch Einsetzen des Stoßparameters

$$b = \frac{Z_T\, Z_P\, e^2}{2E} \cdot cot\left(\frac{\theta}{2}\right) \tag{5.1}$$

in die Formel für das Coulombpotential zweier wechselwirkender Teilchen

$$V_c = \frac{Z_T\, Z_P\, e^2}{R} \tag{5.2}$$

an Stelle des Wechselwirkungsradius R abgeschätzt werden [May92]. Dabei ist Z_T die Ladung der Targetkerne, Z_P die Protonenladung, e die Elementarladung, E die kinetische Energie der Protonen und θ der Streuwinkel. Man erhält die einfache Beziehung

$$V_c = \frac{2E}{cot\left(\frac{\theta}{2}\right)}\ . \tag{5.3}$$

In Tabelle 5.3 sind für Protonen vier verschiedener Energien die Stoßparameter und die Wechselwirkungsenergien bei 25°–Streuung an Kohlenstoffkernen

E	b	V_c
100 keV	195 fm	44 keV
150 keV	130 fm	66 keV
200 keV	97 fm	89 keV
300 keV	65 fm	133 keV

Tabelle 5.3: Stoßparameter und Coulomb–Wechselwirkungsenergien bei der Streuung von Protonen der Energie E an Kohlenstoffkernen (θ=25°).

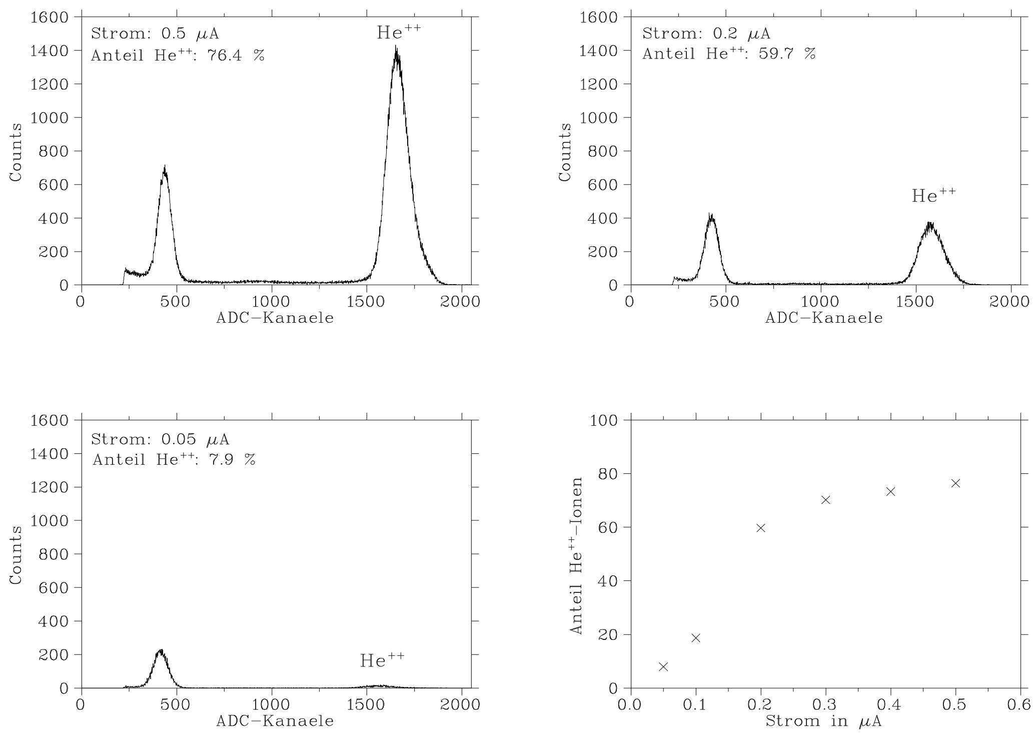

Abbildung 5.1: Streuspektren von α–Teilchen, die bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV unter einem Streuwinkel 20° detektiert wurden. Die Stromreduzierung erfolgte über einen Steerer (vgl. Text). Das Spektrum rechts unten zeigt die Abhängigkeit des He^{++}–Anteils vom eingestellten Strom.

angegeben. Ein Vergleich dieser Werte mit der Bindungsenergie E_B und dem Bindungsabstand R_B der beiden Protonen im Wasserstoffmolekülion ergibt für das am Kohlenstoffkern gestreute Proton die Verhältnisse

$$\frac{V_c}{E_B} \geq 10^4 \quad \text{und} \quad \frac{b}{R_B} \leq 10^{-3} \,. \tag{5.4}$$

Hieraus folgt, daß sich die beiden Protonen im Wasserstoffmolekülion bezüglich der Streuung als unkorrelierte Protonen verhalten, die *unabhängig* voneinander im Kohlenstofftarget gestreut werden. Unter der Annahme, daß sich die kinetische Energie des Molekülions gleichmäßig auf die beiden Protonen verteilt, besitzt ein Proton nach der Streuung unter Vernachlässigung der Energieverluste im Target 1/4 der Energie der gestreuten α–Teilchen.
Abbildung 5.1 zeigt die noch nicht energiekalibrierten Streuspektren von α–Teilchen, die mit 300 kV beschleunigt und unter 20° am Kohlenstofftarget

gestreut wurden. Die Reduzierung des Stromes erfolgte mit einem Steerer, der den Primärstrahl senkrecht nach unten aus der Strahlachse ablenkte, so daß nur noch die Randbereiche des Primärstrahles durch die Blenden B1 und B2 auf das Target trafen. Außerdem ist in der unteren rechten Abbildung der prozentuale Anteil der detektierten α–Teilchen in Abhängigkeit von der Größe des eingestellten Stromes dargestellt.
Wie nach den vorhergehenden Überlegungen erwartet, tritt neben dem α–Peak links im Spektrum ein zweiter Peak auf. Ein Vergleich der ADC–Kanäle, in denen sich die Schwerpunkte der beiden Peaks befinden, zeigt, das diese etwa im Verhältnis 1/4 zueinander stehen. Exakte Berechnungen der Teilchenenergien erfolgen in Kapitel 5.4.2.
Zur experimentellen Kontrolle wurde ein 150 keV–Protonenstrahl, der von einer SO55–Hohlkathodenquelle geliefert wurde, am Kohlenstofftarget gestreut und unter 25° detektiert. Danach wurden He^{++}–Ionen wie in den

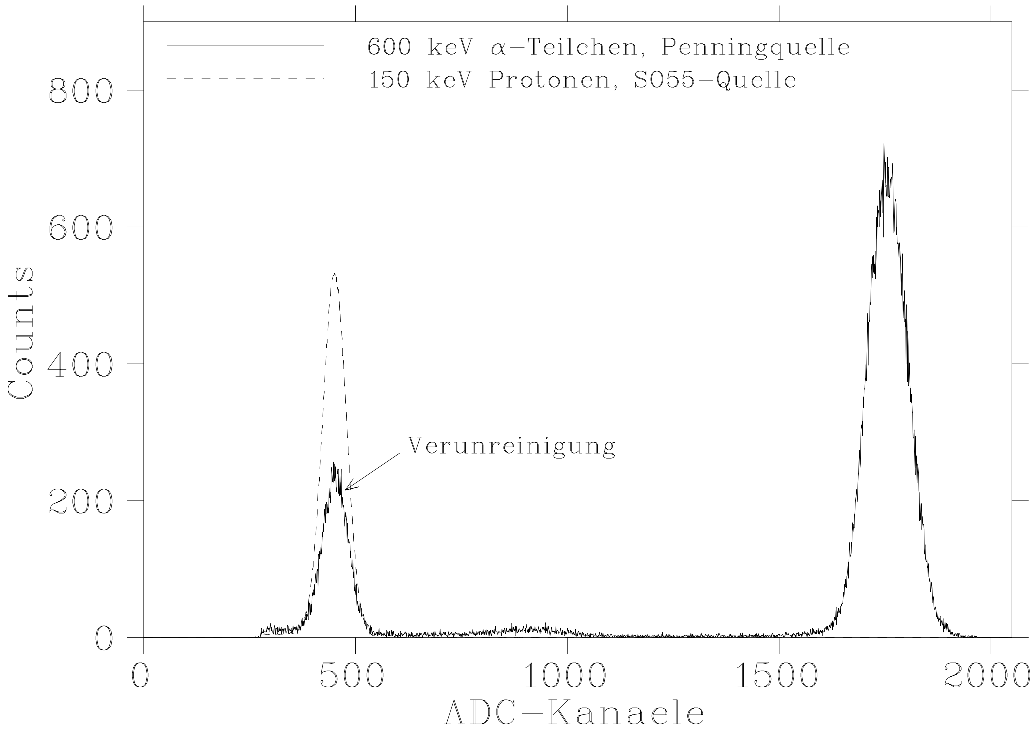

Abbildung 5.2: Vergleich eines He^{++}–Spektrums (U_0=300 kV) mit dem Streuspektrum von Protonen der Einschußenergie 150 keV, die von einer SO55–Quelle geliefert wurden, zur Identifizierung der von den H_2^+–Molekülen herrührenden Verunreinigung im α–Strahl.

Streuspektren aus Abbildung 5.1 mit 300 kV beschleunigt und unter demselben Streuwinkel wie die Protonen am Target gestreut. Bei diesen Experimenten wurde auf gleiche Vakuumbedingungen während der Streuung geachtet, um Peakverschiebungen durch unterschiedliche Energieverluste der Teilchen bei der Streuung an Restgasatomen zu vermeiden. Die Spektren beider Experimente sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Die Bestimmung der Schwerpunkte der Peaks ergab für die Verunreinigung im α–Spektrum die ADC–Kanalnummer 452±1 und für den Protonenpeak die Kanalnummer 450±1. Durch die Übereinstimmung beider Kanalnummern innerhalb der Fehler wurde die Verunreinigung eindeutig als Protonenpeak identifiziert, der von Protonen stammt, deren kinetische Energie ein Viertel der Einschußenergie der α–Teilchen beträgt.
Das Abnehmen des He^{++}–Anteils beim Verstellen des Strahles aus seiner Optimalposition weist auf eine inhomogene Verteilung beider Teilchenarten im Primärstrahl hin (vgl. Abbildung 5.1, Graph rechts unten). Dies bewirkte, daß der Protonenanteil bei den DNA–Bestrahlungen von den momentan eingestellten Beschleuniger– und Quellenparametern abhing.

5.1.2 Strommessung

Der Faraday–Cup ermöglichte aufgrund seiner speziellen Konstruktion (vgl. Abbildung 4.5) die Messung des einlaufenden Primärstromes während der Bestrahlungen. Messungen, bei denen dies erforderlich war (vgl. Kapitel 5.2), wurden nur mit Protonen durchgeführt. Zur Unterdrückung von Sekundärelektronen wurde der Targethalter gegenüber dem Cup mit einer positiven Spannung von 90 V vorgespannt und der Strom am Faraday–Cup abgegriffen. Eine Vergleichsmessung des Primärstromes ohne Streutarget mit einem vorgespannten Cup auf der Strahlachse zeigte, daß der Strom mit der obigen Konfiguration ohne Targetvorspannung zu groß gemessen wurde. Bei Erhöhung der Targetvorspannung von 0 V auf 90 V näherte sich der Meßwert asymptotisch an den Wert der Vergleichsmessung an.
Der für die Strommessung benutzte Integrator gab den gemessenen Stromwert in Form einer Impulsfolge aus, wobei die Pulsfrequenz unabhängig vom eingestellten Meßbereich 10 kHz betrug. Aus der Summe der Counts Σ_C und der Meßzeit $t_{Meß}$ wurde der primäre Strom I_p nach

$$I_p = \frac{\Sigma_C}{10000 \cdot R \cdot t_{Meß}} \tag{5.5}$$

berechnet. Dabei ist R der Betrag des Exponenten, der sich aus der Einstellung des Meßbereichs in 10^{-R} A ergibt. Im Fall eines reinen Protonenstrahles ergibt sich die Gesamtzahl der Protonen n_P, die während $t_{Meß}$ auf das Target geflossen sind, zu

$$n_P = \frac{\Sigma_C}{10000 \cdot R \cdot e} \; . \tag{5.6}$$

Dabei ist e=1.602$\cdot 10^{-19}$ C die Elementarladung.

5.1.3 Elektronik

Die Aufgabe der Auswerteelektronik war, jedes Teilchen, das in den Detektorraumwinkel gestreut wurde, zu registrieren. Dazu mußten die Zählraten, die die Elektronik verarbeiten muß, auf die Totzeit der Elektronik abgestimmt werden. Das hier verwendete Auswertesystem (vgl. Abbildung 4.7) besaß eine Gesamttotzeit von 194 μs. Diese setzte sich zusammen aus der Konversionszeit des CAMAC–ADC (108 μs) und der Totzeit des CAMAC–Auslesezyklus (86 μs) [Wie93]. Innerhalb dieser 194 μs konnte der ADC keine anliegenden Signale verarbeiten. Die wahre Zählrate m wurde über

$$m = \frac{k}{T} \cdot \frac{1}{1 - \left(\frac{k}{T}\right) \tau} \tag{5.7}$$

bestimmt [Leo87]. Dabei ist k die Gesamtzahl der detektierten Counts, T die Meßzeit und τ die Totzeit des Auswertesystems. Die tatsächliche Zahl der in den Detektorraumwinkel gestreuten Teilchen ergab sich durch Multiplikation von m mit der Meßzeit T.

Eine Verringerung der Totzeit wurde durch Reduktion des Detektorraumwinkels gegenüber dem Probenraumwinkel um den Faktor $f_{\Delta\Omega}$=198 erreicht. Die tatsächliche Zahl der Teilchen einer bestimmten Sorte n_T, die während der Bestrahlung die DNA–Probe treffen, berechnet sich nach

$$n_T = 198 \pm 32 \cdot \frac{n_T^{fit}}{1 - \left(\frac{k}{T}\right) \tau} \; . \tag{5.8}$$

Hierbei ist n_T^{fit} die Anzahl der Teilchen, die durch Anpassen einer Gaußfunktion an den entsprechenden Peak im Spektrum bestimmt wurde.

5.2 Aufnahme von Streuspektren

Für die Dosisbestimmung wurden zwei Klassen von Kalibrierungsspektren aufgenommen:

- Streuspektren zur Bestimmung der Targetdicke,
- Streuspektren für die Energiekalibrierung.

Eine genaue Bestimmung der Targetdicke war erforderlich, da diese vom Hersteller nur mit (14±6) μg/cm^2 angegeben werden konnte. Während der Experimente wurden zwei Targets verwendet, die mit Hilfe von Protonenstreuung ausgemessen wurden. Die Protonen hatten Einschußenergien von 100, 150, 230 und 300 keV und wurden unter 25° Streuwinkel detektiert. Parallel dazu wurde der auf das Target treffende Primärstrom gemessen. Die Anzahl der gestreuten Teilchen wurde durch Anpassen einer Gaußfunktion an den Peak der elastisch gestreuten Protonen im aufgenommenen Streuspektrum bestimmt. Dazu stand das Fitprogramm FIT vom IKP Darmstadt [Str93] zur Verfügung.
Zur genauen Bestimmung der effektiven Energie der gestreuten Teilchen wurde eine Energiekalibrierung durchgeführt, die auf der Berechnung der Energieverluste der α–Teilchen im Kohlenstofftarget beruhte. Eine direkte Eichung des ADC mit den ungestreuten Teilchen war aufgrund des hohen Primärstromes nicht möglich (vgl. Kapitel 4). Für die Energiekalibrierung wurden α–Teilchen mit Einschußenergien von 200, 400 und 600 keV am Kohlenstofftarget gestreut und unter 25° detektiert.

5.3 DNA–Bestrahlung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmid–DNA–Proben sowohl mit α–Teilchen als auch mit Protonen bestrahlt. Letzteres war erforderlich, um den Effekt der gestreuten Protonen abschätzen zu können. Wie bei allen vorhergehenden Experimenten, fanden die Bestrahlungen unter einem Streuwinkel von 25° statt. Zur Bestimmung der in der DNA–Probe deponierten Dosis wurde während jeder Probenbestrahlung ein Streuspektrum aufgenommen. Die Bestrahlungszeiten betrugen maximal 40 min.
Die Trägerplättchen, auf denen sich die Plasmid–Proben befanden, wurden erst kurz vor der Bestrahlung aus dem Exikkator entnommen und in

den Probenhalter geschoben (vgl. auch Abbildung 4.6 in Kapitel 4.2). Dazu mußte die Kammer vor bzw. nach jeder Bestrahlung belüftet und wieder evakuiert werden. Während einer Bestrahlungsserie wurde der Primärstrahl nur mit Hilfe des Magnetschiebers gesteuert.

5.4 Auswertung der Streuspektren

5.4.1 Bestimmung der Targetdicke

Eine Beziehung für die Massenbelegung μ des Streutargets kann unter Verwendung der Definition für den differentiellen Wirkungsquerschnitt

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_\theta \equiv \frac{\dot{N}}{\dot{N}_0 \cdot n_T \cdot \Delta\Omega} \tag{5.9}$$

hergeleitet werden [May92]. Dabei ist $\dot{N}$ die Zahl der in das Raumwinkelelement $\Delta\Omega$ gestreuten Teilchen pro s, $\dot{N}_0$ der einfallende Teilchenstrom, n_T die Zahl der Targetkerne pro Fläche und $\Delta\Omega$ das Raumwinkelelement.
Wird n_T durch die Massenbelegung μ und die Molmasse M des Streutargets ersetzt,

$$n_T = \frac{\mu \cdot N_A}{M}, \tag{5.10}$$

erhält man für μ in μg/cm^2

$$\mu = 10^{27} \cdot \frac{N}{N_0} \cdot \frac{M}{N_A \cdot \Delta\Omega} \cdot \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_\theta^{-1} . \tag{5.11}$$

Dabei ist $N_A = 6.022 \cdot 10^{23}$ die Loschmidtzahl und $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_\theta$ der differentielle Wirkungsquerschnitt in mbarn. N bzw. N_0 sind hier die Teilchenzahlen.
α–Teilchen mit Energien bis max. 600 keV bzw. Protonen der halben Energie haben bei der Streuung an Kohlenstoffkernen unter 25° Stoßparameter $\geq$ 65 fm (vgl. Tabelle 5.3). Bei diesen Abständen spielen die Kernkräfte, die ein Maximum bei etwa 1 fm haben, im Verhältnis zu den Coulombkräften keine Rolle [May92]. Die Streuung der Teilchen erfolgt daher aufgrund reiner Coulomb–Wechselwirkung. Da es sich bei den Protonen, die kinetische Energien von max. 300 keV haben, wegen

$$\beta = \sqrt{\frac{2\,E_{kin}}{mc^2}} \leq 2.5 \cdot 10^{-2} \ll 1 \tag{5.12}$$

um nichtrelativistische Teilchen handelt (mc^2=983.3 MeV Ruhemasse des Protons [Att68]), kann der differentielle Wirkungsquerschnitt in Gleichung 5.11 durch den Rutherford–Wirkungsquerschnitt der Teilchen

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\theta}^{RUTH} = 1.296 \cdot \left(\frac{Z_1 \cdot Z_2}{E_0}\right)^2 \cdot sin^{-4}\left(\frac{\theta}{2}\right) \tag{5.13}$$

beschrieben werden [May92]. Dabei ist Z_1 die Kernladung des einfliegenden Teilchens, Z_2 die Kernladung der Targetatome und θ der Streuwinkel. Gleichung 5.13 liefert den Wirkungsquerschnitt in mbarn.

Beim Durchlaufen des Targets haben die Teilchen einen Gesamtenergieverlust, der etwa 10% ihrer Einschußenergie beträgt (vgl. Kapitel 5.4.2). Da die kinetische Energie der Teilchen in den Rutherford–Wirkungsquerschnitt quadratisch eingeht, würde dieser zu einem systematischen Fehler von ca. 20% führen, falls die Teilchenenergie nicht korrigiert wird. Um die systematischen Fehler bei der Berechnung des Rutherford–Wirkungsquerschnitts zu minimieren, wurde angenommen, daß der *Stoß auf halber Targetdicke* stattfindet. Voraussetzung dafür ist, daß der Energieverlust der α–Teilchen in den für die Experimente verwandten Targets mit Schichtdicken bis 20 μg/cm^2 in guter Näherung linear von der Schichtdicke abhängt. Abbildung 5.3 zeigt, daß diese Voraussetzung erfüllt ist. Unter der obigen Annahme wird daher die mittlere Energie der Teilchen am Stoßvertex berechnet. Das Blockdiagramm des Algorithmus zur Berechnung der Targetdicke ist in Abbildung 5.4 gezeigt.

Zunächst wurde der Rutherford–Wirkungsquerschnitt der Teilchen in Abhängigkeit von der Einschußenergie E_0 berechnet und damit die Targetdicke μ nach Gleichung 5.11. Dann wurde die Energie E berechnet, die die Teilchen nach Durchdringen der *halben Targetdicke* besitzen, und damit der Wirkungsquerschnitt neu berechnet. Dieser diente zur Berechnung der modifizierten Targetdicke μ', die mit der zuvor berechneten Dicke μ verglichen wurde. Stimmten die beiden Targetdicken innerhalb einer vorgegebenen Genauigkeit überein, wurde die Berechnung beendet, andernfalls erfolgte eine weitere Modifikation des Wirkungsquerschnitts. Für die gemessenen Target-

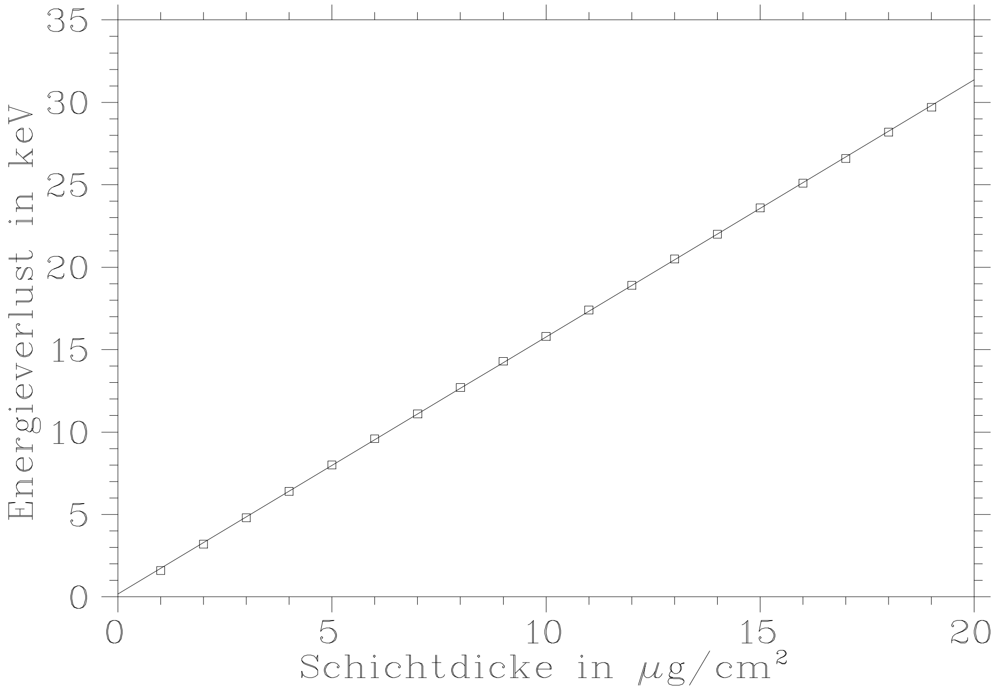

Abbildung 5.3: Energieverlust von 200 keV α−Teilchen im Kohlenstofftarget in Abhängigkeit von der Schichtdicke berechnet mit ASTAR (vgl. Kapitel 5.4.2).

---

dicken ergab sich eine Konvergenz nach 4 Iterationsschritten.
Die Meßfehler bei der Bestimmung der Targetdicke wurden in Fehlerrechnung erster Ordnung berücksichtigt

$$\Delta f = \sum_{i=1}^{n} \left| \frac{\partial f}{\partial x_i} \right| \Delta x_i \, . \tag{5.14}$$

Dabei handelt es sich bei Δf um den Absolutfehler der berechneten Größe f, die von den Meßgrößen x_i abhängig ist. Δx_i sind die Absolutfehler der Meßgrößen. In Anhang B sind die Meßergebnisse die berechneten Targetdicken aufgelistet.
Für beide Targets ergab sich eine Massenbelegung von 18.6±2.4 μg/cm^2.

5.4.2 Energiekalibrierung

Der Gesamtenergieverlust der Teilchen im Target setzt sich aus drei Beiträgen zusammen:

1. Energieverlust durch Ionisation **vor** dem Stoß ($\Delta E'$),

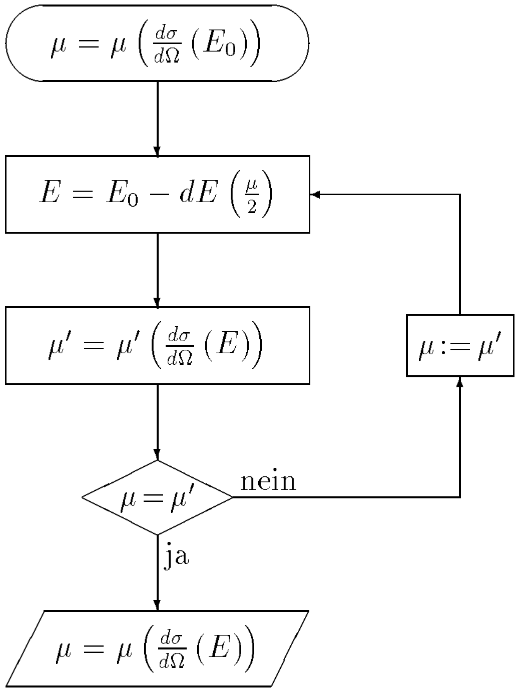

Abbildung 5.4: Algorithmus zur iterativen Berechnung der Targetdicke μ mittels Modifikation des Rutherford–Wirkungsquerschnitts.

2. Impulsübertrag an den Rückstoßkern (ΔE_r),

3. Energieverlust durch Ionisation **nach** dem Stoß ($\Delta E''$).

In Abbildung 5.5 ist die Aufteilung der Energieverluste im Target graphisch dargestellt. Für die effektive Energie E_{eff} der Teilchen nach der Streuung gilt

$$E_{eff} = E_0 - dE'(E_0, \mu_1) - dE_r(E_0 - dE_1) - dE''(E_0 - dE_1 - dE_r, \mu_2) \ . \quad (5.15)$$

Dabei sind $\mu_1 = \mu/2$ und $\mu_2 = \mu/cos\theta$ die den Wegstrecken vor bzw. nach dem Stoß entsprechenden Targetdicken.
Die Berechnung der Energieverluste durch Ionisationsbremsung erfolgte mit Hilfe des Computercodes ASTAR [Ber92]. Der Energieverlust eines Teilchens in einer Kohlenstoffschicht der Dicke μ ergab sich durch Multiplikation

des dichtenormierten differentiellen Energieverlustes mit der Schichtdicke in $\mu g/cm^2$. Da nicht davon ausgegangen werden konnte, daß dieser über die Targetdicken μ_1, bzw. μ_2 konstant war, wurde die jeweilige Schicht in n Einzelschichten zerlegt und der Energieverlust sukzessive für jede Schicht berechnet. Dabei wurde n so groß gewählt, daß der Gesamtenergieverlust asymptotisch konvergierte (vgl. Kapitel 5.4.3).
Der Energieverlust durch elastischen Kernstoß ΔE_r wurde aus der Impuls– und Energieerhaltung der elastischen Streuung zweier Teilchen hergeleitet. Für die Energie E_T eines Teilchen der Masse m nach dem elastischen Stoß am Kern der Masse M gilt

$$E_T = E_0 \cdot \frac{a}{4} \cdot k \cdot \left(cos\,\theta + \left[k^{-2} - sin^2\theta \right]^{\frac{1}{2}} \right)^2 , \tag{5.16}$$

mit

$$a = \frac{4mM}{(m+M)^2} \quad \text{und} \quad k = \frac{m}{M} . \tag{5.17}$$

Aus den unter 25° aufgenommenen Spektren wurden die ADC–Kanalnummern (ch) bestimmt, in denen sich die Schwerpunkte der Peaks

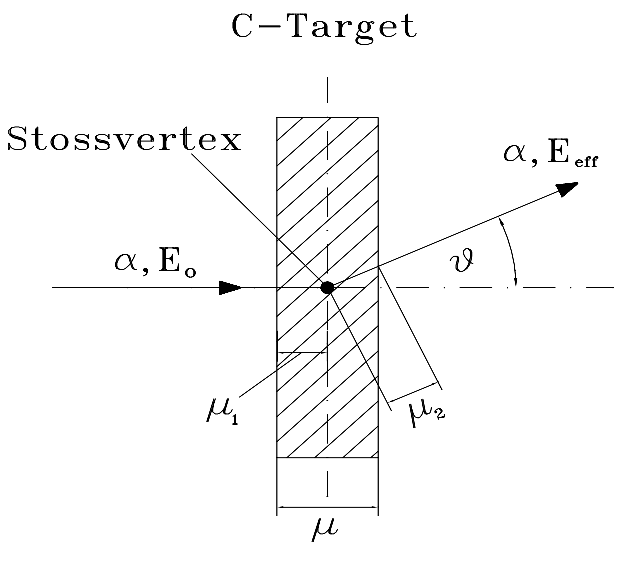

Abbildung 5.5: Schematische Zeichnung zur Aufteilung der Energieverluste der Teilchen im Kohlenstofftarget. μ bezeichnet die gesamte Targetdicke, E_0 ist die Einschußenergie der Teilchen, E_{eff} ist die Energie der Teilchen nach der Streuung.

befanden. Tabelle 5.4 zeigt die Ergebnisse der Energieeichung. Eine Auflistung aller berechneten Energieverluste ist in Anhang C zu finden.
Abbildung 5.6 zeigt die vom ADC aufgenommenen Spektren. Durch lineare Regression mit Hilfe des Auswerteprogramms PHYSICA [Chu94] wurde aus den Schwerpunkten der Peaks und den dazugehörigen effektiven Energien die Energiekalibrierung

$$E^{\alpha}_{eff} = (0.284 \pm 0.001) \cdot ch + (19.2 \pm 1.8)\ keV \tag{5.18}$$

bestimmt. Die angegebenen Fehler sind die absoluten Ungenauigkeiten der Parameter des Fits.
Bei den DNA–Bestrahlungen sind die Fehler der Teilchenenergien nicht durch die Ungenauigkeit der Schwerpunkte der Peaks bestimmt, sondern durch die Hälfte ihrer vollen Halbwertsbreite FWHM. Abbildung 5.7 zeigt die Eichgerade für die effektiven Energien der α–Teilchen in Abhängigkeit von der ADC–Kanalzahl des Schwerpunkts des Peaks.

E_0 in keV	Schwerpunkt	E_{eff} in keV	FWHM in keV
200	491	158.4	23.6
400	1138	340.6	29.1
600	1729	527.7	35.1

Tabelle 5.4: Ergebnisse der Energiekalibrierung mit 200, 400 und 600 keV α–Teilchen, die unter 25° am Kohlenstofftarget gestreut wurden.

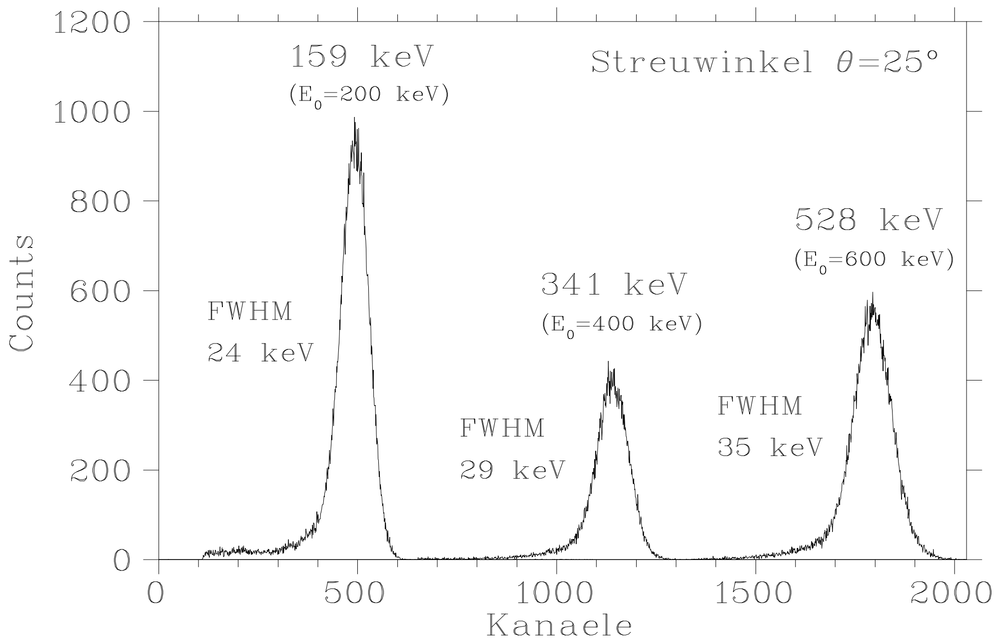

Abbildung 5.6: ADC–Spektrum von α–Teilchen mit drei verschiedenen Einschußenergien E_0. Zusätzlich angegeben sind die nach Gleichung 5.15 berechneten effektiven Energien der Teilchen nach der Streuung sowie die vollen Halbwertsbreiten der Peaks.

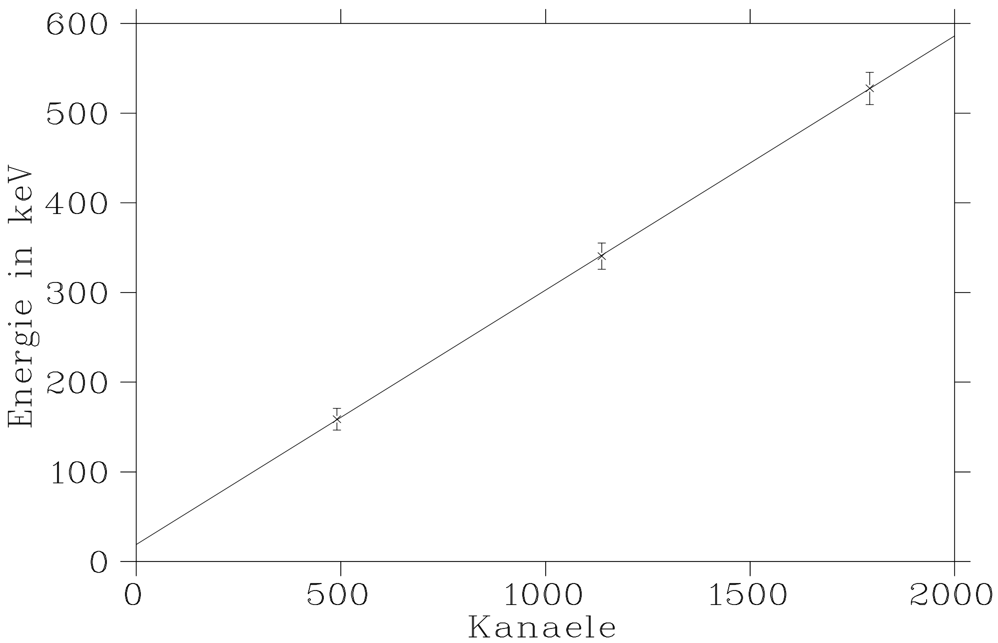

Abbildung 5.7: Eichgerade für die α–Teilchen. Die Fehler ergeben sich aus den Halbwertsbreiten der Peaks.

5.4.3 Dosisbestimmung

Die Dosis D ist definiert als der Mittelwert der pro Masseneinheit Δm absorbierten Energie $\overline{\Delta E_{abs}}$ [Kie89]

$$D = \frac{\overline{\Delta E_{abs}}}{\Delta m} \, . \tag{5.19}$$

Ihre Einheit ist das Gray, wobei gilt

$$1\, Gy = 1\, \frac{J}{kg} \; = \; 6.24 \cdot 10^9 \, \frac{eV}{\mu g} \, . \tag{5.20}$$

Die mittlere pro Masseneinheit absorbierte Energie ist das Produkt aus der Anzahl n_T der Teilchen, die in die Probe eingedrungen sind, und die mittlere pro Teilchen auf die Probenmasse übertragene Energie ΔE_T. Eine mögliche Verminderung von ΔE_T durch die Produktion geladener Sekundärteilchen, die die Probe verlassen, wurde vernachlässigt.
Die in der Probenmasse pro Teilchen deponierte Energie wurde wie der Energieverlust im Streutarget durch Zerlegung der Probenschicht in n Einzelschichten berechnet. Die Probe war ein kristalliner Salzfilm, in dem die DNA–Moleküle statistisch eingebaut waren (vgl. Kapitel 3.5.1). Aus diesem Grund erfolgte eine weitere Zerlegung der Einzelschichten in jeweils eine DNA–, eine Tris– und eine EDTA–Schicht (vgl. Abbildung 5.8). Die Dicke der Einzelschichten wurde so gewählt, daß der Energieverlust der Teilchen über die Schichtdicke konstant war. Dazu wurde n so lange variiert, bis der

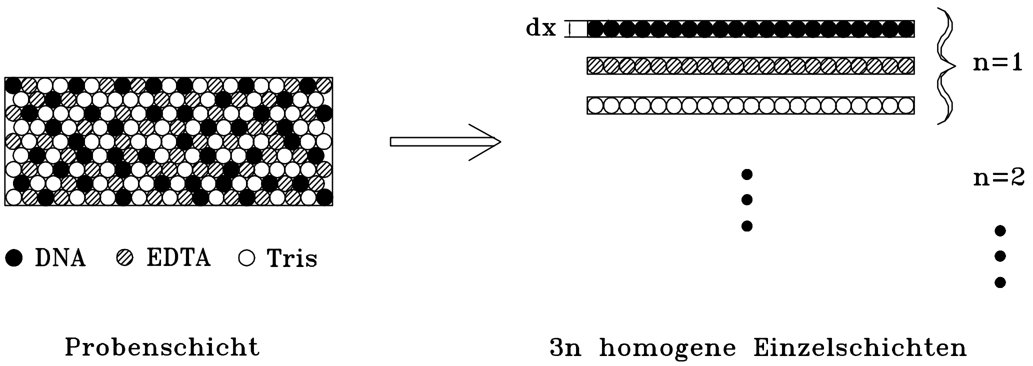

Abbildung 5.8: Aufteilung der Probenschicht in 3n–Einzelschichten zur Berechnung der von den DNA–Molekülen absorbierten Energie.

Gesamtenergieverlust der Teilchen in der Probe asymptotisch konvergierte (vgl. Abbildung 5.9). Dies geschah bei n≈20.
Der Energieverlust eines Teilchens in diesen 3n Schichten ergab sich als Summe der Energieverluste in den einzelnen Schichten, die sukzessive berechnet wurden. Dabei wurde die Energie des Teilchens vor der Berechnung des Energieverlustes in der folgenden Schicht um den Energieverlust in der vorhergehenden korrigiert. Die an die DNA–Moleküle pro Teilchen übertragene Energie ergibt sich somit zu

$$\Delta E_T = \sum_{i=1}^{n} \Delta E_T^i \ , \tag{5.21}$$

mit

$$\Delta E_T^i \equiv \left(\frac{dE}{\rho dx}\right)_i \cdot \rho dx \tag{5.22}$$

in i-ter DNA–Schicht deponierte Energie. Damit ergibt sich für die während einer Bestrahlung applizierte Dosis D

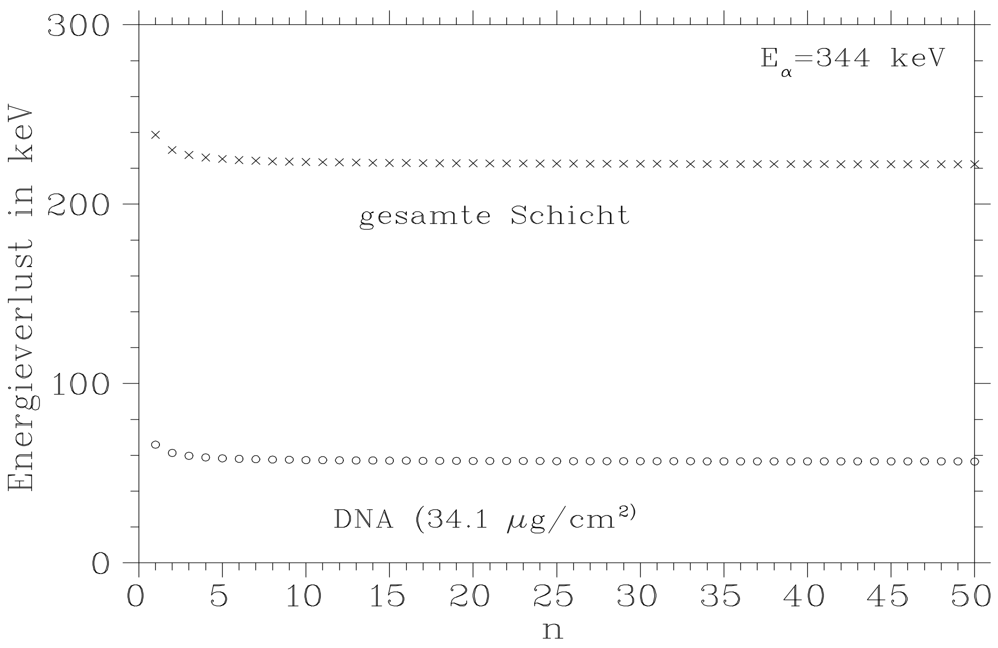

Abbildung 5.9: Energieverlust von 343 keV α–Teilchen in der Probenschicht in Abhängigkeit von der Anzahl n der Schichten.

$$D = 1.602 \cdot 10^{-10} \, \frac{\Delta E_T \cdot n_T}{\Delta m} \, Gy \; , \tag{5.23}$$

wobei ΔE_T in eV und Δm in μg einzusetzen sind. n_T ist die nach Gleichung 5.8 berechnete Gesamtzahl der in die DNA–Probe implantierten Teilchen. Der Dosisfehler ergab sich als Summe der relativen Fehler des Raumwinkelfaktors $f_{\Delta\Omega}$, der Teilchenzahl n_T^{fit} aus dem Fit, der pro Teilchen deponierten Energie ΔE_T und der Probenmasse Δm.
Die Berechnung der Stopping–Power $\frac{dE}{\rho dx}$ von α-Teilchen in Verbindungen erfolgte nach der Bragg'schen Additionsregel

$$\left(\frac{dE}{\rho dx}\right) = \sum_j \epsilon_j \left(\frac{dE}{\rho dx}\right)_j \quad . \tag{5.24}$$

Dabei ist ϵ_j der Gewichtsanteil des j–ten Elementes in der Verbindung und $\left(\frac{dE}{\rho dx}\right)_j$ die Stopping–Power der Teilchen im j–ten Element. Letztere wurden mit dem Computercode ASTAR [Ber92] berechnet.

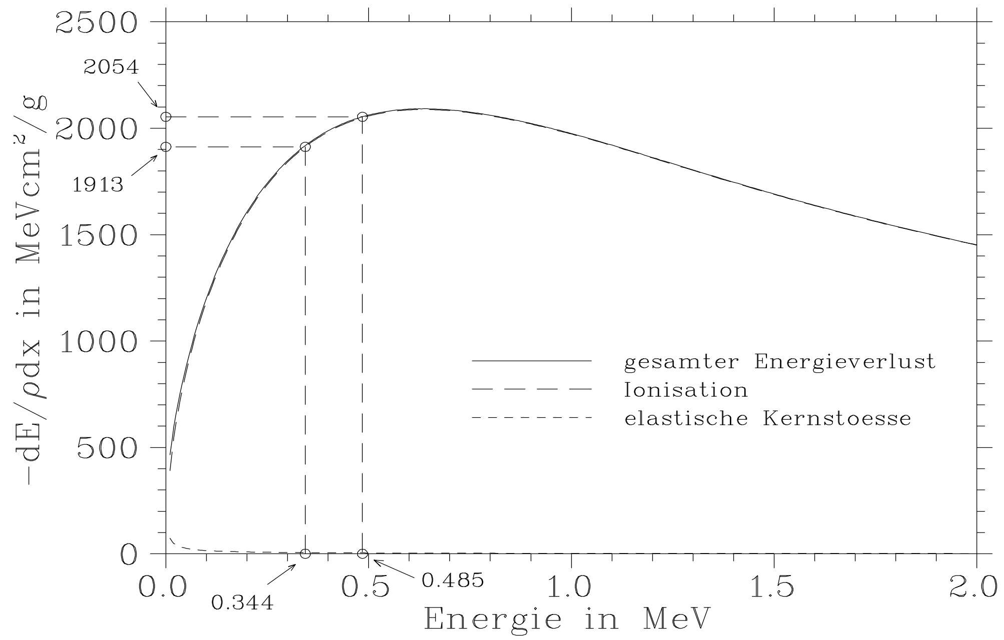

Abbildung 5.10: Massenormierter differentieller Energieverlust von α–Teilchen in DNA in Abhängigkeit von der Teilchenenergie. Aufgetragen ist der Energieverlust durch Ionisationsbremsung, der Verlust durch elastische Kernstöße und die Summe beider Energieverluste.

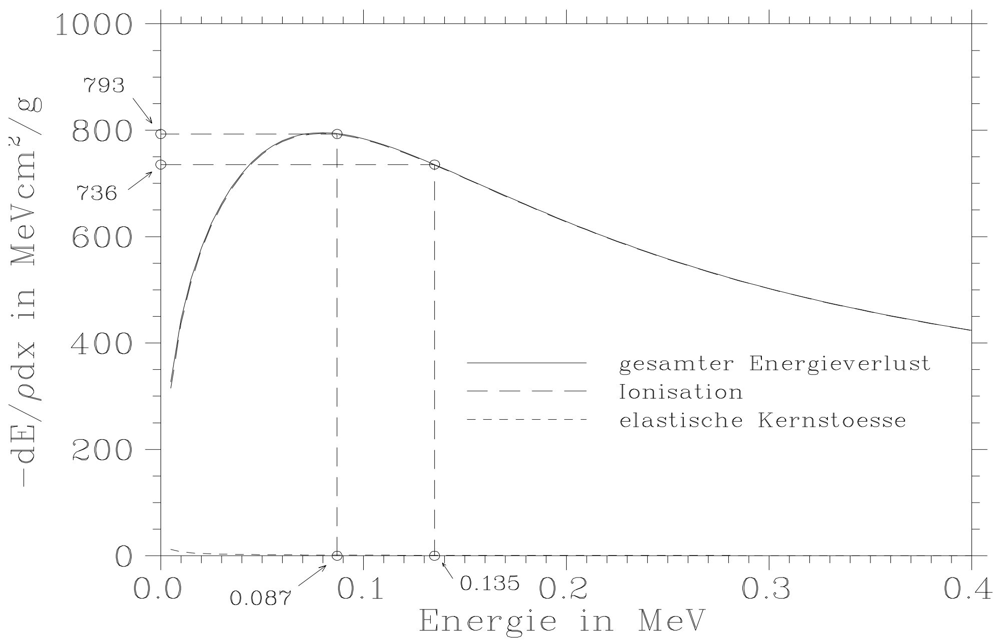

Abbildung 5.11: Massenormierter differentieller Energieverlust von Protonen in DNA in Abhängigkeit von der Teilchenenergie. Aufgetragen ist der Energieverlust durch Ionisationsbremsung, der Verlust durch elastische Kernstöße und die Summe beider Energieverluste.

Abbildung 5.10 zeigt den massenormierten differentiellen Energieverlust von α–Teilchen in DNA, die nach diesem Verfahren berechnet wurde. Gut zu erkennen ist, daß die Teilchen ihre Energie fast ausschließlich durch Wechselwirkung mit den Elektronen an die DNA–Moleküle abgeben. Erst bei Teilchenenergien $\leq$ 120 keV ist der Anteil durch elastische Kernstöße größer als 1%. Zusätzlich dargestellt sind die effektiven Energien der zur Bestrahlung verwandten α–Teilchen, sowie die dazugehörige Stopping–Power der Teilchen in der DNA. Die Graphik zeigt, daß die Bestrahlungsenergien von 344 keV und 485 keV auf bzw. kurz unterhalb des Bragg–Maximums liegen. In Abbildung 5.11 sind die mit ASTAR ermittelten Ergebisse für Protonen dargestellt. Hier liegen die Bestrahlungsenergien von 87 keV und 135 keV im bzw. kurz vor dem Bragg–Maximum.

6. Auswertung der Plasmid–Bestrahlungen

Die Auswertung der Bestrahlungen, deren Ziel die Bestimmung der $\frac{ESB}{DSB}$–Verhältnisse für α–Teilchen mit Energien im Bragg–Maximum ist, beinhaltet folgendene Punkte:

- Bestimmung der Zu– bzw. Abnahmen der drei topoisomeren DNA–Formen mit der Bestrahlungsdosis,
- Berechnung der induzierten ESB und DSB pro Plasmid–Molekül,
- Ermittlung der $\frac{ESB}{DSB}$–Verhältnisse,
- Berechnung der mittleren pro Strangbruch–Ereignis übertragenen Energie,
- Bestimmung der G–Werte für die Induktion von ESB und DSB.

6.1 Bestrahlungs–Übersicht

Tabelle 6.1 gibt einen Überblick über die vier erfolgten Plasmid–Bestrahlungen mit α–Teilchen und Protonen. Für jede Bestrahlung sind die Energie der beschleunigten Ionen E_0^{Ion}, die effektiven Energien der gestreuten α–Teilchen und Protonen E_{eff}, der Anteil der gestreuten Protonen, die Masse der Plasmid–DNA–Probe m_{DNA} und die pro Teilchen in

E_0^{Ion}	E_{eff} in keV		%	m_{DNA}	dE_{DNA} in keV	
	α	p	p	in μg	α	p
600 keV He^{++}	485±20	127±10	29	2.3±0.1	50.2±0.6	19.5±1.5
400 keV He^{++}	344±14	86±10	4.9	3.0±0.1	56.4±1.3	27.1±0.2
150 keV p	/	135±10	100	2.3±0.1	/	19.1±0.4
100 keV p	/	87±10	100	2.3±0.1	/	20.6±0.2

Tabelle 6.1: Übersicht über die Plasmid–Bestrahlungen.

der Plasmid–DNA deponierte Energie dE_{DNA} angegeben. Mit Ausnahme der DNA–Massenbelegung sind alle Werte über die pro Bestrahlungsserie erfolgten Einzelbestrahlungen gemittelt.

6.2 Laserdensitometrische Analyse der bestrahlten DNA

Die bestrahlten DNA–Proben wurden wie in Kapitel 3.4 beschrieben analysiert und laserdensitometrisch ausgewertet. Abbildung 6.1 zeigt exemplarisch für die Bestrahlung mit 344 keV α–Teilchen ein Foto der drei aufgetrennten Plasmid–DNA Fraktionen. Pro verwendeter Dosis wurden jeweils zwei bestrahlte Proben und eine Nullprobe analysiert. Tabelle 6.2 gibt einen Überblick über die applizierten Dosen.

Die einzelnen DNA–Fraktionen sind in Abbildung 6.1 als scharfe, sich nicht überlappende Banden zu erkennen. Außerdem sieht man eine Zunahme der Fraktion der linearen Moleküle (lin) mit steigender Dosis. Bei den beiden höchsten Bestrahlungsdosen (268 Gy und 352 Gy) ist auch die Zunahme der offenzirkularen DNA–Fraktion gegenüber den Nullproben zu erkennen. Veränderungen der superzirkularen Form sind aufgrund der kleinen absoluten Abnahmen nur mit dem Laserdensitometer nachweisbar. Die Auswertung der Banden mit dem Laserdensitometer zeigt Abbildung 6.2. Für drei verschiedene Bestrahlungsdosen sind die in den Banden enthaltenen relativen DNA–Mengen in Abhängigkeit von der zurückgelegten Laufstrecke der jeweiligen DNA–Form dargestellt. Die relativen DNA–Mengen sind proportional zur Fläche der Peaks (vgl. Kapitel 3.4.3). Man erkennt sowohl die Abnahme der superzirkularen–Plasmide als auch die Zunahme der linearen– und offenzirkularen–Formen mit steigender Dosis. Die Ergebnisse der einzelnen bestrahlten Proben inclusive der Bestrahlungsdosen sind in Anhang D aufgelistet.

Abbildung 6.3 zeigt die Veränderungen der drei Plasmid–Formen in

Slot–Nr.	1, 2	4, 5	7, 8	10, 11	13, 14	3, 6, 9, 12, 15
Dosis/Gy	42±9	87±19	171±38	268±59	352±78	Nullproben

Tabelle 6.2: Bestrahlungsdosen der 344 keV α–Bestrahlung.

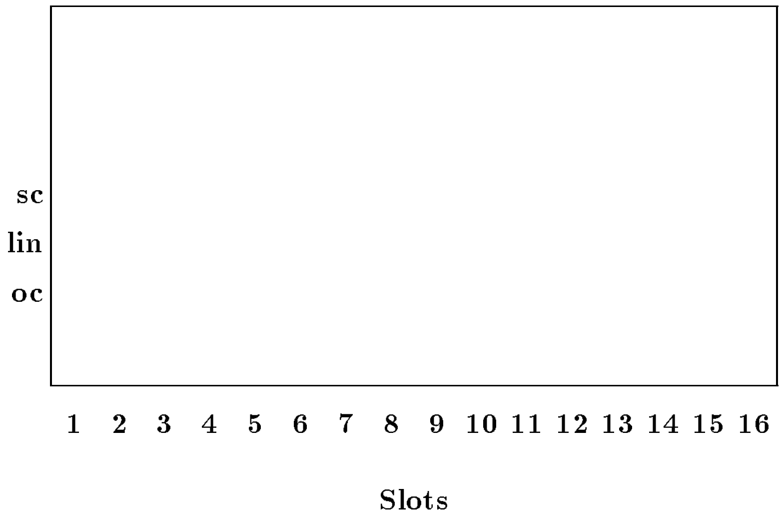

Abbildung 6.1: Gelelektrophoretische Analyse der mit 344keV α–Teilchen bestrahlten Plasmid–Proben. Jede Bestrahlung bestand aus zwei bestrahlten Proben und einer zugehörigen Nullprobe (NP).

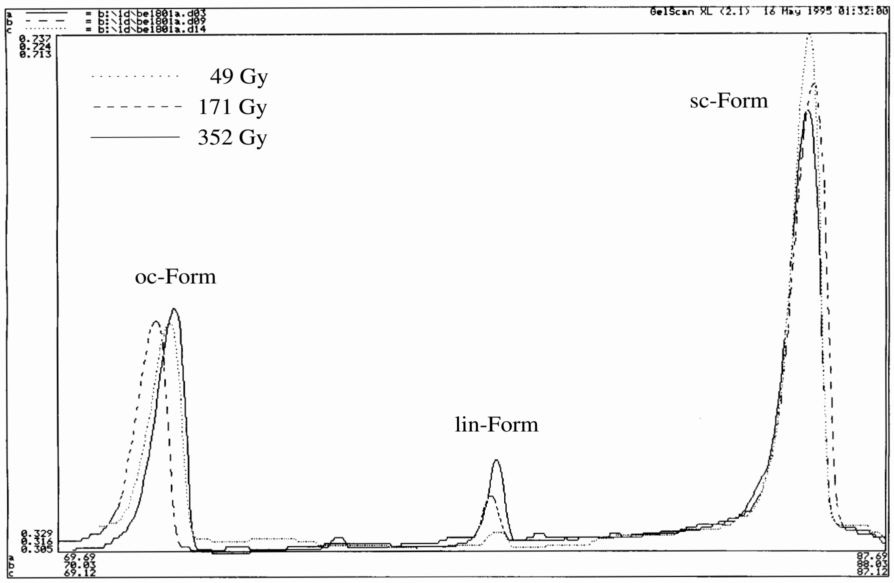

Abbildung 6.2: Laserdensitometrische Auswertung der Plattennegative der 344 keV α–Bestrahlung. Dargestellt ist der Intensitätsverlauf entlang der Laufstrecke der Plasmid–DNA für drei verschiedene Bestrahlungsdosen. Die Peakflächen sind proportional zur DNA–Menge in den Banden.

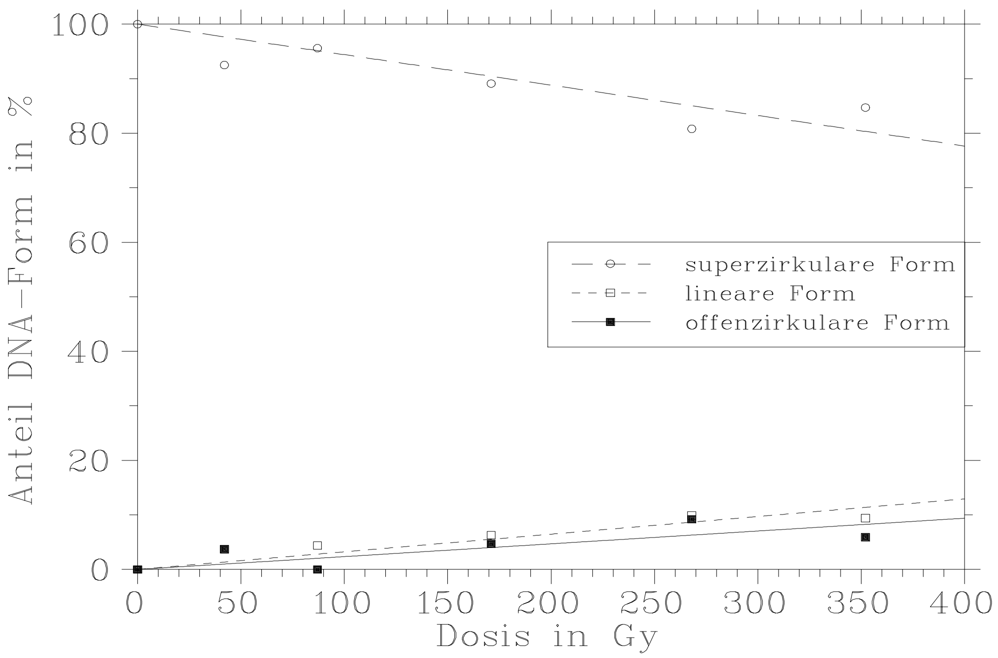

Abbildung 6.3: Ab– bzw. Zunahme der DNA–Formen mit der Dosis nach Bestrahlung mit 344 keV α–Teilchen.

Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Eine Ausgleichsgerade durch die experimentell ermittelten Werte ist ebenfalls angegeben. Man erkennt, daß selbst bei hohen Dosen von etwa 350 bis 400 Gy nur ein Verlust von ca. 20% an superzirkularer Plasmide–DNA entstanden ist, wobei die offenzirkulare und die lineare Form in etwa gleichen Anteilen zunimmt. Die Bedeutung der hohen Dosen wird in Kapitel 6.5 erläutert.

6.3 Berechnung der induzierten Strangbrüche

Aus den Fraktionen der drei nach den Bestrahlungen vorhandenen Plasmid–Formen wurde nach der in Kapitel 3.6 beschriebenen Methode die Anzahl der pro Plasmidmolekül induzierten ESB und DSB berechnet. In den Abbildungen 6.4 und 6.6 sind diese für die 344 keV und die 485 keV α–Bestrahlungen gegen die Dosis aufgetragen. In den Abbildungen 6.5 und 6.7 sind die dazugehörigen Energiespektren der α–Teilchen und Protonen dargestellt. Bei der 344 keV α–Bestrahlung betrug die Energieauflösung der α–Teilchen $\Delta E/E_{eff}$=8.1·10^{-2}, bei den 485 keV α–Teilchen 8.2·10^{-2}. Die großen Fehler

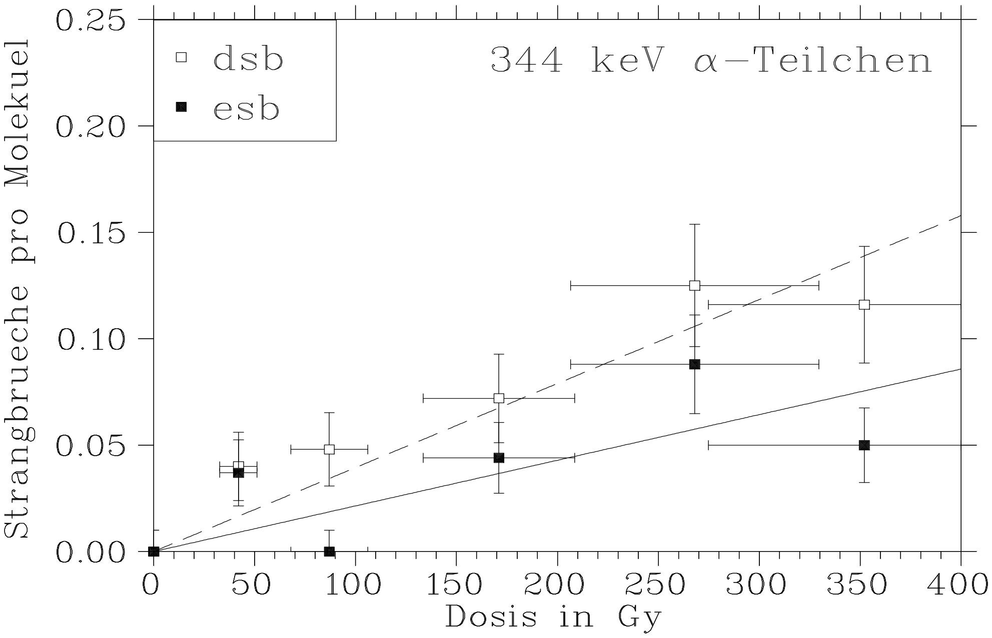

Abbildung 6.4: Anzahl der ESB und DSB in Abhängigkeit von der applizierten Dosis nach Bestrahlung mit 344 keV α–Teilchen (- - DSB, — ESB, Protonenanteil 4.9%).

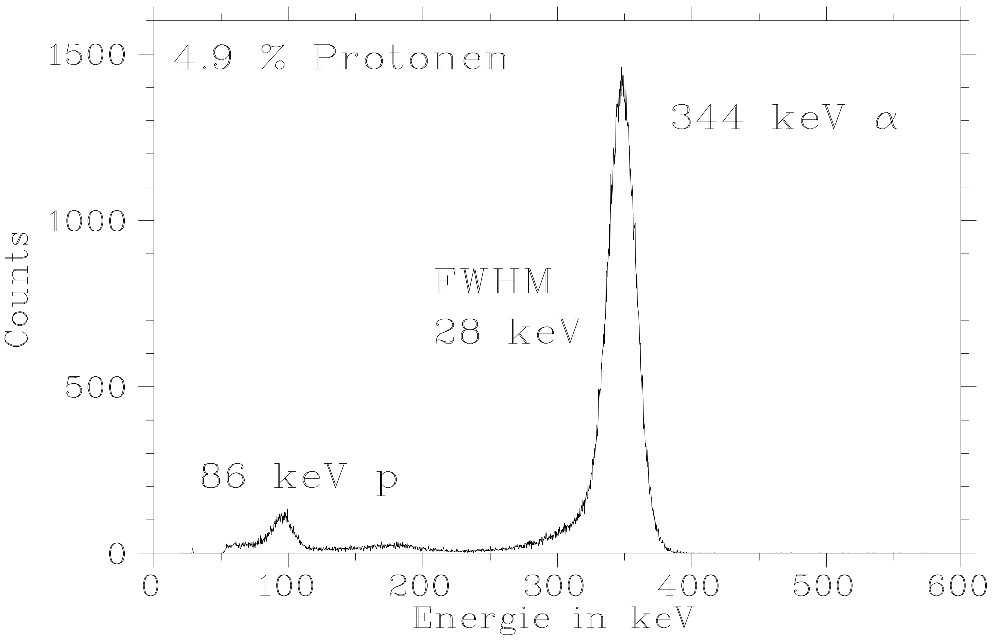

Abbildung 6.5: Energiespektrum der 344 keV α–Bestrahlung.

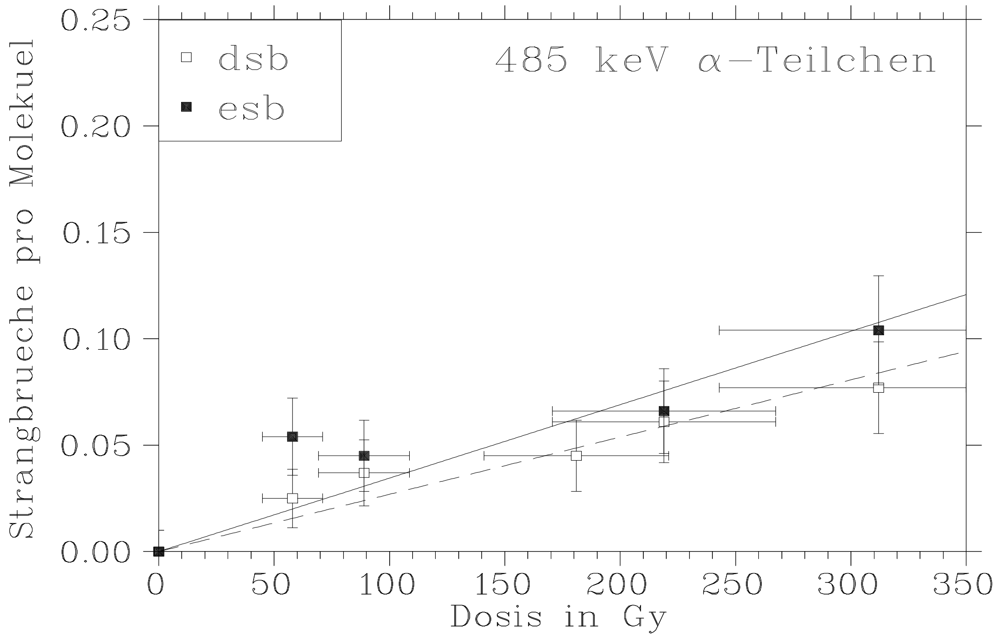

Abbildung 6.6: Anzahl der ESB und DSB in Abhängigkeit von der applizierten Dosis nach Bestrahlung mit 485 keV α–Teilchen (- - DSB, — ESB, Protonenanteil 29%).

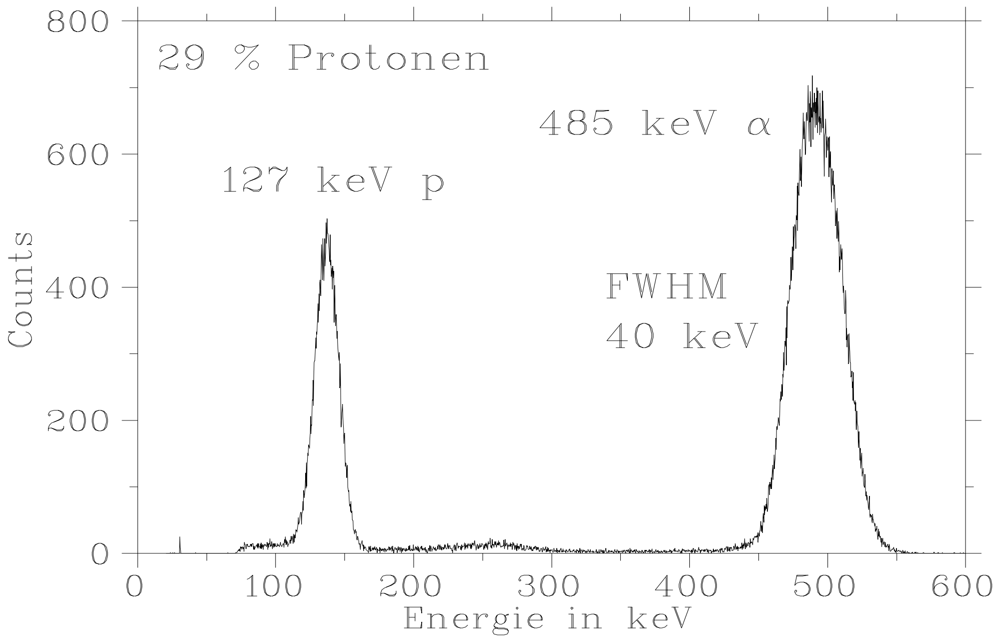

Abbildung 6.7: Energiespektrum der 485 keV α–Bestrahlung.

der Bestrahlungsdosen stammen hauptsächlich aus dem Umrechnungsfaktor $f_{\Delta\Omega}$ für die Raumwinkel von Probe und Detektor (vgl. Kapitel 5.1.3). Obwohl die einzelnen Werte der Strangbrüche fluktuieren, wurde angenommen, daß die ESB und DSB linear mit der Dosis korreliert sind, und durch die erhaltenen Meßpunkte mit Hilfe linearer Regression eine Ausgleichsgerade gelegt.

Auffällig sind die gegensätzlichen Verhältnisse von ESB zu DSB bei den beiden Bestrahlungen. Im Fall der 347 keV α–Teilchen treten bei einer bestimmten Dosis etwa doppelt so viele DSB wie ESB auf, im Fall der 485 keV α–Teilchen ist die Anzahl der DSB bei einer festen Dosis kleiner als die der ESB. Zur Klärung dieses zunächst unverständlichen Resultates war es erforderlich, den Effekt der Protonen zu untersuchen, die bei den Bestrahlungen zu unterschiedlichen Anteilen vorlagen. Zu diesem Zweck erfolgten die in Tabelle 6.1 aufgeführten Kontrollbestrahlungen mit 'reinen' Protonen. Die kinetische Energie der Protonen wurde dabei so gewählt, daß sie die Hälfte der bei den α–Bestrahlungen mitbeschleunigten H_2^+–Molekülionen betrug (vgl. Kapitel 5.1.1). Damit hatten die Protonen der Kontrollbestrahlungen die gleichen effektiven Energien wie die in den α–Spektren. Die Ergebnisse

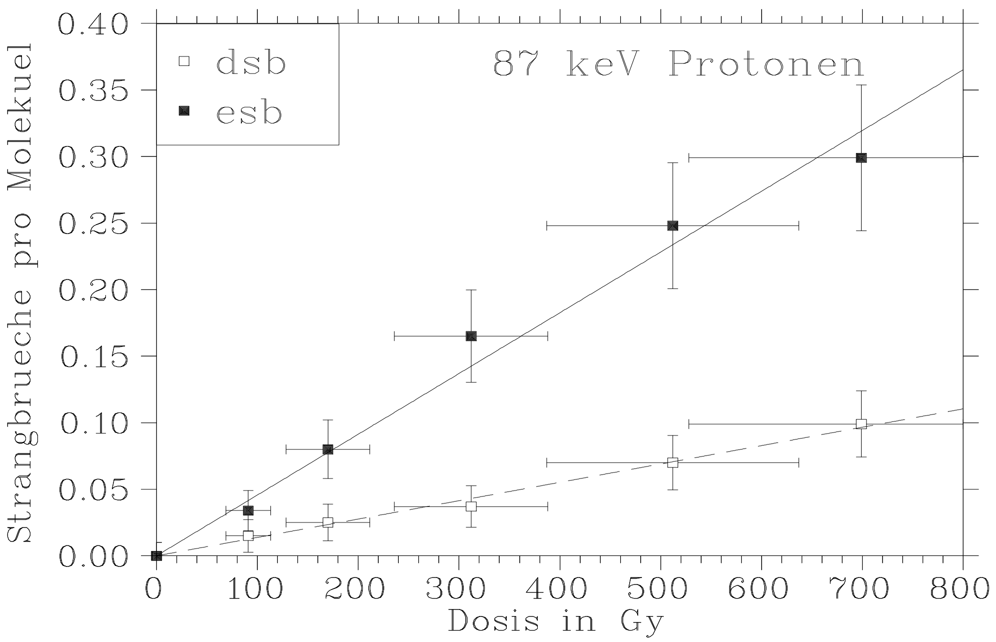

Abbildung 6.8: Anzahl der ESB und DSB in Abhängigkeit von der applizierten Dosis nach Bestrahlung mit 87 keV Protonen (- - DSB, — ESB).

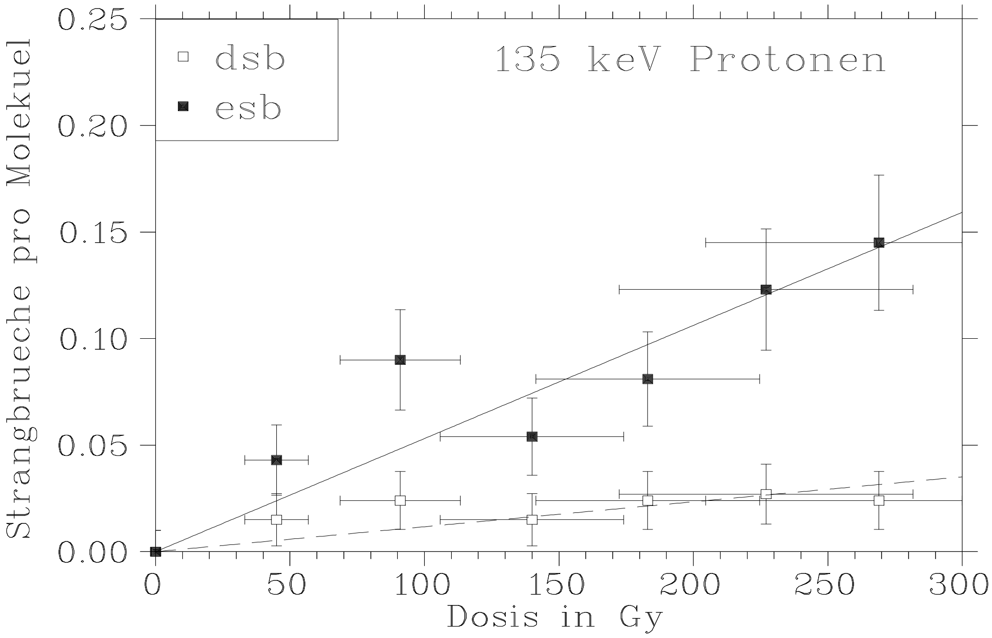

Abbildung 6.9: Anzahl der ESB und DSB in Abhängigkeit von der applizierten Dosis nach Bestrahlung mit 135 keV Protonen (- - DSB, — ESB).

---

der Plasmid–Bestrahlungen mit Protonen sind in den Abbildungen 6.8 und 6.9 dargestellt. Die Graphen zeigen deutlich, daß im Fall der Protonen die Induktion von ESB um den Faktor 3 bis 4 größer ist, als die Induktion von DSB. Dies stimmt mit den Ergebnissen der α–Bestrahlungen überein. Dort überwiegt bei hohen Protonenanteilen (29% bei der 485 keV α–Bestrahlung) die Induktion von ESB. Bei der 344 keV α–Bestrahlung, d.h. im Falle 'fast' reiner α–Teilchen (Protonenanteil 4.9%) dominiert der Anteil induzierter DSB.

6.4 Verhältnisse der Strangbruchraten

Die Steigungen der Regressionsgeraden stellen die Ausbeuten der pro Gy und Plasmidmolekül induzierten Strangbrüche dar. Aus diesen wurden durch Quotientenbildung die Strangbruchverhältnisse der vier Bestrahlungen ermittelt. Die angegebenen Fehler für die Strangbruchausbeuten sind die Ungenauigkeiten der linearen Regression. Für die Korrektur der Ausbeuten an ESB und DSB für die α–Bestrahlungen wurde eine Linearität zwischen Strahlenwirkung (induzierte Strangbrüche pro Gy) und Protonenanteil an

	344 keV α–Teilchen	485 keV α–Teilchen
m_α^{ver}(ESB)	(2.1±0.5)·10^{-4} ESB/Gy	(3.5±0.5)·10^{-4} ESB/Gy
m_α^{ver}(DSB)	(3.9±0.4)·10^{-4} DSB/Gy	(2.7±0.2)·10^{-4} DSB/Gy
ESB/DSB (α)	0.5±0.2	1.3±0.3
	87 keV Protonen	135 keV Protonen
m_p(ESB)	(4.6±0.2)·10^{-4} ESB/Gy	(5.3±0.5)·10^{-4} ESB/Gy
m_p(DSB)	(1.4±0.1)·10^{-4} DSB/Gy	(1.2±0.2)·10^{-4} DSB/Gy
ESB/DSB (p)	3.3±0.2	4.4±1.0
	344 keV α, korrigiert	485 keV α, korrigiert
m_α(ESB)	(2.0±0.5)·10^{-4} ESB/Gy	(2.8±1.0)·10^{-4} ESB/Gy
m_α(DSB)	(4.0±0.4)·10^{-4} DSB/Gy	(3.3±0.4)·10^{-4} DSB/Gy
ESB/DSB (α)	0.5±0.2	0.8±0.4

Tabelle 6.3: Aus den Steigungen $m_{\alpha,p}$ der Regressionsgeraden berechnete Strangbruchverhältnisse der vier Originalbestrahlungen, sowie der korrigierten α–Bestrahlungen. Bei der 344 keV α–Bestrahlung betrug der mittlere Protonenanteil 4.9±0.35 %, bei der 485 keV α–Bestrahlung 29±1.5 %.

der Gesamtzahl der Teilchen, die die Probe getroffen haben, zugrundegelegt. Danach setzen sich die Strangbruchausbeuten für die α–Bestrahlungen mit Protonenverunreinigung m_α^{ver} aus der Summe der Ausbeuten 'reiner' α– bzw. Protonenbestrahlungen m_α bzw. m_p zusammen, die jeweils mit den Anteilen der α–Teilchen (f_α) und der Protonen (f_p) an der Gesamtteilchenzahl gewichtet sind

$$m_\alpha^{ver} = f_\alpha \cdot m_\alpha + f_p \cdot m_p \; . \tag{6.1}$$

Durch Auflösen nach m_α erhält man die um den Effekt der Protonen korrigierten Strangbruchausbeuten für die α–Bestrahlungen. Diese sind zusammen mit den berechneten Strangbruchverhältnissen in Tabelle 6.3 aufgelistet. Die angegebenen Ungenauigkeiten sind mit Hilfe einer Fehlerrechnung erster Ordnung bestimmt. Tabelle 6.4 zeigt die für α–Teilchen und Protonen auf das Molekulargewicht der Plasmid–DNA normierten gemittelten Ausbeuten an ESB und DSB pro Gy und Dalton.

Die Ergebnisse für die ESB/DSB–Verhältnisse der α–Bestrahlungen zeigen, daß im Mittel 0.6 ESB pro DSB durch α–Teilchen mit Energien von etwa

	α–Teilchen ($\overline{LET} \approx 1800\ MeV \cdot cm^2/g$)	Protonen ($\overline{LET} \approx 770\ MeV \cdot cm^2/g$)
m(ESB)	$(5.1\pm1.6)\cdot10^{-11}$	$(1.1\pm0.1)\cdot10^{-10}$
m(DSB)	$(7.9\pm0.9)\cdot10^{-11}$	$(2.8\pm0.2)\cdot10^{-11}$
ESB/DSB	0.6 ± 0.3	3.8 ± 0.1

Tabelle 6.4: Mittlere Ausbeuten m(ESB) für Einzelstrang– und m(DSB) für Doppelstrangbrüche der α– und Protonenbestrahlung in Brüchen/Gy·Dalton, sowie ESB/DSB–Verhältnisse. Zusätzlich angegeben ist der gemittelte LET (vgl. Kapitel 2.2).

300 bis 500 keV im direkten Effekt in DNA induziert werden. Aufgrund des Fehlers variiert dieser Wert zwischen 0.33 und 0.87 ESB/DSB. Protonen mit Energien im Bragg–Maximum produzieren im Vergleich zu den α–Teilchen durchschnittlich sechsmal mehr ESB pro DSB.

6.5 Energieüberträge pro Strangbruchereignis

Aus den Dosis–Wirkungsbeziehungen für die Induktion von ESB und DSB der α–Teilchen und denen der Protonen konnte unter Berücksichtigung der Anzahl der eingesetzten Plasmid–Moleküle eine mittlere pro Strangbruchereignis übertragene Energie berechnet werden. Da durch die Primärionisationen Trümmerbrüche in der DNA entstehen (vgl. Kapitel 2.4.2) wurde angenommen, daß jede Wechselwirkung eines α–Teilchens oder Protons mit einem superzirkularen Plasmid–Molekül einen Strangbruch produzierte. Die Berechnung der pro Strangbruch übertragenen Energien erfolgte mit Hilfe der D_{90}, die aus den Dosis–Wirkungskurven ermittelt werden konnte. Die D_{90} ist die Dosis, bei der 90% der eingesetzten superzirkularen Plasmid–Moleküle überleben. Aus Gleichung 3.3 folgt damit für die mittlere Anzahl erfolgter Strangbrüche pro Plasmid–Molekül $(n_{ESB} + n_{DSB})$

$$\frac{N}{N_0} = e^{-(n_{ESB}+n_{DSB})} = 0.9 \quad \Rightarrow \quad (n_{ESB} + n_{DSB}) \approx 0.1 \ . \qquad (6.2)$$

Dies bedeutet, daß jedes zehnte sc–Molekül durch einen ESB oder DSB in die offenzirkulare oder lineare Form überführt wurde. Aus den Steigungen der Regressionsgeraden kann die D_{90} über die Beziehung

$$D_{90} = \frac{0.1}{m_{\alpha,p}(ESB) + m_{\alpha,p}(DSB)} \tag{6.3}$$

erhalten werden. Die Anzahl der pro μg in der DNA–Probe vorhandenen Plasmid–Moleküle $n_{Plasmid}$ berechnet sich aus dem Molekulargewicht $MG_{Plasmid}$=4.67 $\cdot$ 10^6 Dalton der Plasmid–DNA und der Loschmidtzahl N_L=6.022 $\cdot$ 10^{23} pro Mol. Sie beträgt

$$n_{Plasmid} = \frac{1 \cdot 10^{-6} g \cdot N_L}{MG_{Plasmid}} = 1.3 \cdot 10^{11} \; . \tag{6.4}$$

Mit der D_{90} in eV/μg folgt damit für die mittlere pro Strangbruchereignis übertragene Energie $\overline{E_S}$

$$\overline{E_S} = 10 \cdot \frac{D_{90}}{n_{Plasmid}} \; . \tag{6.5}$$

Tabelle 6.5 zeigt die errechneten Werte für $\overline{E_S}$ sowohl der α– als auch der Protonenbestrahlungen. Zusätzlich angegeben ist die mittlere Zahl der pro Teilchen erfolgten Wechselwirkungen mit den superzirkularen Plasmid–Molekülen der Probe $\overline{n_T^P}$. Diese wurde unter Zuhilfenahme der pro Teilchen in der Plasmid–DNA deponierten Energie dE_{DNA} berechnet (vgl. Tabelle 6.1).

Für die α–Bestrahlungen ergibt sich ein mittlerer Energieübertrag pro

Bestrahlung	D_{90}	$\overline{E_S}$	$\overline{n_T^P}$
344 keV α	167±26 Gy	80±15 eV	705±148
485 keV α	164±37 Gy	79±20 eV	635±168
87 keV p	161±6 Gy	77±10 eV	268±19
135 keV p	154±16 Gy	74±10 eV	258±40

Tabelle 6.5: Mit Hilfe der D_{90} berechnete mittlere pro Strangbruchereignis übertragene Energie $\overline{E_S}$, sowie der mittleren Zahl pro Teilchen erfolgter Wechselwirkungen mit den Plasmid–Molekülen $\overline{n_T^P}$.

Strangbruchereignis von 80±15 eV. Für die Protonenbestrahlung wurde ein Wert von 75±10 eV erhalten.
Die relativ hohen erforderlichen Bestrahlungsdosen resultieren aus der großen Anzahl der verwendeten Plasmid–Moleküle ($\approx 10^{11}/\mu$g). Diese ist bei einer vorgegeben DNA–Menge umgekehrt proportional zum Molekulargewicht der DNA. Mit abnehmender Plasmid–Größe steigt daher bei fester DNA–Menge die zur Induktion einer bestimmten Anzahl an Strangbrüchen pro Molekül erforderliche Bestrahlungsdosis. Die hier ermittelte D_{90} ist also spezifisch für die eingesetzte Plasmid–DNA mit 7180 BP Länge.

6.6 G–Werte

Der G–Wert gibt an, wie viele Moleküle durch strahleninduzierte Reaktionen pro 100 eV absorbierter Energie verändert werden [Der69]. Aus der Ein–Treffer–Kinematik folgt, daß bei der D_{37} (Dosis, bei der 37% der bestrahlten Einheiten unverändert bleiben) die Zahl der Treffer identisch ist mit der Zahl der exponierten Einheiten. Man kann also den G–Wert für die Induktion der ESB und DSB aus der D37 und der Anzahl der bestrahlten Plasmid–Moleküle Z_M ermitteln. Dabei gilt

$$G = \frac{Z_M}{D_{37}/100\,eV} = \frac{n_{Plasmide} \cdot m(ESB, DSB)}{6.24 \cdot 10^7}\,, \tag{6.6}$$

wobei

$$6.26 \cdot 10^9 \cdot \frac{1}{m(ESB, DSB)} \tag{6.7}$$

die D_{37} in eV/μg ist, wenn m in ESB bzw. DSB/Gy eingesetzt wird. Für die α–Bestrahlungen ergaben sich G–Werte von 0.5±0.2 für ESB und 0.8±0.1 für DSB. Die entsprechenden Ergebnisse der Protonenbestrahlungen betrugen 1.0±0.1 für ESB und 0.27±0.03 für DSB.

7. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse der DNA–Bestrahlungen mit niederenergetischen α–Teilchen zeigen, daß die angewandte Methode der Bestrahlung superzirkularer Plasmid–DNA zur Analyse von induzierten ESB und DSB bei Teilchenenergien von 300 bis 500 keV geeignet ist.
Als vorteilhaft erwies sich der Einsatz des 400 keV–Ionenbeschleunigers bezüglich der Energieauflösung der zur Bestrahlung verwendeten Teilchen. Selbst nach der Streuung am Kohlenstofftarget wurde für die α–Teilchen eine Energieauflösung $\Delta E/E$ von $8{\cdot}10^{-2}$ erreicht. Dieser Wert ist gegenüber Bestrahlungsexperimenten mit radioaktiven Quellen, bei denen die Energien der Teilchen mit Hilfe von Mylarfolien reduziert wurden, um etwa den Faktor 30 besser. Ein Nachteil war die Verunreinigung des Primärstrahles mit H_2^+–Molekülionen, die sich nach der Streuung am Kohlenstofftarget als Protonen bemerkbar machten. Da der Wirkungsquerschnitt der Penningquelle für die Ionisation einfach geladener Zustände gegenüber dem für zweifach geladene um etwa 100 größer ist und zusätzlich der Rutherford–Streuquerschnitt für die Protonen der H_2^+–Molekülionen viermal größer ist als für die α–Teilchen (vgl. Kapitel 5.4.1), bewirken selbst geringe Wasserstoffanteile in der Penningquelle wegen dieses 400–fachen Verstärkungseffektes merkliche Protonenausbeuten im Streuspektrum. Da dies ein prinzipielles Problem bei der Ionenseparation ist (vgl. Kapitel 5.1.1), könnte eine Trennung der α–Teilchen von den H_2^+–Molekülionen nur mit Hilfe eines Strahlfilters erfolgen, das hinter der Beschleunigungsstrecke im Strahlrohr plaziert wird. Dies könnte ein reiner Elektrostat oder eine Kombination aus magnetischem und elektrostatischem Filter sein.
Bei der Dosisbestimmung ist die Berechnung der Energie, die pro Teilchen in der DNA deponiert wird, problematisch. Hier wären Vergleichsexperimente sinnvoll, in denen der Energieverlust von α–Teilchen in einem DNA–Film gemessen wird. Vorteilhaft für die Energieverlustberechnungen wären salzfreie DNA–Proben. Ob das z.B. mit einem flüchtigen Puffer wie Ammoniumcarbonat realisierbar wäre, ohne daß die Plasmid–DNA zusätzliche Degradation erfährt, müßte in weiteren Experimenten überprüft werden.
Die Auswertung der Bestrahlungsergebnisse hat gezeigt, daß α–Teilchen

Objekt	Methode	m(ESB)	m(DSB)	$\frac{ESB}{DSB}$	$\overline{LET}$
Plasmid–DNA 7180 BP	DNA–Film im Vakuum	5.1	7.9	0.6	1800
DNA–Segment 54 BP [Cha89]	Monte–Carlo Simulation	~10.0	2.7	3.3	~2000
T7 Phagen–DNA [Nea72] 39936 BP	DNA–Film mit 30% Wassergehalt, 5 MeV α	27.0	1.1	25	~900
ΦX–174RF I Phagen–DNA 5380 BP [Chr72]	stark radikal–unterdrückende Nährlösung, ≈30 MeV α	2.4 2.0	0.21 0.45	11 4.4	343 2250 ($^{11}B^5$)

Tabelle 7.1: Vergleich der Ergebnisse verschiedener Methoden zur Bestimmung der Ausbeute an direkt induzierten Einzel– und Doppelstrangbrüchen durch α–Teilchen unterschiedlichen LETs, angegeben in 10^{-11} Brüche/Gy·Dalton. Die Einheit des $\overline{LET}$ ist MeV·cm^2/g.

mit Energien von 344 und 485 keV in Plasmid–DNA im direkten Effekt Schäden hervorrufen, die sich zu etwa 60% als DSB und zu 40% als ESB nachweisen lassen. Dabei wurde im Mittel eine Energie von 80±15 eV auf die Plasmid–Moleküle übertragen. Unter der Annahme, daß zur Erzeugung eines ESB eine und zur Erzeugung eines DSB zwei Primärionisationen erforderlich sind [Der69, Cha89], erhält man unter Berücksichtigung des mittleren ESB/DSB–Verhältnisses von etwa 0.6 (vgl. Tabelle 6.4) für die Erzeugung eines ESB 50±9 eV und für die eines DSB 100±18 eV. Diese Werte stimmen gut mit dem in der Literatur angegebenen Wert von 60 eV für die mittlere pro Primärionisation erforderliche Energie überein [Der69, Kie89]. Bei den Protonenbestrahlungen ergab sich für die pro Strangbruchereignis übertragene Energie ein Wert von 75±10 eV bei einem Verhältnis von ESB zu DSB von 3.9. Unter derselben Annahme wie bei den α–Teilchen, erhält man hier für einen ESB 62±8 eV, für einen DSB 124±16 eV als erfolgten Energieübertrag. Die Werte stimmen jedoch im Rahmen ihrer Fehler mit denen der α–Bestrahlungen überein. Ein weiterer Vergleich zeigt, daß die hier ermittelten Energieüberträge für die Induktion von ESB und DSB innerhalb der Energieintervalle liegen, in denen ESB und DSB nach der in Kapitel 2.4.2

beschriebenen Modellrechnung am haufigsten auftreten [Cha89].
In Tabelle 7.1 werden die Ausbeuten an direkt induzierten ESB und DSB verschiedener experimenteller Arbeiten und der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Monte–Carlo–Simulation von Bahnspuren geladener Teilchen in DNA mit den vorliegenden Experimenten verglichen. An dieser Stelle sei angemerkt, daß außer bei der Monte–Carlo–Simulation (1.2 MeV α–Teilchen) bei den Phagen–Bestrahlungen Teilchenenergien verwendet wurden, die mindestens um eine Größenordnung größer waren, als die hier benutzten Energien von 300 bis 500 keV. Auffällig ist die hohe Ausbeute an DSB bei den hier durchgeführten Plasmid–Bestrahlungen von $7.9 \cdot 10^{-11} \frac{DSB}{Gy \cdot Dalton}$ im Vergleich zu den DSB–Ausbeuten der Modellrechnung und den Phagen–Bestrahlungen. Dagegen ist die Ausbeute an ESB nur etwa halb so groß wie die entsprechenden Werte der anderen Untersuchungen. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß bei den Phagenbestrahlungen durch den Wassergehalt im DNA–Film bzw. die Bestrahlung in stark radikalunterdrückender Nährlösung ein indirekter Effekt über Wasserradikale nicht auszuschließen ist, während bei Bestrahlung im Hochvakuum ein Ausgasen der Probe den Wassergehalt in der DNA–Schicht auf das mögliche Minimum reduziert.
Die aus den Strangbruchraten resultierenden ESB/DSB–Verhältnisse nehmen mit wachsendem LET ab, wobei dieses Verhalten auch hinter dem Bragg–Maximum ($\approx$600 keV) bei abnehmendem LET bestehen bleibt. Dies deutet darauf hin, daß die Induktion von DSB bei etwa gleichem LET für α–Teilchen auf der abfallenden Flanke des Bragg–Maximums (300 bis 500 keV) effektiver ist als für Teilchen auf der aufsteigenden Flanke (E$\geq$1.2 MeV). Die biologische Wirkung strahleninduzierter Schäden in DNA–Molekülen wird mit zunehmendem LET der Strahlung größer [War85, Goo94]. Dies liegt daran, daß dichtionisierende Strahlung in DNA ein Spektrum an Trümmerbrüchen produziert, die mit zunehmender Komplexität immer schwerer für die Zelle zu reparieren sind (vgl. Kapitel 2.4.2). Für ESB besitzt die Zelle sehr effektive Reparaturmechanismen, während Brüche, bei denen beide DNA–Stränge zerstört werden, zum Verlust der Teilungsfähigkeit führen können. Innerhalb dieses Schadensspektrums gibt es jedoch auch Brüche, die aufgrund ihrer Struktur den Verlust eines bestimmten Abschnitts der Basensequenz bewirken können. Dies kann bei einem DSB der Fall sein, der den gleichzeitigen Verlust eines komplementären Basenpaares zur Folge hatte, oder bei zwei ESB in den gegenüberliegenden Strängen, die nicht mehr

als etwa 4 bis 10 Basenpaare voneinanser entfernt liegen. Durch den Reparaturprozess, der ein weiteres Auftrennen der Stränge erforderlich macht [Kni90], können Basensequenzen verloren gehen [War85].
Das aus der Plasmid–Bestrahlung bestimmte Verhältnis von 0.6 für die Induktion von ESB und DSB könnte ein Hinweis dafür sein, daß durch α–Teilchen mit Energien unterhalb des Bragg–Maximums in DNA im direkten Effekt Schäden hervorgerufen werden, die bezüglich ihrer Schadensdichte im Übergangsbereich zwischen ESB und DSB liegen und damit eine größere Wahrscheinlichkeit für Falschreparatur besitzen als 'glatte' ESB und DSB. Dies wäre dann eine mögliche Erklärung für die mutagene Wirkung niederenergetischer α–Teilchen, die in den eingangs erwähnten Untersuchungen festgestellt wurde bzw. vermutet wird (vgl. Kapitel 1). Damit würden α–strahlende Isotope, die wie das Radongas inkorporiert werden, ein wesentlich größeres kanzerogenes Risiko darstellen als bisher angenommen.
Mehr Aufschluß über diese möglichen Zusammenhänge können Bestrahlungsexperimente an Säugerzellen mit niederenergetischen α–Teilchen geben, bei denen die bestrahlte DNA auf induzierte Punktmutationen in Abhängigkeit unterschiedlicher Reparaturzeiten nach der Bestrahlung untersucht wird.

8. Zusammenfassung

Am 400 kV–Ionenbeschleuniger im Institut für Kernphysik, Münster, wurden He–Kerne auf Energien bis zu 600 keV beschleunigt und an einem Kohlenstofftarget gestreut. Mit den gestreuten Teilchen, deren Energien unterhalb des Bragg–Maximums liegen, wurde superzirkulare Plasmid-DNA mit 7180 Basenpaaren Länge im Vakuum bestrahlt. Zur Intensitätskalibrierung wurden die α-Teilchen mit einem Oberflächensperrschichtzähler, der symmetrisch zur Strahlachse unter demselben Streuwinkel wie die DNA-Proben angeordnet war, spektroskopiert. Für die Dosimetrie wurde der Energieverlust der α- Teilchen beim Durchgang durch die DNA-Schicht berechnet und daraus die Bestrahlungsdosen ermittelt. Die DNA–Proben wurden nach der Bestrahlung mit Hilfe der Agarose–Gelelektrophorese in ihre drei topoisomeren Formen getrennt. Dabei entsteht aus einem superzirkularen Plasmid–Molekül durch einen Einzelstrangbruch (ESB) ein offenzirkulares Molekül und durch einen Doppelstrangbruch (DSB) ein lineares.
Die Korrelation der Dosen mit den induzierten Strangbrüchen zeigt einen linearen Anstieg von ESB und DSB pro Plasmidmolekül, deren Verhältnis 0.6 bis 0.7 beträgt. Dabei wurde im Mittel pro Strangbruch eine Energie von 80 eV deponiert. Die in dieser Arbeit ermittelten DSB–Ausbeuten sind um den Faktor 3 oder mehr größer als vergleichbare Werte anderer Arbeiten.

A. Chemikalien

Im folgenden sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sowie die des Nährmediums für die Bakterienanzucht aufgelistet.

TE–Puffer:

- 10 mM Tris·Cl, pH 7.4
- 1mM EDTA, pH 8

TAE–Puffer (50×TAE, 500 ml):

- 121 g Tris base
- 28.55 ml Eisessig
- 50 ml 0.5 M EDTA, pH 8

LB–Medium, pH 7.0, 500 ml:

- 5 g bacto tryptone
- 2.5 g bacto–yeast extract
- 5 g NaCl

Die Anleitungen zur Herstellung der Puffer und des Mediums sind in Molecular Cloning, Second Edition [Sam89] zu finden.

Chemische Zusammensetzungen der im TE–Puffer enthaltenen Salze:

Tris (Tris[hydroxymethyl]aminoethane):

- $C_4H_{11}NO_3$, MG 121.1, ρ ~1.1 g/cm^3

EDTA, hier eingesetzt: Titriplex III (Dinatrium–EDTA $\cdot$ $2H_2O$):

- $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_6 \cdot 2H_2O$, MG 372.24

B. Targetdickenbestimmung

Die Bestimmung der Targetdicken erfolgte mit Hilfe der Gleichungen 5.11 und 5.13 nach dem in Abbildung 5.4 dargestellten Algorithmus. Die dafür erforderlichen Meßgrößen waren die Einschußenergie E_0 der Protonen, die Meßdauer $t_{meß}$, die Gesamtzahl der detektierten Teilchen N_{ges}, die Zahl der Protonen N_p und die Summe der Counts Σ_C aus der Strommessung (vgl. Kapitel 5.1.2). Der Meßbereich des Amperemeters war in allen Messungen auf $R=10^{-6}$ eingestellt. Tabelle B.1 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Messungen. Die erhaltenen Targetdicken wurden entsprechend ihrem Anteil detektierter Protonen mit den Faktoren w_i gewichtet gemittelt. Damit ergab sich für beide verwendete Targets eine Massenbelegung von 18.6±2.4 μg/cm^2.

Exp.	E_0	$t_{meß}$	N_{ges} $\times 10^4$	N_p $\times 10^4$	Σ_C $\times 10^4$	μ	w_i
Target T1							
S01	300	60	3.44±0.02	3.25±0.02	11.25±0.31	17.1±2.3	8.0
S02	300	60	3.01±0.02	2.83±0.02	10.91±0.29	15.2±2.1	7.0
S03	230	60	3.16±0.02	3.00±0.02	5.61±0.15	18.1±2.5	7.4
S04	300	120	3.40±0.02	3.23±0.02	9.12±0.17	19.7±2.5	7.9
S05	300	120	3.62±0.02	3.43±0.02	9.75±0.18	19.6±2.5	8.5
S06	300	120	3.75±0.02	3.56±0.02	10.10±0.19	19.7±2.5	8.8
S07	300	120	3.69±0.02	3.49±0.02	10.00±0.18	19.5±2.5	8.6
S08	150	120	9.51±0.03	9.19±0.03	7.27±0.13	18.6±2.3	22.2
S09	150	120	9.26±0.03	8.96±0.03	7.03±0.13	18.6±2.3	21.6
Target T2							
S10	150	180	9.83±0.03	9.52±0.03	7.29±0.11	18.2±2.2	20.7
S11	150	180	9.62±0.03	9.32±0.03	7.14±0.11	18.2±2.2	20.3
S12	150	180	9.70±0.03	9.39±0.03	7.27±0.11	18.0±2.2	20.4
S13	100	180	6.23±0.02	6.03±0.02	1.74±0.03	19.3±2.4	13.1
S14	100	180	6.19±0.03	5.99±0.02	1.73±0.03	19.3±2.4	13.0
S15	100	180	5.96±0.02	5.77±0.02	1.64±0.03	19.5±2.4	12.5

Tabelle B.1: Meßwerte aus den Streuexperimenten und die daraus bestimmten Targetdicken für beide verwendete Targets. E_0 ist in keV, $t_{meß}$ in s und μ un μg/cm^2 angegeben. Der Fehler für die Meßdauer beträgt einheitlich ±1 s.

C. Energiekalibrierung

Die Energieverluste der α–Teilchen und Protonen im Kohlenstofftarget, die nach der in Kapitel 5.4.2 beschriebenen Methode ermittelt wurden, sind in Tabelle C.1 dargestellt. Dabei sind die Werte für Energieverlust durch Ionisation vor bzw. nach dem Stoß (ΔE' bzw. ΔE") und der Energieverlust durch Impulsübertrag an den Rückstoßkern (ΔE_r) getrennt aufgelistet. Damit ergibt sich für die effektive Energie der gestreuten α–Teilchen

$$E^{\alpha}_{eff} = (0.284 \pm 0.001) \cdot ch + (19.2 \pm 1.8)\ keV \ , \tag{C.1}$$

und für die gestreuten Protonen

$$E^{p}_{eff} = (0.279 \pm 0.007) \cdot ch + (12.8 \pm 2.8)\ keV \ . \tag{C.2}$$

Die Ungenauigkeiten der Energieverluste durch Ionisation wurden mit dem für den Coputercode ASTAR angegebene Fehler von 7% berücksichtigt. Alle Energien und Energieverluste sind in keV angegeben. Die Schwerpunkte (Center) der Peaks wurden mit dem Fitprogram Fit [Str93] bestimmt.

E_0	ΔE'	ΔE_r	ΔE"	E_{eff}	Center	FWHM
Energiekalibrierung für α–Teilchen						
200	14.7±1.0	11.0±0.1	15.5±1.1	158.8±2.2	491±1	23.6±0.1
400	17.4±1.2	23.0±0.2	19.0±1.3	340.6±2.7	1138±1	29.0±0.1
600	17.7±1.2	35.0±0.4	19.6±1.4	527.7±3.0	1729±1	35.1±0.1
Energiekalibrierung für Protonen						
100	6.3±0.4	1.0±0.1	7.1±0.5	85.6±1.0	258±1	21.6±0.1
150	5.6±0.4	2.0±0.1	6.3±0.4	136.1±0.9	437±1	20.6±0.1

Tabelle C.1: Energieeichung für α–Teilchen und Protonen

D. Laserdensitometrie und Dosisbestimmung

Tabelle D.1 stellt die Ergebnisse der Laserdensitometrie und der Berechnung der ESB und DSB pro Plasmid–Molekül wie in Kapitel 3 beschrieben dar. Eine Zusammenstellung der ermittelten Bestrahlungsdosen ist in den Tabellen D.2 und D.3 gezeigt.

Probe	Dosis(Gy)	oc(%)	lin(%)	sc(%)	ESB	DSB
344 keV α–Bestrahlung						
P01	42±9	3.7	3.7	92.5	0.04	0.04
P02	87±19	0.0	4.4	95.6	0.00	0.05
P03	171±38	4.7	6.3	89.1	0.04	0.07
P04	268±59	9.2	9.9	80.8	0.09	0.13
P05	352±78	5.9	9.4	84.7	0.05	0.12
485 keV α–Bestrahlung						
P06	58±12	5.2	2.3	92.4	0.05	0.03
P07	89±19	4.5	3.5	92.1	0.05	0.04
P08	181±40	25.5	4.1	70.6	0.30	0.05
P09	219±48	6.5	5.4	88.1	0.07	0.06
P10	312±68	9.9	6.7	83.5	0.10	0.08
87 keV Protonen–Bestrahlung						
P11	91±22	3.3	1.5	95.2	0.03	0.02
P12	170±41	7.6	2.4	90.0	0.08	0.03
P13	312±76	14.8	3.5	81.7	0.17	0.04
P14	512±125	21.1	6.2	72.7	0.25	0.07
P15	699±171	24.6	8.2	67.2	0.30	0.10
135 keV Protonen–Bestrahlung						
P16	45±12	4.2	1.5	94.3	0.04	0.02
P17	91±22	8.5	2.3	89.2	0.09	0.02
P18	140±34	5.2	1.4	93.4	0.05	0.02
P19	183±42	7.6	2.3	90.0	0.08	0.02
P20	227±55	11.3	2.6	86.1	0.12	0.03
P21	269±64	13.3	2.3	84.5	0.15	0.02

Tabelle D.1: Ergebnisse der laserdensitometrischen Bestimmung der nach Bestrahlung mit α–Teilchen und Protonen vorhandenen relativen Anteile der drei Plasmid–DNA–Formen in Prozent sowie der Berechnung der induzierten ESB und DSB pro Molekül. Bei den α–Bestrahlungen sind jeweils die Summen aus α– und Protonendosis angegeben (vgl. Tabelle D.2).

Probe	Center	E_{eff}	ΔE_{DNA}	N $\times 10^4$	%N	Dosis (Gy)
344 keV α–Bestrahlung, α–Anteil						
P01	1150	345.7±14.9	56.5±1.3	6.84±0.03	96.1	41±9
P02	1148	345.1±14.9	56.5±1.3	14.07±0.04	95.3	85±19
P03	1145	344.1±14.8	56.4±1.3	27.67±0.06	94.3	166±37
P04	1142	343.3±14.8	56.3±1.3	43.43±0.46	94.3	260±57
P05	1139	342.5±14.8	56.2±1.3	57.59±0.31	95.5	344±76
344 keV α–Bestrahlung, Protonen–Anteil						
P01	263	86.5±10.5	27.1±0.2	0.279±0.007	3.9	0.8±0.2
P02	262	86.2±10.5	27.1±0.2	0.687±0.011	4.7	2.0±0.4
P03	262	86.2±10.5	27.1±0.2	1.69±0.02	5.7	5±1
P04	261	86.1±10.5	27.1±0.2	2.62±0.04	5.7	8±2
P05	260	85.8±10.5	27.1±0.2	2.70±0.02	4.5	8±2
485 keV α–Bestrahlung, α–Anteil						
P06	1664	491.5±17.3	50.4±0.6	7.37±0.03	75.3	52±11
P07	1660	490.3±17.2	50.4±0.6	11.28±0.03	74.7	79±17
P08	1639	484.6±17.1	50.2±0.6	21.97±0.05	68.3	153±34
P09	1631	482.1±17.1	50.1±0.6	27.04±0.05	70.3	188±41
P10	1611	476.6±17.1	49.9±0.6	38.36±0.06	69.1	266±58
485 keV α–Bestrahlung, Protonenanteil						
P06	411	128.0±10.5	19.4±0.4	2.42±0.02	24.7	6±1
P07	410	127.7±10.5	19.4±0.4	3.83±0.02	25.3	10±2
P08	408	127.1±10.5	19.5±0.4	10.20±0.03	31.7	28±6
P09	406	126.7±10.5	19.5±0.4	11.40±0.03	29.7	31±7
P10	403	125.9±10.5	19.5±0.4	17.17±0.05	30.9	46±10

Tabelle D.2: Dosen der α–Bestrahlungen, berechnet aus der effektiven Energie E_{eff}, dem Energieverlust ΔE_{DNA} und der Gesamtzahl N der Teilchen, die die DNA–Probe getroffen haben. Center ist der Schwerpunkt der Peaks im Spektrum, angegeben in ADC–Kanälen. Die Energien E_{eff} und ΔE_{DNA} sind in keV und die Anteile %N der α–Teilchen bzw. Protonen an der Gesamtteilchenzahl in Prozent angegeben.

Probe	Center	E_{eff}	ΔE_{DNA}	N $\times 10^4$	Dosis (Gy)
87 keV Protonen–Bestrahlung					
P11	263	86.7±10.5	20.6±0.2	3.2±0.1	91±22
P12	265	87.2±10.5	20.6±0.2	15.9±0.2	170±41
P13	263	86.6±10.5	20.6±0.2	10.9±0.3	312±76
P14	262	86.4±10.5	20.6±0.2	17.9±0.5	512±125
P15	263	86.7±10.5	20.6±0.2	24.5±0.7	699±171
135 keV Protonen–Bestrahlung					
P16	411	128.0±10.5	19.4±0.4	1.68±0.06	45±12
P17	415	129.3±10.5	19.4±0.4	3.36±0.07	91±22
P18	445	137.7±10.7	19.0±0.4	5.32±0.09	140±34
P19	445	137.5±10.7	19.0±0.4	6.95±0.07	183±42
P20	444	137.2±10.5	19.0±0.4	8.62±0.12	227±55
P21	443	137.1±10.5	19.0±0.4	10.19±0.13	269±64

Tabelle D.3: Dosen der Protonen–Bestrahlungen, berechnet aus der effektiven Energie E_{eff}, dem Energieverlust ΔE_{DNA} und der Gesamtzahl N der Teilchen, die die DNA–Probe getroffen haben. Center ist der Schwerpunkt der Peaks im Spektrum, angegeben in ADC–Kanälen, die Energien E_{eff} und ΔE_{DNA} sind in keV angegeben.

Literaturverzeichnis

[Adz90] K. H. Adzersen, Medizinische Strahlenbelastung in der Bundesrepublik Deutschland – Möglichkeiten der Dosisreduktion, Bericht Nr. 3, Otto Hug Strahleninstitut Bonn, 1990

[Att68] F. H. Attix, W. C. Roesch, E. Tochilin, Radiation Dosimetry, Volume 1: Fundamentals, second edition, Academic Press, 1968

[Bar60] G. W. Barendsen, T. L. J. Beusker, A, J. Vergroesen, L. Budke, Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture. II. Biological experiments. *Radiation Research* 13, 841–849, 1960

[Bar63] H. Barkas, Nuclear research emulsions, Vol. 1. New York: Academic Press, 1963

[Ber92] M. J. Berger, ESTAR, PSTAR and ASTAR, Computer Codes for Calculating Stopping–Power and Range Tables for Elektrons, Protons and Helium Ions, National Institute of Standards and Technology, Gaitherburg, MD 20899, 1992

[Bir83] H.–C. Birnboim, Methods in Enzymology 100, 1983

[Bro91] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, Taschenbuch der Mathematik, B. G. Teubner Verlag, 1991

[Bun93] Bundesumweltministerium, Umweltadioakivität und Strahlenbelastung im Jahr 1993, Drucksache 12/8539

[Cha89] D. E. Charlton, H. Nikjoo, J. L. Humm, Calculation of initial yields of single– and double–strand breaks in cell nuclei from electrons, protons and α particles, *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 56, No. 1, 1–19, 1989

[Chu94] J. L. Chuma, Physica 1.00, Mathematical Analysis and Data Visualization Software, TRIUMF Computing Document, 1994

[Chr72] R. C. Christensen, C. A. Tobias, W. D. Taylor, Heavy–ion–induced single– and double–strand breaks in ΦX–174 replikative form DNA, *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 22, No. 1, 457–477, 1972

[Der69] H. Dertinger, H. Jung, Molekulare Strahlenbiologie, Springer–Verlag, 1969

[Eis91] Y. Eisen, W. F. Harvey, M. R. Raju, Radiobiology of α Particles. II. Dosimetry of Low–Energy α Particles Using Parallel–Plate Ionization Chambers and a Surface Barrier Detector, *Radiation Research* 128, 197–203, 1991

[Fox92] J. C. Fox, K. M. Prise, DNA lesions: linear energy transfer and radiosensitive mutants, *British Journal of Radiology*, Suppl. 24, 48–52, 1992

[Gas89] S. Gasiorowicz, Quantenphysik, 1989

[JET94] JET Star, The Midi Plasmid Purification System, Protocol, GENOMED GmbH, 1994

[Goo94] D. T. Goodhead, Initial events in the cellular effects of ionizing clustered damage in DNA, *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 65, No. 1, 7–17, 1994

[Goo88] D. T. Goodhead, Spatial and temporal distribution of energy, *Health Physics*, 55, 231–240, 1988

[Jen93] T. J. Jenner, C. M. de Lara, P. O'Neill, D. L. Stevens, The induction and rejoining of DNA double strand breaks in V79-4 mammalian cells by γ– and α–irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 64, 631–637, 1993

[Kad92] M. A. Kadhim, D. A. Macdonald, D. T. Goodhead, S. A. Lorimore, S. J. Marsden, E. G. Wright, Transmission of chromosomal instability after plutonium α–particle irradiation, *NATURE*, Vol. 355, 738–740, 1992

[Kie89] J. Kiefer, Biologische Strahlenwirkung, Birkhäuser, 1989

[Kni90] R. Knippers, P. Philippsen, K. P. Schäfer, E. Fanning, Molekulare Genetik, 5. Aufl., Thieme Verlag, 1990

[Leo87] W. R. Leo, Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments, Springer–Verlag, 1987

[Llo79] E. L. Lloyd, M. A. Gemmell, C. B. Henning, D. S. Gemmell, B. J. Zabransky, Cell survival following multiple–track α particle irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 35, 23–31, 1979

[May92] Kernphysik, T. Mayer–Kuckuk, Teubner, 1992

[Mus88] G. Musiol, J. Ranft, R. Reif, D. Seeliger, Kern- und Elementarteilchenphysik, VCH Verlagsgesellschaft, 1988

[Nag92] H. Nagasawa, J. B. Little, Induction of Sister Chromatid Exchanges by Extremely Low Doses of α–Particles, *Cancer Research* 52, 6394–6396, 1992

[Naz88] W. W. Nazaroff, A. V. Nero, Radon and its Decay Products in Indoor Air, Wiley–Interscience Publication, 1988

[Nea72] G. J. Neary, V. J. Horgan, D. A. Bance, A. Stretch, Further data on DNA strand breakage by various radiation qualities, *Int. J. Radiat. Biol.*, 22, 525–537, 1972

[Raj93] M. R. Raju, Y. Eisen, S. Carpenter, K. Jarrett, W. F. Harvey, Radiobiology of α Particles. IV. Cell Inactivation by α Particles of Energies 0.4–3.5 MeV, *Radiation Research* 133, 289–296, 1993

[Sam89] J. Sambrock, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molekular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[Sch89] W.–H. Schulte, Ein 400 kV Ionenbeschleuniger mit hoher Energieschärfe, Doktorarbeit, Westf. Wilhelms–Universität Münster, 1989

[Str93] S. Strauch, Entwicklung eines interaktiven Auswerteprogramms für Elektronenstreumessungen, Diplomarbeit, TH Darmstadt, 1993

[War85] J. F. Ward, Biochemistry of DNA Lesions, *Radiation Research* 104, 103–111, 1985

[Wha58] W. Whaling, The energy loss of charged particles in matter, Handbuch der Physik, Vol. 34, Springer, 1958

[Wie93] W-ie-ne-R Plein&Baus GmbH, PC–CAMAC multi parameter data acquisition program MULTI, Version 1.1, April 1993

[Win85] E. L. Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie, VCH Verlag, 1990

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die zum Gelingen meiner Diplomarbeit beigetragen haben.
Mein besonderer Dank gilt sowohl Herrn Prof. Dr. W. Köhnlein als auch Herrn Prof. Dr. D. Frekers die es mir durch ihre Betreuung und ständige Unterstützung ermöglichten, diese interessante, interdisziplinäre Arbeit anzufertigen.
Zu großem Dank bin ich Herrn Dr. H. J. Wörtche verpflichtet, der mir durch seine Hilfsbereitschaft, Geduld und sein großes Interesse in vielen Situationen wertvolle Anregungen gegeben hat.
Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dipl. Biol. J. Weidner für seine umfangreiche Unterstützung bei allen molekularbiologischen Arbeiten.
Bei Herrn H. Baumeister bedanke ich mich für die kompetente Einweisung in den Betrieb des Beschleunigers und seine Bereitschaft, auftretende Probleme sofort zu beheben.
Ein Dank gilt auch meinen Mitdiplomanden Ana Nuñez Ruiz, Volker Hannen, Johannes Endres und Jochen Volmer, sowie Herrn Dipl. Phys. M. Hartig für ihre Hilfsbereitschaft, die angenehme Zimmeratmosphäre und viele anregende Diskussionen.
Nicht vergessen möchte ich an dieser Stelle meine Eltern und meine Freundin Birgit–Maria, die mir in einer schwierigen Zeit sehr geholfen haben.

Diese Arbeit wurde am Institut für Strahlenbiologie und am Institut für Kernphysik der Westfälischen Wilhelms–Universität Münster angefertigt.

Ich erkläre, daß ich die Arbeit ohne fremde Hilfe verfaßt
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel
verwandt habe.
Münster, im Juni 1995