

**KIT**  
**Karlsruher Institut für Technologie**  
**Die Forschungsuniversität in der**  
**Helmholtz-Gemeinschaft**

**PTE-N Nr. 17**

BMBF geförderte FuE zu  
„Nukleare Sicherheitsforschung“

Berichtszeitraum: 1. Januar - 30. Juni 2018

Projekträger Karlsruhe (PTKA)  
Entsorgung

**Januar 2019**

## PTE-Berichte

Der Projektträger Karlsruhe (PTKA) informiert mit Fortschrittsberichten über den aktuellen Stand der von ihm administrativ und fachlich betreuten FuE.

Die Fortschrittsberichtsreihen behandeln folgende Themenschwerpunkte:

- Entsorgung gefährlicher Abfälle in tiefen geologischen Formationen (PTE Nr. x seit 1991, fortlaufend \*)
- Stilllegung und Rückbau kerntechnischer Anlagen (PTE-S Nr. x seit 2001, fortlaufend #)
- Nukleare Sicherheitsforschung (PTE-N Nr. x seit 2010, fortlaufend)

Die Fortschrittsberichtsreihen sind online verfügbar:

[www.ptka.kit.edu/ptka-alt/wte/287.php](http://www.ptka.kit.edu/ptka-alt/wte/287.php)

Verantwortlich für den Inhalt sind die Autoren bzw. die entsprechenden Forschungsstellen. Das KIT übernimmt keine Gewähr insbesondere für die Richtigkeit, Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter.

*\* Bis Ende des Jahres 2011 wurde in dieser Fortschrittsberichtsreihe auch über die BMBF-geförderte FuE zur untertägigen Entsorgung chemotoxischer Abfälle informiert. Die FuE-Schwerpunkte „Untertägige Entsorgung chemotoxischer Abfälle“ und „Sicherheitsforschung für Bergbauregionen“ wurden zum 31.12.2011 beendet.*

*# Bis Ende des Jahres 2016 wurde in dieser Fortschrittsberichtsreihe auch über die BMBF-geförderte FuE zu Stilllegung und Rückbau kerntechnischer Anlagen informiert. Seit 1.10.2016 wird dieser Förderschwerpunkt durch den Projektträger GRS betreut.*

## Vorwort

Das KIT betreut im Auftrag des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) Referat 723\* als Projektträger FuE-Vorhaben auf dem Gebiet „Nukleare Sicherheitsforschung“.

Die „Nukleare Sicherheitsforschung“ ist einer der Förderschwerpunkte des BMBF-Förderkonzeptes „Grundlagenforschung Energie 2020+“ und umfasst FuE-Aktivitäten zu den Themenbereichen Sicherheitsforschung für Kernreaktoren, Sicherheitsforschung zur nuklearen Entsorgung und Strahlenforschung.

Jeder Fortschrittsbericht stellt eine Sammlung von Einzelberichten über Zielsetzung, durchgeführte Arbeiten, erzielte Ergebnisse, geplante Weiterarbeiten etc. dar, die von den Forschungsstellen selbst als Dokumentation ihres Arbeitsfortschritts in einheitlicher Form erstellt werden.

Der Fortschrittsbericht wird vom Projektträger *halbjährlich* herausgegeben, um alle Beteiligten aktuell über die durchgeführten Arbeiten zu informieren.

Dem Bericht liegt folgendes Gliederungsprinzip zugrunde:

- Im *Teil 1* sind die FuE-Vorhaben dem jeweiligen *Themenbereich* zugeordnet.
- Im *Teil 2*, dem Hauptteil, sind die „formalisierten Zwischenberichte“ der FuE-Vorhaben, geordnet nach *Themenbereichen*, aufgeführt.
- Im *Teil 3* sind die *Forschungsstellen* alphabetisch aufgelistet.

\* neue Referatsbezeichnung (bis Oktober 2018 Referat 722)



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Verzeichnis der Fördervorhaben gemäß FuE-Themenbereichen.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Sicherheitsforschung für Kernreaktoren.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Sicherheitsforschung zur nuklearen Entsorgung .....</i>	<i>3</i>
1.3	<i>Strahlenforschung .....</i>	<i>5</i>
2.1	SICHERHEITSFORSCHUNG FÜR KERNREAKTOREN.....	9
2.2	SICHERHEITSFORSCHUNG ZUR NUKLEAREN ENTSORGUNG .....	33
2.3	STRAHLENFORSCHUNG.....	65
<b>3</b>	<b>Verzeichnis der Forschungsstellen .....</b>	<b>159</b>



# 1 Verzeichnis der Fördervorhaben gemäß FuE-Themenbereichen

## 1.1 Sicherheitsforschung für Kernreaktoren

- |                    |   |   |      |
|--------------------|---|---|------|
| <b>02 NUK 027A</b> | Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt A: Experimentelle und theoretische Untersuchung der Nachwärmeabfuhr von Brennelementen in ausdampfenden Nasslagern                   | <b>TU Dresden</b>                                   | 📖 10 |
| <b>02 NUK 027B</b> | Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt B: Simulation von Strömung und Wärmetransport unter den Bedingungen eines Lagerbeckens   | <b>TU Dresden</b>                                   | 📖 12 |
| <b>02 NUK 027C</b> | Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt C: Analyse und CFD-Modellentwicklung der Strömungszustände in ausdampfenden Brennelementen   | <b>Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.</b>   | 📖 14 |
| <b>02 NUK 027D</b> | Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt D: Dichtegetriebene vertikale Austauschbewegungen und radiales Strahlungsverhalten   | <b>Hochschule Zittau/Görlitz</b>                    | 📖 16 |
| <b>02 NUK 027E</b> | Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt E: Ortsaufgelöste Temperatur- und Gasphasengeschwindigkeitsmessung zur Analyse der Strömungszustände in ausdampfenden Brennelementen | <b>TU Dresden</b>                                   | 📖 18 |
| <b>02 NUK 040A</b> | Verbundprojekt UNSCHRO: Experimentelle Untersuchungen und theoretische Beschreibung der Schädigung metallischer Rohrleitungen bei turbulenter Durchströmung im Bereich hoher Drücke und hoher Temperaturen, Teilprojekt A: Mischnähte, Ausströmen   | <b>Universität Stuttgart – Otto-Graf-Institut -</b> | 📖 20 |

- 02 NUK 040B** Verbundprojekt UNSCHRO: Experimentelle Untersuchungen und theoretische Beschreibung der Schädigung metallischer Rohrleitungen bei turbulenter Durchströmung im Bereich hoher Drücke und hoher Temperaturen, Teilprojekt B: Numerische Simulation turbulenter Strömung **Universität Stuttgart**  22
- 02 NUK 041A** Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt A: Einzel- und Integraleexperimente sowie theoretische Analysen zu Verdampfung, Kondensation und Zweiphasen-Natriumlaufstabilität in einem passiven Wärmetransportsystem **TU Dresden**  24
- 02 NUK 041B** Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt B: Untersuchungen zu Kondensationsprozessen im Notkondensator und numerische Simulation einer passiven Wärmeabfuhrkette **Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.**  26
- 02 NUK 041C** Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt C: Übertragung auf industrielle Anwendungen von neuen Modellen zu Verdampfung, Kondensation und Zweiphasen-Naturumlaufstabilität in einem passiven Wärmetransportsystem **Framatome GmbH, Erlangen**  28
- 02 NUK 041D** Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt D: Statische und dynamische Modellierung der thermischen Kopplung von Fluidphasen und Wärmeüberträgerstrukturen **TH Deggendorf**  30

## 1.2 Sicherheitsforschung zur nuklearen Entsorgung

<b>02 NUK 039A</b>	Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt A	<b>Sondervermögen Großforschung am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)</b>	📖 34
<b>02 NUK 039B</b>	Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt A	<b>Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.</b>	📖 36
<b>02 NUK 039C</b>	Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt C	<b>Ruprecht-Karls- Universität Heidel- berg</b>	📖 38
<b>02 NUK 039D</b>	Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt D	<b>Forschungszentrum Jülich GmbH</b>	📖 40
<b>02 NUK 039E</b>	Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt E	<b>TU München</b>	📖 42
<b>02 NUK 044A</b>	Verbundprojekt SIRIUS: Sekundärionisation radioaktiver Isotope zur orts aufgelösten Ultrapurenanalyse, Teilprojekt A	<b>Leibniz Universität Hannover</b>	📖 44
<b>02 NUK 044B</b>	Verbundprojekt SIRIUS: Sekundärionisation radioaktiver Isotope zur orts aufgelösten Ultrapurenanalyse, Teilprojekt B	<b>Johannes Gutenberg- Universität Mainz</b>	📖 46
<b>02 NUK 046A</b>	Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt A	<b>TU Dresden</b>	📖 48

- 02 NUK 046B** Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt B **Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.**  50
- 02 NUK 046C** Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt C **Universität Leipzig**  52
- 02 NUK 051A** Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt A **Universität Hannover**  54
- 02 NUK 051B** Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt B **Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.**  56
- 02 NUK 051C** Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt C **Universität Jena**  58
- 02 NUK 051D** Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt D **Universität Bremen**  60
- 02 NUK 051E** Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt E **Öko-Institut. Institut für angewandte Ökologie e. V.**  62

### 1.3 Strahlenforschung

<b>02 NUK 017A</b>	Verbundprojekt GREWIS: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender Strahlung: Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Radon in Zell- und Tier-Modellen und in Radon-Patienten; Teilprojekt A	<b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt</b>	📖 66
<b>02 NUK 031A</b>	Verbundprojekt LET: Simulation von Hoch-LET-Effekten mittels fokussierter Niedrig-LET-Strahlung; Teilprojekt A	<b>Universität der Bundeswehr München</b>	📖 68
<b>02 NUK 032</b>	DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Tumoren: Mechanismen und Targets	<b>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</b>	📖 70
<b>02 NUK 034A</b>	Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt A	<b>TU Darmstadt</b>	📖 72
<b>02 NUK 034B</b>	Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt B	<b>TU Darmstadt</b>	📖 74
<b>02 NUK 034C</b>	Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt C	<b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt</b>	📖 76
<b>02 NUK 034D</b>	Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt D	<b>Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg</b>	📖 78
<b>02 NUK 035A</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A	<b>Universität des Saarlandes</b>	📖 80
<b>02 NUK 035B</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B	<b>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</b>	📖 82
<b>02 NUK 035C</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C	<b>TU Dresden</b>	📖 84
<b>02 NUK 035D</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D	<b>Bundesamt für Strahlenschutz, Salzgitter</b>	📖 86
<b>02 NUK 035E</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt E	<b>Medipan GmbH, Dahlewitz</b>	📖 88

<b>02 NUK 036AX</b>	Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt A	<b>IUF - Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH</b>	📖 90
<b>02 NUK 036B</b>	Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt B	<b>Elbe Kliniken Stadte-Buxtehude</b>	📖 92
<b>02 NUK 036C</b>	Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt C	<b>IUF – Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH</b>	📖 94
<b>02 NUK 036D</b>	Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt D	<b>TU Darmstadt</b>	📖 96
<b>02 NUK 037A</b>	Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt A	<b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt</b>	📖 98
<b>02 NUK 037B</b>	Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt B	<b>Universitätsklinikum Essen</b>	📖 100
<b>02 NUK 037C</b>	Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt C	<b>TU Darmstadt</b>	📖 102
<b>02 NUK 038A</b>	Verbundprojekt Endothelzellen: Effekte niedriger, mittlerer und hoher Strahlendosen auf primäre mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Normalgewebe; Teilprojekt A	<b>Klinikum rechts der Isar der TU München</b>	📖 104
<b>02 NUK 038B</b>	Verbundprojekt Endothelzellen: Effekte niedriger, mittlerer und hoher Strahlendosen auf primäre mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Normalgewebe; Teilprojekt B	<b>Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Neuherberg</b>	📖 106
<b>02 NUK 042A</b>	Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt A	<b>Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz</b>	📖 108
<b>02 NUK 042B</b>	Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt B	<b>Johannes Gutenberg-Universität Mainz</b>	📖 110
<b>02 NUK 042C</b>	Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt C	<b>Leibniz-Institut für Präventionsforschung und Epidemiologie – BIPS GmbH, Bremen</b>	📖 112

<b>02 NUK 042D</b>	Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt D	<b>TU Darmstadt</b>	📖 114
<b>02 NUK 043A</b>	Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt A	<b>Forschungszentrum Jülich GmbH</b>	📖 116
<b>02 NUK 043B</b>	Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt B	<b>Universitätsklinikum Essen</b>	📖 118
<b>02 NUK 043C</b>	Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt C	<b>Universität Rostock</b>	📖 120
<b>02 NUK 045A</b>	Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt A	<b>Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Neuherberg</b>	📖 122
<b>02 NUK 045B</b>	Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt B	<b>Bundesamt für Strahlenschutz</b>	📖 124
<b>02 NUK 045C</b>	Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt C	<b>TU München</b>	📖 126
<b>02 NUK 047A</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A	<b>Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Neuherberg</b>	📖 128
<b>02 NUK 047B</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B	<b>Bundesamt für Strahlenschutz</b>	📖 130
<b>02 NUK 047C</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C	<b>Klinikum der Universität München</b>	📖 132
<b>02 NUK 047D</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D	<b>Universitätsklinikum Essen</b>	📖 134
<b>02 NUK 047E</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt E	<b>Charité - Universitätsmedizin Berlin</b>	📖 136
<b>02 NUK 047F</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt F	<b>Albert-Ludwigs-Universität Freiburg</b>	📖 138
<b>02 NUK 048A</b>	Verbundprojekt ESKaRa: Epidemiologische Studie zu Kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Radiotherapie bei Brustkrebspatientinnen, Teilprojekt A	<b>Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz</b>	📖 140
<b>02 NUK 048B</b>	Verbundprojekt ESKaRa: Epidemiologische Studie zu Kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Radiotherapie bei Brustkrebspatientinnen, Teilprojekt B	<b>Universität Ulm</b>	📖 142

- |                    |   |  |       |
|--------------------|---|--|-------|
| <b>02 NUK 049A</b> | Verbundprojekt BrainRadiationAssay: Etablierung eines in vitro Systems zur Analyse und Prädiktion von Schäden im zentralen Nervensystem nach Exposition mit ionisierender Strahlung in Kombination mit anderen Neurotoxika, Teilprojekt A | <b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH</b>                      | 📖 144 |
| <b>02 NUK 049B</b> | Verbundprojekt BrainRadiationAssay: Etablierung eines in vitro Systems zur Analyse und Prädiktion von Schäden im zentralen Nervensystem nach Exposition mit ionisierender Strahlung in Kombination mit anderen Neurotoxika, Teilprojekt B | <b>Hochschule für angewandte Wissenschaften – Fachhochschule Aschaffenburg</b> | 📖 146 |
| <b>02 NUK 050A</b> | Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt A   | <b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH</b>                      | 📖 148 |
| <b>02 NUK 050B</b> | Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt B   | <b>TU Darmstadt</b>  | 📖 150 |
| <b>02 NUK 050C</b> | Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt C   | <b>TU Darmstadt</b>  | 📖 152 |
| <b>02 NUK 050D</b> | Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt D   | <b>Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main</b>                    | 📖 154 |
| <b>02 NUK 050E</b> | Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt E   | <b>Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg</b>                       | 📖 156 |

## **2 Formalisierte Zwischenberichte**

### **2.1 Sicherheitsforschung für Kernreaktoren**

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 027A
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt A: Experimentelle und theoretische Untersuchung der Nachwärmeabfuhr von Brennelementen in ausdampfenden Nasslagern		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2013 bis 31.03.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 637.525,92 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Lippmann	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Projekt soll gesicherte Kenntnisse über die Wärmetransportprozesse für den Fall eines langsam ausdampfenden bzw. vollständig ausgedampften Brennelement-Lagerbeckens sowohl innerhalb der Brennstabündel von Brennelementen (BE) als auch in den Zwischenräumen zwischen den BE liefern, um damit die Entwicklung der axialen und radialen Stabtemperaturprofile als Funktion der Zeit bei unterschiedlichen Störfallszenarien berechnen zu können. Dafür soll ein Integralexperiment aufgebaut werden, welches die thermohydraulischen Vorgänge in einem repräsentativen Ausschnitt des BE-Lagerbeckens ganzheitlich umfasst. Aufbauend auf den Experimenten soll ein Lagerbecken-Modul für den Thermohydraulikcode ATHLET entwickelt werden.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Forschungsvorhaben gliedert sich in die folgenden Arbeitspakete:

- AP0: Systemanalyse, Literaturstudium, Festlegung von Szenarien (TUD-WKET, TUD-ISM, HZDR, HSZG)
- AP1: Auslegung, Errichtung und Inbetriebnahme der Integralversuchsanlage, Durchführung und Bewertung der Experimente (TUD-WKET, TUD-ISM, HZDR, HSZG)
- AP2: Erprobung spezieller Instrumentierungen, fluiddynamische Einzeleffektexperimente an BE-Dummy (TUD-ASP, HSZG)
- AP3: Anwendung von CFD-Codes; 3-D-Modellierung von BE im BE-LB und der Atmosphäre über den BE (TUD-ISM, HZDR)
- AP4: Anwendung von Integralcodes; Entwicklung spezieller Module für ATHLET und COCOSYS (TUD-WKET, TUD-ISM, HZDR, HSZG)

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP0:

- Um die Anforderungen an den Überströmkanal bestimmen zu können, wurde anhand der Ergebnisse der bisherigen Experimente und Daten festgelegt, welche Randbedingungen für die Untersuchungen mit Überströmkanal zielführend sind. Als Ergebnis dieses Prozesses wurde eine Anforderungsliste aufgestellt.
- Um geeignete Komponenten für den Überströmkanal auswählen zu können, wurde eine Literaturrecherche zu Ventilatoren, Heizregistern und Messtechnik durchgeführt.

- Es wurde eine grundlegende Literaturrecherche zur Spraykühlung durchgeführt, um ein Konzept für die Erweiterung des Versuchsstandes erstellen zu können.

AP1:

- Um eine gerade Überströmung des Brennelementmodells in der Versuchsanlage ALADIN zu ermöglichen, wurden Teile des Versuchsfeldes umgestaltet.
- Damit der Überströmkanal Experimente mit den ausgearbeiteten Randbedingungen ermöglicht, waren umfangreiche Auslegungsberechnungen nötig. Diese wurden teils analytisch und teils mittels CFD-Studien durchgeführt.
- Auf Grundlage der Berechnungen und einem strömungstechnischen Vergleich von Ventilatorbauarten wurde entschieden, einen Radialventilator und ein Elektroheizregister mit mind. 5kW Leistung anzuschaffen. Zur Geschwindigkeitsmessung kommen ausschließlich thermische Anemometer infrage, da nur sie im benötigten Messbereich eine hinreichende Genauigkeit aufweisen. Für die Bestimmung der Temperaturen im Überströmbereich werden ca. 50 Thermoelemente benötigt, um eine hinreichend dichte Instrumentierung zu erreichen.
- Nach Abschluss der Bedarfsanalyse wurden ein Ventilator, ein Heizregister, Thermoelemente und ein thermisches Anemometer beschafft.
- Nach Abschluss sämtlicher Auslegungsberechnungen und Überlegungen wurde die Konstruktion des Überströmkanals mittel CAD durchgeführt.
- Der Aufbau der Abluftstrecke des Überströmkanals wurde abgeschlossen.

AP2:

- Nach Abschluss eines ersten Konstruktionsentwurfes wurden die vorläufigen geometrischen Daten den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

AP3:

- Eine erste Einarbeitung in den Systemcode ATHLET wurde durchgeführt, um den Umfang der Arbeiten abschätzen zu können.

#### **4. Geplante Weiterarbeiten**

AP0:

- Fertigstellung einer Übersicht der bisher durchgeführten Untersuchungen.
- Festlegung der Randbedingungen für die Spraykühlung, um mit der Planung der Versuchsanlagenerweiterung beginnen zu können.

AP1:

- Die Fertigstellung des Überströmkanals.
- Festlegung einer konkreten Versuchsmatrix für die Experimente mit den Zusatzkomponenten.
- Durchführung und Auswertung der Experimente mit Zusatzkomponenten.

AP2:

- Die Bereitstellung der finalen Geometriedaten und Messdaten aus den experimentellen Untersuchungen.

AP3:

- Die Modellerweiterung in ATHLET für eine Spraykühlung sowie die Durchführung von Rechnungen und Vergleich mit ALADIN- Experimenten.

#### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Partmann, C.; Schuster, C.; Hurtado, A.: Experimental investigation of the thermal hydraulics of a spent fuel pool under loss of active heat removal conditions. In: Nuclear Engineering and Design 330 (2018), S. 480–487. DOI: 10.1016/j.nucengdes.2018.02.023.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 027B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt B: Simulation von Strömung und Wärmetransport unter den Bedingungen eines Lagerbeckens		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2013 bis 31.03.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 489.910,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Fröhlich	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel des Gesamtvorhabens ist die Gewinnung gesicherter Kenntnisse über die Wärmetransportprozesse für den Fall eines teilweise bzw. vollständig ausgedampften Brennelement-Lagerbeckens (BE-LB). Mittels Experimenten und Simulation erfolgt die Prognose unterschiedlicher Störfallszenarien. Im vorliegenden Teilprojekt werden CFD-Simulationen des experimentell untersuchten Brennstabündels unter Berücksichtigung aller wesentlichen Mechanismen durchgeführt. Besonderes Augenmerk liegt auf dem Wärmetransport durch Konvektion und Leitung im Gas, der Wärmeleitung innerhalb der Brennstäbe (BS) sowie dem Strahlungsaustausch. Simulationen des Brennelement Dummys der HS Zittau-Görlitz (02NUK027D) dienen der Validierung der numerischen Methode und sind prototypisch für Brennelemente von Druckwasserreaktoren. Die gewonnenen Ergebnisse der Modellierung eines Brennelementes liefern eine Datenbasis für das HZ Dresden Rossendorf (02NUK027C), während dort durchgeführte Simulationen des Containments als Randbedingungen in die eigenen Simulationen zurückfließen. Simulationen des am WKET durchgeführten Integralexperimentes (IE) (02NUK027A) an einem für Siedewasserreaktoren typischen Brennelements dienen zur Verifizierung der dort gewonnenen Daten und als Basis für die Weiterentwicklung der Integralcodes (02NUK027A).

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Der Zuwendungsempfänger ist an folgenden Arbeitspaketen im Forschungsvorhaben beteiligt:

- AP0: Systemanalyse, Literaturstudium, Festlegung von Szenarien
- AP1: Auslegung, Errichtung und Inbetriebnahme der Integralversuchsanlage, Durchführung und Bewertung der Experimente
- AP3: Anwendung von CFD-Codes; 3-D-Modellierung von Brennelementen im Brennelement-Lagerbecken und der Atmosphäre über den Brennelementen
- AP4: Anwendung von Integralcodes; Entwicklung spezieller Module für ATHLET und COCOSYS

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Ein Schwerpunkt der Arbeiten im ersten Halbjahr 2018 waren Untersuchungen zu den Erweiterungen im Integralexperiment (IE) des SWR-Brennelements bei TUD-WKET (02NUK027A,

AP1). Erster Schritt war die Erweiterung des vorliegenden geometrischen Modells und des Rechengitters um die Überströmeinrichtung und Anbindung an das Modell des Stabbereichs. Dabei stellte sich heraus, dass der Kopfbereich des Integralexperimentes von der realen Geometrie eines SWR-Brennelementes im Lagerbecken abweicht. In Zusammenarbeit mit den Projektpartnern im TP A wurde ein Dummy für den Brennelementkopf erarbeitet, der in das IE eingebaut wird. Basierend auf dieser geplanten Realisierung wurden erste transiente Rechnungen mit stationären Randbedingungen für ausgewählte Parameterkombinationen aus Füllstand und Geschwindigkeit im Überströmkanal durchgeführt (AP2). Die Realisierung von geeigneten Randbedingungen für den Dampfmassestrom und die Temperatur im Stabbereich stellte dabei eine besondere Herausforderung dar.

Die Erweiterung des Einzeleffektexperiments des DWR-Brennelements bei HSZG (02NUK027D) wurde im regelmäßigen Austausch mit den Projektpartnern begleitet (AP1). In einem Arbeitstreffen am 31. Januar an der TU Dresden wurden die experimentellen Randbedingungen, die konkreten Abmessungen für die Komponenten der 3 x 1 BE-Konfiguration und des Überströmkanals sowie mögliche alternative Anordnungen der BE-Dummys diskutiert. Zusätzlich wurden Anforderungen an die Messtechnik und die Versuchsmatrix hinsichtlich eines möglichen Abgleichs von CFD-Simulationen und Experimenten formuliert. Die abgeleiteten Anforderungen an die Versuchseinrichtungen fließen in die Arbeiten der Teilprojektpartner ein.

Die wissenschaftliche Verwertung der gewonnenen Ergebnisse zur 3D-Modellierung von BE im BE-Lagerbecken und der Atmosphäre über den BE zusammen mit dem HZ Dresden-Rossendorf (02NUK027C) wurde durch Einreichen eines Artikels in der Fachzeitschrift Nuclear Engineering and Design abgeschlossen.

Erste Vorstudien zur Analyse mesoskaliger Effekte wurden an der Geometrie des SWR-Brennelements durchgeführt (AP2). Dazu gehört die Modellierung des Queraustauschs in einem BE als anisotroper poröser Körper und die teilaufgelöste Simulation eines Einzel-BE. Die Ergebnisse dienen als Grundlage für die mesoskalige Simulation eines Teilbereiches eines BE-Lagerbeckens.

Der Zeitplan im Teilprojekt wurde zum Berichtszeitpunkt um ca. 2 Monate überschritten. Dies liegt zum einen an unerwarteten Problemen bei der Realisierung geeigneter Randbedingungen für die Simulation. Zudem verzögerte sich der Aufbau der experimentellen Arbeiten durch die zeitweise unbesetzte Bearbeiterstelle bei TUD-WKET und bei HSZG-IPM durch die erwähnten Änderungen im Versuchsaufbau. Dadurch verzögern sich auch die Simulationen, da die Validierung erst nach Vorliegen gesicherter Messwerte möglich ist.

#### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Im zweiten Halbjahr 2018 werden die CFD-Simulationen zum Integralexperiment mit Überströmung fortgesetzt. Die Untersuchungen sollen um instationäre Randbedingungen erweitert werden (AP2). Zur Vorbereitung der mesoskaligen Simulation eines Lagerbeckenbereichs wird ein überströmtes Einzel-BE mit periodischen RB (unendlich ausgedehntes Lagerbecken) berechnet.

#### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

R. Oertel, T. Hanisch, Dirk Lucas, Eckhard Krepper, Frank Rüdiger, Jochen Fröhlich: Two-scale CFD analysis of a spent fuel pool involving partially uncovered fuel storage racks (eingereicht NED im Mai 2018)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.; Bautzner Landstr. 400, 01328 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 027C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt C: Analyse und CFD-Modellentwicklung der Strömungszustände in ausdampfenden Brennelementen		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2013 bis 31.03.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 434.844,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Krepper	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Zur Berechnung der axialen und radialen Stabtemperaturprofile bei unterschiedlichen Störfallszenarien sowie zur Beurteilung der Kühleffektivität unterschiedlicher Mechanismen im Brennelement-Lagerbecken (Zirkulationsströmungen, Verdampfung, Dampfaufstieg, Kaltgaseinbruch, Strömungsinstabilitäten, Gasphasenturbulenz) werden im vorliegenden Teilprojekt CFD-Methoden mit dem Ansatz des porösen Körpers angewendet. Die notwendige Validierung der zu entwickelnden Modelle erfolgt sowohl an integralen als auch kleinskaligen Experimenten mit einem hohen Instrumentierungsgrad, die in anderen Teilprojekten des Verbunds durchgeführt werden. Der Modellansatz des porösen Körpers wird speziell mit Hilfe der Versuche an der TU-Dresden und den CFD-Simulationen für ein einzelnes Brennelement im HZDR sowie an der TUD-ISM entwickelt und parametrisiert.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Die Arbeiten beginnen mit einem ausführlichen Literaturstudium. Als Ergebnis werden konkrete Störfallszenarien herausgearbeitet und kritische Konstellationen identifiziert. Hierfür und für die Identifizierung des interessanten Parameterbereichs werden die an der TU-WKET durchgeführten ADELA-Experimente analysiert.

Die Strömung in einem Brennelement wird auf der Grundlage des Ansatzes des porösen Körpers simuliert. Hierzu werden die Größen des Modells des porösen Körpers abgeleitet, die die Strömung im Einzelbrennelement in guter Näherung wiedergeben.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wird ein CFD-Modell für eine Anordnung mehrerer Brennelemente in einem Lagerbecken sowie der Raum darüber erstellt. Unter Anwendung des erarbeiteten CFD-Modells werden die ausgewählten Störfallszenarien simuliert, die von einer konkreten Beladungsstruktur und Kühlsituation ausgehen.

Schließlich werden Schnittstellen für die Modellierung mit Lumped Parameter Codes bestimmt. Die Anwendung dieser Codes für diese Aufgabe ist zwar weniger zuverlässig aber dafür weniger aufwendig und kann deshalb flexibler durchgeführt werden.

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

Im zurückliegenden Berichtszeitraum wurde der geschaffene Modellkomplex für die Simulation von Druckwasserreaktor-Lagerbecken und einer postulierten partiellen Freilegung der Brennelemente angepasst. Bei den bisherigen Studien lag der Fokus auf der Modellierung von Siedewasserreaktor-Lagerbecken (Fukushima, SWR-Referenzanlage nach Steinrötter et al. [2014]). Wesentliche Unterschiede bestehen bei den Seitenverhältnissen des Lagerbeckens, der Höhe und Anordnung der Lagergestelle sowie der Zerfallswärmeleistung. Für die Modellierung der Brennelemente mit dem Ansatz des porösen Körpers wurden die zugehörigen Koeffizienten für den Wärmeübergang sowie den viskositäts- und formbedingten Impulsverlust entsprechend angepasst. Der verwendete Simulationsansatz erfordert die Spezifikation geeigneter Anfangsbedingungen, welche aus den unter Anwendung des Integralcodes MELCOR ermittelten Berechnungsergebnissen von Steinrötter et al. (2014) bezogen wurden. Ausgehend von diesem Zustand wurde die Simulation quasistationär fortgeführt, d. h. die Wasseroberfläche als zeitlich unveränderlich angenommen und die Lösung des Gleichungssystems iterativ fortgeführt, bis ein thermisches Gleichgewicht zwischen der in den Brennelementen freigesetzten Wärme und deren Abtransport durch Konvektion oder Wärmeleitung besteht sowie ein ausreichend großer Mittelungszeitraum zur Verfügung steht. Zu den bisher untersuchten Beladungszuständen gehören die Normalbeladung des Beckens im Leistungsbetrieb sowie die Vollbeladung bei einer Revision des Reaktordruckbehälters. In beiden Fällen zeigt sich eine mit den zurückliegenden Simulationen vergleichbare Charakteristik der Strömungszustände in der Lagerbeckenatmosphäre. Kälteres Gas dringt überwiegend im Lagerbeckenzentrum ein, während das warme Gas entlang der Lagerbeckenwand aufsteigt. Im Fall der Vollbeladung ist die Spreizung des Betrags der Zerfallswärmeleistung pro Brennelement sehr groß. Bei einer räumlich konzentrierten Lagerung der zuletzt aus dem Reaktordruckbehälter entnommenen Brennelemente verschiebt sich der Staupunkt des abfallenden Kaltgases demnach in Bereiche wo eine geringere Zerfallswärmeleistung vorliegt.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand im Berichtszeitraum war die vollständige Freilegung des Lagerbeckens unter Anwendung des auf das Fukushima-Szenario spezialisierten Modellkomplexes. Die Simulationen legen nahe, dass für die zum Unfallzeitpunkt vorliegende Zerfallswärmeleistung eine reine Luftkühlung nicht ausreichend gewesen wäre und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Zirkoniumbrand eingesetzt hätte. Da der Gültigkeitsbereich des Modellkomplexes auf Temperaturen unterhalb des Breakaway Effektes begrenzt ist, wurde ein zeitlich verschobener Störfalleintritt von einhundert bis dreihundert Tagen nach dem tatsächlichen Unfall postuliert. Die ermittelten Temperaturen deuten darauf hin, dass eine Luftkühlung für einen um zweihundert Tage verschobenen Störfalleintritt realistisch gewesen wäre. Im Fall von Fukushima ist der freiliegende Beckenquerschnitt ausreichend hoch, so dass sich für alle Zerfallswärmeanordnungen eine ähnliche Maximaltemperatur ergibt.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wird das Szenario der vollständigen Freilegung für die SWR-Referenzanlage untersucht. Im Fokus steht hierbei die Analyse der Strömungszustände im Bereich des Beckenbodens als Funktion der Zerfallswärmeverteilung. Aufgrund der kompakteren Lagerung der Brennelemente sind hier starke Unterschiede zu erwarten.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Hochschule Zittau/Görlitz, Theodor-Körner-Allee 16, 02763 Zittau		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 027D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt D: Dichtegetriebene vertikale Austauschbewegungen und radiales Strahlungsverhalten		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2013 bis 31.03.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 712.104,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Kästner	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Projekt soll in einer Kombination von Experiment und Simulation erweiterte Kenntnisse über die Wärmetransportprozesse im Fall eines teilweise bzw. vollständig ausgedampften Brennelement-Lagerbeckens (BE-LB) sowohl innerhalb der Brennstabbündel von Brennelementen als auch in den Zwischenräumen zwischen den BE liefern. Aufbauend auf den Ergebnissen, die im Verbundvorhaben SINABEL (FKZ 02NUK027) im Zeitraum von 2013 bis 2017 gewonnen wurden, stehen das Strömungs- und Temperaturfeld im Bereich des BE-Kopfes im Mittelpunkt des Interesses, weil die dortigen Verhältnisse den axialen Wärmetransport aus dem BE heraus entscheidend beeinflussen. Das betrifft sowohl die Überströmverhältnisse der umgebenden Atmosphäre als auch den Eintrag von Wassertropfen bei Spraykühlsystemen.

Die Basis der experimentellen Untersuchungen bilden die in o.g. Verbundvorhaben errichteten Versuchsanlagen ALADIN bei TUD-WKET und DVABEG bei HSZG sowie die bei TUD-ASP entwickelten Messmethoden. Zusatzeinrichtungen an den jeweiligen Anlagen dienen der Erfassung der Strömungs- und Temperaturfelder bei gezielter Überströmung über den Kopfbereich von SWR- und DWR-BE. Neben den Untersuchungen zur Temperaturentwicklung in der Integralanlage ALADIN liefern die Experimente vor allem Daten für die angestrebte Modellierung mit Integralcodes (TUD-WKET und HSZG) und CFD-Codes (TUD-ISM und HZDR). Insbesondere für die anspruchsvolle CFD-Modellierung werden Messdaten benötigt, die an den erweiterten Versuchsanlagen auf Grundlage der Ausrüstungen und Erfahrungen aus SINABEL gewonnen werden sollen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Untersuchungsprogramm des Verbundes gliederte sich vor der Aufstockung in 5 Arbeitspunkte (AP-B).

- AP-B0: Systemanalyse, Literaturstudium, Festlegung von Szenarien
- AP-B1: Auslegung, Errichtung und Inbetriebnahme der Integralversuchsanlage, Durchführung und Bewertung der Experimente
- AP-B2: Erprobung spez. Instrumentierungen, fluiddyn. Einzeleffekt-Experimente an einem BE-Dummy
- AP-B3: Anwendung von CFD-Codes; 3-D-Modellierung von BE im Lagerbecken und der Atmosphäre über den BE
- AP-B4: Anwendung von Integralcodes; Entwicklung spezieller Module für ATHLET und COCOSYS

*Aufstockung:* Nach der Aufstockung des Vorhabens wurde die Zuordnung der Arbeiten im Verbund zu den AP-A in der Form angepasst, dass die experimentellen Arbeiten an der Integral- und Einzeleffektanlage im AP-A1 zusammengefasst wurden und eine Änderung der Nummerierung der folgenden Arbeitspakete erfolgte.

- AP-A0: Analyse des erreichten Standes in SINABEL, Festlegung von Randbedingungen für Experimente und Simulationen (TUD-WKET, TUD-ISM, TUD-ASP, HZDR, HSZG)
- AP-A1: Vorbereitung, Aufbau und Inbetriebnahme der Experimentiereinrichtungen, Durchführung und Bewertung der Experimente
- AP-A2: Anwendung von CFD-Codes; 3-D-Modellierung von BE im BE-LB und der Atmosphäre über den BE
- AP-A3: Anwendung von Integralcodes; Entwicklung spezieller Module für ATHLET und COCOSYS

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

Im Berichtszeitraum wurden Arbeiten zu den AP-A1 und AP-A3 der Aufstockung fortgesetzt, wobei die Ergebnisse der abgeschlossenen Parameteranalyse (AP-A0) genutzt wurden, um die thermohydraulischen Randbedingungen beim Ausdampfen des DWR-LB zu definieren. Weiterhin wurden die Abmessungen der Komponenten des DWR-LB bestimmt, um die Gestaltung (Konstruktion, Geometrie) des Versuchsstandes mit der BE-Konfiguration  $3 \times 1$  abzuleiten. Daraus resultierte die Fertigstellung des Konzeptes nach Rücksprache mit dem Projektpartner TUD-ISM zur Festlegung der Geometrie. Aus der komplexen Geometrie und den Bestandteilen des Kompaktlagergestells (KLG) wurde eine Konfiguration für die 3 vorhandenen BE-Dummy abgeleitet. Die Auswahl der Konfiguration basiert auf einer KLG-übergreifenden, asymmetrischen Anordnung. Eine Versuchsmatrix für die geplanten Experimente wurde aufgestellt.

Für COCOSYS-Analysen zum erweiterten Versuchsstand DVABEG wurden die Stoffwerte für das Arbeitsmedium Argon implementiert, welches als Modellgas bei den Experimenten vorgesehen ist. Auf Basis der Festlegungen zu Konstruktion und Geometrie wurde ein Nodalisierungsschema für den konzipierten Versuchsstand aufgestellt.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Parallel zum Aufbau, zur Instrumentierung und Inbetriebnahme des Versuchsstandes werden die Arbeiten zum Einsatz von COCOSYS im meso- bis großskaligen Maßstab fortgesetzt.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Im Berichtszeitraum fanden im Rahmen des Projektes folgende Arbeitstreffen statt:

Arbeitstreffen am 18.01.2018 am HZDR zur Vorstellung des Arbeitsstandes aller Projektpartner

Arbeitstreffen am 13.06.2018 an der Hochschule Zittau/Görlitz zur Vorstellung des Arbeitsstandes aller Projektpartner

Es wurde ein Paper im Rahmen der internationalen Konferenz NUTHOS eingereicht und akzeptiert:

Chahi, H: "Investigation of density driven exchange of gases in spent fuel storage pool of pressurized water reactor", NUTHOS-2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 027E</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt E: Ortsaufgelöste Temperatur- und Gasphasengeschwindigkeitsmessung zur Analyse der Strömungszustände in ausdampfenden Brennelementen		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2013 bis 31.03.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 449.159,40 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Hampel	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im Rahmen des Verbundprojektes sollen die Wärmetransportprozesse ausdampfender Brennelemente-Nasslager für verschiedene Störfallszenarien untersucht und modelliert werden. Dazu ist die Kenntnis der Gasphasentemperatur und -geschwindigkeit in den Zwischenräumen einzelner Brennstäbe im Brennelement von essentieller Bedeutung. Aufgrund der erschwerten mechanischen sowie optischen messtechnischen Zugänglichkeit ist die Anwendung konventioneller Messmethoden eingeschränkt. Das Ziel des Teilprojektes ist die Entwicklung eines minimalinvasiven Messsystems zur Bestimmung der ortsaufgelösten Messung der Gasphasentemperatur und -geschwindigkeit für den Einsatz in einem Integralexperiment.

Im Verbundprojekt besteht Zusammenarbeit mit folgenden Einrichtungen:

- Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen, Institut für Energietechnik, Professur für Wasserstoff- und Kernenergietechnik
- Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen, Institut für Strömungsmechanik
- Hochschule Zittau-Görlitz
- Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1: Analyse ADELA-Experimente für spezielle Messtechnik, Literaturstudium

AP2: Selektion/Erprobung von Messverfahren

AP3: Entwicklung und Aufbau der Instrumentierung

AP4: Erprobung und Kalibrierung spezieller Instrumentierung an eigenem Strömungsversuchsstand

AP5: Unsicherheitsanalysen

AP6: Einsatz der Strömungsmessverfahren am Integralexperiment, Datenanalysen

Aufstockung AP0: Analyse bisheriger Versuche und Messtechnologierecherche

Aufstockung AP1: Optimierung, technologische Umsetzung und Experimente

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Aufstockungsphase / AP1:

In der bestehenden Elektronik ist die zeitliche Auflösung durch den Lastwechselbetrieb für die Temperatur- bzw. Geschwindigkeitsmessung auf 10 min limitiert. Es wurde vermutet, dass die Ursache dafür elektronische Bauteile sind, welche durch ein temperaturabhängiges Übertragungsverhalten eine Erwärmungsphase hin zu einem stationären Betriebspunkt erfordern. Zur Identifikation der betreffenden Bauteile wurde eine Analyse mittels einer Thermographiekamera durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass Transistoren und Messwiderstände als Bestandteil von Verstärkerschaltungen sowohl im Senderteil als auch im Empfängerteil der Elektronik Temperaturen bis zu 120 °C aufweisen. Die neue Elektronik wird nach folgenden Maßgaben entwickelt: 1) Einsatz von Bauteilen mit geringer Temperaturabhängigkeit der Übertragungscharakteristik, 2) Entkopplung von Heiz- und Messkomponenten auf der Platine und 3) Reduzierung der Stromlast auf der Platine. Letztere wird durch den Einsatz von Platin-Widerständen mit einem Nominalwiderstand von 1000 Ohm, anstatt wie bisher 100 Ohm, erzielt.

Bei den bisherigen Experimenten befanden sich die TAGS-Messpunkte in den vollen Unterkämen des Rohrbündels. Simulationen des Projektpartners TUD-ISM zeigen, dass ein größerer Anteil des Dampfstroms über den Spalt zwischen Rohrbündel und Kanalwand aufsteigt. Um einen messtechnischen Zugang in diesem Bereich zu ermöglichen wurde geprüft inwiefern das Design des Thermoanemometriegittersensors angepasst werden kann. (In der derzeitigen Variante befinden sich an dieser Stelle allerdings tragende Stege des Sensors.)

Eine neuartige Variante zur bidirektionalen Geschwindigkeitsmessung wurde zunächst theoretisch-konzeptionell untersucht. Ein beheizter Zylinder wird mit konstanter Heizleistungsdichte längs angeströmt. Dabei bildet sich eine fluiddynamische Grenzschicht aus, deren Dicke in Strömungsrichtung zunimmt, wodurch der Wärmeleitwiderstand in axialer Richtung steigt. Die Folge ist ein reduzierter Wärmetransport stromabwärts entlang des Zylinders und die Ausprägung eines Temperaturprofils. Aus dem Vergleich zweier oder mehrerer Temperaturen auf der Längsachse des Zylinders lässt sich die Anströmrichtung und der Betrag der Geschwindigkeit ableiten.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Aufstockungsphase / AP1:

Auf Grundlage der Randbedingungen zur Entwicklung der neuen Elektronik wird diese neu aufgebaut. Weiterhin wird die konstruktive Anpassung des Sensors überprüft und ggf. umgesetzt. Für die bidirektionale Sonde werden Konstruktionsvarianten erstellt und anhand der Randbedingungen für den Einbau in die modifizierte ALADIN-Anlage beim Projektpartner TUD-WKET deren Umsetzbarkeit bewertet und durchgeführt. Je nach Fortschritt werden die entwickelten Komponenten versuchsbegleitend eingesetzt.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

M. Arlit, E. Schleicher, U. Hampel: "Investigation of Heat Transfer from Dried Rod Surfaces in a Spent Fuel Mock-up with a Thermal Anemometry Grid Sensor". CD-Proceedings. 49th AMNT, Berlin/Germany, 29.-30.05.2018.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität Stuttgart – Otto-Graf-Institut – Materialprüfanstalt, Pfaffenwaldring 32, 70569 Stuttgart		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 040A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt UNSCHRO: Experimentelle Untersuchungen und theoretische Beschreibung der Schädigung metallischer Rohrleitungen bei turbulenter Durchströmung im Bereich hoher Drücke und hoher Temperaturen, Teilprojekt A: Mischnähte, Ausströmen		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2014 bis 30.06.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 737.927,20 EUR	<b>Projektleiter:</b> Silber	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Gesamtziel des Vorhabens ist die Verbesserung des Verständnisses und der Grundlagen zur quantitativen Beschreibung der Wechselwirkungsvorgänge zwischen dem Wandwerkstoff druckbeaufschlagter Komponenten und der turbulenten Durchströmung bei hohen Drücken bis zu 75 bar. Zum einen soll die thermische Wechselbelastung einer Rohrumfangsschweißnaht (Mischschweißnaht) untersucht werden, welche sich stromab einer Einspeisestelle warm/kalt (T-Abzweig) befindet. Zum anderen soll kontrolliert eine Leckstelle (wanddurchdringender Fehler/Leck definierter Größe in Rohrbauteil) eingebracht werden, deren Verhalten unter dem Einfluss des Innendruckes, der Temperaturverteilung und der turbulenten Strömung untersucht wird. Das Vorhaben baut direkt auf dem Vorhaben 02NUK009A auf und nutzt den im Rahmen dieses Vorhabens aufgebauten Versuchskreislauf. In diesem Zusammenhang werden vom Institut für Kernenergetik (IKE) Universität Stuttgart und der Materialprüfungsanstalt (MPA) Universität Stuttgart experimentelle und numerische Untersuchungen von LWR-spezifischen Rohrleitungselementen durchgeführt. Ziel ist die gekoppelte dreidimensionale Simulation und experimentelle Validierung der Vorgänge bei im Rohrleistungssystem auftretenden Rohrumfangsschweißnähten und rissartigen Lecks. Zur Charakterisierung des mechanischen Verhalten von Mischschweißnähten werden Laborproben im Ermüdungsversuch an Luft und bei Bedingungen des LWR-Mediums geprüft sowie Rohrstücke mit Rohrumfangsschweißnaht unter realen Bedingungen (75 bar, 280 °C) im Versuchskreislauf untersucht. Experimentelle Untersuchungen zum Ausströmverhalten aus rissartigen Lecks sollen den bisherigen Kenntnisstand verfügbarer Berechnungsmodelle prüfen und erweitern. Das IKE-Teilprojekt (02NUK040B) umfasst die messtechnische Erfassung der Strömungsvorgänge im Versuchskreislauf sowie die strömungsmechanische Modellierung (Thermofluidynamik) mit entsprechenden Simulationsrechnungen. Das MPA-Teilprojekt (02NUK040B) beinhaltet den Umbau der bestehenden FSI-Versuchsanlage entsprechend den Vorhabenszielen, die Durchführung von Ermüdungsversuchen an Laborproben sowie die Durchführung von Ermüdungsversuchen an geschweißten Rohrmodulen bzw. Ausströmversuchen an Leckmodulen. Strukturmechanische Berechnungen werden eingesetzt um Werkstoffmodelle anhand von Ermüdungsversuchen mit Laborproben aufzubauen um das mechanische Verhalten der Mischschweißnaht- bzw. Leckmodule numerisch abzubilden.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1: Untersuchungen an einer Mischschweißnaht, im Einzelnen:

Werkstoffcharakterisierung (AP1.1), Strömungstechnische Untersuchungen (AP1.2), Versuchskreislauf und Versuchsdurchführung (AP1.2.1), Durchführung der Messungen (AP1.2.2), Auswertung der Messergebnisse (AP1.2.3), Gekoppelte Simulation (AP1.3)

AP2: Ausströmverhalten aus einem Leck, im Einzelnen:

Teststrecke und Versuchsdurchführung (AP2.1), Messung der Leckströmung (AP2.2), Gekoppelte numerische Simulation (AP2.3), Bewertung der Messergebnisse (AP2.4)

AP3: Berichtswesen

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1.1: Das Versuchsprogramm zu den Ermüdungsversuchen wurde im August 2017 abgeschlossen. Die Auswertung der Versuche lief planmäßig.

AP1.2: Umbaumaßnahmen an der Kreislaufführung zur Durchführung der Bauteilversuche mit Mischschweißnaht wurden durchgeführt. Die Mischschweißmodule wurden gefertigt und mit Thermoelementen instrumentiert.

AP1.2.1: Bauteilversuche an den Mischschweißnahtmodulen sind abgeschlossen. Die Auswertung der Ergebnisse ist abgeschlossen.

AP1.2.2: siehe IKE

AP1.2.3: Auswertung der Versuche ist abgeschlossen.

AP1.3: siehe IKE

AP2.1: Erforderliche Umbaumaßnahmen am FSI-Kreislauf zur Durchführung der Leckageversuche wurden durchgeführt. Ein Kondensator zur Kondensation des ausgetretenen Dampfmassenstroms am Leckmodul wurde konstruiert und im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen eingesetzt. Das Leckmodul ist in den Kreislauf eingebaut und Versuche mit unterschiedlichen Rissblenden wurden durchgeführt. Es wurden Leckageblenden mit realistischen Ermüdungsrissen sowie definierten Spalten und Bohrungen hergestellt und untersucht. Im Rahmen der Projektverlängerung wurden weitere Leckageblenden mit größeren Wandstärken untersucht. Die Messungen an einer Leckblende mit Erfassung von Druck und Temperatur im Spalt sind abgeschlossen.

AP2.2: siehe IKE

AP2.3: siehe IKE

AP2.4: Die Auswertung der Messreihen an Kleinversuchsständen (IKE+MPA) und FSI-Großversuchsstand (MPA) wurden abgeschlossen. Leckageberechnungen zu den durchgeführten Messreihen mit analytischen Modellen mittels WinLeck (GRS) wurden durchgeführt.

AP3: Die bisherigen Erkenntnisse zu AP1 wurden in Form des Abschlussberichts dokumentiert. Die Berichtserstellung der anderen Arbeitspakete läuft.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP1.1: Keine.

AP1.2: Keine.

AP2.1: Keine.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität Stuttgart, Keplerstr.7, 70174 Stuttgart		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 040B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt UNSCHRO: Experimentelle Untersuchungen und theoretische Beschreibung der Schädigung metallischer Rohrleitungen bei turbulenter Durchströmung im Bereich hoher Drücke und hoher Temperaturen, Teilprojekt B: Numerische Simulation turbulenter Strömung		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2014 bis 30.06.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.030.269,54 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Laurien	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Verbundprojekt erfolgt in Zusammenarbeit mit der Materialprüfanstalt Stuttgart. Es werden Untersuchungen an einer Rohrrundschweißnaht (ausgeführt als Mischschweißnaht) unter thermisch fluktuierender Beanspruchung stromab einer Vermischungsstelle (T-Abzweig) durchgeführt.

Des Weiteren sollen rissartige Lecköffnungen in die Rohrwand kontrolliert eingebracht und Leckströmungen sowie deren Umgebung bei unterschiedlichen Temperaturen, Drücken und Strömungsbedingungen vermessen werden. Die Untersuchungen finden im modular aufgebauten Rohrleitungsversuchsstand (FSI-Kreislauf, FSI: Fluid-Struktur-Interaktion) bei realitätsnahen thermohydraulischen Versuchsbedingungen ( $p_{\max} = 75$  bar,  $T_{\max} = 280$  °C) statt. Messungen der turbulenten Strömungsgrößen und der Temperaturverteilung innerhalb der Rohrwand werden mit Thermoelementen durchgeführt. Die Entwicklung und der Test weiterer, fortgeschrittener Strömungs-Messtechnik und von Visualisierungsmethoden erfolgt im IKE anhand vereinfachter, isothermer Experimente. Die ein- und zweiphasige Strömungs-Struktur-Wechselwirkung wird außerdem mit zeitabhängig gekoppelten numerischen CFD-Simulationen unter Zuhilfenahme der Large-Eddy-Simulation untersucht sowie mit den erhaltenen experimentellen Ergebnissen verglichen.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Verbundprojekt ist in 3 Arbeitspakete (AP) unterteilt.

AP1: Untersuchungen Mischschweißnaht, i. E.: Werkstoffcharakterisierung (AP1.1), Strömungstechnische Untersuchungen (AP1.2), Versuchskreislauf und Versuchsdurchführung (AP1.2.1), Durchführung der Messungen (AP1.2.2), Auswertung der Messergebnisse (AP1.2.3), Gekoppelte numerische Simulation (AP1.3)

AP2: Untersuchungen zum Ausströmverhalten aus einem Leck, i. E.: Teststrecke und Versuchsdurchführung (AP2.1), Messung der Leckströmung (AP2.2), Gekoppelte numerische Simulation (AP2.3), Bewertung der Messergebnisse (AP2.4)

AP3: Berichtswesen

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1.1: Siehe MPA-Bericht (Projekt 02NUK040A).

AP1.2.1: Siehe MPA-Bericht (Projekt 02NUK040A).

AP1.2.2: Strömungstechnische Untersuchungen am vertikal eingebauten T-Stück im FSI-Versuchskreislauf, i. E. Strömungstemperaturmessungen unter Einsatz des Thermoelement (TC)-Moduls in der Strömungsvermischungszone sowie im Einlaufbereich des Haupt- und Nebenstrangs, PIV (Particle-Image-Velocimetry)-Erfassung der Strömungsgeschwindigkeitsprofile im T-Stück-Nebenstrangeinlauf unter Verwendung des optischen Moduls für Untersuchungsfälle kontinuierliche Nebenstrang-Kaltwassereinspeisung bzw. ohne Kaltwassereinspeisung über Nebenstrang. Zudem Untersuchungen zu Strömungs-Struktur-Wechselwirkung einer Schweißnahtwurzel im Strömungsvermischungsbereich unter Verwendung des Nahwand-LED-Induzierten Fluoreszenz (NW-LED-IF)-Messverfahrens am optischen Modul mit eingebauter Modellschweißnaht.

AP1.2.3: Die Auswertung der Thermoelement-Messungen ergibt, dass hohe Temperaturfluktuationen in der Vermischungszone vorliegen. Die Positionen dieser Temperaturfluktuationen verändern sich in Abhängigkeit von Hauptstrang-/Nebenstrang-Einlaufbedingungen (Temperaturen, Massenströme).

Für den Untersuchungsfall ohne Kaltwassereinspeisung über Nebenstrang weisen die PIV-Messungen teilweise Strömungswirbelstrukturen im Nebenstrang nach, die dort zu ausgeprägten Temperaturfluktuationen führen können.

Die Ergebnisse der NW-LED-IF-Messungen zeigen, dass die Schweißnahtwurzel die Strömungsturbulenz in der Vermischungszone verstärken und ggf. die Temperaturfluktuationen in schweißnahtnahen Bereichen erhöhen kann. In diesen Bereichen erhöht sich demnach die Wahrscheinlichkeit für die thermisch induzierte Materialermüdung.

AP1.3: Durchführung von LES-Simulationsrechnungen für horizontal orientiertes T-Stück und maximale experimentelle Betriebsbedingung (75 bar, 265 °C). In den Simulationen ist auch der experimentelle Fall der künstlich erzeugten periodischen Kaltwassereinspeisung berücksichtigt. Als Simulationsreferenz dient ein Experiment mit kontinuierlicher Kaltwassereinspeisung.

Auswertung der Simulationsergebnisse und Vergleich mit experimentellen Daten. Die berechneten Temperaturverteilungen und Temperaturfluktuationen in der Vermischungszone zeigen eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment. Im Frequenzspektrum der berechneten Temperaturdaten ist der Peak für die periodische Temperaturschwankung nicht so deutlich wie im Experiment zu erkennen.

AP2.1: Siehe MPA-Bericht (Projekt 02NUK040A).

AP2.2: Untersuchung des Einflusses der Flächenveränderung des Risses entlang der Strömungsrichtung durch unterschiedliche Einbaulage der Rissblende (Flächenverjüngung: Düse; Flächenerweiterung: Diffusor); Durchführung von Messungen am Leakage Flow (LF) Versuchsstand mit größeren Wandstärken (18 mm, 30 mm). Untersuchung der Fluidbedingungen (Druck, Temperatur) im Risskanal bei einem Riss mit 30 mm Wandstärke.

AP2.3: Simulation der Zweiphasenströmung bis 170 °C im Druckbereich von 4 bar bis 10 bar unter Berücksichtigung der experimentellen Ergebnisse mit Vernachlässigung der umgebenden Struktur.

Untersuchung des Einflusses des Austrittsdrucks (Outlet-Randbedingung) auf den Leckmassenstrom der Simulation im zweiphasigen Strömungsbereich. Zunächst Simulationen unter der Annahme von Dampfdruck am Austritt entsprechend modifizierter Bernoulli-Gleichung.

AP2.4: Berechnung der Rohrreibungszahlen der unterschiedlichen Rissformen, Wandstärken und Einbaulagen. Erstellen eines Moody-Diagramms zur besseren Darstellung des Einflusses sowohl der Reynolds-Zahl als auch der Geometrieparameter (Rauigkeit, hydraulischer Durchmesser) auf die Rohrreibungszahl mit den Daten aller vermessenen Rissblenden. Gute Übereinstimmung der experimentellen Werte mit den theoretischen Werten entsprechend des Strömungszustands (Unterscheidung zwischen laminarer Strömung, Übergangsbereich laminar ↔ turbulent, turbulente Strömung mit glatter oder rauer Oberfläche).

Um bis zu 25 % höhere Werte des Leckmassenstroms bei Diffusoreinbaulage im Vergleich zur Düse; Annäherung der Werte mit zunehmender Temperatur bzw. abnehmender Unterkühlung des Fluids.

Im zweiphasigen Strömungsbereich tendenzielle Abnahme des Leckmassenstroms mit zunehmendem Verhältnis von Wandstärke zu hydraulischem Durchmesser erkennbar. Bei allen Blenden abnehmender Leckmassenstrom mit zunehmender Temperatur bzw. sinkender Unterkühlung.

Starke Abnahme des Drucks am Risseintritt aufgrund der Beschleunigung des Fluids und der Eintrittsverluste bei den Messungen im Kanal feststellbar. Bei hohen Unterkühlungen konstante Temperatur entlang des Risskanals. Abnahme des Drucks ungefähr auf Niveau des Dampfdrucks am Rissaustritt. Bei geringerer Unterkühlung Erreichen von Siedebedingungen bereits weiter stromauf im Risskanal. Danach Abnahme der Temperatur entlang der Siedelinie bis zum Rissaustritt.

Gute Übereinstimmung der Simulationsergebnisse mit den Experimenten bei hoher Unterkühlung mit Dampfdruck als Randbedingung am Auslass. Zu geringer Leckmassenstrom der Simulationen bei geringer Unterkühlung. Daher schrittweises Absenken des Drucks.

AP3: Noch nicht begonnen.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP1.1: Siehe MPA-Bericht (Projekt 02NUK040A); AP1.2.1: Siehe MPA-Bericht (Projekt 02NUK040A); AP1.2.2: Arbeiten sind abgeschlossen, keine Weiterarbeiten; AP1.2.3: Arbeiten sind abgeschlossen; AP1.3: Arbeiten sind abgeschlossen; AP2.1: Siehe MPA-Bericht (Projekt 02NUK040A); AP2.2: Arbeiten sind abgeschlossen; AP2.3: Arbeiten sind abgeschlossen; AP2.4: Arbeiten sind abgeschlossen; AP3: Erstellung des Abschlussberichts.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

M. Zhou, R. Kulenovic, E. Laurien: T-junction experiment with high temperature and high pressure to investigate flow rate influence on mixing characteristics, *International Journal of Heat and Fluid Flow*, 71, pp. 451-459 (2018)

M. Zhou, R. Kulenovic, E. Laurien: Large-Eddy-Simulation on Thermal Mixing Process at a Horizontal Oriented 90° T-Junction, 12th International Topical Meeting on Nuclear Reactor Thermal-Hydraulics, Operation and Safety (NUTHOS-12), Qingdao, China, October 14-18, 2018

S. Schmid, R. Kulenovic, E. Laurien: Analysis of Initially Subcooled Leakage Flows in a Narrow Through-Wall Crack at low Reynolds-Numbers, Proc. of the International Congress on Advances in Nuclear Power Plants (ICAPP 2018), Charlotte, USA, April 08-11, 2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 041A
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt A: Einzel- und Integraleexperimente sowie theoretische Analysen zu Verdampfung, Kondensation und Zweiphasen-Natriumlaufstabilität in einem passiven Wärmetransportsystem		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2015 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.009.512,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Lippmann	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel des Vorhabens ist es, gesicherte Kenntnisse über das Verhalten und die Wärmetransportprozesse von passiven Systemen zu erhalten. Für experimentelle Untersuchungen ist an der TUD die Versuchsanlage GENEVA errichtet worden. Sie bildet ein passives Nachzerfallswärmeabfuhrsystem ab. An der Anlage werden die Wärmeübertragungsprozesse Kondensation an und Verdampfung in leicht geeigneten Rohren messtechnisch vertieft untersucht. Anhand der erzielten Ergebnisse werden die im Systemcode ATHLET vorhandenen Modelle für passive Systeme validiert und gegebenenfalls ertüchtigt. Des Weiteren sind Integraleexperimente zur Untersuchung der Zweiphasenstabilität vorgesehen. Unter Anwendung dieser erhaltenen Daten erfolgt die umfassende Bewertung der Stabilität des zweiphasigen Naturumlaufts mit der RAM/ROM-Methodik der nichtlinearen Stabilitätsanalyse.

Die GRS (Gesellschaft für Anlagen- und Reaktorsicherheit gGmbH) ist als Unterauftragnehmer für die TU-Dresden tätig. Sie wirkt als wichtiger Schlüssel zur Weiterentwicklung des Systemcodes ATHLET.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Forschungsvorhaben gliedert sich in die folgenden Arbeitspakete:

- AP1: Systemanalyse, Literaturstudium, Festlegung von Szenarien (TUD-WKET, THD, HZDR, Framatome)
- AP2: Erarbeitung der messtechnischen Verfahren, Instrumentierung der Versuchsanlagen und Erprobungsphase (TUD-WKET, HZDR, Framatome)
- AP3: Durchführung von Experimenten, Datenauswertung und –aufbereitung für die Modellentwicklung und Stabilitätsanalyse (TUD-WKET, THD, HZDR, Framatome)
- AP4: Modellentwicklung für CFD- und Integralcodes, Weiterentwicklung RAM/ROM, Validierung der Modelle und Methoden (TUD-WKET, HZDR, Framatome)
- AP5: Gesamtanalyse des passiven Wärmeabfuhrsystems durch Einsatz der neuen Modelle und Methoden (TUD-WKET, HZDR)

Seitens der GRS wurden Arbeitspakete wie folgt definiert:

AP1.1: Recherche (bis 12/2015)

AP1.2: Modellentwicklung und Validierung (10/2016 bis 06/2018)

AP2: Technischer Support (01/2017 bis 12/2018)

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Abgeschlossen.
- AP2: Abgeschlossen.
- AP3: Die Stabilitätsgrenze sowie das Frequenz- und Amplitudenverhalten des instabilen Zweiphasengebietes wurden experimentell bestimmt. Gegenwärtig erfolgen Umbaumaßnahmen zur Änderung der Steigrohrgeometrie.
- AP4: Der Vergleich der experimentellen Daten mit der ATHLET-Simulation zeigt deutliche Schwachstellen der implementierten Wärmeübergangskorrelationen. Erste Näherungen zur Weiterentwicklung der Modelle zeigen, dass die Implementierung von strömungskartenbasierten Korrelationen notwendig ist. Ein auf der GENEVA basierendes ordnungsreduziertes Modell zur Stabilitätsuntersuchung wurde erstellt. Vorab-rechnungen mit ATHLET zeigen Differenzen im Frequenz- und Amplitudenverhalten, welche sich durch die Vereinfachungen im Modell erklären lassen.
- AP5: Noch nicht begonnen (geplanter Zeitraum: 08/2017 bis 12/2018).
- GRS: Mit dem erstellten COSMEA-Datensatz wurden Nachrechnungen der NOKO-Experimente durchgeführt. Ein Vergleich beider Ergebnisse zeigt, dass ATHLET die Experimente lediglich qualitativ abbilden kann. Zudem wurde die THD bei ATHLET-Simulationen unterstützt, das Post-Processing-Werkzeug weiterentwickelt sowie den Projektpartnern ein ATHLET-Patch mit Pythonschnittstelle zur Verfügung gestellt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP3: Durchführung von Experimenten und Auswertung der Daten
- 07/2018: Durchführung der Versuchsreihe „Experimente zur Naturumlaufstabilität“ mit erhöhtem Strömungswiderstand vor der Heizzone
  - 08/2018: Durchführung der Versuchsreihe „Experimente zum Wärmeübergang am Rohrbündel“
  - 09/2018: Durchführung der Integralexperimente an geänderter Steigrohrgeometrie
- AP4: Modellentwicklung und Weiterentwicklung RAM/ROM
- 07/2018: Entwicklung neuer Integralmodelle für den Wärmetransport an geneigten Rohren
  - 08/2018: Anwendung der RAM-ROM-Methode an der GENEVA
  - 09/2018: Implementierung der weiterentwickelten Modelle in ATHLET
- AP5: Gesamtanalyse des passiven Wärmeabfuhrsystems
- 07/2018: Bewertung der Stabilitätseigenschaften
  - 08/2018: ATHLET-Simulation der GENEVA
  - 09/2018: ATHLET-Simulation des gesamten Notkühlsystems NOKO und GEKO
- GRS: Abschließende Arbeiten für das graphische Post-Processing-Werkzeug werden durchgeführt sowie Anwenderunterstützung für ATHLET geleistet.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

- Joint project PANAS; F. Viereckl, W. Lippmann, U. Hampel, M. Walther, S. Leyer, A. Hurtado; Präsentation: NUGENIA Annual Forum & Nuclear Days, Prag, April 2018
- PANAS – Experimental and theoretical investigation of generic thermal hydraulic issues of passive safety systems; C. Schuster, W. Lippmann, U. Hampel, M. Walther, S. Leyer; Compact/Präsentation: 49th Annual Meeting on Nuclear Technology, Berlin, Mai 2018
- Model order reduction of a low pressure natural circulation system; R. Manthey, A. Knospe, C. Lange, C. Schuster, A. Hurtado; Compact/Präsentation: 49th Annual Meeting on Nuclear Technology, Berlin, Mai 2018
- Experimental and theoretical investigation of boiling in the slightly inclined tubes of the containment cooling condenser, F. Viereckl, C. Schuster, W. Lippmann, A. Hurtado; Compact/Präsentation: 49th Annual Meeting on Nuclear Technology, Berlin, Mai 2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V., Bautzner Landstr. 400, 01328 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 041B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt B: Untersuchungen zu Kondensationsprozessen im Notkondensator und numerische Simulation einer passiven Wärmeabfuhrkette		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2015 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 787.100,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Hampel	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Mit Hilfe der bei den beiden Experimenten im HZDR und an der TUD-WKET generierten Experimentaldaten sollen neue Verdampfungs- und Kondensationsmodelle für CFD- und Integralcodes entwickelt werden, die das reale thermohydraulische Verhalten von passiven Wärmeabfuhrsystemen möglichst allgemein wiedergeben können. Dieses thermohydraulische Verhalten umfasst sowohl den Wärmetransport und die Wärmeübertragung auf die Wärmesenke als auch die sich dabei einstellende Naturumlaufströmung, welche integral betrachtet stabilitätsgefährdet ist.

Ziel ist die Entwicklung von Modellen mit den wesentlichen physikalischen Eigenschaften, die sich ohne zu großen numerischen Aufwand insbesondere für technische Geometrien zielgenau auf industrielle Probleme anwenden lassen, die aber auch in numerischen Codes implementiert werden können.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Systemanalyse, Literaturstudium, Festlegung von Szenarien (TUD-WKET, THD, HZDR, Framatome)
- AP2: Erarbeitung der messtechnischen Verfahren, Instrumentierung der Versuchsanlagen und Erprobungsphase (TUD-WKET, HZDR, Framatome)
- AP3: Durchführung von Experimenten, Datenauswertung und –aufbereitung für die Modellentwicklung und Stabilitätsanalyse (TUD-WKET, THD, HZDR, Framatome)
- AP4: Modellentwicklung für CFD- und Integralcodes, Weiterentwicklung RAM/ROM, Validierung der Modelle und Methoden (TUD-WKET, HZDR, Framatome)
- AP5: Gesamtanalyse des passiven Wärmeabfuhrsystems durch Einsatz der neuen Modelle und Methoden (TUD-WKET, HZDR)

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Die erforderlichen Arbeiten zum Literaturstudium und zur Systemanalyse wurden in den vorhergehenden Berichtsperioden weitestgehend abgeschlossen, so dass im 1. Halbjahr 2018 überwiegend Literaturrecherchen zur Steigerung der Kondensationsleistung bei Installation von Einbauten bzw. Abscheidern durchgeführt wurden. Gemeinsam mit den anderen drei Doktoranden des PANAS-Projektes wurde ein Übersichtsbericht zu Systemen der passiven Wärmeabfuhr begonnen. Wegen der großen Datenmenge wurde beschlossen, den Bericht in zwei Teilen anzufertigen. Der erste Teil steht kurz vor der Einreichung, während der zweite Teil noch unter den Autoren diskutiert wird.
- AP2: Die im 3. und 4. Quartal 2017 an der Versuchsanlage COSEMA erhobenen Messdaten für verschiedenen Druckstufen (5, 12, 25, 45 und 65 bar) und stationäre Wärmeübertragungsszenarien wurden im 1. HJ 2018 hinsichtlich der Kondensatverteilung im leicht geneigten Kondensationsrohr ausgewertet und den Projektpartner im März direkt übergeben bzw. restriktiv publiziert (<https://doi.org/10.14278/rodare.3>). Weiterhin wurden die Halbzeuge zum Aufbau der Ti-Teststrecke geliefert und umgehend zur Materialprüfung an die Firma Siempelkamp weitergeleitet. Die im Rahmen einer interdisziplinären Projektarbeit konstruierten und bereits gelieferten Teile der ultraschnellen Röntgentomographie konnten durch die ak-

tuell noch durchzuführenden Messungen an COSMEA-I bis jetzt noch nicht installiert werden. Aktuell wird der Zusammenbau auf Dichtheit geprüft. Auch bei der Realisierung des durchstrahlbaren Targets, das für den Einsatz eines Mehrebenen-CT-Scanner benötigt wird, zeichnet sich weiterer zeitlicher Verzug ab, da der potenzielle Anbieter zunächst eine Testversion erstellen möchte, um die Fertigungstechnologie zu prüfen. Die Vorstudien für den Einsatz des (Mehrebenen)-Strahlungsdetektors sind. Die technischen Zeichnungen zur neuen Titan-Teststrecke sind fertiggestellt und von der zentralen Überwachungsstelle drucktechnisch genehmigt. Die Dampfstützleitung ist komplett aufgebaut und betriebsbereit.

- AP3: Aktuell wird ein neuer Ansatz zur zeitlich aufgelösten Füllstandsbestimmung des Kondensats im Kondensatorrohr getestet und validiert. Nach Abschluss der transienten Kondensationsmessungen Ende 2017 wurden die Messdaten im 1. Halbjahr 2018 ausgewertet.  
Die transienten Versuche wurden bei einem Druck von 65 bzw. 45 bar gestartet und über eine Zeitspanne von mindestens 30 Minuten beobachtet. Nach der Datenauswertung stehen jetzt erstmalig transiente Parameter für insgesamt 8 Hochdruck-Kondensationsexperimente zur Verfügung, die an die TH Deggendorf und die GRS weitergeleitet und dort bereits nachgerechnet wurden.
- AP4: Es wurde ein eigenes Wandkondensationsmodell unter Berücksichtigung des Flüssigkeits-Filmes an der Wand entwickelt. Schließlich wurde ein Modell entwickelt, das sowohl Wandkondensation als auch DCC umfasst. Im Berichtszeitraum wurde des Weiteren der Einfluss von Einbauten auf die Kondensationsrate untersucht. Die Weiterentwicklung dieser im Projekt entwickelten Idee kann bei der Erhöhung des Kühlvermögens sehr hilfreich sein.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Neuerscheinende Publikationen werden regelmäßig analysiert und nutzbare Informationen bei der Weiterarbeit berücksichtigt.
- AP2: Nach Erhalt der Ergebnisse zur Materialprüfung der Titanproben, werden die Halbzeuge zur Schweißfirma weitergeleitet. Nach Fertigstellung der Schweißprobe wird diese ebenfalls materialtechnisch geprüft und bei positiven Ergebnissen die Fertigung des Ti-Kondensatorrohres entsprechend Beauftragung freigegeben.  
Nach Vorliegen von 3 technischen Angeboten wird die Fertigung der Teststrecke COSMEA-II beim ausgewählten Anbieter beauftragt.
- AP3: Es werden die vorliegenden Messdaten analysiert, um weitere Informationen zur Modellbildung bereitzustellen. Zusätzlich werden, soweit technisch möglich, für die ermittelten experimentellen Daten Unsicherheiten bestimmt, um eine hohe Qualität beim Vergleich mit den numerischen Ergebnissen zu gewährleisten.
- AP4: Verbesserung der Modellierung der Sekundärseite; Detailliertere Untersuchungen zum GENTOP-Konzept; Validierung und Verifikation der Modelle anhand der Experimente mit höherem Flüssigkeitsgehalt innerhalb des Rohres; Detailliertere Untersuchung des Einflusses von inneren Einbauten auf den Wärmeübertragungskoeffizienten;

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

- Iskander, K. N. A. (2018): Study on optimal scintillation detectors for ultrafast electron beam X-ray CT scanners. Masterarbeit. Anhalt University of Applied Science.
- Bieberle, A., Boden, S., Beyer, M., & Hampel, U. (2018): Results of the stationary measurements at COSMEA-I facility - CT part [Data set]. <http://doi.org/10.14278/rodare.4>
- Moonesi et al.: CFD modeling and simulation of condensation in passive heat removal systems (atw, 238-241, 2018)
- Moonesi et al.: Modeling of condensation inside an inclined pipe (AMNT 2018- Berlin, proceeding, presentation)
- Moonesi et al.: CFD modeling of condensation inside emergency condensers of passive heat removal systems (ICONE 2018, London, Abstract, presentation)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Framatome GmbH, Paul-Gossen-Str. 100, 91052 Erlangen		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 041C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt C: Übertragung auf industrielle Anwendungen von neuen Modellen zu Verdampfung, Kondensation und Zweiphasen-Naturumlaufstabilität in einem passiven Wärmetransportsystem		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2015 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 320.606,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Walther	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im Rahmen dieses Verbundprojektes werden die thermohydraulischen Besonderheiten der Energieübertragung und Stabilität der bei passiven Wärmeabfuhrsystemen auftretenden Kondensations- und Verdampfungsvorgänge mit experimentellen und theoretischen Methoden untersucht. Der Schwerpunkt liegt auf der Verbesserung von System- und CFD-Codes mit aus Integral- und Einzelexperimenten gewonnenen Daten.

Ziel ist die Entwicklung von Modellen mit den wesentlichen physikalischen Eigenschaften, die sich ohne zu großen numerischen Aufwand zielgenau auf industrielle Probleme und Maßstäbe anwenden lassen, die aber auch in numerischen Rechenprogrammen implementiert werden können.

Framatome unterstützt die Verbundpartner bei der Festlegung durchzuführender Szenarien und bei der Abstimmung der Versuchsdurchführung und des Instrumentierungskonzeptes und stellt experimentelle Daten des INKA Teststandes zur Verfügung. Darüber hinaus ist die Zusammenarbeit bei der Nutzung experimenteller Daten als Grundlage für die verbesserte Modellierung und bei der Implementierung dieser entwickelten Modelle vorgesehen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Die Framatome GmbH bringt Ihre Erfahrungen bei der Festlegung von Versuchsszenarien, der Erarbeitung messtechnischer Verfahren und bei der Instrumentierung der Versuchsanlagen ein. Sie wirkt bei der Planung der notwendigen Teststandmodifikationen mit und stellt ferner Daten von INKA-Experimenten bereit. Framatome wirkt bei der Entwicklung neuer Integralmodelle für den Wärmetransport an geneigten Rohren mit und skaliert diese auf die industrielle Anwendbarkeit in einem kommerziellen CFD-Code. Diese werden an experimentellen Daten validiert und kommen in einer Integralcode-Simulation des Notkühlsystems zum Einsatz.

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

Basierend auf den experimentellen Daten vom NOKO-Teststand COSMEA am HZDR wurde unter Berücksichtigung des revidierten mechanistischen Kondensationsmodells die empirische Korrelation in das Wärmeübertragungsmodell mit Phasenübergang überarbeitet und in S-RELAP5 implementiert. Die Wärmeübertragungsparameter in der Nachrechnung der Experimente von 2014 liefern akzeptable Abweichungen zu den experimentell abgeleiteten Größen.

Der COSMEA-Teststand am HZDR wurde mit CFD abgebildet und das vom HZDR entwickelte CFD Modell implementiert. Zur Stabilisierung der Simulationen wurden Modifikationen am HZDR Modell vorgenommen. Die anschließend durchgeführten Testrechnungen zeigen gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen vom HZDR. Im weiteren Verlauf wurde die Auflösung des Rechengitters schrittweise reduziert mit dem Ziel:

- Den Aufwand der noch anstehenden Berechnung des gesamten Notkondensators in vertretbarem Rahmen zu halten.
- Dass die dadurch resultierenden Abweichungen in den Berechnungsergebnissen noch vertretbar sind.

Des Weiteren wurde ein CFD Model für die Primärseite des Notkondensators erstellt. Hierbei wurden die gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich Rechengitterauflösung angewandt.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Die empirischen Korrelationen in den Wärmeübertragungsmodellen zur Beschreibung des Verhaltens des NOKO-Teststand COSMEA am HZDR werden mit den neuesten Experimenten verglichen.

Mit Hilfe der experimentellen Daten vom Versuchstand GENEVA der TU Dresden sollen neue Integralmodelle für den Wärmetransport an geneigten Rohren, in denen Verdampfung stattfindet, entwickelt werden. Die physikalischen Modelle sollen im Rahmen einer anschließenden Rechnung validiert werden. Ziel ist eine Simulation des gesamten Notkühlsystems.

Hinsichtlich der CFD-Modellentwicklung ist geplant, die bisher gewonnenen Erkenntnisse am Notkondensator CFD-Model umzusetzen und zu testen. Hierzu soll in einem ersten Schritt nur die Primärseite des Notkondensators berücksichtigt werden. Anschließend ist geplant auch die Sekundärseite in das CFD-Model zu integrieren. Ziel hierbei ist eine Validierungsrechnung für das Modell.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> THD - Technische Hochschule Deggendorf, Dieter-Görlitz- Platz 1, 94469 Deggendorf		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 041D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt D: Statische und dynamische Modellierung der thermischen Kopplung von Fluidphasen und Wärmeüberträgerstrukturen		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Reaktorsicherheit		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2015 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 308.568,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Leyer	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Passive Wärmeabfuhrsysteme sind Teil des Sicherheitssystems vieler Anlagen der Generation III, finden sich aber auch schon in Generation II Reaktoren. Ihr Vorteil ist die Unabhängigkeit von externen Energiequellen bzw. von I & C-Systemen. Demnach können diese Systeme auch bei Station-Black-Out Szenarien den Reaktor kühlen und damit die Barrieren zum Sicheren Einschluss von radioaktivem Material gewährleisten. Allerdings zeigen Störfälle wie in der Anlage Fukushima Daiichi wie wichtig eine sorgfältige Auslegung passiv tätiger Systeme ist.

Ziel des PANAS Vorhabens ist die Beschaffung der physikalischen Grundlagen für passive Nachzerfalls-Wärmeabfuhrsysteme, um diese in numerisch berechenbare Korrelationen zu übersetzen, die dann in thermohydraulische Codes eingearbeitet werden können. Ein zentraler Punkt ist die Beschreibung des Wärmeeintrags, da passive Wärmeabfuhrsysteme durch den Dichteunterschied, der durch die Erwärmung bzw. Abkühlung des Kühlmediums hervorgerufen wird, angetrieben werden. Die Modellierung des Wärmeeintrags ins passive System bzw. der Wärmeaustausch zwischen den Phasen des Kühlmediums im stationären bzw. transienten Betrieb ist die zentrale Fragestellung des Teilprojektes PANAS D. Damit ist das Teilprojekt direkt mit den experimentellen Vorhaben im Rahmen des Verbundprojektes verknüpft.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das PANAS Teilprojekt D behandelt die Modellierung der statischen und transienten Wärmeübertragungsvorgänge einer Zweiphasen-Wasser-Dampf-Strömung sowie die Wärmeüberträger-Strukturen. Ausgehend von den in der Literatur verfügbaren Modellen und auf Basis kinetischer Modelle werden die Messergebnisse, die an den Testständen GENEVA der Technischen Universität Dresden und des Teststandes zur Wärmedurchgangsmessung in geneigten Rohren des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf analysiert und optimierte Wärmeübergangsmodelle erarbeitet. Daran anschließend wird die Implementierbarkeit dieser Modelle in gängige Fluidynamische Codes geprüft.

Die Arbeiten sind in 5 Arbeitspakete unterteilt:

AP1: Literaturstudium zu Zweiphaseninstabilitäten und dynamischen thermischen Kopplungen

AP2: Erstellung von 1D dynamisch thermischen Kopplungsmodellen sowohl im stabilen als auch im transienten Zustand mit ATHLET aufgrund der Daten von GENEVA und COSMEA Teststände

AP3: Vergleich des Simulationsresultats mit dem Messergebnis und Entwicklung von Modellen im Hinblick auf vorhandene Zweiphasenströmungs-Instabilitäten und transienten Modellen. Abgrenzung der Gültigkeitsbereiche thermisch-statischer und thermisch-dynamischer Kopplungen

AP4: Entwicklung von 3D Modellen mit kleinem Kontrollvolumen zur Beschreibung dynamischer thermischer Kopplungen mithilfe von CFX

AP5: Beurteilung der Implementierbarkeit von zeitabhängigen Wärmeübergangs-Mechanismen in bestehende Programm-Strukturen

Der Terminplan wurde an die Änderungen im PANAS Projekt angepasst.

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

Das AP1 und 2 sind erfolgreich abgeschlossen. Die Arbeiten im Rahmen des AP3 und 4 sind in der Bearbeitung. Die Literaturrecherche der Wärmeübertragungskoeffizienten wurde durchgeführt und die Nutzungsbedingungen für die Wärmeübertragungsmodelle wurden erfasst. Das Weiteren wurden ATHLET- Berechnung durchgeführt und die Input-parameters wurden von COSMEA-Experimente übernommen. Die Berechnungen der Wärmestromdichte wurden mit dem ausgewerteten Experiment verglichen. Die Fehler der Wärmestromdichte und Kondensationsrate zwischen Simulation und Experimente sind groß und die berechneten Werte sind 30 Prozent klein als experimentale Datum. Die bisherigen Ergebnisse wurden in zwei Konferenzpapers (NURETH und NUTHOS) veröffentlicht. Ein Vortrag über den Kondensationsprozess in COSMEA wurde in SG-FANS Symposium Karlsruhe präsentiert. Das ATHLET Model bezüglich des Verdampfungsprozesses wurde aufgebaut und die Geometrie des Modells umfasst die Dampfkammer und das Verdampfungsrohr in der Dampfkammer. Innerseitige Sieden und außenseitige Filmkondensation in dem Verdampfungsrohr wurden als Randbedingung in ATHLET Berechnung implementiert. Die Geometrie des Verdampfungsrohrs in GENEVA für CFX - Simulation wurde mit ANSYS-DesignModeler aufgebaut.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Zwei Overviewpaper-Veröffentlichung wird durch den Doktoranden im Projekt geplant, wobei der erste Entwurf zweite Hälfte 2018 eingereicht werden soll. Die Kondensationsmodelle von der Literaturrecherche werden in ATHLET implementiert, um die COSMEA-Simulation wieder zu berechnen und die Ergebnisse werden mit dem ausgewerteten Experimental Datum vergleichen. Das Weitere wird die ATHLET-Berechnung bezüglich neuen Daten von COSMEA noch durchgeführt. Bei Bedarf werden die Modelle mit CFX entwickelt.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Eine Veröffentlichung (Overviewpaper für die verschiedenen Wärmeübertragungsmodelle) wird verfasst. Der erste Entwurf wird in der zweiten Jahreshälfte 2018 eingereicht

Ein Vortrag (Investigate of condensation process in COSMEA with ATHLET code) im SG-FANS Symposium wurde präsentiert und das Paper wurde zur Veröffentlichung in der Zeitschrift Kerntechnik vorbereitet



## **2.2 Sicherheitsforschung zur nuklearen Entsorgung**

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Sondervermögen Großforschung beim Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 039A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2015 bis 31.08.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.916.145,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Altmaier	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Gesamtziel des Projekts ThermAc ist die Erweiterung des Kenntnisstands und der thermodynamischen Datenbasis für Actinide, langlebige Spaltprodukte und Matrixelemente mit Relevanz für Langzeitsicherheitsanalysen zur Endlagerung hochradioaktiver wärmeproduzierender nuklearer Abfälle. Angesichts der existierenden Lücken ist ein signifikanter Wissenszuwachs nur auf Basis eines integrierten Konzepts zu realisieren, mit folgenden strategischen Komponenten:

- (i) Systematische Anwendung von verschiedenen Schätzmethoden für thermodynamische Daten und Modellparameter. Basierend hierauf erfolgt die geochemische Modellierung von Referenzsystemen.
- (ii) Umfassende und belastbare experimentelle Validierung der unter (i) erarbeiteten Vorhersagen unter Nutzung verschiedener komplementärer experimenteller und quantenchemischer Ansätze.
- (iii) Grundlegende Untersuchungen zum verbesserten Prozessverständnis der Actinidenchemie bei höheren Temperaturen.
- (iv) Kritische Evaluation der Arbeiten in (i)-(iii), hinsichtlich der Fragen (A) in wieweit sind die Schätzmethoden hinreichend qualifiziert um im Rahmen von Langzeitsicherheitsanalysen belastbar eingesetzt zu werden, und (B) welche Systeme sind weiterhin thermodynamisch unterbestimmt bzw. welche relevanten Prozesse bei höheren Temperaturen können nicht hinreichend verstanden werden.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

(Gesamtprojekt ThermAc, Arbeiten von KIT-INE und dessen Unterauftragnehmern)

KIT-INE arbeitet in allen Arbeitspaketen von ThermAc mit Ausnahme von AP4.

AP1: Initialisierungsarbeiten

AP2: Schätzverfahren für thermodynamische Parameter bei erhöhten Temperaturen

AP3: Erarbeitung von thermodynamischen Daten zur Speziation der Actiniden in wässrigen und festen Systemen

AP5: Bewertung von Schätzmethoden

AP6: Qualitätsmanagement/Dokumentation

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im Rahmen des Berichtszeitraums wurden von KIT-INE folgende Arbeiten durchgeführt:

- KIT-INE, Projektmanagement: Abschluss des Aufstockungsantrags für ThermAc, Organisation von Projekttreffen, Dissemination, Kommunikation mit Assoziierten Partnern.
- KIT-INE, Experimentelles Programm: (i) Synthese von Np(V) Festphasen. (ii) Konzept Manuskript Lee et al. „Solubility of Ca–U(VI)–CO<sub>3</sub>(s) systems at T = 25 and 80 °C“, (iii) Publikation Lee et al. zu „Impact of T on Np(V) solid phases“ im internen Review. (iv) Einreichung Publikation Endrizzi et al. „U(VI) solubility in dilute to concentrated NaCl at T = 25, 55, 80 °C (Manuskript II). (v) Erstellung Publikation Endrizzi et al. „Nd(III) solubility and hydrolysis at elevated T“ in Kooperation mit Uni Heidelberg und Amphos21 (vi) Konzept Manuskript Lee et al. „Redox chemistry of Np at elevated T“ wurde entwickelt.
- Arbeiten des Unterauftragnehmers GRS:
  - (i) Entwicklung von Ion-Wechselwirkungsparametern für untersuchte Systeme. (ii) Arbeiten im MgCl<sub>2</sub>-Mg<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>O System. (iv) Analyse des Systems NaCl-Na<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>O durch Isopiessitik und Löslichkeitsmessungen. (v) Modellentwicklung für NaCl-Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup>/Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> - H<sub>2</sub>O. Einfluss von NaCl auf das Messsignal f(ΔpO<sub>2</sub>) erfolgreich beschrieben.
- Arbeiten des Unterauftragnehmers Amphos21:
  - Schätzmethode für Enthalpy- und Entropiedaten. (i) Nd(III)-OH and Nd(III)-Cl System, Beteiligung an Publikation KIT-INE, (ii) Cm(III)-OH, -Cl System, Ableitung neuer Schätzwerte. (iii) Datenblätter für die untersuchten Systeme bzw. Schätzmethode.
- Arbeiten des Unterauftragnehmers PSI-LES:
  - (i) Anwendung isocoul. Extrapolationen für Cm und Eu mit Phosphaten. (ii) Publikation zur ThermoFun-Bibliothek (Entwurf in interner Begutachtung). (iii) Optimierung der entwickelten Softwarepakete. (iv) Weiterentwicklung des ThermoMatch-Reaktionsgenerators und der graphischen Widgets von ThermoFun zur Tabellierung von thermodyn. Daten.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- KIT-INE, Projektmanagement: Kommunikation im Verbund ThermAc, Organisation von Projekttreffen, Dissemination, Planung des ThermAc Abschlussworkshops im Sommer 2019.
- KIT-INE, Experimentelles Programm: (i) Beginn Np(V) Löslichkeitsexperimente bei T = 80 °C, (ii) Fertigstellung bzw. Einreichung der verschiedenen Manuskripte von Lee et al. bzw. Endrizzi et al. innerhalb ThermAc (iii) Start der experimentellen Arbeiten zu tetravalentem Th(IV). (iv) Analyse von Np(V-IV) Redoxtransformationen als Funktion der Temperatur.
- Arbeiten des KIT-Unterauftragnehmers GRS: Arbeiten entsprechend Verlängerungsantrag.
- Arbeiten des KIT-Unterauftragnehmers Amphos21:
  - (i) Weiterführung der Arbeiten an Datenblättern für die untersuchten Systeme und Schätzmethode. Weiterleitung an Verbundpartner. (ii) Analyse der Anwendbarkeit von Schätzmethode und deren Anwendbarkeit zum Abbau von Unsicherheiten für den Safety Case.
- Arbeiten des KIT-Unterauftragnehmers PSI-LES:
  - (i) Vergleich isocoulomb. Extrapol. mit exp. Resultaten aus ThermAc. (ii) Einreichung Publikation über die ThermoFun-Bibliothek. (iii) Entwurf Publikation „Vergleich isocoul. Extrapol. mit Experimenten. (iv) Austesten mit Fehlerbehebung der erstellten Programme und Bibliotheken. (v) Entwicklung eines graphischen Widgets zum Vergleich der isocoul. und anderer in ThermAc verwendeten Schätzmethode.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Lothenbach et al., (2018), Cemdata18: A chemical thermodynamic database for hydrated Portland cements and alkali-activated materials. Cement and Concrete Research. In press; (2) Miron et al., (2018), A PHREEQC version of CEMDATA'18 generated using ThermoMatch. CASH II Workshop, 23-24 April 2018, EMPA, Dübendorf, Switzerland, (Conference abstract)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V., Bautzner Landstr. 400, 01328 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 039B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethode, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2015 bis 31.08.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 785.091,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Huittinen	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Verbundprojekt ThermAc (sieben Partner, Koordination KIT-INE) zielt auf die Erweiterung des Kenntnisstands und der thermodynamischen Datenbasis für Actiniden, langlebige Spaltprodukte und Matrixelemente mit Relevanz für Langzeitsicherheitsanalysen zur Endlagerung hochradioaktiver wärmeproduzierender Abfälle. Das Projekt adressiert den Temperaturbereich bis 90 °C, und vorrangig anorganische Systeme bei niedrigen oder mittleren Ionenstärken. Angesichts der existierenden thermodynamischen Lücken wurde ein integriertes Konzept mit vier strategischen Komponenten entwickelt um einen signifikanten Wissenszuwachs innerhalb der ersten Projektphase zu generieren:

- a) Systematische Anwendung von Schätzmethode für thermodynamische Daten und Modellparameter; mit nachgeschalteter geochemischer Modellierung von Referenzsystemen.
- b) Experimentelle Validierung dieser Vorhersagen
- c) Untersuchungen zum verbesserten Prozessverständnis der Actinidenchemie.
- d) Finale kritische Evaluation der Schätzmethode für Belange der Langzeitsicherheitsanalysen und Ableitung noch notwendiger Experimente für thermodynamisch unterbestimmte Systeme und relevante Prozesse.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Initialisierungsarbeiten  
(Literaturstudie zu Komplexbildungs- und Löslichkeitskonstanten der Actiniden und den wesentlichen Liganden)
- AP2: Schätzverfahren für thermodynamische Parameter bei höheren Temperaturen
- AP3: Erarbeitung von thermodynamischen Daten zur Speziation der Actiniden in wässrigen und festen Systemen
- AP5: Bewertung von Schätzmethode – Vergleich mit Experimenten
- AP6: Qualitätsmanagement/Dokumentation

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Cm(III)/Eu(III)-Phosphat: Die Ergebnisse zu dem Cm(III)/Eu(III)-Phosphat-System, d. h. die Komplexbildungskonstante  $\log\beta^0(T)$ , die Specific-Ion-Interaction (SIT) Parameter  $\varepsilon(\text{CmH}_2\text{PO}_4^{2+}/\text{EuH}_2\text{PO}_4^{2+}, \text{ClO}_4^-)$  und die thermodynamischen Parameter  $\Delta_{\text{RH}}$  und  $\Delta_{\text{RS}}$  für die Reaktion  $\text{Cm}^{3+}/\text{Eu}^{3+} + \text{H}_3\text{PO}_4 \leftrightarrow \text{Cm}/\text{EuH}_2\text{PO}_4^{2+} + \text{H}^+$ , wurden in einer wissenschaftlichen Publikation zusammengefasst. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Cm(III)-Phosphatkomplexierung bei einem pH-Wert von  $-\log[\text{H}^+] = 2.5$  und unterschiedlichen Temperaturen (25 – 90 °C) und Ionenstärken ( $I=0.5\text{-}2.0$  M) durchgeführt, um Komplexbildungskonstante, SIT Parameter und thermodynamische Daten für den Komplex  $\text{Cm}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2^+$  ableiten zu können.

U(VI)-Silikat: Hinsichtlich des U(VI)-Silikat-Systems erfolgten erste temperaturabhängige Lumineszenz-Untersuchungen im sauren pH-Bereich zur Validierung bereits vorhandener Literaturdaten. Es war möglich eine konditionelle Komplexbildungskonstante sowie thermodynamische Daten für den  $\text{UO}_2\text{OSi}(\text{OH})_3^+$  abzuleiten. In Kollaboration mit den Paul-Scherrer-Institut (PSI) erfolgten erste Untersuchungen im U(VI)-Silikat-System mit Hilfe der Schubert-Methode im basischen pH-Bereich, für welchen bisher noch keine U(VI)-Si-Komplexe bekannt sind. Die bisherige Auswertung der Daten weist auf die Bildung eines ternären U-Si-OH Komplex im basischen pH Bereich hin ( $\text{UO}_2(\text{OH})_2\text{OSi}(\text{OH})_3^-$ ).

U(VI)-Chlorid/Fluorid: Das Quenchingverhalten von Uranyl(VI) mit Chlorid und Fluorid wurde untersucht. Hierzu wurde eine Messmethodik entwickelt, welches es erlaubt UV/Vis- und TRLFS-Spektren gleichzeitig aufzunehmen, um Speziationen von Uran(VI) und Uran(IV) zu untersuchen. Anhand von TRLFS-Ergebnissen war es möglich erste Uranyl(VI)chlorid-Spektren bei und nach direkter Anregung zu beobachten. Weiterhin wurde die TRLFS angewandt, um Stern-Volmer-Plots für das Quenching von Uranyl(VI) mit Chlorid und Fluorid zu erstellen.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Cm(III)/Eu(III)-Phosphat: Für die Cm(III)-Phosphat-Komplexierung sollen die Untersuchungen bei  $-\log[\text{H}^+] = 2.5$  abgeschlossen werden. Danach sollen Versuche bei höheren pH-Werten erfolgen, bei welchen die  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  Liganden die Speziation dominieren. Ziel dieser Arbeiten ist es, für beide Liganden, Komplexbildungskonstanten und thermodynamische Daten für die Komplexe  $\text{CmHPO}_4^+$  und  $\text{CmPO}_4$  abzuleiten.

U(VI)-Silikat: Im U(VI)-Silikat-System folgen TRLFS Untersuchungen im basischen pH-Bereich, um die bisherigen Erkenntnisse aus den Untersuchungen am PSI zu bestätigen. Gleichzeitig sollen zusätzliche Si-NMR und ESI-TOF Messungen weitere Erkenntnisse über die Komplexbildung im sauren Bereich liefern und eine mögliche Polymerisation der Kieselsäure ausschließen.

U(VI)-Chlorid/Fluorid: Die Untersuchungen zu dem Quenchingverhalten von Uranyl(VI) mit Chlorid und Fluorid sollen abgeschlossen werden und in einer Masterarbeit zusammengefasst werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

N. Huittinen, Cm complexation with aqueous phosphates at elevated temperatures, Radiation in the Environment - Scientific Achievements and Challenges for the Society, 16–17.4.2018, Helsinki, Finland

N. Jordan, M. Demnitz, H. Lösch, S. Starke, V. Brendler, N. Huittinen (2018) Complexation of trivalent lanthanides (Eu) and actinides (Cm) with aqueous phosphates at elevated temperatures, Inorg. Chem. 57, 7015-7024

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Grabengasse 1, 69117 Heidelberg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 039C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethode, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2015 bis 31.08.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 654.706,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Panak	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im Rahmen dieses Verbundprojekts werden Untersuchungen durchgeführt, die den Kenntnisstand und die thermodynamische Datenbasis für Actinide, langlebige Spaltprodukte und Matrixelemente mit Relevanz für Langzeitsicherheitsanalysen zur Endlagerung hochradioaktiver wärmeproduzierender nuklearer Abfälle erweitern. Schwerpunkte der geplanten Arbeiten im Rahmen dieses Teilprojekts sind die Charakterisierung von Actinid- und Lanthanidkomplexen durch Anwendung von Speziationsmethoden wie der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS), Röntgenabsorptions- und UV/Vis-Spektroskopie bei erhöhten Temperaturen sowie die Bestimmung von thermodynamischen Daten für Komplexbildungsreaktionen und löslichkeitsbestimmende Festphasen, die im Hinblick auf die Endlagerung in natürlichen geologischen Formationen eine wesentliche Rolle spielen. Dadurch werden grundlegende Informationen bezüglich der Bildungsreaktionen sowie der Stabilität der Komplexe/Festphasen erhalten, die eine zuverlässigere Beschreibung des Migrationsverhaltens von Actiniden in natürlichen Systemen und insbesondere im Nahfeld eines Endlagers ermöglichen.

Das Forschungsvorhaben wird in enger Kooperation mit den Verbundpartnern des HZDR, KIT-INE, FZJ sowie der GRS und der TU München durchgeführt.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- WP1: Komplexbildung von dreiwertigen Actiniden mit Chlorid
- WP2: Hydrolyse von Cm(III) und Eu(III) bei erhöhten Temperaturen
- WP3: Komplexbildung von Np(V) mit anorganischen Liganden bei erhöhten Temperaturen
- WP4: Charakterisierung von Festphasen
- WP5: Bewertung von Schätzmethode; Qualitätsmanagement/Dokumentation

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- WP2: Die neue Hochtemperaturzelle wurde optimiert und auf Funktionsfähigkeit überprüft. Die Anwendung zur TRLFS ermöglicht deutlich geringere Konzentrationen an Cm(III) sowie ein reduziertes Probenvolumen. Als erste Anwendung wurde die Komplexbildung von Cm(III) mit Fluorid im Temperaturbereich bis 200 °C untersucht. Die

Spektren zeigen mit steigender  $[F^-]_{\text{tot}}$  und steigender  $T$  eine bathochrome Verschiebung, was auf die Bildung der Komplexe  $\text{CmF}^{2+}$  und  $\text{CmF}_2^+$  zurückgeführt wird. Die ermittelten konditionalen Stabilitätskonstanten steigen im untersuchten Temperaturbereich um 1 bis 2 Größenordnungen an. Eine Extrapolation auf  $I_m = 0$  mittels der SIT ergibt für die Bildung von  $\text{CmF}^{2+}$  einen Wert von  $\log \beta^0_1(25\text{ °C}) = 3.46 \pm 0.03$ , welcher bis  $200\text{ °C}$  um 1.8 logarithmische Einheiten ansteigt. Des Weiteren wurden mittels der integrierten van't Hoff-Gleichung die thermodynamischen Funktionen der Bildung von  $\text{CmF}^{2+}$  ermittelt ( $\Delta_r H^0_m = 27.0 \pm 1.1\text{ kJ mol}^{-1}$ ;  $\Delta_r S^0_m = 156.7 \pm 2.9\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ ).

WP3: Die bereits durchgeführten UV/Vis-spektroskopischen Studien zur Komplexierung von  $\text{Np(V)}$  mit  $\text{Cl}^-$  wurden durch zusätzliche Extraktionsexperimente komplementiert, wodurch eindeutig die Bildung der  $\text{NpO}_2\text{Cl}$  und  $\text{NpO}_2\text{Cl}_2^-$  Spezies nachgewiesen wurde. Die beobachtete hypsochrome Verschiebung der Absorptionsspektren von  $\text{Np(V)}$  mit steigender Ionenstärke und Temperatur konnte quantifiziert werden, was eine quantitative Auswertung der bereits vorhandenen Daten zur Chloridkomplexierung ermöglichte. Die Ergebnisse zeigen eine thermodynamische Stabilitätskonstante von  $\log \beta^0_1(25\text{ °C}) = -0.65 \pm 0.15$  für die Bildung des  $\text{NpO}_2\text{Cl}$  Komplexes, welche um 0.3 logarithmische Einheiten bis  $85\text{ °C}$  ansteigt. Zusätzlich wurden mittels der integrierten van't Hoff-Gleichung die entsprechende Standardreaktionsenthalpie und -entropie bestimmt ( $\Delta_r H^0_m = 7.4 \pm 2.6\text{ kJ mol}^{-1}$ ;  $\Delta_r S^0_m = 12 \pm 7\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ ).

Der experimentelle Aufbau zur Absorptionsspektroskopie bei  $T > 100\text{ °C}$  wurde optimiert und in Betrieb genommen. Hiermit wurde die Komplexierung von  $\text{Np(V)}$  mit Sulfat bei  $T = 25 - 200\text{ °C}$  untersucht. Die Daten befinden sich aktuell in der Auswertung. Erste Ergebnisse zeigen, dass sich auch in diesem ausgedehnten Temperaturbereich nur die  $\text{Np(V)}\text{-SO}_4^{2-}$  Spezies bildet.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

WP2: Quantitative Untersuchungen der Hydrolyse von  $\text{Cm(III)}$  in Abhängigkeit der Temperatur. Modifikation der neuen Hochtemperaturzelle zur Anwendung in EXAFS-spektroskopische Untersuchungen.

WP3: Komplementierende ICP-OES/MS-Untersuchungen von Batchsamples zur Komplexierung von  $\text{Np(V)}$  mit  $\text{SO}_4^{2-}$ . Vollständige Auswertung des gesamten Datensatzes. Untersuchung der Komplexierung von  $\text{Np(V)}$  mit  $\text{NO}_3^-$  bei  $T > 25\text{ °C}$ .

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Koke, C., Skerencak-Frech, A., Panak, P.J.: The complexation and thermodynamics of  $\text{Cm(III)}$  with chloride in diluted to saturated  $\text{NaCl}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  solution, studied by time resolved laser fluorescence spectroscopy, submitted

Maiwald, M. M., Fellhauer, D., Skerencak-Frech, A., Panak, P. J.: Thermodynamics of the complexation of neptunium(V) with fluoride in aqueous solution, submitted

Maiwald, M.M., Fellhauer, D., Skerencak-Frech, A., Panak, P.J.: Thermodynamics of the complexation of neptunium(V) with halides in aqueous solution at elevated temperatures, 18th Radiochemical Conference Radchem, Czech Republic, 13-18th May 2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 039D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethode, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2015 bis 31.08.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 582.309,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Brandt	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Gesamtziel des Projekts ist die Erweiterung der thermodynamischen Datenbasis für Actiniden, langlebige Spaltprodukte und Matrixelemente mit Relevanz für die Endlagerung hochradioaktiver wärmeproduzierender Abfälle. Der Fokus liegt auf dem Verhalten in aquatischen Systemen bei erhöhten Temperaturen bis 90 °C und niedrigen bis mittleren Ionenstärken - unter Nutzung von Abschätzalgorithmen, neuen experimentellen Untersuchungen und quantenchemisch gestützten Strukturinformationen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden die beteiligten Verbundpartner aus Universitäten und nationale Forschungseinrichtungen ihre Expertise und Aktivitäten in Synthese, Charakterisierung, und Theorie bündeln, um zu einem tieferen Verständnis der Thermodynamik der ausgewählten Systeme zu gelangen.

Durch die das Projekt im Wesentlichen tragenden Doktoranden und Post-Doc Stellen und die verbesserte Vernetzung der beteiligten Institutionen wird ein wichtiger Beitrag zur Nachwuchsförderung mit dem Ziel des Erhalts und der Erweiterung von radiochemischer und kern-technischer Kompetenz in Deutschland geleistet.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1: *Initialisierungsarbeiten*

AP2: Schätzverfahren für thermodynamische Parameter bei höheren Temperaturen

AP3: *Erarbeitung von thermodynamischen Daten zur Speziation der Actinide und Spalt- und Aktivierungsprodukte in wässrigen und festen Systemen* – Experimentelles Programm zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit thermodynamischer Daten von endlager-relevanten Sekundärphasen Zirkon-Doppelhydroxide (LDH = layered double hydroxide) und Ba-Ra-Sulfat

AP4: Quantenchemische Rechnungen

AP5: *Bewertung von Schätzmethoden* – Vergleich und Bewertung von Schätzmethoden mit den in AP3 erarbeiteten thermodynamischen Daten; Auswahl von thermodynamischen Daten für den Gebrauch in bestehenden Datenbanken

AP6: *Qualitätsmanagement/Dokumentation*

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Alle experimentellen Arbeiten aus dem Arbeitsprogramm vor der Aufstockung sind abgeschlossen und in den entsprechenden formalisierten Zwischenberichten besprochen. Eine Veröffentlichung aus dieser Projektphase ist noch in Bearbeitung und soll im Herbst 2018 eingereicht werden.

Die unten beschriebenen AP's beziehen sich auf die Fortsetzung ab 01.03.2018.

AP3: Die benötigten Mischkristalle sind hergestellt und mittels SEM/EDX, XRD charakterisiert worden (AP1 des Fortsetzungsantrags). Rekristallisationsexperimente mit den neu hergestellten Mischkristallen in Gegenwart von Radium bei insgesamt drei unterschiedlichen Temperaturen sind in Vorbereitung und werden kurzfristig begonnen werden (AP2 des Fortsetzungsantrags).

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die mikroskopischen und nanoanalytischen Arbeiten zu AP3 werden plangemäß begonnen werden, sobald Proben dazu vorliegen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Vinograd V. L., Kulik D. A., Brandt F., Klinkenberg M., Weber J., Winkler B. and Bosbach D. (2018): Thermodynamics of the solid solution - Aqueous solution system (Ba,Sr,Ra)SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O: I. The effect of strontium content on radium uptake by barite. *Appl. Geochemistry* 89, 59–74

Poonoosamy J., Brandt F., Stekiel M., Kegler P., Klinkenberg M., Winkler B., Vinograd V., Bosbach D. and Deissmann G. (2018): Zr-containing layered double hydroxides: Synthesis, characterization, and evaluation of thermodynamic properties. *Appl. Clay Sci.* 151, 54–65

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität München, Arcisstr. 21, 80333 München		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 039E
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethode, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt E		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2015 bis 31.08.2019		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 575.528,00 EUR		<b>Projektleiter:</b> Dr. Krüger

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Vorhabensziele:

Quantenmechanische Modellierung von Neptuniumhydroxid- und Carbonatkomplexen der Oxidationsstufen V und VI zur Charakterisierung ihrer Speziation, Geometrie, und thermodynamischer Parameter. Unterstützung der Interpretation entsprechender spektroskopischer Experimente der Projektpartner.

Bezug zu anderen Vorhaben: Teilprojekt im Verbund ThermAc.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Untersuchungsprogramm umfasst folgende Arbeitspakete:

- AP1: Methodenevaluierung
- AP2: Einkernige Neptunium(V)-Komplexe
- AP3: Einkernige Neptunium(VI)-Komplexe
- AP4: Mehrkernige Neptuniumkomplexe
- AP5: Temperaturabhängigkeit der Komplexbildung
- AP6: Unterstützung spektroskopischer Experimente

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP2: Einkernige Np(V)-Komplexe; AP3: Einkernige Np(VI)-Komplexe, AP4: Mehrkernige Np-Komplexe; AP5: Temperaturabhängigkeit der Komplexbildung; AP6: Unterstützung Experimente

Modellierungen zu zweikernigen Hydroxycarbonatkomplexen  $(AnO_2)_2CO_3(OH)_3^-$ , An = U(VI) und Np(VI) (AP4) wurden weitgehend abgeschlossen. Für den aus Experimenten bekannten Komplex  $(UO_2)_2CO_3(OH)_3^-$  wurden neben in der Literatur vorgeschlagenen Isomeren zwei weitere untersucht. Als stabilste Isomere wurden ein bekanntes sowie ein neues mit gleicher Energie berechnet. Ein weiteres Isomer ist etwa 10 kJ/mol weniger stabil. Dieser Satz

von Strukturen ähnlicher Energie entspricht besser den experimentellen Hinweisen als frühere Modellierungen.

Rechnungen zu Aktinoid-Sulfatkomplexen (AP3, B) wurden für U(VI) begonnen, um Ausgangsstrukturen für die aufwändigeren Modellierungen von Np-Komplexen zu gewinnen und um an experimentelle Resultate der Projektpartner anzuschließen. Für U(VI)-Monosulfat wurde eine bevorzugt bidentate Koordination gefunden. Dies bestätigt frühere Rechnungen, allerdings wurde eine geringere Energiedifferenz zum monodentaten Isomer erhalten. Eine abweichende Koordinationszahl der Komplexe kann noch nicht ausgeschlossen werden. Derzeit werden diese Untersuchungen auf U(VI)-Disulfat und Np(VI)-Monosulfat erweitert.

Rechnungen zur Temperaturabhängigkeit von Carbonatkomplexen (AP5) wurden um Mono-, Di- und Tricarbonat von Np(VI) und U(VI) ergänzt. Für alle Komplexe wird eine Stabilisierung mit ansteigender Temperatur erhalten, die für Tricarbonatkomplexe am geringsten ausfällt. Unterschiede zwischen Np(VI) und U(VI) sind bei gegebener Koordinationszahl erwartungsgemäß gering.

Zur Modellierung der Temperaturabhängigkeit von Aktinoid-Halogenidkomplexen (AP3, C; AP5, D) wurden zunächst Mono- und Dihalogenidkomplexe für U(VI) mit F- und Cl-Liganden optimiert und ihre freie Energie für 25 °C und 75 °C bestimmt. In Übereinstimmung mit experimentellen Hinweisen wurden mit der Temperatur steigende Komplexierungskonstanten für alle Komplexe gefunden. Dieser Anstieg ist für F- und Cl-Komplexe recht ähnlich. Für Dihalogenidkomplexe wird eine leichte Präferenz der Koordinationszahl 5 gegenüber 4 berechnet, die mit wachsender Temperatur abnimmt, so dass bei höheren Temperaturen ein Anstieg von Spezies mit geringerer Koordinationszahl zu erwarten ist. Der Einfluss der Temperatur auf das Gleichgewicht zwischen Trans- und Cis-Isomeren ist hingegen sehr gering. Derzeit werden effektive Komplexierungsenergien unter Berücksichtigung des Gleichgewichts verschiedener Spezies in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt sowie an der Erweiterung dieser Studie auf Np(VI) gearbeitet. Dynamische Simulationen der Temperaturabhängigkeit mit periodischen Modellen und expliziter Solvation wurden anhand des Beispiels  $\text{NpO}_2^+$  aufgenommen. Eine einfache Simulation über 15 ps ergab eine bevorzugte Koordinationszahl von vier im Gegensatz zur molekularen Modellierung, in der eine Koordinationszahl von 5 leicht bevorzugt ist. Validierungen der verwendeten Modellparameter sowie dynamische Simulationen zu  $\text{NpO}_2\text{OH}^0$  werden derzeit durchgeführt.

Zur Unterstützung entsprechender Experimente des Projektpartners Helmholtz-Zentrum Dresden Rossendorf wurden U(VI)-Monosilikatkomplexe untersucht (AP6). Optimierungen verschiedener Isomere ergaben eine leichte Präferenz für eine monodentate Koordination des Liganden, die mit einem relativ kurzen U-Si-Abstand von etwa 300 pm einhergeht.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP2: Einkernige Np(V)-Komplexe; AP3: Einkernige Np(VI)-Komplexe, AP5: Temperaturabhängigkeit der Komplexierung

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Leibniz Universität Hannover, Welfengarten 1, 30167 Hannover		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 044A
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt SIRIUS: Sekundärionisation radioaktiver Isotope zur orts aufgelösten Ultrapurenanalyse, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2016 bis 31.12.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 838.914,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Walther	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im vorliegenden Projekt sollen geochemische Einflüsse untersucht werden, die das Migrationsverhalten von Pu oder Tc wesentlich beeinflussen. Da die umgebenden Materialien meist sehr inhomogen sind, müssen Speziation und Sorptionsmechanismen mikroskopisch betrachtet werden. Dazu soll in Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Radioökologie und Strahlenschutz an der LUH sowie dem Institut für Kernchemie und dem Institut für Physik an der JGU Mainz das kombinierte Verfahren der orts aufgelösten Sekundärionen-Flugzeit-Massenspektrometrie mit effizienter und elementselektiver Laser-Resonanzionisation der sekundären Neutralteilchen entwickelt (Laserresonanzionisations-SNMS) und an jeweils einem entsprechend spezialisierten Gerät in Mainz und Hannover eingesetzt werden.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1: Kopplung von TOF-SIMS mit resonanter Laser-ionisation Planung  
 AP2: Charakterisierung des Messverfahrens, Untersuchung systematischer Effekte  
 AP3: Durchführung analytischer Messungen

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Die im Zuge der Mittelumwidmung beschaffte Polarisationsoptik wurde im Strahlengang aller Ti:Sa-Laser implementiert, um eine gezielte Abschwächung der Laserleistung für SNMS-Messungen vornehmen zu können.
- AP2: Im Rahmen einer laufenden Bachelorarbeit (Physik) werden Zusammenhänge verschiedener Messvariablen und Gerätespannungen bei Messungen auf nichtleitenden Umweltproben systematisch untersucht. Ziel der Arbeit ist eine Signaloptimierung für SIMS-Messungen sowie das Erstellen einer Gerätekonfiguration für SNMS-Messungen auf nichtleitenden Proben.  
 SNMS-Messungen für Americium wurden mit einem bekannten Anregungsspektrum erfolgreich getestet: Am-241 und Am-243 konnten in einer Umweltprobe erstmals durch SNMS nachgewiesen werden. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die verwendeten Wellenlängen nicht für Isotopenverhältnismessungen geeignet sind, da sich durch Isotopenshifts die Verhältnisse mit den verwendeten Wellenlängen ändern. Ein Punkt, an dem beide Isotope gleich stark nebeneinander vorliegen, ist nicht erreichbar.  
 In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Düllmann des Instituts für Kernchemie der Universität Mainz wurden Tests zum Drucken von kleinsten Tropfen verschiedener Kalibrierlösungen durchgeführt. Dazu sind Lösungen mit verschiedenen Probengehalten auf unterschiedliche Trägermaterialien getropft und abgedampft worden mit dem Ziel, kleinstmögliche Proben für Einstellungen und Kalibrierungen der Laser-SNMS herzustellen. Die gewünschte kleinflächige Aufbringung konnte erreicht werden. Messungen dieser Standards sind in Bearbeitung.
- AP3: In einer zweiten laufenden Bachelorarbeit (Physik) wird ein Verfahren entwickelt, Wolframnadeln für einen Mikromanipulator herzustellen und mit diesen Nadeln Partikel aus der komplexen Probengeometrie von Asphaltbohrkernen zu extrahieren. Weiterhin sollen geeignete Probenträger für die SIMS entwickelt werden und extrahierte Partikel mit SIMS gemessen werden.

In einer dritten laufenden Bachelorarbeit (Physik) wird die entwickelte Routine zur Partikelfindung systematisch für verschiedene Probenorte angewendet, z. B. an Proben aus dem Cooling Pond, dem Roten Wald und einem Versuchsfeld in Kopachi (alle Region Tschernobyl) sowie Proben aus der Region Fukushima. Gefundene Partikel werden mittels REM/EDX,  $\alpha$ -Track Analyse und  $\gamma$ -Spektroskopie analysiert.

Inklusive der schon bekannten wurden bisher 24 Partikel in Umweltproben gefunden und 4 Partikel mit Wolframnadeln extrahiert. Erste SIMS-Messungen wurden an extrahierten Partikeln erprobt und Uran-Isotopenverhältnisse wurden erfolgreich bestimmt. Durch die Separation von der Umwelt-Matrix wurde das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis deutlich verbessert, so dass auch eine Bestimmung von U-234 möglich wird.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1:
- Erweiterung des Lasersystems um zwei Gitter-Titan:Saphir-Laser.
  - Implementierung eines neuen Americium-Anregungschemas zur Angabe von Isotopenverhältnissen.
  - In Kollaboration mit der JGU Mainz sollen die Simulationen zur zweitstufigen Extraktion vervollständigt und eine kombinierte Datenaufnahme von Laserparametern und Ionensignal entwickelt werden.
- AP2:
- Charakterisierung der Gitter-Ti:Sa-Erweiterung, Testmessungen.
  - Tests verbesserter SIMS-Geräteeinstellungen für SNMS-Messungen auf nichtleitenden Proben. Bestandteil einer Bachelorarbeit.
  - Das Design von SNMS-Proben-Träger für Wolfram-Nadeln wird weiter verbessert, um Signalverlust zu minimieren. Damit werden Messzeiten verkürzt und SNMS-Messungen ermöglicht. Bestandteil einer Bachelorarbeit.
  - Test der in Kooperation mit der JGU Mainz hergestellten gedruckten Standardproben zur Kalibrierung und Einstellung des SNMS-Systems.
  - Tests weiterer verschiedener Anregungsschemata für Pu und U.
- AP3:
- Bestimmung von Pu-Isotopenverhältnissen an extrahierten Partikeln mittels SNMS.
  - Beamline-Experimente an einigen extrahierten Partikeln aus verschiedenen Probenorten, um die Pu-Speziation aufzuklären.
  - Vergleich von REM/SIMS/SNMS-Messungen vor und nach den Beamline-Messungen
  - Lokalisierung und Analyse weiterer Brennstoffpartikel in verschiedenen Proben. Vergleich analysierter Partikel anhand mehrerer Kenngrößen. Bestandteil einer Bachelorarbeit.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Michael Franzmann: A new tool for ultra-trace analysis of radionuclides: Setup, optimization and characterization of the resonant Laser-SNMS System for IRS Hannover. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2018

Franzmann, M., H. Bosco, L. Hamann, C. Walther and K. Wendt (2018): "Resonant Laser-SNMS for spatially resolved and element selective ultra-trace analysis of radionuclides." *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, 33, 730-737

Clemens Walther: "Spatially resolved ultra-trace analysis on plutonium containing particles by rL-SNMS", seminar Lawrence Livermore National Laboratory, 04.04.2018, eingeladener Vortrag

C. Walther, H. Bosco, L. Hamann, M. Weiss M. Franzmann, K. Wendt: "Quasi-non-destructive Investigations of Actinide Particles Recent Applications of the Secondary Neutral Ionization SIMS", MARC X Kona HI USA, 11.04.2018, Vortrag

Hauke Bosco, Martin Weiß, Manuel Raiwa, Klaus Wendt, Clemens Walther: "Progress in spatially resolved ultra-trace analysis on plutonium containing particles by RL-SNMS", DPG Frühjahrstagung Erlangen, 04.03.2018, Vortrag

Hauke Bosco: "Resonante Laser-SNMS als Tool für die nukleare Forensik", Symposium über Nuklearspezifische Gefahrenabwehr des BfS, 15.03.2018 Berlin, eingeladener Vortrag

Hauke Bosco, Martin Weiß, Manuel Raiwa, Klaus Wendt, Clemens Walther: „Ortsaufgelöste Partikelanalyse mit REM und resonanter Laser-SNMS“, Seminar Kernchemie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz, 11.06.2018 Mainz, eingeladener Vortrag

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Saarstr. 21, 55122 Mainz		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 044B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt SIRIUS: Sekundärionisation radioaktiver Isotope zur orts aufgelösten Ultrapurenanalyse, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2016 bis 31.12.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 964.500,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Reich	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Die Sicherheitsanalyse eines geologischen Tiefenlagers für Wärme entwickelnde radioaktive Abfälle muss das geochemische Verhalten von Plutonium und den minoren Actiniden sowie von langlebigen Spaltprodukten berücksichtigen. Im Falle einer Leckage der Abfallbehälter hängt das Ausbreitungsverhalten der Radionuklide wesentlich von Wechselwirkungen mit den das Endlager umgebenden geotechnischen Barrieren, den geologischen Formationen und dem Deckgebirge ab. Im Projekt sollen die geochemischen Einflüsse untersucht werden, die das Migrationsverhalten von Pu und Tc wesentlich beeinflussen. Da die umgebenden Materialien meist sehr inhomogen sind, müssen Speziation und Sorptionsmechanismen der Radionuklide mikroskopisch betrachtet werden. Dazu wird das Verfahren der orts aufgelösten Sekundärionen-Flugzeit-Massenspektrometrie (TOF-SIMS) mit effizienter und elementselektiver Laser-Resonanzionisation kombiniert. Im Rahmen dieses Verbundprojektes arbeiten das Institut für Kernchemie und das Institut für Physik der Universität Mainz mit dem Institut für Radioökologie und Strahlenschutz der Universität Hannover zusammen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Die im Institut für Kernchemie vorhandene TOF-SIMS III-Apparatur soll optimiert und mit dem vorhandenen Lasersystem zum kombinierten Verfahren der Sekundärneutralteilchen-Laserionisations-Massenspektrometrie gekoppelt werden. Nach den Entwicklungs- und Kalibrationsarbeiten sollen die Sorption und Diffusion von Pu in Tongesteinen untersucht und später auf Tc ausgedehnt werden.

Die folgenden Arbeitspakete sind vorgesehen:

- Simulationen zur Ionenoptik des TOF-SIMS und deren Modifikation
- Entwicklung des Lasersystems für den Kooperationspartner Hannover und Tests
- Kopplung der TOF-SIMS mit resonanter Laserionisation
- Charakterisierung des Messverfahrens, Untersuchung systematischer Effekte
- Durchführung analytischer Messungen

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Institut für Kernchemie:

Die Optimierung der Laser-SNMS von Pu auf elektrisch leitenden Substraten im Hinblick auf das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis und die Auflösung wurde abgeschlossen. Dazu wurden die Zeitstruktur der Messung, die Pulsbreite der Ga-Ionen, die Spannungen für die Unterdrückung der Sekundärionen sowie für die Extraktion der Laserionen systematisch variiert. Mit Hilfe von Proben, bei denen eine definierte Menge an  $^{239}\text{Pu}$  elektrolytisch auf Ti-Folie abgeschieden wurde, konnte die Effizienz der Laser-SNMS zu  $(7\pm 1) \times 10^{-4}$  bestimmt werden. Das bedeutet gegenüber der früher mit dieser Apparatur gemessenen Effizienz von  $\approx 10^{-7}$  (Erdmann et al., 2009) eine Verbesserung um mehrere Größenordnungen.

Die erste praktische Anwendung der Laser-SNMS erfolgte an einem aus natürlichem Tongestein isolierten Partikel, das mit  $2 \times 10^{-5} \text{ M } ^{239}\text{Pu(VI)}$  kontaktiert worden war. Die chemische Heterogenität des  $\approx 200 \mu\text{m}$  großen Partikels auf der  $\mu\text{m}$ -Skala konnte durch die Detektion verschiedener Elemente im TOF-SIMS-Modus gezeigt werden. Die Verteilung des Pu auf dem Partikel konnte sowohl mit Laser-SNMS als auch mit TOF-SIMS bestimmt werden.

Institut für Physik:

An der Mainzer Spektroskopieapparatur MABU wurden zweistufige Anregungsschemata für Pu und Am entwickelt, um die Empfindlichkeit des Laser-SNMS-Verfahrens zu erhöhen. Allerdings können nicht-resonante (NR) und Oberflächenionisations-(SI) Prozesse zu Einbußen in der Elementselektivität führen. Zur Überprüfung wurden Massenspektren mit Am-Pu-Cocktails mit gleichen Gehalten untersucht, wobei Unterdrückungen sowohl für Pu als auch Am von mehr als drei Größenordnungen gezeigt werden konnten. Weitere Messungen unter Einbeziehung mehrerer Actiniden (z. B. U und Np) sind in Vorbereitung, u. a. auch um die Beiträge von NR und SI zu separieren. Das zwischenzeitlich entwickelte automatisierte Gitter-Lasersystem ermöglicht es, zwischen den Anregungsschemata verschiedener Actiniden während der Messung schnell zu wechseln. Dies wurde an einem Lanthaniden-Cocktail mit sieben Elementen erfolgreich demonstriert.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Institut für Kernchemie:

Zur Vorbereitung des Einsatzes der Laser-SNMS für nichtleitende Proben soll Pu auf eine Glaskeramik aufgebracht und anschließend der optimale Parametersatz für die Laser-SNMS sowie deren Effizienz bestimmt werden. Danach sollen mit Pu kontaktierte Ton- und Zementproben untersucht werden.

Institut für Physik:

An synthetischen Actiniden-Cocktails mit unterschiedlicher Element- und Isotopenzusammensetzung soll die Zweischritt-Anregung gegenüber der bisher angewendeten Dreischritt-Anregung für die Laser-SNMS-Anwendung weiter charakterisiert werden. Hierzu sollen Anregungsschemata für U, Np und später Cm entwickelt werden. Für alle untersuchten Actiniden werden das Sättigungsverhalten, die Empfindlichkeit und die Selektivität studiert. Absolute Ionisationseffizienzen sollen nachfolgend am hochtransmittierenden RISIKO-Massenseparator ermittelt werden. Die Automatisierung des Gitter-Lasersystems wird weiter verbessert, um einen möglichst autonomen Laserbetrieb im SIRIUS-Projekt zu gewährleisten.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

M. Franzmann, H. Bosco, L. Hamann, C. Walther, K. Wendt: Resonant laser-SNMS for spatially resolved and element selective ultra-trace analysis of radionuclides, *J. Anal. At. Spectrom.* 33, 730-737 (2018)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 046A
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.11.2016 bis 31.10.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.123.790,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Weigand	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im Vorhaben sollen Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und naturstoffrelevanten Derivate, strukturanlogene tripodale Ligandsystemen und Liganden auf Basis von funktionalisierten Chitosan in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt untersucht werden. Zur Aufklärung solcher Wechselwirkungsmuster werden verschiedene Teilaspekte bearbeitet, die von der Synthese der verschiedenen Ligandentypen über experimentelle und theoretische Studien zum Komplexbildungsverhalten in Lösung bis hin zur Bestimmung thermodynamischer Kenngrößen sowie der Beschreibung von Verteilungs- und Transportmechanismen in umweltrelevanten Systemen reichen und eine Ableitung der geltenden Struktur-Wirkungsbeziehungen erlauben.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Im Verbundprojekt soll an der TU Dresden die Komplexbildung zwischen f-Elementen und Naturstoff-basierten Liganden untersucht und relevante Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Als Ligandsysteme sind dabei tripodale Liganden mit zentralen N-, P-, P=O-, CH-Funktionen vorgesehen. Als Substituenten sind insbesondere Amid- und Glucosamineinheiten sowie Phosphanyl- und Phosphoryleinheiten geplant. Als Naturstoff-Ligand kommt Chitin zum Einsatz das geeignet isoliert und funktionalisiert wird. Neben der Synthese und Charakterisierung ausgewählter Ligandtypen sind experimentelle Studien zum Komplexbildungsverhalten gegenüber f-Elementen in Lösung bzw. die gezielte Darstellung relevanter Komplexverbindungen und ihre strukturelle Charakterisierung geplant. Arbeitspakete:

- Synthese und Charakterisierung der unterschiedlichen Ligandtypen: tripodale Liganden, phosphorylierten Pyrazolone, funktionalisiertes Glucosamin
- Isolierung und Charakterisierung von Chitin
- Studien zur Komplexbildung relevanter Zielliganden mit ausgewählten f-Elementen in Lösung mittels UV/Vis- und NMR-Spektroskopie
- Darstellung von kristallinen Metallkomplexen unter Variation der experimentellen Bedingungen sowie deren Charakterisierung durch Elementaranalyse und IR-Spektroskopie
- Ermittlung der charakteristischen Komplexstrukturen durch NMR-Spektroskopie sowie Röntgenkristallstrukturanalyse
- Spektroskopische Studien der Lanthanid- und Actinidkomplexe an chemisch nicht modifiziertem Chitin und an Chitosan
- Thermogravimetrische und dynamische differenzkalorimetrische Untersuchungen der Komplexe sowie Extraktionsuntersuchungen im wässrig-organischen Zweiphasensystem
- Untersuchung des Absorptionsverhaltens von f-Elementen an chemisch nicht modifiziertem Chitin und Chitosan
- Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Die detaillierten Untersuchungen zu den Komplexbildungseigenschaften von *N*-Salicyliden-D-glucosamin mit Uranylionen wurden fortgeführt. Die bestimmte Koordination von drei, über einen  $\mu$ -Oxo-Liganden, verbrückten Metallzentren erfolgt durch drei Liganden jeweils von dem N- und O- Donoratom des Substituenten sowie durch die C-1 OH-Gruppe des Zuckers nach Deprotonierung. Das beobachtete Koordinationsmuster konnte in Anwesenheit verschiedener Alkalimetalle reproduziert werden. Weiterführende Raman-Studien weisen darauf hin, dass ein derartiges Koordinationsmuster der Uranylionen sowohl in Lösung als auch im Festkörper vorliegt. Die Ergebnisse wurden zur Internationalen Konferenz „The 10<sup>th</sup> International Symposium on Nano & Supramolecular Chemistry“ 2018 in Dresden, im Rahmen eines Vortrages vorgestellt.

In den Arbeiten zu tripodalen Ligandensystemen wurde eine Reihe von P-zentrierter Liganden durch Umsetzung von Tris(3,5-dimethylpyrazolyl)phosphan mit verschiedenen Naturstoffen (Maltol, Isomaltol sowie einer Auswahl von Aminosäuren) synthetisiert und charakterisieren. Das Komplexbildungsverhalten der isolierten Phosphane gegenüber Uranylionen unter Verwendung verschiedener Anionen ( $\text{UO}_2(\text{X})_2$ ,  $\text{X} = \text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ) wurde in Lösung NMR-spektroskopisch untersucht.

Weiterhin wurde Europium an Biosilikat aus selbst gezüchteten und aufbereiteten Diatomeen und weiteren natürlichen Diatomeenerde sowie künstlichen Silikatmaterialien (MCF, mesocellular foam) sorbiert. Die Proben wurden mittels Elementanalyse, Optische Emissionsspektroskopie (OES), Massenspektrometrie und zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS, in Zusammenarbeit mit dem HZDR) analysiert; außerdem wurden einige ausgewählte Proben zur weitergehenden Ermittlung der Speziation mittels site-selective TRLFS untersucht. Ebenso wurde Europium nach einer Toxizitätsprüfung an lebenden Chitin produzierenden Diatomeen sorbiert und diese nach der Ernte mithilfe von OES und TRLFS charakterisiert. Um den Einfluss des in den natürlichen Proben vorkommenden Eisens zu evaluieren, wurden Silikat-Eisen-Copräzipitate hergestellt und mit elementanalytischen und spektroskopischen Methoden identifiziert und quantifiziert. Ergebnisse von Voruntersuchungen wurden auf der Konferenz „Silicamics2“ in Victoria, British Columbia, Kanada, im Rahmen eines Vortrages vorgestellt. Zur Identifizierung der in die Komplexbildung von trivalenten f-Elementen an Chitin involvierten funktionellen Gruppen wurden NMR-spektroskopische Analysen an Komplexen aus verschiedenen Lanthanid-Ionen mit den Monomeren von Chitin – Glucosamin und N-Acetylglucosamin – durchgeführt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- Spektroskopische Studien der Ligand-Metallion-Wechselwirkungen in Lösung
- Durchführung von Kristallisationsexperimenten zur Gewinnung von Einkristallen der Liganden und relevanter Metallkomplexe
- Aufklärung der Ligand- bzw. Komplexstruktur durch Röntgeneinkristallstrukturanalyse
- Weiterführende Raman und NMR-Untersuchungen an ausgewählten Actinid- und Lanthanid-Isotopen
- Darstellung und Charakterisierung von iminfunktionalisierten Aminosäuren sowie tripodaler Ligandensystemen auf Basis von Glucosamin bzw. Aminosäuren
- Untersuchung ausgewählter Maillardprodukte als alternative Modellschubstanzen für Naturstoff-basierten Liganden
- Thermogravimetrische und dynamische differenzkalorimetrische Untersuchungen der synthetisierten Komplexverbindungen
- Ausdehnung der Untersuchungen auf spezielle Arten von Chitin (Schwammchitin,  $\beta$ -Chitin) sowie Chitosan und chemisch modifiziertes Chitin

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.; Bautzner Landstr. 400, 01328 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 046B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.11.2016 bis 31.10.2019		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 675.486,00 EUR		<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Stumpf

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Durch Bündelung der Forschungsaktivitäten und Expertisen der Verbundpartner wird durch grundlegende Forschung zu den besonderen komplexchemischen Eigenschaften organischer Liganden mit naturrelevanten Bindungsfunktionen sowie vergleichende Studien am Bioliganden Schwammchitin gegenüber ausgewählten Actinid- und Lanthanidelementen ein innovativer Beitrag zur Koordinationschemie der f-Elemente geleistet.

Das Projekt zielt auf eine wesentliche Erweiterung der Kenntnisse zur Koordinationschemie ausgewählter Actinidelemente als Funktion von Oxidationszustand, Ionenladung, und -radius in komplexen wässrigen Systemen unter umweltrelevanten Bedingungen ab. Es werden umfassende Aussagen zur Speziation dieser Elemente sowie mögliche Verteilungs- und Transportmechanismen unter dem Einfluss ausgewählter Komplexbildner mit naturrelevanten Bindungsfunktionen gewonnen, wodurch deren Einfluss auf Bindungsstärke, Transportphänomene und Struktur besser beschrieben wird.

Der mit den Forschungsaktivitäten einhergehende allgemeine Zugewinn an Erkenntnissen zur Actinidchemie wird weitreichende Konsequenzen für die Interpretation spezifischer Wechselwirkungsprozesse dieser Ionen bei ihrer Lagerung, gegebenenfalls nach unkontrollierter Freisetzung bei Störfällen sowie notwendiger Dekontamination belasteter Bereiche in der Umgebung aber auch bei der Abtrennung der hochradioaktiven minoren Actinidionen aus radioaktiven Abfällen haben.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Synthese der Liganden
- AP2: Radionuklide ausgewählter Lanthanide
- AP3: Komplexbildungsstudien
- AP4: Adsorptions- und Desorptionsuntersuchungen
- AP5: Zusammenfassung und Bewertung

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Zur Sicherung des akademischen Nachwuchses und des Kompetenzerhalts sind Gelder für die Anstellung von wissenschaftlichen Hilfskräften im Projekt beantragt. Im Berichtszeitraum wurde eine weitere Studentin (Frau Luisa Köhler), die am Ende Ihres Studiums steht, für Arbeiten zur Koordinationschemie der f-Elemente angestellt. Herr Bodo Felsner hat seine Studienarbeit erfolgreich abgeschlossen und fertigt derzeit im Rahmen des Projekts seine Masterarbeit an. Frau Ilka Vinçon hat ihre Masterarbeit erfolgreich abgeschlossen und wird nach einem kurzen Industriepraktikum auch ihre Doktorarbeit in einem verwandten Thema im Hause anfertigen. Ein Doktorand (Herr Thomas Radoske) hat nach Ende der dreimonatigen Elternzeit seine Arbeit wieder aufgenommen. Der beantragte Postdoc (Herr Dr. Lotfollah Karimzadeh) hat mit Beginn des Jahres seine Arbeiten zum Reaktiven Transport begonnen. Die geplanten Dienstreisen zur ISNSC (Dresden – fünf Vorträge, ein Poster) finden wie geplant Anfang Juli statt. Für die Dienstreisen zur Plutonium Futures 2018 (San Diego, USA) und zur Goldschmidt 2018 (Boston, USA) wurden von den Kollegen Vorträge eingereicht.

- AP1: Die Serie der Schiffischen Basen wird durch Modifikation der Aromaten erweitert. Zusätzliche Hydroxylgruppen am Aromaten erschweren die Komplexierung. Das Einführen von Fluor am Aromaten ist dagegen synthetisch einfach und ermöglicht stabile Komplexierung. Die synthetischen Arbeiten wurden größtenteils im Haus durchgeführt. Die Vorstufen der Carbene wurden von externen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.
- AP2: Arbeiten zu AP2 sind erst ab Ende 2018 geplant.
- AP3: Die Reihe der Schiffischen Basen mit fluorierten Aromaten ergab stabile Komplexe mit Th(IV), U(IV) und Np(IV). Zudem wurden erste Arbeiten zur Koordinationschemie der Carbene begonnen (Th(IV), U(IV)). Die Serien der Amidinate sind vervollständigt worden (Th(IV), U(IV), Np(IV) und zum Vergleich Zr(IV), Hf(IV) und Ce(IV)). Eine Publikation ist in Vorbereitung. In Zusammenarbeit mit dem AK Weigand (TUD) wurden weitere Komplexe der Pyrazolon-Reihe (U(IV), Np(IV)) präpariert und mit IR und NMR Spektroskopie charakterisiert. Laserspektroskopische Untersuchungen an An(III)- und Ln(III)-Komplexen zur Identifikation der Bindungsstellen an Chitin und Chitinosan wurden gemeinsam mit dem AK Brunner (TUD) fortgeführt.
- AP4: Der Einfluss des Dekontaminationsmittels DTPA auf das Adsorptionsverhalten von Eu(III) wurde für reinen und für natürlichen Quarzsand im pH-Bereich von 3 bis 9 untersucht und durch ein Oberflächenkomplexierungsmodell adäquat beschrieben. In neutralem Milieu wird die Adsorption durch Komplexbildung stark erniedrigt (bei gleichmolarem Verhältnis um 40 % an reinem und um 98 % an natürlichem Quarzsand).
- AP5: Es entstehen derzeit Publikation zu den Amidinat-Systemen und den Schiffischen Basen. Sowohl in den Kooperationsarbeiten zu den phosphorhaltigen Ligandensystemen (mit AK Weigand (TUD)), als auch den Komplexierungsstudien mit Chitin und Chitinosan (mit AK Brunner (TUD)) werden peer-reviewed Publikationen angefertigt. Auf der Radchem 2018 in Marienbad, Tschechische Republik wurden die Arbeiten in zwei Vorträgen präsentiert. Mit insgesamt fünf Vorträgen (davon einer eingeladen) und einem Poster werden die Ergebnisse auf der ISNSC 2018 in Dresden vorgestellt.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Die Reihe der Schiffischen Basen wird durch weitere elektronenziehende und –schiebende Liganden modifiziert, um die Elektronik der aromatischen Ringe und damit der Donoratome zu beeinflussen. Weitere N-heterocyclische Carbene werden durch Modifikation am Stickstoff dargestellt. Erkenntnisse aus den Komplexierungsversuchen (AP3) fließen laufend in die Synthese neuer Ligandensysteme ein. Das Design der Liganden wird zudem maßgeblich durch begleitende quantenchemische Arbeiten im Haus unterstützt.
- AP3: Die Arbeiten zur Komplexierung von Amidinaten und Schiffischen Basen mit Th(IV), U(IV) und Np(IV) werden weitergeführt und die erhaltenen Ergebnisse auf die Komplexierung von Pu(IV) übertragen. Arbeiten zur Komplexierung von dreiwertigen An(III) und Ln(III) an Biosilikaten (mit AK Brunner (TUD)) mittels TRLFS werden fortgesetzt. Zudem werden Arbeiten zur Charakterisierung von Calix[4]aren-Komplexen mittels NMR (mit AK Kersting (Uni Leipzig)) aufgenommen.
- AP4: Die Mobilität von Eu(III) in An- und Abwesenheit von DTPA soll in Säulenversuchen mit Quarzsand pH-Wert-abhängig unter Verwendung von  $^{152}\text{Eu}$  als Radiotracer untersucht werden. Dabei ist die Anwendbarkeit des erstellten Oberflächenkomplexierungsmodells unter dynamischen Fließbedingungen zu prüfen. Hydrodynamische Parameter werden mittels  $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O als konservativem Tracer bestimmt.
- AP5: Die Publikationen zu den Ergebnissen von Serien tetravalenter Actinid-Komplexe mit Amidinaten und Schiffischen Basen werden derzeit geschrieben. Die Kooperationsarbeiten mit der TUD (AK Weigand und AK Brunner) sollen ebenso in peer-reviewed Journalen publiziert werden.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Publikationen:

Martin, N. P.; März, J.; Feuchter, H.; Duval, S.; Roussel, P.; Henry, N.; Petricek, V.; Ikeda-Ohno, A.; Loiseau, T.; Volkringer, C.: Synthesis and structural characterization of the first neptunium based metal-organic frameworks incorporating {Np<sub>6</sub>O<sub>8</sub>} hexanuclear cluster, *Chemical Communications*, 2018, 54 (51), 6979-6982.

Bauer, A.; Jäschke, A.; Schöne, S.; Barthen, R.; März, J.; Schmeide, K.; Patzschke, M.; Kersting, B.; Fahmy, K.; Oertel, J.; Brendler, V.; Stumpf, T.: Uranium(VI) complexes with a calix[4]arene-based 8-hydroxyquinoline ligand: Thermodynamic and structural characterization based on calorimetry, spectroscopy, and liquid-liquid extraction, *ChemistryOpen*, 2018, 7 (6), 467-474.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität Leipzig, Ritterstr. 26, 04109 Leipzig		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 046C
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.11.2016 bis 31.10.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 489.065,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Kersting	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Hauptziel des Projektes ist die Erweiterung des Kenntnisstandes über die Komplexbildung von Lanthanoid- sowie Actinoiden gegenüber Chelatbildnern mit naturrelevanten Bindungsmustern. Hierbei soll besonders der Einfluss des Oxidationszustandes, der Ionenladung sowie des Ionenradius des *f*-Elements auf die Komplexbildung untersucht werden. Zur Einordnung der Ergebnisse ist ein Vergleich zwischen den Lanthanoid- und Actinoidspezies unerlässlich, um Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede in den Wechselwirkungen sowie Bindungsmustern verifizieren zu können.

Dazu sollen im Rahmen des Projekts neue, ionenselektive Liganden synthetisiert werden. Hierbei handelt es sich um calixarenbasierte Liganden, welche mit naturnahen Bindungsfunktionen substituiert werden sollen, um *f*-Elemente selektiv zu binden. Chitosan soll dabei als Vorbild dienen. Dabei kann durch die Variation der Anzahl sowie Position der Substituenten am Grundgerüst die Bindungselektivität, Löslichkeit oder das Extraktionsverhalten eingestellt werden. Die Synthese der Komplexe soll in Anlehnung an bereits literaturbekannte Verfahren zur Darstellung ähnlicher Verbindungen erfolgen. Zur ausreichenden Charakterisierung dieser kann ein breites Spektrum moderner Analysemethoden genutzt werden. Dazu zählen unter anderem NMR-Spektroskopie, IR-Spektroskopie, Raman-Spektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie, ESI-MS, pH-Potenzimetrie, Laserfluoreszenz, isotherme Titrationskalorimetrie und Spektroelektrochemie.

Ein anderer wichtiger Teil des Projektes besteht in der Aufklärung der Struktur der eingesetzten Komplexe sowie deren *f*-Elementkomplexen in Lösung und im Feststoff. Um Aussagen über die elektronischen Begebenheiten, die Funktion der Strukturelemente sowie die strukturellen Besonderheiten der Zielverbindungen treffen zu können, kann auf Methoden wie Röntgenbeugung oder die EXAFS-Spektroskopie zurückgegriffen werden.

Dieses Projekt wird in Zusammenarbeit mit dem Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V. durchgeführt (Prof. Dr. T. Stumpf). Hinzukommend ist eine Zusammenarbeit mit den Abteilungen für Chemie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden vereinbart (Prof. Dr. J. Weigand sowie Prof. Dr. E. Brunner).

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Vorhaben ist in insgesamt 5 Arbeitspakete unterteilt. Eine detaillierte Beschreibung der Arbeitspakete ist im Projektantrag tabelliert. Unsere Arbeitsgruppe ist in die Arbeitspakete 1, 3 und 5 involviert. Mit Beginn des Projektes zum 01. November 2016 wurden die Arbeiten zu den Arbeitspaketen aufgenommen (Mitarbeiter: M.Sc. Peter Hahn). Ab dem 01.01.2017 arbeiten auch M.Sc. Anne Mehnert und M.Sc. Tony Zielke an den skizzierten Experimenten.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Die Synthese von Thiacalix[4]arenliganden mit natürlichen Bindungsfunktionen zur Bindung von *f*-Elementen ist gelungen. Durch Verkürzung des Spacers konnten disubstituierte Liganden mit phosphorylierten Substituenten erhalten werden, welche positive Ergebnisse in Komplexierungsversuchen gegenüber trivalenten Lanthanoidionen zeigen.

Die Anbindung von Zuckern, ähnlich den Chitosangrundbausteinen, an das Calix[4]arengerüst und die damit verbundene Komplexierung von *f*-Elementen konnte trotz umfassender Versuche nicht bewerkstelligt werden. Weitere Versuche werden folgen.

Die Komplexbildungsexperimente bereits synthetisierter Liganden sind sowohl im Festkörper als auch in Lösung fortgeschritten.

Die Benutzung der ITC, welche über das FENABIUM-Projekt angeschafft wurde, wird weiterhin verfeinert. Hinzukommend arbeitete sich Anne Mehnert in das Programm HypCal ein, welches zur erweiterten Auswertung von ITC-Messungen dient.

Anne Mehnert und Peter Hahn arbeiteten an der Veröffentlichung eines Review-Artikels mit den weiteren Teilnehmern des FENABIUM-Verbundprojekts (AK Weigand, AK Stumpf, AK Brunner). Hierzu wurden ausführliche Literaturrecherchen durchgeführt, gefolgt vom Schreiben des Teilartikels. Die Veröffentlichung des Artikels erfolgt dieses Jahr.

Zur Präsentation der bisherigen Forschungsergebnisse in Form eines Posters besuchten alle Mitarbeiter die ISMEC 2018 (International Symposium on Metal Complexes) in Florenz (Italien).

Des Weiteren erfolgte die Teilnahme von Anne Mehnert und Peter Hahn am Koordinationschemietreffen 2018 in Heidelberg, wobei ein Vortrag gehalten wurde (Hahn).

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Ziel der nachfolgenden Monate ist es weitere Komplexbildungsexperimente mit den bereits synthetisierten Liganden anzustellen. Hierbei soll der Fokus auch in Richtung der Actinide geschwenkt werden. Hinzukommend sollen bereits erhaltene Ergebnisse in Form einer Publikation beschrieben werden.

Die Synthese von Thiacalixarenliganden wird weiter vorangetrieben.

Darüber hinaus sollen Komplexbildungskonstanten und andere thermodynamische Reaktionsparameter mittels der ITC ermittelt werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Vorträge:

Hahn, P.: Lanthanoid-Komplexe von Hybrid-Schiff-Base/Calix[4]aren-Liganden: Synthese, Charakterisierung und Komplexierungseigenschaften, Konferenz 14. Koordinationschemietreffen, Heidelberg (Deutschland), 11.-13.03.2018

Poster:

Mehnert, A.: Synthesis and Complexation Studies of Novel Disubstituted Calix[4]arenes as Rare Earth Metal Receptors, International Symposium on Metal Complexes, Florenz (Italien), 03.-07.06.2018

Hahn, P.: Lanthanide Complexes of Hybrid Schiffbase/Calix[4]arene Ligands: Synthesis, Structures and Properties, International Symposium on Metal Complexes, Florenz (Italien), 03.-07.06.2018

Zielke, T.: Thiacalix[4]arenes with Dangling Phosphorylated Substituents at the *lower rim* for *f*-Element Complexation, International Symposium on Metal Complexes, Florenz (Italien), 03.-07.06.2018

Bis heute sind keine zitierfähigen Publikationen verfasst worden.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Leibniz Universität Hannover, Welfengarten 1, 30167 Hannover		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 051A
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2017 bis 31.08.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 811.518,00 EUR		<b>Projektleiter:</b> Dr. Riebe

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Für Langzeitsicherheitsnachweise potentieller Endlager gehen die gängigen radioökologischen Modelle in Störfallszenarien von einem Radionuklideintrag in die Biosphäre über den Wasserpfad aus. Neben dem Weg über Niederschlag und Bewässerung ist besonders der Eintrag über das oberflächennahe Grundwasser in den Boden interessant. Ziel ist ein tieferes Verständnis der komplexen Mechanismen des Radionuklidtransports aus der Grundwasserzone über den Boden in die Pflanzen unter Einbeziehung klimatischer Veränderungen, das zu einer verbesserten Risikoabschätzungen für die Exposition der Bevölkerung über lange Zeiträume führen soll. Einen wesentlichen Fortschritt bildet hierbei die Aufklärung der Aufnahmemechanismen der Radionuklide in Nutzpflanzen auf molekularer Ebene, ein Konzept, das eine über bisherige Transferfaktoren weit hinausgehende Aussagekraft erlaubt.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Bodencharakterisierung, Tracerherstellung, Einfluss des Bodens auf Radionuklidspeziation
- AP2: Säulenversuche; Radioanalytik
- AP3: Pflanzenanzucht, Bestimmung von Transferfaktoren für verschiedene Radionuklide
- AP4: Klonierung von Transportern, Expression und Transportmessung in Oozyten, Analyse der Wirkung von Wurzelexsudaten
- AP5: Analyse und Auswertung

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Alle verwendeten RefeSol-Chargen wurden einer Charakterisierung mit Hinsicht auf pH, Corg, Korngrößenverteilung, Kationenaustauschkapazität und oxalat- und dithionitlöslichen Oxiden (Fe, Al, Mn) unterzogen
- AP3: Von den für die Bestimmung von Transferfaktoren angelegten Gefäßversuchen konnten Proben von Karotten, Kartoffeln und Erbsen in RefeSol-01A (Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (IME)) gewonnen werden. Die Pflanzen wurden in drei Kompartimente unterteilt (Wurzel, Blatt, Frucht bzw. essbarer Anteil) und deren Aktivität im Vergleich zum Boden bestimmt. Für die mit I-125 mar-

kierten Karotten in RefeSol-01A wurden Transferfaktoren von 2, 16 und 18 für essbaren Anteil (Pfahlwurzel), Blatt und Wurzel ermittelt. Im Vergleich der essbaren Anteile aller drei Pflanzenarten fällt auf, dass die Aktivitätskonzentration in den Karotten am höchsten ist (etwa 8 mal so hoch wie in den Kartoffeln und ca. 75 mal so hoch wie in den Erbsen). Die Untersuchungen der Pflanzenaufnahme für das Radionuklid Tc-99 wurden mit einer Pertechnetat-Lösung ( $\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4^-$ ) durchgeführt. Es zeigt sich bisher, dass die Aufnahme von Tc-99 am stärksten in die Blätter erfolgt, gefolgt von den Wurzeln und essbaren Pflanzenteilen. Für eine genaue Auswertung der Transferfaktoren steht die Untersuchung der Bodenproben noch aus.

Die vorläufigen Ergebnisse zur Aufnahme von Pu-238 und Am-243 in die Pflanze zeigen bereits Unterschiede von Größenordnungen in der massenbezogenen Aktivität der Kompartimente. So weisen die Wurzeln die höchsten massenbezogenen Aktivitäten auf, gefolgt von Blättern und essbaren Bestandteilen. Für die Berechnung der Transferfaktoren stehen für beide Nuklide die Messungen der Bodenproben noch aus.

AP4: Der Ionen-Transport des *AtGLR3.7* zeigte einen pH unabhängigen, unspezifischen Kationen-Transport. Zur Charakterisierung der potentiellen Aufnahme und Wechselwirkung mit Radionukliden, z. B. Cm(III) wurden erste Experimente in Zusammenarbeit mit dem Institut für Ressourcenökologie (IRE) am HZDR begonnen (s. Bericht IRE). *AtPHT1.4* wurde in den Oozyten-Expressionsvektor gebracht und mit der Klonierung von *AtNRT1.1* wurde begonnen. Im Rahmen eines Praktikums wurden die Klonierungen von Studenten durchgeführt und soll von diesen während einer Bachelorarbeit fortgeführt werden.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- Bestimmung der Aktivitätskonzentrationen der Böden aus den Gefäßversuchen und Berechnung der noch ausstehenden Transferfaktoren
- Fortsetzung der Gefäßversuche (Karotte, Kartoffel, Erbse, Weizen) mit weiteren Referenzböden
- Säulenversuche mit Referenzböden in Vorbereitung der Lysimeterversuche
- Elektrophysiologische Charakterisierung von *AtPHT1.4*
- Klonierung von *AtNRT1.1*, *AtCCC1* sowie *AtIRT1*

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Poster beim 'Cores Symposium on Radiation in the Environment – Scientific Achievements and Challenges for the Society', 16. - 17. April 2018, Helsinki

Poster bei NuWaMa Summer School 'Deep Geological Repository – the fate of radionuclides', 4. - 8. Juni, HZDR (Dresden) / ÚJV Rez (Prag)

Beitrag in STUK-A261, 'Cores Symposium on Radiation in the Environment – Scientific Achievements and Challenges for the Society', Juli 2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V., Bautzner Landstr. 400, 01328 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 051B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2017 bis 31.08.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 520.337,00 EUR		<b>Projektleiter:</b> Dr. Sachs

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Für Langzeitsicherheitsnachweise potentieller Endlager gehen die gängigen radioökologischen Modelle in Störfallszenarien von einem Radionuklideintrag in die Biosphäre über den Wasserpfad aus. Neben dem Weg über Niederschlag und Bewässerung ist besonders der Eintrag über das oberflächennahe Grundwasser in den Boden interessant. Ziel ist ein tieferes Verständnis der komplexen Mechanismen des Radionuklidtransports aus der Grundwasserzone über den Boden in die Pflanzen unter Einbeziehung klimatischer Veränderungen, das zu verbesserten Risikoabschätzungen für die Exposition der Bevölkerung über lange Zeiträume führen soll. Einen wesentlichen Fortschritt bildet hierbei die Aufklärung der Aufnahmemechanismen der Radionuklide in Nutzpflanzen auf molekularer Ebene, ein Konzept, das eine über bisherige Transferfaktoren weit hinausgehende Aussagekraft erlaubt.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Bestimmung von Wurzelexsudaten, pflanzlichen Zellkulturexsudaten und Untersuchung von deren Wechselwirkung mit Actiniden
- AP2: Charakterisierung der reduzierenden Wirkung von Plasmamembran-Vesikeln bzw. des Wurzelsystems von Pflanzen
- AP3: Nachweis des metallreduzierenden Proteins an der Plasmamembran von Wurzeln
- AP4: Mikroskopischer Nachweis der Actinid- bzw. Eisen-Reduktion an der Plasmamembran von Wurzeln

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Die Untersuchungen zur Konzentrations- und zeitabhängigen Wechselwirkung von U(VI) und Eu(III) als Analogon für dreiwertige Actinide mit Brassica napus-Zellen (Raps) in Suspensionszellkultur wurden fortgesetzt. U(VI) und Eu(III) zeigen ein zeit- und konzentrationsabhängiges Bioassoziationsverhalten mit Brassica napus-Zellen, wobei die Vitalität der Zellen bei den gewählten experimentellen Bedingungen nur wenig von der Gegenwart der Schwermetalle beeinflusst wird. In Gegenwart von 200 µM U(VI) wurde nach anfänglicher Bioassoziation von U(VI) an/in den Zellen eine Wiederfreisetzung von U(VI) in die Lösung beobachtet, die vermutlich auf eine Reaktion der Zellen auf den Schwermetallstress zurückzuführen ist. Mittels zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie bei tiefen Temperaturen (cryo-TRLFS) wurde dieser Prozess untersucht. Nach Faktoranalyse der Spektren konnten drei verschiedene U(VI)-Spezies in den Zellkulturüberständen reproduzierbar detektiert werden, deren Anteile in Lösung sich zeitlich verändern. Die Ergebnisse geben einen ersten Hinweis auf die

Freisetzung von Zellmetaboliten, die zur Wiederfreisetzung von U(VI) in die Lösung führen. Die Anreicherung, Fraktionierung und Untersuchung freigesetzter Zellmetabolite aus Zellkulturüberständen mittels Festphasenextraktion, HPLC und Massenspektrometrie haben zur Identifizierung erster Verbindungen geführt, die als Metabolite in Frage kommen. Cryo-TRLFS-Messungen zur U(VI)-Komplexierung mit potentiellen Pflanzenzellmetaboliten wurden durchgeführt.

- AP2: Die Arbeiten zur Identifizierung eines möglichen metall-reduzierenden Membranproteins, das an der Uranaufnahme in Pflanzenzellen beteiligt ist, wurden begonnen. Erste Untersuchungen zur Beeinflussung essentieller Nährstoffelemente (Mg, Mn, Fe, P, Ca, K) von *Brassica napus*-Zellen in Gegenwart von U(VI) wurden durchgeführt. Dazu wurden *Brassica napus*-Zellen mit verschiedenen U(VI)-Konzentrationen exponiert und die Verteilung der Spurenelemente in den Zellen in regelmäßigen Zeitintervallen über einen Zeitraum von 7 Tagen mittels ICP-MS bestimmt. Die Experimente erfolgten in Gegenwart ausreichender Mengen an Eisen sowie unter Eisenmangel im Nährmedium. Erste Ergebnisse zeigen einen höheren Urangehalt in den Zellen, wenn diese unter Eisenmangelbedingungen gewachsen sind. Dies weist auf eine mögliche Beteiligung des Eisentransportsystems an der Aufnahme von Uran in die Zellen hin. Zur Bestimmung des Umfangs der Fe(III)-Reduktion durch die Zellen bei verschiedenen experimentellen Bedingungen, wird die Ferrozin-Methode zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Fe(II)/Fe(III)-Ionen verbessert.

An der Etablierung einer Kallus- und Suspensionszellkultur von Karottenzellen (*Daucus carota*) als Modellsystem für Nutzpflanzen wird weitergearbeitet.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Biophysik der Universität Hannover wurden erste Untersuchungen zur Wechselwirkung von Oozyten mit Cm(III) mittels TRLFS durchgeführt. Ziel ist die Charakterisierung der Cm(III)-Spezies im Nährmedium sowie nach Wechselwirkung mit den Zellen zur Charakterisierung des Metalltransports in die Zellen.

Organisation und Durchführung des Treffens des Verbundprojekts „TRANS-LARA“ am 26./27.04.2018 in Dresden-Rossendorf.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Fortsetzung der Arbeiten zur Identifizierung von Pflanzenzellmetaboliten nach Exposition der Zellen mit U(VI) und Eu(III) sowie Weiterführung der cryo-TRLFS-Messungen zur U(VI)-Komplexierung mit relevanten Bioliganden. Diese dienen der Interpretation der gemessenen Spektren mit Pflanzenzellen und Zellkulturnährmedien nach Exposition der Zellen mit U(VI).
- AP2: Die Untersuchungen zum Einfluss von U(VI) auf die Verteilung ausgewählter Mikro- und Makroelemente in den Zellen werden fortgesetzt. Ziel ist es, ein potentielles Transportsystem für Uran in die Zellen zu identifizieren. Daneben wird das Expressionslevel der entsprechenden Gene unter verschiedenen Bedingungen verfolgt. Diese Untersuchungen werden zukünftig mit *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2 (BY-2) Zellen durchgeführt, die zu den stabilsten und homogensten Pflanzenzelllinien zählen und als Modellsystem höherer Pflanzen weitverbreitet eingesetzt werden.

Teilnahme am 11th International Biometals Symposium in Ottawa (Kanada; 15.-19.07.2018) mit einem Vortrag und Poster.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fürstengraben 1, 07743 Jena		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 051C
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2017 bis 31.08.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 443.493,00 EUR		<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Schäfer

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Für Langzeitsicherheitsnachweise potentieller Endlager gehen die gängigen radioökologischen Modelle in Störfallszenarien von einem Radionuklideintrag in die Biosphäre über den Wasserpfad aus. Neben dem Weg über Niederschlag und Bewässerung ist besonders der Eintrag über das oberflächennahe Grundwasser in den Boden interessant. Ziel ist ein tieferes Verständnis der komplexen Mechanismen des Radionuklidtransports aus der Grundwasserzone über den Boden in die Pflanzen unter Einbeziehung klimatischer Veränderungen, das zu einer verbesserten Risikoabschätzungen für die Exposition der Bevölkerung über lange Zeiträume führen soll. Einen wesentlichen Fortschritt bildet hierbei die Aufklärung der Aufnahmemechanismen der Radionuklide in der ungesättigten Zone und in Nutzpflanzen auf molekularer Ebene, ein Konzept, das eine über bisherige Transferfaktoren weit hinausgehende Aussagekraft erlaubt.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Bodenentwicklung unter dem Einfluss langfristiger klimatischer Veränderungen
- AP1.J.2a: Definition der vier Referenzbodentypen zusammen mit Öl, Beschaffung und Charakterisierung der Ausgangsmaterialien
- AP2: Modellierung von Speziation, Sorption & Migration von RN für repräsentativ bewirtschaftete Böden
- AP2.4.1a: Aufbau der bodenspez. Strömungs- und Transportmodelle in IcP
- AP2.4.2a: Berechnung von Langzeitreihen für Bodenfeuchte und RN-Konzentrationen für (diskrete) Referenzklimata in icP mit den Parametern von UB-IUP
- AP2.5.2a: Einbau des Kolloidtransports (mobile Oberflächenspezies) (PHREEQC)
- AP3: Redoxverhalten und Speziation von RN im Grundwasser und in verschiedenen repräsentativen landwirtschaftlich genutzten Böden
- AP3.2.1: Planung & Aufbau Laborversuche, Befüllen der Säulen, Herstellen der Modellwässer, Variation der Kontaktzeiten mit organischen/anorganischen Kolloiden
- AP3.3.1: Experimente mit Modellwasser
- AP3.4.1: Säulenexperimente, Probenahme Wasser und Boden, chemische Trennung und Speziation der Nuklide
- AP3.4.2a: Optimierung der Messmethode und Quantifizierung (SF-ICP-MS, AMS)
- AP3.5: Auswertung der Ergebnisse, Interpretation und Aufbereitung der Daten für AP2

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1: *Status:* Der Vergleich dominanter IST- Bodentypen potenzieller Standortregionen (BGR- Studien) aus GIS-Analyse (FSU) werden in einer Masterarbeit (Scheuerer, 2018) zusammengefasst und mit Analysen des ÖI verglichen. Referenzbodentyp 03-G wurde geliefert und musste, wie Referenzbodentyp 01-A, aufgrund des Bedarfs durch weitere Experimente nachbestellt werden. Vorhandene Chargen der Böden wurden homogenisiert. Aus der Zusammenarbeit von FSU, ÖI und LUH-IRS wurden zwei weitere Referenzbodentypen (SOLL-Böden)

aus dem RefeSol System (Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie; IME) ausgewählt. Dies sind eine Pseudovergleyte Parabraunerde 02-A und ein Gley-Podsol 04-A. Sedimentologie, Mineralogie sowie sequenzielle Extraktionen (Fe, Al) der vier Böden werden durchgeführt. Bodenphysikalische Parameter (kf, pF, Korngröße) werden in Kooperation mit der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL) bestimmt.

AP2: *Status*: Beginn der Erstellung eines Modells zu Säulen- Rezirkulationsexperimenten unter gesättigten Bedingungen. Der Transport wird zunächst eindimensional (1D) behandelt und wird mit einem eigenen finiten Differenzen Skript in Matlab simuliert. Die Chemie wird mit dem PhreeqcRM Modul gelöst. Die Bodenchemie wird vereinfacht durch Kationenaustausch und Oberflächenkomplexierung (SCM) an drei reaktive Komponenten simuliert: a) Tonminerale (Illit), b) schwach kristalline Eisenoxide, und c) Huminstoffe. Teil a) und b) liegen vor; Teil c) befindet sich in Entwicklung.

AP3: *Status*: Eine Klimakammer für die geplanten Laborlysimeter- Experimente wurde technisch überprüft und steht zur Verfügung; als Start ist das 2. Hbj. 2018 anvisiert. Zur Sicherstellung gleicher Randbedingungen, soll das Befüllen mit den ausgewählten RefeSols in Kooperation mit LUH-IRS stattfinden. Tests zur repräsentativen In-situ-Beprobung von Lysimeter- Porenwasser und natürlichen Nanopartikeln mit Borosilikat- Saugkerzen wurden im Rahmen von zwei Bachelorarbeiten (Förderer, 2018 & Seyfarth, 2018) durchgeführt und zeigten einen signifikanten Einfluss der Saugkerzen auf die Quantifizierung des mobilen Nanopartikelanteils sowie selektive Sorption speziell von Kationen. In Batch-Experimenten konnte innerhalb von 64 Tagen kein Gleichgewichts- Porenwasser in den beiden gewählten IST-Böden (Scheuerer, 2018; Reiff, 2018) bestimmt werden und es wurde auf Umlauf- Säulenexperimente umgestellt, die auch zur Selen sorption im Vergleich zu Batchexperimenten genutzt werden.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP1: Schwerpunkt ist die Fertigstellung der mineralogischen, geochemischen und Nanopartikel-Charakterisierung der vier Referenzböden. Eine Masterarbeit im Rahmen der Methodenentwicklung zur Differenzierung von anorganischen/organischen Nanopartikeln und Biokolloiden läuft bereits.

AP2: Die Kopplung Chemie/Transport ist realisiert. Validierung des Modells durch Laborexperimente und ggf. Anpassung. Einbindung der Datenbank ThermoChimie. SCM der drei reaktiven Bodenkomponenten und Entwicklung der ungesättigten Strömungs- und Transportmodellierung in iCP, OpenGeoSys oder eigenen Skripten für die geplanten Lysimeter- Experimente wird geplant.

AP3: Alternativen zu den Borosilikat- Saugkerzen für die Lysimeteraufbauten werden geprüft. Die Arbeiten zur Selenit- Sorption (Batchexperimente) im RefeSol 01-A & 03-G (Scheuerer, 2018; Reiff, 2018) und der Vergleich zu Umlaufsäulenversuchen zur Bestimmung von Selen- Sorptionskinetiken wird fertiggestellt (Pauer, 2018; Reiff, 2018) sowie der konservative Tracer Bromid hinsichtlich seiner Reaktivität überprüft (Pauer, 2018). Rezirkulations- Säulenexperimente mit verschiedenen Säulentypen, RefeSol-Böden und Modellwasser sowie deren Modellierung werden weitergeführt. Untersuchung der Kolloidbildung und des Transportes u. a. mit der neu im Rahmen des Projekts beschaffenen NTA mit Fluoreszenzfilteroption (Fluo-NTA). Der Start der Lysimeterexperimente ist vorgesehen; Bestimmung der physikochemischen und bodenphysikalischen Parameter aller RefeSols vor Beginn der Versuche.

Planung von Experimenten zur Validierung konzeptioneller Modellansätze (1D Transport, Kolloidanlagerung) z. B. mit Positronen-Emissions-Tomographie (GePET, in Kooperation HZDR) oder AFM.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Förderer, A.D. (2018): The sorption behavior of mini-glass suction cups in regard to dissolved solution component. Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Pauer, V. (2018): Mechanismen der Selen sorption an einem natürlichen Bodensubstrat. Projektmodulbericht, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Reiff, T. (2018): Untersuchung von RefeSol 03-G in Batch-Experimenten und zukünftige Entwicklung der Braunerden Deutschlands in zwei Klimaszenarien. Projektmodulbericht, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Scheuerer, F. (2018): Verschneidung von Böden und Geologie auf untersuchungswürdigen Gesteinsformationen für die Endlagerung von hochradioaktiven Abfällen. Projektmodulbericht, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Seyfarth, R. (2018): Das Sorptionsverhalten von Miniglassaugkerzen in Hinblick auf die Kolloidfraktion. Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität Bremen, Bibliothekstr. 1, 28359 Bremen		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 051D
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2017 bis 31.08.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 256.465,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Fischer	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Für Langzeitsicherheitsnachweise potentieller Endlager gehen die gängigen radioökologischen Modelle in Störfallszenarien von einem Radionuklideintrag in die Biosphäre über den Wasserpfad aus. Neben dem Weg über Niederschlag und Bewässerung ist besonders der Eintrag über das oberflächennahe Grundwasser in den Boden interessant. Ziel ist ein tieferes Verständnis der komplexen Mechanismen des Radionuklidtransports aus der Grundwasserzone über den Boden in die Pflanzen unter Einbeziehung klimatischer Veränderungen, das zu einer verbesserten Risikoabschätzung für die Exposition der Bevölkerung über lange Zeiträume führen soll. Einen wesentlichen Fortschritt bildet hierbei die Aufklärung der Aufnahmemechanismen der Radionuklide in Nutzpflanzen auf molekularer Ebene, ein Konzept, das eine über bisherige Transferfaktoren weit hinausgehende Aussagekraft erlaubt.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Am Institut für Umweltphysik (IUP) der Universität Bremen wurde mit Hilfe des geochemischen Speziationscodes PHREEQC ein Modell entwickelt, das mehrere sorbierende Komponenten enthält und auch die Komplexierung von Kationen an gelöste und ortsfeste organische Substanz berücksichtigt. Das Modell konnte für Cs, U, und Ni erfolgreich validiert werden.

Nach einer Literaturstudie (AP2.1.1) soll das Modell soweit erweitert werden, dass es die Sorption und Speziation von Am, Tc, Pu, I, und Se erfassen kann (AP2.2.1). Dabei sollen im Falle von I und Se auch die stabilen Isotope als Konkurrenzspezies berücksichtigt werden. Zunächst sollen die für die betrachteten Böden wichtigsten, in der Literatur schon beschriebenen Prozesse implementiert werden, für die auch schon die für die Modellierung wichtigen thermodynamischen Konstanten vorliegen. Auch hier soll das Modell – soweit möglich - anhand von Literaturdaten validiert werden (AP2.3.1). Die Modellierung der hydrologischen Prozesse und Stofftransport erfolgt in AP2.4.1b durch ÖI und in AP2.4.2 durch FSU-AnGeo. Danach soll für mindestens einen (Referenz-)Boden die Abhängigkeit der Verteilungskoeffizienten bzw. der für die Pflanzenaufnahme relevanten Spezies in der Bodenlösung von verschiedenen einzelnen Bodenparametern wie pH und Gehalt an organischen Substanzen bestimmt werden (AP2.4.1). Dabei soll auch der Einfluss von landwirtschaftlichen Maßnahmen (Düngung) untersucht werden.

Im nächsten Schritt soll das Modell auf die gemeinsam mit den Projektpartnern ausgewählten (Referenz-) Böden angewendet und die Ergebnisse mit den experimentellen Studien von LUH-IRS, FSU-AnGeo und HZDR-IRE (Verteilungskoeffizienten und Speziation) verglichen werden (AP2.5.1). Wenn der Vergleich wichtige nicht berücksichtigte Prozesse erkennen lässt und/oder die Studien neue thermodynamische Daten zu Komplexierung und Sorption liefern, können die Einzelmodelle gegebenenfalls verfeinert werden.

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

Es wurde das Modell VII (relevant für Am und Pu sowie Konkurrenzionen) implementiert und zunächst für U anhand von Literaturdaten validiert. Es wurde eine Literaturstudie zu Am, Pu, I, Tc und Se und deren Verhalten im Boden durchgeführt. Weiterhin wurde das Modell derart modularisiert, dass ohne Weiteres zwischen Datenbanken (z. B. Thermochemie und PSI/Nagra) gewechselt werden kann. Es wurden weitere Untermodelle zur Bindung von Am, Pu an Mineraloberflächen implementiert.

Z. Zt. wird ein Modell für die Bindung von Tc an organische Substanz unter anoxischen Bedingungen implementiert und validiert.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Folgende Arbeiten für den nächsten Berichtszeitraum geplant:

Validierung des Sorptionsmodells für Am anhand einer Literaturstudie

Implementation von Sorptionsmodellen für I, Tc und Se

Erste Berechnungen von  $K_d$ -Werten für Referenzböden

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Öko-Institut. Institut für angewandte Ökologie e. V., Merzhauser Str. 173, 79100 Freiburg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 051E</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt E		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2017 bis 31.08.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 338.312,63 EUR		<b>Projektleiter:</b> Dr. Ustohalova

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Für Langzeitsicherheitsnachweise potentieller Endlager gehen die gängigen radioökologischen Modelle in Störfallszenarien von einem Radionuklideintrag in die Biosphäre über den Wasserpfad aus. Neben dem Weg über Niederschlag und Bewässerung ist besonders der Eintrag über das oberflächennahe Grundwasser in den Boden interessant. Ziel ist ein tieferes Verständnis der komplexen Mechanismen des Radionuklidtransports aus der Grundwasserzone über den Boden in die Pflanzen unter Einbeziehung klimatischer Veränderungen, das zu einer verbesserten Risikoabschätzungen für die Exposition der Bevölkerung über lange Zeiträume führen soll. Einen wesentlichen Fortschritt bildet hierbei die Aufklärung der Aufnahme-mechanismen der Radionuklide in Nutzpflanzen auf molekularer Ebene, ein Konzept, das eine über bisherige Transferfaktoren weit hinausgehende Aussagekraft erlaubt.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1.1.1: Auflistung Bodentypen und relevanter Parameter nach World Reference Base For Soil Resources (RWB) und RefeSol
- AP1.1.2b: Definition der vier Referenzbodentypen, mit FSU-AnGeo, dazu Ermittlung von Bodentypen und Grundwasserflurabständen mit ARC-GIS und passenden Bodenkarten.
- AP1.2.1: Abgleich Parameter mit Experimenten und Modellierung, Entscheidung Erweiterung RefeSol-Systematik
- AP1.3.1: Definition von Boden und Klimaszenarien
- AP1.3.2: Ermittlung Pedogenese Ist-Böden/Soll-Böden mit BIOCLIM-Daten
- AP1.4.1: Definition und Festlegung der extrapolierten Soll-Böden für die Experimente
- AP1.5.1: Absprache mit Projektpartnern zum Projektfortschritt, nach Bedarf Anpassungen in der Bodenparametrisierung
- AP2.1.2: Erstellung einer Datenbank mit Parametern zur Bodenhydrologie
- AP2.4.1b: Unterstützung FSU-AnGeo beim Aufbau des bodenspez. Strömungs- und Transportmodelle in IcP (COMSOL Part)
- AP2.5.2b: Berechnung von Langzeitreihen der Biosphere Dose Conversion factors (BDCF) für diskrete Klimazustände (ECOLEGO) ausgehend aus den Ergebnissen FSU-AnGeo
- AP2.5.2a: Bewertung der Ergebnisse, Unsicherheitsanalyse der RN-Konzentrationen und BDCF (ECOLEGO)
- AP4.4: Entwicklung eines verbesserten Kompartimentmodells für den Transfer Boden-Pflanze in ECOLEGO mit Konzepten und gemessenen Parametern des laufenden Projektes (ECOLEGO)

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1.1.2b: Die hydrogeologischen und bodenkundlichen Karten der für die ausgewählten Klimazustände relevanten Regionen (u. a. Regionen der RefeSol Bodenentnahme) mit den Informationen zu Flurabständen und Bodenhorizonten im Großmaßstab werden schrittweise angeschafft, in ArcGIS aufbereitet und ausgewertet. Auswertung erfolgt noch bis Ende 2018.
- AP1.2.1: Für die Experimente wurden Ist/Soll-Böden aus den vorhandenen lieferbaren RefeSol-Bodentypen ausgewählt (AP1.1.2b und 1.4.1), es ist keine Erweiterung der RefeSol-Systematik vorgesehen. Gegenwärtig werden die in der RefeSol-Systematik vorgegebenen Bodenparameter der gelieferten Ist-Böden auf die Abweichungen geprüft (FSU-AnGeo/LUH-IRS), welche sich auf den Ablauf der Experimente, u. a. das Pflanzenwachstum, auswirken könnten.
- AP1.3.1: In Fortsetzung erfolgt die verfeinerte Betrachtung der klimatischen Entwicklung der zwei Referenzhauptregionen Nord- und Süddeutschland entlang der zwei ausgewählten Klimaszenarien: „warm“ und „kalt“ bzw. sommertrocken und humid kalt-gemäßigt (Csa-Csb/Dfc-Dfb nach Köppen-Geiger Klassifikation), welche zur Entwicklung der Soll-Böden führen (AP1.4.1). Als die wesentlichen Faktoren fließen neben den Parametern der klimatischen Entwicklung, die Morphologie und die Bewirtschaftung ein.
- AP1.3.2: Die Bodenhorizontentwicklung der Ist/Soll-Böden unter dem Klimaeinfluss wird beschrieben. Eine Datenbasis dazu bildet u. a. die Auswertung in ArcGIS (AP1.1.2b).
- AP1.4.1: Ausgehend von AP1.3.1 wurden in Absprache mit FSU-AnGeo und LUH-IRS zwei Soll-Böden für Experimente festgelegt: 04-A (RefeSol) bzw. Gley-Podzol für die kalte Entwicklung und 02-A (RefeSol) bzw. Pseudogley-Parabraunerde für die warme Entwicklung.
- AP1.5.1: Ein Abstimmungstreffen Öko-Institut/FSU-AnGeo/LUH-IRS zum Aufbau der Experimente und der Parameterwerteerfassung im Hinblick auf die Modellierung findet im Juli 2018 in Jena statt. U. a. sollen die Randbedingungen „Wasserspiegelschwankung und Temperatur“ für die Langzeitexperimente (Lysimeter) gemäß der verfeinerten Klimabetrachtung festgelegt werden.
- AP2.1.2: Der systematisierte Aufbau der Datenbank der Parameter wurde gestartet: diese soll als ein Leitfaden der experimentell untersuchten Werte dienen aber auch die Lücken zeigen. Identifiziert werden die wahrscheinlichsten Werteintervalle der Parameter, der Fokus liegt auf den elementbezogenen Sorptionskoeffizienten ( $K_d$ ). Die Werteintervalle werden bei den Modellberechnungen einer Monte-Carlo-Analyse unterzogen (Modulaufbau in ECOLEGO).
- AP2.4.1b: Die Synergien mit den bis dato entwickelten Modellansätzen des Öko-Instituts und der Modellierungsarbeiten FSU-AnGeo (1D-Transport) sowie die Optionen der Verknüpfung (Datentransfer) mit der Modellierung in ECOLEGO (AP2.5.2b) werden in Jena im Juli erörtert.
- AP2.5.2b: Gegenüber der Planung (fällig in 2019) erfolgte bereits das ECOLEGO-Seminar mit der Fa. Facilia und die Programmierarbeiten zu Transportberechnungen und zur Berechnung der Dose Conversion Factors (BDCF) starteten in Abstimmung mit der Fa. Facilia (Anpassungen im ECOLEGO Code).
- AP4.4: Im Vorfeld werden in Kooperation mit der Fa. Facilia methodische Ansätze geprüft, welche für die Downskalierung auf die Mikroebene für das Kompartimentmodell geeignet wären.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1.1.2b: Fortsetzung und Abschluss der GIS-Analyse.
- AP1.3.1: Fortsetzung und Abschluss in Ausarbeitung der Horizontierung relevanter RefeSol Ist-Böden und Horizontgenese der RefeSol Soll-Böden unter Klimaeinfluss der Referenzregionen.
- AP1.3.2: Bericht/Protokoll mit Erläuterungen zur erfolgten Auswahl der RefeSol Soll-Böden sowie der Arbeiten zur Extrapolation der Klima- und Bodenhorizontentwicklung.
- AP1.5.1: Kontinuierliche Absprache mit Projektpartnern zum Fortschritt, Die Abschätzung des realistischen und der Vorschlag des experimentellen Quellterms werden entsprechend den Anpassungen während des Aufbaus der Experimente vorgenommen.
- AP2.4.1b: Zum Aufbau der Experimente in Kopplung an die bodenspezifischen Strömungs- und Transportmodelle findet Mitte Juli 2018 ein Treffen in Jena (FSU-AnGeo) statt.
- AP2.5.2b und 4.4: Fortsetzung der vorbereitenden Programmierarbeiten in ECOLEGO.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.



## **2.3 Strahlenforschung**

<b>Zuwendungsempfänger:</b> GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 017A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt GREWIS: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender Strahlung: Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Radon in Zell- und Tier-Modellen und in Radon-Patienten; Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.02.2012 bis 31.07.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 2.915.981,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Fournier	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

In dem hier vorgestellten Projekt soll die Langzeitwirkung von niedrigen Dosen dicht-ionisierender Strahlung ( $\alpha$ -Strahlung, beschleunigte Ionen) untersucht werden. Hierbei sollen sowohl genetische Effekte als auch die für den therapeutischen Nutzen wichtigen Mechanismen der Entzündungshemmung untersucht werden. Dazu ist geplant, eine Radon-Expositionskammer zu bauen, in der Zellkulturen und Kleintiere (Mäuse) mit  $\alpha$ -Teilchen bestrahlt werden können. In Tierexperimenten soll die Verteilung der  $\alpha$ -Emitter physikalisch und biologisch untersucht werden. Durch die Analyse von Chromosomenaberrationen sollen die Induktion von Schäden sowie mögliche Langzeitfolgen der Strahlenexposition abgeschätzt werden. Die entzündungshemmende Wirkung von Radon soll mit der von Röntgenstrahlung verglichen werden. Zur Aufklärung der zellulären und molekularen Wirkungsmechanismen sollen sowohl Aspekte der humoralen als auch der neuronalen Signalvermittlung zwischen den relevanten Zelltypen betrachtet werden. Da die entzündungshemmende Wirkung des Radons um Wochen verzögert auftritt und dann Monate lang anhält, soll auch ein möglicher Einfluss auf die Schmerzwahrnehmung über entsprechende Ionenkanäle in der Zellmembran untersucht werden. Um die entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender Strahlung in chronisch entzündlichen Geweben nachvollziehen zu können, sollen die Untersuchungen auch in präklinischen, transgenen arthritischen Mäusen durchgeführt werden. Ziel ist es, für den Strahlenschutz relevante Erkenntnisse zu langlebigen radioaktiven Isotopen zu erlangen und Verbesserungen bei der therapeutischen Anwendung von Radon und niedrig-dosierter Strahlentherapie zu erarbeiten.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Konstruktion einer Radonkammer, physikalische Dosimetrie für die Bestrahlungsexperimente
- AP2: Biologische Dosimetrie, Schadensinduktion durch Radon in Zellkulturen und Gewebe
- AP3: Abschätzung des Strahlenrisikos durch Untersuchung chromosomaler Aberrationen
- AP4: Untersuchung von zellulären und molekularen Interaktionen in Blutgefäßen und im Knochen

- AP5: Intrazelluläre Signaltransduktion (insbesondere NFκB), Regulation von Adhäsionsmolekülen  
 AP6: Untersuchung entzündungshemmender Reaktionen durch cholinerge Mechanismen  
 AP7: Inhibition der Schmerzentstehung durch Veränderung der Aktivität von Ionenkanälen  
 AP8: Diskontinuierliche Dosis-Effekt-Beziehung (DNA-Reparatur, Stressantwort, ROS)  
 AP9: Untersuchung immunologischer Gefahrensignale und entzündlicher Reaktionen im Tiermodell

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1: Beendet.

AP3: Beendet.

AP4: (a) In humanen Endothelzellen wurden Experimente begonnen, um den Einfluss längerer Kultivierung unter laminarem Strom auf die Induktion von Seneszenz zu untersuchen. Die Stimulierung mit Visfatin wurde weiter untersucht, da anscheinend die Aufreinigung des Proteins Auswirkungen auf die Stimulierungsfähigkeit hat. Die Methode der Einzelmolekülmikroskopie wurde von einem Mitarbeiter erlernt und erste Proben bearbeitet (Kooperation Prof. Meckel, TUD).

(b) Die Osteoklasten-Aktivität wurde auf verschiedenen Substraten weiter untersucht (Plastik, Knochenplättchen, Osteosarkom-Matrix). Experimente zur Strahlenwirkung von Photonen wurden so fortgeführt und eine erste alpha-Bestrahlung durchgeführt. Untersuchungen mit hoher zeitlicher Auflösung zu strahleninduziertem Zelltod wurden abgeschlossen.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP1, AP3 und AP4:

Die Arbeiten werden im Rahmen von GREWIS-alpha weitergeführt (siehe separaten Zwischenbericht).

Für AP4 wird der Abschlussbericht erstellt.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Posterbeiträge:

ERASMUS-Woche (Hochschule Darmstadt):

S. Schmidke, P. Wendel, S. Ktitareva, F. Rapp, C. Fournier: "Low-dose irradiation and anti-inflammatory effects in chronic inflammatory diseases"

K. Schott, S. Hassan, J. Kondol, S. Lehrian, F. Rapp, C. Fournier: "Ionizing radiation alters the differentiation of osteoclasts"

5th World Psoriasis & Psoriatic Arthritis Conference, Stockholm, Schweden:

J. Wiedemann, C. L. Witzler, M. Dornhecker, V. Grünebaum, A. Maier, S. Hüttenhain and C. Fournier: "Establishment of a Psoriatic Skin Model for Radon Treatment"

Praxissemester:

Karola Schott „Charakterisierung von Osteoklasten auf verschiedenen Substraten“

Sebastian Schmidke „Untersuchung der Auswirkungen pro-inflammatorischer Zytokine auf humane Endothelzellen sowie die Charakterisierung morphologischer Veränderungen anhand spezifischer Markerproteine“

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität der Bundeswehr München, Werner-Heisenberg-Weg 39, 85579 Neubiberg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 031A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt LET: Simulation von Hoch-LET-Effekten mittels fokussierter Niedrig-LET-Strahlung; Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.06.2013 bis 31.05.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 31.05.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 851.064,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Dollinger	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel des Projekts ist ein verbessertes grundlegendes Verständnis der erhöhten biologischen Wirksamkeit (RBW) von dicht-ionisierender Strahlung durch strahlenbiologische Experimente mit räumlich fokussierter Dosisapplikation von Niedrig-LET-Strahlung, wodurch Eigenschaften der räumlichen Dosisverteilung von Schwerionenbestrahlung simuliert werden. Im vorliegenden Teilprojekt sollen die Möglichkeiten für strahlenbiologische Experimente mit fokussierter Ionenapplikation am Rasterionenmikroskop SNAKE erweitert werden, um zum einen weitere strahlenbiologische Endpunkte, z. B. Test der Koloniebildungsfähigkeit, zugänglich zu machen und zum anderen die applizierte räumliche Dosisverteilung gezielt variieren zu können. In enger Zusammenarbeit mit Teilprojekt B soll diese Bestrahlungsmethodik genutzt werden um strahlenbiologisch relevante Daten zu gewinnen, welche die Validierung und Weiterentwicklung von Computermodellen zur Berechnung von RBW in Abhängigkeit des LET und der Ionengeschwindigkeit ermöglichen (Teilprojekt C und D).

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Entwicklung von Zellüberlebensexperimenten mit fokussierten Ionenstrahlen.  
- Erhöhung der Bestrahlungsraten und damit der Bestrahlungsflächen.  
- Entwicklung von speziellen Zellwachstumsbehältern, welche die mechanische Beschränkung der Zellwachstumsfläche erlaubt.
- AP2: Verkleinerung des Strahldurchmessers und gezielte Variation des Strahldurchmessers.  
- Charakterisierung von fluoreszierenden Kernspurdetektoren zur Vermessung des Strahlprofils.  
- Vermessung des Strahlprofils in Abhängigkeit der Bestrahlungsparameter zur Identifikation limitierender Faktoren.
- AP3: Variation der Energie und Ionensorte (Deuteronen, alpha-Teilchen, Li) der fokussierten Ionenstrahlen zur Erweiterung der Modifikationsmöglichkeiten der Dosisverteilung.
- AP4: Durchführung von strahlenbiologischen Experimenten mit fokussierten Ionenstrahlen am Rasterionenmikroskop SNAKE.
- AP5: Bewertung der experimentellen Ergebnisse und der Berechnungen in Zusammenarbeit mit allen beteiligten Arbeitsgruppen.

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

In Zusammenarbeit mit dem ehemaligen Projektpartner TUM wurden letzte Experimente zum Zellüberleben in Abhängigkeit der Strahlfleckgröße durchgeführt. Damit wurden die Daten vervollständigt, so dass jetzt alle Daten für eine komplette Darstellung der Mikrometer-Interaktion von Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Strahlung vorliegen. Die Daten zum Zellüberleben wurden gemeinsam mit dem Verbundpartner GSI in einer Publikation zusammengetragen und interpretiert. Die Veröffentlichung ist jetzt mit minor Revisions bei dem Nature publications Verlag „Scientific Reports“ angenommen. Die Daten zum Zellüberleben sind jetzt ebenfalls vollständig und werden gerade in einer neuerlichen Publikation zusammengetragen.

Außerdem wurden weitere Experimente zur Untersuchung der Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit der DSB-Interaktionen auf der Mikrometer-Skala mit dem Partnerinstitut der TUM weitergeführt. Diese Studien wurden in Vorbereitung eines Nachfolgeprojektes angegangen.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Die Arbeiten sind mit Ablauf des Projektzeitraumes abgeschlossen. Gemeinsame Veröffentlichungen mit den Verbundpartnern sind noch geplant.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Physics at the Munich Tandem Accelerator Laboratory, G. Dollinger and T. Faestermann; Nuclear Physics News 28 (1) (2018) 5-12

DNA damage interaction on both nanometer and micrometer scale determine overall cellular damage; T. Friedrich, K. Ilicic, C. Greubel, S. Girst, J. Reindl, M. Sammer, B. Schwarz, C. Siebenwirth, D. W. M. Walsh, T. E. Schmid, M. Scholz, G. Dollinger, Sci. Rep. (2018) accepted for publication

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20251 Hamburg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 032</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Tumoren: Mechanismen und Targets		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 30.06.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 2.100.891,60 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Rothkamm	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) sind nach ionisierender Bestrahlung die wichtigsten DNA-Schäden. Zellen verfügen daher über ein komplexes Netzwerk, diese Schäden zu erkennen und erfolgreich zu reparieren. Bezüglich dieses Netzwerkes zeigen Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen deutliche Abweichungen. Dies betrifft die Initiierung, die Regulierung als auch die Effektivität der verschiedenen Reparaturwege. Diese Abweichungen in der DSB-Reparatur bieten die außerordentliche Chance, neue Zielstrukturen für eine spezifische Inaktivierung von Tumorzellen zu etablieren. Das primäre Ziel dieses Forschungsvorhabens ist es daher, diese tumorspezifischen Veränderungen der DSB-Reparatur zu erfassen und die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen aufzuklären. Darauf aufbauend sollen neue Targets für eine zielgerichtete Inaktivierung von Tumoren identifiziert werden, um damit langfristig höhere Heilungsraten für Tumormpatienten zu erreichen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

### AP1: Alternatives Endjoining

Mittels funktioneller Tests (Reparaturplasmide; Nachweis von Reparaturfoci) soll die Regulation der DSB-Reparatur und vor allem die Bedeutung des alternativen Endjoinings primär in Prostata Tumoren untersucht und Ansätze zur zielgerichteten Therapie basierend auf dem „Synthetic Lethality“-Konzept entwickelt werden.

### AP2: Homologe Rekombination (HR) und Replikation

Ihre Interaktion und die Bedeutung der in vielen Brusttumoren eingeschränkten HR-Funktion als Ansatz für die selektive Tumoringaktivierung sollen mittels Biomarkern und funktionellen Assays untersucht werden.

### AP3: EGFR und ERK-Signalwege

Beeinflussen die zelluläre Strahlenreaktion und DSB-Reparaturwege in vielen Tumoren. Hier sollen die zu Grunde liegenden Mechanismen erforscht und Möglichkeiten der tumorspezifischen Strahlensensibilisierung in Kopf-Hals-Tumoren und Glioblastomen erforscht werden.

### AP4: HPV-Infektion

Es sollen die bei HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren beobachteten Störungen der DNA-Schadensantwort näher charakterisiert und darauf aufbauend Biomarker zur Stratifizierung sowie Ansätze für angepasste Behandlungsstrategien entwickelt werden.

### AP5: Lehre in Strahlenbiologie & Experimenteller Radioonkologie

Lehrinhalte in Bachelor-, Master- und Medizinstudiengängen sollen auf vielfältige Weise mit aktuellen Forschungsfragen aus Medizin und Naturwissenschaften verknüpft werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Manuskripte zur Etablierung von PTEN-Verlust und BCL2-Überexpression als neue Targets (M1.4) und deren Validierungen mittels TMA (M1.5) wurden in Scientific Reports sowie in Cancer Letters veröffentlicht (siehe 5.). Ein Abstract zur Regulation der DSB-Reparaturwege durch RAP80 wurde als Vortrag bei der diesjährigen GBS-Tagung angenommen.
- AP2: Arbeiten zur Etablierung neuer Targets und funktioneller Assays / Biomarker für HR- und Replikationsdefekte wurden weitergeführt, inklusive eines „molecular combing“-Ansatzes sowie Automatisierungsverfahren für den DNA-Fiber-Assay.
- AP3: Ein Manuskript zur Identifikation, Charakterisierung und mechanistischen Analyse eines für das Therapieansprechen bei GBM relevanten Signalwegs (M3.2/3.3) wurde grundlegend überarbeitet und erneut zur Veröffentlichung eingereicht. Ein anderes Manuskript zur Bedeutung der Rezeptor-Tyrosinkinase MET für die Sorafenib-vermittelte Radiosensitivierung von Kopf-Hals-Tumorzellen (M3.2/3.3) sind bei Head & Neck im Druck (Beizaei et al 2018, siehe 5.). Untersuchungen zu Targets und Biomarkern wurden fortgeführt, u. a. mittels Kinom-Analysen.
- AP4: Die Untersuchungen zu Biomarkern der DNA-Schadensantwort und DSB-Reparatur wurden abgeschlossen (M4.3). Die Validierung der Biomarker mittels TMA (M4.4) ist in Arbeit.
- AP5: Die kontinuierliche Aktualisierung und Forschungsvernetzung der strahlenbiologischen Lehrinhalte wurde fortgeführt. Zwei Vorträge wurden zur KVSF Spring School 2018 in Düsseldorf beigesteuert.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Weiterarbeit an M1.4 und M1.5.
- AP2: Etablierung von neuen Targets im Bereich von HR- und Replikationsstörungen und deren Validierung (M2.4 & M2.5).
- AP3: Fortführung von Untersuchungen zu Biomarkern für individualisierte Therapieansätze in HNSCC und GBM und deren Validierung (M3.3 & M3.4).
- AP4: Biomarker-Validierung und Etablierung neuer Targets für HPV-pos HNSCC (M4.4 & M4.5).
- AP5: Fortführung der Aktualisierung und interdisziplinären Vernetzung des Lehrprogramms. Durchführung eines weiteren interdisziplinären Proseminars zu Strahlenschutz und Strahlenwirkung.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Oing C, Tennstedt P, Simon R, Volquardsen J, Borgmann K, Bokemeyer C, Petersen C, Dikomey E, Rothkamm K, Mansour WY (2018): BCL2-overexpressing prostate cancer cells rely on PARP1-dependent end-joining and are sensitive to combined PARP inhibitor and radiation therapy. *Cancer Lett*, 423, 60-70

Mansour WY, Tennstedt P, Volquardsen J, Oing C, Kluth M, Hube C, Borgmann K, Simon R, Petersen C, Dikomey E, Rothkamm K (2018): Loss of PTEN-assisted G2/M checkpoint impedes homologous recombination repair and enhances radio-curability and PARP inhibitor treatment response in prostate cancer. *Sci Rep*, 8, 3947

Beizaei K, Gleißner L, Hoffer K, Bußmann L, Steinmeister L, Laban S, Möckelmann N, Münsher A, Petersen C, Rothkamm K, Kriegs M (2018): Receptor tyrosine kinase MET is a new potential target of multi-kinase inhibitor and radiosensitizer sorafenib in HNSCC but MET inhibition fails to radiosensitize HNSCC cells. *Head Neck*, in press

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 034A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 30.06.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.130.602,80 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Löbrich	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Vorhabensziel dieses Projekts ist die Untersuchung der biologischen Wirkung geringer Dosen ionisierender Strahlung auf das sich entwickelnde Gehirn. Langfristig soll so eine verbesserte Risikoabschätzung für strahleninduzierte neurologische Spätfolgen sowie ein erweitertes Verständnis der molekularen Mechanismen der biologischen Strahlenantwort von neuronalen Stammzellen gewonnen werden.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1: Dieses Arbeitspaket untersucht die relative Bedeutung der unterschiedlichen Reparaturwege für, durch Strahlung induzierte, DNA Doppelstrangsbrüche (DSBs) während der Differenzierung neuronaler Stammzellen zu Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen. Darüber hinaus soll auch die Beteiligung unterschiedlicher DNA-Reparaturproteine an den jeweiligen Reparaturwegen in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus aufgeklärt werden. Diese Untersuchungen sollen mit der Hilfe von in vitro kultivierten neuronalen Stammzellen durchgeführt werden, die zu den verschiedenen Zelltypen differenziert und zu verschiedenen Differenzierungsstadien bestrahlt werden. Für diese Arbeiten sollen sowohl Zelllinien, als auch frisch isolierte Stammzellen aus der Subventrikulärzone bzw. dem Hippocampus unterschiedlich alter Mäuse verwendet werden. Damit trägt dieses AP zu einem besseren Verständnis zu den sich im Laufe der Embryonalentwicklung beständig verändernden Mechanismen der strahleninduzierten DNA-Reparatur bei.

AP2: Im zweiten AP sollen die im ersten AP gewonnenen Erkenntnisse mit der in vivo Situation verglichen werden. Die Wahl des DNA-Reparaturweges sowie die Beteiligung unterschiedlicher DNA-Reparaturproteine soll nach der Bestrahlung von Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen Alters (embryonal bis postnatal) für die verschiedenen Zelltypen des Gehirns untersucht werden. Diese Informationen sollen daraufhin in die geplanten Untersuchungen zur Empfindlichkeit der unterschiedlichen Zelltypen gegenüber Bestrahlung einfließen. Für die detaillierte Untersuchung der Rolle einzelner Proteine auf Reparatur und Überleben sollen zusätzliche Versuche mit Knockout-Mäusen durchgeführt werden. Langfristiges Ziel dieses APs ist es also, den Einfluss von DNA-Reparatur auf das Überleben und die genomische Integrität unterschiedlicher Zelltypen des zentralen Nervensystems nach Bestrahlung zu evaluieren.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1: In diesem Halbjahr wurde wie geplant mit der Etablierung von in vitro Experimenten aus E13,5 Embryonen von WT, Nek1-KO und Rad54-KO Mäusen begonnen. Diese sollten zur weitergehenden Untersuchung der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden mittels HR beitragen. Hierfür wurden erfolgreich neuronale Stammzellen aus den Gehirnen aller drei Mauslinien isoliert und als Neurosphären kultiviert. Parallel hierzu wurden außerdem auch embryonale Mausfibroblasten (MEFs) aus allen zu untersuchenden Mauslinien isoliert und in Kultur genommen. Sowohl mit den MEFs als auch den Neurosphären wurden Bestrahlungsversuche durchgeführt. Hierbei zeigte sich für die Neurosphären ein gegenüber der in vivo Situation ungewöhnlich hohes Level an spontanen DNA DSBs in S-Phase Zellen. Nach einer Dosis von 1 Gy zeigte sich - entgegen unseren Daten aus den in vivo Experimenten - kein Reparaturdefekt in Rad54-defizienten Zellen. Aufgrund des hohen Levels an spontanen Brüchen sind hierzu jedoch weitere Experimente nötig, um hier endgültige Aussagen treffen zu können. Für MEFs konnte der fehlende Reparaturdefekt in einem Nek1-defizienten Hintergrund dagegen bestätigt werden. Wachstumsprobleme mit den Rad54-defizienten MEFs verhinderten bislang die Auswertung der DNA DSB Reparatur mittels HR in diesem Genotyp.

AP2: In diesem Halbjahr sollte für die weitere Untersuchung der DNA-Reparatureffizienz und der Zellzyklusprogression nach Bestrahlung in Nek1-Mäusen ein weiterer in vivo Versuch durchgeführt werden. Hierfür sollten Nek1-KO und WT-Mäuse im Embryonalstadium E14,5 bestrahlt und die Reparatur der DSBs 4 Stunden nach Bestrahlung gemessen werden. Die Versuche wurden erfolgreich durchgeführt und ausgewertet. Hierbei zeigten sich erneut keine Unterschiede zwischen Nek1-defizienten und WT-Tieren. Damit kommen alle unsere bisher durchgeführten in vivo Experimente zu dem Ergebnis, dass es in vivo keinen DNA DSB Reparaturdefekt bzw. keinen HR-Defekt in Nek1-defizienten Tieren gibt. Lediglich in Rad54-defizienten Mäu-

sen kann ein solcher Defekt festgestellt werden. Damit unterscheiden sich unsere Ergebnisse aus embryonalen und frühen postnatalen Entwicklungsstadien von vorangegangenen Studien anderer Labore, in denen Mausfibroblasten aus drei Wochen alten, Nek1-defizienten Mäusen isoliert wurden. Hierbei zeigte sich ein DNA DSB Reparaturdefekt. Dies lässt vermuten, dass es in frühen Entwicklungsstadien der Maus andere Kinasen gibt, welche redundant zu Nek1 sind und die DNA DSB Reparatur über die HR mittels Aktivierung von Rad54 sicherstellen. Die Aktivität dieser Kinasen scheint im späteren Verlauf der Entwicklung allerdings verloren zu gehen. Um dies zu überprüfen sollen weitere Versuche mit älteren Nek1-defizienten Tieren durchgeführt werden (siehe Punkt 4).

Darüber hinaus wurden die *in vivo* Experimente zur DNA DSB Reparatur in 10 Tage alten, Rad54-defizienten Mäusen nach niedrigen Dosen (500 mGy) weiter ausgewertet. Die hierfür durchgeführten Färbungen von Retinaprobe zeigten jedoch, dass sich in diesem neuronalen Gewebe zu diesem Entwicklungsstadium keine proliferierenden Zellen mehr befinden und demnach keine Reparatur von DNA DSBs mittels HR mehr stattfinden kann. Färbungen im Gehirn der Tiere zeigten dagegen, dass es hier noch proliferierende Zellen gibt. Die Anzahl dieser Zellen ist jedoch so gering, dass die Auswertung möglicher Effekte zeitlich sehr aufwendig ist. Dementsprechend liegen hier noch keine weiteren Ergebnisse vor.

Zuletzt sollte im letzten Halbjahr die Arbeit mit den Rad54-KI Mäusen intensiviert werden. In diesen Tieren kann das Rad54-Protein durch die Rekombination mittels der Cre-Rekombinase entweder beständig aktiviert (phosphomimetische S/E Mutante) oder dauerhaft inaktiviert werden (nicht phosphorylierbare S/A Mutante). Hierfür wurden in den letzten 6 Monaten homozygote KI-Mäuse (sowohl S/E als auch S/A Mutanten) mit Mäusen verpaart, welche heterozygot für eine konstitutiv exprimierte Cre-Rekombinase sind. Die Nachkommen dieser Tiere wurden im Embryonalstadium E13,5 aus der Mutter isoliert und mittels mehrerer PCR-Verfahren auf ihren Genotyp hin untersucht. Darüber hinaus wurden von den Tieren sowohl neuronale Stammzellen als auch MEFs isoliert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es in einigen der untersuchten Embryonen zur Rekombination kam: Diese Tiere sind also heterozygot für die eingefügte Mutation. Sie zeigten jedoch gegenüber den anderen Tieren, in denen es nicht zur Rekombination und somit zur Induktion der Mutation kam, keinen Phänotyp. In frühen Embryonalstadien ist eine Heterozygotie für diese beiden Mutationen also nicht lethal bzw. nicht mit einem äußerlich auffälligen Phänotyp verbunden. Die Fibroblasten die aus diesen Tieren isoliert wurden zeigten bzgl. ihres Wachstums ebenfalls keine Auffälligkeiten. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein neuer Tierversuchsantrag zur Zucht von Mauslinien gestellt, in denen die entsprechenden Mutationen homozygot vorhanden sind. Hierdurch sollen weitergehende Experimente zur Regulation von Rad54 und somit der DNA-Reparatur mittels HR ermöglicht werden (siehe Punkt 4). Darüber hinaus wurden neuronale Stammzellen und MEFs aus, für die Knockin-Mutation homozygoten Tieren, isoliert. In diesen Tieren hat die Rekombination noch nicht stattgefunden, die Mutation ist also noch nicht induziert. Diese Zellen sollen im nächsten Halbjahr für *in vitro* Versuche verwendet werden, in denen die Rekombination mittels Transfektion von Cre-Plasmiden induziert wird (siehe Punkt 4).

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

Im nächsten Halbjahr sollen die in Arbeitspaket 1 begonnenen Experimente mit embryonalen neuronalen Stammzellen und Fibroblasten (MEFs) zur Untersuchung der DNA DSB Reparatur mittels HR *in vitro* in allen drei zu untersuchenden Mauslinien abgeschlossen werden. Darüber hinaus sollen MEFs und neuronale Stammzellen aus den in Arbeitspaket 2 verwendeten, induzierbaren Rad54 Mutanten auf die Anzahl von spontan auftretenden und nach Bestrahlung verbleibenden DNA DSBs hin untersucht werden. Hierfür muss zunächst die Transfektion dieser Zellen mit der Cre-Rekombinase etabliert werden, bevor die Untersuchungen zur DNA Reparatur beginnen können. Parallel dazu sollen Fibroblasten untersucht werden, in denen die Cre-Rekombinase kontinuierlich exprimiert wird, es aber erst nach Tamoxifen-Induktion zur Rekombination kommt (siehe unten). Mögliche Probleme bei der Transfektion mit der Cre-Rekombinase können hiermit evtl. vermieden werden.

Für Arbeitspaket 2 soll in diesem Halbjahr ein Tierversuchsantrag gestellt werden, der die Zucht von homozygoten Nek1-KO Tieren bis zu einem Alter von 4 Wochen ermöglicht. Diese Tiere sollen sowohl für *in vivo* Bestrahlungen, als auch für die Isolation und anschließende *in vitro* Bestrahlung von MEFs verwendet werden. Anhand dieser Ergebnisse sollen die Widersprüche zwischen den Ergebnissen zur DNA DSB Reparatur in unserem Labor (kein Reparaturdefekt in embryonalen und frühen postnatalen Stadien) und denen aus vorangegangenen Studien anderer Labore (Reparaturdefekt in Fibroblasten aus drei Wochen alten Mäusen) aufgelöst werden. Darüber hinaus sollen frühe Entwicklungsstadien der Maus auf das Vorkommen von Kinasen getestet werden, die Rad54 auch in Abwesenheit von Nek1 aktivieren und somit die DNA DSB Reparatur mittels HR sicherstellen. Hierfür sollen aufgrund ihrer großen Homologie zu Nek1 zunächst die restlichen Mitglieder der Nek-Familie getestet werden.

Im Hinblick auf die Arbeit mit den Rad54 Knockin-Mutanten soll nach dem Eingang der Zuchterlaubnis für diese Tiere direkt mit den notwendigen Verpaarungen begonnen werden. Aufgrund der Zuchtfolge werden die Tiere jedoch erst im nächsten Jahr zur Verfügung stehen. Parallel hierzu wird eine Zucht von Mäusen erfolgen, in denen die Mutation durch eine Tamoxifen-vermittelte Induktion zeitlich gesteuert werden kann (durch Verpaarung mit einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase). Hierzu bedarf es keiner Bewilligung durch das Regierungspräsidium. Aus diesen Tieren sollen im Laufe des nächsten Halbjahres Fibroblasten isoliert werden die im Rahmen des ersten Arbeitspakets genutzt werden sollen (siehe oben).

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 034B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 30.06.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 899.352,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Laube	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Vorhabensziel dieses Projekts ist die Untersuchung der biologischen Wirkung geringer Dosen ionisierender Strahlung auf das sich entwickelnde Gehirn. Langfristig soll so eine verbesserte Risikoabschätzung für strahleninduzierte neurologische Spätfolgen sowie ein erweitertes Verständnis der molekularen Mechanismen der biologischen Strahlenantwort von neuronalen Stammzellen gewonnen werden.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP3: Ziel des Projekts ist die Erfassung der Auswirkungen geringer Strahlendosen auf die DNA-Reparaturkapazität und die physiologische Funktionalität ausdifferenzierter Astrozyten und Oligodendrozyten in vivo und in vitro. Für die geplanten Versuche wird das in AP4 beschriebene neuronale Stammzellkultursystem verwendet. Nach der Ausdifferenzierung der NSZ in Astrozyten/Oligodendrozyten wird mit speziellen Markern die Reinheit und Funktionalität überprüft. Anschließend wird die Expression verschiedener Ionenkanäle in den Astrozyten und Oligodendrozyten untersucht und die Funktionalität durch elektrophysiologische Messungen an verschiedenen Ionenkanälen (spannungs-abhängige sowie inhibitorische und exzitatorische Liganden-gesteuerte Kanäle) überprüft. Die so charakterisierten glialen Zellen werden anschließend mit geringen Dosen IR bestrahlt um eventuelle Veränderungen im physiologischen Status dieser Zellen aufzeigen zu können.

AP4: In dem vorliegenden Arbeitspaket wird der Einfluss ionisierender Strahlung auf die morphologische und funktionelle Ausbildung von Neuronen und neuronaler Netzwerke während der neuronalen Differenzierung von NSZ untersucht. Diese Untersuchungen sollen mit der Hilfe von in vitro kultivierten neuronalen Stammzellen durchgeführt werden, die zu den verschiedenen Zelltypen differenziert und in verschiedenen Differenzierungsstadien bestrahlt werden. Hierfür werden ES-derivierte und primäre NSZ nach etablierten Protokollen in vitro zu Neuronen differenziert. Für die morphologischen und funktionellen Analysen werden die NSZ in verschiedenen Entwicklungsstadien mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt und deren Effekte auf die Ausdifferenzierung der Neurone und der neuronalen Netzwerke elektrophysiologisch untersucht. Die Neuriten- und Synapsenbildung wird während der neuronalen Differenzierung quantitativ und qualitativ erfasst und anhand elektrophysiologischer Untersuchungen ein Entwicklungsprofil erstellt

A8: Ziel dieses Arbeitspaketes ist es, anhand verhaltensbiologischer Analysen bestrahlter Mäuse (embryonal bis postnatal) eine Risikoabschätzung niedriger Strahlendosen für die Entwicklung des Gehirns zu ermöglichen. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen wird auf der Korrelation neurologischer Auffälligkeiten und von Defiziten im räumlichen Lernen mit dem Bestrahlungszeitpunkt liegen, um besonders strahlenempfindliche Phasen der Entwicklung des Gehirns zu identifizieren.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP3: Im AP3 sollte im letzten Zwischenbericht (2. Halbjahr 2017) die Auswirkung von niedrigdosierter Strahlung auf Astrozyten intensiver untersucht werden. Vorherige Versuche hatten gezeigt, dass Astrozyten signifikant weniger 53BP1 Foci nach einer 500 mGy Bestrahlung aufweisen als Neurone. Deshalb wurden Astrozyten und Neurone aus NSZs ausdifferenziert, mit 500 mGy Röntgenstrahlung bestrahlt und die

Ko-Lokalisation von 53BP1 und gH2AX überprüft. In den Versuchen wurde deutlich, dass die beiden Marker sowohl in Neuronen, als auch in Astrozyten fast zu 100 % ko-lokalisieren. Dies verstärkt die Annahme, dass es sich in Neuronen tatsächlich um DNA-Doppelstrangbrüche handelt und sich nur die Anzahl der Foci gegenüber den Astrozyten signifikant unterscheidet. Die Analyse der Foci-Reparatur ergab ähnlich Kinetiken, so dass die unterschiedliche Anzahl von DNA-DSBs evtl. mit einem effizienteren Puffersystem von freien Radikalen in Astrozyten bei der Induktion der DNA-DSBs erklärt werden könnte.

- AP4: In den vorherigen Berichten wurden Messungen durchgeführt, die gezeigt haben, dass niedrig-Dosis Bestrahlung (500 mGy) in NSZs zu einem Anstieg der Leitfähigkeit spezifischer Kaliumkanäle (Kv3.1, Kv1.3 oder KATP Kanal) führt. Aufgrund der Beobachtung, dass dieser Anstieg in einem vergleichbaren zeitlichen Verlauf auch nach Zugabe von Stickoxid (NO) gefunden werden konnte, wurde im aktuellen Berichtszeitraum versucht eine durch Bestrahlung induzierte Anreicherung von NO nachzuweisen. Darüber hinaus sollte mit Hilfe von Western-Blots die bereits durch qPCR gezeigte erhöhte Expression der neuronalen NO-Synthase (nNOS) bestätigt werden. Die Experimente zeigen einen dosisabhängigen Anstieg von nNOS und eine Anreicherung von Nitrat, was auf eine erhöhte Bildung von NO zurückzuführen ist. Somit führen offensichtlich sowohl Bestrahlung als auch NO-Zugabe zu einer verstärkten
- AP8: Seit dem letzten Zwischenbericht wurden die verhaltensbiologischen Untersuchungen zum Zeitpunkt P10 abgeschlossen. Des Weiteren wurden die Verhaltensanalysen zum Zeitpunkt E14,5 bis auf die 125 mGy beendet. Weiterhin wurden Bestrahlungen (500 mGy) während der Lernphase des Morris Water Maze durchgeführt (nach dem ersten MWM Trainingstag), um zu analysieren in welchem Maße sich ionisierende Strahlung während des Lernprozesses im adulten Nagerhirn auswirkt. Im Vergleich zur Sham bestrahlten Kontrollgruppe (= 0 Gy) konnte gezeigt werden, dass die bestrahlten Gruppen (125 mGy, 250 mGy, 500 mGy) eine dosisabhängige Beeinträchtigung des räumlichen Lernverhaltens im MWM zeigten. Hierbei legten die bestrahlten Gruppen über den Verlauf der fünf Trainingstage, bis zum Auffinden der Plattform, längere Schwimmdistanzen zurück als die Kontrolltiere. Entsprechend zeigte sich bei den Latenzzeiten bis zum Erreichen der Plattform, dass die bestrahlten Gruppen länger nach der Plattform suchten. Bei der Auswertung der angewandten Suchstrategien während des Trainings, zeigte sich ebenfalls eine dosisabhängige Verminderung im prozentualen Anteil an räumlichen Suchstrategien bei den bestrahlten Gruppen. Die Auswertung des MWM Tests ergab insgesamt Hinweise auf Defizite im räumlichen Lernverhalten nach Bestrahlung. Diese Defizite scheinen aufgrund der bisher durchgeführten Experimente einer Dosisabhängigkeit zu folgen, wobei die höchste Dosis von 500 mGy die größten Effekte während der initialen Lernphase verursachte. Diese Unterschiede bei bestrahlten Mäusen sind offensichtlich auf ein verändertes Lernverhalten zurückzuführen, da keine veränderte Motorkoordination oder ein verändertes Angst-/Explorationsverhalten festgestellt werden konnte. Die Beeinträchtigung der initialen Lernphase wurden in der Umlernphase nicht mehr beobachtet, weshalb man hier von einer Verzögerung im Lernprozess nach Bestrahlung ausgehen kann.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

Im AP3 soll in weiteren Experimenten nun der Zusammenhang zwischen Bestrahlung und der vermehrten Produktion an NO über die nNOS mit Hilfe von nNOS Inhibitoren untersucht werden.

Im AP4 soll in laufenden Experimenten der zeitliche Verlauf der Bildung von NO nach Bestrahlung untersucht werden und ob die erhöhte Kalium-Kanalleitfähigkeit auf eine Expressionserhöhung oder direkte Aktivierung der Kaliumkanäle zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Arbeit sollen in der zweiten Jahreshälfte in einer Fachzeitschrift publiziert und im September im Rahmen einer Tagung der Gesellschaft für Biol. Strahlenschutz in Frankfurt vorgestellt werden.

Im AP8 ist in der nächsten Phase geplant die weiteren Bestrahlungen an E14,5 Stadien mit 500 mGy und 250 mGy durchzuführen, um die Gruppen aufzufüllen. Außerdem wird noch die letzte geplante Dosis bei P10 (125 mGy) analysiert, um die Experimente bei P10 abzuschließen. Des Weiteren ist im AP8 in der nächsten Phase geplant die histologischen Analysen mit Hirngewebe der Rad54<sup>-/-</sup> Tiere zu beenden um mögliche Auswirkungen einer Niedrigdosisbestrahlung bei HR-Defizienz zu untersuchen.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Vortrag zur ERRS/GBS – Jahrestagung in Essen. Zwei abgeschlossene Bachelor- und Masterarbeiten.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 034C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 30.06.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 406.411,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Ritter	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Die wissenschaftlichen Ziele des Projekts sind einerseits die Verbesserung der Risikoabschätzung für strahleninduzierte neurologische Spätfolgen und zum anderen ein erweitertes Verständnis der biologischen Strahlenantwort von neuronalen Stammzellen (NSZ). Hierzu wird ein großes methodisches Spektrum eingesetzt. Es reicht von der Charakterisierung der molekularen Mechanismen der Strahlenantwort auf Einzelzellebene über die Erfassung von Effekten auf das Gehirngewebe bis hin zur Bewertung längerfristiger neurologischer Folgen für den Organismus. Um diese Ziele zu erreichen, arbeiten am Forschungsvorhaben Partner mit ausgewiesener strahlen- bzw. neurobiologischer Expertise eng zusammen. Da es bisher nur wenige Daten zur Wirkung von dicht-ionisierenden Strahlen gibt, wird im Rahmen unseres Arbeitspaketes der Einfluss von Teilchenstrahlen (z. B. Kohlenstoff- oder Heliumionen) auf die neuronale Entwicklung näher untersucht. Als Modellsystem dienen murine NSZ, die auch von den anderen Verbundpartnern genutzt werden. Ergänzend sind Versuche mit humanen NSZ geplant. Zunächst soll untersucht werden, inwieweit dicht-ionisierende Strahlung die Fähigkeit von NSZ zur Selbsterneuerung und Differenzierung beeinflusst. Weiterhin sollen zytogenetische Untersuchungen durchgeführt werden, um nähere Informationen über die Genauigkeit der DNA-Reparaturprozesse nach einer Strahlenexposition zu erhalten. Da die Migration ein wichtiger Vorgang bei der Bildung des Nervensystems ist, soll die Fähigkeit der NSZ zu wandern in einem „Migrationstest“ gemessen werden. Für alle ausgewählten Endpunkte werden entsprechende Experimente mit Röntgenstrahlen durchgeführt. Neben dem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn leistet das Forschungsvorhaben einen wichtigen Beitrag zur Nachwuchsförderung und zum Kompetenzerhalt in der Strahlenforschung. Die jungen Projektmitarbeiter erhalten eine intensive wissenschaftliche Aus- bzw. Weiterbildung mit interdisziplinärer Kompetenz in Strahlenforschung, Neurobiologie, Molekularbiologie und Verhaltensforschung. Weiterhin wird in Vorlesungen und Praktika um potenziellen wissenschaftlichen Nachwuchs geworben.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Verbundvorhaben wird von mehreren Arbeitsgruppen aus drei Einrichtungen, d. h. der Technischen Universität Darmstadt (TUD), dem GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung (GSI) und der Universitätsklinik Erlangen (UE) durchgeführt. Es beinhaltet die folgenden Arbeitspakete (AP):

- AP1: DSB-Reparatur in neuronalen Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien (TUD)
- AP2: Strahlenempfindlichkeit neuronaler Stammzellen *in vivo* (TUD)
- AP3: *Self-renewal* und Differenzierung neuronaler Stammzellen (TUD)
- AP4: Morphologie und Funktionalität sich entwickelnder Neurone und neuronaler Netzwerke (TUD)
- AP5: Einfluss von dicht-ionisierender Strahlung auf die neuronale Entwicklung *in vitro* (GSI)
- AP6: Analyse histomorphologischer Veränderungen im Gehirn von bestrahlten Mäusen (TUD)
- AP7: Physiologische Untersuchungen mittels funktioneller Magnetresonanztomographie (UE)
- AP8: Verhaltensbiologische Untersuchungen bestrahlter Mäuse (TUD)

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im Berichtszeitraum wurden die zytogenetischen Untersuchungen zur Wirkung von Röntgenstrahlung fortgesetzt. NSZ wurden mit 0,5 Gy bestrahlt und die Induktion und die Weitergabe von Aberrationen mittels der mFISH-Technik über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden mehr als 100 Metaphasen analysiert. Die Experimente zeigen, dass 48 Stunden nach der Exposition der größte Anteil der geschädigten Zellen durch Apoptose aus der Kultur eliminiert wurde; jedoch entstand auf Grund der Bestrahlung auch ein geringer Anteil von Zellen, die eine Translokation (stabile Aberration) aufwiesen, die an die Nachkommen vererben werden kann. Da Translokationen in Zusammenhang mit der Krebsentstehung stehen und bisher nicht in den Kontrollpopulationen detektiert wurden, verdeutlicht dieses Ergebnis das Gesundheitsrisiko einer Strahlenexposition von NSZ. Darüber hinaus wurden in Kollaboration mit der AG Laube erste Patch-Clamp-Untersuchungen an unbestrahlten humanen NSZ durchgeführt. Ziel ist es, den elektrophysiologischen Phänotyp von humanen (AP5) und murinen NSZ (AP4) zu vergleichen.

Weiterhin wurde die Differenzierungsfähigkeit von unbestrahlten NSZ im 3D-Modell (d. h. Kultivierung der Zellen als Neurosphären) analysiert. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Genexpression von Markern für neurale Stamm- und Progenitorzellen, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten in 2D-Kulturen sowie in 7, 14, 21 und 28 Tage alten Neurosphären untersucht. Übereinstimmend mit vorangegangenen Versuchen zeigt die Auswertung spezifische Veränderungen im Verlauf der Kultivierung. Insbesondere steigt die Expression von neuronalen Markern wie SYP, SNAP25 und DCX stark an ( $\geq 10$ -fach), während die Expression von Markern für Astrozyten (GFAP) oder Oligodendrozyten (MBP) nur geringfügig ansteigt (2-fach). Dies spiegelt die *in vivo* Neurogenese wieder, in der zuerst Neurone gebildet werden, im Anschluss dann Astrozyten und Oligodendrozyten. Um Informationen über die Anordnung der Zellen in den Neurosphären zu erhalten, wurden Kryoschnitte hergestellt und Markerproteine mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Die vorläufigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verschiedenen Zelltypen gleichmäßig in den Neurosphären verteilt sind. Weiterhin wurden im Berichtszeitraum zwei Experimente mit Kohlenstoffionen am National Centre of Oncological Hadrontherapy (CNAO, Pavia, Italien) durchgeführt (ausgedehnter Bragg Peak, LET: 75 keV/ $\mu$ m) und die Fähigkeit der Zellen zur Neurosphärenbildung direkt nach der Bestrahlung gemessen. Wie schon für andere Endpunkte beobachtet, waren Kohlenstoffionen effektiver als Röntgenstrahlen; zum Beispiel betrug nach einer Exposition mit 1 Gy Kohlenstoffionen die Fähigkeit von NSZ Neurosphären zu bilden 50 %, während nach 1 Gy Röntgenbestrahlung ein Wert von 90 % erreicht wurde. Wurden die Neurosphärenbildung 24 Stunden nach Bestrahlung initiiert, waren für beide Strahlenqualitäten Erholungsprozesse sichtbar.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Der Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Differenzierungsfähigkeit von NSZ soll anhand der Genexpression (qPCR-Analyse;  $\geq 17$  Marker) sowie der Proteinexpression (Immunfluoreszenz) untersucht werden. Weiterhin ist geplant, im Oktober dieses Jahres NSZ mit Kohlenstoffionen an der GSI zu bestrahlen (Bestrahlungsbedingungen wie am CNAO, Dosisbereich 0,25 – 1 Gy) und die Induktion von Chromosomenschäden, die Apoptoserate sowie die Fähigkeit der Zellen zur Neurosphärenbildung über einen Zeitraum von 2 bis 4 Wochen zu messen. Aus den gebildeten Neurosphären soll außerdem RNA isoliert und die Expression spezifischer Marker (siehe oben) untersucht werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Mayer M, Arrizabalaga O, Schröder I, Ritter S and Thielemann C (2018): Human Embryonic Stem Cell Derived Neurospheres – 2D and 3D Cell Culture in one sample. Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2018, 11th International Meeting on Substrate Integrated Microelectrode Arrays  
Schwitte J, Paech S (2018): Radiosensitivity of neural and glioblastoma stem cells. Projektbericht, Master Modul Strahlenbiophysik, Technische Universität Darmstadt

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Schloss- platz 4, 91054 Erlangen		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 034D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 30.06.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 401.520,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Uder	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel dieses Projektes ist es, durch Kombination anatomischer und funktioneller Daten eine möglichst vollständige in vivo Struktur-Funktions-Charakterisierung des Mausgehirns nach Bestrahlung vorzunehmen. Wir nehmen hiermit eine nicht-invasive Risikoabschätzung strahleninduzierter neurologischer Spätfolgen am Mausmodell vor und zeigen unmittelbar eine translationale Perspektive für die Klinik auf. Die fMRT-Analyse soll funktionelle Veränderungen von Aktivitäten im Gehirn der in utero und postnatal zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Dosen bestrahlten Mäuse liefern. Diese Ergebnisse werden direkt mit den Ergebnissen aus den Verhaltensstudien (AP8) korreliert. Die hochaufgelösten MR Anatomien erfassen die Strukturveränderungen im Gehirn und dienen zunächst als Atlasreferenzsystem sowie zur direkten Integration der histologischen Untersuchungen (AP6). Hiermit können also Gehirnbereiche definiert werden, die funktionell und/oder strukturell Veränderungen aufzeigen und in denen man daher nach Effekten auf zellulär-molekularer Ebene suchen sollte.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Mit adulten Kontrolltieren sowie zukünftig den Ras51 ko Tieren, nach 500 mG bzw. 250 mG embryonal und P10 Bestrahlung wird zunächst eine „Resting-state“ Aufnahme und anschließend ein fMRT Experiment mit thermisch nozizeptiver Stimulation aufgenommen. Direkt im Anschluss wird nochmals eine „Resting-state“ Aufnahme durchgeführt, um im Vergleich vor und nach nozizeptiver Stimulation, dynamisch-plastische Effekte der Änderungen der Verbindungsstrukturen im Gehirn zu untersuchen. Im Anschluss kann, je nach Befundlage von TP8 (Verhalten), eine Charakterisierung der anderen sensorischen Systeme in einem fMRT Experiment mit multimodaler Stimulation erfolgen. Abschließend wird eine höheraufgelöste Anatomie an den Positionen der funktionellen Bilddaten aufgenommen. Die Daten werden quantitativ mit besonderem Fokus auf die Graphtheorie ausgewertet und entsprechend visualisiert. Auf Ebene der Gruppenstatistik erfolgt synergetisch die Zusammenführung der Ergebnisse aus den anderen TPs, insbesondere die zellulären in vivo Daten aus TP2, die Standardhistologie aus TP6 und die Verhaltensdaten aus AP8.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

In dieser Phase des Projektes wurden die MRT- und Schmerzverhaltens-Messungen für die Wildtyp Mäuse kompetiert. Insgesamt 83 Tiere wurden jeweils einer Resting-State Messung ohne Stimulation und einer fMRI-Messung mit thermischer Stimulation (40 °C und 45 °C als nicht schmerzhafte und 50 °C und 55 °C als schmerzhafte Stimualtion) unterzogen. Zusätzlich wurde bei allen 83 Wildtyp Tieren sowohl das mechanische als auch das thermische Schmerzverhalten über die Wegzug-Latenz der Hinterpfoten nach mechanischer (von Frey-Test) und thermischer (Hargreaves-Test) Reizung gemessen. Folgende experimentelle Gruppen wurden somit insgesamt untersucht:

- 11 postnatal (P10) mit 500 mGy bestrahlte Tiere
- 9 postnatal (P10) mit 250 mGy bestrahlte Tiere
- 12 postnatal (P10) mit 125 mGy bestrahlte Tiere
- 10 embryonal (E14.5) mit 500 mGy bestrahlte Tiere
- 11 embryonal (E14.5) mit 250 mGy bestrahlte Tiere
- 10 embryonal (E14.5) mit 128 mGy bestrahlte Tiere
- 20 naive Tiere, die embryonal (E14.5) eine Sham-Bestrahlung erhalten haben (0 mGy).

Am Ende der funktionellen fMRT Experimente wurden die Tiere mit Kontrastmittel perfundiert. Die perfundierten Gehirne wurden ex-vivo im MRT einer hochaufgelösten Anatomie-Messung unterzogen und anschließend zur weiteren histologischen Untersuchung nach Darmstadt gebracht.

Für die Auswertung der Daten wurde die Registrierung der Mausgehirn Daten nochmals verbessert und die Registrierungsalgorithmen zum ABA optimiert. Somit ist gewährleistet, dass der zur Analyse verwendete Atlas bestmöglich auf die in diesem Projekt erhobenen fMRI-Daten passt. Zurzeit werden alle bis dato erhobenen Daten ausgewertet, es liegen noch keine weiteren Ergebnisse vor.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Weitere Messungen MRT und Verhalten mit Rad54 Knockout Mäusen müssten durchgeführt werden; die Tiere wurden uns vor kurzem aus Darmstadt zugesandt.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Die Publikation zu dem etablierten „Resting-state“-Analyseverfahren ist erschienen (Front Neurosci. 2018 May 23; 12:334. doi: 10.3389/fnins.2018.00334) und wurde gut von der Community aufgenommen (bereits mehr als 1000 views)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität des Saarlandes, Campus, 66123 Saarbrücken	<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 035A
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A	
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung	
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 613.602,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Rube

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Ziel dieses Forschungsverbundes ist es, durch den Nachweis spezifischer DNA Reparaturfoci (RF) biologische Marker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit bzw. das individuelle Strahlenrisiko zu etablieren. Dementsprechend sollen in zusammenhängenden Untersuchungen die wissenschaftlichen und technischen Voraussetzungen für die klinische Anwendung von RF geschaffen werden:

#### *AP2: Akkumulation von RF nach Niedrig-Dosis-Bestrahlung*

Im Rahmen einer protrahierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung soll die Akkumulation von RF in verschiedenen Normalgeweben unter Verwendung von Mausstämmen mit unterschiedlicher Reparaturkompetenz untersucht werden. Insbesondere soll analysiert werden, in welchem Ausmaß DNA Schäden in den ausdifferenzierten Funktionszellen und gewebespezifischen Stamm- und Vorläuferzellen verschiedener Organgewebe nach repetitiver Strahlenexposition mit sehr niedrigen Dosen akkumulieren. Darüber hinaus sollen die biologischen Auswirkungen einer DNA Schadensakkumulation hinsichtlich Zellfunktion sowie die pathophysiologischen Konsequenzen einer wiederholten Strahlenexposition mit niedrigen Dosen hinsichtlich der Organfunktion analysiert werden.

#### *AP4: Akkumulierte RF als Marker des Normalgeweberisikos*

Bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren soll untersucht werden, inwieweit unter einer Radiotherapie akkumulierende RF in Blutlymphozyten, Normal- und Tumorgewebe als Indikator für das individuelle Normalgeweberisiko bzw. Tumorsprechen genutzt werden können. Während der fraktionierten Radiotherapie soll die Akkumulation von RF in den Blutlymphozyten, den Normalgewebs- und Tumorzellen bestimmt und mit der Bestrahlungsdosis, dem Bestrahlungsvolumen, den individuell aufgetretenen Nebenwirkungen, der applizierten Chemotherapie sowie dem jeweiligem Therapieansprechen korreliert werden.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP2: DNA Reparatur-profiziente und -defiziente Mäuse werden täglich bis zu 10 Wochen mit niedrigen Dosen (100 mGy bzw. 10 mGy) bestrahlt. Nach 2, 4, 6, 8 bzw. 10 Wochen werden in den verschiedenen Organgeweben (Gehirn, Haut, Herz, Lunge, Niere, Testis) die RF sowohl in ausdifferenzierten Funktionszellen als auch in Gewebe-spezifischen Stammzellen (spermatogonische Stammzellen in Testis, epidermale Stammzellen der Haarbalgregion) ausgezählt und charakterisiert, um eine potentielle Akkumulation von DNA Schäden zu erfassen. Es sollen mögliche Unterschiede in der Akkumulation von RF in den verschiedenen Funktionszellen und insbesondere in den langlebigen Stamm-/Vorläuferzellen untersucht und zusätzlich mittels der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) charakterisiert werden.

AP4: Bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wird vor Therapiebeginn durch die Bestimmung von RF in ex-vivo bestrahlten Blutlymphozyten die individuelle DNA Reparaturkapazität und somit die Strahlenempfindlichkeit des einzelnen Patienten bestimmt. Während der fraktionierten Radiotherapie werden persistierende RF durch wöchentliche Blutanalysen bestimmt und die potentiell akkumulierenden RF mit der individuellen Reparaturkapazität eines Patienten (gemessen anhand prätherapeutisch gewonnener, in vitro bestrahlter Blutlymphozyten) korreliert. Auch soll geprüft werden, inwieweit die im Normal- bzw. Tumorgewebe akkumulierten RF mit der Normalgewebsreaktion bzw. dem Tumorsprechen korrelieren.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP2: Durch die fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung wird die hippocampale Neurogenese gestört mit einer langfristigen Abnahme der neuronalen Stamm-/ Progenitorzellen insbes. im juvenilen Gehirn. In den letzten Monaten führten wir in Kooperation mit der AG S. Tapio (HelmholtzZentrum München) Proteomanalysen durch, um Einblicke in die neuronalen Reaktions- und Regulationsnetzwerke zu erhalten. Am Ende der Bestrahlungsserie sowie 1 m, 3 m, und 6 m

post-IR wurde der juvenile Hippocampus aus dem murinen Gehirns isoliert, und diente als Ausgangsmaterial für vergleichende quantitative Proteinanalysen mittels Massenspektrometrie. Der Vergleich der Expressionsprofile zeigte eine massive Suppression des Interaktionsnetzwerks des Transkriptionsfaktors CREB 72 h und 1 m post-IR und eine verstärkte CREB-Aktivität 3 m post-IR. Die Daten der MS-basierte Proteomanalyse konnten durch entsprechende Western Blot-Analysen validiert werden. Insgesamt korrelieren die Ergebnisse mit der deutlichen Abnahme der neuronalen Proliferation und Migration im Hippocampus nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung und einer nachfolgenden kompensatorischen Gegenregulation zur funktionellen Regeneration. Die Daten werden derzeit zu einem Publikationsmanuskript zusammengefasst (Schmal Z et al. 2018).

AP4: Bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und Rektum-Karzinomen wurden vor und während der Radiotherapie Blutproben gewonnen, und die RF wurden in den in-vitro bzw. in-vivo bestrahlten Blutlymphozyten quantifiziert. Die während der Radiotherapie ermittelten Foci-Werte wurden mit der Bestrahlungsdosis, dem Bestrahlungsvolumen, den Nebenwirkungen sowie der applizierten Chemotherapie korreliert. Die Daten-Auswertung ergab, dass die gemessenen Foci-Werte und Kinetiken in den Blutlymphozyten nur bedingt mit dem Bestrahlungsvolumen und den individuellen Nebenwirkungen korrelierten. Die strahleninduzierten RF wurden mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) in der Chromatin-Ultrastruktur charakterisiert; hierbei zeigten sich komplexere DNA Schäden bei kombinierter Radio-/Chemotherapie im Vergleich zu alleiniger Radiotherapie. Nach erfolgreicher Daten-Auswertung wurde zwischenzeitlich ein entsprechendes Publikationsmanuskript erstellt (Lorat Y et al. 2018). In Kooperation mit der AG Neubeck/Krause wurden RF in Tumorzellen (Plattenepithel-Ca) vor und nach Strahlenexposition in unterschiedlich oxygenierten bzw. proliferierenden Regionen von Xenograft-Tumoren bestimmt und mittels TEM ultrastrukturell charakterisiert.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP2: Mittels der Magnet-Resonanz-Tomographie (7-Tesla Kleintier-MRT) wurden 1, 3, 6 und 12 Monate nach der Bestrahlungsserie Bilddaten für die morphologische und volumetrische Analyse verschiedener Hirnstrukturen akquiriert. Nach der Bildakquisition werden derzeit die komplexen MRT-Bilddaten für die morphologische Befundbeurteilung ausgewertet. Durch die hochaufgelöste Darstellung der unterschiedlichen Hirnregionen im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung sowie im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrolltieren sollen die morphologischen und strukturellen Veränderungen im Sinne einer potentiellen Neurodegeneration infolge der Bestrahlungsserie erfasst werden. Durch den Vergleich der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung bei adulten versus juvenile Versuchstieren soll die erhöhte Vulnerabilität während der postnatalen Gehirnentwicklung herausgearbeitet werden. Für die multiparametrische Gewebecharakterisierung sollen auch die Perfusions- und Diffusions-Messungen mit speziellen Gradienten-Techniken berücksichtigt werden, um eine potentielle Neuroinflammation mit regionalen Blutflussänderungen diagnostizieren zu können.

AP4: In Normalgewebs- und Tumorzellen wird nach Strahlenexposition die Induktion und Reparatur von DNA Schäden vergleichend durch die Foci-Quantifizierung mittels IFM und deren ultrastrukturelle Charakterisierung mittels TEM untersucht. In Kooperation mit der Fa. ZEISS werden hierbei korrelative Techniken etabliert werden, um Informationen aus der Lichtmikroskopie mit der Auflösungskraft der Elektronenmikroskopie zu kombinieren. Für das Imaging System ZEN CONNECT wird derzeit ein white paper in Kooperation mit der Fa. ZEISS erstellt.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

DNA damage accumulation during fractionated low-dose radiation compromises hippocampal neurogenesis. Schmal Z, Isermann A, Hladik D, Tapio S, Rube CE. Clin Cancer Res. 2018, under review

Hair follicle stem cell fate is dependent on chromatin remodeling capacity following low-dose radiation. Schuler N, Timm S, Rube CE. Stem Cells. 2018 Apr;36(4):574-588

Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. Contrepois K, Coudereau C, Benayoun BA, Schuler N, Roux PF, Bischof O, Courbeyrette R, Carvalho C, Thuret JY, Ma Z, Derbois C, Nevers MC, Volland H, Redon CE, Bonner WM, Deleuze JF, Wiel C, Bernard D, Snyder MP, Rube CE, Olasso R, Fenaille F, Mann C. Nat Commun. 2017 May 10;8: 14995

Ultrastructural insights into the biological significance of persisting DNA damage foci after low doses of ionizing radiation. Lorat Y, Schanz S., Rube CE. Clin Cancer Res. 2016 Nov 1;22(21):5300-5311.

Persistent DNA damage in spermatogonial stem cells after fractionated low-dose irradiation of testicular tissue. Grewenig A, Schuler N, Rube CE. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2015; 92 (5): 1123-1131

Even low doses of radiation lead to DNA damage accumulation in lung tissue according to the genetically-defined DNA repair capacity. Flockerzi E, Schanz S, Rube CE. Radiother Oncol. 2014 May;111(2):212-8.

Scale of DNA damage in blood lymphocytes during radiotherapy depends on concomitant chemotherapy. Lorat Y, Fleckenstein J, Görlinger P, Rube CE 2018, Radiother Oncol 2018, under review

Clustered DNA damage concentrated in particle trajectories causes persistent large-scale rearrangements in chromatin architecture. Timm S, Lorat Y, Jakob B, Taucher-Scholz G, Rube CE. Radiother Oncol. 2018 Jul 23

DNA damage assessment and potential applications in laboratory diagnostics and precision medicine. Reddig A, Rube CE, Rödiger S, Schierack P, Reinhold D, Roggenbuck D. J Lab Precis Med 2018; 3:31

Increasing genomic instability during cancer therapy in a patient with Li-Fraumeni syndrome. Schuler N, Palm J, Schmitz S, Lorat Y, Rube CE. Clinical & Translational Radiation Oncology 2017, 7:71-78

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20251 Hamburg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 035B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 820.920,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Dikomey	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel der beiden Projekte AP3 und AP6 ist es Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit zu etablieren sowie Reparaturfoci als Marker der genomischen Instabilität bzw. der homologen Rekombination zu etablieren.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP3:

- Versuch V3.1: Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit
- Versuch V3.2: Verschiebung der DSB-Reparatur zum PARP-EJ
- Versuch V3.3: Etablierung eines Tumorzellarrays
- Versuch V3.4: RF in Tumorbiopsien nach ex-vivo Bestrahlung

AP6:

- Versuch V6.1: Genomische Instabilität von Tumorzellen
- Versuch V6.2: Genomische Instabilität von Normalzellen
- Versuch V6.3: Zelluläre Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP3:

Ein Manuskript zur Verschiebung der DSB-Reparatur zum PARP-EJ in BCL2-überexprimierenden Zellen wurde in Cancer Letters veröffentlicht (M3.2). Zudem wurde PTEN-Verlust als Biomarker für den therapeutischen Einsatz von PARP-Inhibitoren identifiziert und ein entsprechendes Manuskript in Scientific Reports veröffentlicht. Die Analyse von Reparaturfoci und Charakterisierung der DSB-Reparatur am Tumorzell-Array sowie an frischem Tumorgewebe wurde weitergeführt. Ein Abstract zu dieser Thematik wurde als Vortrag bei der diesjährigen GBS-Tagung angenommen und ein diesbezügliches Manuskript steht kurz vor der Einreichung.

AP6, V6.3:

Die Untersuchungen zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit der verschiedenen Tumorzelllinien wurden fortgeführt. Ergebnisse zum Einfluss relevanter Faktoren wie RAD51, CHK1 und BRCA1 auf die Strahlenempfindlichkeit in Brusttumorzelllinien werden auf der diesjährigen GBS-Tagung präsentiert.

#### **4. Geplante Weiterarbeiten**

AP3, V3.3, V3.4:

Fortführung der Analyse von RF und Charakterisierung der DSB-Reparatur am Tumorzell-Array sowie in frischen Prostatatumorgewebeproben.

AP3, V3.4:

Veröffentlichung der methodischen Ansätze zur Bestimmung von Reparaturphänotypen in ex vivo-Proben. Weiterentwicklung des ex vivo-Assays.

AP6, V6.3:

Weiterführung der Versuche zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit der verschiedenen Tumorzelllinien und deren Vergleich mit Markern der genomischen Instabilität.

#### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Oing C, Tennstedt P, Simon R, Volquardsen J, Borgmann K, Bokemeyer C, Petersen C, Dikomey E, Rothkamm K, Mansour WY (2018): BCL2-overexpressing prostate cancer cells rely on PARP1-dependent end-joining and are sensitive to combined PARP inhibitor and radiation therapy. *Cancer Lett*, 423, 60-70

Mansour WY, Tennstedt P, Volquardsen J, Oing C, Kluth M, Hube C, Borgmann K, Simon R, Petersen C, Dikomey E, Rothkamm K (2018): Loss of PTEN-assisted G2/M checkpoint impedes homologous recombination repair and enhances radio-curability and PARP inhibitor treatment response in prostate cancer. *Sci Rep*, 8, 3947

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 035C
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 213.756,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Krause	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Ziel des Vorhabens ist es, durch den Nachweis von spezifischen DNA-Reparaturfoci (RF) biologische Marker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit bzw. das individuelle Strahlenrisiko zu etablieren. Dazu soll eine zusammenhängende Untersuchung verschiedener Aspekte in der Anwendung von RF vorgenommen werden.

Ein Bezug zu anderen Arbeitsprojekten (AP) besteht wie folgt:

AP5.1 - AP6 bzgl. zellulärer Strahlenempfindlichkeit der HNSCC (Borgmann, Mansour, UKE2)

AP5.2 - AP4 bzgl. ex vivo Bestrahlung von Gewebebiopsien (Fleckenstein, Rube, UKS2)

AP5.3 - AP7 bzgl. Automatisierung der RF-Detektion (Fritz, Roggenbuck, MED)

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

In Dresden erfolgt die Bearbeitung des AP5: „RF als potentielle Marker der Tumorstahlenempfindlichkeit“. Unter Nutzung von an der Technischen Universität Dresden etablierten und gut charakterisierten humanen Tumormodellen sowie einer histologischen, Mikromilieu-korrigierten semiautomatisierten Bildanalyse wird das Potential der RF als Biomarker für die Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren in vivo bestimmt. Die Methodik wird dabei für den Einsatz an menschlichen Tumorbiopsien sowie für den Hochdurchsatz (High Throughput) weiterentwickelt und validiert, um zukünftig die lokale Tumorkontrolle besser vorhersagen und mögliche Strahlenschäden an gesundem Gewebe einsparen zu können.

AP5.1: Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren

An zehn Tumormodellen wird die Anzahl der DNA-RF/Zelle nach Bestrahlung von Tumoren in vivo mittels histologischer, Mikromilieu-korrigierter semi-automatisierter Bildanalyse ermittelt und mit vorhandenen Ergebnissen zur Tumorkontrollwahrscheinlichkeit korreliert.

AP5.2: Etablierung eines Klinik-relevanten ex vivo Assays

An Tumorbiopsien soll ein standardisierter und in der klinischen Routine einfach anwendbarer ex vivo Assay zur Bestimmung der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit mittels DNA-RF etabliert werden.

AP5.3: Entwicklung einer „High Throughput“ Methodik

In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner Medipan GmbH (AP7) soll ein Verfahren zur automatischen Quantifizierung von RF entwickelt werden, welches an den in AP5.1 und AP5.2 erstellten Bilddateien validiert wird.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

#### AP5.1: Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren

Die Tumormodelle wurden immunhistochemisch und mittels Immunfluoreszenz gefärbt und die Reparaturfoci ausgewertet. Die Kurvensteigungen der dosisabhängigen Reparaturfoci zeigen eine signifikante Korrelation mit der Dosis, die notwendig ist 50 % der in vivo Tumoren lokal zu kontrollieren (TCD50); sowohl nach Einzeitbestrahlung unter homogener Hypoxie als auch nach klinisch relevanter fraktionierter Bestrahlung. Ein Manuskript ist in Vorbereitung.

#### AP5.2: Etablierung eines Klinik-relevanten ex vivo Assays

Mit Hilfe des entwickelten gemischten Modells (Rassamegevanon et al 2017, Radiother. Oncol.) wurde die Heterogenität von Reparaturfoci-Daten aus in vivo bestrahlten Tumoren (Koch et al 2013, Radiother. Oncol.) und ex vivo bestrahlten Tumorbiopsien statistisch untersucht. Es zeigte sich, dass die ex vivo Kultivierung zu einer erhöhten Heterogenität der Foci führt. Ein Manuskript ist eingereicht. Der direkte Vergleich der Dosisantwortkurven von ex vivo bestrahlten Biopsien und in vivo bestrahlten Tumoren zeigte in 4 von 5 Tumormodellen keinen signifikanten Unterschied. Die Steigungen der Reparaturfoci-Kurven konnte Tumoren in 2 Resistenzkategorien klassifizieren. Ein Manuskript ist in Vorbereitung.

#### AP5.3: Entwicklung einer „High Throughput“ Methodik

Der entwickelte und zum Patent angemeldete Algorithmus zur Erkennung von Gefäßen in Gewebeschnitten wurde auf weitere Tumormodelle angewendet.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

#### AP5.1: Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren

Die Ergebnisse der in vivo Tumoren sollen mit Daten aus primären Patientenproben verglichen werden und in die Publikation einfließen.

#### AP5.2: Etablierung eines Klinik-relevanten ex vivo Assays

Die Methodik der ex vivo Kultivierung, Bestrahlung und Foci-Analyse soll auf lebende Tumorschnitte (Vibratom) ausgeweitet werden.

#### AP5.3: Entwicklung einer „High Throughput“ Methodik

Der systematische Vergleich (automatisch versus manuell) von erkannten Gefäßstrukturen soll fortgeführt werden. Die Erkennung von Gefäßstrukturen in Immunfluoreszenz gefärbten Tumorgewebeschnitten soll publiziert werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

27. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie, Hamburg, Deutschland, 22-24 März 2018

Poster: Statistical reassessment of DNA damage response determined with  $\gamma$ H2AX foci assay of in- and ex vivo irradiated tumor, Rassamegevanon et al.

Vortrag aktuelle Kontroverse: Der Ex-vivo-Assay als Tool zur Prädiktion der individuellen Strahlenempfindlichkeit und –sensibilisierung, Pro-Position, von Neubeck et al.

Radiation Break-through: from DNA damage responses to precision cancer therapy, Oxford, UK 12-14 März 2018, Poster: Statistical reanalysis of tumour radiation response determined with  $\gamma$ H2AX foci assay reveals a pronounced difference in heterogeneity between in- and ex vivo experimental set-ups, Rassamegevanon et al.

Summer School in Bioinformatics, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Cambridge, UK 25-29 Juni 2018, Poster: Radiation responses predicted via the  $\gamma$ H2AX foci assay: translation and optimisation for a clinical application, Rassamegevanon et al.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Bundesamt für Strahlenschutz, Willy-Brandt-Str. 5, 38226 Salzgitter		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 035D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 266.628,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Gomolka	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Ziel dieses Forschungsverbundes ist es, durch den Nachweis spezifischer DNA Reparaturfoci (RF) biologische Marker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit bzw. das individuelle Strahlenrisiko zu etablieren. Dementsprechend sollen in zusammenhängenden Untersuchungen die wissenschaftlichen und technischen Voraussetzungen für die klinische Anwendung von RF geschaffen werden.

Der Projektteil D ist Teilprojekt eines Verbundes bestehend aus 8 Arbeitspaketen, welcher von der Universität des Saarlandes koordiniert wird und von Projektpartnern aus Wissenschaft und Industrie in München (BfS), Homburg/Saar (Uni Saarland), Hamburg (Uni Hamburg) und Dresden (Uni Dresden, Firma Medipan) bearbeitet wird:

- AP1: RF als Marker einer chronischen Strahlenexposition
- AP2: Akkumulation von RF bei Niedrigdosis-Bestrahlung
- AP3: RF als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit
- AP4: Akkumulation von RF in der Strahlentherapie
- AP5: RF als Marker der Tumorstrahlenempfindlichkeit
- AP6: RF als Marker einer genomischen Instabilität
- AP7: Automatisierung der RF-Detektion
- AP8: Qualitätsmanagement

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1 (BfS): RF als Marker einer chronischen Strahlenexposition

Es ist zu klären, ob eine chronische Strahlenexposition zu einer Akkumulation von spezifischen RF führt und außerdem die Induktion von DSB und deren Reparatur verändert. Als Untersuchungskollektiv stehen kryokonservierte Lymphozytenproben von nach Alter und Rauchen angeglichenen 300 hoch (Working Level Month > 300) und 100 niedrig (WLM < 50) exponierten Bergarbeitern zur Verfügung. In einem Teilkollektiv dieser Biobank wird die Strahlenexposition durch chromosomale mFISH-Analyse von 75 repräsentativen Probanden verifiziert. Hierbei werden chromosomale Aberrationen wie Translokationen und dizentrische Chromosomen untersucht. Im gleichen Teilkollektiv werden verschiedene RF analysiert, wie z. B. gammaH2AX, ATM, 53BP1.

- Versuch 1 (V1.1): Akkumulation von RF  
Nachweis von verschiedenen RF in einem Kollektiv von 75 gut charakterisierten hoch und niedrig exponierten Bergarbeitern
- Versuch 2 (V1.2): Adaption nach chronischer Exposition  
Auswirkung der chronischen Strahlenexposition auf die Zahl der durch in-vitro-Bestrahlung erzeugten Schäden und deren Reparatur
- Versuch 3 (V1.3): Validierung der in-vivo Strahlenexposition mittels mFISH, Vergleich mit RF-Daten

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

V1.1: Der Nachweis von verschiedenen RF mittels Immunfluoreszenz in hoch und niedrig exponierten Uran-Bergarbeitern erfordert eine Methodenetablierung. Dazu konnten die Proteine:  $\gamma$ H2AX, 53BP1, MDC1, pATM und Rap80 in kryokonservierten G0-Lymphozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde pKAP1 und DNA-PK nachgewiesen. Diese Proteine sind an der Signalisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen und der Reparatur mittels nicht-homologer Reparatur beteiligt. Die Dosis-Effektkurven (0 Gy, 0,05 Gy, 0,1 Gy, 0,25 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 8 Gy) und Reparaturkinetiken (1 h, 4 h, 8 h, 24 h) wurden mindestens aus 4fachen biologischen Replikaten erstellt. Die Etablierung erfolgte in Einzelfärbung vom jeweiligen Protein. Es wurde die Etablierung für die automatische Foci-Detektion und Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie abgeschlossen. Für die Ermittlung des passenden Auswertalgorithmus wurden die Parameter Integrationszeit und Intensität der Fluoreszenzsignale angepasst. In die Evaluierung wurden auch der Einfluss einer Bewertung der Rohdaten und eine manuelle Foci-Auswertung mit Auge einbezogen. Die Versuche aus den Replikaten der Dosis-Effekt-Kurve wurden abgeschlossen, die automatische Messung und die Roh-Daten ausgewertet. Daraus ergeben sich vorerst folgende Beobachtungen: Die Bildung von Foci ist für alle untersuchten Protein Dosis-abhängig und die Detektionsgrenze variiert zwischen 0,05 Gy und 0,25 Gy. Die meisten Proteine erreichen üblicherweise ihr Foci-Maximum 1 h nach der Bestrahlung. Im Gegensatz dazu zeigt 53BP1 bei 8 Gy 1 h bis 4 h das Foci Maximum nach Bestrahlung. Bei MDC1 verschiebt sich das Maximum bei einer Dosis über 1 Gy deutlich nach hinten. Rap80 erreicht das Foci-Maximum 24 h nach der Bestrahlung. Die Qualität der Foci unterscheidet sich ebenfalls. Während  $\gamma$ H2AX, 53BP1, MDC1 und Rap 80 große, klare und helle Foci bildet, sind die Foci von pATM, pKAP1 und DNA-PK filigran und klein. Die Bildung von Foci ist in den biologischen Replikaten von  $\gamma$ H2AX, 53BP1 und pKAP1 relativ stabil. Bei den biologischen Replikaten von MDC1, pATM, Rap80 und DNA-PK treten größere inter-experimentelle Schwankungen auf. Zusätzlich zeigen einige Proteine bereits in unbestrahlten Proben diffuse Signale, wodurch eine automatische Auswertung deutlich von der manuellen Auswertung abweicht. In einigen Fällen sind bereits deutliche Foci in unbestrahlten Proben zu beobachten, wodurch die Detektionsgrenze erhöht wird. Generell zeigt die Zellkultur 24 h nach der Bestrahlung viele deformierte Zellen. Aktuell werden die Rohdateien der einzelnen Versuche genauer evaluiert. Dabei spielen die Qualität der Färbung und der Zellkultur eine entscheidende Rolle. Zudem werden exemplarisch Foci mit dem Auge ausgezählt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Möglichkeit zum Nachweis von „konservierten“ Schäden in den Lymphozytenproben der Wismut-Bergarbeiter untersucht. Dazu wurde humanes Vollblut in vitro mit verschiedenen Dosen (0,05 Gy, 0,1 Gy und 1 Gy) bestrahlt und nach einer Stunde Reparaturzeit die Lymphozyten isoliert und kryokonserviert. Dies soll den Ausgangspunkt der Untersuchungen von chronisch exponiert Wismut-Bergarbeitern simulieren. Nach einer Lagerung von mindestens einer Woche im flüssigen Stickstoff wurden die Lymphozyten mit drei verschiedenen Protokollen aufgetaut, in Kultur genommen und erneut in vitro mit 1 Gy bestrahlt. Die Lymphozyten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 6 h, 24 h) fixiert und  $\gamma$ H2AX angefärbt. Es wurde beobachtet, dass der „konservierte“ (vor der Lagerung gesetzte) Schaden nur bei einer direkten Fixierung nach dem Auftauen der 1 Gy bestrahlten Proben nachgewiesen werden konnte. In Proben, die mit 0,05 Gy oder 0,1 Gy bestrahlt wurden, konnten keine  $\gamma$ H2AX Foci nachgewiesen werden. Alle Proben zeigten jedoch die typische Dosis-Effektkurve für  $\gamma$ H2AX Foci nach der erneuten Bestrahlung mit 1 Gy. In der Auswertung wurde ebenfalls beobachtet, dass deutlich weniger Zellen deformiert und durchgefärbt waren, wenn die aufgetaute Zellkultur vor der erneuten Bestrahlung über Nacht bei 37 °C kultiviert wurde.

V1.2: Die Aussagekraft zur Strahlenempfindlichkeit des RF Assays und der mFISH Analyse wurde an Lymphozyten von strahlenempfindlichen Kindern (AT-Patienten) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe überprüft. Die mFISH-Auswertung wurde abgeschlossen. Die Analyse der Reparaturfoci von  $\gamma$ H2AX wurde experimentell ebenfalls abgeschlossen. Hier steht eine Auswertung der automatisch detektiert Foci noch aus.

V1.3: Mit der mFISH Untersuchung von kryokonservierten Lymphozyten von Wismut-Bergarbeitern wurde begonnen. Die mFISH-Analyse der Chromosomen von 4 niedrig exponierten Kontrollen und 29 kumulativ hoch exponierte Wismutbergarbeitern wurde begonnen. Derzeit befinden sich 18 Probanden in Auswertung. Bei den restlichen Probanden steht die Beurteilung noch aus.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die geplante Weiterarbeit folgt dem Arbeitsprogramm.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Medipan GmbH, Ludwig-Erhard-Ring 3, 15827 Dahlewitz		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 035E</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt E		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2014 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 723.729,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Roggenbuck	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel des Vorhabens ist die automatisierte Erkennung und Auswertung von DNA-Reparaturfoci (RF) zur Bearbeitung großer Probenmengen mittels des AKLIDES® Nuk-Systems. Dies beinhaltet die Entwicklung und Testung von Software sowie die Beschleunigung des Analyseablaufs im Vergleich zur manuellen Auswertung. Schwerpunkt ist die Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten mittels gammaH2AX. Gemeinsam mit dem Partner BfS (AP1) geht es um Vergleichsuntersuchungen von Proben nach low-dose Strahlenbelastungen bei Bergarbeitern. Der Partner UKE (AP3+AP6) wird in seinen Vorhaben untersuchen, welche Marker zur Erkennung der individuellen Strahlenempfindlichkeit besonders geeignet sind. Die Marker mit dem größten Potenzial sollen bevorzugt in die Software des AKLIDES® Nuk-Systems implementiert werden. In Zusammenarbeit mit dem Partner OncoRay (AP5) soll die Automatisierung des Nachweises von RF im Tumorgewebe etabliert werden.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP7.1: Analyse von Blutlymphozyten charakterisierter Spender für die Testung von: Reproduzierbarkeit, Stabilität, Sensitivität, Spezifität für den Nachweis von RF  
Bestimmung der optimalen Ausgabeparameter  
Validierung durch Lymphozytenarray und Proben chronisch exponierter Bergarbeiter (AP1)
- AP7.2: Automatisierung des Nachweises verschiedener RF für Tumorklinien (AP6)  
Anwendung bei individueller Strahlenempfindlichkeit und genomischer Instabilität
- AP7.3: Automatisierung des RF Nachweises für Tumorgewebeschnitte (AP5) und für Tumorkarray (AP6)  
Implementierung und Testung verschiedener Ausgabeparameter

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

Zusammen mit dem Projektpartner OncoRay wurde mit Hilfe des neuen Moduls für die Erkennung von Blutgefäßen ein großer Umfang an Bildmaterial ausgewertet. Es sollte geprüft werden, ob die Analyse stabil bleibt und ob sich die Qualität bei verschiedenen Szenen und Konstellationen verändert. Der Projektpartner OncoRay geht die analysierten Bilder durch und bewertet die Analysen.

Um eine Trennung der Zellen in einem Fluoreszenzbild mittels Algorithmus durchführen zu können, wurde eine Überlagerung der beiden Aufnahmen mittels Hellfeld und Fluoreszenz durchgeführt und nach geeigneten Parametern für die automatische Deckung der Bilder gesucht. Dabei wurde die Positionierung der Zellkerne zu einander als helfendes Element gewählt. Bei der Hellfeldaufnahme wurden die Zellkerne im gesuchten Bereich segmentiert und jeweils der Abstand zu einander berechnet.

Für die Aufnahme im Hellfeld wurden unterschiedliche LEDs ausprobiert, mit denen der Objektträger optimal ausgeleuchtet werden soll. Nach einigen Versuchen wurde sich für das NeoPixel LED-Band mit 144 LEDs entschieden. Das Band wurde in kleinere Leisten zugeschnitten (ein Schnitt jede 7 mm ist möglich) und parallel eingesetzt. Dadurch ist es möglich eine homogene Ausleuchtung zu bekommen und die Steuerung einfach zu halten. Jede LED kann dabei einzeln gesteuert werden, so dass alle Bereiche homogen ausgeleuchtet werden können.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Die Auswertung der Ergebnisse durch OncoRay wird genutzt, um Fehler zu finden und den Algorithmus zu verfeinern. Um die Detektion der RF Marker zu verbessern, wird im Vorfeld der Algorithmus für die RF Erkennung angepasst um zusätzliche einige neu entdeckte Störungen zu eliminieren.

Ein Algorithmus für die Suche gleicher Bereiche in den Gewebeschnitten muss in die Prozesskette implementiert und getestet werden. Wie oben beschrieben wird die Distanz der Zellkerne genutzt um den gleichen Abschnitt im Gewebe zu finden. Die Dauer der Berechnung hängt dabei stark von der Anzahl der Zellkerne ab. Da im Fluoreszenzbild die Distanzen aller Zellkerne im kompletten Gewebeschnitt berechnet werden müssen, muss nach einem besseren Merkmal gesucht werden um die Berechnungszeit zu reduzieren.

Ein Prototyp für den Deckel des Probenstisches wird erstellt und die LED-Matrix wird als eine neue Komponente in die Analysesoftware integriert. Zudem wird eine Steuerung für die LEDs implementiert.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

20.09.2017 - Europäische Patentanmeldung: EP17192123.2

<b>Zuwendungsempfänger:</b> IUF - Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 036AX</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2015 bis 31.08.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 892.529,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Boukamp	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

UVA, -B, sichtbares Licht (VIS) und Infrarot (IR) haben jeweils ein unterschiedliches biologisches Wirk- und Schädigungsprofil. Für das Verständnis der schädlichen Wirkung für den Menschen und einer daraus resultierenden relevanten Risikoabschätzung ist es essentiell, die kombinierte Aktion von UV- bis IR-Strahlung in ihrer biologischen Wirksamkeit in Modellsystemen der Haut zu untersuchen. Durch die Analyse unterschiedlicher Parameter in 2D- und Gewebe-relevanten 3D organotypischen Kulturen (OTK) sowie in vivo in der Mauhaut wollen wir die Wirkmechanismen kombinierter Strahlung auf zellulärer und (epi)genetischer Ebene aufklären.

Dafür wird eine kombinierte und bezüglich UVA und -B Strahlenintensität variable Strahlenquelle für alle AGs entwickelt. Die Forschungsschwerpunkte der Verbundpartner sind: Gewebe- und Telomerlängenregulation (AG1), epigenetische Kontrolle zellulärer Funktionen auf DNA- bzw. Histon-Ebene (AG2), IR-Signaling, Mitochondrienintegrität und AhR-Signaling (AG3), DNA Reparatur und Damage Signaling (AG4). Die enge Zusammenarbeit der interdisziplinär aufgestellten AGs schafft Synergieeffekte, die neben der wissenschaftlichen Diskussion den Austausch von Methoden und Materialien, gemeinsame Publikationen sowie die Ausbildung von Nachwuchswissenschaftlern betreffen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Im Teilprojekt A werden folgende Arbeitspakete bearbeitet:

- 2.1) Führt chronische Kombinationsbestrahlung mit UV-VIS-IR zur tumorigenen Transformation der HaCaT Zellen? • genetisches Profil/Tumorbildung/Invasion
- 2.2) Welche Rolle spielt die Gewebeorganisation für das Schadensprofil durch eine Kombinationsbestrahlung? • Störungen von Gewebsorganisation und Differenzierung/Proliferation und Apoptose/Induktion einer Schadenskaskade/Telomer-längenregulation in Epidermis und Dermis.
- 2.3) Welche Rolle spielen Alters-abhängige Veränderungen in der dermalen Matrix auf das epidermale Schadensprofil nach Kombinationsbestrahlung? • AGE-OTKs: Keratinozyten mit gealterten Fibroblasten/HaCaT Zellen mit gealterten Fibroblasten (Invasion)
- 2.4) Welche Rolle spielen off Target Effekte der Immunsuppressiva für die Entstehung von UV-induzierten Hautcarcinomen? • Langzeitbehandlung (10 Wochen) von HaCaT Zellen mit Cyclosporin A/Einfluss von auf die Epithel-Mesenchym Interaktion (RNA Expressionsanalyse)/Einfluss von Cyclosporin A plus Kombinationsbestrahlung mit UV-VIS-IR

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Zu 2) • erneute Kalibrierung der KAUVIR Lampe.

Zu 2.2) • Finalisierung der Publikation zur Charakterisierung von humanen spontan immortalisierten, p53 wildtyp Keratinozyten, die als Pendant zu den HaCaT Zellen (p53 mutiert) in allen Konsortiumsgruppen für die Bestrahlungsexperimente verwendet werden.

- Erstes Bestrahlungsexperiment mit der KAUVIR Lampe: Akute Bestrahlung (1x) im Vergleich “KAUVIR Gesamtspektrum” (1MED, 0,78kJ/m<sup>2</sup> UVB) und “UVA+B” (1MED) in 3D Hautäquivalenten mit normalen humanen Keratinozyten (NHEK) zeigt für das „Volle Spektrum“ eine Tendenz der Epidermisverdünnung (Atrophie) und Abnahme der Fibroblastenzahl, während es mit reiner UV-Strahlung eher zu einer Epidermisverdickung (Hyperplasie) ohne offensichtlichen Effekt auf die Fibroblasten kommt.

- Akute Bestrahlung von 3D Hautäquivalenten mit HaSKpw Zellen mit UVA+B (1 MED), UVA (UVA: 49,5kJ/m<sup>2</sup>) und UVB (0,78kJ/m<sup>2</sup>) führte in keinem Fall zu morphologischen Veränderungen.

- Chronische Bestrahlung mit UVA+B (1 MED), UVA (UVA: 49,5kJ/m<sup>2</sup>) und UVB (0,78kJ/m<sup>2</sup>), 3 x/Woche für 2 Wochen von 3D Hautäquivalenten mit HaSKpw Zellen wurde durchgeführt.

Zu 2.3) • Age-OTKs: Auswertung des ersten OTK Experiments zur Alters-abhängigen UV Sensitivität:

- In OTKs mit jungen Fibroblasten entwickelt sich eine gut stratifizierte und differenzierte Epidermis, die auch unter Bestrahlung morphologisch unverändert erhalten bleibt.

- Die Epithelien der OTKs mit den alten Fibroblasten weisen generell eine Defizienz in der Stratifizierung auf (weniger Zellschichten). Unter chronischer Bestrahlung (3 x/Woche für 2 Wochen) mit KAUVIR Gesamtspektrum (1MED) nicht aber mit UVA+B (0,78kJ/m<sup>2</sup> UVB, 49,5 kJ/m<sup>2</sup> UVA) kommt es zu einer verbesserten Stratifizierung der Epidermis. Dies wird auch durch das verbesserte Expressionsprofil von K10 (epidermaler Differenzierungsmarker) bestätigt. Die Proliferationsrate in den unterschiedlichen Ansätzen und die Rolle von Bestrahlung auf die Basalmembran, speziell Kollagen VII, das mit alten Fibroblasten reduziert ist, wird derzeit bestimmt.

Zu 2.4) • Bei der weitere Auswertung und Verifizierung der RNA Daten aus den Mikroarray Analysen zeigte sich, dass neben einer deutlich veränderten ECM (extrazelluläre Matrix) Regulation in den dermalen Fibroblasten durch CyclosporinA (CsA) und einer verstärkten EMT (epithelial to mesenchymal transition) in der Epidermis, in Epidermis und Dermis eine veränderte Regulation des mTOR Pathway induziert wird.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Zu 2) • Finalisierung der Publikation zum Einfluss von Serum auf das Wachstum und Schadensprofil der Keratinozyten durch UV-Strahlung.

Zu 2.2) • Fertigstellung der Telomerlängenanalyse nach chronischer Bestrahlung von OTKs mit UVA versus UVA+B.

- Auswertung des chronischen Bestrahlungsexperiments und Wiederholungsexperimente zur akuten und chronischen Bestrahlung der HaSKpw Zellen in 3D Hautäquivalenten.

Zu 2.3) • Weitere Auswertung des primären OTK Experiments zur Alters-abhängigen UV Sensitivität (Proliferation/Schadensinduktion/Matrixmodulation) nach Bestrahlung mit UVA+B versus KAUVIR Gesamtspektrum. Materialaustausch mit Buxtehude zur CpD Analyse.

- Ansatz eines Wiederholungsexperiments mit UVA+B versus KAUVIR Gesamtspektrum mit anderen alten und jungen Fibroblasten, um Zellspezifika auszuschließen.

Zu 2.4) • Zur Verifizierung der Relevanz des veränderten mTOR Pathways wird ein OTK Bestrahlungsexperiment (KAUVIR Gesamtspektrum) mit CsA unter mTOR Inhibition durchgeführt.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

- April 2018: Spring School: Kompetenzerhalt im Strahlenschutz, “Non-ionizing and ionizing radiation: Mechanisms and consequences”, Schloss Mickeln, Düsseldorf, Organisation und Vortrag

- Mai 2018: 24. Sitzung vom KVSF, Bonn, Themenschwerpunkt UV-Strahlung, Vortrag zu: Molekulare Grundlagen von Hautkrebs

- Mai 2018: 4th Mancunian Skin Club 2018, Annual International Workshop on Skin Aging, Manchester UK, Vortrag

- Finalisierung des Musterschutzes für die KAUVIR Lampe

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Elbe Kliniken Stade-Buxtehude GmbH, Bremervörder Str. 111, 21682 Stade		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 036B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt KAU VIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2014 bis 31.08.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 891.400,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Greinert	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Der Zusammenhang der biologischen Wirkungen der einzelnen spektralen Komponenten im solaren Spektrum ist komplex und im Einzelnen nicht verstanden. Durch den Einsatz der Kombinationsstrahlung soll besser verstanden werden, wo Unterschiede zur Einzelbestrahlung auftreten und Erkenntnisse gewonnen werden, wie sich solare Strahlung in ihren biologischen Effekten von eher „artifizierender“ Einzelbestrahlung unterscheiden kann. Ziel der Arbeiten ist es, die Bedeutung von zellulären Antworten und Reparaturprozessen für die Hautkrebsentstehung nach Induktion von UV-Schäden durch Kombinationsstrahlung (UV-VIS-IR) im Detail zu erforschen. Dazu ist es notwendig, (i) die Schadeninduktion und im besonderen Maße die nachfolgende DNA-Reparatur nach Kombinationsstrahlung im Vergleich zu anderen UV-Strahlenqualitäten (UVA und UVB) zu untersuchen; (ii) unterschiedliche Expositionsmuster (chronisch vs. akut) miteinander zu vergleichen; (iii) UV-VIS-IR-induzierte epigenetische Veränderungen in „nativem Material“ und in Zelllinien aus Tumormaterial zu charakterisieren; (iv) molekulare und zelluläre Antwort mittels Ausschalten oder Aktivierung von Schlüsselfaktoren zu beeinflussen. Es ist das Ziel, bei den Punkten (i) – (iv) insbesondere den Einfluss von microRNAs und epigenetischen Faktoren (DNA-Methylierung, Histon-Methylierung) zu bestimmen. In Kooperation mit AG1 (Heidelberg) werden Zellkulturproben (humane Keratinozytenzelllinie) und OTKs (organotypische Kultur) untersucht, die mit einer chronischen oder akuten Kombinationsbestrahlung behandelt sind. In Kooperation mit AG3 (Düsseldorf) werden Schadeninduktion und Reparatur der in vivo mit UV-VIS-IR bestrahlten Mausproben untersucht. Die Messungen zu Reparaturkinetiken und Histonmodifikationen werden eng mit AG4 (Darmstadt) koordiniert.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Untersuchung der epigenetischen Veränderungen (z. B. globale DNA-Methylierung, Promotor-Methylierung oder Histonmodifikationen) und der Expressionsänderungen von microRNAs nach chronischer oder akuter Bestrahlung mit einer UV-VIS-IR Kombinationsbestrahlung.
- AP2: Charakterisierung der epigenetischen Veränderungen in „nativem Material“ und in Zelllinien aus Tumormaterial.
- AP3: Untersuchung welche Faktoren und Mediatoren nach UV-VIS-IR auftretende epigenetische Modifikationen bewirken.
- AP4: Messung von Reparaturkinetiken nach Kombinationsbestrahlung.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Arbeitspaket 4: Messung der Apoptose und Bestimmung der Schadensinduktion in HaCaT Zellen nach akuter Kombinationsbestrahlung.

Ergebnisse: Für die Kombinationsbestrahlung wurde das Spektrum der KAUVIR-Lampe mit Hilfe der Filter Asahi SP325 und Schott B270 im UVB-Bereich und durch den Filter Schott WG320 im UVA-Bereich optimiert. Die Induktion der Apoptose in HaCaT-Zellen durch die UV-VIS-IR Kombinationsbestrahlung wurde 48 Stunden nach der Bestrahlung mittels „Annexin V“ Färbung im Flusszytometer (Guava 8HT) ermittelt. Neben der Kombinationsbestrahlung mit zwei verschiedenen Dosen (UVB:  $0,5 \text{ kJ/m}^2$  + UVA:  $32 \text{ kJ/m}^2$  + VIS:  $87 \text{ kJ/m}^2$  + IRA:  $276 \text{ kJ/m}^2$ , Bestrahlungsdauer 17 Min 30 Sek und UVB:  $1 \text{ kJ/m}^2$  + UVA:  $64 \text{ kJ/m}^2$  + VIS:  $175 \text{ kJ/m}^2$  + IRA:  $552 \text{ kJ/m}^2$ , Bestrahlungsdauer 35 Min)) wurde der Effekt der einzelnen Strahlenkomponenten untersucht. Für beide Dosen konnte nach IRA, VIS und UVA kein Apoptose-induzierender Effekt nachgewiesen werden. Durch Kombinationsbestrahlung wurden nach der einfachen Dosis 10,6 % ( $\pm 1,2$ ) apoptotische Zellen induziert, durch Verdoppelung der Dosis stieg auch der Anteil apoptotischer Zellen mit 18 % ( $\pm 5,2$ ) auf das nahezu Doppelte an. Durch Bestrahlung mit den Einzelkomponenten UVB oder UVB+UVA wurden mit der niedrigeren Dosis 8,9 % ( $\pm 0,7$ ) bzw. 8,6 % ( $\pm 0,5$ ) apoptotische Zelle induziert, bei der doppelten Dosis lagen diese Werte bei 12,4 % ( $\pm 1,7$ ) bzw. 15,1 % ( $\pm 2,9$ ). Obwohl nicht signifikant, deutet der jeweilige Vergleich mit der Kombinationsbestrahlung auf einen möglichen Apoptose-reduzierenden Effekt durch die VIS und IRA-Anteile des Spektrums hin. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dieser Effekt verifiziert werden kann. Neben der Apoptose wurde auch die Induktion von DNA-Schäden (CPD) durch Kombinationsbestrahlung in untersucht. Die CPDs wurden mit dem monoklonalem Anti-Thymin-Dimere Antikörper (Klon KTM53) angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Die CPD-Induktion durch Kombinationsbestrahlung (UVB:  $0,5 \text{ kJ/m}^2$  + UVA:  $32 \text{ kJ/m}^2$  + VIS:  $87 \text{ kJ/m}^2$  + IRA:  $276 \text{ kJ/m}^2$ , Bestrahlungsdauer 17 Min 30 Sek) wurde mit dem Effekt der Einzelkomponenten UVB, UVA, UVB+UVA, VIS, IRA verglichen. Nach Bestrahlung mit IRA, VIS und UVA konnte keine CPD-Induktion nachgewiesen werden. Die Kombinationsbestrahlung sowie die Exposition mit UVB und UVB+UVA induzierten eine ähnliche Anzahl an CPDs (etwa 160 Einheiten). Bei einer Verdoppelung der Dosis konnte für alle drei Bestrahlungsmodalitäten eine CPD-Induktion von 280 Einheiten ermittelt werden. Auch bei dieser Dosis konnte keine CPD-Induktion durch IRA, VIS und UVA detektiert werden. Weiterführend wurden CPD-Reparaturkinetiken in HaCaT nach UVB ( $0,5 \text{ kJ/m}^2$ ) und UVB ( $0,5 \text{ kJ/m}^2$ ) +UVA ( $32 \text{ kJ/m}^2$ ) bestimmt. Beide Strahlungsprotokolle induzierten gleiche Menge an Schäden. In beiden Fällen sind die Schäden nach 7 Tagen weitgehend repariert. Die Reparaturzeitkonstante beträgt nach UVB-Bestrahlung 54 h und nach UVB+UVA-Bestrahlung 48 h. Der Versuch wird momentan wiederholt und auf die Kombinationsbestrahlung erweitert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die auf photophysikalischen/photochemischen Prozessen basierende, im solaren Spektrum überwiegend durch UVB (weit weniger durch UVA) bewirkte, Induktion von CPDs nicht durch die anderen Strahlenkomponenten (VIS und IRA) beeinflusst wird. Es gibt jedoch erste Hinweise, dass bei biologischen Endpunkten, denen einen Prozessierung der CPDs zugrunde liegt, wie z. B. der Apoptose, durchaus Effekte erwartet werden können.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP1: Untersuchung der epigenetischen Veränderungen und der Expressionsänderungen von microRNAs nach Bestrahlung mit einer UV-VIS-IR Kombinationsbestrahlung.

AP3: Bestimmung der DNMT-Aktivität/Expression nach akuter Bestrahlung mit einer UV-VIS-IR Kombinationsbestrahlung.

AP4: Bestimmung der Reparaturkinetik in HaCaT Zellen nach der akuten Kombinationsbestrahlung.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> IUF – Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 036C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2014 bis 31.08.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 602.574,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Krutmann	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das solare Spektrum der Sonne wird im Allgemeinen in drei unterschiedliche spektrale Komponenten unterteilt: Die ultraviolette Strahlung (UV), das sichtbare Licht (VIS) und die Infrarotstrahlung (IR). Das Wirk- und Schädigungsprofil jeder einzelnen Strahlungskomponente ist allerdings sehr unterschiedlich. Um eine relevante und aussagekräftige Risikoabschätzung treffen zu können sind Studien, die die kombinierte Aktion von UV- bis IR-Strahlung in ihrer biologischen Wirksamkeit untersuchen, unerlässlich. Durch die Analyse unterschiedlicher Parameter in 2D- wie auch in speziellen, Gewebe-relevanten 3D-organotypischen Kulturen (OTKs) zur Identifizierung und Langzeitregeneration der epidermalen Stammzellen und der in vivo Maushaut soll es ermöglicht werden, die Wirkmechanismen kombinierter Strahlung auf zellulärer und (epi)genetischer Ebene aufzuklären.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Führt die Kombinationsbestrahlung in primären dermalen Fibroblasten zu einer Beeinflussung der mitochondrialen Integrität und der Funktion des Proteasoms?
- AP2: Führt die Kombinationsbestrahlung in primären humanen Keratinozyten zur Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) Signalwegs?
- AP3: Führt die akute Kombinationsbestrahlung in vivo zu gleichen Ergebnissen?
- AP4: Welche Konsequenz hat chronische Kombinationsbestrahlung in vivo?
- AP5: Führt IRA bzw. Kombinationsbestrahlung zur Immunsuppression?

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Arbeitspaket 1, 2: Wirkung der Kombinationsbestrahlung auf dermale und epidermale Hautzellen.

Ergebnisse:

Unsere bisherigen Befunde zeigten, dass i) die Apoptoserate nach simultaner Bestrahlung (UVB+UVA, UVB+UVA+IRA, UVB+UVA+VIS+IRA) im Vergleich zur UVB-Einzelbestrahlung signifikant geringer ist, ii) und dosisabhängig durch UVA-Strahlung vermittelt wird, (iii) dieser Effekt nicht durch VIS und IRA modifizierbar ist, und ihm eine UVA-induzierte Modulation des extrinsischen Apoptose Signalwegs auf Ebene der Zellmembran zu Grunde liegt. In diesem Berichtszeitraum konnte neu gezeigt werden, dass (iv) dieser Effekt sich nicht nur in HaCaT Keratinozyten, sondern auch in primären humanen Keratinozyten beobachten lässt. Darüber hinaus wurde mittels spezifischer Caspase-Inhibitoren und Substanzen, die gezielt die Struktur bzw. die Zusammensetzung der Zellmembran modifizieren, gezeigt, dass (v) die durch UVA-Strahlung vermittelte Modulation der UVB-induzierten extrinsischen Apoptose durch UVA-induzierte Veränderungen in der Lipid-Zusammensetzung der Zellmembran zu erklären ist. Dies führt zu einer verminderten Trimerisierung von Todesrezeptoren und somit zu einer reduzierten Aktivierung der Caspase-8 bzw. Caspase-3.

Die innerhalb des Konsortiums beschlossenen Modifikationen an der KAUVIR-Lampe wurden durchgeführt.

Arbeitspakete 3, 4 und 5: Sämtliche Modifikationen wurden ebenfalls an der für die in vivo Versuche vorgesehenen Bestrahlungseinheit vorgenommen. Aktuell werden die ersten in vivo Versuche unter Verwendung akuter Bestrahlungsprotokolle durchgeführt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Arbeitspaket 1, 2: Der nach Kombinationsbestrahlung auftretende modulierende Effekt von UVA-Strahlung auf die UVB-induzierte Apoptose soll in den nächsten Experimenten weiter charakterisiert werden. Hierfür werden in den aktuellen Experimenten sequentielle Bestrahlungen mit Kombinations- und Einzelbestrahlungen verglichen.

Arbeitspakete 3, 4 und 5: Nach Abschluss der ersten in vivo Experimente, in denen die akute Stressantwort nach Einzel- und Kombinationsbestrahlung untersucht wird, werden wir die ersten Langzeitbestrahlungen durchführen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Krutmann J., Sondenheimer K., Grether-Beck S., Haarmann-Stemmann T. (2018): Combined, Simultaneous Exposure to Radiation Within and Beyond the UV Spectrum: A Novel Approach to Better Understand Skin Damage by Natural Sunlight. In: Krutmann J., Merk H. (eds.) *Environment and Skin* (pp 11-16). Springer, Cham

Sondenheimer K and Krutmann J (2018): Novel Means for Photoprotection. *Front. Med.* 5:162.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 036D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt KAU VIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2014 bis 31.08.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.024.872,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Rapp	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das solare Spektrum enthält unterschiedliche spektrale Komponenten: UVA, -B, sichtbares Licht und Infrarot, die jeweils ein unterschiedliches biologisches Wirk- und Schädigungsprofil aufweisen. Für das Verständnis der schädlichen Wirkung für den Menschen und für eine daraus resultierende relevante Risikoabschätzung ist es essentiell, die kombinierte Aktion von UV- bis IR-Strahlung in ihrer biologischen Wirksamkeit in Modellsystemen der Haut zu untersuchen. Durch die Analyse unterschiedlicher Parameter in 2D- wie auch in speziellen 3D-organotypischen Kulturen zur Identifizierung und Langzeitregeneration der epidermalen Stammzellen und der in vivo Maushaut soll es ermöglicht werden, die Wirkmechanismen kombinierter Strahlung auf zellulärer und (epi)-genetischer Ebene aufzuklären.

Teilprojekt D befasst sich mit folgenden Fragen: Realisierung und Validierung der Strahlungsquelle mit unterschiedlichen spektralen Anteilen. Charakterisierung des DNA Schadens der Kombinationsstrahlung im Vergleich zu den einzelnen Strahlqualitäten. Charakterisierung der DNA Reparaturkinetiken der Kombinationsbestrahlung im Vergleich zu den einzelnen. Differenzierte DNA Schadensprofile in Zellen die der Hautalterung unterlegen sind.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Für die Umsetzung wird eine kombinierte und bezüglich UVA und –B variable Strahlenquelle für alle AGs entwickelt. Die Forschungsschwerpunkte der Verbundpartner sind: Gewebe- und Telomerregulation (AG1); epigenetische Kontrolle zellulärer Funktionen auf DNA- bzw. Histon-Ebene (AG2); IR-Signaling/Mitochondrienintegrität und AhR-Signaling (AG3); DNA Reparatur und Damage Signaling (AG4); Die enge Zusammenarbeit der interdisziplinär aufgestellten AGs schafft Synergieeffekte, die neben der wissenschaftlichen Diskussion den Austausch von Methoden und Materialien, gemeinsame Publikationen sowie die Ausbildung von Nachwuchswissenschaftlern betreffen.

Die Arbeitspakete und Meilensteine des Teilprojekts D sind:

- Konstruktion, Charakterisierung und Validierung der Strahlungsquelle  
Planung, Simulation und praktische Umsetzung der Konstruktion der Kombinationsstrahlenquelle inklusive Einkopplung in ein Mikroskop (MS1)
- Wellenlängenabhängigkeit der DNA Schadensantwort  
Charakterisierung der Schadensantwort im Lebendzellsystem bei Kombinations- und Einzel-Bestrahlung (MS2+3)
- DNA Schadensprofile der Kombinationsbestrahlung  
Messung der DNA Schadensprofile nach isolierter und kombinierter Exposition (MS4)

- DNA Schadensantwort und Zellalterung  
Vergleichende Charakterisierung der DNA Reparatur in gealterten, Chondrozyten-ähnlichen Fibroblasten und nicht gealterten Fibroblasten, unter Verwendung der Lebendzellmikroskopie (MS5).

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im Berichtszeitraum wurde die im Projektantrag beschriebene Spring School: Kompetenzerhalt im Strahlenschutz “Non-ionizing and ionizing radiation: Mechanisms and consequences” gemeinsam vom KAUVIR Konsortium in Düsseldorf durchgeführt (25.-27.4.2018). Dabei waren mehr als zehn Sprecher aus den unterschiedlichsten Bereichen der ionisierenden und nichtionisierenden Strahlenforschung anwesend, die verschiedene Aspekte der Strahlenforschung und des Kompetenzerhalts den über 20 Teilnehmern aus unterschiedlichen Standpunkten präsentierten. Es wurden unterschiedliche Gesichtspunkte aus der Perspektive der industriellen Forschung, des Strahlenschutzes sowie der aktuellen Forschung präsentiert. Hervorzuheben ist, dass die Teilnehmer nicht nur aus den Reihen des Konsortiums, sondern aus mehreren weiteren Institutionen und sogar aus dem Ausland an der Spring School teilgenommen haben.

Im Rahmen des Lampenbaus wurden im Januar und März 2018 die letzten Filter (UVB longpass und UVB shortpass) geliefert und im Anschluss in allen Anlagen installiert. Basierend auf dieser neuen Filterkombination wurde die passende Abschwächung der UVB-Strahlungsquelle neu vermessen und in den einzelnen Bestrahlungsanlagen angepasst. Im Rahmen der Spring School wurde im Anschluss daran von allen Projektpartnern die aktuelle Dosimetrie präsentiert sowie die für die Ringvalidierung notwendigen Messungen besprochen. Die physikalische Ringvalidierung wurde im Berichtszeitraum in jeder Gruppe durchgeführt und zentral beim Projektpartner in Buxtehude ausgewertet. Basierend auf diesen Validierungsergebnissen werden momentan die biologischen Ringvalidierungen an jeder Bestrahlungsanlage durchgeführt.

Für die Projektarbeiten innerhalb des Konsortiums wurde die beiden ausgewählten Zelllinien (HaCat und HaSKpw) weiter charakterisiert. Dabei wurden zusätzlich zu den bereits im vergangenen Zeitraum durchgeführten Charakterisierungen im physiologischen Zustand (unbestrahlt), Bestrahlungsexperimente mit einzelnen Wellenlängenregimen durchgeführt und die Zelllinien hinsichtlich der folgenden Parameter untersucht: Koloniebildung, Wachstumskurven, Zellzyklusverteilung zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis 48 h nach Exposition, Zellmigration, Wundheilungsassays (Scratch-Assay), CPD-Induktion und Reparatur, 6-4-Photoprodukt-Induktion und Reparatur und Apoptosemessung. Diese Daten dienen als Referenz für die anschließenden Kombinationsbestrahlungen und können durch Vergleiche mit bisherigen Daten mit weniger stringent gefilterten Bestrahlungsquellen bereits Aufschlüsse über Kombinationsbestrahlungseffekte ermöglichen. Ebenso wurden zu diesen Endpunkten weitere Kombinationsbestrahlungsexperimente durchgeführt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Oberste Priorität hat im folgenden Berichtszeitraum der Abschluss der Ringvalidierung aller Bestrahlungsanlagen. Dafür werden die biologischen Validierungen an allen Anlagen abgeschlossen und zentral ausgewertet. Als eine zusätzliche Sicherheit wird nochmals eine physikalische, spektroskopische Messung an allen Anlagen durchgeführt.

Für die weitere Charakterisierung der kombinatorischen Bestrahlung werden zurzeit weitere Endpunkte etabliert (MS 2 und 4). Dazu gehört die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die quantitative Messung von 8-oxo-dG mittels ELISA. Darüber hinaus werden momentan DNA Schadensmessungen, die in situ (Comet-assay und Immunfärbung) bereits abgeschlossen sind, durch Slot-blot Messungen komplettiert. Für die Lebendzellanalyse werden weitere Farbstoffe und Alternativen zu genetisch kodierten Fluoreszenzmarkern getestet (SNPA- und CLIP-tags).

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 037A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2014 bis 31.08.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 992.585,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Jakob	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

In dem hier vorgestellten Projekt soll der Einfluss der Organisation des Chromatins in Säugerzellen auf die Strahlenantwort und Reparatur der erzeugten Schäden untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei in dem Wechselspiel von Chromatinstruktur und Schadenskomplexität, wie sie bei Verwendung dichtungisierender Teilchenstrahlung auftritt. In Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen Prof. Dr. M. Löbrich (TU Darmstadt) und Prof. Dr. G. Iliakis (Universität Duisburg-Essen) werden dazu verschiedene Schwerpunkte bearbeitet und die übergeordnete Fragestellung aus unterschiedlichen Blickwinkeln angegangen. Über das Ziel hinaus, wissenschaftliche Ergebnisse und Erkenntnisse zu gewinnen, soll wissenschaftlicher Nachwuchs ausgebildet werden, um so zum Kompetenzerhalt in der Strahlenforschung beizutragen. Dazu dient die Einstellung von Doktoranden und die Rekrutierung beziehungsweise Weiterbeschäftigung von talentierten Postdoktoranden, die neben der eigentlichen Forschungsarbeit durch die Vernetzung im Verbundprojekt sowie die regelmäßigen Seminare über strahlenbiologische und strahlenbiophysikalische Themen an die Strahlenforschung herangeführt bzw. die vorhandenen Kenntnisse vertieft werden.

Im Teilprojekt (AP1: Einfluss der Chromatinstruktur und strukturbildender Faktoren auf die frühen Ereignisse von Reparaturprozessen nach Bestrahlung) der GSI liegt der Schwerpunkt der Untersuchg. in der Wechselwirkung heterochromatischer und chromatinmodulierender Faktoren auf die Reparatur komplexer DNA Schäden nach Teilchenbestrahlung. Hierbei wird bes. der Einfluss der Komplexität auf die Auswahl des Reparaturweges untersucht, aber auch die räumliche Lage und gegebenenfalls Umorganisation der Schäden bezüglich des nukleären Heterochromatins im zeitlichen Verlauf der Schadensprozessierung und Reparatur mit einbezogen. Ein besseres Verständnis dieser zellulären Vorgänge und insbesondere die Rolle der Chromatinkompaktierung beziehungsweise der räumlichen Lage der DNA Schäden sollen bessere Vorhersagen und Risikoabschätzungen möglich machen. Strahlenbiologisch relevante molekularbiologische und mechanistische Erkenntnisse können dazu beitragen, die Strahlentherapie von Tumoren im Sinne kombinatorischer Therapieansätze weiterzuentwickeln.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1:

- Erfassung und Identifizierung strahlungsinduzierter Interaktionspartner strukturbildender heterochromatischer Faktoren.
- Bestimmung der Relevanz dieser Faktoren oder Interaktionen für die räumlich-zeitliche Organisation der DNA Reparatur und deren Ausgang.
- Optimierung und Erweiterung von Methoden/Techniken zur Beobachtung und Quantifizierung strahlungsabhängiger Chromatindekondensation.
- Geklärt werden soll auch die Größenverteilung der Schadensdomänen als Grundlage für die Weiterentwicklung des „Local Effect Models zur Übertragung experimenteller Daten aus Röntgenstrahlexperimenten auf die Effekte nach Teilchenbestrahlung“.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Nachdem bereits früher im Projekt nach Kohlenstoffbestrahlung eine Verringerung der CtIP und RPA Rekrutierung an DNA Doppelstrangbrüche (DSB) nach RNF138 kd gezeigt wurde, konnte nun auch in den neu etablier-

ten stabilen RNF138-KO-Zellen nach Röntgenbestrahlung eine verringerte RPA-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die U2OS-RNF138-KO Zelllinie wurde zudem genutzt, um die DSB Reparatur nach Röntgenbestrahlung zellzyklusabhängig zu untersuchen. Es zeigte sich weder in G1- noch in G2-Phase-Zellen ein DSB-Reparaturdefekt der RNF138-defizienten Zellen nach Röntgenbestrahlung, obwohl in der Literatur (Ismail et al. Nat Cell Biol 2015) eine deutliche Strahlensensitivierung nach RNF138kd beschrieben wurde.

Mit Hilfe des zuvor etablierten ubiquitinabhängigen Pulldowns konnte nachgewiesen werden, dass die strahlungsabhängige Ubiquitinierung von CtIP in G1 im Gegensatz zur Ubiquitinierung von Ku80 RNF138 abhängig erfolgt. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass RNF138 nach Induktion komplexer DNA-Schäden auch in G1 eine resektionsabhängige DSB-Reparatur durch CtIP Ubiquitinierung stimuliert.

Zur Klärung der Frage, welche mechanistische Grundlage hinter der beobachteten Reparaturverzögerung nach Alphabestrahlung und Sirtuininhibition steht, wurde untersucht, ob die Regulation der Resektion via CtIP-Deacetylierung verantwortlich ist. Dazu wurde der Einfluss des Sirtuin Inhibitors Nicotinamid auf die Ausbildung strahlungsabhängiger RPA Foci (Resektionsmarker) nach Alpha- und Röntgenstrahlung untersucht. In beiden Fällen ergab sich kein signifikanter Einfluss der Sirtuininhibition auf die Anzahl strahlungsinduzierter RPA Foci.

Im Bereich der Chromatinkompaktierungs-Messungen mittels Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (FLIM) über Förster-Resonanztransfer (FRET) von nucleosomalen Histonen konnte der Einfluss der Linkerlänge zwischen Histon und Chromophor gezeigt werden. Dadurch ergeben sich Ansätze für zukünftige Optimierungen.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

Nach Feng & Chen (Nat Struct Mol Biol 2012) ist RNF8 in G1-Phase-Zellen essentiell, um Ku80 ubiquitinierungsabhängig von DNA Schäden im Zuge des cNHEJ zu entfernen. Die kommenden Strahlzeiten im Herbst sollen genutzt werden, um mittels Ubiquitinierungs-Pulldown zu klären, ob RNF8 auch bei komplexen Schäden in G1 notwendig ist, um resektionsabhängige DSB-Reparatur zuzulassen, für die eine Entfernung von Ku80 essentiell ist. Des Weiteren soll mittels Inhibitoren getestet werden, ob die ATPase VCP/p97 für die Entfernung von ubiquitiniertem Ku80 vom strahlungsinduzierten DSB wichtig ist und Auswirkungen auf die resektionsabhängige Reparatur zeigt. Darüber hinaus soll die direkte Interaktion von RNF138 mit Ku80 bzw. CtIP mittels Co-IP sowie die Rekrutierung dieser Faktoren an komplexe Schäden zellzyklusabhängig untersucht werden. Die Ionenbestrahlung soll auch genutzt werden, um die DSB-Reparatur der RNF138-KO-Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen sowie das zelluläre Überleben nach Induktion komplexer Schäden zu testen.

Die Bindung des Linkerhistons H1 an die DNA ist maßgeblich an der Kompaktierung des Chromatins und einer damit verbundenen Aggregation der Nucleosomenstruktur im Heterochromatin beteiligt. Deshalb soll getestet werden, ob das Linkerhiston H1 besser für einen kompaktierungsabhängigen Resonanztransfer zu dem nucleosomalen Histon H2B geeignet ist als die Kombination zweier nucleosomaler Histone.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

E. Abdollahi, G. Taucher-Scholz and Burkhard Jakob: Radiation-induced chromatin compaction changes measured utilizing fluorescence lifetime imaging microscopy of DNA binding dyes *Intl. J. Mol. Sci., submitted*

E. Janiel, G. Becker, G. Taucher-Scholz and B. Jakob: Establishing NAD(P)H lifetime measurements for the analysis of the interplay between radiation and energy metabolism, *GSI Scientific Report 2017 (GSI Report 2018-1)*

E. Abdollahi, L. Pack, G. Taucher-Scholz and B. Jakob: Inspection of counting loss and pile up effect on fluorescence lifetime recording of radiation-induced chromatin decompaction, *GSI Scientific Report 2017 (GSI Report 2018-1)*

A. Heselich, L. Pack, G. Taucher-Scholz and B. Jakob: Influence of Sirtuin Inhibitor Nicotinamide on Radiation-induced DNA Damage Repair, *GSI Scientific Report 2017 (GSI Report 2018-1)*

C. Barent, L. Pack, A. Heselich, B. Jakob, G. Taucher-Scholz and N. B. Averbeck: DNA end resection is decreased in RNF138 knockout cells upon irradiation, *GSI Scientific Report 2017 (GSI Report 2018-1)*

S. Tonnemacher, G. Becker, A. Heselich, G. Taucher-Scholz and B. Jakob: Use of TC-Tag and ReAsH as a DNA DSB Marker in CLEM, *GSI Scientific Report 2017 (GSI Report 2018-1)*

M. Schork, M. Kremenovic and A. Heselich: Optimization of the detection of chromatin compaction using FLIM-FRET. *Bericht Mastermodul 2018*

N. Pritsch, I. Gregorz and N. Averbeck: RPA inhibition in DNA damage response. *Bericht Mastermodul 2018*

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 037B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2014 bis 31.08.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 752.328,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Iliakis	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Seit vielen Jahren war die gängige Hypothese in der Strahlenbiologie, dass DSB Reparatur ausschließlich durch die Mechanismen des D-NHEJ und der HRR stattfindet. Allerdings zeigen neuere Arbeiten, die zu einem wesentlichen Anteil aus unserem Institut kommen, dass, bei Versagen des D-NHEJ, nicht HRR sondern eine alternative, backup Form von NHEJ (B-NHEJ) die Funktion von D-NHEJ übernimmt. In den letzten Jahren ist auch das Zusammenwirken von genomischer Architektur und Protein-Modifikation bei der DSB Reparatur in den Fokus geraten. Welcher Reparaturweg gewählt wird, scheint neben der Komplexität des Schadens, auch von der Chromatinstruktur im Schadensbereich bestimmt zu werden. Ziel des vorliegenden Projektes ist es, den Einfluss der Chromatinstruktur auf die Funktion des B-NHEJ zu untersuchen und zu testen, inwiefern die starke Einschränkung dieses Reparaturweges, die in G0 Zellen beobachtet wird, auf die Kondensierung des Chromatins zurückzuführen ist.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Die Rolle der Kondensierung des Chromatins auf die Hemmung von B-NHEJ. DAPI-Färbung in Kombination mit quantitativer Bildanalyse wird für die Quantifizierung der Kondensierung des Chromatins eingesetzt.
- AP2: Der Einfluss von induzierten Änderungen der Chromatinstruktur durch hypotonische Behandlung auf den B-NHEJ in G0-Zellen.
- AP3: Die Zusammenhänge zwischen der Änderung der DNA Methylierung und der Chromatin Kondensierung einerseits und zwischen der Änderung der DNA Methylierung und B-NHEJ andererseits. Dafür wird die Behandlung mit 5-Aza-C und die damit assoziierten Änderungen der Chromatinstruktur durch DAPI Färbung erfasst und quantifiziert. Ziel ist es, unter optimierten Behandlungsbedingungen, die eine maximale Veränderung in der Chromatinstruktur verursachen, die B-NHEJ Aktivität zu quantifizieren. Die DNA Methylierung wird auch mittels Elisa bestimmt und durch Sequenzierung von Bisulfit modifizierter DNA in Gruppen von 3-6 CpGs verifiziert.
- AP4: Der Methylierungsstatus von G0 und G1 Zellen wird untereinander und mit Parametern, die die B-NHEJ Aktivität beeinflussen, verglichen.
- AP5: Der Einfluss von miRNAs, die die Expression von DNA Methyltransferase (DNMT1) regulieren, auf die Aktivität von B-NHEJ.
- AP6: Die Auswirkungen von Proteinen der HP1 Familie durch Überexpression bzw. Suppression mittels RNA-Interferenz auf die B-NHEJ Aktivität.
- AP7: Da Zellen mit Defekten in DNA-PKcs keine Hemmung von B-NHEJ in G0 zeigen, sollen die Wechselwirkungen von DANN-PK auf die Chromatinstruktur analysiert werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass globale Chromatinrelaxierung, induziert durch Inkubation in hypotonem Medium, die Zellteilung (gemessen an Zellzahlen, H3pS10-Färbung, DNA-Färbung und Durchflusszytometrie) vorübergehend stoppt. Diese Unterbrechung ist unabhängig von den bekannten G2-Checkpoint induzierenden Kinasen (ATM und ATR) und nur auf die Veränderung der Chromatinstruktur zurückzuführen. Des Weiteren konnte mithilfe von DSB-Reporterassay-Zelllinien gezeigt werden, dass globale Chromatinrelaxierung die Reparatureffizienz von c-NHEJ, HRR und auch alt-EJ erheblich verschlechtert, aber Single-Strand-Annealing (SSA)-Reparaturevents um das Dreifache steigert. Globale Chromatinkondensierung hingegen (induziert durch Behandlung mit hypertonem Medium) inhibiert alle untersuchten DSB Reparaturwege. In Survival-Experimenten wurde ebenfalls eine stärkere Sensibilisierung der Zellen auf IR durch Chromatinkondensierung im Gegensatz zur Relaxierung festgestellt.

Um die Mechanismen des Methyltransferase-Inhibitors Chaetocin, der für eine verbesserte Reparatur durch alt-EJ in serum-deprivierten HCT116 Lig4<sup>-/-</sup> Zellen sorgt, besser zu verstehen, wurden Schlüsselemente der DDR-Signalwege (ATM, ATR und CDKs) untersucht. Die Kombination von Chaetocin mit der Inhibierung von ATM zeigte eine Abhängigkeit der verbesserten alt-EJ Effizienz von ATM. Da diese Kinase an den MRN Komplex gebunden ist und zusammen mit CtIP die Resektion der Brüche einleitet, wurde untersucht, ob CtIP-Level (die in serum-deprivierten Zellen niedriger sind) durch die Behandlung mit Chaetocin wieder erhöht werden. Allerdings konnte weder eine Veränderung der CtIP-Level noch ein Unterschied in der Reparatureffizienz durch die Inhibierung von MRN in Kombination mit Chaetocin gefunden werden, was darauf schließen lässt, dass Resektionsfaktoren hier keine entscheidende Rolle spielen.

Der Umstand, dass DNA-PK defiziente Zellen im Gegensatz zu anderen, in Komponenten des c-NHEJ defizienten Zelllinien, keine Inhibierung des alt-EJ in der G0-Phase zeigen, sollte im Zusammenhang mit der Resektion untersucht werden. Vorherige Studien haben gezeigt, dass DNA-PK defiziente Zelllinien eine erhöhte Resektionsrate vorweisen, was als mögliche Erklärung für die verbesserte Reparatureffizienz des alt-EJ dienen könnte. In verschiedenen c-NHEJ defizienten Zelllinien (MEF Lig4<sup>-/-</sup>, Ku70<sup>-/-</sup>, Ku80<sup>-/-</sup> und DNA-PKcs<sup>-/-</sup>) konnte nach Bestrahlung mit 20 Gy Resektionsaktivität beobachtet werden, so lange die Zellen in der exponentiellen Phase waren. Sobald sich die Zelllinien aber in der Plateau-Phase befanden, konnte keine Resektion mehr festgestellt werden, auch nicht in DNA-PKcs defizienten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Parameter, die über die Resektionsaktivität hinausgehen die Aktivität von alt-EJ beeinflussen.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- Um die Strahlensensibilisierung der Zellen, die durch globale Chromatinkondensierung und -relaxierung hervorgerufen wird, weiter zu untersuchen, werden mittels Zytogenetik Metaphasen nach entsprechender Behandlung auf Translokationen hin untersucht.
- Um die Effekte von Chaetocin auf die Reparatureffizienz des alt-EJ weiter zu untersuchen, soll ein Knockdown von SUV39H1 in Zellen vorgenommen werden.
- Um weiter die verbesserte alt-EJ Effizienz in DNA-PK defizienten Zellen in der Plateau-Phase zu untersuchen, soll der Fokus mehr auf die Chromatinstruktur in der G0-Phase und damit verbundenen Genexpressions-Unterschieden gelegt werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 037C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2014 bis 31.08.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 719.412,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Löbrich	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Der Schwerpunkt des Projekts liegt auf der Untersuchung der Chromatindynamik während der Homologen Rekombination (HR) in der G2-Phase und der Mitose. Mit der Erforschung dieses wissenschaftlichen Feldes soll ein Beitrag zum besseren Verständnis zur Entstehung von Chromosomenaberrationen und chromosomalen Instabilitäten geleistet werden. Dies umfasst die Untersuchung von HR-assoziierten Vorgängen in der Mitose. Hierbei stellt sich die Frage, welche HR-Intermediate die Mitose durchlaufen und welches Schicksal die Zellen im darauffolgenden Zellzyklus erfahren.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Bisherige Vorarbeiten haben gezeigt, dass Chromatinremodellierer, wie zum Beispiel ATRX und Rad54, Funktionen bei der Homologen Rekombination einnehmen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen soll nun im Rahmen dieses APs untersucht werden, bei welchen Schritten der HR die Chromatin-verändernden Funktionen dieser Proteine benötigt werden. Durch die Anwendung der RNA-Interferenz (si- und sh-RNA) und der Herstellung von Knock-out-Zelllinien (CRISPR/Cas9) soll die genaue Funktion dieser Chromatinremodellierer bei einzelnen Schritten der HR mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden und biochemischer Interaktionsstudien analysiert werden.
- AP2: Im zweiten AP soll untersucht werden, mit welchen HR-Intermediaten die Zellen in die Mitose laufen, um welche Strukturen es sich hierbei handelt und welche Proteine an diesen Prozessen beteiligt sind. In der Mitose ist das Chromatin im Gegensatz zur G2-Phase stark kondensiert, so dass sich die Frage stellt, welche HR-assoziierten Proteine an unreparierten DSBs verweilen können und möglicherweise in der Mitose weiterhin Reparaturprozesse durchführen. Um diese Fragestellung zu erörtern, sollen bekannte HR-Proteine, welche an unterschiedlichen Schritten der HR beteiligt sind und somit spezifisch an verschiedene HR-Intermediate binden, in den verschiedenen Phasen der Mitose mikroskopisch visualisiert und charakterisiert werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1: Im bisherigen Verlauf des Projekts konnte etabliert werden, dass ATRX eine Funktion bei der Reparatur von DSBs durch den Prozess der HR besitzt. Des Weiteren konnte nach Induktion von DSBs eine direkte Interaktion von ATRX und PCNA nachgewiesen werden. Mittels site-directed mutagenesis konnten zudem ATRX-Deletionsmutanten etabliert werden, die spezifische Defekte in unterschiedlichen Eigenschaften von ATRX aufweisen. Für jede dieser Deletionsmutanten wurde ein vergleichbarer DSB-Reparaturdefekt wie in ATRX-defizienten Zellen beobachtet, was eine Bedeutung der einzelnen Eigenschaften für die HR nachweist. Darüberhinaus wurde ein neuer Ansatz etabliert, der eine Visualisierung der DNA-Reparatursynthese während des HR-Prozesses in der Immunfluoreszenz ermöglicht. Mit diesem Ansatz konnten nach Induktion von DSBs Reparatursynthese-Prozesse in Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden, jedoch nicht in ATRX-defizienten Zellen oder den zuvor beschriebenen Deletionsmutanten. Im vorherigen Berichtszeitraum wurden mit PCNA und RFC zwei weitere Faktoren identifiziert, die für die ATRX-abhängige DSB-Reparatur von Bedeutung sind. So wurden nach Depletion dieser Faktoren ebenfalls der für ATRX-defiziente Zellen charakteristische DSB-Reparaturdefekt sowie eine ausbleibende DNA-Reparatursynthese nachgewiesen. Außerdem konnte eine direkte Interaktion von ATRX mit RFC und PCNA nachgewiesen werden. Zusammengefasst verdeutlichen diese Ergebnisse eine essentielle Funktion von ATRX für die DNA-Reparatursynthese während der HR.

In diesem Berichtszeitraum wurde nun die Funktion von ATRX während der Chromatin-Remodellierung im Zuge der DSB-Reparatur genauer untersucht. Da bekannt war, dass ATRX zusammen mit dem Faktor DAXX für den Einbau der Histonvariante H3.3 ins Chromatin benötigt wird, sollte nun die Bedeutung von Histon H3.3 und DAXX für die HR bestimmt werden. H3.3- und DAXX-depletierte Zellen zeigten dabei vergleichbare Defekte in der Reparatur HR-abhängiger DSBs und in der DNA-Reparatursynthese, wie sie bereits in ATRX-defizienten Zellen beobachtet wurden. Darüberhinaus konnte nach DNA-Schädigung eine Interaktion von ATRX mit Histon H3.3 sowie mit DAXX mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Zum Abschluss wurde ein neuer, Immunfluoreszenz-basierter Ansatz etabliert, der eine Visualisierung des Einbaus von Histon H3.3 ins Chromatin ermöglicht. Hiermit konnte ein Einbau von H3.3 ins Chromatin im Zuge der DSB-Reparatur nachgewiesen werden, welcher durch eine Depletion von ATRX, DAXX, PCNA oder RFC1 fast vollständig unterbunden wurde.

AP2: Dieses Arbeitspaket wurde bereits abgeschlossen, da alle Ziele erreicht wurden. So wurde im Rahmen dieses Arbeitspakets gezeigt, dass Zellen mit fortgeschrittenen HR-Intermediaten in die Mitose eintreten können, um diese dort weiter zu prozessieren.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP1: Es sind verschiedene Tumorklinien bekannt, die kein ATRX exprimieren, aber dennoch in der Lage sind DSBs mittels HR zu reparieren. Dies wirft die Fragen auf, wie der HR-Prozess in diesen Zellen abläuft und ob es Unterwege der HR gibt, welche unabhängig von ATRX sind. Um diese Fragen zu beantworten, wurden bereits erste Experimente durchgeführt, die im weiteren Verlauf des Projekts weitergeführt werden sollen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Juhász, S., Elbakry, A., Mathes, A., Löbrich, M. (2018): ATRX Promotes DNA Repair Synthesis and Sister Chromatid Exchange during Homologous Recombination. doi:10.1016/j.molcel.2018.05.014

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 München		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 038A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt Endothelzellen: Effekte niedriger, mittlerer und hoher Strahlendosen auf primäre mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Normalgewebe; Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2015 bis 31.12.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 762.720,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Multhoff	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Neben der linearen dosis-abhängigen Zunahme des Krebsrisikos nach Bestrahlung werden sog. „deterministische“ Effekte diskutiert, die nach Überschreiten eines Schwellenwerts zu Hypoplasien und Zelluntergang im Normalgewebe führen können. Epidemiologische Studien zu strahleninduzierten kardiovaskulären und zerebrovaskulären Effekten und experimentelle Daten zu Strahlen-induzierten immunologischen Reaktionen untermauern die Zweifel an der „Schwellenwert“-Hypothese. Das kritischste Zielgewebe später Schäden nach niedrigen und mittleren Strahlendosen ist die Mikrovaskulatur d. h. am Endothel sensitiver Organe. Risikoanalysen niedriger und mittlerer Strahlendosen und -dosisraten und deren Mechanismen sollen im vorliegenden Forschungsvorhaben an Labortieren untersucht werden. Zielsetzung dieses Antrages ist es, primäre Endothelzellen aus unterschiedlichen Organsystemen nach zielgerichteter Bestrahlung in hoher Qualität reproduzierbar zu gewinnen (Siewert et al. PLoS One 2014) und molekular zu charakterisieren.

Arbeitshypothese: Epidemiologische Studien belegen, dass eine niedrig-dosierte Bestrahlung am Herzen nach einer 5 bis 20-jährigen Latenzzeit die Häufigkeit von Myokard-Infarkten signifikant erhöht, obwohl das Herz über viele Jahre hinweg als eines der strahlenresistentesten Organe angesehen wurde (Schultz-Hector et al. 2007). Unsere Arbeitshypothese besagt, dass ionisierende Strahlung chronische Entzündungen in der Mikrovaskulatur auslöst, die langfristig dann Schäden am Kardiovaskulären System am Herzen verursachen können. Mit unserer neu entwickelten Methode können wir lebende und funktionell aktive primäre mikrovaskuläre Endothelzellen aus verschiedenen Geweben der Maus (Sievert et al. 2014; Pressler 2008) in verschiedenen Altersgruppen isolieren.

Zusammenarbeit mit HMGU Institut für Strahlenbiologie Dr. Tapio (02NUK038B). Folgevorhaben von 02NUK007E (Verbundprojekt „Individuelle Strahlenempfindlichkeit und genomische Instabilität“).

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- Aufklärung der funktionellen Änderungen von pathogener Relevanz in mikrovaskulären Endothelzellen (mECs) isoliert aus Herz, Haut, Leber und Lunge von C57BI/6 Mäusen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlendosen (0,2 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 16 Gy).
- Vergleichende phänotypische Charakterisierung von frisch isolierten mECs aus nicht bestrahlten und bestrahlten (2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 16 Gy) Tieren mittels Durchflusszytometrie.
- Analyse der migratorischen Kapazität von mECs unter statischen Kulturbedingungen und unter Fluss-/Scherstressbedingungen (IBIDI System) (Riederer et al. 2008).
- Interaktion von mECs (nicht bestrahlt und bestrahlt) mit Subpopulationen von Leukozyten unter statischen Bedingungen und unter Fluss/Scherstressbedingungen.
- Erfassung der histologischen und immunhistologischen Änderungen von nicht bestrahlten und mit niedrigen Dosen bestrahlten mECs. Quantifizierung der infiltrierenden Lymphozyten.
- Vergleichende Proteom-Analyse von ECs aus Schein-bestrahlten und bestrahlten Geweben von unterschiedlicher Herkunft.
- Vergleichende Transkriptom-Analysen von ECs aus Schein-bestrahlten und bestrahlten Geweben von unterschiedlicher Herkunft.
- Integrierung der Daten zu einem Modell über den biologischen Mechanismus der strahlen-induzierten Pathogenese.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Die Verwendung des neu etablierten Bestrahlungsprotokolls an der CT-bildgestützten Bestrahlungsanlage „Small Animal Radiation Research Platform“ (SARRP) ermöglichte eine komplette Herz-Bestrahlung, bei der nur 18 % der Lunge direkt mitbestrahlt wurden. Dadurch konnte das symptomfreie Überleben der Mäuse nach einer klinisch relevanten Herz-Bestrahlungsdosis von 16 Gy auf mind. 50 Wochen verlängert werden. Das neue Bestrahlungsprotokoll erlaubt somit erstmals die Analyse von Langzeiteffekten am bestrahlten Herz- und am geringfügig bestrahlten Lungengewebe sowie deren Auswirkung auf das nicht bestrahlte Lungengewebe (abscopaler Effekt). Wir konnten zeigen, dass die Entzündungsmarker ICAM-1 und VCAM-1 20 bis 50 Wochen nach 8 und 16 Gy auf Herz-Endothelzellen konstant signifikant erhöht waren. Ein weiterer Entzündungsmarker FAT, der auch eine wichtige Rolle beim Fettstoffwechsel besitzt, wurde ebenfalls bis 50 Wochen nach 8 und 16 Gy signifikant erhöht exprimiert. Der Entzündungsmarker PECAM-1 zeigte, im Gegensatz zu 8 Gy, eine signifikante Erhöhung 20 bis 40 Wochen nach der 16 Gy Herz-Bestrahlung, die sich 50 Wochen nach Bestrahlung wieder normalisiert hatte. Der Entzündungsmarker ICAM-2 wies 20 bis 50 Wochen nach Bestrahlung mit 8 und 16 Gy keine Veränderungen auf. Die permanente erhöhte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und FAT auf Herz-Endothelzellen bis zu 50 Wochen könnte zu einer chronischen Entzündung mit anschließenden kardiovaskulären Schäden führen.

Um Unterschiede der Strahlensensitivität von nicht-proliferierenden (Normalgewebsendothel) und proliferierenden Geweben (Tumore) zu analysieren, wurden neben Herz-Endothelzellen auch primäre Endothelzellen aus subkutanen Melanom-Tumoren (B16F0) nach lokaler 16 Gy in vivo Bestrahlung des Tumors isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Derzeit erfolgt die Analyse der Daten von Bestrahlungseffekten an isolierten Lungen-Endothelzellen aus bestrahlter und nicht bestrahlter Lunge nach in vivo Herz-Bestrahlung mit 8 und 16 Gy nach 20, 30, 40 und 50 Wochen, um Langzeiteffekte direkter Lungen-Bestrahlung und den abscopalen Effekt zu erfassen.

Die Auswertung der Daten von Tumor-Endothelzellen nach 16 Gy in vivo Bestrahlung wird zurzeit durchgeführt. Die Ergebnisse könnten zu einer verbesserten Bestrahlungsplanung und Tumorkontrolle führen. Zusätzlich ist eine Proteom-Analyse der eingefrorenen Endothelzellen aus nicht bestrahlten und bestrahlten Tumoren in Vorbereitung (Institut für Strahlenbiologie, HMGU). Weitere in vivo Bestrahlungsversuche mit 16 Gy an Melanom-Tumore sind vorgesehen.

Die Interaktion isolierter Herz-Endothelzellen nach in vivo Bestrahlung mit Leukozyten soll im Flusssystem (Ibidi) untersucht werden. Dazu muss ein neuer Versuchsaufbau bestehend aus unterschiedlichen Zelltypen etabliert werden.

Um den Einfluss einer Brustkrebsbestrahlung von Patientinnen auf Erkrankungen des Herzkreislaufsystems besser zu verstehen, soll eine Teilbestrahlung des linken Herzens von Mäusen mit Hilfe der SARRP Maschine erfolgen. Diese Ergebnisse sollen mit Daten von humanen Brustkrebs-Patientinnen korreliert werden, bei denen es während einer Strahlentherapie ebenfalls zu einer Teilbestrahlung des Herzens gekommen ist.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Sievert W., Stangl S., Steiger K., Multhoff G.: Improved overall survival of mice by reducing lung side effects high-precision heart irradiation using a small animal radiation research platform. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 101(3):671-679, doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.02.017, 2018

Lechner P., Buck D., Sick L., Hemmer B., Multhoff G.: Serum heat shock protein 70 levels as a biomarker for inflammatory processes in multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. doi: 10.1177/2055217318767192, 2018

Shevtsov M., Huile, G., Multhoff G.: Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy. *Phil Trans R Soc B* 373: 2016.0526. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb2016.0526>

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 038B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt Endothelzellen: Effekte niedriger, mittlerer und hoher Strahlendosen auf primäre mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Normalgewebe; Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2015 bis 31.12.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 367.263,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Tapio	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Ziel des vorliegenden Projektes ist es, die Wirkung niedriger, mittlerer und hoher Dosen ionisierender Strahlung in einem Bereich zwischen 0,2 Gy und 16 Gy auf mikrovaskuläre Endothelzellen (ECs) gewonnen aus unterschiedlichen Normalgeweben zu studieren. Im Besonderen sollen die Interaktionen zwischen mikrovaskulären ECs und Immuneffektorzellen in vitro und im Mausmodell untersucht werden. Wir werden uns auf Herz, Subkutis, Leber und die Lunge als Hochrisiko-Organ konzentrieren.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Vergleichende Proteom-Analyse von ECs aus Schein-bestrahlten und bestrahlten Geweben von unterschiedlicher Herkunft.
- AP2: Vergleichende Transkriptom-Analysen von ECs aus Schein-bestrahlten und bestrahlten Geweben von unterschiedlicher Herkunft.
- AP3: Integrierung der Daten zu einem Modell über den biologischen Mechanismus der strahlen-induzierten Pathogenese.

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

In dem Zwischenbericht von 31.07.2016 ist die etablierte Plattform schon beschrieben. Hieran wurde nun für weitere Vorhaben die Analyseplattform geändert. Die Datenakquise wurde von einem Daten-abhängigen in einen Datenunabhängigen Modus geändert, was eine Anpassung der Analyse-Software erforderte. Aufgrund der erstmals verwendeten Analyse-Software wurde weiterhin eine weitere Freeware (Skyline) etabliert, um die noch neue datenunabhängige Auswertung durch ein zweites Analysetool zu validieren.

Die Endothelzellen von Herz und Lunge von lokal im Herz mit 10 Gy bestrahlten und scheinbestrahlten Mäusen wurden so analysiert. Bei der Bestrahlungsplattform handelte es sich um die sogenannte „small animal radiation research platform“. Scheinbestrahlung bedeutet, dass die Maus ein CT erhalten hat. In bestrahlten Mäusen wird dies benötigt, um die lokale Bestrahlung des Herzens und der Lunge zu ermöglichen ohne weitere Organe größeren Strahlendosen auszusetzen. Neben der starken Immunreaktion des Mauslungenendothels auf die erfolgte Bestrahlung deuten die deregulierten Proteine auch auf eine funktionelle Veränderung der Proteinexpression hin. Die Strahlenantwort der primären, Mausherzendothelzellen war schwächer ausgeprägt als im mitbestrahlten Lungenendothel, was auf eine höhere Strahlensensitivität des Lungenendothels zurückzuführen ist.

Ein weiterer Vergleich mit den unter Scherspannung kultivierten Zellen zeigt, dass die Auswirkungen der Scherspannung auf die Herzendothelzellen nicht nur die Strahlensensitivität weiter reduziert, sondern auch stärkere Auswirkungen auf die Zellen ausübt, als es die Strahlung vermag. Auf Scherspannung beruhende Veränderungen werden durch die Bestrahlung noch verstärkt. Die damit verbundenen Änderungen im Proteom sind an der Organisation des Zytoskelettes und der Morphologie der Zelle beteiligt. Durch Bestrahlung wurden weiterhin Stoffwechselprozesse dereguliert.

Weiterhin steht die Analyse der Messung einer bestrahlten humanen Endothelzelllinie bevor, um tiefere Einblicke in die Immunantwort und Entzündungsreaktion als Folge der strahleninduzierten DNA Schäden zu bekommen.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Im letzten Bericht (Zeitraum 01.07.2017 - 31.12.2017) wurde über die gemeinsame Auswirkung der Scherspannung und der Bestrahlung berichtet. Hierfür sind Validierungsexperimente geplant, um eine Publikation der Studie zu ermöglichen. Weiterhin sind die Zellkulturexperimente geplant, um die Auswirkungen der Strahlung auf Endothelzellen und Kardiomyocyten zu analysieren. Des Weiteren sind geplant die Auswirkungen des Sekretoms der Endothelzellen auf Kardiomyocyten zu analysieren. Eine Proteom-Analyse der Endothelzellen von unbestrahlten und bestrahlten Melanomen ist vorbereitet.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Langenbeckstr. 1, 55131 Mainz		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 042A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2015 bis 31.03.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 2.095.956,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Blettner	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel des Vorhabens ist die Erforschung des Zusammenhangs zwischen therapeutischer Strahlenexposition im Kindesalter mit genetischen Veränderungen in Bezug auf Langzeitfolgen. Dies soll mit epidemiologischen Methoden im Rahmen einer Kohorten-Studie zur Auswertung der im DKKR erfassten Zweitumor-Ereignisse untersucht werden (AP1). Mit einer molekularepidemiologischen Fall-Kontroll-Studie werden Zellproben von Personen ohne Tumoreignis mit denen von Patienten von primären und sekundären Tumoren in Bezug auf das Genom und Genexpression vor und nach Bestrahlung verglichen (AP2). Die notwendigen statistischen und bioinformatischen Mittel werden in AP3 entwickelt. Strahlenbedingte epigenetische Veränderungen in der Genregulation werden in AP4 untersucht. Untersuchungen auf genomischer Ebene zur Erforschung spontaner und strahleninduzierter Veränderungen der Telomere (AP7a) und dosimetrische Untersuchungen zur Ganzkörperdosisbelastung durch strahlentherapeutische Behandlungen mittels strahleninduzierter genomischer Läsionen (AP7b) sind geplant.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Epidemiologische Auswertung von im DKKR erfassten Second-Tumor Ereignissen nach therapeutischer Exposition zu Strahlung (SCAR)
- AP2: Fall-Kontroll-Studie zu Krebserkrankungen im Kindesalter und molekularer Epidemiologie (KIKME) - Genomweite Analyse von Unterschieden in der strahlenassoziierten, genetischen Krebs susceptibility
- AP3: Statistische Techniken zur integrativen genomweiten Analyse
- AP4: Copy-Number-Variation und Methylierung vor und nach Bestrahlung
- AP7a: Genomische Stabilität bei Malignomerkkrankungen im Kindesalter
- AP7b: Biologische Dosimetrie nach Radiotherapie
- AP Koord.: Koordination des ISIBELA-Verbundes sowie der Aus- und Weiterbildung

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Für die Bestrahlungen im Rahmen einer ALL Therapie konnten die ersten Dosen mittels der Phantome erfolgreich rekonstruiert und ausgewertet werden. Die Therapieprotokolle für Hodgkin- wie non-Hodgkin-Lymphome liegen vor und eine Dosimetrie und Auswertestrategie hierfür wurde entwickelt.
- AP2: Im Verlauf des letzten Halbjahres wurde die Rekrutierung von Patienten mit mehreren primären Neoplasien und den dazu gematchten Patienten mit nur einer primären Neoplasie in der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie fortgeführt. Zu den Krebspatienten wurden weiterhin krebsfreie Kontrollpatienten im Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie rekrutiert. Im ersten Halbjahr des Jahres 2018 konnten Zelllinien von weiteren 114 ehemaligen Kinderkrebspatienten mit einer Primärneoplasie, von weiteren 20 ehemaligen Kinderkrebspatienten mit mehre-

ren Primärneoplasien sowie von weiteren 32 krebsfreien Kontrollprobanden erstmals kultiviert werden. Aus diesen 166 Zelllinien wurde anschließend DNA extrahiert. Darüber hinaus wurden bei weiteren 25 gematchten Triplets zeitgleich Bestrahlungsexperimente durchgeführt und RNA im Anschluss extrahiert.

- AP3: Die neuen RNA-Seq Daten wurden prozessiert. Die Pipeline für die Analyse der Whole Genome Sequenzdaten (WGS) wurde aufgesetzt und getestet.
- AP4: Die Ergebnisse aus der Bisulfitanalyse der Patienten wurden in Form eines Vortrags auf der DEGRO 2018 vorgestellt und sind nun in einer Publikation zusammengefasst (Publikation in submission prozess). Die Korrelation der CGH Analysen 2N, 1N und 0N Datensätze mit RNA-SEQ Datensätzen des Triplett Experiments sind abgeschlossen. Bestätigungsexperimente wurden im Rahmen einer med. Doktorarbeit (Miriam Endres) erfolgreich durchgeführt. DNA- Deletionsanalysen nach Bestrahlung 2N, 1N und 0N sind abgeschlossen (Bachelorarbeit Lukas Wagner).
- AP7a: Bestrahlungsexperimente mit 21 Triplets, d. h. 63 Zelllinien von 3 gematchten Spendern (Kontrolle, PN und SN) der GenkiK/KIKME Phase I Fibroblasten, wurden erfolgreich durchgeführt. Bisher zeigen die Analysen von 17 Triplets keine Unterschiede in der zellulären oder chromosomalen Radiosensitivität zwischen den Studienpopulationen. SN-Spender zeigten spontane chromosomale Instabilitäten
- AP7b: Die Analyse von DNA Doppelstrangbrüchen in peripheren Leukozyten von 10 Patienten (6 x Orthovoltgerät, 4 x Linearbeschleuniger) zeigen bisher keine Unterschiede in der Dosisbelastung der Patienten zwischen den Bestrahlungstechniken.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Die Therapiedatenerhebung wird weiter fortgeführt. Weitere Protokolle werden in die Therapieplanungssoftware eingepflegt und Dosisvolumenhistogramme erstellt. Weiter werden Verfahrensweisen für Schätzung der Unsicherheit der Dosen erntwickelt.
- AP2: In den folgenden sechs Monaten soll die Rekrutierung von Probanden mit Sekundärneoplasie und Primärneoplasie sowie von krebsfreien Kontrollen in der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie sowie im Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie fortgeführt werden. Des Weiteren sollen die gewonnenen Zelllinien weiterhin kultiviert werden und DNA extrahiert werden. Weitere Bestrahlungsexperimente an Zelllinien sollen durchgeführt und RNA extrahiert werden.
- AP3: Die Prozessierung der WGS wird unter Verwendung von MOGON II durchgeführt. Die RNA-Seq und der WGS Daten werden integrativ ausgewertet. Hierfür wird Methodenforschung betrieben.
- AP4: Aufgrund personaler Verzögerung bei dem Kooperationspartner in Würzburg, wird die Arrayhybridisierung für die Methylierungsanalyse voraussichtlich im Oktober 2018 ausgeführt. Im Moment wird das Programm für die Korrelation von RNA-Seq und Methylierungsdaten (Bachelor Arbeit Alexander Wichmann) an zwei unabhängigen Datensätzen, Kopf-Hals und Brustkrebs, der TCGA Datenbank getestet (Bachelorarbeit Katja Korrolew). Die Daten der RNA-Seq CGH Analyse werden in Form einer Publikation zusammengefasst. Letzte Bestätigungsanalysen werden durchgeführt (med. Doktorandin Nergiz Kartal).
- AP7a: Finale Analysen der Chromosomenpräparate GenkiK/KIKME I Fibroblasten.
- AP7b: Fortlaufende Patientenrekrutierung und Analyse.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Scholz-Kreisel, P., Kaatsch, P., Spix, C., Schmidberger, H., Marron, M., Grabow, D., Becker C., Blettner, M. (2018): Second malignancies following childhood cancer treatment in Germany from 1980 to 2014. Deutsches Ärzteblatt Online, 115(1), 385–393. //doi.org/10.3238/aerztebl.2018.0385

Galetzka D, Böck J, Dittrich M, Zahnreich S, Altebockwinkel I, Sinizyn O, Ludwig M, Rossmann H, Spix C, Breuksch I, Prawitt D, Maron M, Haaf T, Schmidberger H. (2018): Factors leading to changes in methylation of intron 2 in RAD9A gene and their possible influence in tumor development. Vortrag DEGRO2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Saarstr. 21, 55122 Mainz		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 042B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2015 bis 30.06.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 518.880,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Hankeln	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Der Forschungsverbund ISIBELA verfolgt das übergeordnete Ziel, den Zusammenhang zwischen einer Strahlenexposition und der Entstehung von Folgeoplasien bei Primärtumoren im Kindesalter zu erforschen. Die Verbundpartner (Universitätsmedizin Mainz, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Technische Universität Darmstadt, Leibniz Institut für Präventionsforschung und Epidemiologie Bremen) untersuchen die Fragestellung unter Anwendung epidemiologischer, biostatistischer, radiobiologischer, zell- und molekularbiologischer sowie genetischer Arbeitstechniken. Durch Anwendung von Hochdurchsatz-Genomforschung sollen insbesondere mögliche genetische Prädispositionen für die Entstehung strahleninduzierter Krebserkrankungen aufgedeckt werden. Erkenntnisse zur strahleninduzierten Karzinogenese könnten zu einer Optimierung strahlentherapeutischer Behandlungsansätze führen.

Im Teilprojekt B an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz werden standardisierte Verfahren zur Anwendung von Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologie (NGS) im Rahmen multizentrischer epidemiologischer Studien entwickelt und die entsprechenden Sequenzdaten für das Projekt produziert (Teilprojekt 8).

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1: Absprache und Synchronisierung der Arbeitsschritte für die NGS-Analysen

AP2: RNA-Sequenzierung von Zellkultur-Proben vor und nach radioaktiver Bestrahlung

AP3: DNA-Sequenzierung des Genoms ausgewählter Probanden

AP4: Replikation der genetischen Daten in einem zweiten unabhängigen Probandenkollektiv

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

Im Rahmen von Vor- und Hauptversuchen wurden in der ersten Jahreshälfte 2018 insgesamt 108 RNA Proben humaner Fibroblasten-Zellkulturen (erhalten von AP2) zu RNA aufgearbeitet, qualitätsüberprüft, entsprechende Sequenzier-Bibliotheken erstellt und mit dem Illumina-Hochdurchsatzverfahren sequenziert.

Wie in den bisherigen Versuchen wurden sowohl die Dosis der Bestrahlung als auch die Zeit bis zu Extraktion der RNA variiert. Die Proben wurden gemäß der von uns festgelegten Standards (beschrieben in Bericht 1/2016) überführt, gelagert und qualitativ begutachtet. Alle eingegangenen RNA-Proben erfüllten die Qualitätsanforderungen und wurden daher zur Konstruktion von Sequenzierbibliotheken verwendet. Die Sequenzierung wurde jeweils mit einer angestrebten Sequenziertiefe von ca. 20 Mio. Reads pro Bibliothek gemäß den Standardprotokollen der Firma Illumina für „single read/high output“-Läufe auf einem HiSeq 2500-Sequencer durchgeführt. Die Daten wurden zu weiteren Auswertung per FTP an die Bioinformatikgruppe (AP3, IMBEI Mainz) transferiert. Die Details der Abläufe sind im Bericht 1/2016 erläutert. Die schrittweise erstellten und verbesserten Erfassungen der Laufparameter und Datensatzstatistiken wurden in den Berichten 2/2016 und 1/2017 dargestellt.

Aufgrund der im Bericht 2/2017 erläuterten Verzögerungen im Arbeitsablauf wurde eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung bis zum 30.06.2019 beantragt und zwischenzeitlich bewilligt.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Da wir die Prozessierung der Sequenzierproben durch die Einstellung und Einarbeitung von Frau Dr. Regina Stiehl sicherstellen konnten sowie aufgrund der insgesamt verbesserten Rekrutierungsabläufe in AP2, ist im 2. Halbjahr 2018 mit der Verarbeitung von >200 Proben zu rechnen.

Für die DNA-Sequenzierung der Genome auf der neuen Illumina-Sequenzierplattform NovaSeq wurden Anfang 2018 die Parameter und Methoden im Detail festgelegt. Ein erster Batch von 30 DNAs wurde qualitätsüberprüft und für die Whole Genome-Sequenzierung vorbereitet.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Leibniz-Institut für Präventionsforschung und Epidemiologie – BIPS GmbH, Achterstr.30, 28359 Bremen		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 042C
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2015 bis 30.04.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 438.337,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Marron	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Die Erforschung des Zusammenhangs zwischen Strahlenexposition und Krebsentstehung im Kindesalter sowie der Entwicklung von Folgeneoplasien als Langzeitfolge stellen das übergeordnete Ziel des ISIBELA Forschungsverbundes dar. Die enge Zusammenarbeit mit weiteren drei Verbundpartnern (Universitätsmedizin Mainz, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz und Technische Universität Darmstadt) verknüpft verschiedenste Herangehensweisen aus der molekularen Epidemiologie, der Biostatistik, der Genomik, der Molekularbiologie und der Radiodosimetrie. Durch diese umfassende Betrachtung der Zusammenhänge von strahleninduzierten Krebserkrankungen und genetischer Disposition können grundlegende Informationen zu den Mechanismen der Karzinogenese gewonnen werden. Diese können zu Optimierungen in der Strahlentherapie herangezogen werden und als Grundlage zur Entwicklung von Markern für eine genetische Krebsdisposition nach Expositionen durch Strahlung (z. B. nach Strahlentherapie oder Strahlenunfällen) dienen. Das Teilprojekt C am Standort Bremen ist dabei für die wissenschaftliche Leitung des Arbeitspaketes 2 (AP2) des ISIBELA Verbundes zuständig. Dieses Arbeitspaket beschäftigt sich mit der Durchführung der molekular-epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie KIKME (Krebserkrankungen im Kindesalter und molekulare Epidemiologie) und der genomweiten Identifizierung von Genen und Gen-Strahlen-Interaktionen.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Leitung und Design der Fall-Kontroll-Studie KIKME, in der ehemalige Kinderkrebspatienten mit und ohne Folgeneoplasie sowie krebsfreie Kontroll-Probanden miteinander verglichen werden
- AP2: Genomweite Identifizierung von Genen und Gen-Strahlen-Interaktionen durch die Kombination von Bestrahlungsexperimenten an Probandenzelllinien der KIKME Studie mit Methoden der Hochdurchsatz-Entschlüsselung von Genomen und Transkriptomen
- AP3: Weitere Auswertung der erhobenen KIKME Studiendaten, insbesondere die lebenslange medizinische Strahlenbelastung unter Berücksichtigung von Chemotherapie sowie das familiäre Auftreten von Erkrankungen
- AP4: Als Vertrauensstelle in einer essentiellen Schlüsselposition die Verantwortung für die Mehrfachpseudonymisierung der Proben und Untersuchungsergebnisse für alle Projektpartner

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

In der vergangenen Förderperiode konnte die Rekrutierung von ehemaligen Kinderkrebspatienten (Fällen) mit einer Primäreoplasie (FPN (First Primary Neoplasm)) und mehreren Primäreoplasien (SPN (Second Primary Neoplasm)) sowie von krebsfreien Kontrollen (CO) erfolgreich fortgeführt

werden. Im Mai 2018 wurden in einer weiteren Rekrutierungswelle nochmals 20 potentielle FPN Fälle vom Deutschen Kinderkrebsregister angeschrieben. Bisher konnten von insgesamt 198 angeschriebenen SPN Patienten 81 (42 %) für die Teilnahme an der Studie gewonnen werden. Zudem haben 22 % der FPN Probanden (357 Zusagen von insgesamt 1590 Angeschriebenen) der Studienteilnahme zugestimmt. In der Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Mainz wurden bisher 179 potenzielle Kontrollprobanden direkt angesprochenen. 113 (63 %) von ihnen konnten als Studienteilnehmer bewogen werden. Der Anteil der teilnehmenden Fälle, die eine Rekrutierung in ihrer Wohnortnähe in Anspruch nehmen ist im Vergleich zum letzten Berichtszeitraum nochmals angestiegen. Derzeit nehmen 62 % der SPN und 61 % der FPN Fälle eine Vor-Ort-Rekrutierung in Anspruch. Um die Rekrutierung in der Wohnortnähe der Probanden deutschlandweit garantieren zu können, wurde das Netzwerk aus kooperierenden Hautärzten auch im vergangenen Halbjahr weiter ausgebaut. Inzwischen wurden von 179 niedergelassenen Hautarztpraxen Hautprobenentnahmen bei teilnehmenden Fällen für die KiKme-Studie durchgeführt. In einem kontinuierlich fortlaufenden Prozess wurden auch im vergangenen Halbjahr teilnehmende Fälle sowie Kontrollprobanden unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht sowie bei den ehemaligen Kinderkrebspatienten von Diagnosejahr und Art der ersten Krebserkrankung, Matchinggruppen zugeordnet. Die Bioprobendatenbank wurde weiterhin mit Informationen zur Qualität und Quantität der einzelnen Proben sowie dem aktuellen Probenstatus gespeist. Hierzu gehören Informationen zur Probenentnahme, zu den Kultivierungsphasen, zur Zellentwicklung, zum Verbleib und zur Qualität von Extraktionen. Aktuell befinden sich detaillierte Informationen zu 3764 Bioproben in der Datenbank. Neben der Pflege der Bioprobendatenbank, wurden auch weiterhin fortlaufend alle Informationen der Studienteilnehmer in die Studiendatenbank eingepflegt. Die Dateneingabe in die Studiendatenbank erfolgt nach wie vor zu Zwecken der Qualitätssicherung standardisiert in einer parallelen Doppelteingabe von zwei Personen an getrennten Bildschirmen. In Zusammenarbeit mit dem Labor der Radioonkologie und Strahlentherapie in Mainz wurden in der vergangenen Förderperiode weitere Bestrahlungsversuche an Hautproben durchgeführt. Mittlerweile wurden Bestrahlungsversuche an Zelllinien von insgesamt 132 Probanden (44 Triplets mit je 1 SPN, 1 FPN und 1 CO Proband) durchgeführt. Hierfür wurden je Versuch insgesamt 3 gezählte und G0 synchronisierte Zelllinien pro Proband mit den festgelegten Strahlungsdosen 0 Gy, 50 mGy und 2000 mGy zeitgleich bestrahlt bzw. nicht bestrahlt. Alle 396 Experimente wurden nach 4 Stunden beendet. Sowohl die RNA als auch die DNA wurde extrahiert, die Quantität und Qualität der Proben wurde gemessen. Die gewonnenen Extrakte wurden anschließend zur Sequenzierung der RNA und DNA an das Labor der Mainzer Universität weitergegeben. Darüber hinaus wurde im vergangenen Berichtszeitraum mit der DNA-Extraktion aus den vorhandenen Speichelproben begonnen. Mittlerweile konnte DNA aus dem Speichel von 198 Probanden extrahiert und eingelagert werden.

#### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Auch im kommenden Halbjahr der Förderung sollen weitere SPN und FNP Fälle sowie Kontrollprobanden rekrutiert werden. Alle teilnehmenden Probanden (SPN, FPN und CO) werden weiterhin fortlaufend Matchinggruppen basierend auf Alter, Geschlecht, Diagnosejahr und Art der ersten Krebserkrankung zugeordnet. Darüber hinaus sollen weitere Bestrahlungsversuche mit weiteren zur Verfügung stehenden Zelllinien von gematchten Triplets bestehend aus 1 SPN, 1 FPN und 1 CO geplant und durchgeführt werden. Außerdem soll die DNA-Extraktion aus den Speichelproben weiter fortgeführt werden. Sowohl die Bioprobendatenbank als auch die Studiendatenbank sollen weiterhin qualitätsgesichert und unter Berücksichtigung der festgelegten Standards mit Informationen gespeist werden. Eine erste Publikation mit Beschreibung des Studiendesigns, des Rekrutierungsverhaltens und ersten Auswertungen der Versuchsbedingungen soll erstellt werden.

#### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 042D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2015 bis 31.08.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 805.884,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Löbrich	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Gesamtziel des Vorhabens liegt in der Erforschung des Zusammenhangs zwischen einer genetischen Prädisposition und der Entstehung von Krebs im Kindesalter. Die Rekrutierung der Probanden, Etablierung der Zelllinien, molekulare/zelluläre Untersuchungen werden von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt, die eng verzahnt arbeiten. Schwerpunkt der von der Arbeitsgruppe Prof. Löbrich durchgeführten Arbeitspakete 5 und 6 ist es, zelluläre Untersuchungen mit molekularen Analysen zu komplementieren, um einen tieferen Einblick in die einer Tumorentstehung zugrundeliegenden molekulargenetischen Ursachen zu erlangen. Dabei wird untersucht, inwieweit sich Checkpoint- und Reparaturkapazität im Hinblick auf für die Krebsentstehung vorbelasteten Personen von gesunden Probanden unterscheidet. Genomische Analysen sollen Einblick in mögliche genetische Ursachen der Krebsentstehung liefern. Schließlich sollen die Daten der verschiedenen Endpunkte korreliert und gemeinsam veröffentlicht werden.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

### AP5: DSB-Reparatur- und G2/M-Checkpoint-Messungen und Genomanalysen prädisponierter Personen:

Im Rahmen des ISIMEP-Projekts wurden rund 40 Zelllinien aus Biopsien von Patienten mit einer sekundären Neoplasie nach einem Ersttumor im Kindesalter sowie Zelllinien aus Biopsien von Patienten mit einer primären Neoplasie im Kindesalter ohne Folgoneoplasie auf ihre Checkpoint- und Reparaturkapazität untersucht. Diese Untersuchungen werden nun an 20 neu etablierten, gematchten Kontrollzelllinien gesunder Probanden durchgeführt. Außerdem sollen von allen insgesamt 60 Zelllinien molekulargenetische Analysen durchgeführt und eventuell vorliegende genomische Auffälligkeiten in Genen der DNA-Reparatur oder Zellzykluskontrolle mit dem zellulären Verhalten korreliert werden. Auffällige Zelllinien werden schließlich eingehenden Reparatur- und Zellzyklusstudien unterzogen.

### AP6: Identifizierung genetischer Prädispositionen der spontanen und strahleninduzierten Karzinogenese im Zusammenhang mit Doppelstrangbrüchen und Zellzykluskontrolle:

Nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) durch z. B. Röntgenstrahlung verlangsamen Zellzyklus-Checkpoints die Proliferation, um den Reparaturmechanismen Zeit für die Beseitigung der Läsionen zur Verfügung zu stellen. Störungen in der DNA-Schadensantwort können zu einer erhöhten Chromosomeninstabilität und letztlich zur Entstehung von Krebs führen. Die im Rahmen des Kooperationsprojektes AP2 rekrutierten ca. 300 Zelllinien aller drei Patientengruppen (primäre Neoplasie, sekundäre Neoplasie und gesunde Kontrollgruppe) werden mit einem halbautomatischen Screening-Verfahren auf ihr Zellzyklusverhalten und ihre Reparaturkapazität nach hohen und niedrigen Dosen ionisierender Strahlung untersucht. Diese Daten werden statistisch ausgewertet und mit den epidemiologischen und molekulargenetischen Resultaten korreliert.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP5: Die 40 Zelllinien der GenKIK-Studie aus der ersten Förderperiode (ISIMEP), d. h. insgesamt 20 Zelllinien aus Biopsien von Patienten mit einem Zweitumor nach Ersttumor im Kindesalter sowie 20 Zelllinien von Patienten mit einem Tumor im Kindesalter (ohne Zweitumor), wurden bei unserem Kooperationspartner in Mainz durch weitere 20 Zelllinien von gesunden, gematchten Probanden ergänzt. Sämtliche Zelllinien, einschließlich derer, die schon in der ersten Förderperiode analysiert wurden, wurden auf ihre individuelle Reparaturkapazität nach niedrigen Strahlendosen hin untersucht. Dies war unabdingbar, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aller 60 Zelllinien zu gewährleisten. Inzwischen wurden die Experimente mit allen Zelllinien durchgeführt und Bildaufnahmen zur automatisierten Auswertung angefertigt. Die nachfolgende Auswertung der Bilddateien wurde im vergangenen Berichtszeitraum (Juli-Dezember 2017) für 40 Zelllinien abgeschlossen. Bei den fehlenden 20 Zelllinien zeigte die Auswertung der Bilddateien, dass die Immunfluoreszenzfärbung nur in einem von insgesamt drei Experimenten eine gute Qualität aufwies. Daher wurden diese Experimente im aktuellen Berichtszeitraum wiederholt. Leider konnte auch hier keine ausreichende Qualität der Immunfluoreszenzfärbung der Zellen erzielt werden, um eine Auswertung vorzunehmen. Daher wird diese letzte Versuchsreihe erneut wiederholt bevor eine umfassende Interpretation der Ergebnisse und die Identifikation auffälliger Zelllinien erfolgen kann.

Die Daten aus den Reparaturstudien sowie Daten aus vorangegangene Studien der Projektpartner sollen im Rahmen von AP5 durch genomische Untersuchungen komplementiert werden. Dazu wird das gesamte Exom aller GenKIK-Zelllinien sequenziert und die Sequenzen mit denen der Zelllinien von gesunden Probanden verglichen. Zellen aller Zelllinien wurden mit Barcodes versehen und zum Sequenzierungsunternehmen geschickt. Dort wird derzeit die DNA aus den eingeschickten Zellpellets isoliert und deren Qualität geprüft. Bei ausreichender Qualität der isolierten DNA wird die Exom-Sequenzierung vorgenommen.

AP6: Im aktuellen Berichtszeitraum wurden uns von AP2 weitere Zelllinien bereitgestellt, die im Rahmen der KIKME Phase 2 von rekrutierten Patienten sowie von gesunden, gematchten Probanden etabliert wurden. Derzeit befinden sich 40 pseudonymisierte Triplets (120 Zelllinien) in Darmstadt, welche sukzessive für die Experimente expandiert und bis zur Durchführung der Experimente im Kryotank eingelagert werden.

Beginnend mit 8 Triplets wurden Experimente zur Induktion des G2/M-Checkpoints sowie zur Analyse der Reparaturkapazität (analog zu AP5) durchgeführt. Es wurden jeweils drei Experimente mit diesen Zelllinien durchgeführt. Sukzessive werden nun Bilder am Scanning-Mikroskop aufgenommen und für die automatisierte Auswertung vorbereitet.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP5: Reparatur-Kapazität: Die Experimente müssen für 20 Zelllinien komplett wiederholt werden, da eine Auswertung der Bilddateien aufgrund der schlechten Qualität der Immunfluoreszenzfärbung nicht möglich war. Nach Abschluss dieser Wiederholungsexperimente und der anschließenden Identifikation auffälliger Ziellinien werden mit diesen Zelllinien detaillierte Analysen der DNA-Reparatur durchgeführt.

Exom-Sequenzierung: Nach der Sequenzierung der Zelllinien werden die Daten an AP3 am IMBEI (Mainz) zur Auswertung übermittelt.

AP6: Die Bildaufnahme und Auswertung der Experimente mit den ersten acht Triplets wird fortgesetzt. Sukzessive werden weitere Zelllinien für die Experimente expandiert bzw. in den Experimenten auf ihre Reparaturkapazität und auf ihre Checkpoint-Sensitivität hin untersucht. Die Ergebnisse werden mit den bisherigen Daten aus der GenKIK-Studie verglichen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Str., 52428 Jülich		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 043A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2015 bis 30.06.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 569.567,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Kriehuber	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Zentrales Ziel des Vorhabens ist die Charakterisierung der zellzyklusabhängigen zellulären DNA-Schadensantwort nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) unterschiedlicher Komplexität in Abhängigkeit der Lokalisation des Schadens im Chromatin. Hierbei soll im Besonderen aufgeklärt werden, welche Faktoren die Auswahl der involvierten Reparaturprozesse bestimmen und inwieweit die unterschiedliche Komplexität der DNA-Läsionen die Güte (Fehlerhaftigkeit) der Reparatur beeinflussen und wie dies sich in der zyto- und genotoxischen Schädigung der Zellen widerspiegelt.

Hierzu sollen über geeignete Auger Elektronen Emitter (AEE) unterschiedlicher Halbwertszeiten, Energien und durchschnittlich emittierten Elektronen pro Zerfall und über diverse  $\beta$ -Emitter DNA-Läsionen von unterschiedlicher Komplexität in die DNA eingeführt werden. Aufgrund der kurzen Reichweite von Auger Elektronen soll durch gezielte Positionierung der AEE über AEE-markiertem-UdR und AEE-markierten DNA Triplex-bildenden Oligonukleotiden exklusiv Bereiche des Eu- und Heterochromatins geschädigt werden und die Qualität der Schadensprozessierung in Relation zur Lokalisation und Komplexität des induzierten DSB zellzyklusabhängig untersucht werden. Über gezielte Schädigung von eingeführten DNA-Konstrukten soll des Weiteren die molekulare Signatur von Mutationsereignissen charakterisiert werden. Die genexpressionsbasierte Analyse von Signalwegen soll Hinweise darauf geben, welche zellulären Prozesse die Auswahl der involvierten Reparaturmechanismen steuern.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Projekt ist in 2 Arbeitspakete/Hauptfragestellungen untergliedert:

- AP1: Wie unterscheidet sich die Reparatur von komplexen DSB die in heterochromatischen Bereichen lokalisiert sind im Vergleich zu euchromatisch lokalisierten DSB? Dazu soll in synchronisierten Jurkat, SCL-II und NIH 3T3 Zellen ein Puls-Labeling mit  $^{125}\text{I}$ -UdR/  $^{123}\text{I}$ -UdR oder  $^3\text{H}$ -UdR in früher bzw. später S-Phase durchgeführt werden, so dass exklusiv entweder eu- bzw. heterochromatische Bereiche der DNA gelabelt werden. Nachfolgend soll der Einfluss der Schäden in hetero- und eu-chromatischen Bereichen auf Zellzyklusverlauf, die DSB Reparatur und die Genexpression untersucht werden.
- AP2: Wie unterscheidet sich die Qualität der Reparatur von DSBs unterschiedlicher Komplexität auf dem Level des einzelnen Bruches? Zu diesem Zweck soll ein Genreporterkonstrukt erstellt und stabil in das Genom von SCL-II Zellen integriert werden. Der verwendete Genreporter verfügt über TFO-Bindesequenzen, so dass mit Hilfe von  $^{125}\text{I}$  und  $^{131}\text{I}$  markierten TFOs sequenzspezifische Schäden, unterschiedlicher Komplexität erzeugt werden können.

Nach Reparatur der induzierten DNA-Läsionen soll das Konstrukt mittels einer Pull-Down Reaktion aus der genomischen DNA der Zellen aufgereinigt und hinsichtlich Mutationsfrequenz, -typ und -lokation untersucht werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Nach Synchronisierung und Puls-Labeling der Zellen mit  $^{125}\text{I}$ -UdR in der frühen bzw. späten S-Phase wurden Aliquots der Zellen unmittelbar nach dem Labeling, in der anschließenden G2/M-Phase sowie in den nachfolgenden G1-, S- und G2/M-Phase bei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwecks Zerfallsakkumulation eingefroren. Zu geeigneten Zeitpunkten wurden die Zellen aufgetaut, rekultiviert und RNA für die Genexpressionsanalysen isoliert, so dass diese RNA-Proben komplett vorliegen. Parallel dazu wurden die Auswertungen bzgl. der Induktion und Reparatur von  $^{125}\text{I}$ UdR-induzierten DSB ( $\gamma$ -H2AX/53BP1 Foci-Analysen) sowie Mikrokern- und Chromosomen-Analysen begonnen.
- AP2: Ergänzend zu den bereits durchgeführten Versuchen zur geno- und zytotoxischen Wirkung von  $^{125}\text{I}$  markierten TFO wurde in einem identischen Versuchsaufbau die Wirkung von  $^{32}\text{P}$  als hochenergetischer  $\beta$ -Emitter untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen (53 BP1 Foci Assay), chromosomalen Aberrationen (Mikrokern Assay) als auch der Apoptoseinduktion (Annexin V-FITC/PI Assay) durchweg geringere Effekte zu beobachten waren, als bei der Verwendung des Auger Elektronen Emitters  $^{125}\text{I}$ . Jedoch konnten auch nach  $^{32}\text{P}$ -Markierung Unterschiede zwischen den verwendeten TFOs festgestellt werden. Bei gleicher Anzahl induzierter 53BP1 Foci und chromosomaler Aberrationen wurde in TFO-p2RT behandelte Zellen eine im Vergleich zu den TFO-MBS behandelten Zellen signifikant erhöhte Apoptoserate festgestellt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: RNA-Isolation in zusätzlichen Kontrollen für die Genexpressionsanalyse; anschließende Durchführung und Analyse der Microarray-Experimente. Weiterführung der Auswertungen bzgl. der Induktion und Reparatur von  $^{125}\text{I}$ UdR-induzierten DSB ( $\gamma$ -H2AX/53BP1 Foci-Analysen). Abschluss der Mikrokern- und Chromosomen-Analysen. Durchführung von zellulären Uptake-Experimenten mit  $^3\text{H}$ -UdR. Synchronisierungs- und Puls-Labeling-Experimente mit  $^3\text{H}$ -UdR. Bestimmung der Apoptose- und Mikrokernrate in  $^3\text{H}$ -UdR-markierten Zellen.
- AP2: Da die erzielten Ergebnisse die Vermutung zulassen, dass die genomische Lokalisation der stabil integrierten p2RT Vektoren einen Einfluss auf die zellulären Effekte der induzierten Schäden haben, soll mittels „Long-Read-Sequencing“ die Positionen der p2RT Vektoren im Genom der stabil-transfizierten SCL-II p2RT Zelllinie bestimmt werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Unverricht-Yeboah M, Giesen U, Kriehuber R.: Comparative gene expression analysis after exposure to  $^{123}\text{I}$ -iododeoxyuridine,  $\gamma$ - and  $\alpha$ -radiation - potential biomarkers for the discrimination of radiation qualities. *Journal of Radiation Research*, Vol. 59, 4, 2018, 411–429  
<https://doi.org/10.1093/jrr/rry038>

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen	<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 043B
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt B	
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung	
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2015 bis 30.06.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.558.260,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Iliakis

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

1.1 UDE-1: Untersuchung der biologischen Effekte komplexer DNA-Läsionen in der Form von DSB-Clustern mit Hilfe eines eigens entwickelten Modellsystems zur gezielten Induktion von DSB mit einer Restriktionsendonuklease (I-SceI).

1.2 UDE-2: Weiterentwicklung des vorliegenden Modellsystems zur Induktion von DSB Clustern. Dazu sollen Systeme zur induzierbaren Expression und Destabilisierung von I-SceI eingeführt werden. Diese würden eine bessere zeitliche Kontrolle der DSB-Induktion und dadurch eine bessere Approximation der Situation nach Exposition an ionisierende Strahlung ermöglichen.

1.3 UDE-3: Der Effekt der erhöhten DSB Komplexität durch kombinierte Behandlung mit Cisplatin und ionisierende Strahlung (IR) auf die Strahlensensitivierung von Lungenkarzinomen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

UDE-1: Bereits vorhandene klonale CHO Zelllinien mit Integrationen des Systems zur Induktion von DSB-Clustern sollen um Klone mit zusätzlichen Integrationen erweitert werden. Das System soll in eine immortalisierte humane Fibroblasten-Zelllinie eingebracht und eine Batterie an Klonen mit unterschiedlicher Anzahl von Integrationen generiert werden. Der Einfluss der DSB-Cluster auf das Zellüberleben in sämtlichen klonalen Zelllinien soll getestet werden. Der Einfluss von DSB-Clustern auf die Entstehung von chromosomalen Aberrationen soll bestimmt werden. Die Einwirkung von DSB-Clustern auf die genomische Stabilität soll anhand der Detektion einer Vielzahl genomischer Veränderungen durch Next Generation Sequencing (NGS) untersucht werden. Der Einfluss der Abstände zwischen den I-SceI Sites auf die Letalität des Clusters wird geprüft. Die Auswirkung von DSB-Clustern mit inkompatiblen Enden sowie der Resektion auf die Zellletalität wird ermittelt.

UDE-2: Parameter für eine regulierte Aktivierung der I-SceI Endonuklease im Zellkern sollen ermittelt werden. Dafür wird die Expression von mit Glucocorticoid-Rezeptor- (GCR) und Destabilisierungsdomänen (DD) gekoppelter I-SceI Proteine in Abhängigkeit der Konzentrationen der jeweiligen Liganden und ihrer Inkubationszeiten und die daraus resultierende Induktion von DSB gemessen. Im Folgenden soll das System zur induzier- und regulierbaren Expression von I-SceI in die im Rahmen von AP3 generierten Zelllinien, die bereits Integrationen des Systems zur Induktion von DSB-Clustern durch I-SceI enthalten, eingebracht werden. Dies ermöglicht eine bessere zeitliche Kontrolle der DSB Induktion und erlaubt es, den Prozess der Transfektion und den damit verbundenen Stress für die Zellen zu vermeiden. In den so erzeugten modifizierten Zellklonen sollen dann ebenfalls das Zellüberleben, die Bildung von Chromosomenaberrationen sowie weitere genomische Alterationen (NGS) in Folge der Induktion von DSB-Clustern untersucht werden.

UDE-3: Mögliche Parameter für die Cisplatin- und Strahlenresistenz werden gesucht und Strategien entwickelt um diese zu umgehen. Hierzu wollen wir die Wirkung von Cisplatin und IR induzierten komplexen DNA Schäden auf die Checkpoint-Aktivierung im Zellzyklus, die Wahl der Reparaturwege, genomische Instabilität und Strahlenempfindlichkeit in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien (NSCLC) bewerten. Die Beziehung zwischen diesen funktionellen Endpunkten und möglichen Prädiktoren (Aktivierung unterschiedlicher Reparaturwege, Zellzyklusphasenabhängigkeit, Akkumulation residualer Schäden während fraktionierter Bestrahlung, die Chromatinstruktur, d. h. Histonmodifizierungen und EGFR Status der Zellen) werden analysiert.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

UDE-1: In humanen RPE1-Klonen wurde die Bildung von Rad51-Foci in G2-Zellen untersucht. Rad51 wurde häufiger an komplexe DSB rekrutiert als an einfache Brüche und persistierte dort länger (mind. 36 h). Dies weist auf eine substantielle Beteiligung der HRR an der Reparatur von ISceI-induzierten DSB-Clustern hin, deren Reparatur aber verzögert verläuft. Zytogenetische Untersuchungen zeigten außerdem, dass eine Hemmung von Rad51 die Anzahl von Chromosomenbrüchen und Aberrationen vor allem bei DSB-Clustern höchster Komplexität erhöht. Experimente in CHO-Klonen mit einfachen DSB (1xS.D) und DSB-Clustern (4xS.R), bei denen die Bildung von 53BP1-Foci durch RNAi-vermittelten knockdown von RNF8/168 unterbunden wurde, zeigten zudem in Überlebens-tests eine stärkere Abtötung von Zellen mit einfachen DSB, was auf eine stärkere Abhängigkeit dieser von cNHEJ hindeutet. Der Vergleich der Induktion von DSB-Clustern mittlerer Komplexität (2 x S.R) in CHO WT und DNA-PKcs-defizienten Zellen zeigte eine deutlich erhöhte Bildung von Translokationen und ein erniedrigtes Überleben in den Mutanten. Interessanterweise führte Hemmung von PARP1 mit PJ34 in den DNA-PKcs-Mutanten zu einem weiteren Anstieg der Translokationen, was eine Abhängigkeit der Bildung von alt-EJ in diesem Fall in Frage stellt. Wir haben begonnen die exakte Anzahl und genomische Lokalisation stabil integrierter transgener Konstrukte durch Nanoporen-Sequenzierung (MinION; ONT) in den verschiedenen Klonen zu bestimmen.

UDE-2: Die stabile Integration des Konstrukts zur regulierbaren Expression von ISceI in Klonen mit bereits integrierten ISceI-sites hat sich als problematisch erwiesen. Mögliche Ursache könnte Expression von ISceI von den zur Integration transfizierten Plasmiden während der Selektionsphase sein.

UDE-3: Unsere Daten zeigten eine verstärkte Radiosensibilisierung durch CP in resistenten A549 Zellen, wenn der MRN-Komplex durch Mirin gehemmt wurde. Diese Ergebnisse konnten durch Unterdrückung der Mre11 Expression mit siRNA bestätigt werden. Mirin erhöht den Anteil residualer strahleninduzierter Reparaturfoci ( $\gamma$ H2AX und Rad51) 24 h nach Bestrahlung in CP-resistenten Zelllinien, nicht aber in CP-sensitiven Zelllinien. Die Erhöhung der radiosensibilisierenden Wirkung von CP in beiden Zelllinien durch Metformin (MET) ging mit einem erhöhten Anteil von Pt-Addukten, erniedrigtem Anteil initialer Rad51 Foci sowie einem erhöhten Anteil residualer Reparaturfoci ( $\gamma$ H2AX, 53BP1) 24 h nach Bestrahlung einher. Der radiosensitivierende Effekt des MET war in A549 von dem AMPK Signalweg abhängig, wohingegen es in H460 AMPK unabhängig war.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

UDE-1: Die Ergebnisse zum knockdown von RNF8/168 in CHO Zellen sollen um chromosomale Translokationen und um Überexpressionsexperimente ergänzt werden. Die Ergebnisse in CHO WT und DNA-PKcs-defizienten Zellen sollen durch PCC-Analysen validiert und um Immunfluoreszenzanalysen von Rad51 und RPA-Foci ergänzt werden.

UDE-2: Um erneut aufgetretene Probleme bei der Erzeugung von Klonen mit regulierbarer Induktion von DSB durch ISceI ohne Transfektion zu überwinden, soll nun ein umgekehrter Ansatz getestet werden, bei dem zuerst das Konstrukt zur regulierbaren ISceI-Expression stabil integriert werden und dann die Konstrukte zur Erzeugung von DSB mit Hilfe des SB-Transposase eingebracht werden sollen. NGS Analysen sollen die Effekte von einfachen und komplexen DSB weiter charakterisieren.

UDE-3: Die Effekte der Kombinationstherapien im Plaque-Monolayer Assay, einem kliniknahen Tumormodell sowie den Einfluss der Chromatinstruktur auf die Kombinationstherapie werden untersucht. In der Arbeit von Herrn Erol, wollen wir den Effekt der Inhibierung des MRN Komplexes auf Reparaturfoci, die Aktivierung von NER, den Einfluss von komplexen CP/IR Brüchen auf die Replikationsdynamik sowie die Ko-lokalisierung von CP-Addukten und Reparaturfoci vorantreiben.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Riaz A. M., Sak A., Erol B. Y., Groneberg M., Melnikova M., Thomale J., Stuschke M.: Combined effects of metformin and cisplatin on radiation sensitivity in non-small cell lung cancer cells. *Strahlenther Onkol*, 2018 (Suppl) 194:S100

Riaz A. M., Sak A., Erol B. Y., Groneberg M., Thomale J., Stuschke M.: Metformin enhances the radiosensitizing effect of cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines with different cisplatin sensitivities. *Oncotarget*, 2018 (angenommen)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität Rostock, Universitätsplatz 1, 18055 Rostock		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 043C
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2015 bis 30.06.2019	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 237.438,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Wolkenhauer	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Die transkriptionellen Veränderungen nach DNA Schädigungen werden basierend auf Messungen von Genexpressionsdaten durch das Collar-Konsortium sowie von Datenerhebungen externer Quellen (TRANSFAC, String Datenbank) genutzt um genregulatorische Netzwerke, die zelluläre Mechanismen und regulatorische Interaktionen von DNA Schadensantworten beschreiben, vorher zu sagen. Zu diesem Zweck werden neue Herangehensweisen für die Kombination heterogener Netzwerkinterferenzen entwickelt und anhand von Computermodellen und experimentellen Genexpressionsdaten evaluiert. In Zusammenarbeit mit der Universität Duisburg-Essen und dem Forschungszentrum Jülich wird ein bioinformatischer Arbeitsablauf für die Datenanalyse von Sequenzierungen zu Genexpressionen erstellt und in Folge dessen zelluläre Antworten nach unterschiedlich komplexen Doppelstrangbrüchen untersucht. Außerdem werden die durch Doppelstrangbrüchen induzierten Einflüsse auf Hetero- und Euchromatin (via  $^{125}\text{I}$ -UdR) in den drei Zellzyklusphasen (G2, G1, S Phase) untersucht. Das Rahmenkonzept beinhaltet eine multivariate, statistische Analyse, Algorithmen zur Mustererkennung und eine funktionelle Analyse wichtiger Signalwege, die aktive Veränderungen zeigen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Identifizierung und Auswahl von öffentlich verfügbaren und geeigneten Genexpressionsdatensätzen
- AP2: Entwicklung eines halbautomatischen bioinformatischen Arbeitsablaufes für die Analyse von Genexpressionsdaten und weiterführenden Datentypen
- AP3: Untersuchung von genomweiten Expressionsveränderungen nach der Anpassung und der zielgerichteten Schädigung an Hetero- und Euchromatin
- AP4: Vorhersage von genregulatorischen Netzwerken, die zelluläre Antworten nach strahlungsinduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen aufzeigen
- AP5: Entwicklung eines Arbeitsablaufes für die Prozessierung von „Next Generation Sequencing“ Daten um genomische Veränderungen, generiert durch Anhäufung von Doppelstrangbrüchen, aufklären zu können

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP2: Um die Wiederverwendung der verwendeten Tools innerhalb der Genexpressionsanalyse einer breiteren wissenschaftlichen Gemeinschaft sicher zu stellen, wurde an einer Online-Trainingsplattform (<https://galaxyproject.github.io/training-material/>) für bioinformatische Datenanalysen mitgewirkt und veröffentlicht.
- AP3: Es wurde eine weitere Methodenevaluation zur Integration von Hochdurchsatzdaten mit Hilfe von spezieller Analysesoftware (KeyPathwayMiner) in Cytoscape durchgeführt und um eine Analyse von aktuellen Softwareanwendungen für die Identifizierung angereicherter Signalwege, die den Einfluss auf spezifische Signalwege anhand von Datenbanken (z. B. WikiPathways, BioCarta, Reactome etc.) prüfen, erweitert. Diese verwendete Herangehensweise erlaubt es Genexpressionsdaten unabhängig von bereits erstellten Netzwerken innerhalb eines integrativen Ansatzes zu nutzen und somit für die DNA-Reperatur-Mechanismen wichtige Signalwege zu identifizieren.
- AP5: Weiterhin wurde zusätzlich zu dem bisherig verwendeten Arbeitsablauf für die Identifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen die neuartige Technologie (DeepVariant), basierend auf „Deep Learning“, auf die vorhandene Datenstruktur implementiert und angewendet. Diese Methodik könnte zu einer unabhängigen, computergestützten Validierung von DNA-Doppelstrangbrüchen beitragen und damit eine Erhöhung der Genauigkeit bei der Identifizierung von strukturellen Variationen führen. Darüber hinaus wurde die entwickelte Analysestrategie für die Identifizierung von strukturellen Variationen (SV) im Genom für eine verbesserte Detektion von Doppelstrangbrüchen um neue Algorithmen geprüft und aktualisiert.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die innerhalb des Projektes verglichenen und vorab ausgewählten Tools und Integrationsherangehensweisen werden für die Analyse von SVs und der Genexpression mit Hilfe von experimentellen Sequenzierungsdaten, die durch die Projektpartner bereitgestellt werden, innerhalb der aktuellen Workflows weiterhin evaluiert, optimiert und validiert. Die neuartige Methodik basierend auf „Deep Learning“ wird weiterhin mit den klassischen Herangehensweisen abgeglichen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Wolfien M., et al.: Community-driven data analysis training for biology. Cell Systems. 10.1016/j.cels.2018.05.012

Wolfien M.: Posterslam auf der Langen Nacht der Wissenschaft – Rostock, 26.04.2018

Wolfien M.: Vortrag auf der Entwicklerkonferenz „NCONF“ – Rostock, 06.06.2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 045A
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2016 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 988.930,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Graw	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

In der Frage niedriger Dosen ionisierender Strahlen besteht dringender Forschungsbedarf sowohl hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen als auch hinsichtlich der biologischen Mechanismen. Bereits vor Beginn des Projekts wurden die Mäuse einmalig im Alter von 10 Wochen mit Dosen zwischen 0 Gy und 0,5 Gy ( $^{60}\text{Co}$ ) bestrahlt und die Auswirkungen auf das Auge und das Verhalten der Mäuse beiderlei Geschlechts im Verlauf der folgenden 2 Jahre betrachtet. In dieser Zeit wurden systematisch biologische Proben verschiedener Organe, Blutzellen und Plasma gesammelt. Diese Proben werden mit vielfältigen molekularen und „OMICS“-Untersuchungen einschließlich einer systembiologischen Analyse auf strahleninduzierte Veränderungen untersucht. Das Ziel des Verbundes ist es, ein ganzheitliches Verständnis der Wirkung niedriger Dosen ionisierender Strahlen auf einen Säugetierorganismus zu erhalten. Das Vorhaben leistet einen Beitrag zum Förderschwerpunkt „Strahlenforschung“ und hier insbesondere zur Nachwuchsförderung auf dem Gebiet der Strahlenbiologie im Rahmen des „Kompetenzverbund Strahlenforschung - KVSF“.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Die Augenruppe (HMGU-Auge; Jochen Graw; AP1) untersucht die Auswirkungen niedriger Strahlendosen auf die Linse und die Retina.

Das Verhaltensteam (HMGU-Verhalten; Sabine Hölter; AP2) untersucht die Auswirkungen niedriger Strahlendosen auf das Verhalten von Mäusen und Veränderungen im Gehirn.

Die Transkriptomgruppe (HMGU-ZYTO, Kristian Unger, AP5) analysiert die Transkriptomte in einen Teil der asservierten Organe.

Die Bestrahlungsgruppe (HMGU-AMSD, Helmut Schlattl; Z1) berät die Projektpartner hinsichtlich einer optimierten Bestrahlungsplanung betreut den nötigen Anlagenbetrieb.

Die Pathologie-Gruppe (HMGU-Patho, Frauke Neff; Z2) führt eine standardisierte Sektion der wichtigsten Organe aller Mäuse aus der Studie durch.

Die Datenintegrations-Gruppe (HMGU-ICB, Fabian Theis; Z3) verknüpft die Daten der einzelnen Arbeitspakete und führt eine systembiologische Analyse durch.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Die Ergebnisse des 1. Halbjahres 2018 wurden im Rahmen einer INSTRA-Vollversammlung am 28.6.2018 vorgetragen und diskutiert; hier erfolgt nur eine kurze Darstellung:

AP1: Augenuntersuchungen (HMGU-Auge; Jochen Graw)

Die DNA-Reparatur (charakterisiert durch gleichzeitige Anwesenheit von 53BP1 und  $\gamma$ H2AX im Zellkern) in Linsenepithelzellkulturen nach Bestrahlungen mit 0,5 Gy und 1 Gy zeigt ein Maximum nach 1 Stunde und eine Rückkehr zum Ausgangswert nach 24 Stunden. Es gibt keine Abhängigkeit von der Dosis, der Dosisrate und des Genotyps.

AP2: Verhalten (HMGU-Verhalten; Sabine Hölter)

Die weitere Auswertung der Verhaltensdaten zeigte einen allgemeinen Dosis-Effekt über die Beobachtungszeit von 18 Monaten. Wir sehen einen frühen Dosis-Effekt beim akustischen Schreckreflex; für „Bewegung und Erkundung“ ist ein Einfluss der Dosis im Alter signifikant. Im Alter beobachten wir zusätzlich einen signifikanten Einfluss der (heterozygoten) Mutation.

AP5: Transkriptomanalyse (HMGU-ZYTO; Kristian Unger)

Die ersten Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse des Bluts liegen vor. Die Effektgröße ist erwartungsgemäß klein, aber in allen Dosisgruppen nachweisbar. Es sind im Wesentlichen Signalwege der allgemeinen Immunantwort, der Myogenese und des Häm-Metabolismus betroffen.

Z1: Bestrahlung (HMGU-AMSD; Helmut Schlattl)

Es wurden noch einige Zellkulturproben bestrahlt; die  $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlungsanlage wurde zum 30.6.2018 abgebaut und steht nicht mehr zur Verfügung.

Z2: Pathologie (HMGU-PATHO; Frauke Neff): ausgeschieden

Z3: Datenintegration (HMGU-ICB; Fabian Theis)

Um die große Menge an Multi-Omics-Daten bewältigen zu können, haben wir eine INSTRA-Graph-Datenbank mit dem Neo4J-Framework erstellt.

Allgemein:

Zum Austausch statistischer Verfahren fand am 1.2.18 ein Statistik-Workshop **aller** INSTRA-Gruppen statt (Förderkennzeichen A-C).

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP1: Augenuntersuchungen (HMGU-Auge; Jochen Graw)

Es werden neue detaillierte histologische Analysen der Linsen 24-Monate nach der Bestrahlung durchgeführt, um mögliche Hinweise auf posterior-subcapsuläre Schäden zu finden.

AP2: Verhalten (HMGU-Verhalten; Sabine Hölter)

Die immunhistologischen Untersuchungen an Gehirnschnitten werden fortgeführt.

AP5: Transkriptomanalyse (HMGU-ZYTO; Kristian Unger)

Die Analyse der differentiell exprimierten Gene der Blutzellen wird unter besonderer Berücksichtigung des strahlenbiologischen Kontextes verfeinert.

Z1: Bestrahlung (HMGU-AMSD; Helmut Schlattl)

Es werden keine Bestrahlungen durchgeführt.

Z2: Pathologie (PATHO; Frauke Neff): ausgeschieden

Z3: Datenintegration (HMGU-ICB; Fabian Theis)

Die INSTRA Multi-Omics-Datenbank bildet die Basis unseres neu entwickelten Regressionsmodells. Das Modell benutzt Informationen aus öffentlich zugänglichen Datenbanken, um Schlüsselmerkmale im Zusammenhang mit niedrigen Bestrahlungsdosen zu analysieren und zu erkennen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Dalke, C., et al.: Lifetime study in mice after acute low-dose ionizing radiation: a multifactorial study with special focus on cataract risk. *Radiat Environ Biophys.* 2018;57:99-113

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Bundesamt für Strahlenschutz, Willy-Brandt-Str. 5, 38226 Salzgitter		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 045B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2016 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 262.634,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Kulka	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

In der Frage niedriger Dosen ionisierender Strahlen besteht dringender Forschungsbedarf sowohl hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen als auch hinsichtlich der biologischen Mechanismen. Bereits vor Beginn des Projekts wurden die Mäuse einmalig im Alter von 10 Wochen mit Dosen zwischen 0 Gy und 0,5 Gy ( $^{60}\text{Co}$ ) bestrahlt und die Auswirkungen auf das Auge und das Verhalten der Mäuse beiderlei Geschlechts im Verlauf der folgenden 2 Jahre betrachtet. In dieser Zeit wurden systematisch biologische Proben verschiedener Organe, Blutzellen und Plasma gesammelt. Diese Proben werden mit vielfältigen molekularen und „OMICS“-Untersuchungen einschließlich einer systembiologischen Analyse auf strahleninduzierte Veränderungen untersucht. Das Ziel des Verbundes ist es, ein ganzheitliches Verständnis der Wirkung niedriger Dosen ionisierender Strahlen auf einen Säugetierorganismus zu erhalten. Das Vorhaben leistet einen Beitrag zum Förderschwerpunkt „Strahlenforschung“ und hier insbesondere zur Nachwuchsförderung auf dem Gebiet der Strahlenbiologie im Rahmen des „Kompetenzverbund Strahlenforschung - KVSF“.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Untersuchungen von Markern für Herz-Kreislauf- und Entzündungserkrankungen (AP3; Ulrike Kulka, Sabine Hornhardt, Maria Gomolka, Monika Hauptmann, Ute Rößler):

AP1: Untersuchungen am Plasma:

Das gesammelte und isolierte Blutplasma wird für die Bestimmung inflammatorischer Faktoren und Stoffwechselmetaboliten verwendet.

AP2: Untersuchungen an der Milz:

Durch Proteomanalysen wurden Proteine identifiziert, die möglicherweise als Kandidaten für Strahlenempfindlichkeit angesehen werden können. Diese Daten wurden an humanen lymphblastoiden Zelllinien und Fibroblastenzellen erhoben und sollen nun an den Milzzellen der Mäuse verifiziert werden.

AP3: Untersuchungen an der Leber:

In kryokonserviertem Material der Mäuseleber soll die Strahlenantwort auf der Ebene der Phosphoproteine mittels Proteomics untersucht werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Untersuchungen am Plasma: Die geplanten Untersuchungen von inflammatorischen Faktoren in wissenschaftlich-technischer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Lehr am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie des Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf (Unterauftragnehmer) bearbeitet. Dabei werden mit Hilfe des Multiplex Immunassays Konzentrationsveränderungen von Zytokinen und C-reaktivem Protein (CRP) gemessen, welche bei einer Strahlenantwort betroffen sind. Plasmaproben von 121 männlichen Versuchstieren wurden ausgewählt, um folgende Fragestellungen zur Bestrahlung im Niedrigdosisbereich zu verfolgen: (i) Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen 0 Gy und 500 mGy zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung der Tiere (24 Stunden, 12, 18, 24 Monate nach Bestrahlung) (ii) Vergleich der Effekte der verschiedenen Strahlendosen (0 mGy, 63 mGy, 125 mGy, 500 mGy) (iii) Einfluss der rezessiven Mutation *Ercc2*<sup>S737P</sup> auf den Phänotyp. In ersten Vergleichen der mit 500 mGy bestrahlten Tiere mit Kontrolltieren konnte über alle Zeitpunkte hinweg ein dosisabhängiger Anstieg von CRP beobachtet werden, mit einem signifikanten Anstieg 12 Monate nach Bestrahlung. Zudem gab es im Vergleich einen signifikanten Anstieg des Granulocyte Colony-Stimulating Factor zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung. Die Daten wurden an die Datenintegrations-Gruppe (HMGU-ICB, Fabian Theis) übergeben.
- AP2: Untersuchungen an der Milz: Die Herstellung von Proteinextrakten aus Milzgewebe von 236 Tieren wurde abgeschlossen. In ersten Experimenten wurden 13 Kandidatenproteine mittels Western Blot analysiert, um die Wirkung der Strahlendosis 500 mGy zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung der Tiere (4, 24 Stunden, 12, 18 Monate nach Bestrahlung) zu verfolgen. In Proben bestrahlter männlicher Wildtyp-Tiere konnte bisher im Vergleich zu Kontrolltieren ein altersabhängiger Anstieg des Enzyms Superoxid-Dismutase 2 beobachtet werden. Dies muss jedoch in nachfolgenden Experimenten bestätigt werden.
- AP3: Untersuchungen an der Leber: Proteinextrakte wurden aus tiefgefrorenem Pulver der gesamten Leber von 243 Tieren hergestellt. Die Analyse der Proteinexpression in der Leber wird mittels DIGE durchgeführt. Es gingen 126 Tiere in die Untersuchungen ein. Die experimentellen Analysen sind abgeschlossen, die Auswertungen hierzu sind in Arbeit.

Das BfS beteiligte sich bei allen Arbeiten zur Asservierung der Mausorgane.

Das erste Jahrestreffen 2018 des INSTRA-Verbundes fand am 28.06.2018 am Helmholtz-Zentrum München statt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die Weiterarbeit wird nach Arbeitsplan durchgeführt. Die differentiell exprimierten Proteine werden mittels MALDI-TOF-Analyse identifiziert und anschließend mittels Western Blot validiert.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Dalke C., et al.: Lifetime study in mice after acute low-dose ionizing radiation: a multifactorial study with special focus on cataract risk. *Radiat Environ Biophys.* 2018;57:99-113

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität München, Arcisstr. 21, 80333 München	<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 045C
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt C	
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung	
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2016 bis 31.12.2018	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 208.353,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Atkinson

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

In der Frage niedriger Dosen ionisierender Strahlen besteht dringender Forschungsbedarf sowohl hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen als auch hinsichtlich der biologischen Mechanismen. Bereits vor Beginn des Projekts wurden die Mäuse einmalig im Alter von 10 Wochen mit Dosen zwischen 0 Gy und 0,5 Gy ( $^{60}\text{Co}$ ) bestrahlt und die Auswirkungen auf das Auge und das Verhalten der Mäuse beiderlei Geschlechts im Verlauf der folgenden 2 Jahre betrachtet. In dieser Zeit wurden systematisch biologische Proben verschiedener Organe, Blutzellen und Plasma gesammelt. Diese Proben werden mit vielfältigen molekularen und „OMICS“-Untersuchungen einschließlich einer systembiologischen Analyse auf strahleninduzierte Veränderungen untersucht. Das Ziel des Verbundes ist es, ein ganzheitliches Verständnis der Wirkung niedriger Dosen ionisierender Strahlen auf einen Säugetierorganismus zu erhalten. Das Vorhaben leistet einen Beitrag zum Förderschwerpunkt „Strahlenforschung“ und hier insbesondere zur Nachwuchsförderung auf dem Gebiet der Strahlenbiologie im Rahmen des „Kompetenzverbund Strahlenforschung - KVSF“.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Vergleichende Proteom-Analyse von Hippocampus und Cortex Schein-bestrahlter und bestrahlter Wildtyp- und heterozygoter (Ercc2) Mausmutanten. Erkenntnisse der in-vivo Beobachtungen werden in-vitro unter Verwendung zweier Zellmodelle (HT22- und Ntera2-Zellen) vertieft.
- AP2: Analyse strahlen-induzierter Proteom-Veränderungen im Herz von Wildtyp- und heterozygoter (Ercc2) Mausmutanten.
- AP3: Proteom-Analyse mesenchymaler Stammzellen (MSCs) von Wildtyp- und heterozygoter (Ercc2) Mausmutanten. Fokus hierbei liegt auf Proteinen, die mit dem Verlust der Stammzell-Multipotenz, Differenzierung und Seneszenz in Zusammenhang stehen.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Die Analysen der Verhaltenstests zeigen Alters- und Strahlendosisabhängige Veränderungen. Um die molekulare Ursachen dafür herauszufinden, wurden zu allen Zeit- und Dosisgruppen Proteomanalysen durchgeführt. Für das Protein-Profilung wurde eine markierungsfreie („label-free“) LS-MS/MS Quantifizierung angewendet und mit der Software „Progenesis Q1“ ausgewertet. Die Ergebnisse der Proteom-Analyse zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Strahlendosen, abhängig von Geschlecht und Genotyp. Alle massenspektrometrischen Messungen wurden abgeschlossen.

Die MS-Daten wurden unter Verwendung des Software-Tools „INGENUITY Pathway Analysis“ von QIAGEN bioinformatisch ausgewertet. Dabei wurden deregulierte Proteinnetzwerke identifiziert. Die wichtigsten Proteine, die als Hauptkoordinatoren für die betroffenen Signalwege identifiziert wurden, wurden mit Immunblot-Analysen validiert. Einer der zentralen deregulierten Signalwege nach Bestrahlung ist der Akt/CREB Signalweg. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Erhaltung der normalen Funktionalität von Neuronen, indem die Apoptose blockiert und die Proteinsynthese induziert wird. Durch Immunblot-Analysen zentraler Proteine, wie die Proteine Akt und CREB, konnte die Relevanz in der Strahlenantwort verifiziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass 24 Monate nach Bestrahlung, abhängig von der Dosis, anti-oxidative Signalwege aktiv sind. Zudem sind vor allem in der höchsten Dosis Anzeichen auf Entzündung und Zelltod sichtbar. Diese Ergebnisse können die in den Verhaltenstests beobachteten Veränderungen erklären und stimmen mit den Ergebnissen der anderen Teilprojekte überein. Die Herzproben wurden parallel zu den Gehirnproben nach gleichem Ablauf bearbeitet, allerdings konnten keine großen Alters- oder Strahlendosisbedingte Veränderungen auf der Proteomebene im Herzgewebe identifiziert werden.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Es sind noch weitere Validierungen der Gehirnproteomdaten anderer Zeitpunkte geplant. Zudem soll die Regulierung des Transkriptionsfaktors CREB in allen Proben über die Zeit verfolgt werden. Die Daten sollen mit den immunhistochemischen Analysen von AP2 verglichen werden. Ein Manuskript ist geplant.

Die MSCs, die aus dem Knochenmark der zu untersuchenden Tiere isoliert wurden, werden kurzzeitig für die Proteom-Analyse *in-vitro* propagiert und hinsichtlich der Expression von Stammzell-Markern charakterisiert. Speziell werden Proteine untersucht, die mit Verlust der Stammzell-Multipotenz, mit einer verstärkten spontanen Differenzierung sowie beschleunigter Seneszenz im Zusammenhang stehen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 047A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2017 bis 28.02.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 806.645,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Zitzelsberger	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im Rahmen des Verbundprojekts ZiSStrans sollen molekulare Zielstrukturen und Signalnetzwerke identifiziert werden, die eine Modulation der zellulären Strahlenantwort in Tumorgeewebe von Kopf-Hals-Tumoren erlauben, ohne die Normalgewebstoxizität zu erhöhen. Ausgehend von den im Vorgängerprojekt ZiSS identifizierten Signalnetzwerken der Strahlenantwort werden Zellkultur- und Tiermodelle zur Charakterisierung der Signalwege, zur systembiologischen Modellierung der Netzwerke und zur Validierung identifizierter Netzwerkpräsentanten eingesetzt. Die gewonnenen Hypothesen werden in translationalen Studien an Tumor- und Normalgewebeproben von Patientenkollektiven untersucht, die durch klinische Endpunkte hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit charakterisiert sind.

Dabei soll der wissenschaftliche Austausch und Nachwuchs gefördert werden und zudem die zukunftsweisende Systembiologie in die Strahlenforschung integriert werden.

Das Verbundprojekt besteht aus den sechs Projektpartnern: Abteilung Strahlenzytogenetik, Helmholtz Zentrum München (HMGU; Koordination), Bundesamt für Strahlenschutz (BfS), Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin (CUB), Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen (IFZ), Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Ludwig-Maximilian-Universität München (LMU), Klinik für Strahlenheilkunde Freiburg, Universitätsklinikum Freiburg (UKF).

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Verbundprojekt ist in vier Arbeitspakete (APs) unterteilt, die von den sechs Projektpartnern (HMGU, BfS, CUB, IFZ, LMU und UKF) gemeinsam bearbeitet werden:

AP1: Netzwerkanalyse und Systemmodellierung

AP2: Funktionelle Charakterisierung und präklinische Validierung von Strahlenantwort-relevanten Netzwerken

AP3: Translationale Validierung von Netzwerken und Markern in Patientengewebe

AP4: Nachwuchsförderung, Training und Interdisziplinärer Austausch

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1: Netzwerkanalyse und Systemmodellierung

AP1.1: Identifizierung zentraler Netzwerkmodule der Strahlenantwort

Die im Vorgängerprojekt gewonnenen integrativen, zeitaufgelösten Omics Datensätze von strahlenempfindlichen, normalen und resistenten Zelllinien wurden in enger Kooperation mit dem CUB bezüglich zentraler Netzwerkmodule der Strahlenantwort analysiert. Hierzu hat am 6./7.2.2018 ein Arbeitstreffen von Herrn Unger mit Herrn Klinger und Herrn Blüthgen (CUB) in Berlin stattgefunden.

Um den zeitlichen Verlauf von strahleninduzierten SASP-Faktoren zu erfassen und darüber hinaus übergeordnete Netzwerkknotenpunkte zu identifizieren, wurden vom IFZ weitere murine Pneumonitis-Proben (Thoraxbestrahlung mit 15 Gy) einer Zeitreihe (0-21 d) generiert und für Genexpressionsanalysen zur Verfügung gestellt. Die RNA-Proben (ex vivo Gesamtlungen-Homogenate) wurden am HMGU globalen mittels Mikroarrays Genexpressionsanalysen unterzogen. Derzeit erfolgt die Datenanalyse.

Für die Doktorandenstelle in AP1 zur „Systembiologische Charakterisierung und Modulation der Strahlenantwort in der Strahlentherapie“ konnte Frau Sarah Mwiberi als geeignete Kandidatin gewonnen werden, die die Stelle zum 1. August 2018 antreten wird.

AP3: Translationale Validierung von Netzwerken und Markern in Patientengewebe

AP3.1: Retrospektive Validierung von Netzwerken und Repräsentanten in Tumorgewebe

Die Aufarbeitung des retrospektiven Tumorkollektivs primär-definitiv strahlentherapierter HNSCC-Patienten (LMU-KKG Kollektiv) wurde abgeschlossen. Aus allen relevanten Gewebeproben wurde DNA und RNA isoliert sowie der HPV-Status der Tumorproben ermittelt (immunhistochemische Färbung von p16INK4a und PCR-Analysen zum Nachweis von HPV auf DNA-Ebene). Es wurde mit der Aufarbeitung des prospektiven LMU-KKG Kollektivs adjuvant strahlentherapierter HNSCC-Patienten begonnen. Gegenwärtig werden alle relevanten Gewebeproben aus der Pathologie herausgesucht, um Gewebe-Mikroarrays zu erstellen sowie simultan DNA und RNA zu isolieren.

AP3.3: Prospektive Validierung von Netzwerken und Repräsentanten in Tumor- und Normalgeweben

Vom Projektpartner Freiburg (UKF) wurden Zellpellets von einem Pilotversuch zur Generierung von Mundschleimhaut-Keratinocyten-Proben zur Verfügung gestellt. Hierzu wurden Keratinocyten-Zellen von drei Normal Spendern präpariert, bestrahlt (0/4 Gy), nach 24 h/96 h geerntet und jeweils 3 Aliquots Zellpellets schockgefroren. Am HMGU konnte erfolgreich ein Protokoll zur simultanen Isolation von DNA/RNA/Protein aus den Zellpellets etabliert werden. Die Protein-Isolate wurden zur Analyse erster Kandidatenproteine nach Essen (IFZ) geschickt. Des Weiteren wurden vom UKF primäre Keratinocyten-Zellen für die Etablierung von Chromosomenanalysen an Metaphasepräparaten zur Verfügung gestellt. Theresa Heider wird am 16./17.7. für einen Laboraustausch nach Freiburg fahren.

Das Halbjahres-Meeting des Verbundes ZISStrans fand am 26./27. März in Essen statt. Für das HMGU nahmen H. Zitzelsberger, K. Unger und J. Hess teil.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die geplante Weiterarbeit folgt dem Arbeitsprogramm.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Bundesamt für Strahlenschutz, Willy-Brandt-Str. 5, 38226 Salzgitter		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 047B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2017 bis 28.02.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 516.332,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Hornhardt	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das übergeordnete Ziel dieses Verbundprojekts ist die Identifizierung von molekularen Zielstrukturen und Signalnetzwerken, die die zelluläre Strahlenantwort in Tumorgewebe von Kopf-Hals Tumoren modulieren. In einem zweiten Schritt werden diese Signalwege und Repräsentanten auch in Normalgeweben auf ihre Beteiligung bei Strahlenreaktionen überprüft. Basierend auf den in vitro und in vivo Modellen mit charakterisierter Strahlenempfindlichkeit des Vorgängerprojekts ZiSS (02NUK024) und den identifizierten gemeinsamen Signalwegen von strahlenresistenten, normalsensitiven und hypersensitiven Zellkulturmodellen wird die Hypothese überprüft, ob diese gemeinsamen Signalwege eine zentrale Bedeutung bei der Ausprägung eines strahlenresistenten Phänotyps in Kopf-Hals Tumoren sowie bei der Strahlenreaktion im Normalgewebe haben. Durch Perturbationsexperimente werden die regulatorischen Netzwerke modelliert, um zentrale Netzwerkrepräsentanten als mögliche Biomarker und therapeutische Angriffspunkte zu charakterisieren. Konsequenterweise erfolgt daraufhin die Übertragung der Erkenntnisse aus den präklinischen in vitro und in vivo Modellen auf menschliche Primärgewebeprobe. Hierzu werden zunächst geeignete Nachweismethoden entwickelt und etabliert. Darüber hinaus werden Kollektive für Tumor- und Normalgewebe etabliert, die eine Verknüpfung der gemessenen Marker mit klinisch strahlenempfindlichen oder strahlenresistenten Phänotypen erlauben. Schließlich sollen im geplanten Verbundprojekt der wissenschaftliche Austausch und Nachwuchs gefördert werden und zudem die zukunftsweisende Systembiologie in die Strahlenforschung integriert werden. Weitere Verbundpartner sind Abt. für Strahlenzytogenetik, HelmholtzZentrum München; Institut für Pathologie, Charite Berlin; Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen; Klinik u. Poliklinik für Strahlentherapie u. Radioonkologie, Ludwig-Maximilians-Universität München; Klinik für Strahlenheilkunde, Universitätsklinikum Freiburg.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Netzwerkanalyse und Systemmodellierung  
Schwerpunkt BfS: 1.3 Implementierung von Nachweismethoden
- AP2: Funktionelle Charakterisierung und präklinische Validierung von Strahlenantwort-relevanten Netzwerken  
Schwerpunkt BfS: 2.4 Funktionelle Analyse und Validierung therapeutisch relevanter Netzwerkrepräsentanten und Knotenpunkte für die Normalgewebstoxizität in vitro
- AP3: Translationale Validierung von Netzwerken und Markern in Patientengewebe  
Schwerpunkt BfS: 3.2 Retrospektive Validierung von Netzwerken und Repräsentanten in Normalgewebe; 3.3 Prospektive Validierung von Netzwerken und Repräsentanten in Tumor- und Normalgeweben
- AP4: Nachwuchsförderung, Training und Interdisziplinärer Austausch  
Alle Arbeiten erfolgen in enger Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Aus der Sichtung der durch den 2D-DIGE Screen identifiziert Proteine gingen vor allem zellzyklusspezifische Proteine sowie Proteinuntereinheiten des Prä-Replikationskomplexes und Strukturproteine hervor. Es wurden Netzwerkanalysen vorgenommen und die Signaltransduktionswege auf vielversprechende Netzwerkknoten/Repräsentanten hin untersucht. Es wurden Interaktionspartner des G1/S-spezifischen Rb-Netzwerkes als Marker-Kandidaten identifiziert. Rb, RbAP48, mehrere Untereinheiten des MCM-Proteinkomplexes und seine Interaktionspartner Cdc6 und Cdc45 sowie Strukturproteine (LaminA, Septin) wurden ausgewählt und nachfolgend mit diesen Kandidaten eine funktionelle Analyse durchgeführt.
- AP2: Um die ausgewählten Protein-Kandidaten auf ihr Potential als Biomarker der Strahlensensitivität zu testen, wurden die Proteinlevel der ausgewählten Kandidatenproteine Rb, RbAP48, LaminA, Septin, Cdc6, Cdc45 und der Untereinheiten des MCM-Proteinkomplexes auf ihre Abundanzmuster in Zellextrakten lymphoblastoider Zelllinien untersucht. Hierzu wurden Zeitverlaufsexperimente von asynchronen Kulturen normaler (20037) sowie verschiedenen sensibler LCL Patienten-Zelllinien (4028, 4039, 4040, 4060, 4064) durchgeführt. Durch Western Blot Analyse wurden die Kandidaten-Proteine untersucht und die spezifischen Proteinmengen zu verschiedenen Zeitpunkten in den unbestrahlten sowie mit 10 Gy bestrahlten Zellen bestimmt und verglichen. Die Analyse der Proteinlevel zeigte bei mehreren der Kandidaten ein signifikant unterschiedliches Abundanzmuster zwischen der normal-sensitiven Linie 20037 und der radiosensitiven Linie 4060. Die Ergebnisse des Vergleichs mit anderen sensitiven Zelllinien stehen zu diesem Zeitpunkt noch aus.
- Aus der Analyse der Proteinlevel von Rb und seinem Interaktionspartner RbAP48 sowie der MCM-Proteinkomplexuntereinheiten MCM 2, 3, 4, 7, 10 ergaben sich Hinweise auf einen Unterschied in der stöchiometrischen Komplexzusammensetzung bzw. Hinweise auf eine veränderte Affinität der Bindungspartner. Diese mögliche strahlungsabhängige Bindung zwischen den Interaktionspartnern bzw. eine Veränderung in der Komplexstöchiometrie wurde durch Co-Immunpräzipitation überprüft. Hierbei wurde ein strahlungsabhängiger Unterschied im zeitlichen Verlauf der Bindung zwischen Rb und RbAP48 festgestellt im Vergleich der unbestrahlten und bestrahlten (10 Gy) Linien 20037 und 4060.
- AP3: Es wurden mit allen Verbundpartnern Grundlagen zur Aufarbeitung und Analyse des Patientenmaterials des Partners Universitätsklinikum Freiburg ausgearbeitet. Vorversuche zur Gewebekultur wurden durchgeführt um mögliche Zellmengen für die nachfolgende Analyse zu ermitteln. Für eine Validierung und Analytik der Biomarkerkandidaten in Material aus den Zellkulturen des Patientenmaterials wurden anschließenden Tests durchgeführt um die besten Bedingungen für den Zellaufschluss und eine simultane Extraktion von DNA, RNA und Protein zu ermitteln. Im Zeitraum wurden 5 Blutproben von Patienten aufgearbeitet.

Es fanden mehrere Telefonkonferenzen zwischen den Kooperationspartnern und am 26./27.03.2018 ein Projekttreffen in Essen statt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die Weiterarbeit wird nach Arbeitsplan durchgeführt.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Klinikum der Universität München, Marchioninstr. 15, 81377 München		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 047C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2017 bis 28.02.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 688.212,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Lauber	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im Rahmen des Verbundprojekts ZiSStrans sollen molekulare Zielstrukturen und Signalnetzwerke identifiziert werden, die eine Modulation der zellulären Strahlenantwort in Tumorgewebe von Kopf-Hals-Tumoren erlauben, ohne die Normalgewebstoxizität zu erhöhen. Ausgehend von den im Vorgängerprojekt ZiSS identifizierten Signalnetzwerken der Strahlenantwort werden Zellkultur- und Tiermodelle zur Charakterisierung der Signalwege, zur systembiologischen Modellierung der Netzwerke und zur Validierung identifizierter Netzwerkpräsentanten eingesetzt. Die gewonnenen Hypothesen werden in translationalen Studien an Tumor- und Normalgewebeproben von Patientenkollektiven untersucht, die durch klinische Endpunkte hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit charakterisiert sind.

Dabei soll der wissenschaftliche Austausch und Nachwuchs gefördert werden und zudem die zukunftsweisende Systembiologie in die Strahlenforschung integriert werden.

Das Verbundprojekt besteht aus den sechs Projektpartnern: Abteilung Strahlenzytogenetik, Helmholtz Zentrum München (HMGU; Koordination), Bundesamt für Strahlenschutz (BfS), Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin (CUB), Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen (IFZ), Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Ludwig-Maximilian-Universität München (LMU), Klinik für Strahlenheilkunde Freiburg, Universitätsklinikum Freiburg (UKF)

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Verbundprojekt ist in vier Arbeitspakete (APs) unterteilt, die von den sechs Projektpartnern (HMGU, BfS, CUB, IFZ, LMU und UKF) gemeinsam bearbeitet werden:

AP1: Netzwerkanalyse und Systemmodellierung

AP2: Funktionelle Charakterisierung und präklinische Validierung von Strahlenantwort-relevanten Netzwerken

AP3: Translationale Validierung von Netzwerken und Markern in Patientengewebe

AP4: Nachwuchsförderung, Training und Interdisziplinärer Austausch

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im vorliegenden Bericht werden Arbeiten des Projektpartners LMU zu AP1 - 4 dargestellt:

Gemeinsam mit den anderen Projektpartnern wurden die vorhandenen Daten zur Bedeutung der zellulären Seneszenz und des damit verbundenen sekretorischen Phänotyps gesichtet, final ausgewertet und im Sinne eines Publikationskonzepts zusammengestellt. Dies befindet sich aktuell in der ersten Korrektur- und Überarbeitungsphase. Darüber hinaus wurden und werden die Daten, die mit den generierten radioresistenten Cal33-Zellklonen von den verschiedenen Partnern erhoben wurden, gesichtet und zusammengestellt. Aktuell laufen noch Auswertungen der Microarray-Transkriptom-Daten. Ziel ist die zeitnahe Erstellung eines Publikationskonzepts.

Zum 01.04.2018 konnte mit Dr. Radostin Galabov ein neuer wissenschaftlicher PostDoc-Mitarbeiter für die Fortsetzung der Projektarbeiten gewonnen werden. Herr Galabov befindet sich aktuell in der Einarbeitungsphase. Da die Nachbesetzung dieser Stelle mit einem geeigneten Mitarbeiter sehr lange gedauert hat, ist leider eine Verzögerung von 10 Monaten in der Projektbearbeitung eingetreten.

Sonstiges:

Das Halbjahres-Meeting des Verbunds fand am 26./27. März im IFZ in Essen statt. Krankheitsbedingt konnte K. Lauber für den Projektpartner LMU leider nicht teilnehmen.

Am 26. Juni 2018 fand von 9 - 11 h eine Telefonkonferenz aller beteiligten ZiSStans-Partner statt. Es wurden der Probenaustausch zwischen den Verbundpartnern, die weiteren Arbeiten im Verbund, die Präsentation des Verbundes auf einer Homepage und auf Konferenzen sowie die Publikationsstrategie für die bereits gewonnenen Daten abgestimmt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Das Projekt wird wie im Projektantrag geplant weiterbearbeitet. Da die Nachbesetzung dieser Stelle mit einem geeigneten Mitarbeiter sehr lange gedauert hat, ist leider eine Verzögerung von 10 Monaten in der Projektbearbeitung eingetreten.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Publikationen

Linge A, Schötz U\*, Löck S, Lohaus F, von Neubeck C, Gudziol V, Nowak A, Tinhofer I, Budach V, Sak A, Stuschke M, Balermipas P, Rödel C, Bunea H, Grosu AL, Abdollahi A, Debus J, Ganswindt U, Lauber K, Pigorsch S, Combs SE, Mönnich D, Zips D, Baretton GB, Buchholz F, Krause M, Belka C\*, Baumann M\*; DKTK-ROG. Comparison of detection methods for HPV status as a prognostic marker for loco-regional control after radiochemotherapy in patients with HNSCC. *Radiother Oncol.* 2018;127(1):27-35. \*equal contribution

Kongressbeiträge

Schötz U, Orth M, Selmansberger M, Schuster J, Stegen B, Hess J, Unger K, Zitzelsberger H, Belka C, Engenhart-Cabillie R, Lauber K. Prognostic biomarkers and targets for personalization of radiotherapy of HNSCC: CD44v6. *Radiother Oncol.* 2018;127; Supplement 1: S251-S251 Meeting Abstract: OC-0488 ESTRO Jahrestagung

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen	<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 047D
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D	
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung	
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2017 bis 28.02.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 739.080,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Jendrossek

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im Rahmen des Verbundprojekts ZiSStrans sollen molekulare Zielstrukturen und Signalnetzwerke identifiziert werden, die eine Modulation der zellulären Strahlenantwort in Tumorgewebe von Kopf-Hals-Tumoren erlauben, ohne die Normalgewebstoxizität zu erhöhen. Ausgehend von den im Vorgängerprojekt ZiSS identifizierten Signalnetzwerken der Strahlenantwort werden Zellkultur- und Tiermodelle zur Charakterisierung der Signalwege, zur systembiologischen Modellierung der Netzwerke und zur Validierung identifizierter Netzwerkpräsentanten eingesetzt. Die gewonnenen Hypothesen werden in translationalen Studien an Tumor- und Normalgewebeproben von Patientenkollektiven untersucht, die durch klinische Endpunkte hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit charakterisiert sind. Dabei soll der wissenschaftliche Austausch und Nachwuchs gefördert werden und zudem die zukunftsweisende Systembiologie in die Strahlenforschung integriert werden.

Das Verbundprojekt besteht aus den sechs Projektpartnern: Abteilung Strahlenzytogenetik, Helmholtz Zentrum München (HMGU; Koordination), Bundesamt für Strahlenschutz (BfS), Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin (CUB), Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen (IFZ), Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), Klinik für Strahlenheilkunde Freiburg, Universitätsklinikum Freiburg (UKF)

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Verbundprojekt ist in vier Arbeitspakete (APs) unterteilt, die von den sechs Projektpartnern (HMGU, BfS, CUB, IFZ, LMU und UKF) gemeinsam bearbeitet werden:

- AP1: Netzwerkanalyse und Systemmodellierung
- AP2: Funktionelle Charakterisierung und präklinische Validierung von Strahlenantwort-relevanten Netzwerken
- AP3: Translationale Validierung von Netzwerken und Markern in Patientengewebe
- AP4: Nachwuchsförderung, Training und Interdisziplinärer Austausch

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

#### *Arbeiten des IFZ in AP1-4:*

Murine Lungengewebsproben (0 und 15 Gy Thoraxbestrahlung) wurden an den Partner HMGU weitergegeben und dort erfolgreich einer Transkriptom-Analyse unterzogen. Die Auswertung der erhaltenen Datensätze wird zeitnah in Zusammenarbeit mit der zum 1.8.2018 eingestellten Doktorandin

S. Mwiberi am HMGU erfolgen. Die quantitative Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Expression identifizierter relevanter SASP-Faktoren aus bestrahlten Gewebeproben mittels Real-Time PCR wird fortgeführt.

Derzeit wird der Effekt der Inhibition eines SASP Faktors auf die Radiosensitivität einer syngen murinen HNSCC-Tumorzelllinie *in vivo* getestet. Vorläufige Ergebnisse deuten auf eine Radiosensitivierung der Tumoren durch den SASP-Inhibitor hin. Erste Tumoren wurden bereits isoliert und werden derzeit histologisch und immunhistochemisch untersucht. Um statistisch valide Daten zu erhalten sind weitere Experimentalserien nötig, die Gegenstand aktueller Arbeiten sind. Ebenso wurden weitere Versuchsserien zur Analyse des Einflusses der Inhibition eines SASP Faktors mit immunmodulierenden Eigenschaften auf frühe (0-3 Wochen) und späte (ca. 25 Wochen) Lungenveränderungen nach einer Thoraxbestrahlung *in vivo* initiiert. Derzeit erfolgt die vertiefte Auswertung der Gewebeproben der bereits beendeten Versuchsserien. Zur Komplettierung der erhaltenen Daten werden komplementäre *in vitro* Untersuchungen an humanen und murinen Normalgewebszellen durchgeführt.

Vom Partner UKF wurden weitere retrospektiv gesammelte Speichelproben (Zellpellets und variable Mengen Speichelüberstand (0,5-5 ml)) von Patienten mit früher und später Mukositis-reaktion erhalten. Es wird derzeit getestet, ob sich aus den aus diesen Proben erhaltenen Zellpellets noch qualitativ hochwertige RNA zum Nachweis einer veränderten Expression bereits identifizierter Faktoren mit Bedeutung für pathologische Normalgewebs-Reaktionen isolieren lässt. Außerdem werden Ausstriche dieser Proben immunhistologisch auf das Vorhandensein bestimmter Immunzellen hin untersucht. Obwohl nicht aus allen Speichelproben ausreichende Mengen und qualitativ gute Zellen für die RNA-Isolierung und Zellanalyse isolieren lassen sind in den qualitativ guten Proben jedoch einzelne SASP-Faktoren nachweisbar. Die systematische Analyse dauert noch an. Erste qualitative Analysen von Test-RNA und Protein-Lysaten der Mundschleimhaut-Keratinocyten-Proben des Partners UKF (isoliert und erhalten vom HMGU) zeigen eine gute Qualität.

Das Halbjahres-Meeting des Verbundes fand am 26./27. März am IFZ in Essen statt. Für das IFZ nahmen V. Jendrossek, D. Klein, Ch. Hansel, S. de Leve, J. Matschke und F. Wirsdörfer teil. Am 26.6.18 fand zusätzlich eine Telefonkonferenz aller beteiligten ZiSStans-Partner statt. Die bislang im Projekt beschäftigte Post Doc S. de Leve befindet sich bis 19.8.2018 in Elternzeit. Ihre Vertretung Frau Dr. Alina Meyer hat zum 30.04.2018 die Arbeitsgruppe verlassen. Eine geeignete Vertretung für die verbleibende Zeit konnte nicht gefunden werden.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die geplante Weiterarbeit folgt dem Arbeitsprogramm.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Preis: Dr. S. de Leve erhielt den Dissertationspreis 2018 der DEGRO „Strahlenbiologie“

Vorträge: V. Jendrossek und S. de Leve auf der DEGRO (Leipzig)

Publikationen: Wiesemann A., Jendrossek V., Klein D.: Inhibition of Radiation-Induced Ccl2 Signaling Protects Lungs from Vascular Dysfunction and Endothelial Cell Loss. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Apr 2. doi: 10.1089/ars.2017.7458

Publizierte Abstracts (DEGRO 2018, Leipzig):

DeLeve S. et al.: *Strahlenther Onkol* (2018) 194 (Suppl 1): 1. P08-4

Wiesemann A. et al.: *Strahlenther Onkol* (2018) 194 (Suppl 1): 1. P08-14.

Wirsdörfer F. et al.: *Strahlenther Onkol* (2018) 194 (Suppl 1): 1. P08-15

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 047E</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt E		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.03.2017 bis 28.02.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 582.708,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Blüthgen	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel des Verbundvorhabens ist die Identifizierung von molekularen Zielstrukturen und Signalnetzwerken, welche die zelluläre Strahlenantwort in Tumorgewebe von Kopf-Hals Tumoren modulieren. Deren Relevanz wird auch in Normalgeweben überprüft. Außerdem soll eine Übertragung der Erkenntnisse aus Modellsystemen auf menschliche Proben erfolgen. Dabei soll der wissenschaftliche Nachwuchs gefördert und zudem die zukunftsweisende Systembiologie in die Strahlenforschung integriert werden. Das Projekt ist ein Verbundprojekt mit dem Bundesamt für Strahlenschutz (BfS), dem Institut für Zellbiologie (IFZ) der Universitätsklinikum Essen, der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), der Abteilung für Strahlenzytogenetik des Helmholtz Zentrums München (HMGU) sowie der Klinik für Strahlenheilkunde des Universitätsklinikums Freiburg (UKF).

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

CUB ist verantwortlich für die systembiologischen Analysen im Konsortialprojekt, die Arbeitsgruppe koordiniert das Arbeitspaket AP1 und alle Arbeiten der CUB werden in AP1 „Netzwerkanalyse und Systemmodellierung“ durchgeführt.

Im Einzelnen gliedert sich das Arbeitsprogramm in folgende Punkte. Jeder dieser Punkte wird in enger Kooperation mit den Konsortialpartnern bearbeitet.

- AP1.1: Identifizierung zentraler Netzwerkmodule der Strahlenantwort
- AP1.2: Identifizierung von Repräsentanten der Modulaktivität
- AP1.3: Implementierung von Nachweismethoden
- AP1.4: Zeitaufgelöste Messung der Netzwerkaktivitäten
- AP1.5: Modellierung der Netzwerke und Identifizierung von Modulationsknoten
- AP1.6: Datenhandling und -Management

### **3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse**

Ausgehend von den Arbeiten im vorherigen Berichtszeitraum wurde das Modellierungsverfahren weiter verbessert und insbesondere die Dokumentation der Modellierungssoftware (StasNet) überarbeitet. Diese ist nun auch als Journalpublikation im Fachjournal *Bioinformatics* zugänglich.

Nachdem in der letzten Berichtsperiode die für die Perturbationsexperimente benötigten Assays etabliert und getestet wurde, wurden diese nun genutzt, um die Vorexperimente für den großen Perturbationscreen zur Generierung modellierbarer Daten durchzuführen. Hier wurden die Konzentrationen und Zeitpunkte der Perturbationen an einem Zellmodell ausgetestet, und ein finales Perturbationsschema erstellt. Beim Projekttreffen in Essen wurde dieses mit den Projektpartnern diskutiert und noch weiter verfeinert. Als Perturbationen wurden verschiedenen Wachstumsfaktoren (IL1a, IGF, CXCL1, EGF, IFN-b), kleinmolekularen Inhibitoren (IKK-6, Rapamycin, AZD6244, LY294002, Ruxolitinib) sowie DNA-Damaging Agents ausgewählt. Diese Substanzen werden alleine und in Kombination genutzt, um das Signalnetzwerk von Zelllinienklonen mit unterschiedlicher Strahlenresistenz zu perturbieren, und dann die Phosphorylierung wichtiger Signalknoten mit Hilfe der etablierten Assays zu messen.

Weiterhin wurde in Kooperation mit der AG Unger eine Strategie zur Extraktion von Signalnetzwerken aus den Transkriptomdaten erarbeitet, die auf die im Vorgängerprojekt ZiSS angewendet wird, um weitere Kandidaten für Signalnetzwerke zu screenen.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Im 2. HJ 2018 ist insbesondere die Generierung von Daten (Perturbationsexperimente) zur Modellierung der Signalnetzwerke in Strahlenempfindlichen und –sensitiven Subklonen einer Zelllinie geplant sowie erste Modellierungen dieser Daten.

### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Die Modellierungspipeline wurde im Fachjournal *Bioinformatics* publiziert:

Dorel, M.; Klinger, B.; Sieber, A.; Prahallad, A.; Gross, T.; Bosdriesz, E.; Wessels, L. and Blüthgen, N.: Modelling Signalling Networks from Perturbation Data. *Bioinformatics*, early online, 2018, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bty473>

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Friedrichstr. 39, 79098 Freiburg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 047F</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt F		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.04.2017 bis 31.03.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 611.208,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Henke	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

ZiSStrans ist das Folgeprojekt zu ZiSS. In ZiSS identifizierte Signalwege der Seneszenz, des Zellzyklus, Immunsystems und von PI3K/Akt werden in weiterführenden Experimenten systembiologisch und funktionell spezifiziert und ihre Deregulation in humanen Proben validiert. Darüberhinaus sollen aus zusätzlichen Daten durch entsprechende Analysen weitere, neue Knotenpunkte und Repräsentanten in den Netzwerken der Strahlenantwort identifiziert werden. Sowohl Zellkulturmodelle als auch Patientenproben, die durch klinische Parameter hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit charakterisiert sind, werden untersucht.

Das Freiburger Projekt ist Teil eines Verbundes, dessen 5 Arbeitspakete von 6 Projektpartnern gemeinsam bearbeitet werden: Bundesamt für Strahlenschutz, AG-SG1.1 (Dr. S. Hornhardt, Dr. M. Gomolka), Helmholtz-Zentrum München, Abteilung für Strahlenzytogenetik (Prof. Dr. H. Zitzelsberger, Dr. J. Heß, Dr. K. Unger), Charité Berlin, Institut für Pathologie (Prof. Dr. Nils Blüthgen), Universitätsklinikum Essen, Institut für Zellbiologie (Prof. Dr. V. Jendrossek), LMU München, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, (Prof. Dr. K. Lauber, Prof. Dr. med. Belka), Universitätsklinik Freiburg, Klinik für Strahlentherapie (Prof. Dr. M. Henke, H. Bunea, Dr. A. Thomsen).

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: „Netzwerkanalyse und Modellierung“ (CUB/HMGU/BfS)
- AP2: „Zeitaufgelöste Messung von Netzwerkkomponenten, funktionelle Charakterisierung und präklinische Validierung von Strahlenantwort-relevanten Netzwerken in HNSCC Tumormodellen“ (LMU/HMGU/IFZ)
- AP3: „Zeitaufgelöste Messung von Netzwerkkomponenten, funktionelle Charakterisierung und Validierung von Strahlenantwort-relevanten Netzwerken in Normalgewebs-Modellen“ (IFZ/HMGU/BfS/UKF)
- AP4: „Translationale Validierung von Netzwerken und Markern in Patientengewebe“ (BfS/HMGU/LMU/UKF/IFZ)
- AP5: „Nachwuchsförderung, Training und Interdisziplinärer Austausch“ (BfS/CUB/HMGU/LMU/UKF/IFZ)

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Arbeiten des UKF in AP1 - AP2: entfällt, da im UKF-Teilprojekt nicht vorgesehen.

Arbeiten des UKF in AP3:

Es wurde, retrospektiv, ein Datensatz von Patienten mit Kopf-Halstumoren identifiziert, der Strahlendosis zur Ausprägung von Nebenwirkungen (Mukositis) und zu Tumorkontrolle erfasst. Von diesen Patienten sind asservierte Speichelproben (Zellen und Flüssigkeit für weitere Analysen verfügbar. Speichel-Zell-Pellets wurden zur methodischen Etablierung von Zytokinbestimmung aus klinischem Material dem Projektpartner IFZ übermittelt.

Normalgewebsanalysen werden sowohl in etablierten Zelllinien als auch im Patientengewebe durchgeführt. Dafür wurde ein komplettes klinisches Studienprotokoll für Patienten mit Kopf-Halstumoren erstellt. Es beschreibt die prospektive Identifizierung, Rekrutierung, Behandlung und Nachverfolgung dieses Kollektivs: Demographie, Tumorlokalisation und –ausdehnung sowie Schleimhautdosisbelastung/Mukositis-Grad, Tumor-Gesamtdosisbelastung/Tumor-kontrolle. Der Zeitablauf und die Methodik der Gewinnung prätherapeutischer und interventioneller Vollblut-, Serum-, Speichel- und FF-Tumorproben sowie von Mundschleimhautkeratinozyten dieser Patienten wurden definiert. Versandart und Ansprechpartner sowie weiteres processing der klinischen Proben für die Analyse von Netzwerk-Repräsentanten der Strahlenreaktion (ZiSS) wurden ebenfalls definiert und mit Probandenproben getestet. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Freiburg (413/17) bewertet. In einer Pilotphase wurden 20 Patienten bis März 2018 eingebracht, entsprechendes Material gewonnen und gespeichert. Der Aufbau einer Datenbank für Datenerfassung und spätere Analyse ist in Bearbeitung.

Für die in-vitro Bestimmung der individuellen Normalgewebs-Radiosensitivität wurde ein Kulturverfahren für Keratinozyten und ein Proliferations/Migrations-Assay entwickelt. Dies wurde zunächst an gesunden Probanden etabliert, danach – in einer Pilotphase - an 13 Patienten getestet. Dabei wurde keine nennenswerte Patientenbelastung beobachtet. Eine Test-Validierung, auch mittels Klonogenitätstestung und Chromosomen-Analyse ist noch ausstehend. Im Vorläuferprojekt, ZiSS, stand den Projektpartnern klinisches Material nicht zur Verfügung; die Analytik war daher nun auf die knapp bemessenen klinischen Proben anzupassen: Daher wurden kultivierte bestrahlte/unbestrahlte Keratinozyten sowie Medium-Überstand (jeweils Normalpersonen) zur Extraktion von DNA, RNA und Proteinen den Projektpartnern HGMU und CUB zugesandt und notwendige Zell-Mengen ermittelt.

Arbeiten des UKF in AP4:

Zu Patientengewebe und Normalgewebsreaktionen vergleiche auch oben, AP3 Abs. 2 und 3. Das Studienprotokoll erfasst die Tumorkontrolle. Die im Protokoll vorgesehenen und entnommenen Proben – insbesondere auch die FF-Tumorgewebsproben - sollen zur prospektiven Validierung der präklinisch identifizierten prädiktiven Biomarker (vgl. AP1-3) verwendet werden. 20 Patienten wurden bereits rekrutiert, ihre Daten erfasst und entsprechende Biomaterialien für die spätere Analyse asserviert.

#### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Die geplante Weiterarbeit folgt dem Arbeitsprogramm.

Speichelproben, Serumproben und Tumorproben werden weiterhin entsprechend Studienprotokoll in Freiburg gesammelt und tiefgefroren gelagert, klinische Daten kontinuierlich erfasst. EDTA- und Heparin-antikoaguliertes Vollblut wird für zelluläre Analysen an den Projektpartner BfS gesendet, der nach Anreicherung der mononukleären Zellen diese an die anderen Partner versendet.

Methodisch wird derzeit der Proliferations/Migrations-Assay validiert. Darüberhinaus wird untersucht, ob – nach Anwachsen der Keratinozyten – eine zwischenzeitliche Kryokonservation weitere Analysen beeinträchtigt.

Zur Datenakquisition und Optimierung der klinischen Abläufe wird eine remote-data-entry Datenbank erstellt.

#### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Langenbeckstr. 1, 55131 Mainz		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 048A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ESKaRa: Epidemiologische Studie zu Kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Radiotherapie bei Brustkrebspatientinnen, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.05.2017 bis 30.04.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 819.068,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Wollschläger	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Zur Beurteilung kardialer Spätfolgen durch die moderne Radiotherapie besteht weiterer Forschungsbedarf. Insbesondere fehlen aussagekräftige große Studien mit deutschen Patientinnen. Vor diesem Hintergrund wurde im Jahr 2013 die PASSOS-Herzstudie initiiert (BMBF, FKz: 02NUK026B). Zur PASSOS-Studie gehörten ca. 12.000 ehemalige Brustkrebspatientinnen, die zwischen 1998 und 2008 an den Universitätskliniken Mainz und Ulm (und 16 regionalen Ulmer Netzwerkkliniken) behandelt worden sind. Mehr als 75 % aller Studienteilnehmerinnen der PASSOS-Kohorte erhielten eine RT im Rahmen der Primärtherapie. Die Auswertung der PASSOS-Daten zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Lateralität und dem kardialen Mortalitäts- oder Morbiditätsrisiko. Methodische Einschränkungen der PASSOS-Herzstudie ergeben sich aus der kurzen Beobachtungszeit (durchschnittliche Follow-up Dauer ca. 7 Jahre). Zudem ist die Lateralität möglicherweise ein unzureichendes Proxy für die tatsächliche Dosisbelastung des Herzens. Das ESKaRa-Verbundprojekt ist die Fortsetzung und Erweiterung der PASSOS-Herzstudie.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

ESKaRa ist eine Kohortenstudie mit eingebetteter Fall-Kontroll-Studie. Dabei nutzt ESKARA klinische Daten, die bereits für die Studienteilnehmerinnen der PASSOS-Kohorte erhoben worden sind: prognostische Faktoren, Details der Brustkrebstherapie und kardiovaskuläre Komorbiditäten zum Zeitpunkt der Brustkrebstdiagnose. Darauf aufbauend wird ESKaRa ein zeitlich erweitertes Follow up zur Mortalität durchführen sowie eine erneute Fragebogenerhebung zur kardialen Morbidität. Neben den kardialen Spätfolgen wird ESKaRa zudem den Endpunkt „Zweitumore nach Brustkrebstherapie“ betrachten. Schließlich wird mit optimierten dosimetrischen Ansätzen eine exakte, individuelle Charakterisierung der Strahlenexposition des Herzens erfolgen:

AP1: Mortalitäts-Follow up bis einschließlich 30.06.2018.

AP2a: Fragebogenerhebung zur Erfassung inzidenter kardialer Ereignisse nach RT sowie von Zweitmalignomen (Selbstangabe).

AP2b: Zur systematischen Erfassung von Zweitumoren wird für Mainzer Patientinnen (ergänzend zum Fragebogensurvey) ein Abgleich mit dem Krebsregister in Rheinland-Pfalz durchgeführt. Für Patientinnen aus Ulm sollen alternative Vorgehensweisen geprüft werden (Klinisches Krebsregister Baden-Württemberg, CCC Ulm).

AP3: Fall-Kontroll-Studie mit exakter Dosimetrie: Fälle sind Patientinnen mit kardialen Ereignissen nach RT. Die „kardialen Ereignisse“ wurden in der PASSOS-Vorläuferstudie ermittelt (kardiale Mortalität oder Morbidität). Für Fallpersonen und für Kontrollpersonen (Letztere ohne kardiale Erkrankungen nach RT) wird die Herzdosis individuell auf Basis der Bestrahlungsplanung bestimmt – sowohl für das Ganzherz als auch für relevante Teilstrukturen. Bei Patientinnen, für die kardiale Ereignisse im Rahmen des zweiten Fragebogensurvey (AP2a) festgestellt werden sowie bei zugehörigen Kontrollpersonen wird die Herzdosis geschätzt.

AP4: Statistische Analyse: Dosis-Wirkungs-Analyse mit verschiedenen Endpunkten (Mortalität, Morbidität) unter Berücksichtigung von individuellen Confoundern (Ko-Morbiditäten, Lebensstilfaktoren etc.).

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1-AP3: Ergebnisse der vorbereitenden Arbeiten: Positives Votum des Landesdatenschützers Rheinland-Pfalz liegt vor, positives Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz liegt vor.
- AP1: Aufbau der Studiendatenbank zur Organisation und Dokumentation des Follow up. Anfragen an Einwohnermeldeämter in Rheinland-Pfalz wurde im Juli 2018 gestartet (ca. 50 % der Studienpopulation angeschrieben, davon bisheriger Rücklauf ca. 78 %).
- AP2a: Fragebogenerhebung: Anpassung der Erhebungsinstrumente (Fragebogen, Patientinnen-Information, Einverständniserklärung) und Modifikation gemäß Vorschlägen der Ethik-Kommission.
- AP2b: Abgleich der ESKaRa-Kohorte mit dem Krebsregister Rheinland-Pfalz zur Identifikation von Zweittumoren: Laut Votum des Landesbeauftragten für den Datenschutz in Rheinland-Pfalz (22.6.2018) müssen (entgegen ursprünglicher SOPs) die Adressdaten von Patientinnen mit Zweittumoren nicht in der ESKaRa-Studiendatenbank gelöscht werden.
- AP3: - Überarbeitung des PASSOS Herzatlas (Struktur His-Bündel/AV-Knoten).  
 - Erstellung von Listen bereits namentlich bekannter Fallpersonen aus Mainz und Ulm zur Akquise der elektronischen Daten zur Strahlentherapieplanung.  
 - Geschichtete zufällige Ziehung von jeweils 2 gematchten Kontrollpersonen für jede Fallperson aus Mainz und Ulm nach dem Incidence-Density-Sampling Verfahren.  
 - Entwicklung eines standardisierten Verfahrens zum Privacy Preserving Record Linkage zur Identifikation der die Strahlentherapie durchführenden Klinik bei Patientinnen mit Primärtherapie in einer Ulmer Netzwerkklinik. Testläufe des Record Linkage in Mainz und Ulm.  
 - Entwicklung von SOPs zur Akquise elektronischer Daten zur Strahlentherapieplanung aus den Netzwerkkliniken in Absprache mit Ulmer Kooperationspartner: Aufsetzen und Test einer Online-Plattform zum Austausch von DICOM-Dateien zur Bildgebung und Strahlentherapie.  
 - Einstellung und Einarbeitung eines Medizinphysikers in Ulm zum 01.09.2017.  
 - Einstellung eines Medizinphysikers in Mainz zum 15.10.2017 sowie einer MTRA in Mainz zum 01.01.2018.  
 - Herzkonturierung nach dem PASSOS Herzatlas inkl. der Erfassung von technischen Parametern der Strahlentherapie für Fälle und Kontrollen in Mainz und Ulm.  
 - Beginn der Akquise verschlüsselter Patientendaten zum späteren Record Linkage aus Strahlentherapie-Kliniken und Gynäkologien im Umland von Ulm.  
 - Entwicklung eines Tools zum Anonymisieren von DICOM Datensätzen vor dem Transfer von Ulm nach Mainz.  
 - Beginn eines Unterprojekts zur Lungenkonturierung.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Weiterführung Follow up mit Ende ca. Dezember 2018. Danach Beginn der Anfragen an Gesundheitsämter.
- AP2a: Einrichten einer Projekt-Webseite zur Außendarstellung gegenüber Studienteilnehmerinnen und an der Datenerhebung beteiligten Kliniken.
- AP2b: Sondierungsgespräche: Klinisches Krebsregister Baden-Württemberg, CCC Ulm.
- AP3: Record Linkage zwischen Netzwerkklinik-Gynäkologien und Strahlentherapie-Kliniken im Umland von Ulm mit anschließender Rekrutierung der Strahlentherapiedaten für Fälle und Kontrollen mit Primärtherapie in einer Netzwerkklinik. Fortsetzung der Dosimetrie für Fälle und Kontrollen mit Primärtherapie in Mainz und Ulm.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Präsentation Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Datenverarbeitung und Statistik (gmds) 2018: Angenommene Präsentation zum anonymisierten Record Linkage zwischen PASSOS Kohorte und Gutenberg Gesundheitsstudie (H. Merzenich)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität Ulm, Helmholtzstr. 16, 89081 Ulm		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 048B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt ESKaRa: Epidemiologische Studie zu Kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Radiotherapie bei Brustkrebspatientinnen, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.05.2017 bis 30.04.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 270.727,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Wiegel	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Anschlussprojekt zum Forschungsvorhaben PASSOS. Untersuchung von kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen in Deutschland unter Berücksichtigung individueller (kardiovaskulärer) Vorerkrankungen und Risikofaktoren.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Follow-up für Brustkrebspatientinnen (Diagnose 1998-2008). Das Mortalitäts-Follow up bis einschließlich 30.06.2018 (maximale Beobachtungszeit 20 Jahre). Bei verstorbenen Patientinnen individuelle Todesursachen-Recherche. Endpunkte: kardiale Mortalität, Krebssterblichkeit.
- AP2: Recherche zu inzidenten Zweitmalignomen und kardialen Ereignissen bis zum 30.06.2018. Fragebogenerhebung aller noch lebenden Kohortenmitglieder. Ergänzender Abgleich mit dem Krebsregister in Rheinland-Pfalz. Endpunkte: (Krebs-) Morbidität, kardiale Morbidität.
- AP3: Für alle Patientinnen nach Radiotherapie mit kardialen Ereignissen bis zum 31.12.2013 sowie für ereignisfreie Kontrollpersonen der Kohorte wird die Herzdosis individuell auf Basis der Bestrahlungsplanung bestimmt – sowohl für das Ganzherz als auch für relevante Teilstrukturen. Für Patienten mit kardialen Ereignis (Mortalität und Morbidität kombiniert) nach dem 31.12.2013 bis zum 30.06.2018 sowie für zugehörige Kontrollpersonen wird die Herzdosis geschätzt.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1+2: Einstellung einer medizinischen Dokumentarin seit 03/18 in der Frauenklinik Ulm zur Vorbereitung und Durchführung des Mortalitäts-FU und des Fragebogensurveys. Kontaktaufnahme/Schreiben an die externen Netzwerkkliniken erfolgt. Vorbereitung der Datenbanken, Abfragen und SOPs. Seit dem 01.07.2018 Anschreiben an die entsprechenden Einwohnermeldeämter der Patienten aus externen Zentren, von denen ein Einverständnis vorliegt, dass ihre personenbezogenen Daten im Studienzentrum der Universitätsfrauenklinik Ulm zentral gespeichert werden dürfen, zur Ermittlung des Vitalstatus bzw. zum Adressabgleich. Zusätzlich Anschreiben bezüglich Vitalstatusabgleich / Adressabgleich an die Einwohnermeldeämter von 4 externen Zentren aus über Patienten, bei denen die patientenbezogenen Daten in Ulm nicht vorliegen.
- AP3: Patientenliste entsprechend Fall-Kontroll-Design in Studienzentrale Mainz selektiert und von Gynäkologie Ulm de-anonymisiert an Strahlentherapie übermittelt. CTs mit Behandlungsplänen von Originaldatenträgern (Tape/CD) auf Server übertragen. Datentransformation für Segmentierung in aktueller Planungssoftware ECLIPSE. Herz mit Teilstrukturen (Myokard, linke/rechte Herzvorderwand, Aortenklappe, Pulmonalklappe, Reizleitungssystem) für jetzt insgesamt 300 Patienten konturiert (Stand August 2018) und Dosisvolumenhistogramme erstellt. Dokumentation zugehöriger Fall- und Behandlungsdaten in ESKaRa-spezifischem Standard-Format. Konturierung von CT-Serien im Rahmen des Inter-Observer-Vergleichs/PASSOS-Herzatlases. Verschlüsselung der Patientenennung zum Abgleich zwischen Gynäkologie- und Strahlentherapie-Patienten bei Studienzentrale Mainz. Entwicklung und erfolgreicher Test des anonymisierten Bilddaten-Transfers zwischen Ulm und Mainz.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1+2: Fortlaufender Abgleich mit den Einwohnermeldeämtern. Planung von weiteren Besuchen in den externen Zentren. Bei aktuell fehlender Rückmeldung von 9 Netzwerkkliniken, direkte Kontaktaufnahme mit den jeweiligen Chefarzten geplant. Beim jeweiligen zweiten Besuch in den Netzwerkkliniken sollen der Rücklauf der EMAs dokumentiert und die Gesundheitsämter angeschrieben werden, um für die Todesursachenrecherche die Sterbeurkunden „neu Verstorbener“ anzufordern.
- AP3: Fortsetzung der Konturierung/Dokumentation von Index- und Kontrollfällen. Pseudonymisierte Archivierung der CTs mit Behandlungsplänen und re-konturierten Herzstrukturen. Für sämtliche Fälle Ergänzung einer aufgrund des Inter-Observer-Vergleichs neu definierten Teilstruktur zur verbesserten Repräsentation des Reizleitungssystems.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 049A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt BrainRadiationAssay: Etablierung eines <i>in vitro</i> Systems zur Analyse und Prädiktion von Schäden im zentralen Nervensystem nach Exposition mit ionisierender Strahlung in Kombination mit anderen Neurotoxika, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2017 bis 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 596.000,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Schröder	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Strahleninduzierte Schäden des zentralen Nervensystems (ZNS) stellen ein immenses Problem sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie pädiatrischer Tumore dar und führen zu einer progressiven Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten, ähnlich wie sie in Demenz- und Alzheimerpatienten beobachtet wird. Als Ursache wird die Schädigung von Stamm- und/oder Vorläuferzellen im Gehirn und eine damit verbundene gestörte Neurogenese/Neuroregeneration diskutiert, die noch verstärkt wird durch Kombination mit Chemo- und Immuntherapie und/oder anderen Medikationen zur Behandlung von Komorbiditäten. Die genauen Wirkmechanismen dieser Kombinationstherapien auf das gesunde ZNS und insbesondere die Rolle ionisierender Strahlung dabei sind weitgehend unbekannt und es gibt weltweit kein System das es erlaubt, die Diversität dieser chronischen und kumulativen Langzeiteffekte und deren Risiko umfassend zu untersuchen. Im Verbundprojekt BrainRadiationAssay wird daher basierend auf humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) ein *in vitro* System entwickelt, das die *in vivo* Entwicklung und Regeneration von Neuronen und Mikroglia, welche als Makrophagen des Gehirns eine Schlüsselrolle sowohl in der Reaktion auf neurotoxische Einflüsse als auch in der Neurogenese selbst spielen, in allen Stadien realistisch nachbildet. So können die Mechanismen der Neurotoxizität von ionisierender Strahlung in Kombination mit anderen Therapieformen systematisch molekularbiologisch und elektrophysiologisch untersucht und potentielle Biomarker zur Prädiktion neurotoxischer Strahlenschäden identifiziert werden. Zusammenfassend stellt das Projekt einen wichtigen Baustein in der besseren Handhabung und Minimierung von strahleninduzierten Langzeitfolgen der Tumordetektion und -behandlung dar.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Verbundvorhaben beinhaltet die folgenden Arbeitspakete (Teilprojekte):

- AP1: Entwicklung eines neuronalen und mikroglialen Differenzierungssystems auf der Basis von hESZ und Untersuchung der Wirkmechanismen von Röntgenstrahlen und C-Ionen auf die neuronale/mikrogliale Differenzierung von hESZ allein oder in Kombination mit Chemotherapeutika, Immuntherapeutika oder Antikonvulsiva (GSI Helmholtzzentrum, Dr. Insa S. Schroeder).
- AP2: Transfer der Differenzierungssysteme auf MEA Chips für funktionale Analysen von Neuronen nach kombinierter Strahlen- und Medikamenteneinwirkung (Hochschule Aschaffenburg, Prof. Dr. C. Thielemann).

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1:

Die für den Berichtszeitraum geplante Etablierung der Herstellung kortikaler Gehirn-Organoiden aus humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) nach einer von Lancaster et al. (Nature Biotechnology 35, 2017, 659-666) publizierten Methode war erfolgreich und die ersten Organoiden haben das Ende der Differenzie-

rung-/Kultivierungszeit von 60 Tagen bald erreicht, so dass mit der Charakterisierung begonnen werden kann.

Diverse Methoden zur optimalen Adhesion der embryonalen Stammzellen an Mikrofilamente, die aus chirurgischem Poly(lactid-co-Glycolid) (PLGA)-Nahtmaterial hergestellt werden mussten, wurden verglichen und Techniken zur Herstellung der Mikrofilamente verbessert. Auch wenn so die Ausbeute von Organoiden um das Vierfache erhöht werden konnte und ein wichtiger Meilenstein des Projekts erreicht ist, wäre eine maschinengesteuerte, standardisierte Produktion von PLGA-Mikrofilamenten vorteilhaft und soll in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Nanobiosystemtechnik der TU Ilmenau realisiert werden (siehe weiterführende Arbeiten). Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass die hESZ eine quervernetzte Filamentstruktur bevorzugen, so dass Halbkugelartige Netze aus PLGA hergestellt werden sollen, die eine in Größe und Ausrichtung der Zellen reproduzierbare Aggregatbildung fördern. Die bisher generierten Organoiden weisen morphologisch identifizierbare Kortexstrukturen auf, so dass von einer erfolgreichen Neurogenese ausgegangen werden kann.

Neurale Stammzellen und Neurosphären wurden für den Kooperationspartner HAB (AP2) hergestellt, um die Möglichkeiten der Aufbringung dieser Zellen auf neue Multi-Electrode-Arrays (MEAs) und ihre Verwendung für Bioprint-Prozesse zu testen. Das Bioprint-Verfahren könnte die im Projekt angestrebte Kokultur von neuronalen Vorläuferzellen, Neuronen und Mikrogliazellen durch eine gerichtete und reproduzierbare Strukturierung wesentlich erleichtern.

Die im Verbundprojekt HiPSTAR (BMBF - Richtlinie zur Förderung innovativer Stammzelltechnologien für die individualisierte Medizin) erarbeiteten neuen Strategien zur Generierung von neuronalen Rosetten (neurale Vorläuferzellen, die dem Neuralrohr ähneln) ließen sich mithilfe der vorhandenen technischen Ausstattung nicht etablieren. Es wurde aber die Anschaffung eines neuen Inkubators veranlasst, der es uns ermöglicht, unter physiologischen Hypoxiebedingungen (5 % Sauerstoff) entsprechende neurale Rosetten für die weitere Differenzierung in Neurone herzustellen.

#### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Die umfassende Charakterisierung der generierten Gehirn-Organoiden auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR und auf Proteinebene mittels immunocytochemischer Analysen steht im Fokus der weiterführenden Arbeiten. Hierbei ist insbesondere die Kooperation mit dem Institut für Strahlenbiologie des Helmholtz Zentrums München von Vorteil, welches Proteomanalysen der Organoiden durchführen kann. Erste Strahlenexperimente sowohl mit Röntgenstrahlung als auch mit Kohlenstoffionen sind für den Herbst 2018 geplant.

Vertieft werden soll innerhalb der Kooperation mit der Arbeitsgruppe Nanobiosystemtechnik der TU Ilmenau die Herstellung und Testung von PLGA-Kopolymerstrukturen zur reproduzierbaren Bildung von Gehirn-Organoiden. Hier ist das Ziel, ein dreidimensionales Netzwerk aus PLGA herzustellen, um die aufwendige und schlecht reproduzierbare Herstellung von Mikrofilamenten aus PLGA-Wundnahtmaterial zu umgehen. Ebenso soll die Generierung von neuronalen Vorläuferzellen (neurale Rosetten) durch die Anwendung spezieller Scaffolds, die die Ausrichtung der neuronalen Stammzellen in Rosetten begünstigen sollen, erprobt werden. Dies wird durch den Gastaufenthalt einer Studentin der TU Ilmenau im Rahmen der GSI Summer School ermöglicht.

Die Herstellung von neuronalen Vorläuferzellen (neurale Rosetten), die statt der bislang für die Generierung von Organoiden verwendeten hESZ, eingesetzt werden sollen, kann nach der Beschaffung eines neuen Inkubators zügig implementiert werden.

#### **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Celine Katharina Schielke, Masterarbeit: „Differenzierung von neuronalen Stammzellen in neurale Vorläuferzellen und Neurone, eingereicht am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz am 31.01.2018

Mayer M., Arrizabalaga O., Schröder I., Ritter S. and Thielemann C. (2018): Human Embryonic Stem Cell Derived Neurospheres – 2D and 3D Cell Culture in one sample. Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2018 | 11th International Meeting on Substrate Integrated Microelectrode Arrays. doi: 10.3389/conf.fncel.2018.38.00078

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Hochschule für angewandte Wissenschaften - Fachhochschule Aschaffenburg, Würzburger Str. 45, 63743 Aschaffenburg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 049B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt BrainRadiationAssay: Etablierung eines in vitro Systems zur Analyse und Prädiktion von Schäden im zentralen Nervensystem nach Exposition mit ionisierender Strahlung in Kombination mit anderen Neurotoxika, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2017 bis 31.12.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 389.735,00 EUR		<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Thielemann

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Strahleninduzierte Schäden des zentralen Nervensystems (ZNS) stellen ein immenses Problem sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie pädiatrischer Tumore dar und führen zu einer progressiven Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten, ähnlich wie sie in Demenz- und Alzheimerpatienten beobachtet wird. Als Ursache wird die Schädigung von Stamm- und/oder Vorläuferzellen im Gehirn und eine damit verbundene gestörte Neurogenese/Neuroregeneration diskutiert, die noch verstärkt wird durch Kombination mit Chemo- und Immuntherapie und/oder anderen Medikationen zur Behandlung von Komorbiditäten. Die genauen Wirkmechanismen dieser Kombinationstherapien auf das gesunde ZNS und insbesondere die Rolle ionisierender Strahlung dabei sind weitgehend unbekannt und es gibt weltweit kein System das es erlaubt, die Diversität dieser chronischen und kumulativen Langzeiteffekte und deren Risiko umfassend zu untersuchen. Im Verbundprojekt BrainRadiation-Assay wird daher basierend auf humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) ein in vitro System entwickelt, das die in vivo Entwicklung und Regeneration von Neuronen und Mikroglia, welche als Makrophagen des Gehirns eine Schlüsselrolle sowohl in der Reaktion auf neurotoxische Einflüsse als auch in der Neurogenese selbst spielen, in allen Stadien realistisch nachbildet. So können die Mechanismen der Neurotoxizität von ionisierender Strahlung in Kombination mit anderen Therapieformen systematisch molekularbiologisch und elektrophysiologisch untersucht und potentielle Biomarker zur Prädiktion neurotoxischer Strahlenschäden identifiziert werden. Zusammenfassend stellt das Projekt einen wichtigen Baustein in der besseren Handhabung und Minimierung von strahleninduzierten Langzeitfolgen der Tumordetektion und -behandlung dar.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Verbundvorhaben beinhaltet die folgenden Arbeitspakete (Teilprojekte):

- AP1: Entwicklung eines neuronalen und mikroglialen Differenzierungssystems auf der Basis von hESZ und Untersuchung der Wirkmechanismen von Röntgenstrahlen und C-Ionen auf die neuronale/ mikrogliale Differenzierung von hESZ allein oder in Kombination mit Chemotherapeutika, Immuntherapeutika oder Antikonvulsiva (GSI Helmholtzzentrum, Dr. Insa S. Schroeder).
- AP2: Transfer der Differenzierungssysteme auf MEA Chips für funktionale Analysen von Neuronen nach kombinierter Strahlen- und Medikamenteneinwirkung (Hochschule Aschaffenburg, Prof. Dr. C. Thielemann).

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im Fokus der im Berichtszeitraum durchgeführten Experimente standen die aus humanen embryonalen Stammzellen differenzierten Neurosphären.

In den letzten Monaten wurden die Kultivierung und Passage von neuralen Stammzellen sowie die Herstellung von Neurosphären im BioMEMS Lab der Hochschule Aschaffenburg etabliert. Die Neurosphären wurden erfolgreich auf den MEA Chips ausgesät und elektrische Signale detektiert.

Werden Neurosphäre auf einem geeigneten Substrat ausgesät, beginnen Zellen und Neurite radial aus der Neurosphäre zu migrieren. Bereits im vorrangegangenen Projekt Pränatal (02NUK025C) konnte durch immunhisto-

chemische Methoden nachgewiesen werden, dass es sich bei diesen Zellen um postmitotische Neurone handelt. Im Berichtszeitraum wurden nun erfolgreich Protokolle zur Anfertigung von Kryoschnitten sowie zur immunhistochemischen Markierung der selbigen etabliert. Dabei zeigte sich, dass sich im Inneren der Neurosphären sowohl Neurone, als auch neurale Stammzellen befinden. Eine Selbstorganisation der Zellen zu einer definierten Struktur wurde nicht nachgewiesen.

Um das Auswachsen der Zellen und Neurite besser analysieren zu können, wurde Anfang des Jahres die Software Metamorph mit dem dazugehörigen *Neurite outgrowth* Modul erworben. In ersten Vorversuchen wurde die Software dazu eingesetzt um Netzwerke kortikaler Rattenneurone sowie aus den Neurosphären migrierende Zellen und Neurite zu analysieren. Zunächst wurde getestet, welche Aufnahmen für die Analyse am besten geeignet sind. Hierfür wurden konventionelle mikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt sowie eine Lebendfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DIL und eine Antikörperfärbung fixierter Zellen gegen das Protein MAP2. Dabei zeigte sich, dass die Fluoreszenzfärbungen für die Analyse des Neuritenwachstums besser geeignet sind, da hier der Kontrast zwischen zellulären Strukturen und dem Hintergrund höher ist. Aufgrund der höheren Auflösung der Antikörperfärbungen sind diese einer Lebendfärbung mit dem Farbstoff DIL vorzuziehen.

Im vorangegangenen Projekt Pränatal wurde gezeigt, dass Neurosphären, die auf mit Röntgenstrahlung (1 Gy) exponierten embryonalen Stammzellen basieren, ein geringeres Aktivitätsniveau besitzen, als entsprechende Kontrollkulturen. Um zu untersuchen ob dieser Effekt auch auftritt, wenn die Bestrahlung zu einem späteren Differenzierungsstadium erfolgt, wurden in den letzten Wochen neurale Stammzellen mit Röntgenstrahlung exponiert. Aus den überlebenden Zellen wurden anschließend Neurosphären hergestellt. Diese werden momentan auf den MEA Chips kultiviert und ihre elektrische Aktivität täglich abgeleitet.

Des Weiteren wurden die ersten Neurosphären auf den CMOS-basierten *high density* MEAs (HDMEA) kultiviert. Um ein optimales Adhäsionsverhalten der Zellen auf den Chips zu erreichen, wurden hierbei unterschiedliche Beschichtungsprotokolle verwendet. Dabei zeigte sich, dass eine Beschichtung mit Polyethylenimin und Laminin zu den besten Ergebnissen geführt hat. Die Neurosphären adhärten auf den HDMEAs und das Auswachsen einzelner Neurite wurde beobachtet. Neuronale Signale konnten jedoch noch nicht detektiert werden. Zusätzlich zu den Arbeiten mit Neurosphären, wurden weitere Experimente mit dem im BioMEMS Lab vorhandenen Bioprinter durchgeführt. Hierbei wurden neurale Stammzellen in einer geeigneten Biotinte vermengt und in einer mäanderförmigen Struktur auf die MEA Chips gedruckt. Dabei zeigte sich, dass die Strukturen hochgenau auf den Elektroden des MEA Chips gedruckt werden können. Des Weiteren zeigte sich ein gutes Adhäsionsverhalten der in der Biotinte vermengten Zellen auf den MEA Chips.

Ferner wurden die Algorithmen zur Signalverarbeitung optimiert. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Quantifizierung der Synchronität neuronaler Signale gelegt. Für die Quantifizierung der Synchronität wurde ein spezieller Algorithmus namens „Spike-contrast“ entwickelt, welcher die Synchronität nicht nur mit einem skalaren Wert beschreibt, sondern ein Synchronitäts-Spektrum erzeugt, welches es erlaubt die zeitlichen Änderungen der Synchronität von sich entwickelnden neuronalen Netzwerken zu untersuchen.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

Im Fokus der nächsten Experimente stehen weiterhin die aus humanen embryonalen Stammzellen differenzierten Neurosphären. Nach Beendigung des derzeit laufenden Bestrahlungsexperimentes, bei dem neurale Stammzellen mit 1 Gy Röntgenstrahlung exponiert wurden, sollen die daraus gewonnenen Daten analysiert und mögliche strahleninduzierten Veränderungen des Aktivitätsmusters ermittelt werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollen durch Wiederholungen des Experiments validiert werden. Zusätzlich zu der Untersuchung der Funktionalität sollen die Auswüchse der Neurosphären mittels Antikörperfärbung markiert und mit der Software Metamorph analysiert werden. Dadurch soll ermittelt werden, ob die Bestrahlung der neuralen Stammzellen einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen in den Neurosphären hat. Ferner soll mithilfe immunhistochemischer Färbungen gegen das Protein Synaptophysin die Anzahl synaptischer Verbindungen in den Neurosphären sowie in den auswachsenden Neuronen untersucht werden.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

M. Mayer, O. Arrizabalaga, I. Schröder, S. Ritter and C. Thielemann: Human Embryonic Stem Cell Derived Neurospheres – 2D and 3D Cell Culture in one sample; Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2018

M. Ciba and C. Thielemann: Synchrony changes on different time-scales during in vitro neuronal network development; Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 050A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.08.2017 bis 31.01.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.944.335,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Fournier	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Aufbauend auf die im GREWIS-Projekt erzielten Ergebnisse soll die Langzeitwirkung von Radonexposition näher untersucht werden, anknüpfend an die Notwendigkeit der Aufklärung biologischer Mechanismen im Niedrigdosis-Bereich, um fundierte Erkenntnisse zur therapeutischen Anwendung zu erarbeiten und die Unsicherheiten in der Einschätzung der Wirkung von niedrigen Dosen insbesondere von  $\alpha$ -Strahlung zu reduzieren. Die Radonkammer und die im GREWIS-Projekt etablierten Methoden der physikalischen und biologischen Dosimetrie sollen verwendet werden, um die Aktivitätskonzentrationen in der Lunge von exponierten Mäusen und in einem einfachen Lungenmodell zu quantifizieren, und dabei zwischen Radon und Folgeprodukten zu unterscheiden sowie eine Dosis abzuschätzen. In einem biologischen Lungenmodell sollen Zelltypen mit besonderem Risiko für bleibende genetische Schäden identifiziert werden. In Arbeiten des GREWIS-Projektes wurde in Fettgewebe (*ex vivo*) eine Akkumulation von Radon beobachtet sowie in der ersten Radon-Patientenstudie eine immunmodulierende und entzündungshemmende Wirkung, die sich auch auf Faktoren des Fettgewebes erstreckt. Die Antwort von Fettzellen auf Exposition mit  $\alpha$ -Teilchen- bzw. Radon sowie der Zusammenhang zu den beobachteten Veränderungen von Immun-, Gelenk- und Knochenzellen soll in weiteren Patientenstudien sowie durch *ex vivo* Untersuchung von Patientenmaterial und *in vitro* aufgeklärt werden.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Radon-Diffusion/ Löslichkeit und Aerosole
- Radonkammer, Service Strahlenschutz
  - Dosisdeposition von Radon im mechanischen Lungenmodell
  - Radon-Löslichkeit und Konzentration (Gewebe, Organe, Mäuse; mit HPGe-Detektor)
  - Radon-Diffusion in Gewebeschichten (Fett, Knochen, Bindegewebe; in Radonkammer)
  - Exposition von Mäusen in Radonkammer
- AP3: Zytogenetische Untersuchungen
- Etablierung der organotypischen Kultivierung und Differenzierung von HBEZ
  - Genetische, zellbiologische und molekulare Endpunkte (Photonen und  $\alpha$ -Bestrahlung)
  - Differenzierungsfähigkeit/Funktionalität der HBEZ nach einer Strahlenexposition
  - Genetische Marker in Patienten(blut) nach Radon-Exposition
- AP4: (Osteo-) immunologische und entzündliche Reaktionen
- Osteo-immunologische Veränderungen in Patientenblut (LD-RT-, RAD-ON02-Studie)
  - Untersuchung von Vorläuferzellen *ex vivo* vor und nach Therapie (LD-RT, RAD-ON02)
  - *Ex vivo* Bestrahlung von Synovial-Gewebe von Patienten und gesunden Spendern
  - Vergleich des Einflusses von Photonen- und  $\alpha$ -Strahlung auf OB-Vorläuferzellen
  - Wirkung von Radon-Adsorption in hTNF- $\alpha$ -tg Mäusen;IDO-Expression in Lunge und Haut
  - Adhäsion von Lymphozyten auf Endothelzellen (organotypische), anti-oxidativer Einfluss

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Die Messungen zur Radonlöslichkeit in unterschiedlichen Materialien (Knochen, Knochenmark, Fett, Muskel) wurden fortgesetzt. Die bisherigen Ergebnisse zur Löslichkeit in Fettsäuren und Wasser und der Vergleich mit molekular-dynamischen Simulationen wurden in einer Publikation eingereicht. Die Arbeiten zur Bestimmung der Radondiffusion in unterschiedlichen Materialien wurden im Januar veröffentlicht. Im Radonheilstollen in Bad Kreuznach konnten erste Experimente mit einem freiwilligen Probanden durchgeführt werden. In der Radonkammer fanden umfangreiche Messungen zur Radonlöslichkeit, u. a. im mechanischen Lungenmodell, statt. Ebenso wurde die Alpha-Bestrahlungsvorrichtung regelmäßig genutzt. Der hierzu geplante Technical Report (AP1, AP4) ist zur Publikation vorbereitet und soll zeitnah eingereicht werden.
- AP3: Die in vitro Dosis-Effekt Kurve (Kalibrationskurve) für die Induktion von dizentrischen Chromosomen in peripheren Blutlymphozyten (semi-automatische Analyse) wurde ergänzt, insbesondere wurde ein weiterer Niedrigdosis-Punkt von 0,01 Gy eingefügt. Die Kurve basiert nun auf 200.000 analysierten Metaphasen. Mit der Auswertung des Radon-Experiments (3 h Expositionsdauer) wurde begonnen. Eine Publikation wurde fertiggestellt und eingereicht.
- AP4: Die Daten aus den Experimenten mit hTNF- $\alpha$ - Mäusen sind noch in der Auswertung und anhand der Erfahrungen die Marker-Panels angepasst. Ein neuer Tierversuchsantrag, der auch das Serumtransfer-Modell umfasst, wird in Zusammenarbeit mit AP5 derzeit finalisiert. Die Daten zur Strahlensensitivität von Adipozyten in Bezug auf Proliferation und Differenzierung wurden vervollständigt. Eine Publikation wird zeitnah eingereicht. Ein erstes Experiment zur Ermittlung von möglichen strahleninduzierten Änderungen mittels Transkriptomanalyse wurde durchgeführt. Probenvorbereitung und RNA-Isolierung wurden etabliert und die Proben derzeit analysiert (Kooperation Dr. Kriehuber, FZ Jülich). Mit der Untersuchung zur Strahlenwirkung auf die Funktionalität von Adipozyten wurde angefangen. Die IMMO-LDRT Studie läuft weiter. Serumproben zur Bestimmung der Adipokine und Knochenmetabolismus-Marker werden gesammelt bzw. bei Vollständigkeit aufgearbeitet.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Die Messungen zur Löslichkeit von Radon sollen in verschiedenen Materialien fortgeführt werden. Weiterhin sollen Diffusionsmessungen durchgeführt werden. Außerdem ist es geplant, die sehr vielversprechenden Messungen am freiwilligen Probanden in Bad Kreuznach zu wiederholen und neben Abdomen und Lunge auch die Aktivität in der Wirbelsäule zu messen. Die Publikation zur Alpha-Bestrahlungsvorrichtung soll eingereicht werden.
- AP3: Die Analyse von Blutproben aus der LDRT-Studie wird fortgesetzt, mit der Radon-Patientenstudie wird voraussichtlich im Herbst begonnen. Darüber hinaus werden die ersten Experimente zur Strahlenempfindlichkeit von humanen Bronchialepithelzellen durchgeführt. Eine Publikation zur genetischen Wirkung von Alphastrahlen wird vorbereitet.
- AP4: Neue Experimente mit hTNF- $\alpha$ - Mäusen in der Radonkammer werden, je nach Zuchterfolg, vorbereitet. Die Auswertung der Transkriptomanalyse von bestrahlten Präadipozyten wird zeitnah erwartet. Anhand der Ergebnisse werden näher zu untersuchende Zielgene festgelegt. Die Experimente zu Änderungen der Funktionalität von Adipozyten nach Bestrahlung werden weitergeführt. In Endothelzellen wird der Einfluss von laminarer Strömung nach längerer Kultivierung auf Seneszenz oder endothelial-mesenchymale Transition weiter untersucht. Die Stimulierung mit Visfatin wird in Kombination mit Photonen- und alpha-Bestrahlung untersucht. Daten zur Differenzierung von Osteoklasten nach Bestrahlung werden ausgewertet und wiederholt. LSM-Aufnahmen werden detailliert hinsichtlich der 3D-Anheftungsstrukturen analysiert. Eine Publikation der Daten wird vorbereitet. Die Kooperation mit Prof. Rehart (Agaplesion Markus Krankenhaus, Frankfurt/ Main) wird im August beginnen und erste Proben werden in Kultur genommen. Die Adipokin- und Zytokinfreisetzung wird nach Bestrahlung untersucht. Das Sammeln und Auswerten der Proben der IMMO-LDRT Studie läuft weiter bis zur geplanten Fallzahl. Die RAD-ON02 Studie wird mit AP5 für November 2018 vorbereitet.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Maier, A et al. "Method for measurement of radon diffusion and solubility in solid materials"; Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 416 (2018): 119-127

C. Hartel, Y. Knies, U. Gaipl, B. Frey and S. Ritter: Sensitivity of the dicentric assay for low-dose biodosimetry of therapeutic radiation exposure. Poster, EPRBiodose Konferenz München, Juni 2018

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 050B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.08.2017 bis 31.01.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 588.971,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Löbrich	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

In dem Projekt GREWISalpha soll die genetische und die entzündungshemmende Wirkung von dicht ionisierender Strahlung, insbesondere von Radon untersucht werden. Die hier vorgeschlagene interaktive Forschungsarbeit wird zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Radon beitragen und die Auseinandersetzung von jungen Wissenschaftlern mit den vielseitigen Aspekten der Radon-Problematik fördern. Wir erwarten wichtige Erkenntnisse für den Strahlenschutz von langlebigen radioaktiven Isotopen und Verbesserungen in der therapeutischen Anwendung von Radon und der niedrig-dosierten Strahlentherapie nicht maligner Erkrankungen gewinnen zu können. Neben Röntgen- und  $\alpha$ -Bestrahlungen sowie Experimenten mit Ionenstrahlen sollen Zellkulturen und Tiere in einer Radonkammer exponiert werden, da die Radon-Exposition im Bereich des Strahlenschutzes und in der Therapie entzündlicher Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielt. In Zell- und Tier-Versuchen soll die Entzündungshemmende Wirkung von Radon mit molekular-biologischen Mitteln untersucht werden und mit Therapie-Daten verglichen werden. GREWIS verfolgt einen neuen Ansatz: wissenschaftliche Techniken und Kenntnisse verschiedener Institute, auch von Fachleuten, die bis jetzt keine Strahlenbiologie betreiben, zusammen zu bringen und zu verknüpfen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Projekt wird in Zusammenarbeit mit dem Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GSI durchgeführt. Schwerpunkte des Forschungsvorhabens der AG Löbrich an der TUD sind folgende Untersuchungen:

- Bestrahlung von Zellkulturen mit einer  $^{241}\text{Am}$ -Quelle zur Etablierung eines Korrekturfaktors
- Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung von Markern für komplexe Brüche in verschiedenen Geweben
- Exposition von Mäusen mit hohen Aktivitätskonzentrationen von Radon, um die Rolle von Aerosolen bei der Dosisdeposition in der Lunge zu untersuchen
- Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung von DNA-Doppelstrangbrüchen im Knochen sowie die Analyse der Radon-induzierten DNA-Doppelstrangbrüche
- Exposition von Mäusen mit hohen Aktivitätskonzentrationen von Radon um die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in verschiedenen Organen zu untersuchen
- Umfassende mechanistische Studien zur Reparatur bei niedrigen Strahlendosen in kultivierten Zellen zur Frage, ob Radikalstress die Reparaturkinasen ATM und DNA-PKcs aktivieren kann und dadurch die Reparaturprozesse effizient aktiviert
- Etablierung von weiteren Markern zur *in vitro* Analyse von persistierenden Foci-Signalen

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

#### Biodosimetrie

Im Rahmen des Projektes GREWIS wurde eine unerwartet hohe Anzahl von 53BP1-Foci (als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs)) in der Lunge von Mäusen nachgewiesen, die einer therapeutisch relevanten Konzentration von Radon ( $440 \text{ kBq/m}^3$ ) ausgesetzt wurden. Für die Abschätzung der im Gewebe deponierten Dosis (ausgehend von der Anzahl der detektierten Foci) wurden bisher Experimente nach Bestrahlung mit 10 mGy Röntgenstrahlen herangezogen, bei denen eine vergleichbare Anzahl an Foci festgestellt wurde. Dieses Vorgehen ist aufgrund der unterschiedlichen Art der Dosisdeposition von Röntgenstrahlen und Radon möglicherweise nicht gerechtfertigt, ohne einen geeigneten Korrekturfaktor für die unterschiedliche Dosisdeposition zu berücksichtigen. Um einen solchen Korrekturfaktor zu entwickeln, muss entweder auf kultivierte Zellen zurückgegriffen werden oder, alternativ, können auch Gewebe nach der in vivo Bestrahlung mit anderen Schwerionen (mit einem zu  $\alpha$ -Teilchen vergleichbaren LET) zur Dosisabschätzung verwendet werden. Vorläufige Ergebnisse solcher Experimente zeigen, dass die Zellen der Lunge nach der in vivo Bestrahlung mit 10 mGy Eisenionen, wie erwartet, eine etwas geringere Anzahl an 53BP1-Foci aufweisen, als nach der Bestrahlung mit 10 mGy Röntgenstrahlen. Wird dieses Experiment mit Eisenionen zur Abschätzung der Dosisdeposition von Radon verwendet, wird in der Lunge von Radon-exponierten Mäusen eine Dosis von 12 mGy deponiert.

#### Mechanistische Studien

Im Rahmen des Projektes GREWIS wurde eine ineffiziente DSB-Reparatur nach Radonexposition ( $440 \text{ kBq/m}^3$ ) festgestellt. Dieses Verhalten kann nicht nur auf die Komplexität der Schäden zurückgeführt werden, da ein ähnliches Verhalten auch für strukturell einfachere DSBs nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlen beobachtet wurde. Weiterführende mechanistische Studien sollen klären, warum die Reparatur nach solch niedrigen Strahlendosen ineffizient verläuft. Eigene Vorarbeiten in kultivierten Zellen zeigten, dass Radikale, neben deren bekannten Effekt auf die Induktion, auch die Reparatureffizienz nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen beeinflussen (Grudzenski et al., PNAS 2010, Dissertation J. Mirsch). Dieser Zusammenhang zwischen geringer Reparatureffizienz und niedrigem Radikalstress sollte mit tierexperimentellen Studien verifiziert werden. Dazu wurden Mäuse über 14 Tage mit dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) behandelt und anschließend mit 20 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt. Eine entsprechend bestrahlte Kontrollgruppe erhielt kein NAC. Da durch das NAC der oxidative Stress in den Zellen verringert wird, erwarteten wir durch die NAC-Behandlung eine eingeschränkte Reparatur.

Zur Analyse der Reparatureffizienz wurden Gewebeschnitte der Lunge, der Niere und des Dünndarms angefertigt und die DNA-Schadensmarker (53BP1-,  $\gamma$ H2AX-Foci) angefärbt. Die Quantifizierung der 53BP1-Foci zeigte, dass nach 24 h zwar 10-15 % der induzierten DSBs in Organen der Kontrollgruppe persistierten, jedoch wurde keine signifikant verschlechterte Reparatur in den NAC-behandelten Mäusen festgestellt. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass NAC - im Gegensatz zu in vitro-Experimenten in kultivierten Zellen - die Reparatureffizienz in vivo nur bis zu einem gewissen Grad beeinflussen kann und die Dosis von 20 mGy bereits die antioxidative Kapazität der Zellen übersteigt. Im Vergleich zu kultivierten Zellen ist die in vivo-Anwendung von NAC durch die Pharmakokinetik "limitiert". NAC wird im Darm und in der Leber stark verstoffwechselt und obwohl dessen Metabolite auch antioxidativ wirken können, verstärkten sie die antioxidative Kapazität der Zelle auch bei einem Überangebot möglicherweise nicht mehr.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Um die Ursache der schlechten Reparatureffizienz näher zu untersuchen, sollen für weiterführende mechanistische Studien zunächst mind. eine geeignete Zelllinie etabliert werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 050C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.08.2017 bis 31.01.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 398.280,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Thiel	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Die geplanten Arbeiten werden sich auf Effekte von Strahlung im Allgemeinen und Radonstrahlung im Besonderen auf Prozesse in Zellen jenseits des Zellkerns konzentrieren. Ein zentrales Element in den Arbeiten beruht auf Befunden, die zeigen, dass eine Bestrahlung von Zellen mit niedrigen Dosen im Zytoplasma von Zellen zu einem raschen Anstieg an ROS führt; diese initiale Zellantwort löst wiederum weitere Signalkaskaden aus, die sowohl für die Immunantwort der Zellen aber auch für neurophysiologische Signalweiterleitungen von Bedeutung sein können.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Untersuchungen zu dem zeitlichen und kausalen Zusammenhang zwischen einer Niedrigdosen-Bestrahlung von Zellen des Immunsystems und von Neuronen und dem folgenden Anstieg an ROS in den Zellen und die sich daraus ergebene Auswirkung auf Signalkaskaden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im vorherigen Berichtszeitraum wurden Messungen durchgeführt, die gezeigt haben, dass ionisierende Strahlung einschließlich  $\alpha$ -Strahlung in humanen T-Zellen zu Oszillationen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führen. Teile der Ergebnisse sind in die unten genannte Publikation eingeflossen. In dem aktuellen Berichtszeitraum hat die Doktorandin Frau Tandl mit einem Masterstudenten Experimente durchgeführt, die zeigen sollen aus welchem zellulären Kompartiment das  $\text{Ca}^{2+}$  stammt und warum nach Bestrahlung mehr als eine halbe Stunde vergeht bis die  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillationen einsetzen. Laufende Experimente sollen ferner Auskunft darüber geben, welcher Signalweg in den T-Zellen durch die  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillationen aktiviert werden. Die Ergebnisse der Arbeiten werden im September im Rahmen einer Tagung der Gesellschaft für Biol. Strahlenschutz in Frankfurt vorgestellt werden. Des Weiteren wurde begonnen, zu Neuronen differenzierte neuronale Stammzellen aus der Maus elektrophysiologisch zu charakterisieren und auf O<sub>2</sub>- beschichteten Mylar-Folien wachsen zu lassen, um die Wirkung von alpha-Strahlung auf Neurone zu analysieren. In dem aktuellen Berichtszeitraum hat die Doktorandin Frau Juliane Joswig diese Experimente weiter vorangetrieben und gezeigt, dass die auf beschichteter Mylar Folie differenzierten Zellen eine deutliche Stromantwort nach Applikation von Glyzin/Glutamat aufweisen, was für das Vorhandensein von funktionellen NMDAR spricht. Ebenso konnte sie eine Erhöhung der Kalium- und Natrium-Leitfähigkeit während des Differenzierungsverlaufs aus vorangegangenen Arbeiten bestätigen. Aufgrund dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, dass sich die aus neuronalen Stammzellen differenzierten Neuronen als Modellsystem für die Schmerzsensierung eignen und eine kontrollierte Bestrahlung mit alpha-Teilchen möglich ist. Laufende Experimente sollen nun Auskunft darüber geben, welchen Einfluss unterschiedliche Dosen an alpha- und Röntgen-Bestrahlung auf die Aktivität von Rezeptoren und Kanälen haben. Die Ergebnisse der Arbeit werden im September im Rahmen einer Tagung der Gesellschaft für Biol. Strahlenschutz in Frankfurt vorgestellt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die laufenden Arbeiten zum  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling in T-Zellen sollen im folgenden Berichtszeitraum abgeschlossen werden, damit dieser Teil der Arbeit publiziert werden kann. In kommenden Experimenten sollen Effekte von alpha Strahlung und Radon Behandlung miteinander verglichen werden, um herauszufinden, ob eine eventuelle Schmerzsensierung strahlungsspezifisch oder radonspezifisch ist.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Voos, P., Fuck, S. Weipert, F., Babel, L., Tandl, D., Meckel, T., Hehlhans, S., Fournier, F., Rödel, F., Moroni, A. Thiel, G. (2018): Ionizing radiation induces morphological changes and immunological modulation of Jurkat cells. *Frontiers in Immunol.* 9:922.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Theodor-W.-Adorno-Platz 1, 60323 Frankfurt am Main		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 050D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.08.2017 bis 31.01.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 405.538,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Rödel	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Die niedrig dosierte Strahlentherapie wird vorwiegend zur Behandlung degenerativ-inflammatorischer, d. h. benignen Erkrankungen eingesetzt. Die ursächlichen Mechanismen, die zur antientzündlichen Wirkung niedrig dosierter Strahlung führen, sind bislang jedoch nur unzureichend geklärt. Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten jedoch in den letzten Jahren für viele Effekte eine nichtlineare Dosis-Wirkungsbeziehung nach Röntgen- und Schwerionen-Bestrahlung beobachten, an der entscheidend reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind. Diese werden in der Zelle hochpräzise durch antioxidative Enzyme reguliert und führen im Niedrigdosisbereich funktionell zu einer Minderung der Leukozytenadhäsion als einer wesentlichen Komponente der Inflammation. In Teilprojekt D werden als mögliche Regulatoren des oxidativen Systems und der ROS-Produktion in Endothelzellen und Leukozyten der Transkriptionsfaktor Nrf2 sowie micro(mi)RNAs nach Bestrahlung mit Photonen und mit dicht-ionisierenden Strahlenquellen *in vitro*, *in vivo* und in Patientenstudien in enger Kooperation mit AP1 (Maier & Kraft, GSI), AP4 (C. Fournier, GSI) und AP5 (U. Gaipl & B. Frey, UKER) untersucht.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Entsprechend der im Rahmen des Verbundprojektes GREWIS gewonnenen Erkenntnisse ist das Untersuchungsprogramm des Teilprojektes D (Arbeitspaket 6) wie folgt gegliedert:

Task 21: Der erste Themenkomplex beinhaltet Untersuchungen der Nrf2 Aktivität in Endothelzellen und Leukozyten nach Photonen- und Radon-Bestrahlung.

Task 22: Dieses Arbeitspaket befasst sich mit der Analyse von Nrf2 und dessen Targetgenen nach Bestrahlung von Subpopulationen muriner und humaner Lymphozyten.

Task 23: In diesem Themenkomplex sollen die *in vitro* gewonnenen molekularen Erkenntnisse über die differentielle Regulation der ROS-Produktion durch antioxidative Enzyme und miRNAs *in vivo* im Mausmodell sowie in Patientenstudien bestätigt werden.

Task 24: Gegenstand dieses Arbeitspaketes ist die Identifizierung der an der differentiellen Regulation des antioxidativen Systems von Endothelzellen und der Leukozytenadhäsion beteiligten miRNAs mittels spezifischer miRNA Inhibitoren und Next Generation Sequencing (NGS).

Task 25: In weiteren funktionellen Analysen werden die anti-oxidativen Einflüsse auf die Lymphozyten-Adhäsion an Endothelzellen mittels Flow Chamber untersucht.

Task 26: Dieses Arbeitspaket beschäftigt sich mit der Etablierung organotypischer Blutgefäß-Kulturen zur Messung von Lymphozyten-Adhäsion nach Niedrigdosisbestrahlung.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im Rahmen des Verbundprojektes GREWIS konnte eine nichtlineare Dosis-Effekt-Beziehung der Leukozyten-Endothelzelladhäsion nach Niedrigdosis-Bestrahlung in ursächlichen Zusammenhang mit der Regulation des anti-oxidativen System gebracht werden. Eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors Nrf2 nach Bestrahlung im Bereich zwischen 0,3 und 0,7 Gy führte zu einer verringerten Expression der anti-oxidativen Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Catalase und Glutathionperoxidase (GPx) und damit zu einer erhöhten ROS-Menge in den untersuchten Immunzellen. Zur Überprüfung dieser nichtlinearen Regulation *in vivo* wurde eine Real-Time PCR zur Quantifizierung der murinen Enzyme mit Standardkurve zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Messungen etabliert. Die Messung sowohl von SOD1, Catalase, GPx1 als auch des Transkriptionsfaktors Nrf2 zeigte sowohl bei mit Radon (430 kBq) bestrahlten C57Bl/6 Kontrollmäusen als auch bei bestrahlten hTNF $\alpha$ -transgenen Mäusen eine veränderte Expression im Vergleich zu unbestrahlten Mäusen, jedoch war diese gegenläufig. Während die Bestrahlung bei den Kontrollmäusen zu einer erhöhten Expression der anti-oxidativen Enzyme führte, war diese in den Radon-exponierten hTNF $\alpha$ -transgenen Mäusen vermindert.

Im Berichtszeitraum wurden zudem die Expression von Nrf2, SOD1, Catalase und GPx1 in den ersten Patientenproben der IMMO-LD-RT Patientenstudie bestimmt. Bis zu diesem Zeitpunkt lag RNA aus Blut von fünf Patienten, die die Therapie beendet haben, vor. Es wurde jeweils vor Therapie, am Ende der ersten Bestrahlungsserie, am Anfang der zweiten Bestrahlungsserie, am Ende der zweiten Bestrahlungsserie und zum Zeitpunkt der Nachsorge in Erlangen (AP5) Blut entnommen und die RNA isoliert. Die Quantifizierung der Enzyme und von Nrf2 erfolgte mittel Real-Time PCR in Frankfurt (AP6, Task 23). Dabei zeigte sich eine Regulation der Expression der untersuchten Faktoren im Verlauf der Therapie, der aber erst nach Untersuchung weiterer Patientenproben in der fortlaufenden Studie abschließend beurteilt werden kann.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Innerhalb des Verbundprojekts GREWISalpha werden fortlaufend Patientenproben durch die Projektpartner (AP5) gesammelt, die in Frankfurt hinsichtlich der Expression von an der Regulation des anti-oxidativen Systems beteiligter Faktoren untersucht werden (Task 23). Zusätzlich erfolgen funktionelle Studien in Form von Adhäsionsexperimenten *in vitro* und *in vivo* nach niedrig dosierter Strahlentherapie (Task 23, 25, 26).

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Voos P, Fuck S, Weipert F, Babel L, Tandl D, Meckel T, Hehlhgans S, Fournier C, Moroni A, Rödel F, Thiel G.: Ionizing Radiation Induces Morphological Changes and Immunological Modulation of Jurkat Cells. *Front Immunol* 2018;9:922.

Wunderlich R, Rühle PF, Deloch L, Roedel F, Fietkau R, Gaipl US, Frey B.: Ionizing radiation reduces the capacity of activated macrophages to induce T-cell proliferation, but does not trigger dendritic cell-mediated non-targeted effects. *Int J Radiat Biol* 2018;18:1-36.

Hehlhgans S, Oppermann J, Weipert F, Mörtl S, Fournier C, Rödel C, Rödel F.: MicroRNAs modulieren die anti-oxidative Antwort von Endothelzellen nach Bestrahlung im Niedrigdosisbereich. Abstract bei der 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Leipzig, 2018; *Strahlenther Onkol* 2018;194, Supplement 1: S98

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Schlossplatz 4, 91054 Erlangen		<b>Förderkennzeichen:</b> 02 NUK 050E
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt E		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.08.2017 bis 31.01.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2018 bis 30.06.2018	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 694.760,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Gaipl	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Gesamtziel des Verbundes knüpft an die Notwendigkeit der Aufklärung biologischer Mechanismen im Niedrigdosis-Bereich an. Der Schwerpunkt wird auf die Wirkung von Radon gelegt, dessen radioaktiver Zerfall und Inkorporation durch den Menschen etwa 30 % der mittleren Strahlenbelastung pro Jahr ausmacht. Andererseits wird eine hohe Zahl an Patienten, die unter chronischen, degenerativen, entzündlichen und schmerzhaften Erkrankungen leiden, in dafür ausgewiesenen Heilbädern mit Radon therapiert. Die Arbeiten des Verbundprojektes sollen dazu beitragen, Risiken und Nutzen einer Radon-Exposition auf wissenschaftlicher Basis besser abwägen zu können. Dazu wurden im vorangegangenen Projekt GREWIS die notwendigen Instrumente und Methoden etabliert bzw. eine entsprechende Infrastruktur (Radonkammer, Patientenstudien, Tier-Modelle) geschaffen und validiert, die nun in GREWISalpha fokussiert eingesetzt werden kann.

Im Hinblick auf die klinische Nutzung von Radon-Exposition sollen im Teilprojekt E basierend auf den aussagekräftigen Vordaten, Immunmatrices identifiziert werden. Diese könnten als Immunbiomarker von Strahlungsexpositionen dienen. Es wird die RAD-ON02-Folgestudie, welche eine temporäre Placebo-Gruppe beinhaltet (*cross-over-design*), durchgeführt werden, um die durch Radonexposition hervorgerufenen osteoimmunologischen Veränderungen klar definieren zu können. Ergänzend zur Immunphänotypisierung sollen zusätzlich auch Zytokine, Chemokine und erweiterte Gefahrensignale im Blut erfasst werden. Schließlich sollen die Immunbiomarker der Niedrigdosis-Exposition von Radon denen für Photonen (IMMO-LDRT-01-Studie) gegenübergestellt werden.

In den Maus-Modellen soll der Fokus verstärkt auf die lokalen und systemischen osteoimmunologischen Veränderungen durch Strahlungsexposition sowie auf das Zell-Mikromilieu im Knochen und am entzündeten Knorpel gelegt werden. Ein weiteres Entzündungsmodell wird hierfür etabliert und genutzt, welches auch schnellere Analysen in höherer Anzahl zulässt. Mit diesen K/BxN (respektive KRN) Mäusen kann der Einfluss von Strahlung auf die mannigfaltigen Interaktionen von Immunzellen mit Osteoblasten, Osteoklasten sowie Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten sehr gut auf molekularer und zellulärer Ebene untersucht und Mechanismen der Strahlungswirkung aufgeklärt werden. Ausgewählte Experimente sollen ebenfalls weiter im hTNF- $\alpha$ -tg Mausmodell durchgeführt werden. Ein Augenmerk soll hierbei insbesondere auf den Einfluss des basalen Entzündungsstatus auf die strahlungsinduzierten osteoimmunologischen Veränderungen gelegt werden.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Die Arbeitshypothese ist, dass Radonexposition die Populationen und Funktionen von Immunzellen und Zellen des Knochenstoffwechsels moduliert und somit zur Abmilderung von Entzündung beiträgt.

Im Speziellen wird der spezifische Immunstatus von Patienten vor, während und nach Strahlungsexposition im Rahmen der RAD-ON02- und der IMMO-LDRT-01-Studie bestimmt sowie das weitere Mikromilieu im Serum analysiert. Es sollen Immunbiomarker und Immunmatrices der Strahlungsexposition auch im Vergleich zur lokalen Hochdosisbestrahlung definiert werden. Mechanistisch werden osteoimmunologische Untersuchungen zur Wirkung von Radon auf Entzündung und Knochenmetabolismus in den K/BxN und hTNF- $\alpha$ -tg Mausmodellen sowie in *ex vivo* Zellkultursystemen durchgeführt.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Frau Ina Becker wurde als neue wissenschaftliche Mitarbeiterin in die Immunphänotypisierungen (IPT) erfolgreich eingearbeitet. Frau Donaubauer hat sich im Rahmen ihrer Promotion „*Osteoimmunological modes of action of radon and X-ray*“ der Graduiertenschule für Lebenswissenschaften „Life@FAU“ der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg angeschlossen. In die IMMO-LDRT01 Studie konnten nun bereits 81 Patienten eingeschlossen werden. Im peripheren Blut waren B und T Lymphozyten nach Ende der ersten Bestrahlungsserie signifikant erniedrigt, wohingegen eosinophile Granulozyten signifikant erhöht waren. Im längeren Verlauf war bei einigen Immunzelltypen ein reduzierter Aktivierungsstatus nach der seriellen Bestrahlung festzustellen. Diese Daten wurden im Juni 2018 auf der DEGRO Jahrestagung in Form eines Vortrags präsentiert. Aktuell wird der Immunstatus der Patienten unter Berücksichtigung der zugrundeliegenden Indikationen analysiert, um zu untersuchen, ob bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern unterschiedliche immunologische Mechanismen nach Bestrahlung zum Tragen kommen. Bei ersten Analysen zeigten sich Unterschiede im initialen Immunstatus der verschiedenen Patientenkollektive. Die Methode der modularen Immunphänotypisierung wurde im Mai 2018 bei Springer Protocols eingereicht. Die Publikation zu den Zytokindaten aus der RAD-ON01-Studie wird für *Biomed Res Int* mit *minor revisions* umgeschrieben und das Paper bei *Modern Rheumatology* wurde im Februar 2018 akzeptiert. Die Vorbereitungen zur RAD-ON02 Studie wurden fortgesetzt. Im Zuge der tierexperimentellen Arbeiten wurde das Paper „Low-dose radiotherapy ameliorates advanced arthritis in hTNF- $\alpha$  tg mice by particularly positively impacting on bone metabolism“ in überarbeiteter Form bei *Frontiers in Immunology* eingereicht und ist im abschließenden Begutachtungsprozess. Es wurden funktionelle Assays zum Fressverhalten der Osteoklasten (*pit formation*) finalisiert und die Neutrophileninfiltration und Aktivität in den bestrahlten Pfoten von hTNF- $\alpha$  tg Mäusen untersucht. Ein weiteres Paper, welches den Einfluss von niedrig dosierter Röntgenstrahlung auf Zellen des Knochenmetabolismus im nicht-entzündeten Zustand untersucht, wurde fertiggestellt und soll beim *International Journal of Molecular Sciences* eingereicht werden. Die Daten zum Knochenmetabolismus nach LD-RT wurden beim *European Rheumatology Workshop* in Genf präsentiert und der Abstract in einer *Supplementary Issue* von *Annals of the Rheumatic Diseases* veröffentlicht. Ein weiterer Abstract wurde im Rahmen der DEGRO in Leipzig als Poster präsentiert sowie als Kurzveröffentlichung in *Strahlentherapie und Onkologie* publiziert. Die Untersuchungen zum Einflusses der lokal applizierten Röntgenstrahlung auf das periphere Immunsystem im KRN Serumtransfermodell wurden wiederholt. Hierbei bestätigte sich, dass B Zellen im Knochenmark und Blut behandelter Tiere erniedrigt werden. Bei den T Zellen konnte eine Verschiebung im Knochenmark von CD8<sup>+</sup> hin zu CD4<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden, während sich die Gesamt T Zellzahl sowohl im Blut als auch im Knochenmark reduziert hatte. Eine Bachelorarbeit, welche sich mit dem Einfluss niedrig dosierter Röntgenstrahlung auf den Phänotyp gesunder Makrophagen beschäftigt, wurde begonnen. Das Treffen zur Koordination der Tierversuche und des neuen TVAs fand im Januar 2018 an der GSI statt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Ein Update der IPT Daten der IMMO-LDRT-01 Studie soll im September 2018 auf der GBS Jahrestagung vorgestellt werden. Im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit sollen zudem die erhobenen Daten zur Lebensqualität und den Schmerzparametern evaluiert werden. Die hierdurch generierten Erkenntnisse sollen im Anschluss mit den Daten der IPT korreliert werden. Des Weiteren sind Analysen von osteoimmunologischen Serummarkern mit den in die hauseigene Biobank eingelagerten Serumproben der Studienpatienten geplant. Für Nov. dieses Jahres ist der Start der RAD-ON02 Studie geplant und die entspr. Vorbereitungen getroffen. Das Paper wird beim *International Journal of Molecular Sciences* eingereicht werden. Die Arbeiten zum Einfluss der Röntgenstrahlung auf Makrophagen sollen fortgeführt werden. Hierfür sind v. a. Transwell-Assays zur Untersg. des Einflusses von Zytokinen, welche von *fibroblast-like synoviocytes* (FLS) freigesetzt wurden, auf die Differenzierung von Makrophagen vorgesehen. Die Experimente zu Untersg. des Einflusses des Geschlechts sowie der Bestrahlungshäufigkeiten auf den Phänotyp von FLS sollen abgeschlossen werden. Die detaillierte Charakterisierung der hTNF- $\alpha$  tg Tiere wird im Rahmen einer weiteren zahnmedizinischen Doktorarbeit durchgeführt. Weiterführende Untersg. zum Einfluss von niedrigen Strahlendosen auf den Knochenmetabolismus sind ebenfalls vorgesehen. Die aufgrund von Bauarbeiten in den GSI Laboratorien sowie erneuten Zuchtproblemen der hTNF- $\alpha$  tg Mäusen ausgesetzten Versuche in der Radonkammer werden wieder aufgenommen. Die im Rahmen der Serumtransferversuche entstandenen Knochenschnitte sollen bzgl. der Infiltration von entzündlichem Gewebe sowie Knochenerosionen untersucht werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Rückert, Deloch et al., *Strahlenther Onkol.* 2018 Jun;194(6):509-519; Rühle et al., *Mod Rheumatol.* 2018 Mar 2:1-8; Wunderlich et al., *Int J Radiat Biol.* 2018 Jun 18:1-36; Deloch et al., *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77 (Suppl 1) A62-A63; Deloch et al., *Strahlenther Onkol.* 2018;194(1):1-222.



### 3 Verzeichnis der Forschungsstellen

- |  |   |
|--|---|
| <b>Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Friedrichstr. 39, 79098 Freiburg</b>             |   |
| 02 NUK 047F  | Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt F  138   |
| <b>Bundesamt für Strahlenschutz, Willy-Brandt-Str. 5, 38226 Salzgitter</b>               |   |
| 02 NUK 035D  | Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D  86  |
| 02 NUK 045B  | Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt B  124  |
| 02 NUK 047B  | Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B  130   |
| <b>Charité - Universitätsmedizin Berlin, Hindenburgdamm 30, 14195 Berlin</b>             |   |
| 02 NUK 047E  | Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt E  136   |
| <b>Elbe Kliniken Stade-Buxtehude GmbH, Bremervörder Str. 111, 21682 Stade</b>            |   |
| 02 NUK 036B  | Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt B  92   |
| <b>Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich</b>                |   |
| 02 NUK 039D  | Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt D  40  |
| 02 NUK 043A  | Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt A  116  |
| <b>Framatome GmbH, Paul-Gossen-Str. 100, 91052 Erlangen</b>                              |   |
| 02 NUK 041C  | Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt C: Übertragung auf industrielle Anwendungen von neuen Modellen zu Verdampfung, Kondensation und Zweiphasen-Naturumlaufstabilität in einem passiven Wärmetransportsystem  28 |
| <b>Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Schlossplatz 4, 91054 Erlangen</b> |   |
| 02 NUK 034D  | Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt D  78  |
| 02 NUK 050E  | Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt E  156   |

<b>Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fürstengraben 1, 07743 Jena</b>
---

- 02 NUK 051C Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt C  58

<b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt</b>
--

- 02 NUK 017A Verbundprojekt GREWIS: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender Strahlung: Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Radon in Zell- und Tier-Modellen und in Radon-Patienten; Teilprojekt A  66
- 02 NUK 034C Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt C  76
- 02 NUK 037A Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt A  98
- 02 NUK 049A Verbundprojekt BrainRadiationAssay: Etablierung eines in vitro Systems zur Analyse und Prädiktion von Schäden im zentralen Nervensystem nach Exposition mit ionisierender Strahlung in Kombination mit anderen Neurotoxika, Teilprojekt A  144
- 02 NUK 050A Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender  $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt A  148

<b>Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V., Bautzner Landstr. 400, 01328 Dresden</b>
---

- 02 NUK 027C Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt C: Analyse und CFD-Modellentwicklung der Strömungszustände in ausdampfenden Brennelementen  14
- 02 NUK 041B Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt B: Untersuchungen zu Kondensationsprozessen im Notkondensator und numerische Simulation einer passiven Wärmeabfuhrkette  26
- 02 NUK 046B Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt B  50
- 02 NUK 051B Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt B  56

**Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg**

- 02 NUK 038B Verbundprojekt Endothelzellen: Effekte niedriger, mittlerer und hoher Strahlendosen auf primäre mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Normalgewebe; Teilprojekt B  106
- 02 NUK 039B Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt B  36
- 02 NUK 045A Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt A  122
- 02 NUK 047A Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A  128

**Hochschule für angewandte Wissenschaften – Fachhochschule Aschaffenburg, Würzburger Str. 45, 63743 Aschaffenburg**

- 02 NUK 049B Verbundprojekt BrainRadiationAssay: Etablierung eines in vitro Systems zur Analyse und Prädiktion von Schäden im zentralen Nervensystem nach Exposition mit ionisierender Strahlung in Kombination mit anderen Neurotoxika, Teilprojekt B  146

**Hochschule Zittau/Görlitz, Theodor-Körner-Allee 16, 02763 Zittau**

- 02 NUK 027D Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt D: Dichtegetriebene vertikale Austauschbewegungen und radiales Strahlungsverhalten  16

**IUF – Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf**

- 02 NUK 036AX Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt A  90
- 02 NUK 036C Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt C  94

**Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Theodor-W.-Adorno-Platz 1, 60323 Frankfurt am Main**

- 02 NUK 050D Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender  $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt D  154

**Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Saarstr. 21, 55122 Mainz**

- 02 NUK 042B Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt B  110
- 02 NUK 044B Verbundprojekt SIRIUS: Sekundärionisation radioaktiver Isotope zur orts aufgelösten Ultrapurenanalyse, Teilprojekt B  46

- |             |  |
|-------------|--|
| 02 NUK 047C | <b>Klinikum der Universität München, Marchioninstr. 15, 81377 München</b><br>Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C <span style="float: right;">📖 132</span>  |
| 02 NUK 038A | <b>Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 München</b><br>Verbundprojekt Endothelzellen: Effekte niedriger, mittlerer und hoher Strahlendosen auf primäre mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Normalgewebe; Teilprojekt A <span style="float: right;">📖 104</span>   |
| 02 NUK 042C | <b>Leibniz-Institut für Präventionsforschung und Epidemiologie – BIPS GmbH, Achterstr. 30, 28359 Bremen</b><br>Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt C <span style="float: right;">📖 112</span>  |
| 02 NUK 044A | <b>Leibniz Universität Hannover, Welfengarten 1, 30167 Hannover</b><br>Verbundprojekt SIRIUS: Sekundärionisation radioaktiver Isotope zur orts aufgelösten Ultrapurenanalyse, Teilprojekt A <span style="float: right;">📖 44</span>  |
| 02 NUK 051A | Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt A <span style="float: right;">📖 54</span>  |
| 02 NUK 035E | <b>Medipan GmbH, Ludwig-Erhard-Ring 3, 15827 Dahlewitz</b><br>Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt E <span style="float: right;">📖 88</span>  |
| 02 NUK 051E | <b>Öko-Institut. Institut für angewandte Ökologie e. V., Merzhauser Str. 173, 79100 Freiburg</b><br>Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt E <span style="float: right;">📖 62</span>                              |
| 02 NUK 039C | <b>Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Grabengasse 1, 69117 Heidelberg</b><br>Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt C <span style="float: right;">📖 38</span>   |
| 02 NUK 039A | <b>Sondervermögen Großforschung beim Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen</b><br>Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt A <span style="float: right;">📖 34</span> |

<b>THD - Technische Hochschule Deggendorf, Dieter-Görlitz-Platz 1, 94469 Deggendorf</b>
---

- 02 NUK 041D Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt D: Statische und dynamische Modellierung der thermischen Kopplung von Fluidphasen und Wärmeüberträgerstrukturen  30

<b>Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt</b>
--

- 02 NUK 034A Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt A  72
- 02 NUK 034B Verbundprojekt NeuroRad: Ein Ansatz zur Bewertung neurologischer Strahlenschäden, Teilprojekt B  74
- 02 NUK 036D Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt D  96
- 02 NUK 037C Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt C  102
- 02 NUK 042D Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt D  114
- 02 NUK 050B Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender  $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt B  150
- 02 NUK 050C Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender  $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt C  152

<b>Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden</b>
--

- 02 NUK 027A Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt A: Experimentelle und theoretische Untersuchung der Nachwärmeabfuhr von Brennelementen in ausdampfenden Nasslagern  10
- 02 NUK 027B Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt B: Simulation von Strömung und Wärmetransport unter den Bedingungen eines Lagerbeckens  12
- 02 NUK 027E Verbundprojekt SINABEL: Sicherheit der Nasslager für abgebrannte Brennelemente: Experimentelle Analyse, Modellbildung und Validierung für System- und CFD-Codes; Teilprojekt E: Ortsaufgelöste Temperatur- und Gasphasengeschwindigkeitsmessung zur Analyse der Strömungszustände in ausdampfenden Brennelementen  18
- 02 NUK 035C Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C  84

- 02 NUK 041A Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfalls-wärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt A: Einzel- und Integralexperimente sowie theoretische Analysen zu Verdampfung, Kondensation und Zweiphasen-Natriumlaufstabilität in einem passiven Wärmetransportsystem  24
- 02 NUK 046A Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt A  48
- Technische Universität München, Arcisstr. 21, 80333 München**
- 02 NUK 039E Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt E  42
- 02 NUK 045C Verbundprojekt INSTRA: Integrative Langzeitstudie zur Wirkung niedriger Strahlendosen in der Maus; Teilprojekt C  126
- Universität Bremen, Bibliothekstr. 1, 28359 Bremen**
- 02 NUK 051D Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt D  60
- Universität der Bundeswehr München, Werner-Heisenberg-Weg 39, 85579 Neubiberg**
- 02 NUK 031A Verbundprojekt LET: Simulation von Hoch-LET-Effekten mittels fokussierter Niedrig-LET-Strahlung; Teilprojekt A  68
- Universität des Saarlandes, Campus, 66123 Saarbrücken**
- 02 NUK 035A Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A  80
- Universität Leipzig, Ritterstr. 26, 04109 Leipzig**
- 02 NUK 046C Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungsfunktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisierung in der Umwelt, Teilprojekt C  52
- Universität Rostock, Universitätsplatz 1, 18055 Rostock**
- 02 NUK 043C Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt C  120
- Universität Stuttgart, Keplerstr. 7, 70174 Stuttgart**
- 02 NUK 040B Verbundprojekt UNSCHRO: Experimentelle Untersuchungen und theoretische Beschreibung der Schädigung metallischer Rohrleitungen bei turbulenter Durchströmung im Bereich hoher Drücke und hoher Temperaturen, Teilprojekt B: Numerische Simulation turbulenter Strömung  22

<b>Universität Stuttgart – Otto-Graf-Institut – Materialprüfanstalt, Pfaffenwaldring 32, 70569 Stuttgart</b>
--

- 02 NUK 040A Verbundprojekt UNSCHRO: Experimentelle Untersuchungen und theoretische Beschreibung der Schädigung metallischer Rohrleitungen bei turbulenter Durchströmung im Bereich hoher Drücke und hoher Temperaturen, Teilprojekt A: Mischnähte, Ausströmen  20

<b>Universität Ulm, Helmholtzstr. 16, 89081 Ulm</b>
---

- 02 NUK 048B Verbundprojekt ESKaRa: Epidemiologische Studie zu Kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Radiotherapie bei Brustkrebspatientinnen, Teilprojekt B  142

<b>Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen</b>
---

- 02 NUK 037B Verbundprojekt VERCHROMT: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung, Teilprojekt B  100
- 02 NUK 043B Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt B  118
- 02 NUK 047D Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D  134

<b>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20251 Hamburg</b>
--

- 02 NUK 032 DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Tumoren: Mechanismen und Targets  70
- 02 NUK 035B Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B  82

<b>Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Langenbeckstr. 1, 55131 Mainz</b>
--

- 02 NUK 042A Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt A  108
- 02 NUK 048A Verbundprojekt ESKaRa: Epidemiologische Studie zu Kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Radiotherapie bei Brustkrebspatientinnen, Teilprojekt A  140