

# **Subdiffusion von DNS-Doppelstrangbrüchen unter dem Einfluss von Zellkernverformungen**

*der Bundeswehr*  
**Universität**  **München**

**Bachelorarbeit**  
**von**  
**Michael Haum**

Universität der Bundeswehr München  
Fakultät für Luft – und Raumfahrttechnik

Institut für Angewandte Physik und Messtechnik  
Prof. Dr. Günther Dollinger

Betreuer  
Stefanie Girst

März 2012



# Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung.....	4
1	Einleitung .....	5
2	Biologische Grundlagen.....	7
3	Mathematische Grundlagen.....	9
	3.1 Grundbegriffe der Statistik.....	9
	3.2 Die Gauß'sche Normalverteilung.....	10
4	Diffusion.....	12
	4.1 Grundlagen.....	12
	4.2 Mean Square Displacement bei normaler und anomaler Diffusion .....	13
5	Versuchsdurchführung und Auswertung.....	15
	Abbildungsverzeichnis.....	20
	Literaturverzeichnis.....	21

## Zusammenfassung

Die Untersuchung von Schäden an biologischem Material durch ionisierende Strahlung stellt immer noch ein großes Forschungsgebiet von Medizin und Biologie dar. Insbesondere die Reparaturvorgänge nach der Schädigung der DNS im Zellkern werfen noch viele offene Fragen auf, dabei vor allem die der gefährlichsten Doppelstrangbrüche (DSB). Für ein besseres Verständnis der raumzeitlichen Dynamik der DSB wurden lebende Zellen am Münchner 14 MV Tandembeschleuniger mit 43 MeV Kohlenstoff-Ionen beschossen, um so die DNS gezielt zu schädigen und die erzeugten DSB über die sich dort gebildeten fluoreszenzmarkierten Reparaturproteincluster („Foci“) zu beobachten.

Für die Analyse der Dynamik wurde die zeitliche Änderung der Abstände benachbarter Foci ( $l \approx 5 \mu\text{m}$ ) herangezogen. Die Standardabweichung der Abstandsänderung über ein Zeitintervall  $\Delta t$  kann mit der Gleichung  $\sigma^2 = \Gamma \Delta t^\alpha$  beschrieben werden, die eine Aussage über die Art der Diffusion macht. Es zeigte sich, dass der Diffusionsexponent mit  $\alpha = 0,49 \pm 0,05$  deutlich kleiner ist als der einer normalen Diffusion ( $\alpha = 1$ ) und der Transportkoeffizient bei  $\Gamma = (1,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,49}$  liegt, sodass der Bewegung eine anomale Subdiffusion zugrunde liegt [S. Girst, 2011]. Durch die Betrachtung der Abstände anstelle von absoluten Positionen soll ausgeschlossen werden, dass eine Bewegung oder Deformation der gesamten Zelle unbeabsichtigt in die Auswertung mit einfließt.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob auch bei der Auswertung von größeren Foci-Abständen eine anomale Subdiffusion vorliegt. Hierfür wurden die Abstandsänderungen eines Foci zu seinem übernächsten Nachbarn ( $l \approx 10 \mu\text{m}$ ) herangezogen. Es ergab sich, dass auch hier eine anomale Subdiffusion vorliegt, mit dem Diffusionsexponenten  $\alpha = 0,58 \pm 0,03$  und dem Transportkoeffizienten  $\Gamma = (1,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,58}$ . Trotz des größeren Diffusionsexponenten liegt auch nach dieser Auswertung eine anomale Subdiffusion vor, sodass das für kleine Abstände gefundene Ergebnis bestätigt wird. Der größere Diffusionsexponent ist allerdings ein Hinweis darauf, dass sich bei großen Foci-Abständen eine Verformung der Zelle in der Auswertung stärker bemerkbar macht.

# 1 Einleitung

Der Mensch ist allgegenwärtig einer Belastung durch Strahlung in Form hochenergetischer Teilchen oder elektromagnetischer Wellen hoher Energie ausgesetzt. Natürliche Quellen sind radioaktives Gestein und Gase, oder auch die Sonne, deren Teilchenstrahlung durch die Atmosphäre nicht restlos abgeschirmt werden kann. Zur Strahlenexposition tragen des weiteren künstliche Quellen, wie Röntgenstrahlung aus medizinischen Gründen oder Strahlung durch Kernwaffentests und Kernanlagen bei. Strahlung kann zum einen durch Bildung von Krebs den Organismus schädigen, zum anderen aber auch gezielt eingesetzt werden, um Tumorzellen zu zerstören. Daraus ergibt sich ein großes Interesse an den genauen Vorgängen nach der Beschädigung von Erbinformation durch Bestrahlung.

Um diese Vorgänge gezielt zu untersuchen wurden am Rasterionenmikroskop SNAKE (Supraleitendes Nanoskop für angewandte kernphysikalische Experimente), das am Münchner 14 MV Tandembeschleuniger aufgebaut ist, lebende Zellen beschossen und die Vorgänge in der Zelle untersucht. Volker Hable beschrieb dabei in seiner Dissertation die „Realisierung einer Lebendzellmikroskopieeinrichtung am Rasterionenmikroskop SNAKE“<sup>1</sup>. Stefanie Girst untersuchte die Dynamik von Reparaturproteinclustern („Foci“) und damit die der dadurch markierten Doppelstrangbrüche der DNS. Die Doppelstrangbrüche wurden durch den Beschuss der Zellen mit Kohlenstoff-Ionen oder Protonen induziert, wobei die Projektile in einer  $(5 \times 5) \mu\text{m}^2$  Matrix appliziert wurden. Wesentliche Erkenntnis der Arbeit war, dass die zeitliche Änderung der Abstände benachbarter Foci auf eine Subdiffusion als zugrunde liegende Random Walk-Bewegung der DNS schließen lässt. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob auch die Analyse größerer Foci-Abstände eine Subdiffusion zeigt und welche Parameter diese Diffusion beschreiben. Dies kann einerseits die Richtigkeit der Auswertungsmethodik bestätigen und andererseits aber auch zeigen, ob beispielsweise eine Deformation der Zelle, die bei größeren Foci-Abständen stärker ins Gewicht fallen müsste, in der Auswertung bemerkbar wird. Hierfür sollen die Daten von Stefanie Girst erneut ausgewertet und dabei die zeitliche Änderung der Abstände der übernächsten Foci-Nachbarn herangezogen werden.

In der folgenden Arbeit wird dabei zunächst auf die biologischen (Kapitel 2) Grundlagen eingegangen. Da für die Bewertung der Diffusion die Standardabweichung der Abstandsänderung

---

1 V. Hable, 2011. S. 121

verwendet wird, soll diese in den mathematischen und statistischen Grundlagen im Kapitel 3 beschrieben werden. Die physikalischen Grundlagen der Diffusion werden im Kapitel 4 zusammengefasst. Das Kapitel 5 beschreibt die Durchführung des Versuchs sowie die Auswertung der Daten und enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

## 2 Biologische Grundlagen

Eine Bestrahlung mit hochenergetischen Teilchen oder elektromagnetischen Wellen kann zur Ionisation von Atomen führen. Vor allem für Zellen und hier insbesondere für den Träger des Erbmaterials, die DNS (Desoxyribonucleinsäure), stellt dies eine Gefährdung dar. Eine Schädigung der DNS kann zu bösartigen Mutationen und damit zu Krebs führen. Die DNS ist eine mehrfach verdrillte Doppelhelix, wobei sich das Rückgrat aus abwechselnd angeordneten Zucker- und Phosphateinheiten zusammensetzt. An eine Zuckereinheit angeschlossen ist jeweils eine der vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Die beiden Stränge der DNS werden über diese Basen verbunden, wobei als Bindungstyp eine Wasserstoffbrückenbindung vorliegt. Dabei kann sich allerdings nur Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin verbinden. Die Reihenfolge der Basen (Basenfolge) stellt die Erbinformation dar [R. Renneberg, 2007].

Bei einer Schädigung der DNS lassen sich zwei Arten unterscheiden: Einzelstrangbrüche, bei denen nur ein Zucker – Phosphat Strang gebrochen ist, sowie Doppelstrangbrüche, bei denen beide Stränge gebrochen sind. Der Doppelstrangbruch stellt dabei den gefährlicheren Schaden dar, da hierbei aus dem Verlust von Basen auch ein Verlust von Erbinformation resultiert. Zellen besitzen allerdings durch zwei verschiedene Reparaturmechanismen die Möglichkeit solche Schäden zu beheben. Bei der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ, engl. non homologous endjoining) werden die beiden Enden wieder zusammengefügt, ohne dass dabei verloren gegangene Basen berücksichtigt werden. Bei der homologen Rekombination (HR) wird eine intakte DNS Sequenz mit der gleichen Information als Vorlage genutzt, sodass auch die verlorene Erbinformation wiederhergestellt wird [V. Hable, 2011].

Für diese Reparaturmechanismen ist eine Vielzahl an Proteinen erforderlich, welche sich an den Doppelstrangbrüchen anlagern. Dazu gehören zunächst Proteine, welche die Bruchstellen markieren, sowie Proteine die bewirken, dass die Zelle in ihrer Entwicklungsphase verharret, bis der Reparaturprozess abgeschlossen ist. Zu letztgenanntem kann vor allem MDC1 und 53BP1 gezählt werden. Proteine wie Rad51 sind für die Reparatur des Doppelstrangbruchs über NHEJ verantwortlich. Diese Proteine lassen sich mit Fluoreszenzproteinen markieren, sodass sich Cluster von Proteinen der lebenden Zelle unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachten lassen. Diese Proteincluster werden als Foci bezeichnet. Zur Untersuchung der Dynamik von

Doppelstrangbrüchen nach Ionenbestrahlung wurden solche markierten Foci in dieser Arbeit verwendet [V. Hable, 2011].



### 3 Mathematische Grundlagen

#### 3.1 Grundbegriffe der Statistik

Als Zufallsexperiment wird ein Experiment bezeichnet, dessen Ausgang unbekannt ist und beliebig oft wiederholt werden kann. Alle „möglichen, sich aber gegenseitig ausschließenden Ergebnisse“<sup>2</sup> werden als Elementarereignisse  $\omega$  bezeichnet. Die Menge, die sich aus allen Elementarereignissen zusammensetzt ist der Ergebnisraum. Im Falle eines Würfelwurfs stellt jede mögliche, gewürfelte Augenzahl ein Elementarereignis dar, der Ergebnisraum  $\Omega$  enthält bei einem (gewöhnlichen) Würfel die Zahlen eins bis sechs. Eine Menge, die eine Teilmenge des Ergebnisraums enthält, wird als Ereignis bezeichnet. Dabei stellt die Menge aller Ereignisse den Ereignisraum dar [L. Papula, 1999]. Im obigen Beispiel wäre also „gerade Augenzahl“ ein Ereignis und würde dabei die Zahlen zwei, vier und sechs enthalten. Jedem Elementarereignis  $i$  kann eine Wahrscheinlichkeit  $p_i$  zugeordnet werden, sodass gilt:

$$0 \leq p_i \leq 1 \quad (1)$$

und

$$\sum_i p_i = 1 \quad (2)$$

Diese Wahrscheinlichkeiten lassen sich auch für alle Ereignisse finden. Diese Zuordnung bildet zusammen mit dem Ereignisraum den Wahrscheinlichkeitsraum [L. Papula, 1999].

Oft ist es hilfreich, jedem Elementarereignis die Zufallsgröße  $X(\omega)$ , mit den einzelnen Elementen  $x_i$  zuzuordnen. Zufallsgrößen können dabei diskrete Werte annehmen (Münzwurf) oder kontinuierlich sein (Zeit bis zum Zerfall eines radioaktiven Atoms). Ausgehend von der Zufallsgröße lässt sich ein Erwartungswert  $E(X)$  definieren. Im Falle einer diskreten Zufallsgröße ist

$$E(X) = \mu = \sum_i x_i \cdot p(x_i) \quad (3)$$

Durch die Varianz kann eine Aussage über die Streuung der Ergebnisse eines Zufallsexperiments gemacht werden. Die Varianz wird dabei mit der Abweichung von Zufallsgrößen vom Erwartungswert in Verbindung gebracht, sodass

---

<sup>2</sup> L. Papula, 1999. S. 267

$$\text{Var}(X) = \sum_i (x_i - \mu)^2 \cdot p(x_i) \quad (4)$$

gilt. Eng in Verbindung mit der Varianz steht die Standardabweichung, die sich über

$$\sigma = \sqrt{\text{Var}(X)} \quad (5)$$

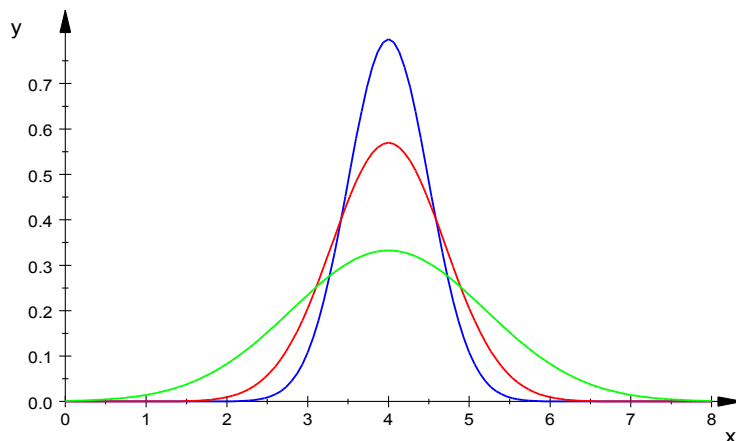
berechnen lässt [H. Toutenburg, 2005].

### 3.2 Die Gauß'sche Normalverteilung

Die Gauß'sche Normalverteilung spielt in der Mathematik und in den Naturwissenschaften eine erhebliche Rolle. Beispielsweise lässt sich beim sehr häufig wiederholten Münzwurf die erwartete Anzahl des Ergebnisses „Kopf“ nach Gleichung (3) leicht abschätzen, es ist jedoch genauso möglich nur „Kopf“ oder nur „Zahl“ zu erhalten. Die Wahrscheinlichkeiten hierfür sind allerdings - je nach Anzahl der Würfe - sehr gering. Wenn allgemein bei einem Zufallsexperiment die Wahrscheinlichkeiten für ein Ereignis bei wiederholter Durchführung konstant bleiben, so sind die Wahrscheinlichkeiten für die Ereignisse nach der Wahrscheinlichkeitsfunktion

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2} \quad (6)$$

normalverteilt. Die Abbildung 1 zeigt solche Normalverteilungskurven mit verschiedenen Standardabweichungen  $\sigma$ .



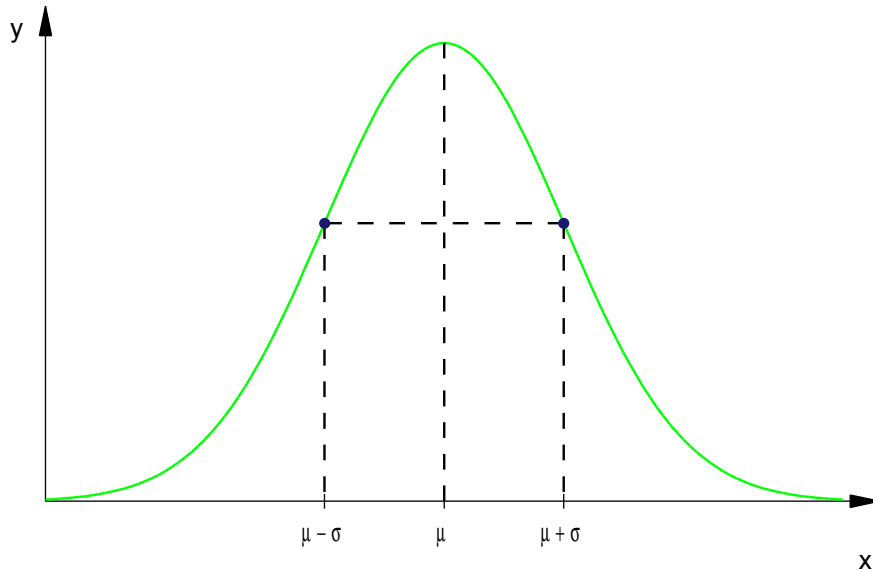
**Abbildung 1:** Die Graphik zeigt mehrere Normalverteilungen nach Gleichung (6) mit einem Erwartungswert von  $\mu=4$ . Hierbei wurden die Werte für die Standardabweichung variiert. Bei der blau gezeichneten Funktion ist  $\sigma=0,5$ , bei der roten Funktion ist  $\sigma=0,7$  und bei der grünen Funktion ist  $\sigma=1,2$ . Es wird deutlich, dass mit zunehmender Standardabweichung die Streuung, bzw. die Breite steigt und gleichzeitig das Maximum sinkt.

Die wesentlichen Eigenschaften der Normalverteilung sind [H. Toutenburg, 2005]:

- Das Maximum liegt bei  $x=\mu$ , die Wendepunkte liegen bei  $x=\mu \pm \sigma$

- Die Funktion ist normiert, d.h.  $\int_{-\infty}^{\infty} f(x) dx = 1$
- Die Funktion ist symmetrisch zu  $x = \mu$ .

Diese Eigenschaften der Normalverteilung sind in Abbildung 2 graphisch veranschaulicht.



**Abbildung 2:** Dargestellt ist eine Normalverteilung, mit eingezeichneten Parametern. Erkennbar ist, dass die Funktion achsensymmetrische zu  $x = \mu$  ist, wo auch das Maximum liegt. Die Wendepunkte liegen bei  $x = \mu \pm \sigma$ .

## 4 Diffusion

### 4.1 Grundlagen

Unter einer Diffusion versteht man einen Stofftransport zum Ausgleich eines Nichtgleichgewichtszustands [G. Wedler, 1982]. Die Diffusion wird dabei durch Konzentrations-, Temperatur- und Druckunterschiede ermöglicht [H. D. Baehr, K. Stephan, 1994]. Die Teilchen in einem solchen System bewegen sich aufgrund der Vielzahl an Teilchenstößen völlig zufällig in alle Richtungen. Die Wahrscheinlichkeiten für eine Bewegung in eine bestimmte Richtung sind dabei immer gleich. Diese mit „Random Walk“ bezeichnete Bewegung führt dann im Falle einer normalen Diffusion zu einer Normalverteilung der Teilchen.

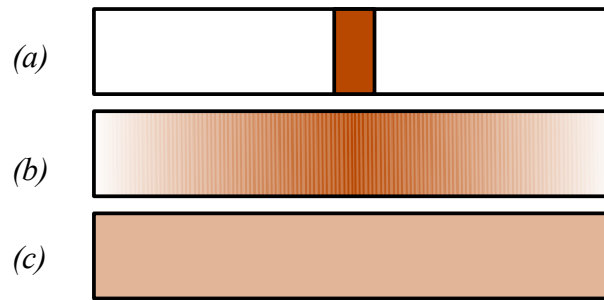
Eine mathematische Beschreibung der normalen Diffusion wird durch die beiden Fick'schen Gesetze im eindimensionalen Fall realisiert. Für die Teilchenstromdichte  $J$  gilt nach dem ersten Fick'schen Gesetz:

$$J = \frac{1}{A} \frac{dN}{dt} = -D \frac{dN}{dx} \quad (7)$$

für eine Diffusion entlang der  $x$ -Achse mit einer Teilchenzahldichte  $N$  durch eine Fläche  $A$ . Der Faktor  $D$  wird dabei als Diffusionskoeffizient bezeichnet und ist unter anderem von der Viskosität des Stoffes und den äußeren Bedingungen (z.B. Temperatur) abhängig [G. Wedler, 1982]. Das zweite Fick'sche Gesetz, auch Diffusionsgleichung genannt, beschreibt dabei das „Bestreben, Sprünge in der Verteilung der Substanzen auszugleichen“ [P. W. Atkins, 1988]. Hiernach ist

$$\frac{dN}{dt} = D \frac{d^2 N}{dx^2} \quad (8)$$

Die Abbildung 3 zeigt den Verlauf einer Diffusion schematisch. In einem länglichen Gefäß befindet sich in der Mitte eingeschlossen Brom ( $a$ ). Nach dem Entfernen der Trennwand diffundieren die Bromdämpfe in beide Richtungen, um den Konzentrationsunterschied auszugleichen. Erkennbar ist, dass die Konzentrationsverteilung in dem Zwischenzustand ( $b$ ) die Form normalverteilt ist, bevor sie im Endzustand ( $c$ ) schließlich überall gleich ist.



**Abbildung 3:** Dargestellt ist die Diffusion einer Bromprobe, die sich in der Mitte eines länglichen Gefäßes befindet. Nach dem Entfernen der Trennwand beginnen die Bromdämpfe in beide Richtungen zu diffundieren. Der Konzentrationsgradient baut sich langsam ab, bis im Endzustand die Konzentration überall gleich groß ist. In dem Zwischenzustand ist erkennbar, dass die räumliche Verteilung der Konzentration nach Gauß normalverteilt ist.

#### 4.2 Mean Square Displacement bei normaler und anomaler Diffusion

Da die Wahrscheinlichkeit für die Bewegung eines Teilchens in jede Richtung gleich groß ist, bleibt es im Mittel auf seiner ursprünglichen Position. Um dennoch eine Aussage über die Bewegung eines Teilchens zu machen wird die „mean square displacement“ (MSD) eingeführt, bei der die Wahrscheinlichkeit, ein Teilchen bei dem Ortsvektor  $\vec{r}$  zu finden einfließt. Damit ist

$$MSD(t) = \langle r^2(t) \rangle = \int r^2 p(\vec{r}, t) d\vec{r} . \quad (9)$$

Bei einer normalen Diffusion ist die Wahrscheinlichkeitsfunktion gegeben durch

$$p(\vec{r}, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \exp\left(-\frac{(\vec{r} - \vec{r}_0)^2}{4Dt}\right) , \quad (10)$$

mit  $D$  als Diffusionskonstante und  $d$  als Anzahl der Dimensionen. Daraus ergibt sich nach Ausführung der Integration für die MSD

$$MSD(\Delta t) = \langle r^2(\Delta t) \rangle = 2dD\Delta t \quad (11)$$

[S. Girst, 2011].

Ein Random Walk im zweidimensionalen lässt sich allgemein durch

$$MSD(\Delta t) = \Gamma \Delta t^\alpha , \quad (12)$$

beschreiben, mit  $\alpha$  als Diffusionsexponent und  $\Gamma$  als Transportkoeffizient. Dabei beschreibt  $\alpha=1$  die bereits diskutierte normale Diffusion,  $\alpha \neq 1$  wird als anomale Diffusion bezeichnet. Ist  $\alpha < 1$ , so liegt eine Subdiffusion vor, die Bewegungen sind also geringer als im Fall einer normalen

Diffusion. Bei  $\alpha > 1$  liegt eine Superdiffusion vor, sodass hier die Diffusionsprozesse im Vergleich zur normalen Diffusion beschleunigt wird.

Die Standardabweichung  $\sigma$  der Abstandsänderungen zweier Teilchen steht mit der *MSD* eines Teilchens über

$$\sigma^2(\Delta t) = 2 \text{MSD}(\Delta t) \quad (13)$$

im Zusammenhang [S. Girst, 2011]. Für die Abstandsänderung zweier anomal diffundierenden Teilchen ergibt sich demnach (13, 14):

$$\sigma^2(\Delta t) = 2 \Gamma(\Delta t)^\alpha . \quad (14)$$

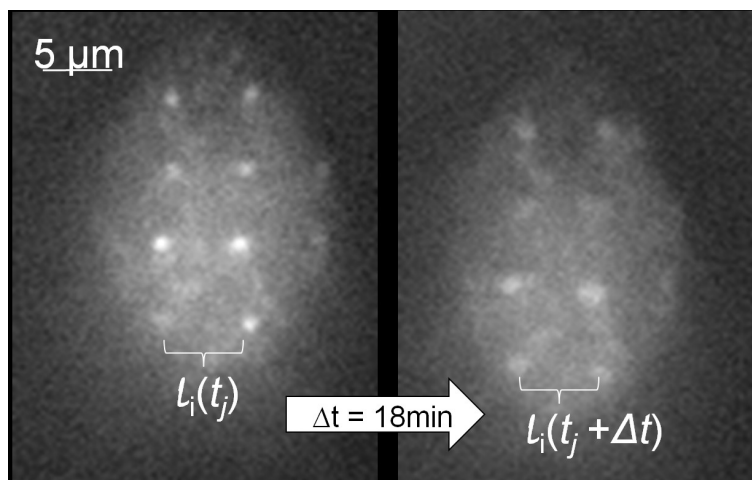
Die Verteilungsfunktion der Abstandsänderung  $\Delta l$  im Fall einer anomalen Diffusion ist gegeben durch

$$p(\Delta l, \Delta t) = \frac{1}{\sqrt{4G(1+\alpha)\Gamma\Delta t^\alpha}} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!G(1-\frac{\alpha}{2}(k+1))} \left( \frac{|\Delta l|}{\sqrt{G(1+\alpha)\Gamma\Delta t^\alpha}} \right)^k , \quad (15)$$

wobei  $G(x)$  die mathematische Gamma Funktion darstellt [S. Girst, 2012].

## 5 Versuchsdurchführung und Auswertung

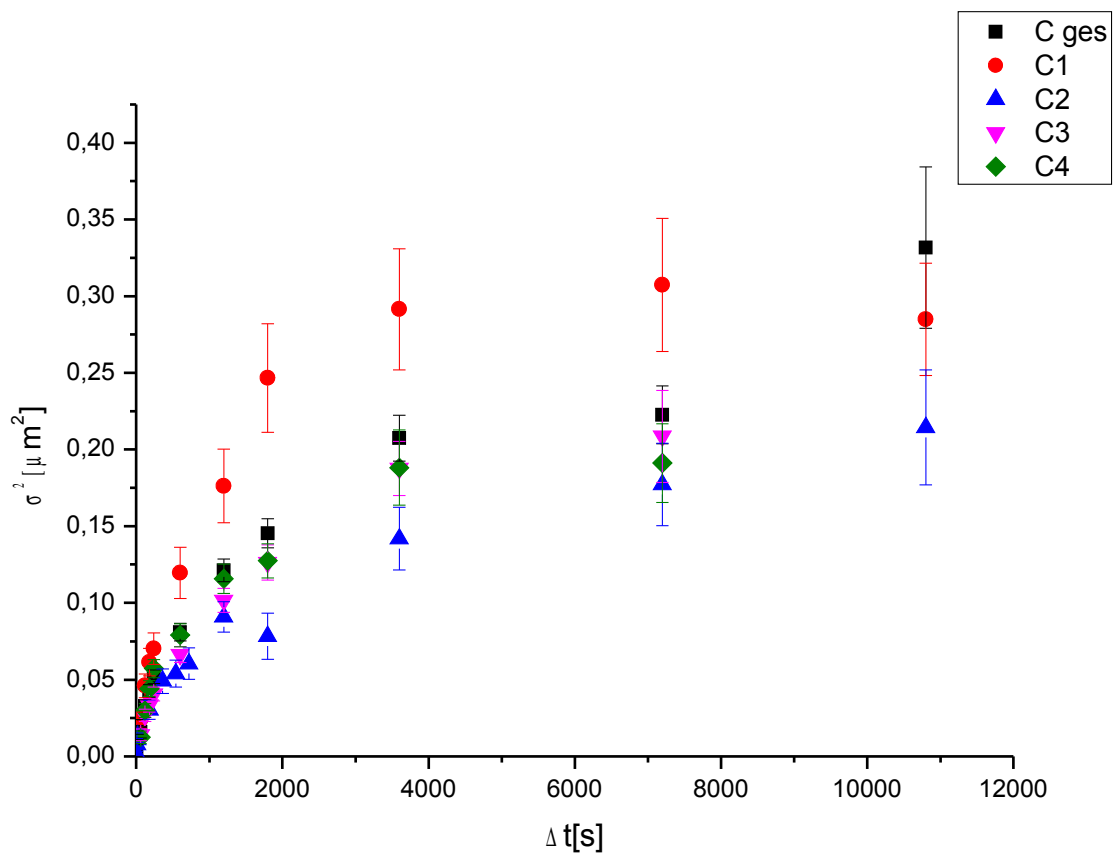
Für den Versuch wurden im Rahmen der Diplomarbeit von S. Girst am Münchner Tandembeschleuniger vier Proben (als C1 bis C4 bezeichnet) mit lebenden U2OS Zellen mit Kohlenstoff-Ionen mit einer kinetischen Energie von 43 MeV beschossen. Die Kohlenstoff-Ionen wurden dabei in einem quadratischen Raster auf die Zellen geschossen, wobei der Abstand der Ionen zueinander  $l \approx 5 \mu\text{m}$  betrug und nur ein Ion pro Punkt appliziert wurde. Das Reparaturprotein MDC1 wurde mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP markiert und dessen Foci an den induzierten Doppelstrangbrüchen in einem Zeitraum von mehreren Stunden beobachtet. Die Koordinaten der Foci wurden unter Nutzung des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ für jede Aufnahme bestimmt [S. Girst, 2011]. Jede Probe enthielt zwischen 10 und 20 Zellen, wobei in jeder Zelle bis zu 20 Foci verfolgt werden konnten. Abbildung 4 zeigt zwei Bilder einer Zelle unmittelbar und 18 Minuten nach dem Beschuss. Die Foci an den Doppelstrangbrüchen sind durch die hellen Punkte erkennbar. Die Foci an den Doppelstrangbrüchen sind durch die hellen Punkte erkennbar.



**Abbildung 4:** Die beiden Bilder zeigen eine Zelle unmittelbar und 18 Minuten nach dem Beschuss mit Kohlenstoff-Ionen, die zueinander einen Abstand von  $5 \mu\text{m}$  aufweisen. Die Foci an den Doppelstrangbrüchen sind anhand der hellen Punkte erkennbar. Die Abstandsänderungen zwischen unmittelbaren Foci-Nachbarn wurden in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet [S. Girst, 2012].

Während in [S. Girst, 2011] die Abstände benachbarter Foci in Abhängigkeit von der Zeit zur Auswertung untersucht wurden, wurden in der vorliegenden Arbeit von jeder Zelle jeweils die Abstände eines Focus zum übernächsten Nachbarn herangezogen, sodass  $l(0s) \approx 10 \mu\text{m}$  beträgt. Aus diesen Abständen lassen sich die Abstandsänderungen  $\Delta l$  sämtlicher Foci-Paare einer oder

aller Proben während einer Zeitspanne  $\Delta t$  berechnen. Die Standardabweichung dieser Abstandsänderungen für ein Zeitintervall  $\Delta t$  wird als  $\sigma(\Delta l(\Delta t)) = \sigma(\Delta t)$  bezeichnet und wurde für Zeiten  $\Delta t = 10 - 10000$  s berechnet. Damit ergibt sich für jede Probe eine Funktion  $\sigma^2(\Delta t)$ , die sich mit Funktion (16) fitten lässt. Zusätzlich wurden aus allen Proben die Standardabweichungen der Abstandsänderungen der betrachteten Foci zusammengefasst und deren Mittelwert für jede Zeitdifferenz gebildet. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Auswertung benachbarter Foci herangezogen [S. Girst, 2012]. In Abbildung 5 ist die Entwicklung der quadrierten Standardabweichungen für jede Probe (als C1 – C4 bezeichnet) und für den Mittelwert aus allen Standardabweichungen (C ges) zu sehen.



**Abbildung 5:** Standardabweichungen  $\sigma^2$  der Änderung der Foci-Abstände für jede Probe (C1 – C4) und der Mittelwert aus den Standardabweichungen aller Zellen (C ges) über die jeweilige Zeitspanne  $\Delta t$ . Hierbei wurden immer die Abstände von jeweils übernächsten Foci-Nachbarn berücksichtigt.

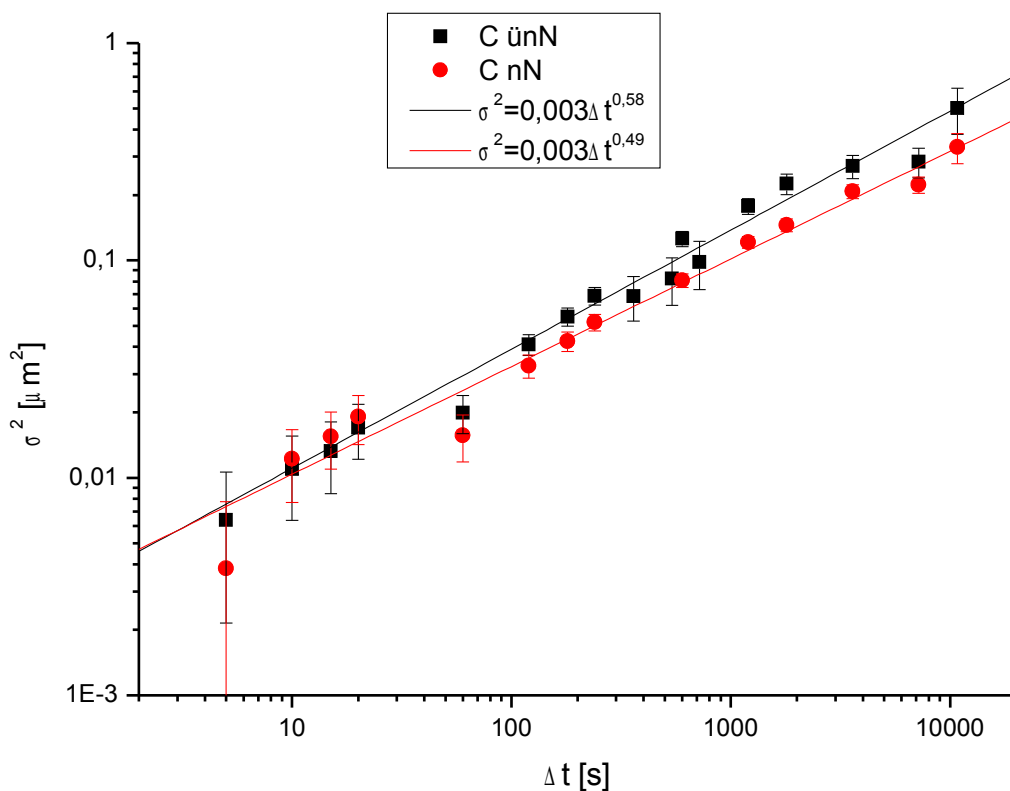
Es ist klar erkennbar, dass die Quadrate der Standardabweichungen nicht wie bei einer reinen Diffusionsbewegung linear mit der Zeit  $\Delta t$  ansteigen, sondern deren Anstieg für größere Zeitintervalle kleiner wird. Nach Gleichung (16) wird deutlich, dass der Diffusionskoeffizient



$\alpha < 1$  ist, sodass auch bei der Analyse größerer Foci-Abstände eine Subdiffusion der durch die Foci markierten DSBs vorliegt. In einer doppellogarithmischen Darstellung geht Gleichung (16) über in

$$\log(\sigma^2) = \log(2\Gamma) + \alpha \log \Delta t, \quad (16)$$

sodass  $\alpha$  die Steigung der Geraden darstellt. Der Transportkoeffizient  $\Gamma$  ist ein Maß für die Diffusionsgeschwindigkeit. In Abbildung 6 sind in einem Koordinatensystem mit doppellogarithmischer Skalierung die quadrierten Standardabweichungen für die Änderungen der Abstände von übernächsten Foci-Nachbarn (C ünN) und für die nächsten Foci-Nachbarn (C nN) zu sehen. Zusätzlich wurde die beiden Messreihen mit der Funktion (16) gefittet.



**Abbildung 6:** Dargestellt sind die Entwicklungen der Standardabweichungen der Abstandsänderungen für große ( $l \approx 10 \mu\text{m}$ ) und kleine ( $l \approx 5 \mu\text{m}$ ) Anfangsabstände der Reparatur-Foci. Berücksichtigt wurden dabei jeweils die Mittelwerte aller Standardabweichungen. Der Fit beider Funktionen zeigt, dass bei größeren Foci-Abständen die Steigung der Fitgeraden geringfügig steiler ist, was auf einen größeren Diffusionsexponenten  $\alpha$  schließen lässt.

Der lineare Anstieg bei doppellogarithmischer Darstellung bestätigt einen Zusammenhang der Form  $\sigma^2 = 2\Gamma \Delta t^\alpha$ . Auffällig ist, dass die Steigung der Geraden „C ünN“ steiler ist als die der Geraden „C nN“. Der Diffusionsexponent  $\alpha$  der in dieser Arbeit neu berechneten Geraden ist mit einem Wert

von  $\alpha=0,58$  größer als der Diffusionsexponent kleiner Foci-Abstände, der  $\alpha=0,49$  beträgt. Der Transportkoeffizient ist in dieser Auswertung  $\Gamma = 0,0014 \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,58}$ .

Tabelle 1 zeigt die Diffusionsexponenten und Transportkoeffizienten für kleine und große Foci-Abstände im Vergleich. Hierzu wurden alle Versuche aufgelistet, sowie der daraus bestimmte gewichtete Mittelwert und die Ergebnisse, die sich aus den Mittelwerten aller Standardabweichungen ergeben.

Versuch	$\alpha$ (große Foci- Abstände)	$\Gamma[\mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha]$ (große Foci- Abstände)	$\alpha$ (kleine Foci- Abstände)	$\Gamma [\mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha]$ (kleine Foci- Abstände)	Anzahl Zellen
C1	$0,52 \pm 0,04$	$(2,1 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	$0,45 \pm 0,04$	$(2,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$	9
C2	$0,47 \pm 0,04$	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$	$0,47 \pm 0,07$	$(1,4 \pm 0,9) \cdot 10^{-3}$	10
C3	$0,60 \pm 0,04$	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	$0,55 \pm 0,05$	$(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$	19
C4	$0,71 \pm 0,06$	$(0,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	$0,49 \pm 0,04$	$(1,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	19
Gewichteter Mittelwert	<b><math>0,60 \pm 0,08</math></b>	<b><math>(1,3 \pm 2,2) \cdot 10^{-3}</math></b>	<b><math>0,49 \pm 0,06</math></b>	<b><math>(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}</math></b>	<b>57</b>
C ges	$0,58 \pm 0,03$	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	$0,49 \pm 0,05$	$(1,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	57

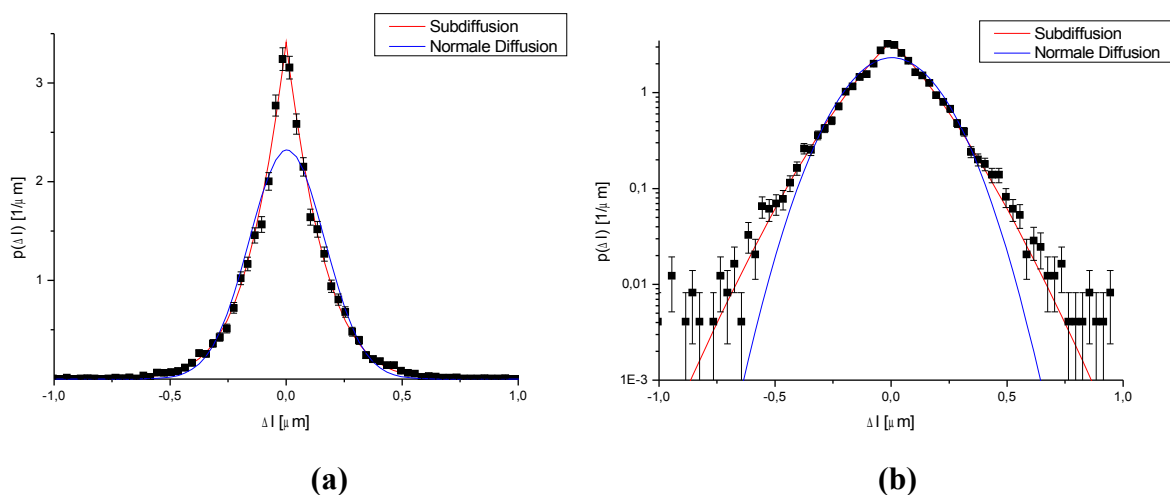
**Tabelle 1:** Übersicht der durch Fit ermittelten Diffusionsexponenten  $\alpha$  und Transportkoeffizienten  $\Gamma$  für jede Probe, sowie der gewichtete Mittelwert und das Mittel aus allen Standardabweichungen (C ges). Dabei wurden die Ergebnisse aus den Abständen der übernächsten Foci-Nachbarn („große Foci-Abstände“) mit den Ergebnissen aus den Abständen der direkten Foci-Nachbarn („kleine Foci-Abstände“) verglichen.

Auch hier zeigt sich, dass in allen Versuchen eine anomale Subdiffusion der DSB vorliegt. Bei großen Foci-Abständen ist  $\sigma^2(\Delta t)$  auch in den einzelnen Versuchen immer höher als bei kleinen Foci-Abständen, die höheren Mittelwerte sind also nicht auf einzelne Ausreißer zurückzuführen. Die Transportkoeffizienten bei großen Foci-Abständen unterscheiden sich stark zwischen den einzelnen Proben, sind jedoch immer kleiner als bei kleinen Foci-Abständen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten bestätigen das Ergebnis von [S. Girst, 2011] einer Subdiffusion als Art der Bewegung von DNS-Doppelstrangbrüchen. Dass bei größeren Foci Abständen die Diffusionsexponenten im Allgemeinen größer sind als die bei kleinen Foci Abständen lässt sich darauf zurückführen, dass eine Verformung der Zelle, also beispielsweise eine

Vergrößerung, die Auswertung beeinflusst. Bei größeren Foci Abständen fallen diese Deformationen stärker ins Gewicht, als bei Foci-Paaren mit kleineren Abständen. Dies ist jedoch erst für Zeiten  $\Delta t \geq 3 \text{ min}$  zu erkennen (vgl. Abb. 6), das heißt schnelle Bewegungen auf einer kurzen Zeitskala werden auch bei Auswertung größerer Abstände nahezu korrekt dargestellt. Die Methodik der Auswertung kann die Ergebnisse also beeinflussen und Zellkernverformungen fälschlicherweise als Foci-Bewegung interpretieren. Im Vergleich zu den genannten Ergebnissen ergab eine Studie der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI), dass die Reparatur-Foci und damit die DNS einer normalen Diffusion unterliegen. In dieser Studie wurden nicht die Änderung der Abstände der Foci zueinander herangezogen, sondern die Änderung der absoluten Position der einzelnen Foci. Translationen und Rotationen des gesamten Zellkerns wurden berücksichtigt und entsprechend korrigiert [B. Jakob et al., 2009]. Verformungen des Zellkerns können dabei jedoch nicht korrigiert werden und haben vermutlich zu dem abweichenden Resultat geführt.

In Abbildung 7 ist die Verteilung der Abstandsänderungen  $\Delta l$  für die Zeitdifferenz  $\Delta t = 60 \text{ s}$  zu sehen. Für die Datenpunkte (schwarz) wurden aus allen Proben die Werte für die entsprechenden Abstandsänderungen herangezogen. Die Punkte wurden zum einen mit einer Normalverteilung für normale Diffusion (blau) nach Gleichung (6) und zum anderen mit der Verteilungsfunktion für Subdiffusion (rot) nach Gleichung (15) gefittet. Für die anomale Diffusion wurde der Diffusionsexponent  $\alpha = 0,58$  und der Transportkoeffizient  $\Gamma = 0,0014 \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,58}$  als Fitparameter eingesetzt.



**Abbildung 7:** Histogramm der Abstandsänderungen ( $\Delta l (\Delta t = 60 \text{ s})$ ) zwischen übernächsten Foci-Nachbarn, gefittet mit der Verteilungsfunktion für normale (blau) und anomale (rot) Diffusion in linearer (a) und logarithmischer (b) Darstellung (Bin-Breite =  $0,03 \mu\text{m}$ , insg. 8154 Datenpunkte). Die Datenpunkte werden durch die Verteilungsfunktion für gefittete Subdiffusion mit Diffusionsexponenten  $\alpha = 0,58$  wesentlich besser gefittet als durch die Verteilungskurve einer normalen Diffusion.

Es ist erkennbar, dass die Datenpunkte durch die Verteilungsfunktion einer Subdiffusion deutlich besser gefittet werden als durch die Gaußfunktion einer normalen Diffusion. Vor allem der scharfe Peak bei  $\Delta l = 0 \mu\text{m}$  passt besser zur Verteilungsfunktion einer Subdiffusion als zur Normalverteilungskurve. Die logarithmische Darstellung zeigt, dass auch die Bereiche mit sehr großen bzw. sehr kleinen Abstandsänderungen durch den Fit der Subdiffusion besser als durch den Fit der normalen Diffusion wiedergegeben werden. Damit ist auch die Verteilung der Abstandsänderung ein deutliches Indiz für eine Subdiffusion der DSBs.

Die Ursache der Subdiffusion ist in dem Aufbau der Zelle zu finden. Die Zellflüssigkeit (Cytoplasma) enthält eine Vielzahl verschiedener Makromoleküle und Organellen, welche die Diffusionsvorgänge abbremsen. Dies bedeutet für die Doppelstrangbrüche, dass diese sich langsamer bewegen und damit mehr Zeit für deren Reparatur zur Verfügung steht. Dadurch halten sich die Doppelstrangbrüche auch viel länger in ihrer unmittelbaren Umgebung auf, die damit auch genauer nach der Anschlussstelle „abgesucht“ wird [G. Guigas et al., 2008]. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die beiden zusammengehörenden Bruchstellen wieder richtig rekombiniert werden, ist durch die Subdiffusion also höher als bei einer normalen Diffusion, was zu einer Reduktion der Fehler bei der DSB-Reparatur führt und die Überlebenschancen der Zelle erhöht.

## **Abbildungsverzeichnis**

1 Normalverteilung	6
2 Eigenschaften der Normalverteilung	7
3 Diffusion einer Bromprobe	9
4 Zelle nach dem Beschuss mit Kohlenstoff – Ionen	11
5 Standardabweichungen der Abstandsänderungen in linearer Darstellung	12
6 Doppellogarithmische Darstellung der Standardabweichungen der Abstandsänderungen	13
7 Verteilung der Abstandsänderung in normaler und logarithmischer Darstellung	15

## Literaturverzeichnis

- P. W. Atkins. Physikalische Chemie. Wiley Verlag, Weinheim 1988.
- H. D. Baehr, K. Stephan. Wärme und Stoffübertragung. Springer Verlag, Berlin 1994.
- S. Girst. Anomalous subdiffusion of DNA repair protein foci after ion microirradiation. Technische Universität München, 2011.
- S. Girst. Subdiffusion supports repair of DNA double-strand breaks. Universität der Bundeswehr München, voraussichtlich 2012.
- G. Guigas, M. Weiss. Sampling the Cell with Anomalous Diffusion-The Discovery of Slowness. Biophysical Journal 94, 2008.
- V. Hable. Echtzeitbeobachtung schneller Reaktionskinetiken in lebenden Zellen nach Ionenmikrobestrahlung. Universität der Bundeswehr München, 2011.
- B. Jakob, J. Splinter, M. Durante, G. Taucher Scholz. Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 2009.
- R. Metzler, J. Klafter. The random walk's guide to anomalous diffusion: a fractional dynamics approach. Physics Reports 339, 2000.
- L. Papula. Mathematik für Ingenieure und Naturwissenschaftler. Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden 1999.
- R. Renneberg. Biotechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2007.
- H. Toutenburg. Induktive Statistik. Springer Verlag, Berlin 2005.
- G. Wedler. Lehrbuch der physikalischen Chemie. Verlag Weinheim, Weinheim 1982.

## Erklärung

Thema: Subdiffusion von DNS-Doppelstrangbrüchen unter dem Einfluss von Zellkernverformungen

Autor: Michael Haum  
Universität der Bundeswehr München  
Fakultät für Luft – und Raumfahrttechnik

Gutachter: .....  
Prof. Dr. Günther Dollinger

Neubiberg, den .....

Erklärung: Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Ferner habe ich vom Merkblatt über die Verwendung von Diplom- und Abschlussarbeiten Kenntnis genommen und räume das einfache Nutzungsrecht an meiner Bachelorarbeit der Universität der Bundeswehr München ein.

Neubiberg, den

.....

Michael Haum