Ein Beschleunigerexperiment zur mutagenen Wirkung von niederenergetischen α-Teilchen

Diplomarbeit im Fach Physik
von
Johannes Endres

Juni 1996

Institut für Strahlenbiologie
der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

„Schlecht haftende Frischhaltefolie ist
ein Alptraum!“

anonym, um 1995

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Kapitel 1

Einleitung

Der Mensch ist ständig verschiedenartiger Strahlung ausgesetzt. Diese Strahlung gliedert sich nach ihrer Quelle in natürliche und zivilisatorisch bedingte. Die natürliche Strahlung läßt sich weiter in eine kosmische und eine terrestrische Komponente unterteilen.

Die kosmische Strahlung an der Erdoberfläche ist eine Sekundärstrahlung. Die aus dem Weltraum einfallende Primärstrahlung besteht aus Protonen, α-Teilchen und einigen schwereren Kernen. Diese Strahlung wird schon in der Atmosphäre oberhalb von 20 km in eine große Zahl unterschiedlicher Teilchen umgesetzt. Über den Ursprung der kosmischen Primärstrahlung gibt es nach Vogel [18] „fast so viele Theorien wie Autoren."

Die terrestrische Komponente stammt vor allem aus den Nukliden der natürlichen Zerfallsreihen. Diese bestehen aus den Mutternukliden ^{232}Th, ^{235}U und ^{238}U und ihren Zerfallsprodukten. Diese Nuklide emittieren α-, β- und γ-Strahlung. Die terrestrischen Strahlungsquellen müssen noch danach unterschieden werden, ob sie von außen auf den Körper wirken, oder ob sie in den Körper aufgenommen wurden.

Der größte Teil der zivilisatorisch bedingten Strahlenbelastung stammt aus der medizinischen Diagnostik, also vor allem aus Röntgenaufnahmen. Der Rest dieser Komponente, aus kerntechnischen Anlagen und dem Fallout von Atomwaffentests, ist dagegen gering.

In Tabelle 1.1 ist die mittlere Strahlenbelastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1993 zusammengestellt. Dabei ist von den inkorporierten Strahlenquellen das Radon wegen seines großen Anteils an der Gesamtbelastung gesondert aufgeführt.

Das Edelgas Radon ist ein α-Strahler, der in allen drei natürlichen Zerfallsreihen auftritt. Das Isotop ^{222}Rn ist Teil der ^{238}U-Reihe. Es hat eine Halbwertszeit von 3,8 Tagen. Unter seinen Zerfallsprodukten finden sich 4 weitere α-Strahler, bevor die Reihe beim stabilen ^{206}Pb endet. ^{222}Rn ist für etwa 90% der Strahlenbelastung durch Radon verantwortlich. ^{220}Rn findet sich in der ^{232}Th-Reihe. Es hat eine Halbwertszeit von nur 55 Sekunden und hat 3 α-Strahler als Folgeprodukte.

Quelle	Äquivalentdosis [mSv]	Anteil
Inhaliertes Radon und Folgeprodukte	1,4	35,3%
Andere Inkorporierte	0,3	7,6%
Übrige terrestrische Strahlung	0,4	10,1%
Kosmische Strahlung	0,3	7,6%
Medizin	1,5	37,8%
Tschernobyl	0,02	0,5%
Fallout	0,02	0,5%
kerntechnische Anlagen	0,01	0,3%
Andere	0,02	0,5%
Summe	4	

Tabelle 1.1: Mittlere Strahlenbelastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1993. Die Daten sind vom Bundesumweltministerium veröffentlicht [10]

Es trägt etwa 10% zur Strahlenbelastung durch Radon bei. ^{219}Rn aus der ^{235}U-Reihe ist wegen seiner kurzen Halbwertszeit von 3,96 Sekunden bedeutungslos.

Das Radon, das zur Strahlenbelastung der Bevölkerung beiträgt, stammt aus dem Boden, dem Uranbergbau und aus Baumaterialien. Da die natürlichen Radionuklide hauptsächlich in vulkanischen Erguß- und Erstarrungsgesteinen vorkommen, ist die Radonbelastung in den Mittelgebirgsregionen besonders hoch. Ebenso regional eingeschränkt ist offensichtlich die Belastung durch Radon, das beim Uranbergbau freigesetzt wird. Der Anteil aus Baumaterialien gewinnt aus zwei Gründen an Bedeutung. Einerseits werden beim Wohnungsbau zunehmend Materialien verwendet, die aus Abfallprodukten von Industrieprozessen bestehen, die gerade die Radionuklide anreichern. Solche Materialien sind z. B. Phosphorit-Gips und Gasbeton. Andererseits wird durch immer bessere Bauisolierung die Luftzirkulation und damit der Abtransport des Radons verringert.

Da Radon ein Gas ist, wird es eingeatmet. Das Radon selbst und seine Zerfallsprodukte lagern sich an der Lungenschleimhaut ab. Die α-Teilchen, die dann emittiert werden dringen direkt in das Gewebe ein. Sie haben Anfangsenergien von etwa 5 MeV, was ihnen im Gewebe eine Reichweite von ca. 35μm verleiht. Sie durchdringen dann als langsame α-Teilchen gerade den Teil des Gewebes, wo die Schleimhaut neu gebildet wird. Zahlreiche Untersuchungen liefern Hinweise auf eine mutagene Wirkung gerade langsamer α-Teilchen.

Im Jahr 1995 fertigte V. Scholz seine Diplomarbeit [47] am Institut für Strahlenbiologie und am Institut für Kernphysik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster an. Er faßt seine Arbeit so zu zusammen:

> „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 Alphateilchen mit einem Oberflächensperrschichtzähler, der symmetrisch zur Strahlachse unter demselben Streuwinkel wie die DNA-Proben angeordnet war, spektroskopiert. Für die Dosimetrie wurde der Energieverlust der Alphateilchen 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.“

Die vorliegende Arbeit baut auf diesem Experiment auf und dehnt die Methodik auf die Bestrahlung lebender Zellen aus. Das Ziel ist es, einen Aufbau zu konstruieren, mit dem die mutagene Wirkung langsamer α-Teilchen erforscht werden kann. Dazu sollen lebende Zellen mit definierter Energie bei guter Energieschärfe bestrahlt werden. Dabei sollen die Dosis und die Dosisleistung einfach wählbar und exakt zu kontrollieren sein. Die so bestrahlten Zellen sollen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden auf kleinste Veränderungen ihres Erbguts untersucht werden.

Im Kapitel 2 werden zahlreiche biologische und physikalische Begriffe eingeführt, die dann in den folgenden Kapiteln benutzt werden. Um die Definitionen dieser Begriffe leichter auffindbar zu machen, befindet sich am Ende der Arbeit ein Index.

Kapitel 2

Biologische und physikalische Grundlagen

2.1 Ein Häppchen molekulare Genetik

2.1.1 Bestandteile und Bindung der DNA

Die gesamte genetische Information einer Zelle ist in ihrer DNA gespeichert. DNA ist die Abkürzung der englischen Bezeichnung für Desoxyribonukleinsäure. Die DNA ist ein Polymer, das aus nur vier verschiedenen Grundelementen zusammengesetzt ist. Diese Elemente werden als Nukleotide bezeichnet. Jedes Nukleotid besteht aus einer Base, einem Zucker (der Desoxyribose) und einer Phosphatgruppe. Als Beispiel ist in Abbildung 2.1 Desoxyadenosinmonophosphat dargestellt. Die vier Nukleotide unterscheiden sich in der Base, die sie enthalten; hier kommen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) vor. Es ist üblich, zur Bezeichnung der Basen nur die abkürzenden Buchstaben zu verwenden. Für den Einsatz in molekulargenetischen Techniken werden die Nukleotide meistens in Form von Desoxy-Nukleo-Triphosphaten (dNTPs) eingesetzt. Das „N" steht dabei für A, C, G oder T.

Das DNA-Polymer wird gebildet, indem sich die Phosphatgruppe an die Desoxyribose des nächsten Nukleotids bindet. Da ein O^--Ion der Phosphatgruppe nicht zur Bindung verwendet wird, ist das DNA-Polymer ein Polyanion. Die Desoxyribose ist an ihr eigenes Phosphat über eine Hydroxyl-Gruppe gebunden. Das Phosphat des benachbarten Nukleotids ist direkt an den 3'-Kohlenstoff der Desoxyribose gebunden. Diese Asymmetrie definiert eine Richtung entlang des Polymers. Diese Richtung ist in Abbildung 2.2 gekennzeichnet. Die Basen sind nicht an der Bildung des Polymers beteiligt. Ein einzelner Strang der DNA besteht aus einem Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat, an dem die Basen hängen. Die Abfolge der Basen A, C, G und T wird als die Sequenz der DNA bezeichnet. Die Sequenz enthält die genetische Information.

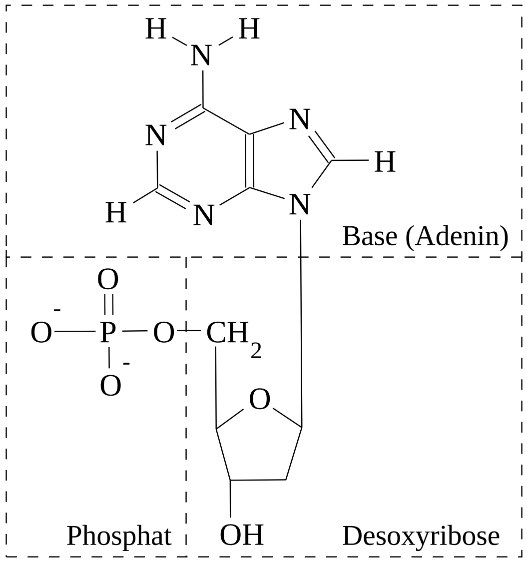

Abbildung 2.1: Strukturformel von Desoxyadenosinmonophosphat (dAMP) als Beispiel für ein Desoxy-Nukleotid. Dem entsprechenden Didesoxy-Nukleotid fehlt die OH-Gruppe in der Desoxyribose.

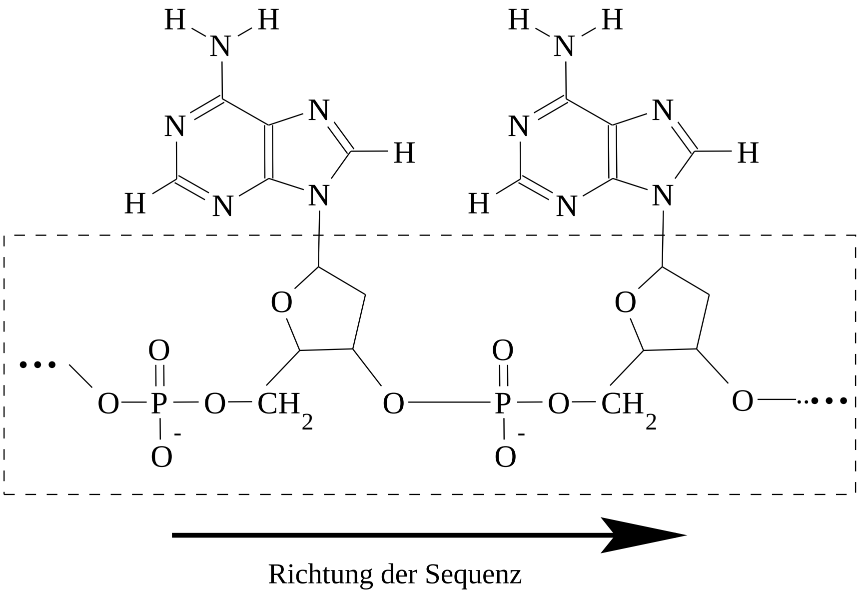

Abbildung 2.2: Bindung zwischen benachbarten Nukleotiden. Die Bestandteile des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats sind markiert.

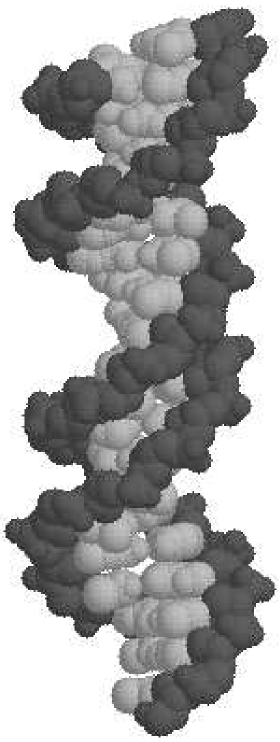

Abbildung 2.3: Modell der Doppelhelix. Der DNA-Abschnitt ist 20 Basenpaare lang. Das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat ist dunkel dargestellt, die Basen dazwischen hell.

2.1.2 Die räumliche Struktur

Zu jeder der vier Basen ist eine andere komplementär. Das bedeutet, daß diese beiden Basen miteinander eine Bindung durch Wasserstoffbrücken eingehen können. In diesem Sinne ist A komplementär zu T und C zu G. Zu jedem DNA-Einzelstrang gibt es einen, der aus den jeweils komplementären Basen aufgebaut ist. Diese beiden Einzelstränge binden sich durch die Wasserstoffbrücken an den einzelnen Basen aneinander. So entsteht der DNA-Doppelstrang. Im Sinne der oben definierten Richtung sind die beiden Einzelstränge antiparallel ausgerichtet. Da die jeweils komplementären Basen in den beiden Strängen durch die Wasserstoffbrücken Paare bilden, wird die Länge eines DNA-Abschnitts in Basenpaaren (Bp) angegeben.

Wegen der Bindungswinkel liegt der Doppelstrang nicht linear vor, sondern windet sich zu einer schraubenförmigen Struktur, der Doppelhelix. Diese Struktur wird zusätzlich durch elektrische Wechselwirkung zwischen Basen aus benachbarten Windungen stabilisiert. Die Doppelhelix ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

2.1.3 Chromosomen

Man unterteilt die Lebewesen heute danach, ob ihre Zellen einen Kern besitzen, oder nicht. Die Lebewesen mit Zellkern bezeichnet man als Eukaryoten. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel die vielzelligen Pflanzen und Tiere, aber auch Einzeller wie Hefe. Diejenigen ohne Zellkern nennt man Prokaryoten. Diese Gruppe wird von einzelligen Bakterien gebildet. Eukaryoten sind komplizierter aufgebaut als die von Prokaryoten.

Bei Prokaryoten ist die DNA über das ganze Zellinnere verteilt. An die negativ geladenen Phosphationen sind positiv geladene Metalle oder Polyamine ionisch gebunden. Bei Eukaryoten befindet sich die DNA im Zellkern, und es gibt eine zusätzliche Struktur. Die DNA bildet hier mit bestimmten Proteinen, die als Histone bezeichnet werden, das Chromatin. Dabei windet sich die Doppelhelix um Makromoleküle aus mehreren Histonen. Um eins dieser Moleküle legen sich etwa 145 Basenpaare in $1\frac{3}{4}$ Windungen. Da die Windungszahl nicht ganzzahlig ist, liegt das Chromatin nicht linear vor, sondern faltet sich. Die so entstehenden Strukturen sind die Chromosomen. Sie enthalten zusätzliche Unterstrukturen, etwa das Centromer, das die Mitte markiert, und die Telomere, die die Enden eines Chromosoms markieren. Eukaryotische Zellen, die keine Keimzellen sind, haben zwei gleiche Sätze von Chromosomen.

2.1.4 Gene

Beim Auslesen der genetischen Information wandert ein Enzymkomplex an der DNA entlang und spaltet den Doppelstrang lokal kurzfristig auf, lagert an jede Base das komplementäre Nukleotid an und bildet so eine Kopie eines DNA-Abschnitts. Dieser Vorgang heißt Transskription. Das Rückgrat des entstandenen Moleküls hat eine geringfügig andere Struktur als das der DNA. Statt Desoxyribose enthalten die einzelnen Einheiten Ribose. Das Molekül heißt daher Ribonukleinsäure (RNA).

Einen zusammenhängenden Abschnitt der DNA, der die Information für ein Merkmal enthält und als ganzer transskribiert wird, nennt man ein Gen. Ein Gen kann einige 100 bis mehrere 10000 Basenpaare lang sein. Anfang und Ende eines Gens auf der DNA sind durch charakteristische Nukleotidsequenzen gekennzeichnet. An diese lagern sich spezielle Proteine an, die dem Transskriptionsenzym mitteilen, wo es zu beginnen und aufzuhören hat.

Bei Prokaryoten enthält ein Gen in ununterbrochener Folge die Nukleotidsequenz, die sich auch in der RNA wiederfindet. Bei Eukaryotengenen wechseln sich informationstragende Abschnitte, die Exons, und nichtkodierende Abschnitte, die Introns, ab. Das Gen wird trotzdem als ganzes transskribiert, und die Abschnitte, die den Introns entsprechen, werden nachträglich von Enzymen aus der RNA entfernt. Exons sind einige 10 bis einige 100 Basenpaare lang, Introns 100 bis mehrere 1000. Auch das Verhältnis der Anzahl und Länge der Introns zu denen der Exons variiert von Gen zu Gen.

2.1.5 Mutationen

Eine Mutation ist eine dauerhafte Veränderung in einer Nukleotidsequenz. Befindet sich eine Mutation in einem Exon, so kann sie die Funktion des Gens verändern und so zu einer Abwandlung in dem Merkmal führen, für das das Gen verantwortlich ist. Solche Mutationen sind die Grundlage der Artenentstehung in der Evolution. Durch sie ändern sich Merkmale eines Lebewesens, das dadurch besser oder schlechter überleben kann. Eine Mutation kann aber auch bewirken, daß eine Zelle zur Tumorzelle wird.

Nicht jede Veränderung der Sequenz führt zu einer Mutation. Häufig entstehen Schäden in der DNA durch thermische Zerstörung der Bindung zwischen der Base und der Desoxyribose in den Nukleotiden A und G. Dieser Vorgang findet in einer menschlichen Zelle etwa 5000 bis 10000 mal pro Tag statt. Auch Chemikalien können die DNA schädigen, indem sie das Desoxyribose-Phosphat-Gerüst oder die Basen angreifen oder sich anlagern. Betreffen solche Schäden nur einen eingeschränkten Bereich eines der beiden DNA-Stränge, so können sie repariert werden, da die Information auf dem komplementären Strang noch vorhanden ist. Für diese Reparatur sind spezielle Enzyme zuständig.

Ist eine Reparatur nicht möglich und entsteht so eine Mutation, die die Zelle zur Tumorzelle machen kann, so tritt ein zelleigener Mechanismus in Aktion, der zum Tod der Zelle führen soll. So schützt sich der Zellverband vor einzelnen außer Kontrolle geratenen Zellen. Diese Art des Zelltods wird als Apoptose bezeichnet. Kommt es nicht zur Apoptose, so erben die Tochterzellen die Mutation.

2.2 Wechselwirkung langsamer Ionen mit Materie

2.2.1 Wechselwirkungsprozesse

Welche Wechselwirkungen beim Durchgang eines geladenen Teilchens durch Materie dominieren, hängt vor allem von Masse, Ladung und kinetischer Energie des Ions ab. Bezüglich der Masse unterscheidet man leichte Teilchen (Elektronen und Positronen) und schwere Teilchen (alle übrigen). Schwere Teilchen mit weniger als 10 MeV werden als langsame schwere Teilchen bezeichnet.

Der differentielle Energieverlust ist die Energie, die ein Teilchen auf einem infinitesimalen Wegstück dx an die Materie abgibt. Die Maß für die Dicke eines Streutargets wird meistens seine Massenbelegung, d. h. die Masse pro Fläche, angegeben. Daher ist es üblich, als Längeneinheit für dx $\frac{\mu g}{cm^2}$ zu benutzten. Damit ist die Einheit des differentiellen Energieverlustes $\left(\frac{dE}{dx}\right)$ $\frac{keV\,cm^2}{\mu g}$.

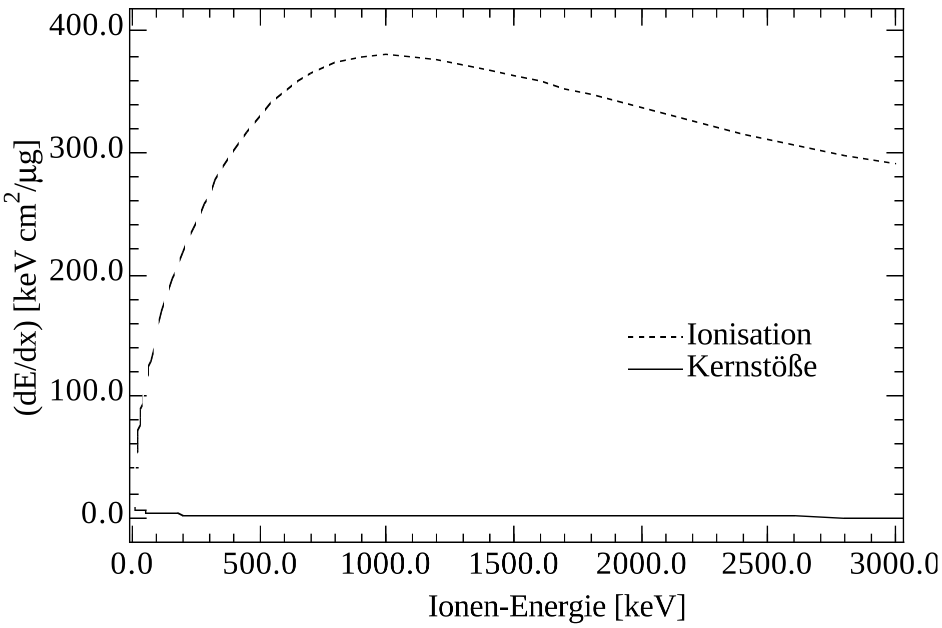

Abbildung 2.4: Anteile der Ionisation und der Kernstöße am differentiellen Energieverlust von α-Teilchen in Gold. Die Werte wurden mit dem Programm STOPPING&RANGES aus dem TRIM-Paket [58] ermittelt.

Im folgenden wird nur der Energieverlust von α-Teilchen von weniger als 3 MeV betrachtet. Die Prozesse, die beim Energieverlust solcher Ionen eine Rolle spielen, sind

1. unelastische Stöße mit gebundenen Elektronen (Ionisationsbremsung),

2. elastische Stöße mit Atomkernen,

3. Induktion von Gitterschwingungen (Phononen).

Alle drei Effekte werden bei langsamen Teilchen durch die Coulomb-Wechselwirkung vermittelt.

In Abbildung 2.4 sind die Energieverluste durch Kernstöße und Ionisation für α-Teilchen in Gold dargestellt. Die Induktion von Phononen spielt erst bei Energien von wenigen eV eine nennenswerte Rolle (Musiol [36]) und ist daher nicht mit dargestellt. Man erkennt, daß die Ionisationsbremsung für langsame schwere Teilchen der wesentliche Effekt ist. Im Bereich über 150 keV ist der Anteil der Kernstöße am gesamten Energieverlust weniger als 1,5%.

In der Strahlenbiologie wird der totale Energieverlust ionisierender Strahlung pro Weg als linearer Energietransfer (LET) bezeichnet. Der betrachtete Weg ist dabei die Projektion der Teilchenbahn auf seine Richtung beim Eintritt in das Material. Die übliche Einheit ist $\frac{keV}{\mu m}$.

2.2.2 Die Bethe-Bloch-Gleichung

Ein Ausdruck, der die Ionisationsbremsung geladener Teilchen beschreibt, wurde von Bethe und Bloch abgeleitet. Die Bethe-Bloch-Gleichung lautet (Musiol [36]

$$\left(\frac{dE}{dx}\right) = \frac{Z_1^2\, e^4\, n_e}{v^2\, m_e}\left(\ln\frac{2\, m_e\, v^2}{\langle E_B\rangle} - \ln\left(1-\beta^2\right) - \beta^2\right). \tag{2.1}$$

In dieser Gleichung ist Z_1 die Ladung des Ions, v seine Geschwindigkeit, e die Ladung des Elektrons, m_e seine Masse, n_e die Elektronendichte und $\langle E_B\rangle$ die mittlere Ionisierungsenergie im Targetmaterial und $\beta = \frac{v}{c}$. Mit der Ruhemasse des α-Teilchens $m_\alpha c^2$=3724,3 MeV ist bei einer kinetischen Energie von 2 MeV

$$\beta = \frac{v}{c} = \sqrt{1 - \left[\frac{m_\alpha c^2}{E_{kin} + m_\alpha c^2}\right]^2} \approx 0,03 \ll 1. \tag{2.2}$$

Der zweite und dritte Summand in Gleichung 2.1, die relativistische Korrekturen beschreiben, können also vernachlässigt werden.

Die Elektronendichte n_e kann durch die Ordnungszahl Z_2, die Atommasse A, die Dichte ρ und die Avogadro-Konstante N_A ausgedrückt werden:

$$n_e = \rho\,\frac{Z_2\, N_A}{A}. \tag{2.3}$$

Benutzt man dann noch $E_{kin} = \frac{1}{2} m_\alpha v^2$ ist, so wird Gleichung 2.1 zu:

$$\left(\frac{dE}{dx}\right) = \frac{Z_1^2\, Z_2\, e^4\, N_A\, \rho\, m_\alpha}{2\, A\, E_{kin}\, m_e} \cdot \ln\frac{4\, m_e\, E_{kin}}{\langle E_B\rangle\, m_\alpha}. \tag{2.4}$$

2.2.3 Die effektive Ladung

Der Ausdruck in Gleichung 2.4 beschreibt die Ionisationsbremsung nicht für beliebig kleine Energien. Für $E_{kin} \to 0$ divergiert der Ausdruck, was physikalisch nicht sinnvoll ist. Tatsächlich nimmt der Energieverlust mit abnehmender Energie zu, bis er ein Maximum, das Bragg-Maximum, erreicht, und nimmt dann wieder ab. Dieses Verhalten läßt sich in die Gleichung 2.4 einführen, indem man Z_1 durch eine energieabhängige effektive Ladung Z_{eff} ersetzt. Ist die Geschwindigkeit des Ions vergleichbar mit der der Hüllenelektronen auf der K-Schale, wird die Umladung, d. h. der Einfang von Elektronen durch das Ion, bedeutsam. Diese Bedingung kann man als

$$\beta \le \alpha \cdot Z_2 \tag{2.5}$$

formulieren (Musiol [36]), wobei α die Feinstrukturkonstante ist. Für Gold, mit Z_2=79, ist $\alpha \cdot Z_2 \approx 0,58$, man erwartet also eine deutliche Abweichung von der Bethe-Bloch-Gleichung.

Während des Abbremsens verringert sich die effektive Ladung des Ions durch den Elektroneneinfang. Statt eines Ions der Ladung Z_1 bewegt sich ein System aus Ion und Elektronen, das ständig Elektronen mit der Umgebung austauscht. Weil dieser Vorgang ein sehr komplexes quantenmechanisches Problem ist, gibt es noch keine vollständige theoretische Behandlung.

Formeln für die effektive Ladung werden empirisch abgeleitet. Um sicherzustellen, daß der Energieverlust für $E_{kin} \rightarrow 0$ gegen 0 geht, muß der Faktor vor dem Logarithmus in Gleichung 2.4 in beliebig kleiner *positiver* Potenz von E_{kin}abhängen. Z_1 muß also in höherer Ordnung als $\frac{1}{2}$ von E_{kin}abhängen. Außerdem enthalten sie meist Z_2, um die Abhängigkeit vom Targetmaterial zu berücksichtigen. Beispiele für solche Formeln finden sich bei Barkas [4], Azziz [3], Öztürk [38] und Ziegler [59].

2.2.4 Empirische Formeln für den Energieverlust

Weil eine theoretische Ableitung des Energieverlustes von Ionen in Materie noch nicht gelungen ist, geht man einen anderen Weg. Eine Funktion, deren Form den experimentell ermittelten Zusammenhang zwischen Ionen-Energie und Energieverlust gut beschreibt, wird an eine möglichst große Basis von Meßdaten angepaßt. Eine solche Funktion wird von Ziegler, Biersack und Littmark vorgeschlagen [59], eine andere von der ICRU[1] in ihrem Report 49 [24]. Auf der Arbeit von Ziegler et al. beruht das Programmpaket TRIM [58], auf dem ICRU-Report das Paket ESTAR, PSTAR & ASTAR [7].

Ziegler et al. [57] schlagen unterschiedliche Funktionen für gasförmige und feste Targets, für langsame und schnelle Ionen und für Protonen und Helium-Ionen vor. Die Funktion für die Ionenbremsung S_e von Helium-Ionen, die sich mit einer Energie E_{kin}von weniger als 10 MeV in einem festen Target bewegen, lautet

$$\frac{1}{S_e} = \frac{1}{S_L} + \frac{1}{S_H} \tag{2.6}$$

$$S_L = A_1 \cdot E_{kin}^{A_2} \tag{2.7}$$

$$S_H = \frac{1000 \cdot A_3}{E_{kin}} \cdot \ln\left(1 + \frac{1000 \cdot A_4}{E_{kin}} + \frac{A_5 \cdot E_{kin}}{1000}\right). \tag{2.8}$$

Die Parameter $A_1 \ldots A_5$ sind für alle Elemente tabelliert, dabei ist aber zu beachten, daß sie nur für 12 Elemente (H, He, C, N, O, Ne, Al, Ar, Cu, Kr, Ag, Au) auf Messungen mit Helium-Ionen beruhen. Die anderen Werte wurden mit Hilfe einer Formel für die effektive Ladung aus Meßwerten für Protonen skaliert.

Bei der Anpassung der Funktionsparameter an die Meßdaten ordnen sowohl die ICRU als auch Ziegler et al. jeder Veröffentlichung ein Gewicht zu, das die Vertrauenswürdigkeit der Experimentatoren beschreiben soll. Deshalb, und weil

[1] International Commission on Radiation Units

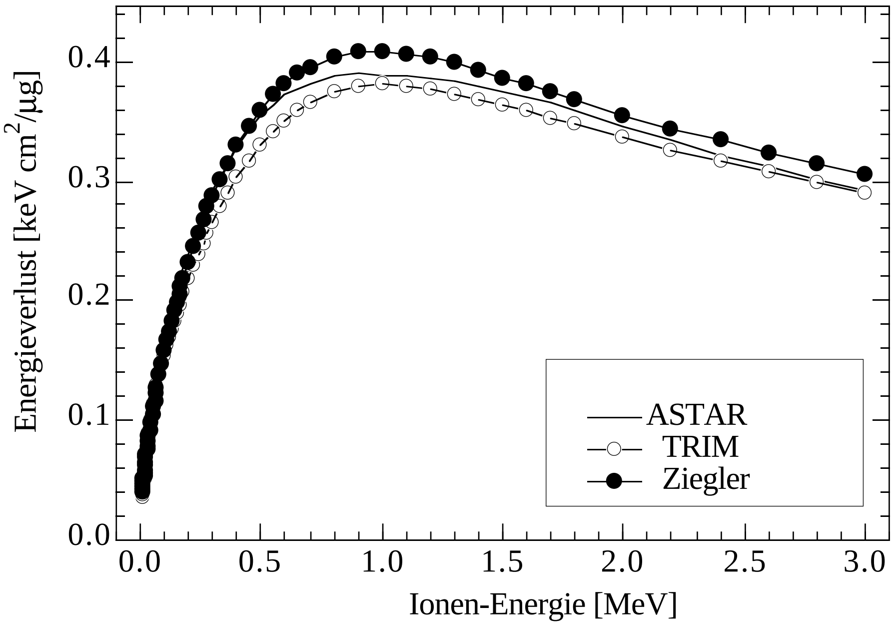

Abbildung 2.5: Ionisationsbremsung von Helium-Ionen in Gold. Berechnet mit ASTAR, TRIM und Gleichungen 2.6–2.8.

sie teilweise auf verschiedenen Veröffentlichungen beruhen, unterscheiden sich die mit ASTAR und TRIM berechneten Energieverluste. Die Tabellen zu Gleichungen 2.6–2.8 wurden bereits 1977 veröffentlicht. Da die inzwischen gewonnenen Ergebnisse in die aktuelle Version 95.6 von TRIM eingeflossen sind, unterscheiden sich auch diese Werte. Die verschiedenen Energieverlustkurven sind für Gold in Abbildung 2.5 verglichen. Da sich die Zahlenwerte nur um einige Prozent unterscheiden, werden in dieser Arbeit die Gleichungen 2.6–2.8 benutzt.

Um den Energieverlust durch Stoß mit Targetkernen zu berechnen, schlägt Ziegler [57] vor, zunächst eine Rechengröße, die reduzierte Ionenenergie

$$\epsilon = \frac{32,53 \cdot M_2 \cdot E}{Z_1 Z_2 (M_1 + M_2)\left(Z_1^{\frac{2}{3}} + Z_2^{\frac{2}{3}}\right)^{\frac{1}{2}}} \tag{2.9}$$

zu berechnen. Dabei sind M_1 und M_2 die Massen des Projektils bzw. des Targets. Mit der reduzierten Ionenenergie berechnet man dann den Energieverlust durch Kernstöße mit der Fallunterscheidung

$$S_n = 1,593\sqrt{\epsilon} \qquad (\epsilon < 0,01) \tag{2.10}$$

$$S_n = 1,7\sqrt{\epsilon} \cdot \frac{\ln(\epsilon + \exp(1))}{1 + 6,8 + 3,4\sqrt{\epsilon^3}} \qquad (0,01 \le \epsilon \le 10) \tag{2.11}$$

$$S_n = \frac{\ln(0,47\epsilon)}{2\epsilon} \qquad (\epsilon > 10). \tag{2.12}$$

2.2.5 Die Bragg-Regel

Um den Energieverlust in einem aus mehreren Elementen zusammengesetzten Material zu bestimmen, bedient man sich der Bragg-Regel. Sie besagt, daß der Energieverlust im Mischmaterial gleich der mit den Gewichtsanteilen w_i gewichteten Summe der Energieverluste $\left(\frac{dE}{dx}\right)_i$ in den beteiligten Elementen ist [23]:

$$\left(\frac{dE}{dx}\right)_{ges.} = \sum_i w_i \left(\frac{dE}{dx}\right)_i . \tag{2.13}$$

Die Gleichung 2.13 berücksichtigt offensichtlich nicht die geänderten Energieverhältnisse, die durch die chemische Bindung im Targetmaterial entstehen. Diese sind besonders bei komplexen Molekülen, wie etwa langkettigen Kunststoffen, von großer Bedeutung. Thwaites [52] gibt an, daß die Ionenbremsung unterhalb des Bragg-Maximums bis zu 25% von den so berechneten Werten abweicht. Er empfiehlt, bei großen Molekülen die Bragg-Regel nicht auf die beteiligten Elemente anzuwenden, sondern das Molekül rechnerisch in die größten Gruppen zu zerlegen, für die Energieverlustdaten vorliegen. Die Bragg-Regel soll dann auf diese Gruppen angewandt werden.

2.2.6 Struktur der Teilchenbahn

Ein α-Teilchen gibt seine Energie vor allem durch Ionisationen an die Materie ab (vgl. Abschnitt 2.2.1). Seine Bahn besteht also aus diskreten ionisierten Gebieten. Nach Kiefer [26] ist der Abstand dieser Gebiete näherungsweise

$$a = \frac{E_P}{\left(\frac{dE}{dx}\right)} \tag{2.14}$$

wobei E_P die mittlere pro Ionisation übertragene Energie ist. Bei einer solchen primären Ionisation entstehen mehrere Ionenpaare, da das Elektron, das die Energie aufnimmt, seinerseits weitere Ionisationen bewirkt. Der Radius des so entstehenden ionisierten Bereichs wird durch die Reichweite des zuerst ionisierten Elektrons bestimmt.

Um die Struktur der Teilchenbahn zu bestimmen, wird ein α-Teilchen von 1 MeV betrachtet. Die Rechnung mit STOPPING & RANGES [58] liefert einen Energieverlust von 211 $\frac{keV}{\mu m}$. Nimmt man mit Kiefer [26] an, daß der Energieübertrag bei einer primären Ionisation 60 eV beträgt, so ist der Abstand zweier Primärereignisse a=0,28 nm. Als mittlerer Energieverlust von Elektronen in Wasser findet sich ebenfalls bei Kiefer $10\frac{keV}{\mu m}$. Damit haben schon Elektronen von nur 3 eV eine Reichweite von 0,3 nm. Der Radius der ionisierten Gebiete ist also größer als ihr Abstand, die Bahnspur des α-Teilchens ist ein durchgehender Ionisationskanal.

2.3 Strahlenschäden in der DNA

Wie in Abschnitt 2.2.1 gezeigt, ist der wesentliche Effekt beim Durchgang eines langsamen schweren Ions durch Materie die Ionisation. Abhängig davon, wo die Ionisation stattfindet, kann eine Vielzahl verschiedener Schäden entstehen. Zunächst muß zwischen direkten und indirekten Schäden unterschieden werden. Direkte Schäden entstehen bei Ionisationen im DNA-Molekül, indirekte verändern eine Substanz außerhalb der DNA so, daß sie die DNA schädigt.

Die häufigsten Schäden an der DNA sind

- Veränderungen der Basen durch Ionisation oder Radikalangriff,
- Bruch eines oder beider DNA-Stränge durch Ionisation oder Radikalangriff im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat,
- Bindung von Proteinen an die DNA und
- Vernetzung innerhalb des DNA-Moleküls.

Alle diese Veränderungen können zum Zelltod führen, von dem in Abschnitt 2.1.5 erwähnten Reparaturmechanismus behoben werden oder – eventuell nach unvollständiger Reparatur – als Mutationen bestehen bleiben.

Goodhead [19] hat mit Monte-Carlo-Methoden die Bahnspuren geladener Teilchen und ihrer Sekundärelektronen simuliert. Dabei stellte sich heraus, daß besonders Cluster von vielen und verschiedenartigen Schäden in einem eingeschränkten Bereich der DNA biologische Folgen für die Zelle haben. Solche Schadenscluster entstehen durch hohe Ionendichten, die Trümmerbrüche der DNA verursachen. Die Wahrscheinlichkeit für solche Ereignisse mit hoher Schadensdichte steigt mit dem LET.

2.4 Bisherige Experimente

2.4.1 Experimente mit Quellen

Für die Bestrahlung lebender Zellen mit α-Teilchen werden oft Quellen benutzt. Abbildung 2.6 zeigt als Beispiel den Aufbau, den Inkret et al. [22] benutzt haben. Die Vorteile eines solchen Apparats liegen in der einfachen Konstruktion und Handhabung. Die benutzten Quellen liefern aber α-Energien oberhalb von 5 MeV. Um die Auswirkungen niederenergetischer Strahlung untersuchen zu können, wird die Energie reduziert, indem man Mylar-Folien zwischen die Quelle und die Proben legt. Dadurch wird aber auch die Energieverteilung verbreitert. Um die Energie auf 2 MeV zu reduzieren, benutzen Inkret et al. 9 μm Mylar. Die Halbwertsbreite der Energieverteilung verschlechtert sich dabei von 190 keV auf 380 keV. Die Linienbreite von 190 keV ohne Filter kommt daher, daß sich der ganze Aufbau

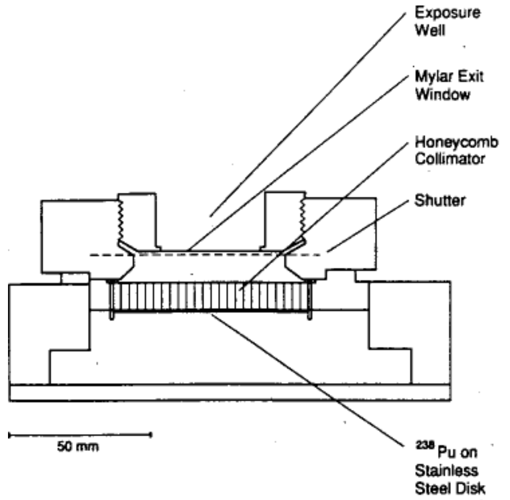

Abbildung 2.6: Der Bestrahlungsaufbau von Raju et al. als Beispiel für die Bestrahlung mit einer Quelle

an der Luft befindet. Die große Energieunschärfe ist der wesentliche Nachteil der Bestrahlung mit Quellen und macht diese Technik für Untersuchungen unterhalb von 1 MeV α-Energie ungeeignet.

2.4.2 Experimente am Beschleuniger

Eine bessere Energieschärfe läßt sich bei Experimenten mit Ionenbeschleunigern erreichen. Aufbauten für solche Versuche wurden von Lloyd et al. [30], Colvett und Rohrig [12], Bird et al. [8] und Napolitano et al. [37] konstruiert. Dabei stellten sich drei wesentliche Probleme:

1. Die Zellen müssen unter Normaldruck gehalten werden, folglich muß ein Vakuumaustrittsfenster für die Ionen konstruiert werden.

2. Der Teilchenstrom eines Beschleunigers ist in der Regel so groß, daß die Zellen innerhalb von Sekundenbruchteilen zu hohe Dosen aufnehmen.

3. In herkömmlichen Beschleunigern ist die Strahlachse horizontal. Um die Zellen gleichmäßig zu bestrahlen müssen sie entweder senkrecht ausgerichtet werden, oder der Strahl muß um 90° abgelenkt werden.

Lloyd et al. verwenden zur Verringerung der Intensität eine Goldfolie. Diese befindet sich im Strahl und streut ihn auf. Der Experimentierplatz liegt 10 m von diesem Target entfernt. Auf diese Weise wird der Raumwinkel der Probe und somit der Strom verringert. Als Vakuumaustrittsfenster wird eine 25 μm dicke Aluminiumfolie verwendet. Dadurch sind nur Experimente bei Energien von mehr als 6 MeV möglich, und die Energieschärfe des Strahls leidet unter dem dicken

Fenster. Trotz seiner Dicke biegt sich dieses Fenster zum Vakuum hin durch. Dadurch haben die α-Teilchen unterschiedlich viel Luft zu durchdringen, bevor sie die Zellen erreichen. Die Zellen werden in Petrischalen angezogen, die dann senkrecht vor das Vakuumfenster gebracht werden. Im Verlaufe einer Bestrahlung fließen sie langsam herab.

Um dieses Problem zu umgehen, verwenden Bird et al. einen Spektroskopiemagneten, der die α-Teilchen nach oben ablenkt. Dies stellt einen erheblichen experimentellen Aufwand dar und verursacht hohe Kosten, falls der Spektroskopiemagnet noch nicht vorhanden ist. Der Aufbau von Bird et al. ist durch eine Mylar-Folie gegen Normaldruck abgeschlossen. Auch diese ist mit 15 μm so dick, daß nur α-Teilchen mittlerer Energie mit mäßiger Energieschärfe am Probenort verwendet werden können.

Colvett und Rohrig verwenden kein Vakuumfenster. Am Ende des von ihnen benutzten Strahlrohrs befinden sich differentielle Vakuumpumpstufen und ein Schieber. Dieser wird nur während der Bestrahlung geöffnet. Durch die Pumpstufen stellt sich ein Vakuumgradient von fast Normaldruck außerhalb bis zu ca. 10^{-5} Torr im Strahlrohr ein. Die Zellen sind während der Bestrahlung starken Druckschwankungen ausgesetzt, die sich in der Überlebensrate niederschlagen. Die Zellen sind in diesem Aufbau wiederum in Petrischalen senkrecht angeordnet.

Ebenfalls mit senkrechter Probenausrichtung arbeiten Napolitano et al. Da sie ortsaufgelöste Bestrahlungen durchführen wollen, muß das Herabfließen der Zellen in den Petrischalen verhindert werden. Dazu werden die Zellen in den Petrischalen getrocknet und während der Bestrahlung kontinuierlich gedreht. Die Zellen werden anschließend in den Petrischalen aufgeschwemmt und auf ein Nährmedium gebracht. Napolitano et al. weisen darauf hin, daß das Drehen während der Bestrahlung die Überlebensrate der Zellen beeinflußt. Von den Zellen aus Petrischalen, die nicht gedreht wurden, wachsen ca. 20% an. Nach 4 minütigem Drehen sinkt dieser Anteil auf etwa 10%, nach 15 min sogar unter 5%. Dieser Effekt wird von Napolitano et al. nicht erklärt. Er macht aber eine Auswertung der überlebenden Zellen problematisch.

In diesen Beschleunigerexperimenten wurde untersucht, welcher Anteil der Zellen durch die Bestrahlung abgetötet wird. Dieser Effekt ist leicht nachzuweisen, steht aber in Konkurrenz zur Mutation der Zellen. Auch der Mutationseffekt wurde mit den oben beschriebenen Aufbauten untersucht, meist von anderen Experimentatoren. Zu erwähnen ist die Arbeit von Jin et al. [25], in der der Apparat von Bird benutzt wurde. Es wurde die DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis untersucht. Dabei wurden geringe Dosen durch γ-Strahlung, hohe durch α-Teilchen eingebracht. Dieses Vorgehen berücksichtigt nicht die unterschiedliche Art der Schäden, die durch die verschiedenen Strahlungsarten hervorgerufen werden.

Kapitel 3

Die biologische Methode

3.1 Die biologischen Techniken

Ziel der Untersuchungen war es, kleinste Mutationen der DNA nachzuweisen. Die kleinste nachweisbare Mutation ist eine Veränderung einer einzelnen Base. Solche sogenannten Punktmutationen lassen sich unter anderem durch Sequenzierung oder die Methode des Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) nachweisen. Beide beruhen auf dem Prinzip der Elektrophorese. Um die benötigten DNA-Mengen zu gewinnen, kann man zuvor die Polymerase-Kettenreaktion durchführen. Diese Techniken werden im folgenden erläutert.

3.1.1 Elektrophorese

DNA-Bruchstücke unterschiedlicher Länge oder Form lassen sich durch Elektrophorese trennen. Dazu wird die DNA-Lösung in Vertiefungen (slots) in einem Gel pipettiert. Dieses Gel besteht aus Agarose oder Polyacrylamid. Anschließend wird eine Spannung an das Gel angelegt. Da die DNA ein Polyanion ist, beginnt sie sich im Gel entlang des elektrischen Feldes zu bewegen. Die DNA-Bruchstücke bewegen sich entsprechend ihrer Beweglichkeit im Gel unterschiedlich weit. Die Beweglichkeit hängt bei Doppelsträngen von ihrer Länge ab, bei gleich langen Einzelsträngen von ihrer Sekundärstruktur (vgl. Abschnitt 3.1.4).

Das entstandene Bandenmuster läßt sich durch Anfärben der DNA sichtbar machen. Dazu legt man das Gel in ein Ethidiumbromid-Bad. Das Ethidiumbromid interkaliert in den Zwischenräumen der Doppelhelix. Anschließend wird das Gel unter ultraviolettem Licht fotografiert. Da das Ethidiumbromid bei Anregung in diesem Spektralbereich fluoresziert, werden die Bereiche des Gels, in denen sich DNA befindet, als Schwärzungen im Negativ sichtbar (Abbildung 3.1). Die Trennschärfe des Verfahrens läßt sich durch die Wahl des Gels, der Spannung und der Temperatur verbessern.

Bei der submarinen Elektrophorese wird das Gel in eine Kammer gelegt, die wenig größer ist als das Gel. Die Kammer wird anschließend mit einer Puf-

Abbildung 3.1: Negativ der Fotografie eines Elektrophoresegels. Man erkennt die DNA-Ansammlungen als dunkle Querstreifen. Unterschiedliche Lauflänge nach oben bedeutet unterschiedliche Größe der Bruchstücke. Man erkennt auch die Längsstreifen (Lanes), die jeweils aus einem Slot stammen. (Foto aus [42])

ferlösung aufgefüllt. Die Elektroden, mit deren Hilfe die Spannung angelegt wird, tauchen an den Enden der Kammer in diesen Puffer ein.

Es gibt standardisierte Mischungen von DNA-Bruchstücken definierter Länge. Man kann einen solchen Standard zusätzlich zur zu untersuchenden DNA in eigene Slots im Gel einsetzen. An den Banden in dieser Lane kann man die absolute Länge der in der Probe enthaltenen Bruchstücke leicht ablesen.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für den Nachweis von Mutationen sind gewisse Mindestmengen an DNA erforderlich, z. B. 100 ng für eine Sequenzierung. Eine Hefezelle enthält aber nur 0,025 pg DNA, eine menschliche 6 pg. Man kann DNA vermehren, indem man einzelne Zellen auf ein Nährmedium bringt. Die Zellen teilen und bilden identische Nachkommen, sogenannte Klone. Diese Methode ist langwierig und birgt die Gefahr, daß eine spontane Mutation auftritt und weiter vermehrt wird. Eine solche Mutation ist nicht von einer durch die Bestrahlung hervorgerufenen zu unterscheiden und verfälscht das Ergebnis. Außerdem ist die Erzeugung von Klonen nicht mit

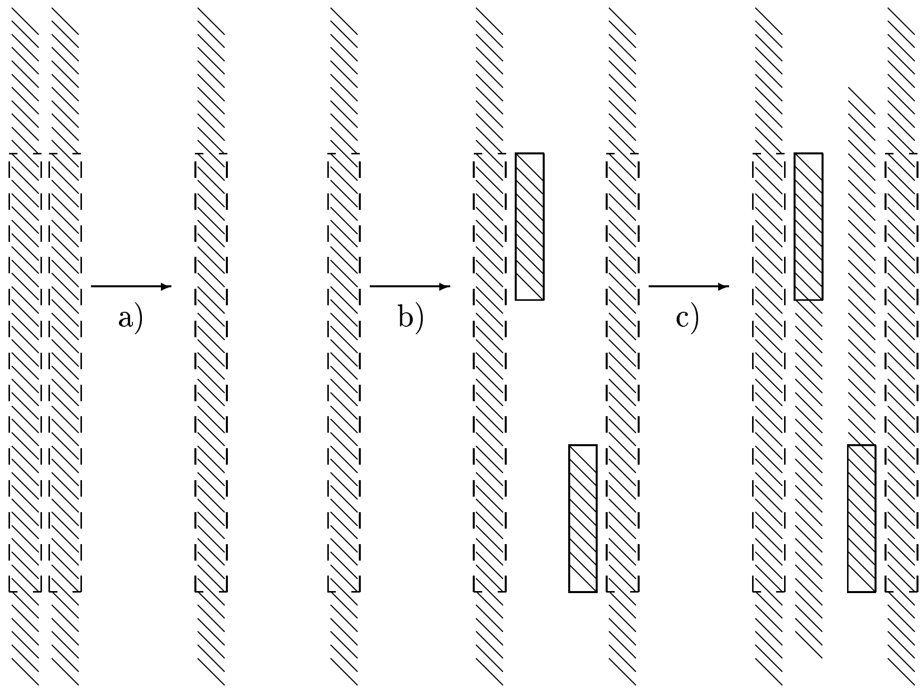

Abbildung 3.2: Die drei Schritte eines PCR-Zyklus: a) Denaturierung, b) Hybridisierung der Primer, c) Verlängerung der Primer. Die Zielsequenz ist hervorgehoben.

allen Zelltypen durchführbar.

Im Reagenzglas läßt sich DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR nach englisch: polymerase chain reaction) vervielfältigen. Um einen Abschnitt der DNA mittels PCR gezielt zu vermehren, benötigt man

1. kurze DNA-Stücke, die zum Anfang der Zielsequenz auf einem Strang und zum Ende der Zielsequenz auf dem anderen Strang komplementär sind, sogenannte Primer,

2. DNA-Polymerase, ein Enzym, das die DNA durch Aneinanderreihen von Nukleotiden kopieren kann und

3. Nukleotide, die dafür zur Verfügung stehen.

Diese Komponenten werden mit der zu untersuchenden DNA gemischt.

Die PCR hat drei Teilreaktionen (Abbildung 3.2). Im ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf 94°C erwärmt. Dabei lösen sich die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden DNA-Strängen (Denaturierung). Im zweiten Schritt wird das Gemisch auf 55–60 °C (je nach Länge der Primer) abgekühlt. Dabei lagern sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen am Anfang und Ende der Zielsequenz an (Hybridisierung). Im dritten Schritt wird das Reaktionsgemisch

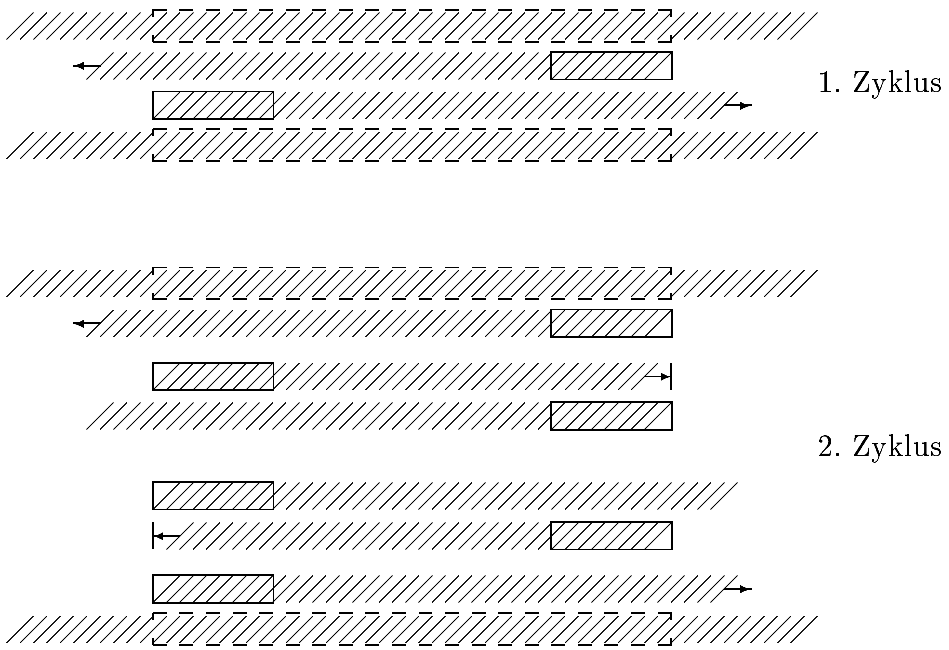

Abbildung 3.3: Entstehung des PCR-Produktes. Die sekundären DNA-Kopien sind genau so lang wie die Sequenz zwischen den beiden Primern.

auf 72 °C erwärmt. Jetzt verlängert die Polymerase die Primer entsprechend der Zielsequenz.

Diese drei Reaktionen werden 25– bis 40-mal wiederholt. Da die im vorhergehenden Zyklus erzeugten Kopien jeweils mit repliziert werden, vermehrt man den gewünschten DNA-Abschnitt exponentiell. Die Polymerase der meisten Zellen ist nicht hitzestabil, daher wird für die PCR die Polymerase des Bakteriums „Thermus aquaticus“ verwendet. Dieses Bakterium kann bei 95°C existieren. Die Polymerase des „Thermus aquaticus“ wird kurz Taq-Polymerase genannt.

In der PCR entstehen vorwiegend DNA-Abschnitte, die genau die Länge der untersuchten Sequenz zwischen den Primern haben. Dieser Sachverhalt wird anhand der Abbildung 3.3 erläutert. Die Kopien, die direkt von der ursprünglichen DNA stammen, haben einen durch den Primer definierten Anfang und eine unbestimmte Länge, die aber über die Hybridisierungsstelle des anderen Primers hinausreicht. Im zweiten Zyklus lagert sich dieser Primer an die Kopien an und wird verlängert. Da die Kopien aber mit dem ersten Primer beginnen, haben ihre Kopien nun ein definiertes Ende. Die sekundären Kopien entsprechen genau dem DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primern.

Man wählt die Primer in der Regel so, daß sie sich im Abstand einiger 100 Basenpaare an die DNA anlagern.

3.1.3 Sequenzierung

Mit Hilfe der Sequenzierung läßt sich die Abfolge der Nukleotide in einem DNA-Abschnitt genau bestimmen. Hier wird die „Didesoxy-Sequenzierung“ nach Sanger [45] beschrieben.

Zunächst wird der zu sequenzierende DNA-Doppelstrang auf chemischem Wege dauerhaft denaturiert. Anschließend wird ein geeigneter Primer zugesetzt, der sich am Anfang der Sequenz anlagert. Dann wird das Reaktionsgemisch auf vier Gefäße verteilt. Jedem Gemisch werden die vier Nukleotide und DNA-Polymerase zugesetzt. In einen der Ansätze gibt man zusätzlich ein Didesoxy-Nukleotid, das dem Nukleotid A entspricht. Der Unterschied zum einfachen Desoxy-Nukleotid besteht darin, daß dem Didesoxy-Nukleotid auch die zweite Hydroxyl-Gruppe fehlt. Dadurch kann an dieses Nukleotid kein weiteres mehr gebunden werden. Ein DNA-Polymer, in das die Polymerase das Didesoxy-Nukleotid eingebaut hat, endet an dieser Stelle. Da das im ersten Ansatz einem A entspricht, enden alle DNA-Polymere in diesem Ansatz mit einem A. Weil aber auch das entsprechende Desoxy-Nukleotid vorhanden ist und eingebaut wird, entstehen Abschnitte unterschiedlicher Länge. Die entsprechende Reaktion wird in den drei anderen Reaktionsgemischen so durchgeführt, daß die entstehenden Stränge dort mit C, G bzw. T enden.

Die vier Ansätze werden nun zur Elektrophorese nebeneinander in ein Gel eingesetzt, und die Slots werden entsprechend markiert. Durch Anfärben der DNA macht man das Bandenmuster sichtbar. Das kürzeste Fragment ist um ein Nukleotid länger als der Primer. Findet es sich beispielsweise in der Spalte (Lane) auf dem Gel, die aus dem Slot A stammt, muß die Sequenz mit A beginnen. Findet sich das nächst längere Stück in der Lane C, muß die Sequenz AC... lauten. So läßt sich die ganze Sequenz leicht am Gel ablesen.

Im Institut für Strahlenbiologie steht ein automatisches Sequenziergerät Modell 4000 der Firma Li-Cor zur Verfügung. Zur Sequenzierung wird die DNA wie oben beschrieben vorbereitet und im Sequenziergerät in ein Gel pipettiert. Die Elektrophorese wird dann automatisch so durchgeführt, daß kein Bandenmuster entsteht, sondern die einzelnen Banden nacheinander aus dem Gel herauslaufen. Die Kante des Gels wird dabei ständig von einem Laser gescannt. Die Information, wann in welcher Lane eine Bande das Gel verläßt, wird an einen Computer übertragen. Der zeichnet so direkt die Sequenz auf.

Führt man die Sequenzierung vor und nach der Bestrahlung durch, kann man Punktmutationen sofort erkennen. Dabei ist es nötig, auch unbestrahlte Proben zu sequenzieren, da auch spontane Mutationen zu erwarten sind. Zieht man den so ermittelten Untergrund ab, erhält man die strahlungsinduzierte Mutationsrate.

3.1.4 Single Strand Conformation Polymorphism

Um in einer großen Menge von Proben die wenigen mutierten Zellen zu finden, ist die Sequenzierung zu aufwendig. Man benötigt ein Verfahren, das es erlaubt, auf einfachere Weise die mutierte DNA zu finden, um diese dann gezielt auf die Art der Mutation zu untersuchen. Es bietet sich die Methode des Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) an. Diese Methode wurde von Orita et al. entwickelt [31, 32].

Wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen denaturiert und anschließend wieder abgekühlt, so lagern sich die komplementären Einzelstränge wieder aneinander. Man kann das verhindern, indem man die DNA so schnell abkühlt, daß den Einzelsträngen keine Zeit bleibt, sich an ihre Gegenstücke zu binden. So lassen sich 10–15% der DNA in Einzelstränge trennen. Jeder so entstandene Einzelstrang bildet ein Knäuel, dessen Form für seine Sequenz charakteristisch ist. Die verschieden aufgeknäuelten Einzelstränge lassen sich durch Elektrophorese trennen.

Führt man dieses Verfahren mit den PCR-Produkten durch, so entstehen zwei Banden im Gel, die den beiden Einzelsträngen des Doppelstranges entsprechen. Hat eine Mutation stattgefunden, so erscheinen die beiden Banden wegen der geänderten Sequenz an anderen Stellen. Die ursprünglichen Banden verschwinden, weil die PCR-Produkte die Kopie der DNA einer einzigen mutierten Zelle sind und so ausschließlich die veränderte Sequenz enthalten.

3.2 Das biologische System

Bei der Auswahl geeigneter Zellen sind einige Randbedingungen zu beachten. Die Zellen müssen

1. Eukaryoten sein, damit die Struktur ihres Erbguts der beim Menschen ähnelt (vgl. Abschnitt 2.1.3),

2. mit im Institut für Strahlenbiologie beherrschten Methoden zu vermehren sein,

3. robust genug sein, für die Dauer der Bestrahlung unter den Bedingungen, die im Bestrahlungsaufbau herrschen, zu überleben,

4. aus Einzelzellen Kolonien bilden, damit sich bei der Auswertung Mutationen in verschiedenen Zellen trennen lassen,

5. mit den oben beschriebenen Methoden auf Mutationen zu untersuchen sein,

6. preiswert sein, damit das Projekt im Rahmen einer Diplomarbeit finanzierbar bleibt,

7. einen Monolayer am Boden des Probengefäßes bilden, damit die Dosis bei allen bestrahlten Zellen gleich ist.

Gerade im Hinblick auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen wären menschliche Lungenzellen ein ideales Zellsystem. Es gibt Stämme dieser Zellen, die auf Kunststoffolien als Monolayer wachsen. Leider gibt es im Institut für Strahlenbiologie noch keine Erfahrungen mit der Handhabung dieser Zellen.

In allen Punkten geeignet sind Hefezellen. Hefen sind, wie schon in Abschnitt 2.1.3 bemerkt, Eukaryoten. In einer Nährlösung bei geeigneter Temperatur vermehren sie sich gut. Sie sind sehr robust und bilden auf einem Nährmedium aus Einzelzellen Kolonien.

3.2.1 Yeast Artificial Chromosomes

Es ist heute möglich, ein menschliches Gen mit den Strukturen eines Hefegens, die ein vollständiges Chromosom ausmachen, zu kombinieren (vgl. Abschnitt 2.1.3). Dieses Chromosom werden in Hefezellen eingeschleust und von der Zelle bei jeder Teilung kopiert und den Tochterzellen weitergegeben. Ein solches künstliches Chromosom wird daher als Yeast[1] Artificial Chromosome (YAC) bezeichnet. In das YAC wird auch ein Hefe-Gen eingebaut, das für den Stoffwechsel der Zelle notwendig ist. Diese YAC wird dann Zellen eingepflanzt, die das Stoffwechsel-Gen vorher nicht besitzen, sogenannte Mangelmutanden. Die Zellen, bei denen das Einschleusen des YACs nicht funktioniert hat oder die das YAC nicht komplett geerbt haben, sind nicht zum Stoffwechsel in der Lage und sterben ab. So ist sichergestellt, daß alle Zellen einer Kolonie das YAC enthalten.

Die hier benutzten YACs enthalten zusätzlich ein Gen, das bewirkt, daß die Hefekolonien rot sind. Verunreinigungen durch unerwünschte Zellen und Mutationen, die diesen Bereich des YACs betreffen, werden als weiße Zellkolonien sichtbar.

3.2.2 Das Gen p53

Für unser Experiment werden YACs mit dem menschlichen Gen p53 benutzt. Dieses Gen stammt vom Chromosom 17 und ist 20.281 Basenpaare (Bp) lang, die sich auf 11 Exons und 12 Introns verteilen. Man hat festgestellt, daß eine der verbreitetsten genetischen Veränderungen in menschlichen Krebszellen eine Mutation im p53-Gen ist. Eine Funktion des p53 ist seine Fähigkeit, die Apoptose hervorzurufen. Außerdem spielt es offenbar eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung. Der Verlust der Funktion von p53 führt dazu, daß mehr Mutationen weitervererbt werden, da keine Apoptose mehr stattfindet. Die große Zahl von Mutationen in

[1] engl. yeast=Hefe

p53 in verschiedenen menschlichen Krebsarten deutet darauf hin, daß die Inaktivierung von p53 ein entscheidender Schritt bei der Entstehung von Krebs ist. Dies unterscheidet p53 von anderen Tumorsuppressorgenen, deren Funktion jeweils auf bestimmte Gewebearten eingeschränkt ist. Ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit von p53 ist seine erstaunliche Beständigkeit während der Evolution: p53 und ähnliche wurden bei Fischen, Amphibien, Vögeln, Nagern und Primaten gefunden. Einen Überblick über Funktion und Wirkungsweise von p53 gibt der Artikel von Lee und Bernstein [28].

Das Protein, für dessen Produktion p53 zuständig ist, wurde von der Zeitschrift Science zum „Molekül des Jahres 1993“ gewählt [14]. Die Sequenz des Gens ist bekannt.

Am Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH)[2] wird eine Bibliothek von YAC-Zellen unterhalten [1]. Aus dieser Bibliothek können Wissenschaftler Zellen, die die gewünschten Gene enthalten, kostenlos bestellen. p53 ist in den YACs 204 D_7, 204 E_7, 204 E_9, 427 G_{10}, 427 G_{11} und 436 G_{12} enthalten.

3.2.3 Monolayer

Die verwendeten YAC-Zellen bilden von selbst einen Monolayer am Boden des Probengefäßes, wenn sie in geeigneter Konzentration einpipettiert werden. Unter dem inversen Mikroskop sieht man, daß die Zellen den Boden des Gefäßes nahezu vollständig bedecken. Fokussiert man das Mikroskop auf eine Ebene oberhalb dieser Bodenschicht, so findet man dort keine Zellen mehr.

3.3 Durchführung der Bestrahlungen

3.3.1 Aufbereitung und Kontrolle der YACs

Bei der Auswertung der Bestrahlungen wird ein DNA-Abschnitt von 325 Bp Länge, der das Exon 5 und ein Teil des Exons 6 umfaßt, betrachtet (vgl. Anhang C). Es muß zunächst überprüft werden, in welchen der YAC-Hefen dieser Abschnitt des Gens enthalten ist. Am CEPH wird durch radioaktive Koloniehybridisierung überprüft, ob p53 in den Zellen enthalten ist. Dazu wird ein Molekül, das sich an einen spezifischen Abschnitt der DNA innerhalb des Gens anlagert, radioaktiv markiert. Die markierten Proben werden in Vertiefungen in einer Kunststoffolie pipettiert. Die Folie wird anschließend auf ein Fotopapier gelegt. Dieses wird dadurch an den Stellen geschwärzt, an denen Zellen lagen, die den untersuchten DNA-Abschnitt enthalten. Die Stelle, an der sich eine solche radioaktive Sonde anlagert, muß nicht in dem Bereich zwischen den von uns verwendeten Primern liegen. So ist es möglich, daß einige der YACs das Fragment, das wir untersuchen wollen, nicht enthalten.

[2] 27, rue Juliette Dodu, F-75010, http://www.cephb.fr/

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und des Nährmediums lassen sich Anhang B entnehmen.

Anzucht der YAC-Hefen

Die YAC-Hefen werden vom CEPH in lyophylisiertem (getrocknetem) Zustand geliefert. Sie werden zuerst mit 300 μl AHC-Puffer aufgeschwemmt. Danach werden sie getrennt nach den Stämmen 204 D_7, 204 E_7, 204 E_9, 427 G_{10}, 427 G_{11} und 436 G_{12} auf Agar-Platten, denen AHC zugesetzt ist, ausplattiert. Etwa 10–15% der Zellen wachsen an. Nach zwei Tagen werden einzelne Kolonien von den Platten gepickt, in 100 ml AHC-Medium suspendiert und über Nacht bei 30°C angezogen.

DNA-Isolierung

Aus den Zellen muß nun die DNA isoliert werden. Die dazu nötigen Arbeitsschritte sind:

1. Die Zellen 2 mal mit 10 ml SCE waschen,
2. 10 min bei 2.000 rpm zentrifugieren,
3. mit 2 ml SCE + β-Mercaptoethanol + 2 μl 2 u-Lyticase(Sigma) bei 37°C 2 h inkubieren,
4. 10 min bei 2.000 rpm zentrifugieren,
5. 0,7 ml Lysis-Puffer zugeben,
6. das gleiche Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol zufügen,
7. 15 min bei 65°C inkubieren,
8. nach Invertieren 5 min bei 2.000 rpm zentrifugieren,
9. Schritte 1–8 wiederholen,
10. das gleiche Volumen Isopropanol zufügen,
11. 15 min bei RT inkubieren,
12. 15 min bei höchster Umdrehungszahl zentrifugieren,
13. mit 200 μl 70%igem Ethanol waschen,
14. 15 min bei höchster Umdrehungszahl zentrifugieren,
15. an der Luft trocknen und schließlich
16. die DNA in 100 μl TE+2 u-RNAse A bei 37°C in 2 h aufnehmen.

Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung

Die DNA wird entsprechend ihrer angenommenen Konzentration mit TE-Puffer verdünnt. Anschließend wird ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wird bei 260 nm, 280 nm und 360 nm die Absorption gemessen. 260 nm ist das Absorptionsmaximum von Nukleinsäure, 280 nm das von Proteinen. Die Messung bei 360 nm wird benötigt, um den Untergrund an Streulicht abzuziehen. Das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der DNA. Eine DNA, bei der dieser Wert größer als 1,8 ist, wird als rein betrachtet. Die optische Dichte bei 260 nm ist ein Maß für die DNA-Konzentration in der Lösung. Densitometer sind so geeicht, daß ein Wert von 1,0 einer Konzentration von 50 $\frac{\mu g}{ml}$ entspricht. Werden höhere Konzentrationen erwartet, muß die DNA-Lösung vor der Messung verdünnt werden.

PCR mit den Primern 730 und 731

Für die PCR wird die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 1 $\frac{ng}{\mu l}$ verdünnt. Die eingesetzte Menge der Lösung muß so gewählt sein, daß am Anfang etwa 10.000 Kopien der DNA zur Verfügung stehen. Für die sechs PCR-Ansätze, entsprechend den sechs YAC-Stämmen, werden

- 0,5 μl DNA-Lösung,
- 2,5 μl PCR-Puffer,
- je 4 μl der 4 dNTPs (200 μMol),
- 1 μl Primer 730 (12,5 pMol),
- 1 μl Primer 731 (12,5 pMol),
- 15,7 μl H_2O und
- 0,3 μl Taq-Polymerase (3 units)

gemischt. Die Zeiten und Temperaturen bei der PCR sind:

Phase	[°C]	[min]
Vorbehandlung	94	4
Denaturierung	94	1
Anlagerung	55	1
Verlängerung	72	1
Nachbehandlung	72	4
Endtemp.	24	

Es werden 35 PCR-Zyklen durchgeführt. Die Zeiten und Temperaturen werden dabei von einem Thermocycler Autogene 2 (Fa. Grant) gewährleistet.

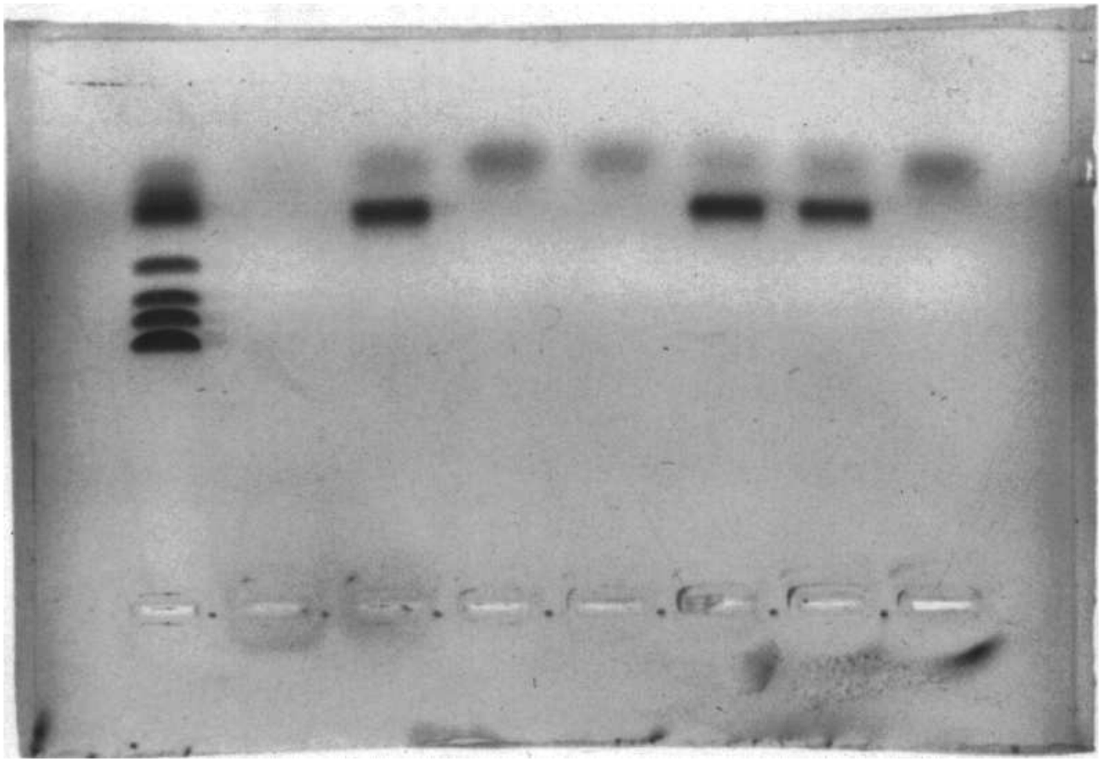

Abbildung 3.4: Das Gel zur Kontroll-PCR mit den Primern 730 und 731. Die Lanes enthalten von links nach rechts einen Längenstandard, die PCR-Produkte der Zellstämme 204 D_7, 204 E_7, 204 E_9, 427 G_{10}, 427 G_{11}, 436 G_{12} und eine Nullprobe.

Submarine Elektrophorese

Die Elektrophorese wird auf einem 1%igen Agarose-Gel unter TAE-Puffer in einer Elektrophoresekammer der Firma Pharmacia durchgeführt. Abbildung 3.4 zeigt ein Foto des Gels. Man erkennt in den Lanes von 204 E_7, 427 G_{11} und 436 G_{12} die zusätzliche Bande, die dem PCR-Produkt entspricht.

PCR mit den Primern 731 und 758

Zur Kontrolle wird mit den YAC-Stämmen, die beim ersten Test ein positives Ergebnis zeigen, eine weitere PCR mit den Primern 731 und 758 durchgeführt. Der entsprechende DNA-Abschnitt ist 1340 Bp lang und umfaßt die Exons 4 und 5 und einen Teil des Exons 6. Als PCR-Ansatz dienen

- 0,5 μl DNA-Lösung,
- 2,5 μl PCR-Puffer,
- je 4 μl der 4 dNTPs (200 mMol),

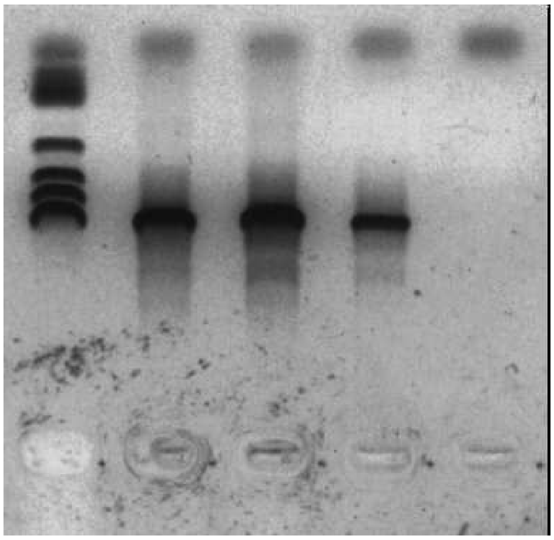

Abbildung 3.5: Das Gel zur Kontroll-PCR mit den Primern 731 und 758. Die Lanes enthalten von links nach rechts einen Längenstandard, die PCR-Produkte der Zellstämme 204 E_7, 427 G_{11}, 436 G_{12} und eine Nullprobe.

- 1 μl Primer 731 (12,5 pMol),
- 2,3 μl Primer 758 (5,4 pMol),
- 14,4 μl H_2O und
- 0,3 μl Taq-Polymerase (3 units).

Die Zeiten und Temperaturen werden wie bei der ersten PCR eingestellt, und es werden 35 PCR-Zyklen durchgeführt.

Submarine Elektrophorese

Die Elektrophorese der PCR-Produkte erfolgt wie oben dargestellt. Das Gel ist in Abbildung 3.5 gezeigt. In allen drei YACs läßt sich wiederum das gewünschte DNA-Fragment nachweisen.

3.3.2 Vorbereitung der Bestrahlung

In Abschnitt 3.3.1 wurde gezeigt, daß die YAC-Stämme 204 E_7, 427 G_{11} und 436 G_{12} für die Untersuchung geeignet sind. Sie enthalten das DNA-Fragment, das sich mit Hilfe der Primer 730 und 731 in der PCR vermehren läßt. Für die Bestrahlungen müssen Einzelzellen dieser Stämme erzeugt werden.

Anzucht der YAC-Hefen

Von den AHC-Agar-Platten werden einzelne Kolonien gepickt, in 100 ml AHC-Medium suspendiert und über Nacht bei 30°C angezogen. Die Zellen werden unter dem inversen Mikroskop in einer Thoma-Kammer [46] ausgezählt. Entsprechend der so bestimmten Zellzahl wird die Zellsuspension so verdünnt, daß Zellen später einen Monolayer auf dem Boden des Probengefäßes bilden.

Vereinzelung der Zellen

Hefezellen sind sowohl zur sexuellen Fortpflanzung (meiotisch), als auch zur Zellteilung (mitotisch, Knospung) in der Lage. Wären einzelne Zellen bei der Bestrahlung gerade im Zustand der Knospung, ließe sich eine eventuell entstehende Mutation weder der Tochter- noch der Mutterzelle zuordnen. Außerdem würden durch die Nähe der beiden Zellen später Kolonien entstehen, die nicht Klone einer sondern zweier verschiedener Zellen sind. Da es aber für die Untersuchungen wichtig ist, in einer Zellkolonie nur das Erbgut einer Zelle zu finden, muß die Knospung gestoppt werden.

Dazu wird ein von T. Pötter entwickeltes Verfahren [39] verwendet. Man nutzt dabei aus, daß Hefen keine Knospen bilden, wenn sie die Chance zur sexuellen Fortpflanzung haben. Die Anwesenheit eines Sexualpartners erkennt die Hefezelle an einem Botenstoff, dem α-Faktor. Setzt man diesen Stoff in 5 mMolarer Konzentration der Zellsuspension zu und inkubiert 4 h bei 30°C, so stellen die Hefen die Knospung ein. Anschließend werden die Zellen in einem im Institut für Strahlenbiologie selbstgebauten Beschallungsgerät für 30 s der größtmöglichen Ultraschall-Energie ausgesetzt. Dadurch werden eventuell noch aneinanderhaftende Zellen getrennt. Abbildung 3.6 zeigt eine Fotografie der vereinzelten Zellen unter dem inversen Mikroskop.

3.3.3 Bestrahlung

Aus der Suspension der Einzelzellen in AHC-Nährlösung werden Proben von jeweils 100 μl in Eppendorf-Gefäße gefüllt. Diese Proben werden bis zur Bestrahlung auf Eis gelagert. Zur Bestrahlung wird eine Probe in ein Probengefäß (vgl. Abschnitt 4.5) pipettiert. Man setzt das Gefäß in den Bestrahlungsaufbau ein und läßt den Zellen 15 min Zeit, am Boden den Monolayer zu bilden. Dann wird entsprechend der gewünschten Dosis bestrahlt.

Die Zellen werden anschließend mit $2\times$ 100 μl AHC vom Boden des Probengefäßes aufgespült, mit der Pipette aufgenommen und in Eppendorf-Gefäße gefüllt. Diese Proben werden bis zur weiteren Bearbeitung wiederum auf Eis gelagert.

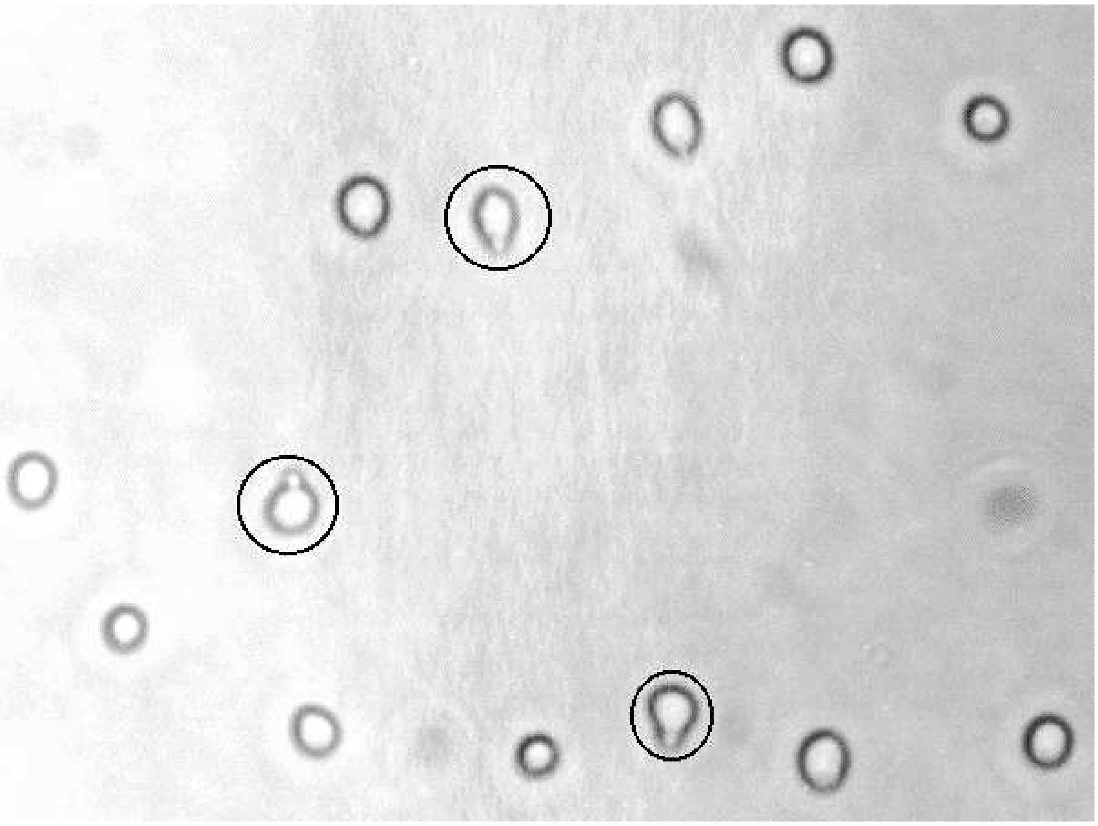

Abbildung 3.6: Fotografie der vereinzelten Zellen unter dem inversen Mikroskop. Der α-faktor wurde ca. 4 h zuvor zugesetzt. Es wurde ein Bereich der Fotografie ausgewählt, in dem noch Zellen zu erkennen sind, die dabei sind Knospen zu bilden. Man erkennt deutlich, daß die Zellen nicht mehr in Clustern zusammenhängen.(Fotografie von T. Pötter [39])

3.3.4 Nachbereitung und Auswertung

Anzucht der bestrahlten Zellen

Zunächst wird unter dem inversen Mikroskop die Zellzahl in den Proben bestimmt. So kann kontrolliert werden, ob das Abspülen der Zellen vom Gefäßboden effektiv war. Die Zellsuspensionen werden dann so verdünnt, daß ca. 1.000 Zellen pro AHC-Agar-Platte ausplattiert werden. Der α-Faktor wird in diesem Schritt so stark verdünnt, daß die Zellen wieder beginnen, sich zu teilen. Die Zellen werden für 2 Tage bei 30°C angezogen.

Bestimmung der Überlebensrate

Nach zwei Tagen haben sich auf den AHC-Agar-Platten rote Kolonien gebildet. Diese werden gezählt, um festzustellen, wieviele der ausplattierten Zellen überlebt haben. Man geht dabei davon aus, daß jede Kolonie aus einer einzigen Zelle hervorgegangen ist.

DNA-Isolierung

Von den Platten werden einzelne Kolonien gepickt und deren DNA isoliert. Das Verfahren unterscheidet sich geringfügig von dem oben beschriebenen:

1. Die Zellen 2 mal mit 0,5 ml SCE waschen,
2. 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren,
3. mit 0,5 ml SCE+β-Mercaptoethanol+2 μl 2 u-Lyticase(Sigma) bei 37°C 2 h inkubieren,
4. 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren,
5. 0,5 ml Lysis-Puffer zugeben,
6. das gleiche Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol zufügen,
7. 15 min bei 65°C inkubieren,
8. nach Invertieren 4 min bei 13.000 rpm zentrifugieren,
9. Schritte 1–8 wiederholen,
10. das gleiche Volumen Isopropanol zufügen,
11. 15 min bei RT inkubieren,
12. 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren,
13. mit 200 μl 70%igem Ethanol waschen,

14. 15 min bei höchster Umdrehungszahl zentrifugieren,
15. an der Luft trocknen und schließlich
16. die DNA in 20 μl TE+2 u-RNAse A bei 37°C in 2 h aufnehmen.

Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung

Die Reinheit und Konzentration der isolierten DNA wird photometrisch bestimmt. Es zeigt sich, daß sich aus einer Kolonie ca. 30$\frac{\mu g}{ml}$ DNA gewinnen lassen. Das genügt für den PCR-Ansatz.

PCR

Für die PCR wird die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 1 $\frac{ng}{\mu l}$ verdünnt. Als PCR-Ansatz werden

- 0,5 μl DNA-Lösung,
- 2,5 μl PCR-Puffer,
- je 4 μl der 4 dNTPs (200 mMol),
- 1 μl Primer 730 (12,5 pMol),
- 2,3 μl Primer 731 (5,4 pMol),
- 14,4 μl H_2O und
- 0,3 μl Taq-Polymerase (3 units)

gemischt. Es werden 35 PCR-Zyklen durchgeführt.

Submarine Elektrophorese

Um den Erfolg der PCR zu kontrollieren, wird eine submarine Elektrophorese mit den oben beschirebenen Parametern vorgenommen. Bei den Proben aus erfolgreicher PCR wird eine einzelne Bande im Gel sichtbar, da Produkte *einer* definierten Länge entstanden sind. Bei erfolgloser PCR fehlt diese Bande.

SSCP

Für die Untersuchung der DNA auf Mutationen mittels SSCP werden 3 μl des PCR-Ansatzes mit dem gleichen Volumen Formamid gemischt. Das Gemisch wird auf 100°C erhitzt und dann in einem Salz-Eis-Wasser-Gemisch auf -4°C – -7°C abgeschreckt. Von diesem Ansatz werden 1,5 μl auf ein 12,5%-iges Polyacrylamid-Gel aufgebracht. Die Elektrophorese wird im Phast System (Fa. Pharmacia) durchgeführt. Die Bedingungen sind:

Phase	Spannung	Begrenzung	Dauer
pre-run	400 V	10 mA oder 2,5 W	150 Vh
Probenaufbringung	400 V	1 mA oder 2,5 W	2 Vh
Lauf	400 V	2,5 W	150 Vh bei 15°C

Die ganze Elektrophorese dauert etwa 150 min. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Kapitel 6 zusammengestellt.

Kapitel 4

Der experimentelle Aufbau

An den Aufbau zur Bestrahlung der YAC-Zellen mit niederenergetischen α-Teilchen sind einige Anforderungen zu stellen:

- Die Energie muß auf einfache Weise genau einstellbar sein.
- Die Zellen sollen unter physiologischen Bedingungen, d. h. unter Normaldruck, Raumtemperatur und in Nährlösung, bleiben.
- Die Energieschärfe am Probenort soll gut sein.
- Die Intensität am Ort der Zellen darf nicht zu groß und nicht zu klein sein, damit sich die Dosis durch die Länge der Bestrahlung genau vorwählen läßt.
- Die Dosis muß während der Bestrahlung gemessen werden können.
- Aus dem aufbau darf keine α-Strahlung austreten.
- Das Vakuum im Beschleuniger muß unter allen Bedingungen erhalten bleiben.
- Die Proben müssen einfach und schnell zu wechseln sein.

Um die Energie einfach wählen zu können, wird an einem Ionenbeschleuniger bestrahlt. Ein Fenster aus Kunststoffolie schließt das Vakuum im Strahlrohr so ab, daß der Normaldruck am Probenort gewährleistet bleibt. Um die gute Energieschärfe des Beschleunigers möglichst wenig zu beeinflussen, wird dieses Fenster aus der dünnsten verfügbaren Folie gefertigt.

Der Ionenstrom wird reduziert, indem die Teilchen an einer Goldfolie gestreut werden. Zur Bestrahlung werden die unter 90° gestreuten α-Teilchen benutzt. Ebenfalls unter 90° wird ein Oberflächensperrschichtzähler angeordnet, der es erlaubt, die Ionen während der Bestrahlung zu spektroskopieren.

Die Kammer, in der sich die Proben befinden, ist durch einen Deckel verschlossen, der das Austreten von Strahlung verhindert und gleichzeitig das Luftvolumen begrenzt, das bei einem Bruch des Vakuumfensters ins Strahlrohr eindringt.

Die Proben werden zur Bestrahlung in Probengefäße pipettiert, die sich schnell ein- und ausbauen lassen und gut zu handhaben sind.

4.1 Die Beschleuniger

4.1.1 Der Dynamitron-Tandem-Beschleuniger in Bochum

Die Universitäten Bochum, Dortmund und Münster betreiben gemeinsam einen Tandem-Beschleuniger. Das Dynamitron-Tandem-Laboratorium (DTL) befindet sich in Bochum. Es ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

Der Kern des Systems ist das eigentliche Dynamitron, ein Vakuumtank, in dessen Mitte sich das Terminal befindet, an das eine Beschleunigungsspannung von bis zu +4 MV angelegt werden kann. Da die beiden Enden des Tanks auf Erdpotential gehalten werden, gibt es also eine positive und eine negative Beschleunigungsspannung.

Um einen He^{++}-Strahl zu erzeugen, werden zunächst in einem Injektor der Firma ORTEC He^{-}-Ionen erzeugt und mit einer Spannung von 90 kV aus der Quelle extrahiert. Sie passieren dann einen Analysiermagneten. Vom statischen Magnetfeld werden die Ionen je nach ihrer Strahlsteifigkeit R unterschiedlich abgelenkt. Die Strahlsteifigkeit ist definiert als

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

wobei A die Ionenmasse ist, E_{kin} die kinetische Energie und q die Ladung des Ions. Hinter dem Magneten ist eine Spaltblende montiert, die alle Ionen ausblendet, die eine andere Strahlsteifigkeit haben als die gewünschte Ionensorte. Durch Variation des Magnetfeldes können hier verschiedene Ionensorten ausgewählt werden.

Die He^{-}-Ionen treten hinter dem Spalt in das Dynamitron ein und gewinnen durch die Terminalspannung $U_{Term.}$ die Energie $U_{Term.} \cdot e$. Obwohl die Lebensdauer des He^{-}-Zustandes sehr gering ist, reicht sie aus, um die Ionen bis zum Terminal gelangen zu lassen. Dort durchqueren sie einen Lithium-Gasstripper, der Elektronen von den Ionen abstreift. So entstehen He, He^{+} und He^{++}. Die positiven Ionen gewinnen nun durch den Potentialunterschied zum Ende des Beschleunigertanks die Energie $U_{Term.} \cdot e$ bzw. $2 \cdot U_{Term.} \cdot e$.

Die Ionen werden nun von einem weiteren Analysiermagneten in eins von zwei Strahlrohren umgeleitet, die unter 57,5° angeordnet sind. Am Eintritt dieses Strahlrohrs befindet sich ein Gitter. Fließt hier ein Strom, so hat der Ionenstrahl sich so verändert, daß er nicht mehr optimal durch die Lücken im Gitter tritt. Der Analysiermagnet wird dann von einem Regelkreis so nachgeregelt, daß der Strom auf dem Gitter minimal wird. So wird der Strahl wieder optimal in das Strahlrohr gelenkt. Am Ende des 57,5°-Strahlrohrs leitet ein weiterer Magnet

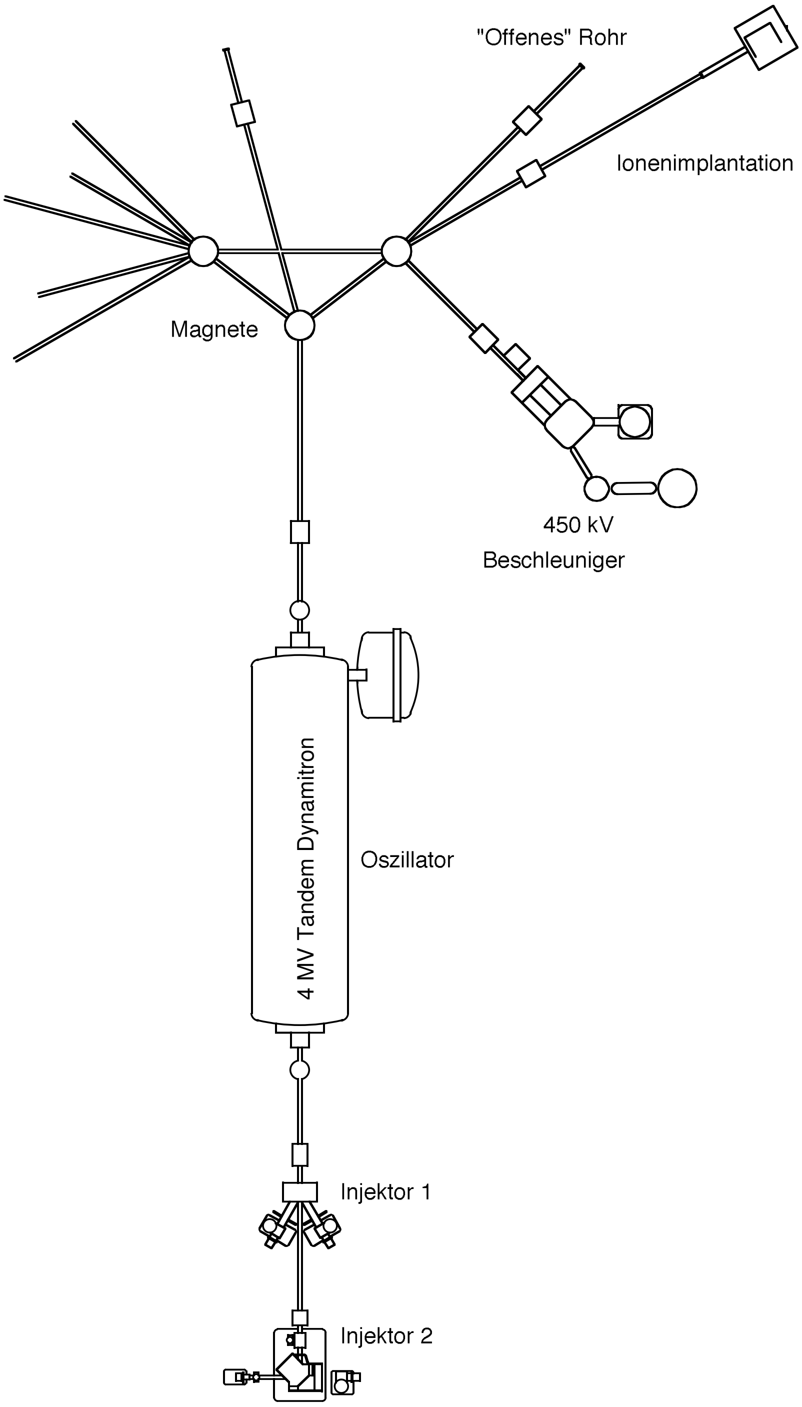

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des DTL [9]

Molekül	A [amu]	Ladung q_1 [$\lvert e\rvert$]
H	1	-1/4
H_2	2	-1/2
O	16	-4
O_2	32	-8
N	14	-7/2
N_2	28	-7

Tabelle 4.1: Ladungen den häufigsten Verunreinigungen, die zu einer Strahlsteifigkeit von $\sqrt{4 \cdot U_{ex}}$ führen.

den Ionenstrahl in eins von vier Strahlrohren, an deren Enden die Experimentierplätze sind. Es wurde der in Abbildung 4.1 als „offenes Strahlrohr" bezeichnete Experimentierplatz benutzt.

Für die Bestrahlung ist es wünschenswert, einen Strahl zu haben, der möglichst nur aus He^{++}-Ionen besteht. Verunreinigungen können aus der Quelle, dem Stripper oder dem Restgas im Vakuum kommen.

Ionen aus der Quelle müßten am ersten Analysiermagneten dieselbe Strahlsteifigkeit haben wie He^-. Nennt man die Ladung am ersten Analysiermagneten q_1, und die Extraktionsspannung U_{ex}, so ist die Strahlsteifigkeit

$$R = \sqrt{\frac{A \cdot E_{kin}}{q_1^2}} = \sqrt{\frac{A \cdot U_{ex}}{|q_1|}} = \sqrt{4\, U_{ex}}. \tag{4.2}$$

Die Ladungszustände, die diese Strahlsteifigkeit bewirken, sind für die häufigsten Verunreinigungen in Tabelle 4.1 aufgetragen. Da die Ladung ganzzahlig sein muß, kommen an dieser Stelle nur noch Verunreinigungen mit O^{-4}, O_2^{-8} und N_2^{-7} in Frage.

Die Strahlsteifigkeit am zweiten Magneten ist

$$R = \sqrt{\frac{A \cdot (|q_1| \cdot (U_{ex} + U_{Term.}) + q_2 \cdot U_{Term.})}{q_2^2}}. \tag{4.3}$$

Für He^{++}-Ionen nimmt das den Wert

$$R = \sqrt{U_{ex} + 3\, U_{Term.}} \tag{4.4}$$

an. Setzt man diese Bedingung in Gleichung 4.3 ein und löst nach q_2 auf, so stellt man fest, daß Verunreinigungen, die den ersten Magneten passieren konnten, ebenfalls auf $q_2 = -2 \cdot q_1$ umgeladen werden müssen. Für die drei verbleibenden Verunreinigungen heißt das, daß sie alle Elektronen abgeben müssen. Damit stehen in O_2 und N_2 keine Bindungselektronen mehr zur Verfügung, die Ionen O_2^{+16} und N_2^{+14} existieren also nicht. Man kann annehmen, daß die Wahrscheinlichkeit für eine Umladungen um 12 Ladungszustände beim Sauerstoff sehr gering ist. Auch die Verunreinigung mit Sauerstoff kann insgesamt vernachlässigt werden.

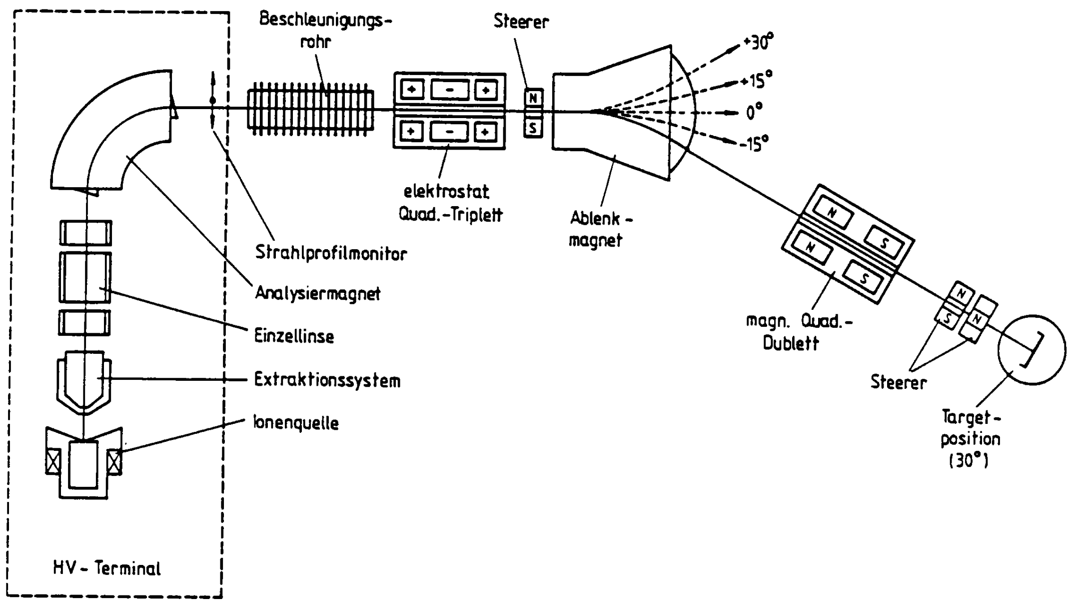

Abbildung 4.2: Der Ionenbeschleuniger der Universität Münster (Abbildung aus Schulte [48]). Das $+30°$-Strahlrohr ist im wesentlichen wie das gezeigte aufgebaut, es fehlt lediglich das Quadrupol-Duplett

Als Stripper-Gas wird Lithiumdampf eingesetzt. $^6Li^{q_2}$-Ionen haben am zweiten Analysiermagneten die selbe Strahlsteifigkeit wie die He^{++}-Ionen, wenn

$$q_2 = \frac{6 \cdot U_{Term.}}{U_{ex} + 3\,U_{Term.}} \tag{4.5}$$

ist. Für $U_{Term.}$ im Bereich 270 kV...600 kV, der bei den Messungen benutzt wurde, ist dieser Ausdruck 1,8...1,9. Der nächste ganzzahlige Ladungszustand wäre $q_2 = 2$. Der dadurch entstehende Unterschied in der Strahlsteifigkeit genügt, um die $^6Li^{+2}$-Ionen am zweiten Magneten auszufiltern.

Die letzte Gruppe von Verunreinigungen sind Ionen aus dem Restgas. Sie werden durch Stoß mit den α-Teilchen erzeugt, ihre Energien sind also statistisch verteilt, sie sind als Untergrund im Spektrum zu erkennen.

Die Energieschärfe des α-Strahls wurde von Becker et al. [5] vermessen und ist besser als 5 keV.

4.1.2 Der Linearbeschleuniger in Münster

Der Ionenbeschleuniger der Universität Münster ist in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt. Zur Erzeugung von He^{++}-Ionen wird eine im Institut für Kernphysik konstruierte Penning-Quelle eingesetzt. Die Ionen werden durch eine Spannung von 30 kV aus der Quelle extrahiert und anschließend in einem Analysiermagneten getrennt. Der Magnet lenkt die Ionen um 90° ins Beschleunigungsrohr ab.

Hier kann eine Beschleunigungsspannung von maximal 400 kV angelegt werden. Die beschleunigten Ionen werden von einem Magneten in eines der fünf Strahlrohre gelenkt. Für die Experimente war die Streukammer am +30°-Strahlrohr montiert.

Da in Münster nur ein Analysiermagnet eingesetzt wird, ist der α-Strahl nicht so rein wie der, der in Bochum zur Verfügung steht. Verunreinigungen durch $(H_2)^+$-Ionen konnten von Scholz [47] nachgewiesen werden. Diese Molekülionen werden im Streutarget gespalten und sind im Spektrum als Protonen sichtbar.

Bei der Konstruktion des Beschleunigers war eine möglichst gute Energieschärfe das oberste Ziel. Für einen α-Strahl beträgt sie 40 eV. Bei den verwendeten Energien von 240–660 keV ist damit das Verhältnis der Breite der Energieverteilung zu ihrer Höhe $1{,}7\cdot10^{-3}$ bis $6\cdot10^{-5}$.

4.2 Die Streukammer

4.2.1 Aufbau zur Bestrahlung

Abbildungen 4.4 und 4.3 sind schematische Darstellungen der Streukammer, wie sie zur Bestrahlung der Zellen benutzt wurde. Abbildung 4.5 zeigt die geöffnete Kammer.

Nach dem Eintritt in die Kammer wird der Strahl zunächst durch zwei Blenden aus Tantal kollimiert. Er trifft dann auf das Streutarget aus $180\frac{\mu g}{cm^2}$ Gold. Das Target ist an einem seitlich in die Kammer eingeschobenen Targethalter montiert, der Platz für vier Targets bietet. Zwischen diesen Targets kann gewechselt werden, ohne die Kammer zu belüften. Eine der Positionen bleibt unbesetzt, um beim Fokussieren und Justieren der Strahllage den Strom in einem Faraday-Cup am Ende der Kammer beobachten zu können.

Die zu bestrahlenden Proben werden senkrecht über dem Streutarget angebracht. Damit die um 90° gestreuten Teilchen wieder aus der Goldfolie austreten können, ist das Target um zwei Achsen jeweils um 45° gekippt. Der Targethalter

∅ Streukammer	375±1	mm
Höhe Streukammer	186±1	mm
∅ 1. Blende	1±0,1	mm
∅ 2. Blende	2±0,1	mm
∅ Vakuumfenster	7,5	mm
Abstand Probe–Target	102	mm
∅ Detektorblende	2,5	mm
Abstand Detektorblende–Target	134	mm

Tabelle 4.2: Abmessungen der Streukammer

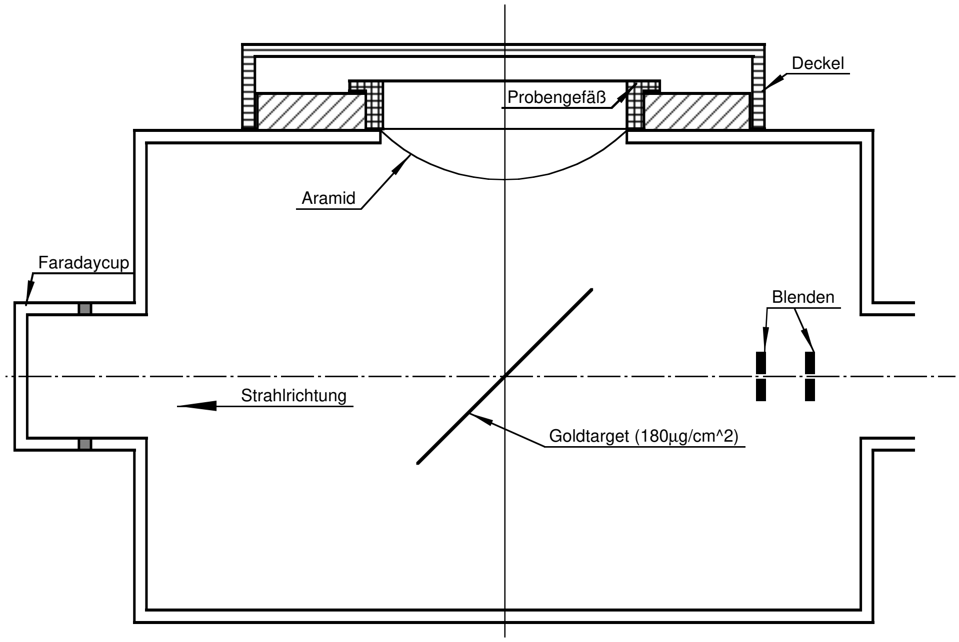

Abbildung 4.3: Schematische Zeichnung der Streukammer von der Seite

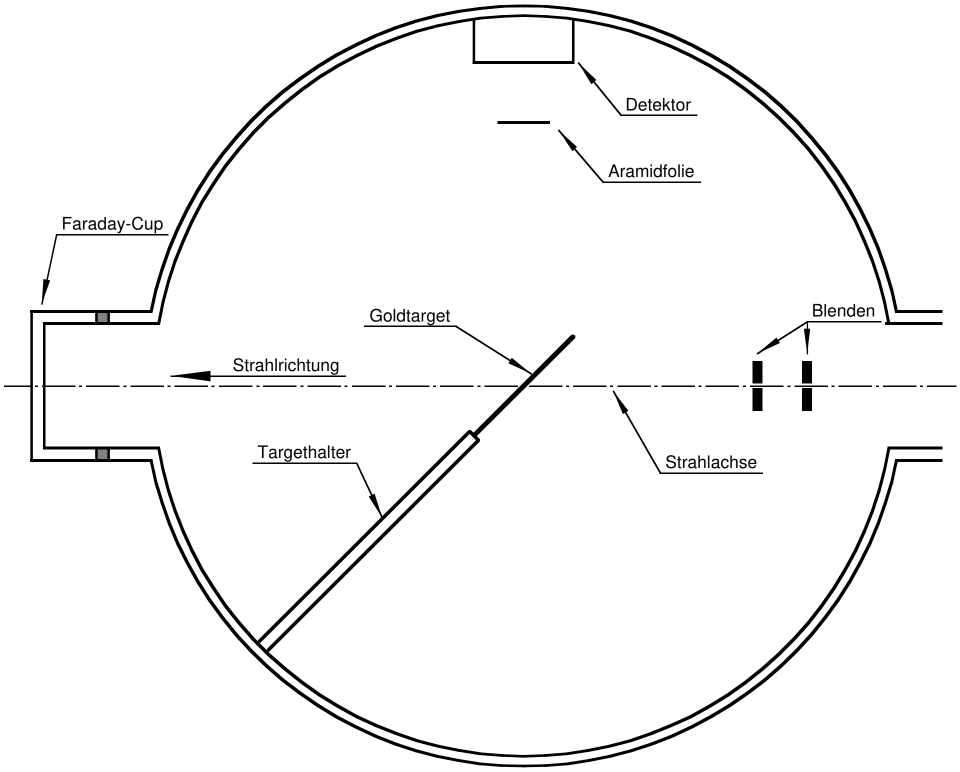

Abbildung 4.4: Schematische Zeichnung der Streukammer von oben

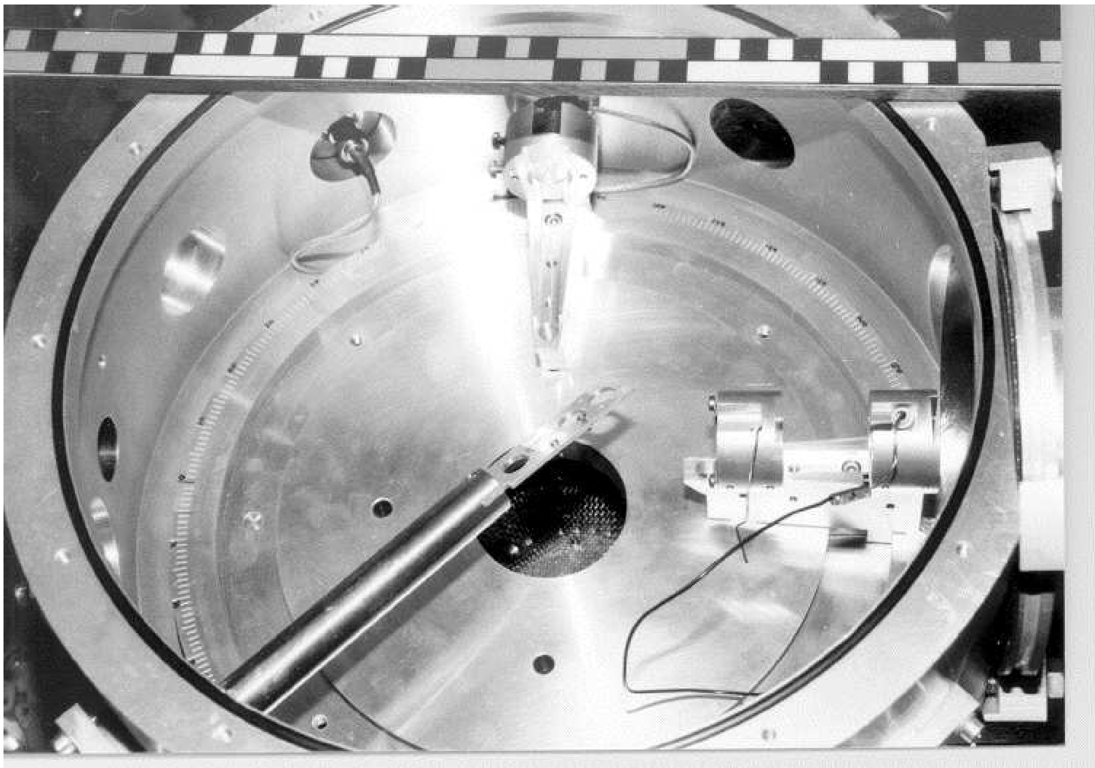

Abbildung 4.5: Die geöffnete Streukammer. Man erkennt oben die Detektorhalterung, rechts die beiden Blenden am Strahleintritt und in der Mitte das um zwei Achsen jeweils um 45° angestellte Target. Die Unterteilungen des Maßstabs sind 1 cm breit.

ist unter einem Winkel von 45° zur Strahlachse angebracht und das Target ist um 45° um die Achse des Targethalters gedreht.

In der Streuebene parallel zum Kammerboden ist ebenfalls unter 90° ein Oberflächensperrschichtzähler Modell Ortec BA-17-150-1000 angeordnet. Er dient der Dosisbestimmung während der Bestrahlung. Der Detektorraumwinkel wird durch eine Blende definiert. Zwischen Streutarget und Blende ist eine Aramidfolie montiert, um ihren Effekt auf die Teilchenenergie bei der Dosismessung direkt zu berücksichtigen.

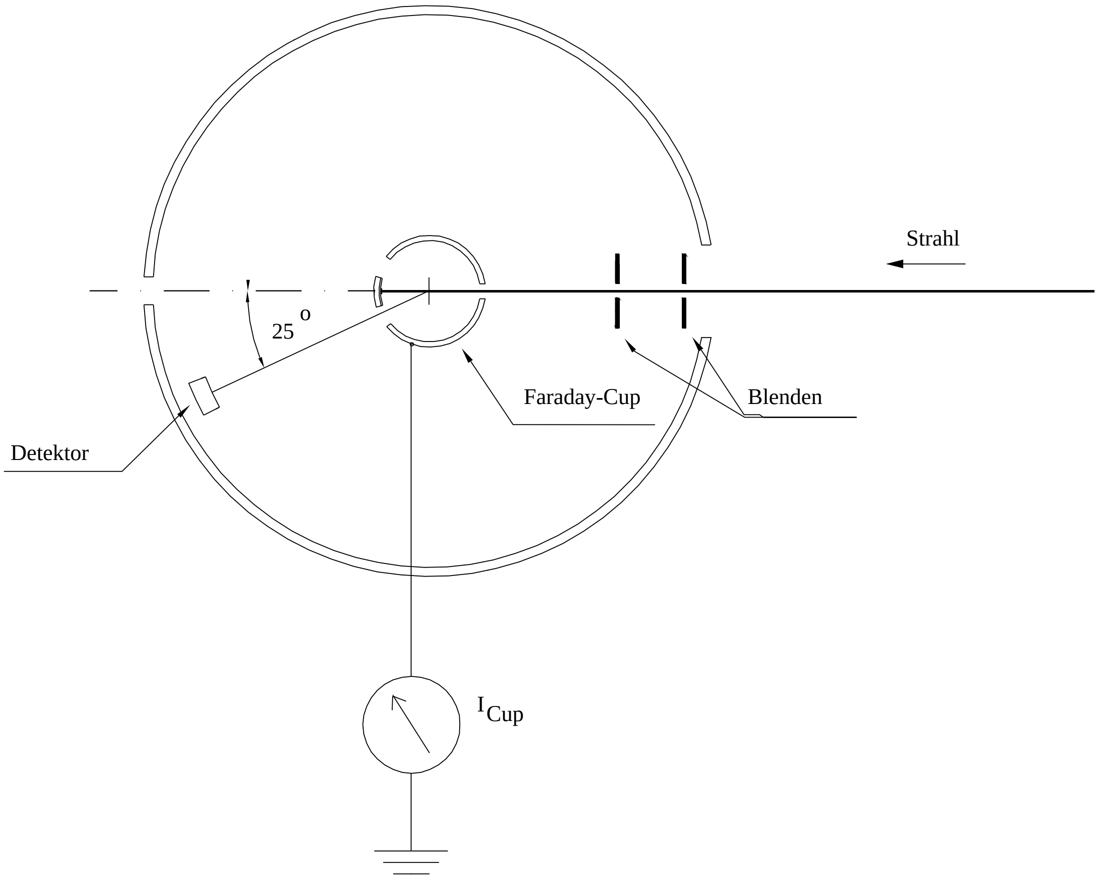

Abbildung 4.6: Der Aufbau zur Energieeichung (Abbildung nach Scholz [47])

4.2.2 Aufbau zur Energieeichung

Eine direkte Energieeichung ist nicht möglich, da der Ionenstrom zu groß für den Detektor ist. Die Energieeichung erfolgt daher durch eine selbstkonsistente Rechnung aus dem absoluten Rutherford-Wirkungsquerschnitt (vgl. Abschnitt 5.2). Zur Bestimmung dieses Wirkungsquerschnittes müssen der absolute Ionenstrom und die Anzahl der in ein bestimmtes Raumwinkelelement gestreuten Teilchen gemessen werden. Der Targethalter wird in den von Scholz [47] verwendeten Deckel der Streukammer montiert, an dem sich ein Faraday-Cup befindet, der lediglich eine Öffnung für den eintretenden Strahl und zwei unter jeweils 25° für die gestreuten Teilchen hat. Dieser Faraday-Cup umschließt das Target fast vollständig und ist gegen den Deckel der Streukammer isoliert. So kann der gesamte Ionenstrom als Strom im Faraday-Cup gemessen werden. Der Detektor wird unter 25° zum einfallenden Strahl angebracht. Der so modifizierte Aufbau ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

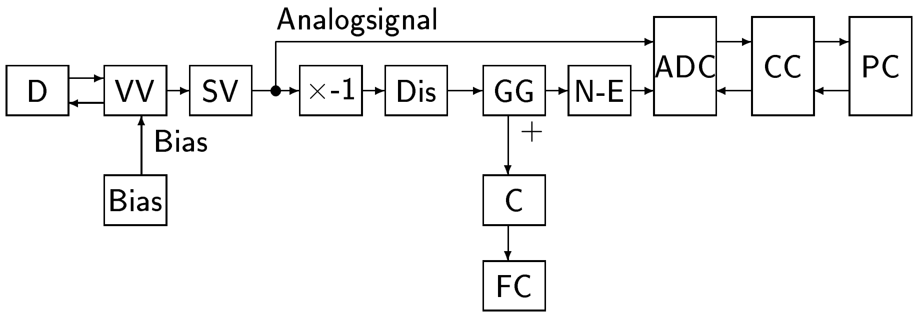

Abbildung 4.7: Schaltskizze der Elektronik

4.3 Die Elektronik

Abbildung 4.7 zeigt eine Schaltskizze der benutzten Elektronik. Der Detektor wird durch ein Netzgerät (Bias) mit der nötigen Vorspannung versorgt. Das Detektorsignal wird zunächst von einem Vorverstärker (VV) und einem Spektroskopieverstärker (SV) verstärkt. Dieses Signal wird dem Analog-Digital-Wandler (ADC) als Analoginput zugeführt. Nach einem Invertierer (–) liegt es auch an einem Diskriminator (Dis) an. Dieser erzeugt bei Signalen einer einstellbaren Mindesthöhe ein kurzes Rechtecksignal, das vom nachfolgenden Gategenerator (GG) in Länge und Höhe normiert wird. Dieses Signal entspricht dem NIM-Standard. Da der ADC das Gate-Signal im ECL-Standard erwartet, wird es durch einen NIM-ECL-Konverter (N-E) entsprechend umgewandelt. Die üblichen Signalstandards und ihre Umwandlung werden von Leo [29] eingehend behandelt. Der SILENA 4418/V ist ein peaksensitiver ADC, d. h. er wandelt die maximale Amplitude, die das Analogsignal annimmt während das Gatesignal anliegt, in einen digitalen Wert um, sobald das Gatesignal nicht mehr anliegt. Der NIM-ECL-Konverter und der ADC werden durch ein Einschubgehäuse nach dem CAMAC-Standard (Crate) versorgt, gesteuert und ausgelesen. Die Verbindung zwischen dem Crate und dem Meßcomputer (PC) stellt ein CAMAC-Controller (CC) im Crate her. Zur Steuerung und zur Erfassung der Meßwerte wird das Programm MULTI [56] benutzt.

Bei den Messungen am DTL wird das positive Gatesignal auch einem Zähler (C) zugeführt, der nach einer einstellbaren Anzahl von Ereignissen einen Faraday-Cup (FD) in den Strahl fährt und diesen so unterbricht.

Für die Messungen zur Energieeichung wird der Faraday-Cup in der Kammer mit einem Stromdigitalisierer verbunden. Dieser gibt eine Rechteckfolge aus, deren Frequenz proportional zum Eingangsstrom ist. Die Rechtecksignale werden mit einem automatischen Zähler gezählt.

	Funktion	Hersteller	Typ
D	Detektor*	Ortec	BA-17-150-1000
D	Detektor†	Canberra	25-11-100AM
Bias	Vorspannungsnetzteil	Ortec	210
VV	Vorverstärker*	Ortec	142A
VV	Vorverstärker†	Ortec	142
SV	Spektroskopieverstärker	Canberra	1413
$\times -1$	Invertierer	Ortec	433
Dis	Diskriminator	Chronetics	151
GG	Gategenerator	Ortec	416A
N-E	NIM-ECL-Konverter	C.A.E.N.	C467
ADC	ADC	Silena	4418/V
CC	CAMAC-Controller	Wiener	CC16
PC	Meßwerterfassung	Wiener	Multi, Version 1.2
C	Zähler	DTL	-

†Messungen in Münster, *Messungen in Bochum

Tabelle 4.3: Die Komponenten der Elektronik

4.4 Das Vakuumfenster

Besonders wichtig war die Konstruktion eines Vakuumfensters an der Streukammer. Dieses Fenster muß erstens dem Druckunterschied zwischen dem Vakuum in der Kammer und dem Normaldruck außerhalb gewachsen sein; zweitens soll es möglichst dünn sein, um die Energieverteilung der α-Teilchen so wenig wie möglich zu verbreitern. Drittens soll das Fenster so groß sein, daß Probengefäße einer handhabbaren Größe benutzt werden können. Solche Vakuumfenster werden üblicherweise aus Metall- oder Kunststoffolien hergestellt. Metallfolien müßten, um dem Druck standzuhalten so dick sein, daß ihr Einfluß auf die Energieverteilung zu groß wäre. Sie scheiden daher in dieser Anwendung aus. Das übliche

	Mylar	Aramid
Dichte $\left[\frac{g}{cm^3}\right]$	1,395	1,5
Streckspannung $\left[\frac{N}{mm^2}\right]$	100	300
zugehörige Dehnung [%]	4	2
Zugfestigkeit $\left[\frac{N}{mm^2}\right]$	200	400–500
Elastizitätsmodul $\left[\frac{N}{mm^2}\right]$	4.500	9.000–13.000
lieferbare Dicken [μm]	2/2,5/3/3,5/4/...	1,5/2/4/...

Tabelle 4.4: Die relevanten mechanischen Daten von Mylar- und Aramidfolien. Die Angaben sind den jeweiligen Datenblättern [21, 53] entnommen.

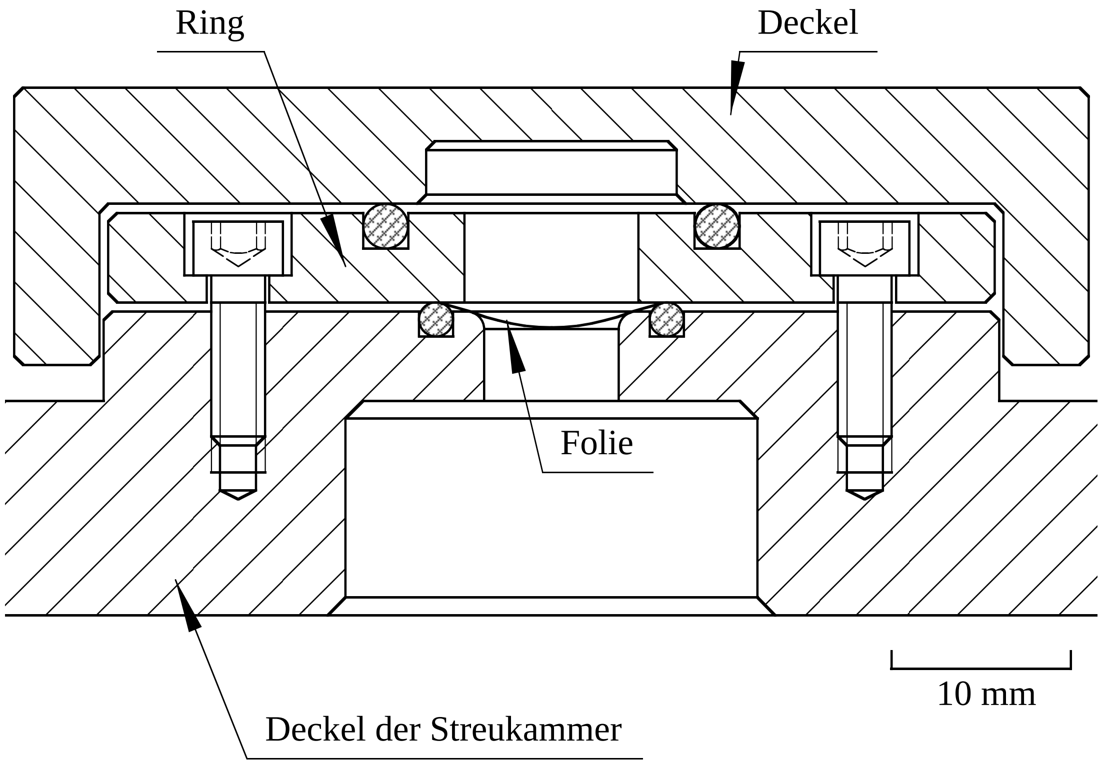

Abbildung 4.8: Das Vakuumfenster. Die Folie, die das Vakuum abschließt, wird zwischen dem O-Ring im Deckel der Streukammer und dem Ring eingeklemmt. Das Probengefäß wird in die Bohrung im Ring eingesetzt.

Kunststoffmaterial für Vakuumfenster ist Mylar. Es wird z. B. von der Firma Hoechst unter dem Namen „Hostaphan“ vertrieben. Aramidfolie weist aber noch günstigere mechanische Eigenschaften auf. Dieses neue Material wird von der Firma Toray als „TX-1 Aramid Film“ verkauft. Tabelle 4.4 zeigt die relevanten mechanischen Daten der beiden Materialien.

Das Vakuumfenster ist in Abbildung 4.8 gezeigt. Es besteht aus einer 1,5 μm dünnen Aramidfolie, die das Vakuum gegen den Normaldruck abschließt. Die Folie wird von einem Ring gegen einen O-Ring gepresst. So wird sie gleichzeitig fixiert und abgedichtet. Das Probengefäß wird später in die Bohrung in diesem Ring eingesetzt. Ein Deckel verhindert einerseits, daß Strahlung austritt, andererseits begrenzt er die Luftmenge, die in die Streukammer eindringen kann, falls das Vakuumfenster bricht.

4.4.1 Die mechanische Haltbarkeit

Um zu berechnen, welchen Durchmesser D ein Vakuumfenster aus einer Folie der Dicke d haben kann, ohne daß sich die Folie streckt, wird zunächst die Kraft

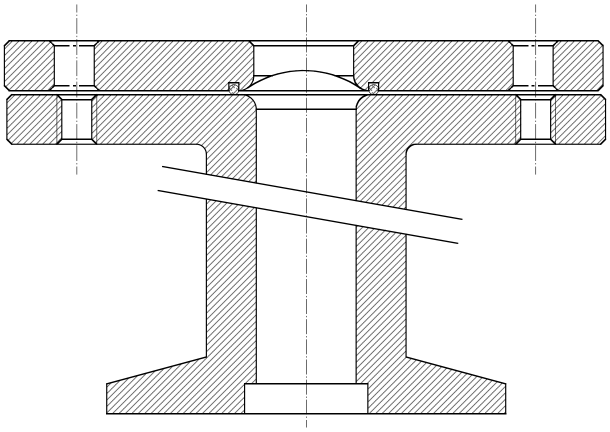

Abbildung 4.9: Der Folienhalter für den Drucktest. Die eingespannte Folie ist als Kreisbogen angedeutet. Am unteren Ende des Halters befindet sich ein Kammerflansch zum Anschluß an Druckluft. Der Durchmesser der Bohrung ist 10 mm

abgeschätzt, die die Druckdifferenz Δp auf das Fenster ausübt:

$$F_p = \Delta p \cdot \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2. \tag{4.6}$$

Das berücksichtigt nicht, daß sich die Folie unter Belastung dehnt. Da diese Dehnung aber weniger als 2 % beträgt (vgl. Tabelle 4.4), reicht dieser Ausdruck für eine Abschätzung aus. Nimmt man weiter an, daß sich die Dicke der Folie nicht wesentlich ändert und daß die größte Spannung am Rand (Fläche A) des Fensters auftritt, so gilt für die Streckspannung:

$$\sigma = \frac{F_p}{A} = \frac{\Delta p \pi D^2}{4 \cdot \pi D d}, \tag{4.7}$$

also für den Durchmesser bei gegebener Spannung

$$D = \frac{4\sigma d}{\Delta p}. \tag{4.8}$$

Mit $\Delta p \simeq 0,1 \frac{N}{mm^2}$ ist der maximale Durchmesser eines Fensters aus 1,5 μm dicker TX-1-Folie 18 mm, bei 2 μm 24 mm. Ein Fenster von 1 cm Durchmesser aus 1,5 μm dicker TX-1-Folie sollte bei einer Druckdifferenz von 1,8 bar brechen.

Die so berechnete Druckfestigkeit des Vakuumfensters wird mit einem Aufbau, wie er in Abbildung 4.9 dargestellt ist, überprüft. Ein Stück der Folie wird zwischen dem O-Ring im Deckel und dem Flansch eingeklemmt. Der Halter wird über ein Manometer und ein Reduzierventil mit dem Druckluftsystem des Instituts für Kernphysik verbunden. Die 1,5 μm dicke TX-1-Folie hält in diesem Aufbau einem Überdruck von 1,6 bar stand. Bei 1,7 bar bricht sie reproduzierbar. Das stimmt mit dem oben näherungsweise berechneten Wert überein.

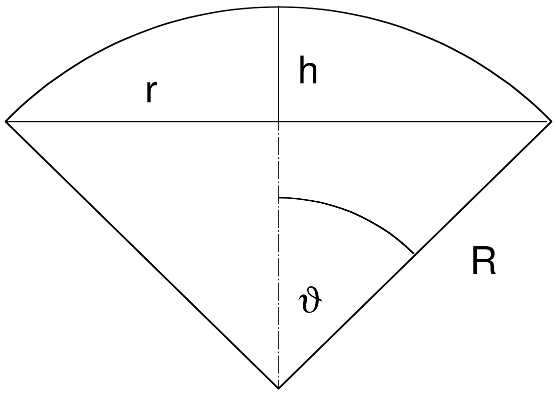

Abbildung 4.10: Die Geometrie für die Ableitung der Foliendurchbiegung

Die Bohrung im Testaufbau hat einen Durchmesser von 10 mm. Da das Vakuumfenster mit einem Durchmesser von 7,5 mm um den Faktor $\frac{3}{4}$ kleiner ist, erwartet man, daß es einem Überdruck von 2 bar standhält. Die Druckdifferenz zwischen Vakuum und Umgebung ist nur 1 bar. Ein Toleranzfaktor von 2 ist auch im Maschinenbau üblich.

4.4.2 Durchbiegung

Die Folie biegt sich unter der Druckbelastung zum Vakuum hin durch. So entsteht eine Luftblase, die die α-Teilchen durchdringen müssen. Da sie dabei Energie verlieren, und dieser Energieverlust in die Dosisberechnung eingehen muß, muß die Durchbiegung der Folie berechnet werden. Die folgende Ableitung folgt der Darstellung von Föppl [16]. Nimmt man an, daß die Folie unter Belastung eine Kugelsegment bildet, so kann man die Höhe des Abschnitts h nennen, den Radius der Kugel R und den der Schnittfläche r. Diese Größen sind in Abbildung 4.10 verdeutlicht. Es gilt dann

$$h = R - \sqrt{R^2 - r^2}. \tag{4.9}$$

Nennt man den Öffnungswinkel des Kugelsegments ϑ, so gilt für die relative Änderung der Länge eines Kreisdurchmessers l

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l} = \frac{2\,R\vartheta - 2\,R\sin\vartheta}{2\,R\vartheta} = 1 - \frac{r}{R} \cdot \frac{1}{\arcsin\frac{r}{R}}. \tag{4.10}$$

Taylorentwicklung um 0 ergibt:

$$\epsilon = \frac{1}{6}\left(\frac{r}{R}\right)^2 + O\left(\left(\frac{r}{R}\right)^4\right). \tag{4.11}$$

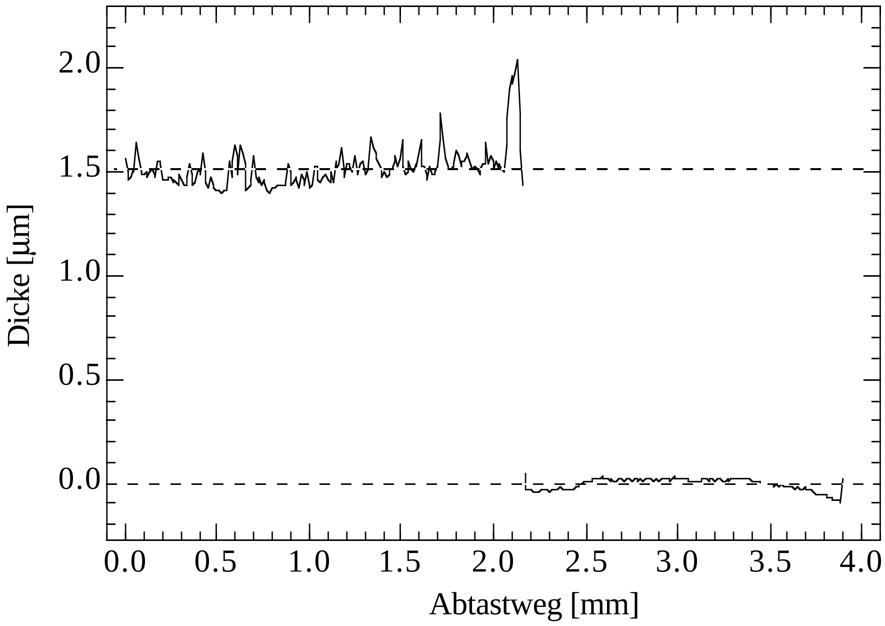

Abbildung 4.11: Messung der Dicke der TX-1-Folie. Dargestellt sind der Mittelwert der 12 Messungen des TallySurf und die Mittelwerte der Meßwerte auf und neben der Folie.

Ist E der Elastizitätsmodul, so gilt für die Spannung definitionsgemäß

$$\sigma = E \cdot \epsilon \tag{4.12}$$

und auf der Kugelschale

$$\sigma = \frac{pR}{2d}. \tag{4.13}$$

Insgesamt führt das zu

$$h \approx \frac{r}{2}\sqrt[3]{\frac{3pr}{Ed}}. \tag{4.14}$$

Eine genaue Ableitung müßte die Querkontraktionszahl von Aramid berücksichtigen (siehe Markús [34]), die aber nicht zur Verfügung steht.

Mit dem mittleren Elastizitätsmodul E=10.500 $\frac{N}{mm^2}$ ergibt sich h=0,78 mm. Die Höhe, die das Volumen des Kugelsegments halbiert, ist 0,53 mm. Dies ist die mittlere Weglänge, die ein α-Teilchen in der Luftblase zurücklegt. Dieses Maß wird bei der Berechnung des Energieverlustes benutzt.

4.4.3 Messung der Foliendicke

Die Dicke der TX-1-Folie wurde im Instituts für Solarenergieforschung Hannover mit einem TallySurf Modell 3 der Firma Taylor-Hobson vermessen. In diesem Gerät wird eine Nadel von einem Uhrwerk über die zu untersuchende Oberfläche gezogen. Die Nadel steht senkrecht zur Oberfläche und zur Abzugsrichtung.

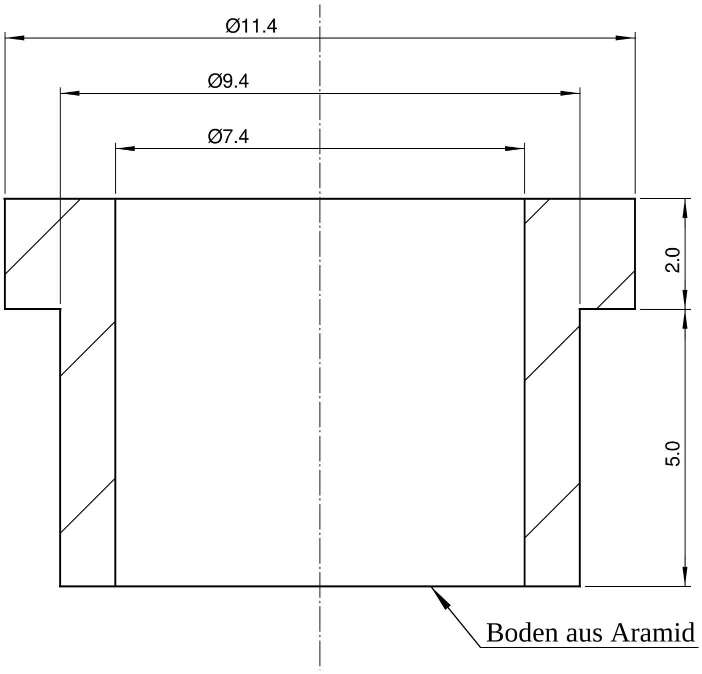

Abbildung 4.12: Zeichnung des Probengefäßes. Es wird aus Polypropylen gefertigt. Der Boden wird mit „UHU endfest 3000“ eingeklebt.

Sie ist an einem Permanentmagneten befestigt, der sich in einer Spule befindet, die ebenfalls senkrecht zu Oberfläche und Abzugsrichtung steht. Jede Bewegung der Nadel entlang ihrer Längsachse induziert so einen Strom, der als Meßsignal dient. Er wird von einem Speicheroszilloskop 54501A der Firma Hewlett-Packard aufgenommen. Die Daten werden mit einem selbstgeschriebenen Programm über die IEEE-Schnittstelle des Speicheroszilloskops in einen Computer eingelesen.

Vier Proben der TX-1-Folie wurden jeweils 2-4 mal vermessen. Der Rand der Folie ist als deutlicher Sprung in den Meßwerten erkennbar. Der Mittelwert der 12 Messungen ist in Abbildung 4.11 zu sehen. Die Dicke der Folie wird als Abstand der Mittelwerte der Meßwerte vor und nach dem Sprung bestimmt. Sie ist d=(1,52±0,01) μm.

4.5 Die Probengefäße

Da die α-Teilchen durch den Boden in das Probengefäß gelangen, muß dieser so beschaffen sein, daß er möglichst wenig Einfluß auf die Ionenenergie nimmt. Hier bietet sich wieder 1,5 μm dicke TX-1-Folie an. Der Rest des Gefäßes ist aus Polypropylen gefertigt, einem robusten und leicht zu bearbeitenden Kunststoff. Als Kleber wurde zuerst Araldit AV 118 erprobt. Das Datenblatt [11] empfiehlt, den Kleber bei 150°C aushärten zu lassen. Bei dieser Temperatur wellt sich aber die TX-1-Folie, womit die so geklebten Probengefäße unbrauchbar sind. Ein geeigneter Kleber ist „UHU endfest 3000“. Die Klebungen werden bei 70°C für 3 Stunden im Trockenschrank ausgehärtet.

Die Probengefäße müssen vor der Benutzung sterilisiert werden. Da Autoklavieren wegen der dabei auftretenden Temperatur von 140°C nicht in Frage kommt, werden die Gefäße mit Alkohol desinfiziert.

Kapitel 5

Eichung des Aufbaus

5.1 Totzeit

Für die Messungen ist die Bestimmung zweier Totzeiten erforderlich. Einerseits muß die Totzeit der Elektronik bis zum Gategenerator (Abb. 4.7) bekannt sein, da durch die Anzahl der Gatesignale die Dauer der Bestrahlung gesteuert wird. Andererseits ist es für die Energieeichung erforderlich, die Zahl der gestreuten Teilchen zu kennen; deshalb ist eine Totzeitkorrektur der Streuspektren nötig. Die Zahl k der detektierten Ereignisse ist um die Zahl der Ereignisse, die in die Totzeit fallen, geringer als die wahre Zahl m der Ereignisse:

$$k = m - k \cdot \frac{m}{T} \cdot \tau, \tag{5.1}$$

wobei T die Meßdauer und τ die Totzeit ist [29].

Zur Bestimmung der Totzeit wurde an Stelle des Vorverstärkers ein Pulser BH-1 der Firma BNC an den Spektroskopieverstärker angeschlossen. Mit zwei Zählern wurde die Anzahl der Pulse und die der Gatesignale gemessen. Aus der Differenz kann mit Gleichung 5.1 die Totzeit bestimmt werden. Die Länge der Gatesignale betrug während aller Messungen (1510±5) ns. Signale dieser Länge können höchstens mit einer Frequenz von (662±2) kHz auftreten. Bis zu einer Frequenz der Eingangspulse von 650 kHz konnte kein Unterschied der Zählraten festgestellt werden. Als Totzeit der Elektronik bis zum Gategenerator kann also die Gatelänge angenommen werden:

$$\tau_{Gate} = (1510 \pm 5)\ ns. \tag{5.2}$$

Die größte im Experiment auftretende Zählrate ist 32,1 kHz, das Mittel liegt bei (13±5) kHz. Die Anzahl der Gatesignale kann also direkt als Ereigniszahl interpretiert werden, die Totzeit kann vernachlässigt werden.

Da somit die Zahl der im Detektor nachgewiesenen Ionen bekannt ist, kann die Totzeit des ADC aus dem Unterschied zur Zahl der Ereignisse im Spektrum bestimmt werden. Sie beträgt:

$$\tau_{ADC} = (297 \pm 3)\, \mu s. \tag{5.3}$$

5.2 Energieeichung

Eine direkte Energieeichung des Aufbaus ist leider nicht möglich. Würde man mit einem Strahl bekannter Energie direkt in den Detektor schießen, wäre die Zählrate viel zu groß, der Detektor würde zerstört. Auch durch extreme Defokussierung und Veränderung der Quellenparameter läßt sich der Strom nicht ausreichend verringern. Eine Eichquelle läßt sich ebenfalls nicht einsetzen, da solche Quellen α-Energien im Bereich von 5 MeV zur Verfügung stellen. Da bei den Messungen aber Energien von weniger als 2 MeV auftreten, würde man mit einer Eichung auf 5 MeV mehr als die Hälfte der möglichen Energieauflösung verlieren. Für die Energieeichung wurden deshalb die Rutherford-Streuformel und der Energieverlust im Streutarget benutzt.

Da die kinetische Energie E_{kin} der verwendeten α-Teilchen kleiner ist als 1,9 MeV, gilt mit der Ruhemasse mc^2=3724,3 MeV

$$\beta = \sqrt{1 - \left[\frac{m_\alpha c^2}{E_{kin} + m_\alpha c^2}\right]^2} \leq 3 \cdot 10^{-2} \ll 1. \tag{5.4}$$

Für die Rechnung kann man also von Rutherford-Streuung ausgehen. Man nimmt an, daß ein nachgewiesenes α-Teilchen an *einem* Kern des Targets gestreut wurde, und daß die Streuung in der Mitte des Targets stattfindet. Beide Annahmen sind durch die geringe Targetdicke begründet. Die Anzahl der in das Raumwinkelelement $\Delta\Omega$ unter dem Winkel ϑ gestreuten Teilchen läßt sich mit der Streuformel

$$N = N_0 \cdot \Delta\Omega \cdot n_T \cdot \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_\vartheta \tag{5.5}$$

berechnen, wobei $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_\vartheta$ der differentielle Rutherford-Wirkungsquerschnitt ist, N_0 die Zahl der einfallenden Teilchen und n_T die der Targetkerne pro Fläche. Diese hängt mit der Molmasse M des Targetmaterials, der Avogadro-Konstante N_A und der Flächenbelegung μ des Targets zusammen:

$$n_T = \frac{\mu \cdot N_A}{M}. \tag{5.6}$$

Die Flächenbelegung wird in $\frac{\mu g}{cm^2}$ angegeben und ist ein Maß für die Dicke des Targets. Der differentielle Rutherford-Wirkungsquerschnitt ist (Mayer-Kuckuck [35]):

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_\vartheta = \left(\frac{Z_1 \cdot Z_2 \cdot e^2}{4E_{kin}}\right)^2 \cdot \sin^{-4}\left(\frac{\vartheta}{2}\right), \tag{5.7}$$

wobei Z_1 und Z_2 die Kernladungszahl von Target bzw. Projektil ist, und E_{kin} die kinetische Energie des Projektils beim Stoß. Insgesamt ist also die Flächenbelegung:

$$\mu = \frac{N}{N_0} \cdot \frac{M}{N_A} \cdot \frac{1}{\Delta\Omega} \left(\frac{4}{Z_1 \cdot Z_2 \cdot e^2}\right)^2 \cdot \sin^4\left(\frac{\vartheta}{2}\right) \cdot E_{kin}^2. \tag{5.8}$$

In dieser Gleichung sind außer der Flächenbelegung μ und der kinetischen Energie E_{kin} alle Größen der Messung zugänglich.

Die beiden nicht direkt meßbaren Größen treten auch im Energieverlust des α-Teilchens auf. Der Energieverlust im Target setzt sich aus dem Energieübertrag auf Elektronen vor dem Stoß ($\Delta E_{e,1}$), dem Energieübertrag auf den Stoßpartner (ΔE_r) und dem Energieübertrag auf Elektronen nach dem Stoß ($\Delta E_{e,2}$) zusammen:

$$E_{aus} = E_0 - \Delta E_{e,1} - \Delta E_r - \Delta E_{e,2}. \tag{5.9}$$

Der elektronische Energieverlust läßt sich durch den differentiellen Energieverlust $\left(\frac{dE}{dx}\right)$ausdrücken. Nennt man die Dicke des Targets, die das α-Teilchen vor dem Stoß durchdringt d, so ist die kinetische Energie des α-Teilchens beim Stoß

$$E_{kin} = E_0 - \int_0^d dEdx_{E(x)}dx. \tag{5.10}$$

Der differentielle Energieverlust ist tabelliert (vgl. 2.2), und es gibt interpolierende Funktionen zu diesen Tabellen, aber auch mit diesen Funktionen ist keine geschlossene Lösung des Funktionalintegrals in 5.10 möglich. Man denkt sich deshalb d in N Teilstücke zerlegt und geht zu der Abbildung

$$E_{i+1} = E_i - \frac{d}{N} \cdot \left(\frac{dE}{dx}\right)_{E_i} \qquad (i = 0 \dots N, E_{kin} = E_N) \tag{5.11}$$

über, die sich leicht programmieren läßt. Führt man nun noch die Dichte ρ des Targetmaterials ein und ersetzt d durch $\frac{\mu}{\rho}$, so erhält man die gewünschte Funktion von μ und E_{kin}:

$$E_{kin} = E_0 - \sum_{i=0}^{N-1} \frac{\mu}{\rho N} \cdot \left(\frac{dE}{dx}\right)_{E_i}. \tag{5.12}$$

Der differentielle Energieverlust wird mit einer Formel von Ziegler [57] bestimmt.

Eine erste Schätzung für die Flächenbelegung μ wird durch Wiegen eines Targets bestimmt. Mit diesem ersten Wert von μ berechnet man mit Gleichung 5.11 die kinetische Energie beim Stoß. Diese setzt man in Gleichung 5.8 ein und berechnet einen neuen Wert für μ. Nach wenigen Wiederholungen konvergiert dieses Verfahren.

Das beschriebene Verfahren liefert die Dicke μ des Targets und die kinetische Energie E_{kin} des α-Teilchens beim Stoß. Aus dieser Energie wird in klassischer Rechnung der Energieübertrag ΔR_r auf den Targetkern bestimmt. Anschließend wird wiederum mit Gleichung 5.12 der elektronische Energieverlust bis zum Austritt aus dem Target berechnet.

Um eine Schätzung für die Fehler der Energie und der Dicke zu erhalten, werden für jede Messung auch die Extremwerte der Fehlerbereiche der Eingangsgrößen eingesetzt. Diese Werte werden so kombiniert, daß sie sich in der gleichen

E_0	ΔE_0	E_{aus}	ΔE_{aus}	Kanal	HWHM
900	3	825	3	1055	30
1100	3	1023	3	1321	29
1300	3	1224	3	1585	32
1500	3	1418	3	1879	25
900	3	820	3	912	31
1100	3	1027	3	1186	29
1300	3	1227	3	1456	30
1500	3	1425	3	1731	27
300	0,04	244	1	758	30
360	0,04	306	1	976	31
420	0,04	361	1	1212	31
480	0,04	425	1	1441	32
540	0,04	484	1	1658	34
600	0,04	538	1	1876	32

Tabelle 5.1: Die Daten für die Energieeichungen. E_0 bezeichnet die Einschußenergie, ΔE_0 ihren Fehler, E_{aus} die Austrittsenergie und ΔE_{aus} deren Fehler. Alle Energien sind in keV angegeben. HWHM bezeichnet die halbe Halbwertsbreite der Verteilung.

Weise auf die Ergebnisse auswirken. Um z. B. den Maximalfehler für eine Dickenangabe zu bestimmen werden N+ΔN, N_0-ΔN_0, $E_0+\Delta E_0$, $\Delta\Omega$-$\Delta(\Delta\Omega)$ und $\vartheta+\Delta\vartheta$ eingesetzt. Dabei ist mit Δx der absolute Fehler der Größe x bezeichnet.

Aus den Messungen Phys012–Phys015, Phys048–Phys051 und MS001–MS006 (siehe Tabelle A.1) können Energieeichungen gewonnen werden. Dabei gelten die ersten beiden Eichungen für Messungen in Bochum, die dritte für Messungen in Münster. Zunächst werden mit dem Programm FIT [51, 50] Gauß-Peaks an die Streuspektren gepaßt. Die Schwerpunkte dieser Verteilungen werden den oben ermittelten Energien zugeordnet. Mit den Datenpaaren, die in Tabelle 5.1 aufgeführt sind, werden lineare Regressionen durchgeführt. Sie liefern für die Messungen in Bochum die Geradengleichungen

$$E = [(67 \pm 5) + (0.72 \pm 0.02) \cdot Kanal]\ keV, \tag{5.13}$$
$$E = [(148 \pm 10) + (0.74 \pm 0.02) \cdot Kanal]\ keV, \tag{5.14}$$

für die in Münster

$$E = [(46 \pm 4) + (0.263 \pm 0.003) \cdot Kanal]\ keV. \tag{5.15}$$

Die benutzten Zählraten stellen eine hohe Belastung für den Sperrschichtzähler dar. Das führt dazu, daß die Höhe der erzeugten Ladungspulse mit der Zeit geringer wird. Dieser Effekt drückt sich in den zwei verschiedenen Eichgeraden aus. Man erkennt, daß die Linearität nicht betroffen ist. Lediglich der

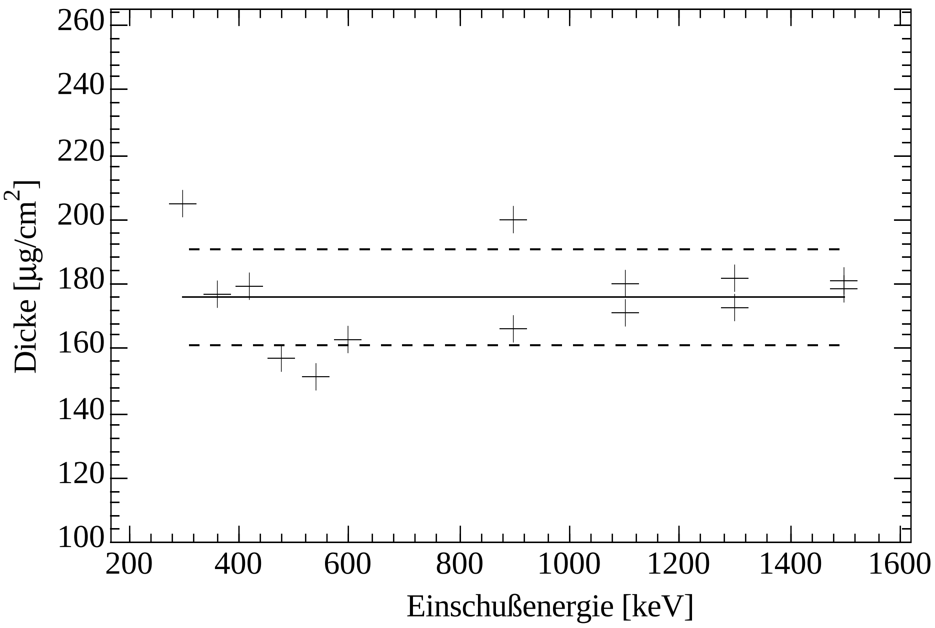

Abbildung 5.1: Ergebnisse der Messung der Dicke des Gold-Targets. Die durchgezogene Linie ist der fehlergewichtete Mittelwert, die gestrichelten zeigen die Standardabweichung.

Achsenabschnitt ändert sich. Als Energieeichung für die biologischen Bestrahlungen und die Energieverlustmessung wird die aus Gleichung 5.14 benutzt, da sie zeitlich näher an den Messungen liegt.

5.3 Bestimmung der Targetdicke

Wie bereits in Abschnitt 5.2 erwähnt, werden bei der Energieeichung die Energie beim Streuereignis und die Targetdicke abwechselnd so verändert, daß die errechneten Wirkungsquerschnitte sich den gemessenen angleichen. Somit liefert dieses Verfahren neben der Energie beim Stoß auch die Dicke des Targets. Aus den Messungen Phys012–Phys015, Phys048–Phys051 und MS001–MS006 (siehe Tabelle A.1) ergibt sich die Dicke des Goldtargets Au_3 zu

$$\mu = (176 \pm 15)\frac{\mu g}{cm^2}. \tag{5.16}$$

Dies ist der fehlergewichtete Mittelwert der einzelnen Dicken. Um die Fehler der einzelnen Dickenwerte abzuschätzen, wird ebenso vorgegangen wie bei der Energieeichung. Es werden jeweils die Extrema der Meßgrößen in ihren Fehlerbereichen so kombiniert, daß sie die maximale Auswirkung auf die Dicke haben. In Abbildung 5.1 sind die Meßwerte der Targetdicke, der Mittelwert und seine Standardabweichung dargestellt.

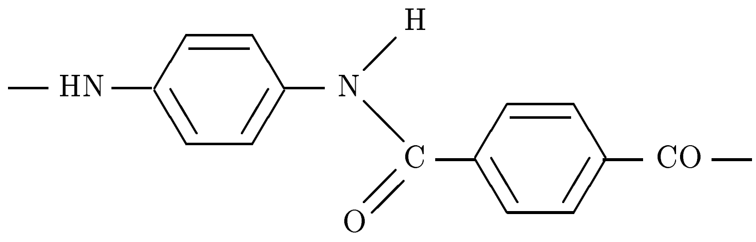

Abbildung 5.2: Strukturformel des Monomers von Poly-(p-Phenylentherephthalat) (nach Ullmann [20])

5.4 Energieverlust in Aramid

Aramid gehört nicht zu den Materialien, für die Energieverlustdaten vorliegen. Um den Energieverlust mit TRIM oder ASTAR abschätzen zu können, muß die Zusammensetzung des Materials bekannt sein. Die Firma TORAY, die die benutzte Folie herstellt, war nicht bereit, diese Information zur Verfügung zu stellen. In den einschlägigen Handbüchern ([13, 2, 41]) findet sich Aramid lediglich als Material für Fasern, nicht für Folien.

Als Aramide werden nach der Definition der US Federal Trade Commission synthetische, lineare Makromoleküle bezeichnet, bei denen mehr als 85% aller Amidgruppen direkt zwischen zwei aromatischen Ringen liegen, wobei bis zu 50% der Amidgruppen durch Imidgruppen ersetzt sein dürfen (Preston [41], nach Rickert [43]). Industriell werden vor allem Poly(m-phenylenisophthalamid) (MPIA) und Poly(p-phenylentherephthalat) (PPTA) eingesetzt. Von diesen beiden Polymeren ist PPTA in wesentlichen Eigenschaften, für die Daten vorliegen, der TX-1-Folie ähnlicher als MPIA (siehe Tabelle 5.2). Für die Berechnung der Energieverluste wird daher die Zusammensetzung von PPTA gemäß Tabelle 5.3 angenommen.

Bereits in Abschnitt 2.2.5 wurde darauf hingewiesen, daß die Berechnung des Energieverlustes in einer Verbindung aus den Energieverlusten in den einzelnen

	PPTA	MPIA	TX-1
Dichte $\left[\frac{g}{cm^3}\right]$	1,45	1,38	1,5
Feuchtigkeitsaufnahme [%]	1,5–2,5	4,5–5,5	1,5–1,8
Wärmebeständigkeit [$^\circ C$]	180–200	180–200	180
Beständig gegen			
konzentrierte Säuren	nein	nein	nein
organische Lösemittel	ja	nein	ja

Tabelle 5.2: Vergleich einiger Eigenschaften verschiedener Aramide. Die Daten von PPTA und MPIA sind Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry [17] entnommen, die für TX-1 dem Datenblatt [53].

Element	Anzahl	Anzahlanteil	Gewicht	Gewichtsanteil
Kohlenstoff	14	50%	168,15	70,6%
Sauerstoff	2	7%	32,00	13,4%
Stickstoff	2	7%	28,01	11,8%
Wasserstoff	10	36%	10,08	4,2%
Summe	28		238,24	

Tabelle 5.3: Zusammensetzung von PPTA.

Elementen mit einem großen Fehler behaftet sein kann. Um die Vorhersagen der Programme TRIM und ASTAR zu testen, wurde der Energieverlust in einer 1,5 μm dicken Aramidfolie gemessen. Dazu wurde die Folie in einen Halter unmittelbar vor der Detektorblende eingespannt. Der Aufbau entsprach ansonsten dem bei der Energieeichung (vgl. Abb. 4.6). Für die Berechnung der Energieverluste wurden die Messungen Phys022–Phys025, Phys034, Phys041–Phys047 und MS011–MS012 herangezogen.

Abbildung 5.3 zeigt die so bestimmten Energieverluste im Vergleich mit den von TRIM und ASTAR berechneten Werten. TRIM bietet die Möglichkeit, die stöchiometrischen Verhältnisse eines Materials anzugeben, das nicht in der Tabelle der vermessenen Materialien enthalten ist. Das Programm korrigiert dann die Ergebnisse der Bragg-Regel mit einer empirischen Formel, die die Bindungs-

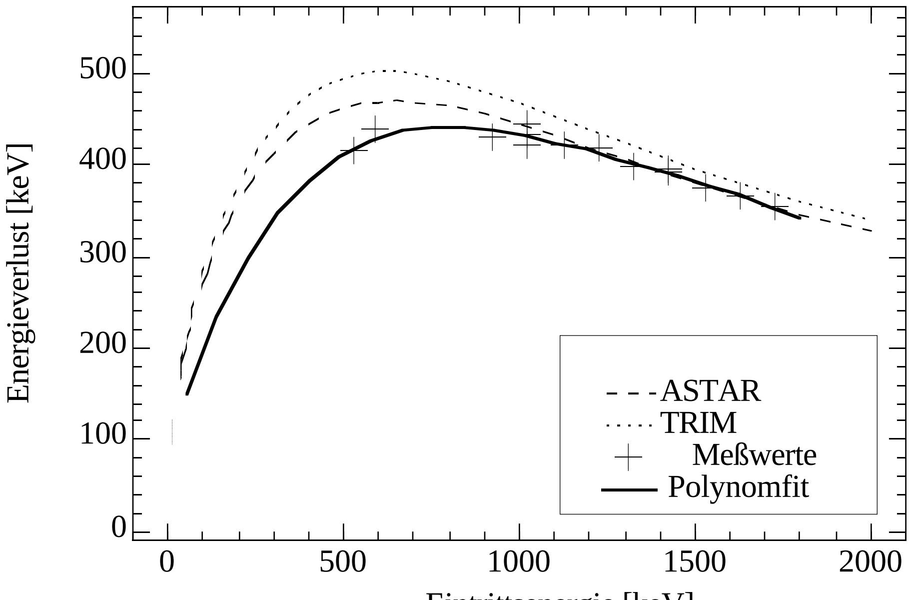

Abbildung 5.3: Absoluter Energieverlust in 1,5 μm Aramid.

Parameter	Wert	abs. Fehler
a_0	96	3
a_1	1,18	0,01
a_2	-1,40 $\cdot 10^{-3}$	0,02$\cdot 10^{-3}$
a_3	6,8$\cdot 10^{-7}$	0,1$\cdot 10^{-7}$
a_4	-1,27$\cdot 10^{-10}$	0,02$\cdot 10^{-10}$

Tabelle 5.4: Die Parameter eines Polynoms $\sum_{i=0}^{4} a_i\, E^i$, das an die absoluten Energieverluste in 1,5 μm Aramidfolie angepaßt wurde.

energien abschätzen und berücksichtigen soll. Bei der Berechnung mit ASTAR wurden lediglich die Energieverluste in den Elementen mit Hilfe der Bragg-Regel kombiniert.

Es zeigt sich, daß beide Programme den maximalen Energieverlust überschätzen. Bezogen auf den jeweils berechneten Wert liegt die Schätzung von TRIM 12 % zu hoch, die von ASTAR um 6 %. Beide Programme geben das Maximum bei zu niedrigen Energien an, TRIM um 170 keV, ASTAR um 140 keV. Für Energien über 1 MeV stimmen die Berechnungen von ASTAR sehr gut mit den gemessenen Werten überein.

An die Meßwerte wird ein Polynom 4. Grades angepaßt, das den Verlauf des Energieverlustes gut wiedergibt. Die Parameter des Polynoms

$$\sum_{i=0}^{4} a_i\, E^i \tag{5.17}$$

sind der Tabelle 5.4 zu entnehmen.

Ein Fit an die Funktionen 2.6–2.8 und 2.10–2.12 ist nicht sinnvoll. Der Parameter Z_1, die effektive Ionenladung, muß beim Fit variiert werden, ebenso Z_2 und M_2, da sich diese Größen für zusammengesetzte Materialien nicht aus den Ladungen und Massen der Elemente berechnen lassen. Für einen 8-parametrigen Fit liegen zu wenige Datenpunkte vor. Verschiedene Methoden der nichtlinearen Anpassung enden in lokalen Minima der Bewertungsfunktion. Die zugehörigen Funktionen ähneln dem Verlauf des Energieverlustes nicht.

5.5 Dosis, Dosisleistung und LET

Die Energiedosis ist die pro Masse deponierte Energie. Ihre Einheit ist das Gray:

$$1Gy = 1\frac{J}{kg} \approx 6,24 \cdot 10^{12}\frac{keV}{g}. \tag{5.18}$$

Zur Berechnung der Dosis muß zunächst die Energie am Probenort bestimmt werden. Die α-Teilchen verlieren im Target, im Vakuumfenster, in der Luftblase darüber und im Boden des Probengefäßes Energie:

$$E_{Probe} = E_0 - \Delta E_{Target} - \Delta E_{Fenster} - \Delta E_{Luft} - \Delta E_{Boden}. \tag{5.19}$$

Im Bestrahlungsaufbau befindet sich vor dem Detektor eine Aramidfolie. Die gemessene Energie ist also

$$E_m = E_0 - \Delta E_{Target} - \Delta E_{Fenster}. \tag{5.20}$$

Es wäre äußerst schwierig, vor dem Detektor im Vakuum auch eine Luftblase zu installieren, die der über dem Vakuumfenster entspricht. Es ist somit auch nicht sinnvoll, eine zweite Folie vor dem Detektor anzubringen, da die α-Teilchen mit einer anderen Energie in sie eintreten würden, als in den Boden des Probengefäßes.

Zur Berechnung des Energieverlustes in der Luft wird TRIM benutzt, da Luft hier in der Datenbank der Materialien enthalten ist, in denen der Energieverlust gemessen wurde. Die Luftfeuchte wird nicht berücksichtigt, weil ihr Einfluß gering ist. Der Energieverlust in Aramid wird mit dem in Abschnitt 5.4 bestimmten Polynom berechnet.

Die Energie der α-Teilchen beim Eintritt in die Luftblase beträgt (680±40) keV. Dieser Wert ist der Mittelwert der Messungen Bio001–Bio011. Die Breite der gemessenen Energieverteilung ist mit der maximalen Energieauflösung des Detektors nach den Herstellerangaben [15] korrigiert. Der Fehler ist die Standardabweichung des mit den Verteilungsbreiten gewichteten Mittels.

Der mittlere Energieverlust in der Luftblase ist (110±60,4) keV. Die Breite dieser Verteilung setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Das ist einerseits die Verbreiterung, die ein monoenergetischer Strahl beim mittleren Energieverlust erleidet; andererseits verbreitert sich die Verteilung, weil die Teilchen unterschiedlich viel Luft zu durchdringen haben. Der erste Anteil beträgt 7 keV, der zweite 60 keV. Diese Breiten werden quadratisch addiert. Die Verteilung, die durch die verschiedene Dicke der Luftschicht entsteht, ist keine Gauß-Verteilung. Weil aber eine genaue Rechnung, mit Hilfe der Faltung mit der Übertragungsfunktion, keine deutlichen Unterschiede zeigt, wird sie doch wie eine Gauß-Verteilung behandelt. Würde man an dieser Stelle die Faltung anwenden, wäre die entstehende Verteilung keine Gauß-Verteilung mehr, und in den weiteren Schritten wäre die einfachere Quadrataddition nicht mehr anwendbar. Dem steigenden Rechenaufwand steht kein Präzisionsgewinn gegenüber, da die Korrekturen zu gering sind.

Der mittlere Energieverlust im Boden des Probengefäßes ist (427±10) keV. Die Energie am Probenort ist

$$142 \pm 73\ keV. \tag{5.21}$$

Eine Hefezelle hat einen Durchmesser von etwa 2,5 μm und besteht zum größten Teil aus Wasser. Ihre Masse ist also etwa 8 pg. Ein α-Teilchen von 142 keV hat nach TRIM in Wasser eine Reichweite von 1,8 μm. Das α-Teilchen wird folglich in der Zelle vollständig gestoppt und deponiert seine ganze Energie in der Zelle. Die Dosis, die eine Zelle bei einem Treffer aufnimmt, ist also

$$2,8 \pm 1,5\ Gy. \tag{5.22}$$

Die Dauer einer Bestrahlung wird durch die Anzahl der im Detektor nachgewiesenen Teilchen bestimmt (vgl. Abschnitt 4.3). Diese Zahl muß also in Beziehung zur Dosis gesetzt werden. Das geschieht über die Raumwinkel von Probe und Detektor. Ist r der Durchmesser der Blende und R ihr Abstand vom Streuzentrum, so ist der Raumwinkel

$$\Delta\Omega = \pi \frac{r^2}{R^2}. \tag{5.23}$$

Mit den Maßen aus Tabelle 4.2 ist der Raumwinkel des Detektors

$$\Delta\Omega_{Detektor} = 0,27 msr \tag{5.24}$$

und der der Probe

$$\Delta\Omega_{Probe} = 4,25 msr. \tag{5.25}$$

Ihr Verhältnis ist 15,5. Auf dem Boden des Probengefäßes haben $6{,}25 \cdot 10^6$ Zellen Platz. Wenn im Detektor 403.226 Teilchen nachgewiesen sind, hat im Mittel jede Zelle einen Treffer erhalten. Die Dosen und Dosisleistungen, mit denen die einzelnen Proben bestrahlt wurden, sind in Tabelle 6.1 zusammengestellt.

Als LET wird der von α-Teilchen in Wasser angenommen. Er beträgt $(133 \pm 38)\ \frac{keV}{\mu m}$.

Kapitel 6

Biologische Ergebnisse

Am 1.2.96 wurden am DTL in Bochum 10 Proben von YACs mit p53 bestrahlt. Dabei wurde wie in Abschnitt 3.3 beschrieben vorgegangen. Zur Bestrahlung wurden Zellen der Stämme 204 E_7 und 427 G_{11} verwendet. Bei der Kontrolle hatte sich gezeigt, daß diese Stämme das Fragment der p53-Sequenz enthalten, auf das die hier verwendeten Primer passen. Nach der Bestrahlung wurden die Proben E_7 1 und E_7 2 auf jeweils zwei Platten verteilt. Die so entstandenen 4 Proben wurden als E_7 1 a, E_7 1 b, E_7 2 a und E_7 2 b bezeichnet.

6.1 Überlebensrate

Zur Bestimmung der Überlebensraten werden alle Proben herangezogen. Auf den AHC-Agar-Platten bilden die YAC-Hefen rote Kolonien, die sich leicht auszählen lassen. Diese Zellzahlen sind in Tabelle 6.1 mit den Dosen und Dosisleistungen zusammengestellt. Die mittlere Zellzahl pro Platte betrug 425 ± 35.

Als Parameter der AHC-Agar-Platten sind die Bestrahlungsdosis, die Dosisleistung, die Dauer der Bestrahlung, die Uhrzeit der Bestrahlung und die Reihenfolge der Auszählung bekannt. Um festzustellen, ob sich die Anzahl der Zellkolonien pro Platte mit einem dieser Parameter signifikant ändert, wird jeweils der lineare Korrelationskoeffizient nach Pearson [40] berechnet. Dieser Wert beschreibt die Abhängigkeit zwischen einer unabhängigen Variable und einer, die von dieser abhängt. In unserem Fall ist die abhängige Variable die Zahl der Zellen pro Platte, die unabhängige der jeweilige Parameter. Eine Korrelation von 1 bedeutet, daß die abhängige Variable linear mit der unabhängigen ansteigt. Bei -1 liegt ein linearer Abfall mit dem Anstieg der unabhängigen Variable vor.

Außerdem wird auch das Signifikanzniveau für die jeweilige Korrelation berechnet. Das ist die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Wert der Korrelation auftritt, *ohne* daß ein Zusammenhang zwischen den Daten besteht. Je geringer das Signifikanzniveau, desto wahrscheinlicher ist ein Zusammenhang der Variablen. Bei einem Signifikanzniveau von weniger als 5% wird die Korrelation als signifikant

Probe	Kolonien pro Platte	Dosis [Gy]	Dosisleistung $\left[\frac{mGy}{s}\right]$
E_7 1 a	381	2,7	45
E_7 1 b	389	2,7	45
E_7 2 a	390	2,7	20,9
E_7 2 b	407	2,7	20,9
E_7 3	465	27	51,9
E_7 4	420	27	47,6
E_7 5	402	27	47,2
E_7 6	421	40,6	50,9
E_7 7	482	40,6	47,9
E_7 8	440	40,6	51,3
E_7 9	416	69,4	52,6
G_{11}	464	92,3	89
K^- 1	407	0	0
K^- 2	407	0	0
K^- 3	490	0	0

Tabelle 6.1: Zellkolonien, Dosen und Dosisleistungen der YAC-Proben

bezeichnet, bei weniger als 1% als sehr signifikant.

Man erwartet, daß die Zahl der Kolonien mit zunehmender Dosis zunächst konstant bleibt und dann ab einer Schwelle steil abfällt (Kiefer [26]). Dieser Zusammenhang ist nicht festzustellen. Die eingebrachten Dosen sind zu gering, um den Abfall der Zellzahl zu beobachten. Um eine vollständige Überlebenskurve aufzunehmen, wären erheblich höhere Bestrahlungsdosen erforderlich. Auf solche Bestrahlungen wird verzichtet, da strahlungsinduzierte Mutationen untersucht werden sollten. Daß die Kolonienzahl nicht signifikant zur Dosis korreliert ist, kann aus der geringen Probenzahl erklärt werden.

Die einzige Korrelation, die nahezu signifikant ist, ist die zwischen der Uhrzeit der Bestrahlung und der Zahl der Kolonien. Dies kann als Übungseffekt gedeutet werden. Mit zunehmender Erfahrung gelang es demnach immer effektiver, die

	Dosis	Dauer	Dosis-Leistung	Uhrzeit	Reihenfolge der Zählung
Korrelation	0,4052	0,5005	0,1746	0,5069	0,2409
Signifikanz-niveau	13,4%	5,7%	53,4%	5,4%	38,7%

Tabelle 6.2: Korrelationen der Anzahl der Kolonien pro AHC-Agar-Platte mit den verschiedenen Parametern.

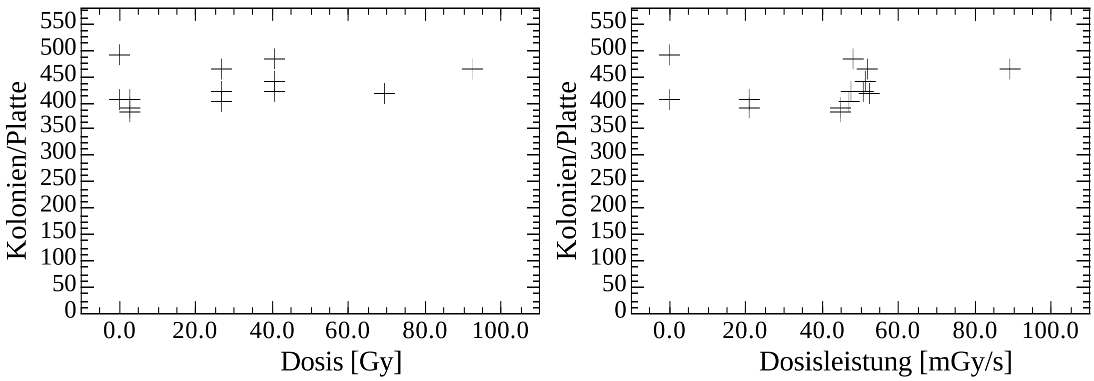

Abbildung 6.1: Die Anzahl der Zellkolonien pro AHC-Agar-Platte, aufgetragen gegen Dosis und Dosisleistung.

Zellen vom Boden des Probengefäßes abzuspülen.

6.2 Mutationen

Von der AHC-Agar-Platte der mit der höchsten Dosis bestrahlen Probe G_{11} wurden 60 Kolonien gepickt. Diese wurden wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben auf Mutationen untersucht. Bei der Kontroll-Elektrophorese zeigte sich, daß die PCR bei 50 Proben gelungen war. Bei der anschließenden SSCP fanden sich *keine* Mutationen.

Um eine Aussage über die Induktion von Mutationen machen zu können, muß zunächst die Rate der spontanen Mutationen aus den nicht bestrahlten Proben bestimmt werden. Dann kann diese Rate mit der der induzierten Mutationen verglichen werden. Um einen Unterschied der Raten statistisch signifikant zu belegen, müssen jeweils mehrere hundert Proben bearbeitet werden. Eine solche Untersuchung hätte den Rahmen einer Diplomarbeit im Fach Physik gesprengt und den Schwerpunkt der Arbeit auf die Durchführung biologischer Verfahren verschoben.

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war es, einen Aufbau zu konstruieren, in dem sich lebende Zellen unter physiologischen Bedingungen mit α-Teilchen geringer Energie bestrahlen lassen. Die Energie sollte bei guter Energieschärfe frei einstellbar sein, die Dosis sollte bei verschiedenen Dosisleistungen gut vorwählbar und exakt zu kontrollieren sein. In diesem Aufbau sollten YAC-Hefen mit dem Gen p53 bestrahlt und mit Hilfe der SSCP und der Sequenzierung nach Sanger auf Mutationen untersucht werden.

Um eine gute Energieschärfe bei einstellbarer Energie zu gewährleisten, wurde für die Bestrahlungen ein Ionenbeschleuniger benutzt. Der primäre Ionenstrom wurde durch Rutherford-Streuung an einem Gold-Target verringert. Zur Bestrahlung wurden die um 90° nach oben gestreuten α-Teilchen benutzt. Ebenfalls unter 90° wurde ein Oberflächensperrschichtzähler eingebaut, der es erlaubte, die α-Teilchen zu spektroskopieren und so die Dosis während der Bestrahlung zu messen.

Die Zellen waren bei der Bestrahlung durch ein Fenster aus Aramid-Folie vom Vakuum im Strahlrohr getrennt. Dieses neue Material hat sich wegen seiner großen mechanischen Belastbarkeit in dieser Anwendung als besonders geeignet erwiesen. Da der differentielle Energieverlust in Aramid noch nicht bekannt war, und die Extrapolation mit Hilfe der Bragg-Regel ungenau ist, wurde er gemessen.

Die zu bestrahlenden YAC-Zellen wurden in einem waagerecht stehenden Probengefäß über dem Streutarget angebracht. Die α-Teilchen traten durch den Boden dieses Gefäßes ein, der ebenfalls aus Aramid gefertigt war. Der Aufbau erlaubte es, die Zellen während der Bestrahlung unter Normaldruck und Raumtemperatur zu belassen. Die Zellen befanden sich in einer Nährlösung. Ein der Nährlösung zugesetzter Sexualfaktor bewirkte, daß die Zellen sich während der Bestrahlung nicht teilten. Die so behandelten Einzelzellen bildeten eine Monolayer am Boden des Probengefäßes. So war sichergestellt, daß alle Zellen mit der gleichen Dosis bestrahlt wurden.

Am DTL in Bochum wurden Zellen mit Dosen von 2,7 Gy bis 92,3 Gy bei Dosisleistungen zwischen 20 $\frac{mGy}{s}$ und 89 $\frac{mGy}{s}$ bestrahlt. Dabei zeigte sich, wie erwartet, keine erhöhte Sterblichkeit. Die Rate der induzierten Mutationen wurde nicht bestimmt. Wegen der erforderlichen statistischen Auswertung hätte eine sehr große Zahl von Proben ausgewertet werden müssen, was den Rahmen einer Diplomarbeit im Fach Physik gesprengt hätte.

Bei einer Primärenergie von (1.200±3) keV ist die Energie am Probenort (142±73) keV. Der Hauptteil der Energie geht in der Aramid-Folie verloren. Der größten Anteil an der Energieunschärfe kommt aus der Luft zwischen dem Vakuumaustrittsfenster und dem Boden des Probengefäßes. Da das Fenster annähernd die Form einer Kugelschale annimmt, verlieren α-Teilchen, die an verschiedenen Stellen durch die Luftblase treten, unterschiedlich viel Energie.

Da sich der Aufbau zur Bestrahlung von lebenden Zellen unter physiologischen Zellen geeignet erwiesen hat, sollten diese Experimente fortgesetzt werden. Es sollten nun Bestrahlungen mit verschiedenen Energien durchgeführt werden, um die Energieabhängigkeit der Mutationsrate zu untersuchen. Dabei sollten insgesamt höhere Dosen benutzt werden, da die Hefezellen sehr robust gegen Strahlenschäden sind.

Ohne Veränderung des Aufbaus sind auch Untersuchungen mit schwereren Ionen denkbar. Am DTL sind bereits Ionenstrahlen aus fast allen stabilen Elementen erzeugt worden. Es wäre allerdings zu betrachten, bis zu welcher Kernladung und -masse die Annahme reiner Rutherford-Streuung gerechtfertigt ist. Auch steigen mit diesen beiden Größen der Energieverlust und die Beschädigung des Gold-Targets.

Sobald am Institut für Strahlenbiologie die Methode der Aufzucht von menschlichen Lungenzellen als Monolayer auf Kunststoffolien etabliert ist, sollten diese Zellen untersucht werden.

Die Energieschärfe am Probenort kann noch nicht als befriedigend betrachtet werden. Der Ansatzpunkt für Verbesserungen ist die Luftblase zwischen dem Vakuumfenster und dem Boden des Probengefäßes. Sie ließe sich verkleinern, indem das Vakuumfenster verkleinert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, ein feines Gitter z. B. aus Aramid-Fasern unterzulegen. So könnte die Durchbiegung verringert werden.

Eine weitere interessante Aussicht wären ortsaufgelöste Experimente. Würde man zwischen Vakuumfenster und Probengefäß einen Trackdetektorfilm einbringen, könnte man die Mutationen in einer Zelle mit dem Durchgang eines α-Teilchens korrelieren. Eine Fotografie der Zellschicht würde über eine des Entwickelten Trackdetektorfilms gelegt, um festzustellen, welche Zelle wo wieviele Treffer erlitten hat. Die Verwendung solcher Trackdetektorfilme ist ebenso Standard wie Techniken, einzelne Zellen gezielt aus der Zellschicht zu entnehmen und zu untersuchen. Die wesentliche Schwierigkeit ist es, die beiden Fotografien mit der Genauigkeit eines Zelldurchmessers ($\approx 2\mu$m) übereinanderzulegen.

Eine andere Möglichkeit für ortsaufgelöste Experimente bietet der Microbeam, der am DTL zur Verfügung steht. Dieser Strahl hat einen Durchmesser von ca.

1 μm. Mit Hilfe von modernsten Microstrip-Detektoren ließe er sich auch mit dieser Genauigkeit positionieren. In Kombination mit den Erfahrungen in der Konstruktion des Vakuumaustrittsfensters und der Handhabung und Auswertung von Zellen können sich weitere Einblicke in die Strahlenwirkung eröffnen.

Anhang A

Die Messungen

Tabelle A.1 stellt die bei den Messungen ermittelten Grunddaten zusammen. Die verwendeten Abkürzungen sind:

E_0: Die Einschußenergie in MeV.

Counts: Die Anzahl der Gatesignale während der Messung.

T: Die Meßdauer in Minuten.

Q: Die während der Messung im Faraday-Cup gesammelte Ladung in 10^{-7}C.

Target: Die Bezeichnung des für diese Messung benutzen Targets. Es kamen 2 Kohlenstofftargets (C_1, C_2) und 3 Goldtargets (Au_1, Au_2, Au_3) zum Einsatz.

ϑ : Der Streuwinkel in Grad.

A: Die Anzahl der Aramidfolien zwischen Target und Detektor.

Probe: Die Bezeichnung der bestrahlten biologischen Probe.

Messung	E_0 [MeV]	Counts	T [min]	Q [10^{-7}C]	Target	ϑ [°]	A	Probe
Messungen am 19.12.95								
Bo001	1,5	700.000			C_1	25	0	-
Bo002	1,4	700.000			C_1	25	0	-
Bo003	1,1	300.000			C_1	25	0	-
Bo004	1,1	200.000			Au_1	25	0	-
Bo005	1,1	82.337			Au_1	25	1	-
Bo006	1,1	100.000			Au_1	25	1	-
Bo007	1,1	70.000			Au_1	90	0	-

Messung	E_0 [MeV]	Counts	T [min]	Q [10^{-7}C]	Target	ϑ [°]	A	Probe
			Messungen am 20.12.95					
Bo008	1,5	390.000	4:57		Au_1	90	1	-
Bo009	1,5	390.000	7:32		Au_1	90	1	1
Bo010	1,5	390.000	3:17		Au_1	90	2	2
Bo011	1,5	390.000	3:24		Au_1	90	2	3
Bo012	1,5	780.000	7:55		Au_1	90	2	4
Bo013	1,5	780.000	6:35		Au_1	90	2	5
Bo014	1,5	1.560.000	14:50		Au_1	90	2	6
Bo015	1,5	1.560.000	21:07		Au_1	90	2	7
Bo016	1,5	2.730.000	31:28		Au_1	90	2	8
Bo017	1,5	2.730.000	29:05		Au_1	90	2	9
Bo018	1,5	3.900.000	43:56		Au_1	90	2	12
Bo019	1,5	3.900.000	45:51		Au_1	90	2	13
Bo020	-	-	45:00					14
Bo021	-	-	30:00					15
Bo022	-	-	15:00					16
Bo023	-	-	7:00					17
Bo024	-	-	3:00					18
Bo025	1,5	200.000			Au_1	90	0	-
Bo026	1,5	50.527			C_1	90	0	-
			Messungen am 21.12.95					
Bo027	1,6	390.000			Au_1	90	2	-
Bo028	1,6	390.000			Au_1	90	2	-
Bo029	1,6	390.000			Au_1	90	2	-
Bo030	1,6	390.000			Au_1	90	2	-
Bo031	1,6	390.000			Au_1	90	2	-
Bo032	1,6	1.170.000	15		Au_1	90	2	20
Bo033	1,6	1.170.000	18		Au_1	90	2	21
Bo034	1,9	1.170.000	16		Au_1	90	2	22
Bo035	1,9	1.170.000	17		Au_1	90	2	23
Bo036	1,5	53.756	20		C_1	90	0	-
			Messungen am 30.1.96					
Phys001	1,5	900.000			Au_2	25	0	-
Phys002	1,5	900.000			Au_3	25	0	-
Phys004	1,5	1.800.000	2:39	98,8	Au_3	25	0	-
Phys005	1,3	1.800.000	1:42	73,8	Au_3	25	0	-
Phys006	1,1	1.800.000	1:45	51,88	Au_3	25	0	-
Phys007	0,9	1.800.000	1:17	34,16	Au_3	25	0	-
Phys008	1,5	1.800.000	1:40	99,44	Au_3	25	0	-

Messung	E_0 [MeV]	Counts	T [min]	Q [10^{-7}C]	Target	ϑ [°]	A	Probe
Messungen am 31.1.96								
Phys012	1,5	900.000	3:53	44,46	Au_3	25	0	-
Phys013	1,3	1.800.000	1:30	73,90	Au_3	25	0	-
Phys014	1,1	1.800.000	1:46	51,74	Au_3	25	0	-
Phys015	0,9	1.800.000	1:31	34,96	Au_3	25	0	-
Phys016	0,9				Au_3	25	0	-
Phys017	0,9				Au_3	25	0	-
Phys018	0,9				Au_3	25	0	-
Phys019	0,9				Au_3	25	0	-
Phys020	0,9				Au_3	25	0	-
Phys021	0,9	200.000	3:55		Au_3	25	1	-
Phys022	1,1	900.000	1:47		Au_3	25	1	-
Phys023	1,3	1.800.000	2:10		Au_3	25	1	-
Phys024	1,5	1.800.000	2:27		Au_3	25	1	-
Phys025	1,7	1.800.000	2:12		Au_3	25	1	-
Phys026	1,1	900.000	2:14		Au_3	90	0	-
Phys027	1,1	900.000	7:27		Au_3	90	1	-
Phys028	1,1	900.000	3:03		Au_3	90	1	-
Phys029	1,1	900.000	6:54		Au_3	90	1	-
Messungen am 1.2.96								
Phys031	1,2	900.000	2:37		Au_3	90	1	-
Bio001	1,2	390.000	1:00		Au_3	90	1	E_7 1
Bio002	1,2	390.000	2:09		Au_3	90	1	E_7 2
Bio003	1,2	3.900.000	8:40		Au_3	90	1	E_7 3
Bio004	1,2	3.900.000	9:27		Au_3	90	1	E_7 4
Bio005	1,2	3.900.000	9:31		Au_3	90	1	E_7 5
Bio006	1,2	5.850.000	14:11		Au_3	90	1	
Bio007	1,2	5.850.000	13:17		Au_3	90	1	E_7 6
Bio008	1,2	5.850.000	14:07		Au_3	90	1	E_7 7
Bio009	1,2	5.850.000	13:12		Au_3	90	1	E_7 8
Bio010	1,2	10.000.627	22		Au_3	90	1	E_7 9
Bio011	1,2	13.295.426	17:17		Au_3	90	1	G_{11} 1
Bio012	-	-	20					K^- 1
Bio013	-	-	20					K^- 2
Bio014	-	-	20					K^- 3
Phys032	1,2	900.000	2:15		Au_3	90	1	-
Phys033	1,1	900.000	2:08		Au_3	90	0	-
Phys034	1,1	1.800.000	1:22		Au_3	25	1	-

Messung	E_0 [MeV]	Counts	T [min]	Q [10^{-7}C]	Target	ϑ [°]	A	Probe
Messungen am 2.2.96								
Phys041	1,1	900.000	2:54	118,88	Au_3	25	1	-
Phys042	1,0	1.800.000	2:25	48,22	Au_3	25	1	-
Phys043	1,2	1.800.000	2:00	68,62	Au_3	25	1	-
Phys044	1,4	1.800.000	2:58	92,00	Au_3	25	1	-
Phys045	1,5	1.800.000	2:31	102,58	Au_3	25	1	-
Phys046	1,6	1.800.000	2:51	118,44	Au_3	25	1	-
Phys047	1,8	1.800.000	3:27	150,88	Au_3	25	1	-
Phys048	1,5	1.800.000	2:29	98,58	Au_3	25	0	-
Phys049	1,3	1.800.000	1:38	76,98	Au_3	25	0	-
Phys050	1,1	1.800.000	1:39	55,26	Au_3	25	0	-
Phys051	0,9	1.800.000	0:56	37,66	Au_3	25	0	-
Messungen am 21.2.96 in Münster								
MS001	0,6	3.203.130	2:22	29,64	Au_3	25	0	-
MS002	0,54	3.685.153	3:10	29,75	Au_3	25	0	-
MS003	0,48	4.901.890	6:36	29,70	Au_3	25	0	-
MS004	0,42	7.514.753	7:03	29,71	Au_3	25	0	-
MS005	0,36	10.224.622	5:43	29,73	Au_3	25	0	-
MS006	0,3	17.820.306	7:43	29,73	Au_3	25	0	-
MS007	0,24	10.026.072	4:06	19,45	Au_3	25	0	-
MS010	0,6	49.174			Au_3	25	1	-
MS011	0,6	2.033.713	3:46	29,83	Au_3	25	1	-
MS012	0,66	1.792.644	2:49	29,81	Au_3	25	1	-

Tabelle A.1: Grunddaten der Messungen

Anhang B

Kulturmedien und Puffer

Im folgenden sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und des Kulturmediums für die YAC-Zellen aufgelistet. Puffer und Nährmedium wurden entsprechend den Vorschriften von Maniatis [44] gefertigt.

AHC Kulturmedium für YACs (1 l)

- 6,7 g Yeast Nitrogen Base (Fa. DIFCO)
- 10 g Casein-Hydrolysat
- a ml 1%ige Adenin-Hemisulfat-Lösung
- 50 ml 40%ige Glukose-Lösung
- ad 1 l H_2O
- pH 5,8 einstellen

Lysis-Puffer für die DNA-Isolierung

- 50 mM Tris pH 7,5
- 25 mM EDTA
- 500 mM NaCl
- 1% SDS

PCR-Puffer (50 ml)

- 25 ml 1 M KCl
- 5 ml 1 M Tris-HCl pH 9
- 5 ml 150 mM $MgCl_2$
- 500 μl Gelatine
- 500 μl Triton$\times$100
- ad 50 ml H_2O

SCE Waschpuffer für Hefen

- 1 M Sorbitol
- 20 mM EDTA pH 8
- 0,1 M NaCitrat pH 7,0

TAE-Puffer (50×TAE, 500 ml)

- 121 g Tris Base
- 28,55 ml Eisessig
- 50 ml 0,5 M EDTA pH 8

TE-Puffer .

- 10 mM Tris-Cl, pH 7,4
- 1 mM EDTA pH 8

Anhang C

Primer und untersuchte Sequenz

Für die PCR im Bereich des Gens p53 wurden 3 Primer bei der Firma MWG-Biotech[1] bestellt. Die Sequenzen dieser Primer lauten:

Primer 730: `5'--TTC CTG CAG TAC TCC CCT GCC--3'`

Primer 731: `5'--GCA AAT TTC CTT CCA CTC GG--3'`

Primer 758: `5'--TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT G--3'`

Der damit abgedeckte Ausschnitt aus der Sequenz des Gens p53 ist im folgenden aufgeführt. Die Hybridisierungsstellen der drei Primer sind unterstrichen. Die Exons sind in Großbuchstaben dargestellt, die Introns in Kleinbuchstaben.

```
12001 ctcttttcac ccatctacag TCCCCCTTGC CGTCCCAAGC AATGGATGAT TTGATGCTGT Primer 758
12061 CCCCGGACGA TATTGAACAA TGGTTCACTG AAGACCCAGG TCCAGATGAA GCTCCCAGAA
12121 TGCCAGAGGC TGCTCCCCGC GTGGCCCCTG CACCAGCAGC TCCTACACCG GCGGCCCCTG Exon 4
12181 CACCAGCCCC CTCCTGGCCC CTGTCATCTT CTGTCCCTTC CCAGAAAACC TACCAGGGCA
12241 GCTACGGTTT CCGTCTGGGC TTCTTGCATT CTGGGACAGC CAAGTCTGTG ACTTGCACGg
12301 tcagttgccc tgaggggctg gcttccatga gacttcaatg cctggccgta tccccctgca
12361 tttcttttgt ttggaacttt gggattcctc ttcaccctta ggcttcctgt cagtgttttt
12421 ttatagttta cccacttaat gtgtgatctc tgactcctgt cccaaagttg aatattcccc
12481 ccttgaattt gggcttttat ccatcccatc acaccctcag catctctcct ggggatgcag
12541 aacttttctt tttcttcatc cacgtgtatt ccttggcttt tgaaaataag ctcctgacca
12601 ggcttggtgg ctcacacctg caatcccagc actctcaaag aggccaaggc aggcacatca
12661 cctgagcccc aggagttcaa gaccagcctg ggtaacatga tgaaacctcg tctctacaaa
12721 aaaatacaaa aaattagcca ggcatggtgg tgcacaccta tagtcccagc cactcaggag
12781 gctgaggtgg gaagatcact tgaggccagg agatggaggc tgcagtgagc tgtgatcaca
12841 ccactgtgct ccagcctgag tgacagagca agaccctatc tcaaaaaaaa aaaaaaagaa
12901 aagctcctga ggtgtagacg ccaactctct ctagctcgct agtgggttgc aggaggtgct
12961 tacacatgtt tgtttctttg ctgccgtgtt ccagttgctt tatctgttca cttgtgccct
13021 gactttcaac tctgtctcct tcctcttcct acagTACTCC CCTGCCCTCA ACAAGATGTT Primer 730
13081 TTGCCAACTG GCCAAGACCT GCCCTGTGCA GCTGTGGGTT GATTCCACAC CCCCGCCCGG Exon 5
13141 CACCCGCGTC CGCGCCATGG CCATCTACAA GCAGTCACAG CACATGACGG AGGTTGTGAG
13201 GCGCTGCCCC CACCATGAGC GCTGCTCAGA TAGCGATGgt gagcagctgg ggctggagag
```

[1] MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, email: oligo@mwgdna.com

```
13261 acgacagggc tggttgccca gggtccccag gcctctgatt cctcactgat tgctcttagG
13321 TCTGGCCCCT CCTCAGCATC TTATCCGAGT GGAAGGAAAT TTGCGTGTGG AGTATTTGGA Primer 731
13381 TGACAGAAAC ACTTTTCGAC ATAGTGTGGT GGTGCCCTAT GAGCCGCCTG AGgtctggtt Exon 6
```

Anhang D

Größen und Einheiten

Aktivität

Die Aktivität ist die Anzahl der Zerfälle pro Sekunde. Ihre Einheit ist das Bequerel (Bq).

$$1\,Bq = 1\,\frac{Zerfall}{s} \tag{D.1}$$

Die alte, nicht SI-konforme Einheit ist das Curie (Ci). Es entspricht der Aktivität von 1 g reinem, d. h. auch von seinen Folgeprodukten befreitem Radium. Aus der relativen Atommasse von ^{226}Ra und seiner Halbwertszeit von 1.580 a ergibt sich die Umrechnung

$$1\,Ci = 3,7 \cdot 10^{10}\,Bq. \tag{D.2}$$

Energiedosis

Die Energiedosis D ist die gesamte pro Masse absorbierte Energie. Ihre SI-Einheit ist das Gray (Gy):

$$1\,Gy = 1\,\frac{J}{kg} \approx 6,24 \cdot 10^{12}\,\frac{keV}{g}. \tag{D.3}$$

Die alte Einheit ist das rad (rd), definiert als

$$1\,rd = 0,01\,\frac{J}{kg} = 0,01\,Gy. \tag{D.4}$$

Die Energiedosisleistung ist als die pro Sekunde deponierte Dosis definiert. Ihre Einheit ist $\frac{Gy}{s}$.

Strahlungsart	Qualitätsfaktor $\left[\frac{Sv}{Gy}\right]$
Röntgen- und γ-Strahlung	1
β-Strahlung	1
Elektronen	1
Positronen	1
Protonen mit Energien >2 MeV	2
Neutronen mit Energien < 10 keV	3
Neutronen mit Energien > 10 keV	10
Spaltfragmente, Rückstoßkerne	20
α-Strahlung	20

Tabelle D.1: Die Qualitätsfaktoren der verschiedenen Strahlungsarten gemäß der deutschen Strahlenschutzverordnung.

Ionendosis

Die Anzahl der in einem kg erzeugten Ionenpaare wird als Ionendosis bezeichnet. Ihre alte Einheit ist das Röntgen (R). 1 R war ursprünglich als die Ionendosis definiert, die in 1 cm^3 Luft bei 1 bar und 20°C 2,08·10^9 Ionenpaare erzeugt. Bezogen auf 1 kg ist das

$$1\,R = 2,58 \cdot 10^{-4} \frac{A\,s}{kg}. \tag{D.5}$$

Die SI-Einheit der Ionendosis ist $\frac{A\,s}{kg}$.

Die Ionendosisleistung ist die Zahl der pro Sekunde und kg erzeugten Ionenpaare. Die Einheit ist $\frac{A}{kg}$.

Bei der Strahlentherapie mit ^{60}Co werden Ionendosisleistungen im Bereich 0,3–1,8 $\cdot 10^{-3} \frac{C}{kg\,s}$ benutzt.

Äquivalentdosis

Da die biologische Wirkung der verschiedenen Strahlungsarten unterschiedlich ist, wird sie nicht allein durch die Dosis beschrieben. Man definiert daher die Äquivalentdosis als mit Qualitätsfaktoren gewichtete Summe über die Energiedosen aus den einzelnen Strahlungsarten:

$$H_W = \sum_i QF_i\, D_i. \tag{D.6}$$

Die Qualitätsfaktoren sind in Tabelle D.1 zusammengestellt. Sie werden vom Gesetzgeber festgesetzt und sind daher Schwankungen unterworfen und international nicht einheitlich. Die Qualitätsfaktoren der deutschen Strahlenschutzverordnung liegen teilweise deutlich unter den von der ICRP[1] empfohlenen. Für α-Teilchen schlägt die ICRP beispielsweise einen Wert von 25 vor.

Die Einheit der Äquivalentdosis ist das Sievert (Sv). Ein Sievert ist die Äquivalentdosis, die einer Energiedosis von 1 Gy entspricht. Entsprechend ist die alte Einheit rem (Röntgen equivalent man) als die Äquivalentdosis definiert, die 1 rd entspricht. Die Umrechnung ist entsprechend

$$1\,Sv = 100\,rem. \tag{D.7}$$

Die Einheit Sv wird immer dann verwendet, wenn eine Summation gemäß Gleichung D.6 durchgeführt wurde. Da die Qualitätsfaktoren QF_i international unterschiedlich sind, sind Angaben der Äquivalentdosis in Sv *nicht vergleichbar.*

Zur Äquivalentdosis ist auch die Äquivalentdosisleistung in $\frac{Sv}{s}$ definiert.

Die Bevölkerung der Bundesrepublik ist im Mittel einer Strahlenbelastung von ca. 4 mSv pro Jahr ausgesetzt [10]. Der gesetzliche Grenzwert liegt bei 50 mSv pro Jahr. Für Personen, die beruflich strahlenexponiert sind, gilt ein erhöhter Grenzwert von 500 mSv pro Jahr.

Linearer Energietransfer (LET)

Die Energie, die ein ionisierendes Teilchen bezogen auf seinen Weg durch die Materie deponiert, nennt man den Linearen Energietransfer. Man betrachtet dabei die Projektion der Teilchenspur auf die Eintrittsrichtung. Die gebräuchliche Einheit ist $\frac{keV}{\mu m}$.

Die Energie, die ein Teilchen auf dem infinitesimalen Wegstück dx verliert, wird auch als differentieller Energieverlust bezeichnet. Der Weg wird dabei mit Hilfe der Dichte in der Einheit $\frac{\mu g}{cm^2}$ angegeben. Die übliche Einheit des differentiellen Energieverlustes ist damit $\frac{keV\,cm^2}{\mu g}$.

[1]International Commission on Radiation Protection

Literaturverzeichnis

[1] Albertsen, H. M.; Abderrahim, H.; Cann, H. M. et al. : Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. Proceedings of the National Academy of Science, 87, S. 4256–4260, Juni 1990. Kontakt: denis@ceph.cephb.fr (Denis Le Paslier).

[2] Aramide. In: Falbe, J. und Regnitz, M. (Hg.): Römpp Chemie Lexikon, Band 1, S. 236–237. Verlag Georg Thieme, Stuttgart, New York, 9. Auflage, 1989.

[3] Azziz, N.; Hajnal, F.; Lowder, W. M. et al. : Stopping power and the concept of effecive ion charge at low energies. Radiation Research, 132, S. 277–281, 1992.

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

[5] Becker, H. W.; Bahr, M.; Berheide, M. et al. : Hydrogen depth profiling using ^{18}O ions. Zeitschrift fur Physik A, 351, S. 453–465, 1995.

[6] Berg, P. und Singer, M. : Die Sprache der Gene, Grundlagen der Molekulargenetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1993.

[7] Berger, M. J. : ESTAR, PSTAR & ASTAR, Computer programs for calculating stopping-power and range tables for electrons, protons and helium ions. Ionizing Radiation Division, National Institute of Standards and Technology, Gaitherburg, MD 20895.

[8] Bird, R. P.; Rohrig, N.; Colvett, R. D. et al. : Inactivation of synchronized Chinese hamster V79 cells with charged-particle track segments. Radiation Research, 82, S. 277–289, 1980.

[9] Brand, C. : Persönliche Mitteilung.

[10] Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Bericht der Bundesregierung an den deutschen Bundestag über Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung im Jahr 1993, September 1994. Bundesdrucksache 12/8539.

[11] Ciba-Geigy. Konstruktionsklebstoffe: Arladit AV 118, August 1985. Publ.-Nr. 24869/1/d.

[12] Colvett, R. D. und Rohrig, N. : Biophysical Studies with spacially correlated ions, 2. Multiple scattering, experimental facility, and dosimetry. Radiation Research, 78, S. 192–209, 1979.

[13] Composite Materials. In: Gerhertz [17], S. 379–380.

[14] Culotta, E. und Koshland, D. E. J. : Molecule of the year: p53 sweeps through cancer research. Science, 262(5142), S. 1953, Dezember 1993.

[15] EG&G Ortec. Modular Pulse-Processing Electronics and Semiconductor Radiation Detectors, November 1994.

[16] Föppl, A. : Vorlesungen über Technische Mechanik, Festigkeitslehre, Band 3. Oldenbourg, München, 15. Auflage, 1951.

[17] Gerhertz, W. (Hg.): Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH Verlagsgesellschaft, Cambridge, New York, 5. Auflage, 1987.

[18] Gerthsen, C. und Vogel, H. : Physik, Ein Lehrbuch zum Gebrauch neben Vorlesungen. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 18. Auflage, 1995.

[19] Goodhead, D. T. : Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. International Journal of Radiation Biology, 65(1), S. 7–17, 1994.

[20] High Performance Fibers. In: Gerhertz [17], S. 11–17.

[21] Hoechst AG, Frankfurt/M. Hostaphan, 2 1980.

[22] Inkret, W. C.; Eisen, Y.; Harvey, W. F. et al. : Radiobiology of α particles: 1. Exposure systems and dosimetry. Radiation Research, 123, S. 304–310, 1990.

[23] International Commission on Radiation Units and Measurements. Stopping Powers for electrons and Positrons, Band 37 von ICRU Report, Washington, DC (USA), 1985. ICRU.

[24] International Commission on Radiation Units and Measurements. Stopping Powers and Ranges for Protons and Alpha Particles, Band 49 von ICRU Report, Bethesda, Maryland (USA), Mai 1993. ICRU.

[25] Jin, Y.; Yie, T.-A. und Carothers, A. M. : Non-random deletions at the dihydrofolate reductase locus of Chinese hamster ovary colls induced by α-paticles simulating radon. Carcinogenesis, 16(8), S. 1981–1991, August 1995.

[26] Kiefer, J. : Biologische Strahlenwirkung. Birkhäuser, 1989.

[27] Knippers, R.; Philippsen, P.; Schäfer, K. P. et al. : Molekulare Genetik. Verlag Georg Thieme, Stuttgart, New York, 5. Auflage, 1990.

[28] Lee, J. M. und Bernstein, A. : Apoptosis, cancer and the p53 tumor suppressor gene. Cancer and Metastasis Reviews, 14, S. 149–161, 1995.

[29] Leo, W. R. : Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments, A How-to approach. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1987.

[30] Lloyd, E. L.; Gemmell, M. A.; Henning, C. B. et al. : Cell survival following multiple-track alpha particle irradiation. International Journal of Radiation Biology, 35(1), S. 23–31, 1979.

[31] M, O.; H, I.; H, K. et al. : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proceedings of the National Academy of Science, 86(8), S. 2766–2770, April 1989.

[32] M, O.; Y, S.; T, S. et al. : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 5(4), S. 874–879, November 1989.

[33] Mark, H.; Bikales, N. M.; Overberger, C. G. et al. (Hg.): Encyclopedia of Polymer Science and Technology. Wiley, New York, 1988.

[34] Márkus, G. : Kreis- und Kreisringplatten unter periodischer Belastung. Werner-Verlag, Akadémiaí Kiadó, Düsseldorf, Budapest, 1. Auflage, 1985.

[35] Mayer-Kuckuck, T. : Kernphysik, Eine Einführung. Teubner Studienbücher: Physik. Teubner, Stuttgart, 5. Auflage, 1992.

[36] Musiol, G.; Ranft, J.; Reif, R. et al. : Kern– und Elementarteilchenphysik. VCH Verlagsgesellschaft, 1988.

[37] Napolitano, M.; Durante, M.; Grossi, G. et al. : Inactivation of C3H 10T $\frac{1}{2}$ cells by monoenergetic high LET alpha–particles. International Journal of Radiation Biology, 61(6), S. 813–820, 1992.

[38] Öztürk, N.; Antolak, A. J. und Williamson, W. J. : Low-Energy Limit Corrections to the Electronic Stopping Power Equation for Ions. Radiation Effects and Defects in Solids, 114, S. 133–135, 1990.

[39] Pötter, T. : Persönliche Mitteilung. Steht zur Veröffentlichung an.

[40] Press, W. H.; Flannery, B. P.; Teukolsky, S. A. et al. : Numerical Recipes, The Art of Scientific Programming. Cambridge University Press, Cambridge, USA, 1. Auflage, 1989. (FORTRAN-Version).

[41] Preston, J. : Polyamides, Aromatic. In: Mark et al. [33].

[42] Qiagen GmbH. Product Guide 1996, 1995.

[43] Rickert, C. : Herstellung und Charakterisierung vernetzter Aramide. Dissertation, ETH Zürich, 1993.

[44] Sambrock, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. : Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Auflage, 1989.

[45] Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulsen, A. R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science, 74, S. 5463–5467, 1977.

[46] Schlegel, H. G. : Allgemeine Mikrobiologie. Verlag Georg Thieme, Stuttgart, New York, 6. Auflage, 1985.

[47] Scholz, V. : Aufbau einer Apparatur zur Bestrahlung von DNA mit niederenergetischen α–Teilchen. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1995.

[48] Schulte, W. H. : Ein 400 kV Ionenbeschleuniger mit hoher Energieschärfe. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1989.

[49] Singer, M. und Berg, P. : Gene und Genome. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1992.

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

[51] TH Darmstadt. Fit, Version 3.0, 1996.

[52] Thwaites, D. I. : Departures from Bragg's rule of stopping power additivity for ions in dosimetric and related materials. Nuclear Instruments and Methods B, B69, S. 53–63, 1992.

[53] Toray Industries, Inc., Film and film products research laboratories. Toray Aramid Film (TX-1). Deutsche Niederlassung: Toray Deutschland GmbH, Steinweg 9, 6000 FfM 1, FAX: 069-288607.

[54] Weidner, J. : Untersuchung von Mutationen in menschlichen Defektgenen (Phenylalaninhydroxylasegen). Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1990.

[55] Weidner, J. : Wirkung von langwelliger UV-Strahlung (313 nm) auf 5-Bromazil Cluster in einem für diese Zwecke genetisch modifizeirten M13-Phagen. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1995.

[56] Wiener GmbH. Multi, Version 1.2, 1995.

[57] Ziegler, J. F. : Helium stopping powers and ranges in all elements. Pergamon, New York, 1977. (= Band 4 von [59]).

[58] Ziegler, J. F. : TRIM, The Transport of Ions in Matter, Version 95.6. IBM-Research, Yorktown, NY, 10598, USA, Mai 1995.

[59] Ziegler, J. F.; Biersack, J. P. und Littmark, U. : The Stopping and Range of Ions in Solids. Pergamon, New York, 1985.

Index

Danksagung

Ich danke den Professoren Dr. W. Köhnlein und Dr. D. Frekers für die Übertragung dieser Aufgabe und die Bereitschaft, meine Diplomarbeit zu betreuen.

Besonderer Dank gilt Dr. Heinrich *Johannes* Wörtche für die intensive Betreuung dieser Arbeit. Sein Interesse, seine Anregungen und seine Hilfsbereitschaft, auch in schwierigen Situationen, haben wesentlich zu ihrem Gelingen beigetragen.

Ich danke Dr. Jürgen Weidner für seine umfangreiche Unterstützung bei allen molekularbiologischen Arbeiten und den schnellsten Transfer nach Bochum.

Bei Helmut Baumeister möchte ich mich für die Schnelligkeit, mit der er viele Probleme gelöst hat, Anregungen im technischen Bereich und seine immer besonders freundliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Volker Scholz bin ich zu Dank verpflichtet für die Einführung in dieses Arbeitsgebiet und seine Arbeit, auf die ich meine aufbauen konnte.

Außerdem danke ich allen aus der Arbeitsgruppe Frekers, die bisher nicht erwähnt sind, nämlich Ana Nuñez Ruiz, Volker Hannen, Jochen Volmer, Dirk Bonekämper, Dirk Rondeshagen, Thomas Wolff und Herrn Dipl. Phys. Matthias Hartig, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, viele anregende Diskussionen und einige nette Abende.

Gute Anregungen und methodische Anleitung verdanke ich auch Thomas Pötter. Hans-Werner Becker war bei den Messungen am DTL eine große Hilfe.

Dank gilt den Herren Apool, Brand, Brandner, Reimöller, Schöngraf und Wylich vom DTL. Ihre besondere Art der Hilfsbereitschaft hat die Messungen zu einem unvergeßlichen Erlebnis gemacht.

κοστα Σιαντιδις und Nåtåljå Råkøwski danke ich fürs Korrekturlesen. Dafür und für die Fotos gebührt auch Sabine Fiekers Dank. Für professionelle psychologische Hilfe bedanke ich mich bei Guido Strunk.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre Unterstützung in allem, was ich gemacht habe. Außerdem danke ich ihnen und allen anderen, die Anteil daran haben, dafür, daß ich bin, wer ich bin und tun konnte, was ich getan habe.

Heike Fiche-Beque danke ich für viele Vorschläge und Anregungen, ihre Solidarität, Trost, Unterstützung, Aufmunterung, … und überhaupt alles.

Diese Arbeit wurde am Institut für Strahlenbiologie und am Institut für Kernphysik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster angefertigt. Ich habe diese Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Münster, den 21. Juni 1996