

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

**PTE-N Nr. 21**

BMBF geförderte FuE zu  
„Nukleare Sicherheitsforschung“

Berichtszeitraum: 1. Januar - 30. Juni 2020

Projekträger Karlsruhe (PTKA)  
Entsorgung

**November 2020**

## 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 722 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.



## 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>
<b>2</b>	<b>Formalisierte Zwischenberichte .....</b>	<b>9</b>
2.1	SICHERHEITSFORSCHUNG FÜR KERNREAKTOREN .....	9
2.2	SICHERHEITSFORSCHUNG ZUR NUKLEAREN ENTSORGUNG .....	17
2.3	STRAHLENFORSCHUNG.....	51
<b>3</b>	<b>Verzeichnis der Forschungsstellen .....</b>	<b>127</b>



# 1 Verzeichnis der Fördervorhaben gemäß FuE-Themenbereichen

## 1.1 Sicherheitsforschung für Kernreaktoren

- |                    |  |   |      |
|--------------------|--|---|------|
| <b>02 NUK 041A</b> | Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt A: Einzel- und Integralexperimente sowie theoretische Analysen zu Verdampfung, Kondensation und Zweiphasen-Natriumlaufstabilität in einem passiven Wärmetransportsystem | <b>TU Dresden</b>                                 | 📖 10 |
| <b>02 NUK 041B</b> | Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt B: Untersuchungen zu Kondensationsprozessen im Notkondensator und numerische Simulation einer passiven Wärmeabfuhrkette   | <b>Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.</b> | 📖 12 |
| <b>02 NUK 041D</b> | Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt D: Statische und dynamische Modellierung der thermischen Kopplung von Fluidphasen und Wärmeüberträgerstrukturen   | <b>TH Deggendorf</b>                              | 📖 14 |



## 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 Schätzmetho- den, spektroskopischen und quantenmechanischen Metho- den; Teilprojekt A	<b>Sondervermögen Großforschung am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)</b>	📖 18
<b>02 NUK 039C</b>	Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmetho- den, spektroskopischen und quantenmechanischen Metho- den; Teilprojekt C	<b>Ruprecht-Karls- Universität Heidel- berg</b>	📖 20
<b>02 NUK 044B</b>	Verbundprojekt SIRIUS: Sekundärionisation radioak- tiver Isotope zur orts aufgelösten Ultraspurenanalyse, Teilprojekt B	<b>Johannes Gutenberg- Universität Mainz</b>	📖 22
<b>02 NUK 046A</b>	Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungs- beziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungs- funktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisie- rung in der Umwelt, Teilprojekt A	<b>TU Dresden</b>	📖 24
<b>02 NUK 046B</b>	Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungs- beziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungs- funktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisie- rung in der Umwelt, Teilprojekt B	<b>Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.</b>	📖 26
<b>02 NUK 046C</b>	Verbundprojekt FENABIUM: Struktur-Wirkungs- beziehungen zwischen f-Elementen und organischen Ligandsystemen mit naturstoffbasierten Bindungs- funktionen in Hinblick auf eine mögliche Mobilisie- rung in der Umwelt, Teilprojekt C	<b>Universität Leipzig</b>	📖 28
<b>02 NUK 051A</b>	Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche- Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimati- scher Veränderungen, Teilprojekt A	<b>Universität Hanno- ver</b>	📖 30
<b>02 NUK 051B</b>	Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche- Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimati- scher Veränderungen, Teilprojekt B	<b>Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.</b>	📖 32

<b>02 NUK 051C</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>Universität Jena</b>	📖 34
<b>02 NUK 051D</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>Universität Bremen</b>	📖 36
<b>02 NUK 051E</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>Öko-Institut. Institut für angewandte Ökologie e. V.</b>	📖 38
<b>02 NUK 053A</b>	Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt A	<b>Forschungszentrum Jülich GmbH</b>	📖 40
<b>02 NUK 053B</b>	Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt B	<b>Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.</b>	📖 42
<b>02 NUK 053C</b>	Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt C	<b>Sondervermögen Großforschung am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)</b>	📖 44
<b>02 NUK 053D</b>	Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt D	<b>Helmholtz-Zentrum Potsdam Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ</b>	📖 46
<b>02 NUK 053E</b>	Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt E	<b>Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ</b>	📖 48

### 1.3 Strahlenforschung

<b>02 NUK 032</b>	DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Tumoren: Mechanismen und Targets	<b>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</b>	 52
<b>02 NUK 035A</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A	<b>Universität des Saarlandes</b>	 54
<b>02 NUK 035B</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B	<b>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</b>	 56
<b>02 NUK 035C</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C	<b>TU Dresden</b>	 58
<b>02 NUK 035D</b>	Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D	<b>Bundesamt für Strahlenschutz, Salzgitter</b>	 60
<b>02 NUK 036AX</b>	Verbundprojekt KAU VIR: 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>	 62
<b>02 NUK 036B</b>	Verbundprojekt KAU VIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt B	<b>Elbe Kliniken Stade-Buxtehude</b>	 64
<b>02 NUK 036C</b>	Verbundprojekt KAU VIR: 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>	 66
<b>02 NUK 036D</b>	Verbundprojekt KAU VIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt D	<b>TU Darmstadt</b>	 68
<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>	 70
<b>02 NUK 042A</b>	Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt A	<b>Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz</b>	 72

<b>02 NUK 042B</b>	Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt B	<b>Johannes Gutenberg-Universität Mainz</b>	 74
<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>	 76
<b>02 NUK 042D</b>	Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt D	<b>TU Darmstadt</b>	 78
<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>	 80
<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>	 82
<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>	 84
<b>02 NUK 047B</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B	<b>Bundesamt für Strahlenschutz</b>	 86
<b>02 NUK 047C</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C	<b>Klinikum der Universität München</b>	 88
<b>02 NUK 047D</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D	<b>Universitätsklinikum Essen</b>	 90
<b>02 NUK 047E</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt E	<b>Charité - Universitätsmedizin Berlin</b>	 92
<b>02 NUK 047F</b>	Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt F	<b>Albert-Ludwigs-Universität Freiburg</b>	 94
<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>	 96
<b>02 NUK 048B</b>	Verbundprojekt ESKaRa: Epidemiologische Studie zu Kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Radiotherapie bei Brustkrebspatientinnen, Teilprojekt B	<b>Universität Ulm</b>	 98
<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>	 100

<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>	 102
<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>	 104
<b>02 NUK 050B</b>	Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt B	<b>TU Darmstadt</b>	 106
<b>02 NUK 050C</b>	Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt C	<b>TU Darmstadt</b>	 108
<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>	 110
<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>	 112
<b>02 NUK 054A</b>	Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt A	<b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH</b>	 114
<b>02 NUK 054B</b>	Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt B	<b>Universitätsklinikum Essen</b>	 116
<b>02 NUK 054C</b>	Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt C	<b>TU Darmstadt</b>	 118
<b>02 NUK 055A</b>	Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt A	<b>Leibniz-Institut für Alternsforschung – Fritz-Lipmann-Institut e. V. (FLI), Jena</b>	 120
<b>02 NUK 055B</b>	Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt B	<b>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</b>	 122
<b>02 NUK 055C</b>	Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt C	<b>TU Dresden</b>	 124



## **2 Formalisierte Zwischenberichte**

### **2.1 Sicherheitsforschung für Kernreaktoren**

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 041A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt A: Einzel- und Integralexperimente 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 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.817.155,95 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr.-Ing. 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 geneigten 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 Integralexperimente zur Untersuchung der Zweiphasenstabilität vorgesehen. Unter Anwendung dieser erhaltenen Daten erfolgt die umfassende Bewertung der Stabilität des zweiphasigen Naturumlaufs 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)

Beginnend mit dem Zeitraum der Projektaufstockung gliedern sich die Arbeitspakete wie folgt:

- AP1\*: Literaturstudium, Festlegung von Randbedingungen für Experimente und Modellbildung, Arbeiten zur Vorbereitung der Experimente und Simulationen (TUD-WKET, THD, HZDR, GRS)

- AP2\*: Vorbereitung und Durchführung der Experimente (TUD-WKET, THD, HZDR)  
 AP3\*: Modellentwicklung für CFD- und Integralcodes, Weiterentwicklung RAM/ROM, Durchführung von Simulationen (TUD-WKET, THD, HZDR, GRS)  
 AP4\*: Validierung der Modelle und Methoden (TUD-WKET, THD, HZDR, GRS)  
 AP5\*: Abschlussbericht (TUD-WKET, THD, HZDR, GRS)

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1\*: abgeschlossen
- AP2\*: Die Wärmeübertragungsexperimente zum Einfluss nichtkondensierbarer Gase wurden laut Experimentiermatrix begonnen und mussten durch den Notbetrieb der TU Dresden aufgrund der Corona-Pandemie unterbrochen werden. Die Versuchsanlage befindet sich momentan in Revision, um die Experimente fortführen zu können.
- AP3\*: Ein an die GENEVA-Versuchsanlage angelehntes ATHLET-Modell wurde erstellt. Dabei wurden Geometriefaktoren so angepasst, dass die relativen Abweichungen im Geschwindigkeits- und Druckprofil auf bis zu 5 % minimiert wurden. Dieses Modell bildet die Grundlage zur Berechnung des Eingangsdatsatzes für das Naturumlauf-ROM. Das Naturumlauf-ROM wurde mit dem Bifurkationscode MatCont gekoppelt. Die Komplexität der Modellierung verursacht allerdings trotz der Modellordnungsreduktion einen hohen Rechenaufwand. Die Verfolgung der Gleichgewichtspunkte (Steady states) detektiert ab einem gewissen Rechenschritt komplexe Zahlenwerte. Erfolgt die Lösung daraufhin nur mit dem Realteil resultiert eine Hopf-Bifurkation an diesem Datenpunkt. Die Hopf-Bifurkation nahe der Stabilitätsgrenze wird durch die numerische Integration im Zeitbereich bestätigt.  
 Ein ATHLET-Datensatz zur Berücksichtigung nichtkondensierbarer Gase beim Kondensationswärmeübergang wurde erstellt. Erste Vorausrechnungen für Helium und Stickstoff zeigen Verteilungen der Gase im Dampfraum, die bislang nicht erklärbar sind.
- AP4\*: Für die MatCont-Rechnungen wurden Betriebspunkte nahe der Stabilitätsgrenze als Referenzpunkte gewählt und numerisch im Zeitbereich integriert. Die Resultate zeigen, dass das Stabilitätsverhalten der GENEVA sehr gut durch das ROM abgebildet wird.
- AP5\*: noch nicht begonnen (geplanter Zeitraum: 10/2020 - 12/2020)

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP2\*: bis 09/2020: Durchführung von Kondensationsexperimenten
- AP3\*: bis 08/2020: Durchführung nichtlinearen Stabilitätsuntersuchung  
 ab 10/2020: Überprüfung der ATHLET-Modelle zu nicht kondensierbaren Gasen anhand der Ergebnisse der Kondensationsexperimente
- AP4\*: bis 08/2020: Überprüfung der RAM-ROM-Methode anhand der Integraleexperimente  
 ab 10/2020: Weiterentwicklung und Validierung von Kondensationsmodellen bei Anwesenheit von nicht kondensierbaren Gasen
- AP5\*: ab 09/2020: Erstellen des Abschlussberichts

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<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 31.12.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.134.305,95 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: Literaturstudium, Festlegung von Randbedingungen für Experimente und Modellbildung, Arbeiten zur Vorbereitung der Experimente und Simulationen
- AP2: Vorbereitung und Durchführung der Experimente
- AP3: Modellentwicklung für CFD- und Integralcodes, Weiterentwicklung RAM/ROM, Durchführung von Simulationen
- AP4: Validierung der Modelle und Methoden
- AP5: Abschlussbericht

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Das CFD-Modell wurde für die gemessenen Wanddicken der COSMEA-Anlage aktualisiert. Es wurde eine Literaturstudie über die Auswirkungen von Einbauten auf die Verbesserung der Wärmeübertragung während des Kondensationsprozesses durchgeführt.
- AP2: Es wurde die Neukonstruktion der COSMEA-Versuchsstrecke mit drallfreier Sekundärkühlung und erweiterte Thermoinstrumentierung im Außenrohr sowie Strömungs-

gleichrichter im Innenrohr geplant. es wurden Teile bestellt und mit dem Aufbau begonnen.

- AP3: Es wurde die Kombination von GENTOP-Konzept und dem neu entwickelten Wandkondensationsmodell untersucht. Simulationsergebnisse wurden mit den neuen experimentellen Daten der COSMEA-Anlage verglichen. Es wurde ein vereinfachtes ATHLET (V3.2) Modell des COSMEA-Kondensatorrohrs erstellt. Dieses Modell berücksichtigt nur die Primärseite mit einer festen Außenwandtemperatur als Randbedingung. Das Modell wurde mit den experimentellen Daten von COSMEA für verschiedene Betriebsdrücke validiert. Ein Fehler in der ATHLET-Implementierung des Dobson/Chato-Kondensationsmodells wurde gefunden und korrigiert.
- AP4: Das entwickelte CFD-Modell für die Kondensation im Rohrinnen wurde verwendet, um einen Test von GENEVA zu simulieren, bei der Kondensation an der Außenseite des geeigneten Rohrs auftritt.

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

- AP2: Installation des Messsystems an das TOPFLOW-Regelsystem, Neuaufstellung des CoRöCT, Experimente
- AP3: Es erfolgen weitere Arbeiten am GENTOP-Konzept zur Modellierung des gesamten Kondensationsprozesses vom Reindampf am Eintritt bis zur reinen Flüssigkeit am Austritt des Rohres. Ein ATHLET-Modell des neuen Aufbaus des COSMEA-Prüfstands wird auf der Grundlage von Messdaten für ausgewählte Strömungszustände und Wärmeübertragungsregime entwickelt und validiert. Die Ergebnisse des Modells werden mit den Ergebnissen von CFD-Auswertungen verglichen.
- AP4: Bislang wird das HZDR-Kondensationsmodell auf die GENEVA-Geometrie angewendet. Der nächste und letzte Schritt ist die Modellierung des gesamten Szenarios mit Berücksichtigung von Sieden und Kondensation (durch Verwendung des RPI-Modells für das Sieden).

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

- A. Moonesi et al.: Flow morphology and heat transfer analysis during high-pressure steam condensation in an inclined tube part II: Numerical investigations, Nuclear Engineering and Design 2020, 362
- A. Moonesi et al.: Modelling of passive heat removal systems: A review with reference to the Framatome BWR reactor KERENA: Part I, Energies 2020, 13, 35
- R. Manthey, et al.: Modelling of passive heat removal systems: A review with reference to the Framatome BWR reactor KERENA: Part II, Energies 2020, 13, 109

<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 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 494.528,40 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 der experimentellen Daten aus der COSMEA Anlage sowie Daten die in früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen ein optimiertes Wärmeübergangsmodell für die Innenseite der Notkondensatorrohre entwickelt. Damit lässt sich die Unsicherheit der numerischen Berechnung des Wärmeflusses auf unter 4 % reduzieren.

Die Arbeitspakete des ursprünglichen PANAS Projektes sind damit abgeschlossen. Im Rahmen des erweiterten PANAS Projektes werden derzeit folgende Arbeitspakete bearbeitet:

AP1: Literaturstudium zu sekundärseitigen Wärmeübergangsmodellen und Mehrrohr-Effekten sowie Zweiphaseninstabilitäten und natürliches Kreislaufsystem

- AP2: Auswahl von geeigneten Wärmeübertragungsmodellen von Literatur und Implementierung der Modelle in ATHLET. Vergleich der berechneten Ergebnisse mit experimentellen Daten der COSMEA-Testanlage
- AP3: Entwicklung des ATHLET Wärmeübertragungsmodells und CFD Modellierung des adiabaten Siedens in Steigleitungen
- AP4: Validierung der neuen Modelle auf der Basis des Experiments

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

Das Arbeitspaket 1 der PANAS Erweiterung ist abgeschlossen. Eine umfassende Literatur-Recherche wurde unter Berücksichtigung aller möglichen Wärmeübertragungsphänomene auf der Sekundärseite durchgeführt. Die identifizierten Modelle wurden auf Ihre Anwendbarkeit im Betriebsparameterbereich der COSMEA-Testanlage überprüft. Dafür wurde MATLAB Berechnungen zum Wärmeübergang mit den gefundenen Modellen durchgeführt und mit experimentellen Daten verglichen. Für die COSMEA-Versuche ergab sich die beste Übereinstimmung für das Dittus-Boelter Wärmeübergangsmodell. Allerdings sind die COSMEA Daten beschränkt auf einphasige Konvektion auf der Sekundärseite. Allerdings sind auch hier Abweichungen zwischen experimentellen und gemessenen Werten zu erkennen. Das unterstützt den Ansatz die Modellierung weiter zu entwickeln.

In früheren Arbeiten wurde die für Niederdruck-2-Phasen Naturumlaufsysteme typischen Flashing Instabilitäten untersucht. Anhand der experimentellen Ergebnisse wurde die ATHELRL Modellierung durch ein spezifisches adiabates Verdampfungsmodell erweitert. CFD Simulationen wurden durchgeführt, um die ATHLET Modell-Entwicklung mit weiteren Daten zu unterstützen. Allerdings ergaben sich physikalisch nicht sinnvolle Ergebnisse. Das kann wahrscheinlich auf das Fehlen eines Balseckeimmodells in gängigen CFD Codes zurückgeführt werden. Darum wird im nächsten Schritt ein Keimmodell entwickelt.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

In den nächsten Schritten werden die verschiedene Modelle aus Literatur im ATHLET implementiert, um die COMEA Versuche mit ATHELRL unter Nutzung der verschiedenen Modelle nachrechnen zu können. Damit wird ein detaillierter Vergleich der zwischen Experimentellen Daten und Modellierung mit verschiedenen Wärmeübertragungs-Modellen möglich und man erhält einen Überblick über die Unsicherheiten. Aufbauend darauf wird ein optimiertes Wärmeübertragungsmodell entwickelt. Die CFD Modellierung wird anhand von experimentellen Daten gewonnen und an der INTRAVIT Anlage weiter verfeinert und optimiert.

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

Keine.



## **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 30.04.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.07.2019 bis 30.04.2020	
<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

- KIT-INE, Projektmanagement: Kommunikation im Verbund ThermAc, Dissemination.
- KIT-INE, Experimentelles Programm:
  - (i) Abschluss der Th(IV)-Löslichkeitsexperimente mit hydroxidischen Festphasen bei höheren Temperaturen. Klarer Einfluss der Temperatur auf Löslichkeit und Th-Festphasen beobachtet.
  - (ii) Abschluss der Experimente zur Th(IV)-Löslichkeit bei Anwesenheit von Carbonat bei höheren T.
  - (iii) Umfassende Festphasencharakterisierung für Th(IV)-Festphasen, welche in den Experimenten höherer Temperatur ausgesetzt waren. Höhere Temperatur führt allgemein zu höherer Kristallinität der Festphasen.
  - (iv) Betreuung der Masterarbeit von Herrn Ch. Kiefer am KIT zu Themen in ThermAc.
  - (v) Arbeit am Abschlussbericht.
- Arbeiten des Unterauftragnehmers GRS:
  - (i) Auswertung der spektrophotometrischen Messungen zur Komplexbildung von Fe(II) mit Chlorid und Sulfat. Faktoranalytische Quantifizierung der Spezieskonzentrationen und Bestimmung von Ionen-wechselwirkungskoeffizienten für Eisen(II)chlorokomplexe in NaCl und KCl Lösungen.
  - (ii) Spektrophotometrische Messungen von Eisen(II) in Sulfatlösungen steigender Konzentration zeigen nur schwache Veränderungen der Absorptionsspektren, wodurch keine Quantifizierung von Sulfatokomplexen möglich war.
  - (iii) Das Modell zur Umrechnung von gemessenen Redoxpotentialen in Sauerstoffpartialdrücke wurde begrenzt auf Lösungen der Salze NaCl, KCl und MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C (NaCl: 25 – 60 °C).
- Arbeiten des Unterauftragnehmers Amphos21:
  - (i) Finalisierung der Arbeiten innerhalb von TermAc. Abschluss der Arbeiten zu den entwickelten technischen Datenblättern.
  - (ii) Erstellung detaillierter Angaben zur den Ergebnissen der Vergleiche zwischen experimentellen Daten und den geschätzten Werten.
  - (iii) Zusammenfassung der Arbeiten für den Abschlussbericht inklusive Diskussion der Anwendbarkeit der entwickelten Schätzmethode für den Safety Case.
- Arbeiten des Unterauftragnehmers PSI-LES:
  - (i) Die Softwaretools ThermoMatch, ThermoHub und ThermoFun wurden in Bezug auf Import/Export von Daten in verschiedenen Datenbankformaten weiterentwickelt. Importoption wurden eingerichtet um csv-Dateien aus Excel einzulesen. Datenexport in das GEM-Selektor-Format wurde verbessert.
  - (ii) Der universale Open-source-client ThermoFun, der thermodynamische Daten von Substanzen und Reaktionen bei gewünschten Temperaturen und Drücken berechnet, kann in einer Browserumgebung als Jupyter-Notebook genutzt werden. Dazu wurden Dokumentation und Tutorials verbessert (siehe <https://thermohub.org/thermofun>). Eine Publikation hierzu ist in Bearbeitung.
  - (iii) Beitrag zum Abschlussbericht ist in Bearbeitung.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Das ThermAc Projekt wurde im vorliegenden Berichtszeitraum beendet. Es werden dementsprechend keine weiteren experimentellen Arbeiten innerhalb von ThermAc durchgeführt. Die Publikation verschiedener Projektergebnisse aus ThermAc kann erst nach Projektende erfolgen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Miron G. D., Kulik D. A., Thoenen T. (2020): Generating isocoulombic reactions as a tool for systematic evaluation of temperature trends of thermodynamic properties: Application to aquocomplexes of lanthanides and actinides. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, in press

<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 30.09.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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 Speziationmethoden wie z. B. 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

#### WP3:

Für weitere UV/Vis-spektroskopische Studien zur Komplexierung von  $\text{NpO}_2^+$  im Temperaturbereich bis 200 °C wurde eine neue Hochtemperatur-VIS/NIR-Zelle in Betrieb genommen und getestet. Diese stellt eine wesentliche Verbesserung der für die ersten Untersuchungen von  $\text{NpO}_2^+$  mit Sulfat bis 200 °C verwendeten Zelle dar. Sie besteht ebenfalls aus einer TiPd-Legierung mit einem Massenanteil von 0.2 % Pd, welche eine sehr hohe Korrosionsbeständigkeit und einen geringen Wärmeausdehnungskoeffizienten aufweist. Die Zelle wurde für einen maximalen Druck von 30 bar (TÜV geprüft) und Temperaturen bis 200 °C ausgelegt. Im Gegensatz zu dem Prototyp dieser Zelle wurden optische Fenster aus Quarz und Dichtungen aus Silikon verwendet, was eine erhöhte Dichtigkeit insbesondere bei Temperaturen > 150 °C zur Folge hat. Auch durch die Verwendung von speziellen IR-Lichtleitern konnte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) nochmals deutlich verbessert werden.

Mittels des neuen experimentellen Aufbaus wurden weitere Untersuchungen zur Komplexierung von  $\text{NpO}_2^+$  mit  $\text{SO}_4^{2-}$  im Temperaturbereich bis 200 °C durchgeführt. Die experimentellen VIS/NIR Spektren sowie die daraus ermittelten thermodynamischen Daten stehen in sehr guter Übereinstimmung mit denen der vorausgegangenen Arbeiten. Durch die verbesserte Spektrenqualität konnte jedoch der Datensatz maßgeblich erweitert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden bereits publiziert (siehe Berichte, Veröffentlichungen).

#### WP2/WP4:

Im Rahmen der Charakterisierung von löslichkeitsbestimmenden Festphasen wurden 6 mg Cm(III) aus verschiedenen Abfällen durch Ionenaustauschchromatographie abgetrennt. Das Cm(III) wurde anschließend als Hydroxid gefällt und mittels kaustischer Thermosynthese zu  $\text{Cm}(\text{OH})_3(\text{cr})$  umgesetzt. Die Festphase wurde erfolgreich mittels EXAFS, XRD und TRLFS charakterisiert. Das Pulverdiffraktogramm enthält alle Reflexe entsprechend der Raumgruppe  $P6_3/m$ . Durch die Auswertung der EXAFS-Spektren konnten die Atomabstände in der  $\text{Cm}(\text{OH})_3(\text{cr})$  Festphase ermittelt werden. Die Daten zeigen eine Koordinationsumgebung des Cm(III) mit sechs Sauerstoffatomen im Abstand von 2.47 Å sowie je zwei Curiumatomen im Abstand von 3.69 Å und sechs im Abstand von 4.14 Å. Das Fluoreszenzspektrum von  $\text{Cm}(\text{OH})_3(\text{cr})$  weist eine Emissionsbande bei 609.6 nm auf. Die absolute Fluoreszenzintensität des Festkörpers gegenüber dem Aquoion beträgt nur 10 %, was bedeutet, dass in diesem kristallinen Festkörper ein starkes Fluoreszenzquenching erfolgt. Dies wird auch durch die sehr kurze Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau = 42.9 \pm 1.0 \mu\text{s}$  bestätigt, die deutlich unter den dokumentierten Werten für das Cm(III)-Aquoio liegt. Diese charakterisierte Festphase diente als Grundlage für die Untersuchung der Hydrolysereaktion von Cm(III) aus untersättigter Lösung mittels zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie. In analoger Weise wurde auch  $\text{Eu}(\text{OH})_3(\text{cr})$  synthetisiert und mittels XRD und SEM charakterisiert. Die ermittelte Löslichkeitskonstante des  $\text{Eu}(\text{OH})_3(\text{s})$  entspricht mit  $\log *K_{s0}^\circ = 17.6 \pm 0.1$  der der Literatur.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

WP3: Publikation der thermodynamischen Daten der Np(V)-Chloridkomplexierung.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Maiwald, M. M., Skerencak-Frech, A., Panak, P. J.: Spectroscopic characterization and thermodynamics of the complexation of Np(V) with sulfate up to 200 °C, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 240, 118579-118587 (2020)

<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 Ultraspurenanalyse, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2016 bis 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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

Department Chemie (bis 31.12.2019 Institut für Kernchemie):

Die laserspektroskopischen Untersuchungen an Np-239 in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physik wurden fortgesetzt. Hierfür wurde erneut Np-239 am Forschungsreaktor TRIGA Mainz erzeugt, säulenchromatographisch abgetrennt und Proben für die Messungen im Institut für Physik präpariert. In der direkt anschließenden Messzeit konnten bestehende Fragestellungen geklärt und die Isotopieverschiebung Np-239/Np-237 für ein dreistufiges Anregungsschema gemessen werden.

Für die weitere Untersuchung der beobachteten Einflüsse des Elektrolyten auf die Mikrostruktur von Zementstein in Sorptions- und Migrationsexperimenten wurden einzelne Bruchstücke einer polierten Zementscheibe mit verschiedenen Zementporenwässern kontaktiert. Das war zum einen künstliches Zementporenwasser (engl. *artificial cement pore water*, ACW) und zum anderen ACW, das zusätzlich mit Zementsteinpulver äquilibriert worden war (ACW-Z). Die mit ACW und ACW-Z kontaktierten Zementsteinproben wurden mittels SEM/EDX analysiert. Die TOF-SIMS Messungen konnten nach einer durch die Corona-Pandemie bedingten Unterbrechung erst gegen Ende des Berichtszeitraums fortgesetzt werden. Gegenwärtig erfolgt die Auswertung der Messdaten.

Die Auswertung der Proben zur Analyse des Einflusses der Probenmatrix auf das Laser-SNMS Signal von Pu-239 wurde fortgesetzt. An verschiedenen Tonmineralproben, die mit 20  $\mu\text{M}$  Pu(IV)-Lösung kontaktiert worden waren, wurden deutliche Unterschiede in der Intensität des Laser-SNMS-Signals beobachtet. Das deutet auf einen signifikanten Einfluss der Probenzusammensetzung auf die Zählrate. Allerdings war der Einfluss der Probenmatrix auf die Intensität des Signals in TOF-SIMS- und Laser-SNMS-Messungen nicht in allen Fällen identisch und muss noch weiter untersucht werden.

Institut für Physik:

Das Teilprojekt war bereits zum Ende des Jahres 2019 abgeschlossen.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- Abschluss der TOF-SIMS-Messungen zum Einfluss des Elektrolyten (ACW und ACW-Z) auf die Zementsteinoberflächen und Auswertung der Messdaten.
- Kontaktierung von Zementscheiben mit Pu-239 und ortsaufgelöste Detektion des Plutoniums mittels Laser-SNMS.
- Erneute Herstellung und Abtrennung von Np-239 zur Verwendung als Tracer für die Quantifizierung von Np-237 mittels Resonanzionisations-Massenspektrometrie (RIMS).

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<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 30.04.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.427.253,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Weigand	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Im Vorhaben sollen Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen f-Elementen und naturstoffrelevanten Derivate, strukturanalogen tripodalen 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 Untersuchungen zu den Komplexbildungseigenschaften von Phosphorylpyrazolonen gegenüber  $\text{Th}^{4+}$ ,  $\text{Np}^{4+}$  und  $\text{Ce}^{4+}$  wurden auf  $\text{U}^{4+}$  ausgedehnt und im Hinblick auf eine geplante Veröffentlichung vervollständigt. Dabei weisen detaillierte  $^{31}\text{P}$ -NMR-Studien darauf hin, dass für  $\text{Ce}^{4+}$ ,  $\text{Th}^{4+}$  und  $\text{Np}^{4+}$  eine hoch symmetrische Spezies in Lösung vorliegt und vermutlich eine zur Kristallstruktur vergleichbare Koordination der Metallzentren erfolgt. Im Gegensatz dazu werden für  $\text{U}^{4+}$  komplexe Spektren beobachtet, die gegenwärtig durch eine detaillierte Analyse vorliegender EXAFS Spektren ausgewertet werden.

In den Arbeiten zu substituierten Glucosamin wurde die Auswahl der verfügbaren Liganden erweitert. Dazu wurden die OH-Gruppen des Zuckers acetyliert sowie in Position 6 eine Phosphatgruppe eingeführt. Die gebildeten Komplexe nach Umsetzung mit  $\text{UO}_2^{2+}$  werden gegenwärtig in Lösung charakterisiert und in Kristallisationsexperimenten wird die Gewinnung von Einkristallen angestrebt. Die Arbeiten zum Aufbau P-zentrierter tripodaler Ligandensysteme wurden weitergeführt, wobei an einer Darstellung von Liganden mit Amid- sowie Aminfunktionen in den Podandarmen gearbeitet wird.

Darüber hinaus wurden die experimentellen Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von f-Elementen an wärmebehandelten Treber weitgehend abgeschlossen und in einem Manuskript zusammengefasst. Die Studien zur Adsorption von  $\text{UO}_2^{2+}$  an dem Brauereiabfallprodukt Heißtrub zeigen eine maximale Adsorptionskapazität von 165 mg/g  $\text{UO}_2^{2+}$ , unabhängig von der im Brauprozess verwendeten Malzart.

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Stumpf wurden die Arbeiten zur Sorption von  $\text{Eu}^{3+}$  an Diatomeenbiosilikat abgeschlossen. Dabei wurden die gebildeten Sorptionsspezies mithilfe von zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie untersucht und die Sorptionskapazität in Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert quantifiziert. Nach erfolgter methodischer Optimierung konnten unter Einsatz der Kathodolumineszenz sorbierte Europiumionen auf einzelnen Diatomeenzellwänden und Fragmenten erfolgreich mit hoher Auflösung lokalisiert werden. Außerdem wurden die Arbeiten an unbehandeltem Chitin weitergeführt. Zur Identifikation der Bindungsfunktionen, welche mit den Lanthanid- und Actinidionen wechselwirken, wurden die Untersuchungen mit dem Monomer von Chitin, dem Monosaccharid N-Acetylglucosamin, vertieft. Zur Identifikation der einzelnen Komplexspezies und der Ermittlung der Komplexbildungskonstante wurden NMR- und laserspektroskopische Untersuchungen an den Komplexen als Funktion von pH-Wert und Konzentration sowie theoretische Berechnungen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Arbeiten zur Prozessierung in ionischen Flüssigkeiten weitergeführt. Im Fokus steht hierbei die Herstellung von chitinösen Folien für die Sorption von  $\text{Eu}^{3+}$  aus wässrigen Lösungen.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- Synthese und Charakterisierung von tripodaler Alkylphosphinoxide, deren Podandarme über Aminfunktionen verknüpft sind
- Spektroskopische Studien der Ligand-Metallion-Wechselwirkungen der tripodalen Liganden in Lösung
- Durchführung von Kristallisationsexperimenten zur Gewinnung von Einkristallen der Liganden und relevanter Metallkomplexe
- Aufklärung der Ligand- bzw. Komplexstruktur durch Röntgeneinkristallstrukturanalyse
- Untersuchung ausgewählter Maillardprodukte als alternative Modellschubstanzen für Naturstoff-basierten Liganden
- Weiterführung der Untersuchungen zur gezielten Modifikation und Immobilisierung von Treber sowie zur Adsorption von f-Elementen
- Fortsetzung der Studien zur Oberflächencharakterisierung von Heißtrub und dessen Bindungsspezifität
- Untersuchung der Bindungseigenschaften und Bindungskonstanten der Maillard-Reaktions-Modellliganden sowie Kaffeemelanoidinfraktionen gegenüber dreiwertigen f-Elementen und  $\text{UO}_2^{2+}$ -Ionen in repräsentativen Lebensmittelmodellsystemen sowie unter den physiologischen Bedingungen des Verdauungstraktes
- Im kommenden Halbjahr werden insbesondere die Fortführung der Arbeiten zur Optimierung des Sorptionsverhaltens und zur Bestimmung der Sorptionskinetiken und Sorptionskapazitäten der chitinösen Folien

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Veröffentlichungen: Y. Su, W. Böhm, M. Wenzel, S. Paasch, M. Acker, E. Brunner, T. Henle, J. J. Weigand; Mild hydrothermal treated brewer's spent grain for efficient removal of uranyl ions and rare earths, submitted  
 K. Kammerlander, L. Köhler, N. Huittinen, R. Steudtner, C. Oschatz, M. Vogel, T. Stumpf, E. Brunner; Sorption of Europium on Diatom Biosilica as Model of a "Green" Sorbent for f-Elements, submitted  
 Poster bei Konferenzen: Y. Su, M. Wenzel, S. Paasch, E. Brunner, J. J. Weigand, Oxidation of brewer's spent grain for f-elements adsorption; Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Fluidverfahrenstechnik, Adsorption und Extraktion, 26.-28.02.2020, Berchtesgaden, Deutschland

<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 30.04.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 893.268,00 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: Herstellung von Yttrium-86 am Zyklotron
- AP3: Komplexbildungsstudien
- AP4: Adsorptions- und Desorptionsuntersuchungen
- AP5: Zusammenfassung und Bewertung

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Auf Grund der Schutzmaßnahmen in der Anfangsphase der Covid-19-Pandemie war der Laborbetrieb am HZDR nur eingeschränkt möglich. Die beteiligten Mitarbeiter haben die Zeit genutzt, um Publikationen zu finalisieren und ggf. ihre Abschlussarbeiten zu schreiben.

AP1: Neuartige symmetrische, wie asymmetrische N-Donoren basierend auf Schiff'schen Basen wurden synthetisiert. Die Verknüpfung der jeweiligen Donorfunktionalitäten erlaubt eine Veränderung des Bisses der Liganden und damit eine Optimierung für verschiedene Ionenradien der zu komplexierenden Metallionen.

AP2: Bereits erfolgreich abgeschlossen.

- AP3: Die Arbeiten zur Komplexierung von Amidinaten und Schiffchen Basen mit Th(IV), U(IV), Np(IV) und Pu(IV) wurden publiziert. Erste Komplexierungsversuche mit den neuen N-Donor-Liganden aus AP1 wurden begonnen. Die quantenchemischen Berechnungen an Salen-artigen Komplexen der frühen Actiniden, deren Bindungsanalysen und Bestimmungen der Bindungsordnungen werden zur Publikation vorbereitet. Die Arbeiten zur Berechnung größerer Komplexsysteme mit natürlich vorkommenden und biologisch-inspirierten Ligandsystemen mit QM/MM Methoden wurden fortgesetzt und die Optimierung der Schnittstelle zwischen den verwendeten Programmpaketen erfolgreich begonnen. Eine Publikation zu ersten Ergebnissen an Haupt- und Nebengruppenmetallkomplexen werden zur Publikation vorbereitet.
- AP4: Bereits erfolgreich abgeschlossen.
- AP5: Publikationen zu den Komplexen der tetravalenten Actinide mit Amidinat-Liganden wurden zur Publikation eingereicht und sind zum Teil bereits erschienen. Die Arbeit zu Silylamid-/imid-Komplexen mit U(IV) und U(V) sind zur Publikation vorbereitet und werden in den nächsten Wochen eingereicht. Zudem fließen die ersten QM/MM Ergebnisse in ein Manuskript ein. Herr Fichter hat seine Doktorarbeit verfasst und eingereicht. Herr Radoske hat seine Ergebnisse zur Publikation eingereicht und schreibt nun seine Doktorarbeit.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Erkenntnisse aus den Komplexierungsversuchen (AP3) fließen laufend in die Synthese neuer Ligandsysteme ein. Das Design der Liganden wird zudem maßgeblich durch begleitende quantenchemische Arbeiten im Haus unterstützt.
- AP2: Bereits erfolgreich abgeschlossen.
- AP3: Die Arbeiten zur Komplexierung von neuartigen Schiffchen Basen mit N-Donorfunktionalitäten werden fortgesetzt und auf Np(IV) und Pu(IV) erweitert. Die Berechnungen an komplexen biologisch-inspirierten Systemen mit QM/MM Methoden werden auf die Koordination von Actiniden übertragen. Es gilt dabei die Datenübergabe zwischen zwei Programmpaketen weiter zu optimieren. Arbeiten zur Komplexierung von dreiwertigen An(III) und Ln(III) an Biosilikaten (mit AK Brunner (TUD)) mittels TRLFS werden fortgesetzt.
- AP4: Bereits erfolgreich abgeschlossen.
- AP5: Eine Reihe von Publikationen befinden sich derzeit im Review Prozess und weitere Manuskripte werden derzeit geschrieben. Die Kooperationsarbeiten mit der TUD (AK Weigand und AK Brunner) sind bereits geschrieben und sollen zeitnah zur Publikation in Journalen mit peer review eingereicht werden. Alle Ergebnisse sollen im kommenden Halbjahr in Dissertationen der beteiligten Doktoranden fließen und zeitnah verteidigt werden.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Publikationen:

Karimzadeh, L.; Lippold, H.; Stockmann, M.; Fischer, C.: Effect of DTPA on europium sorption onto quartz – Batch sorption experiments and surface complexation modeling, *Chemosphere* 239(2020), 124771. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124771

Fichter, S.; Kaufmann, S.; Kaden, P.; Brunner, T. S.; Stumpf, T.; Roesky, P. W.; März, J.: Enantiomerically pure Tetravalent Neptunium Amidinates: Synthesis and Characterization, *Chem. Eur. J.*, 2020, 26 (41), 8897-8870 DOI: 10.1002/chem.202001865

Kloditz, R.; Fichter, S.; Kaufmann, S.; Brunner, T.; Kaden, P.; Patzschke, M.; Stumpf, T.; Roesky, P.; Schmidt, M.; März, J.: A Series of Tetravalent Actinide Amidinates: Structure Determination and Bonding Analysis, *Inorg. Chem.* 2020, submitted

Radoske, T.; Fichter, S.; März, J.; Kaden, P.; Patzschke, M.; Schmidt, M.; Stumpf, T.; Ikeda-Ohno, A.: Systematic comparison of the structure of homoleptic salen-type Schiff base complexes of tetravalent metals (M(IV) = Zr, Hf, Ce, Th, U, Np, and Pu) in solid state and in solution, *Dalton Trans.* 2020, submitted

Radoske, T.; März, J.; Patzschke, M.; Kaden, P.; Schmidt, M.; Stumpf, T.: Bonding Trends in Tetravalent Th-Pu Monosalen Complexes, *Chem. Eur. J.* 2020, submitted

Zhang, J.; Wenzel, M.; Schnaars, K.; Hennersdorf, F.; März, J.; Rossberg, A.; Kaden, P.; Stumpf, T.; Weigand, J. J.: Coordination of Tetravalent Cerium and Actinides (An = Th(IV), U(IV), Np(IV)) by a 4-Phosphoryl 1H-Pyrazol-5-olate Ligand in Solution and the Solid State, *Chem. Commun.* 2020, submitted

<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 30.04.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 637.671,00 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-Potenziometrie, 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 mehrere Arbeitspakete unterteilt, wobei eine detaillierte Beschreibung der Arbeitspakete im Aufstockungs- bzw. Hauptantrag zu finden ist. Unsere Arbeitsgruppe ist in die Arbeitspakete 1, 3 und 5 involviert. Seit Beginn des Projektes arbeiten M.Sc. Peter Hahn sowie ab dem 01.01.2017 auch M.Sc. Anne Mehnert und M.Sc. Tony Zielke an den skizzierten Experimenten. Die drei Promotionsarbeiten werden bis Ende der Projektlaufzeit erfolgreich abgeschlossen werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Zu Beginn des Berichtszeitraumes wurde die analytische Charakterisierung bereits erhaltener Verbindungen weiter vorangetrieben. Dabei lag der Fokus vermehrt auf der Untersuchung von Komplexbildungsreaktionen in Lösung, die mittels UV-vis und Fluoreszenz-Spektroskopie sowie ITC-Messungen verfolgt wurden. Peter Hahn betrieb weiterführende Studien über die *upper-rim*-Funktionalisierung des Calix[4]arens mittels pyridinstabiler Iodkationen, um diese für Weiterfunktionalisierung mit naturrelevanten Bindungsmustern einzusetzen. Ebenso konnten *f*-Elementkomplexe eines monosubstituierten Hydrazino-carbonylmethoxy-Liganden kristallisiert und röntgenkristallographisch untersucht werden, welches wiederum interessante Ergebnisse liefert, um das Komplexierungsverhalten dieser neuartigen Liganden gegenüber *f*-Elementen zu verstehen. Anne Mehnert führte erfolgreiche Synthesen von Eu- und Tb-Komplexen mit dem im Aufstockungsantrag skizzierten C<sub>2</sub>-symmetrischen Schiff-Base/Calix[4]aren-Liganden durch. Es wurden elektronenziehende und elektronenschiebende Substituenten am Benzolkern der Schiff-Baseeinheit angebracht, und photophysikalische Parameter (Quantenausbeuten, Lebensdauer angeregter Zustände) ermittelt. Herr Zielke hat während des Zusammenschreibens mehrere vierkernige Lanthanoid-Komplexe mit Thiocalixarenen erhalten und kristallographisch charakterisiert. Diese Ergebnisse will er noch mit in seine Schrift aufnehmen. Die Komplexierungseigenschaften wurden auch hier mittels spektrophotometrischer Methoden untersucht.

Durch die Corona-Pandemie kam es leider zu Einschränkungen im Laborbetrieb, die einige Verzögerungen bei der Projektbearbeitung nach sich zogen. Wir haben daher diese Zeit genutzt, um im Home-Office-Betrieb einige der erhaltenen Ergebnisse zu publizieren. 2 Publikationen sind inzwischen angenommen. Eine weitere wurde eingereicht und befindet sich in der Begutachtungsphase.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

In den folgenden Monaten soll die analytische Charakterisierung der erhaltenen *f*-Elementkomplexe abgeschlossen werden. Durch die Covid-19-Pandemie stehen hier leider noch einige Messungen aus. Ebenso sollen in den nächsten Monaten weitere Ergebnisse publiziert werden.

Die Untersuchungen der Lumineszenz der Tb- und Eu-Komplexe sollen vervollständig und in einer Veröffentlichung zusammengefasst werden.

Weiterhin werden erste EPR-Messungen mit Gd-Komplexen durchgeführt, um diese Komplexe als *protein-spin tags* in Betracht zu ziehen, um damit die Verteilung in biologischer Matrix zu untersuchen. Des Weiteren werden die *upper-rim*-iodierten Calix[4]arene in Folgereaktionen umgesetzt, um sowohl Bindungsstellen für Metallionen zu erhalten sowie geeignete Funktionalitäten am Grundkörper einzuführen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

P. Hahn, S. Ullmann, J. Klose, Y. Peng, A. Powell, B. Kersting: "Dinuclear Tb and Dy Complexes supported by hybrid Schiff-Base/Calixarene Ligands: Synthesis, Structures and Magnetic Properties" Dalton Trans. 2020, DOI: 10.1039/d0dt02209h, accepted

P. Hahn, S. Ullmann, A. Kahnt, B. Abel, B. Kersting: "Synthesis, Structures and Luminescence Properties of Dinuclear Nd, Eu, Tb, and Yb Complexes supported by a Pendant Picolyl-Imine Calix[4]arene Ligand", Inorg. Chim. Acta 2020, ICA\_2020\_844, accepted

A. Jäschke, T. Stumpf, A. Aliabadi, B. Büchner, V. Kataev, T. Hahn, J. Kortus, B. Kersting: "Tetranuclear Lanthanide Complexes supported by Hydroxyquinoline-Calix[4]arene-Ligands: Synthesis, Structure and Magnetic Properties of [Ln<sub>4</sub>(H<sub>3</sub>L)<sub>2</sub>(m-OH)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (Ln = Tb, Dy, Yb) and [Dy<sub>2</sub>(H<sub>4</sub>L)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)](NO<sub>3</sub>)", Eur. J. Inorg. Chem. 2020, ejic.202000718 (submitted)

<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 30.11.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<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 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

- 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

- AP2: In inaktiven Säulenversuchen mit RefeSol 02-A und 03-G unter Ausschluss von Luft-sauerstoff wurden während der sechswöchigen Laufzeit täglich Porenwasserproben entnommen, in denen die pH- und Eh-Werte sowie der TOC-Gehalt bestimmt wurden. Erwartungsgemäß folgten alle Säulen in Bezug auf pH- und Eh-Einstellung dem gleichen Trend (pH-Zunahme, Eh-Abnahme). Die TOC-Werte blieben in RefeSol 02-A relativ konstant bei Werten um 100 mg/L, während sie in RefeSol 03-G zeitabhängig von etwa 650 mg/L zu Beginn auf 160 mg/L zu Versuchsende sanken. Im Folgenden werden die Versuche mit RefeSol 01-A und 04-A fortgeführt. Weiterhin wurden Säulen-

lenversuche mit Pu-238 und Am-243 in RefeSol 02-A und 03-G angesetzt. Eine Analyse der Ergebnisse steht durch die Covid-19-bedingte Schließung der Universitätseinrichtungen und dem daraus resultierenden Probenrückstau noch aus. Für die Lysimeter wurde ein System zur Entnahme von Porenlösung installiert und in Betrieb genommen. Die erste Probenentnahme wurde inzwischen vorgenommen und erst kürzlich abgeschlossen, so dass sich der Zeitpunkt der Tracerzugabe zu den Lysimeter insgesamt um etwa sechs Monate verzögert.

AP3: Der in RefeSol 02-A und 03-G angezogene Weizen wurde geerntet und teilweise analysiert. Wie bereits in RefeSol 01-A und 04-A beobachtet, fand im Fall des I-125 kein Transfer in die Körner statt. Die mittleren Transferfaktoren für die Blätter lagen bei max.  $3,62 \pm 1,07$  und für die Wurzeln bei max.  $31,09 \pm 9,11$ . Die Analyse der übrigen Radionuklide steht auch hier durch die Covid-19-bedingte Schließung der Universitätseinrichtungen und dem daraus resultierenden Probenrückstau noch aus.

AP4: Um die tatsächlich aufgenommenen Phosphatmenge in Oozyten, welche den AtPHT1.4 exprimieren zu untersuchen, wurde ein Phosphat-Aufnahme-Assay mit Ammonium-Molybdat etabliert. Ein erster Versuch zeigte überraschenderweise, dass AtPHT1.4 exprimierende Oozyten in den ersten 5 min weniger Phosphat aufnahmen als Kontroll-Oozyten. Um dieses Ergebnis zu validieren sind jedoch noch weitere Aufnahme-Experimente nötig, in denen z. B. unterschiedliche Phosphatkonzentrationen im Medium getestet werden.

Des Weiteren sind wir daran interessiert, die Expression der pflanzlichen Metabolitransporter in den Oozyten auf Protein-Ebene nachzuweisen. Für diesen Ansatz sollten AtPHT1.4, AtGLR3.7 und AtIRT1 Proteine, welche alle mit einem Strep-Tag versehen wurden, exprimiert werden. Nach Isolation sollte die Präsenz der Proteine mittels Anti-Strep-Tag Antikörper in einem Western Blot nachgewiesen werden. Der erste Versuch zeigte jedoch zu starke unspezifische Bindungen des Antikörpers. Dieser Ansatz muss noch optimiert werden und auch andere Antikörper sollen getestet werden.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- Wiederholung einiger Säulenversuche zu RefeSol-01A und -04A mit geändertem Versuchsaufbau
- Zugabe von Tracer (Tc-99, I-125, Pu-238 und Am-243) zu den Lysimeterversuchen
- Fortführung Methodenentwicklung für SIMS/LA-MS-Messungen (versch. Pflanzenteile)
- Weitere Untersuchung zur Aufnahme und Wechselwirkung von Cm und Am mit AtGLR3.7 in Oozyten, Aufnahme von Tc durch AtPHT1.4
- Untersuchung der Kinetik der Aufnahme von Phosphat durch AtPHT1.4-exprimierende Oozyten
- Entwicklung einer Expressionskontrolle pflanzlicher Metabolitransporter in Oozyten mit HA-getagten Proteinen sowie spezifischen Antikörpern gegen AtPHT1.4 sowie AtIRT1

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Annika Klose: Ortsaufgelöste Analyse von Pu-, Am-, Tc-getracerten Wurzelschnitten mittels TOF-SIMS und Laser-SNMS (Masterarbeit)

<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 28.02.2021		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<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 zum Vergleich der Freisetzung von Metaboliten aus Suspensionszellkulturen und Pflanzen nach U(VI) Exposition wurden fortgeführt. Junge Rapspflanzen (*Brassica napus*) wurden aus Samen in Hydrokultur herangezogen und mit U(VI) exponiert. Mittels HPLC wurden erste Metaboliten in den Hydrokulturlösungen detektiert. Die Identifizierung steht noch aus. Die U(VI) Speziation in den Hydrokulturlösungen wird mittels zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS) untersucht. Zur Charakterisierung der Speziation von bioassoziiertem Eu(III) an/in *Daucus carota*-Zellen wurden TRLFS-Messungen durchgeführt. Es wurden 11 Modellverbindungen mittels TRLFS auf ihre Eu(III) Speziation untersucht. Die  $^{7}F_0$ -Anregungsspektren der Pflanzenzellen wurden mittels Linearkombination mit den Modellen angepasst. Das Eu(III)-*D. carota*-Zellspektrum kann mit Malonsäure (72 %), Zitronensäure (13 %) und Phosphoenolpyruvat (12 %) beschrieben werden.

- AP2/AP3: Es wurden Proteom-Analysen von BY-2-Zellen (*Nicotiana tabacum*) durchgeführt, die in Gegenwart von Phosphat bzw. unter Phosphatmangelbedingungen mit 20  $\mu\text{M}$  U(VI) exponiert wurden. Die Analyse zeigte unterschiedlich exprimierte Proteine, die auf zellulären Stress, Metallhomöostase, antioxidierende Systeme und Transporter zurückzuführen sind. Zusätzlich wurden kontextspezifische Daten in Form von Zellwachstumsprofilen, Zellviabilitäten und Zellkonzentrationen an Mikro- und Makroelementen in Gegenwart von U(VI) bestimmt. Diese Untersuchungen dienen der Identifizierung potentieller Prozesse bei der Aufnahme von U(VI) in Pflanzenzellen.
- AP4: Kürzlich begonnene fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen geben erste Hinweise zur Aufnahme von U(VI) in BY-2-Zellen mittels Endozytose. In einem ersten Experiment konnte eine Co-Lokalisierung der Fluoreszenz des Plasmamembran-Farbstoffs FM4-64 mit der Fluoreszenz von U(VI) beobachtet werden. Diese mikroskopischen Untersuchungen unterstützen frühere experimentelle Befunde, bei denen eine verringerte U(VI)-Aufnahme in BY-2-Zellen nach deren Behandlung mit Wortmannin (Endozytoseinhibitor) detektiert wurde. Im Zuge der Lysimeter-Beprobung der Universität Jena, wurden Boden- und Flüssigproben entnommen, die durch das HZDR zur Isolation der DNA und deren anschließender Sequenzierung verwendet wurden. Von den 11 Flüssigproben konnte die DNA nicht in ausreichender Menge und Reinheit dargestellt werden, so dass keine Sequenzierung möglich war. Aus den vier Bodenproben (Refesol 03G, 01A, 02A und 04A) konnte erfolgreich DNA isoliert und gereinigt werden. Die Proben wurden durch die Firma RTL Genomics (Texas, USA) sequenziert (Auswertung noch ausstehend). Die Daten geben Aufschluss über die mikrobielle Population in den einzelnen Bodenproben und können zur Interpretation möglicher geochemischer Beobachtungen, die in den jeweiligen Zonen der Lysimeter gemacht worden sind (Bildung/Verbrauch von Metaboliten, z. B. organischen Säuren und Gasen, Veränderungen im Redoxpotential und pH-Wert), herangezogen werden.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Die Identifizierung von Pflanzenmetaboliten in Hydrokulturlösungen soll mittels HPLC, NMR und Massenspektrometrie erfolgen. Röntgenabsorptionsspektroskopische Untersuchungen (ROBL, ESRF) zur Bestimmung des Oxidationszustandes sowie der chemischen Umgebung von bioassoziiertem U an/in *B. napus* Zellen sind geplant. Fortsetzung der TRLFS-Messungen zur Bestimmung der Eu(III)/Cm(III)/U(VI)-Speziation in Gegenwart von Pflanzenzellen und Pflanzen
- AP2/AP3: Überarbeitung der experimentellen Methodik zur Gewinnung von Membranproteinen, um größere Proteinmengen für die Proteom-Analyse zu erhalten. Die Durchführung einer vertieften Proteom-Studie ist geplant.
- AP4: Mikroskopischer Nachweis der U(VI)-Aufnahme und -Verteilung in Pflanzenzellen (Fluoreszenzmikroskopie, TEM). Verifizierung der Aufnahme von U(VI) in Pflanzenzellen mittels Endozytose durch Wiederholung der FM4-64-Färbung sowie durch Inhibierung Clathrin-vermittelter Endozytose mittels Wortmannin. Auswertung der erhaltenen Sequenzierdaten der Bodenproben sowie weitere DNA-Isolation und Sequenzierung aus Lysimeter-Proben der Universität Hannover

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

- Moll, H., Sachs, S., Geipel, G.: Plant cell (*Brassica napus*) response to europium(III) and uranium(VI) exposure. Environ. Sci. Pollut. Res. (2020), doi: 10.1007/s11356-020-09525-2
- Lückel, B.: Interaktionen von BY-2 Zellen mit dem Radionuklid Uran(VI). TU Dresden, 2020 (Praktikumsbericht)

<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 31.12.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<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 Risikoabschätzung 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
- AP1.1.2a: 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: Bodenanalytik der Referenzbodentypen befindet sich für die Quantifizierung der mineralogischen Zusammensetzung auf dem Stand des letzten Berichtszeitraumes. Die Probenvorbereitung für die Analytik der spezifischen Oberfläche wurde durchgeführt.

- AP2: Status: Die Einbindung der Hysterese in das Comsol-Modell gestaltet sich als schwierig und es werden momentan Alternativen zum Hysterese-Modell recherchiert, wie zum Beispiel das Grenzflächenmodell (Zhuang et al. 2017). Da die Lysimeter-Experimente in der Klimakammer momentan noch keine Grundwasserschwankungen vorsehen, ist dies für den Vergleich Experiment – Modell noch nicht kritisch. In Bezug auf die Modellierung der Mikrobiologie wurde sich zunächst für die Umsetzung durch ein klassisches Monod-Modell entschieden. Die Parameterunsicherheiten werden im Rahmen des Konsortiums diskutiert. Die prognostizierende Modellierung der eingesetzten Tracer im Lysimeter wurde durchgeführt und die Experimente und die Porenwasserprobenahme dahingehend optimiert. Auf Basis der bisherigen hydrogeochemischen Charakterisierung der RefeSol Systeme konnte ein Modell für erste Simulationen in Hp1 nahezu vollständig erstellt werden.
- AP3: Status: Die Einstellung eines „dynamischen hydrochemischen Gleichgewichts“ der vier RefeSol-Porenwässer wurde anhand physikochemischer Parameter und der deutlichen und stabilen Ausprägung von Redoxgradienten (mittels VisiSens-System) nach ca. einem Jahr Experimentdauer definiert. Jedoch muss festgehalten werden, dass sich das System nach wie vor in einem transienten Zustand befindet. Das VisiSens-System ermöglichte die genaue Lokalisierung von Redox-Grenzflächen, die von Eh-Unterschieden von mehreren hundert mV geprägt sind und deren Mächtighkeitsbestimmung im Sub-Milimeterbereich liegt. Das im vorherigen Bericht angesprochene Protokoll zur ausführlichen Charakterisierung der Porenwässer wurde umgesetzt. Hierbei zeigte sich z. B. eine deutliche Differenzierung zwischen assoziierten Spurenmetallen in der Ausschlussgröße kleiner und größer 3kDa. Der Hauptanteil von Spurenmetallkonzentrationen befand sich in der Fraktion < 3kDa. Eine mit der NTA messbare Zunahme von kolloidalen Phasen war positiv mit einer Konzentrationserhöhung von Fe-Spezies in der Fraktion >3kDa korreliert. Weiterhin waren Fe-Konzentrationen z. B. positiv mit DOC Gehalten korreliert, was für einen kolloidalen Stabilisierungsmechanismus sprechen könnte. Porenwasserproben für AMS Messungen wurden vorbereitet, jedoch zunächst aufgrund der begrenzt messbaren Gesamtprobenzahl zurückgestellt. Bromid-Tracerexperimente sowie die gleichzeitige Injektion von Se-Spezies und Radionuklid-Homologen (Eu, Hf) wurde begonnen. Die injizierte Menge wurde aller zwei bis drei Tage überwacht und bestmöglich an Evaporationsbedingungen der Klimakammer angepasst. Probenahmen zur Erfassung der Durchbruchkurven werden im zwei- bis dreiwöchigen Maßstab durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte wie für vergangene Probenahmen für nasschemische und Kolloid-Analytik (ICP-MS/OES, IC, NTA, DOC). Bei RefeSol 03G konnten weiterhin nur lückenhaft Proben entnommen werden, was v. a. die obere Entnahmetiefe betrifft. Die methodische Weiterentwicklung der (fluo)-NTA konnte aufgrund der verzögerten Lieferzeiten von Referenzmaterialien nicht wie gewünscht vorangebracht werden.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Die Ziele des AP sind auf dem Stand des letzten Berichtszeitraumes, die Analyse der spezifischen Oberfläche zur Komplettierung der Charakterisierung der Referenzmaterialien wird durchgeführt.
- AP2: Durchführung von ersten Simulationen in Hp1 nach der vollendeten hydrogeochemischen Charakterisierung des RefeSol 01-A Systems. Vergleich der Ergebnisse Experiment-Modellierung sowie Verfeinerung der erforderlichen Parameter und Übertragung des Modells auf andere Bodensysteme.
- AP3: Überwachung von Zielelementen sowie die regelmäßigen Probenahmen werden im nächsten Berichtszeitraum fortgeführt. Nach der hydrogeochemischen Erfassung der Durchbruchkurven wird ein analoges Protokoll zur Charakterisierung der Porenwässer wie im vergangenen Berichtszeitraum umgesetzt, um die potenzielle Verteilung der Zielelemente in diversen Fraktionen zu untersuchen. „Post-mortem“ Analysen der Festphasen der einzelnen RefeSol-Substrate werden geplant. Die weitere Durchführung der Methodenentwicklung entspricht den Vorhaben aus den vergangenen Berichtszeiträumen.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Sarius, V. (2020): Multi-method characterization of equilibrium pore waters of different soil substrates from mesoscale laboratory lysimeters. Projektmodul, Friedrich-Schiller-Universität Jena

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universität Bremen, Bibliothekstr. 1, 28359 Bremen		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 051D</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 D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.09.2017 bis 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 256.465,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Günther	

## 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 wurden im Batchprogramm „KdMultigrid“, mit dessen Hilfe die fünfdimensionalen  $K_d$ -Matrizen (nach dem Vorbild des sog. „Smart- $K_d$ “-Konzepts, siehe Stockmann et al., 2017) berechnet werden, Fehler beseitigt und neue Funktionalitäten eingeführt, z. B. die Möglichkeit, verschiedene Parameter gleichzeitig zu variieren. So kann beispielsweise die Abhängigkeit des  $K_d$  von der Ionenstärke (Variationen durch Verdunstung und Verdünnung der Bodenlösung) abgeschätzt werden. Für Pu, Am und Tc wurden die ersten  $K_d$ -Matrizen erstellt.

Das Modell wurde durch eine Sorptionskomponente an Illit ergänzt und mit Hilfe einer Literaturstudie wurde das Gesamtmodell für Se validiert.

Es wurden für Tc und Se Einzelparametervariationen durchgeführt, auch unter verschiedenen Redoxbedingungen. Die relevantesten Parameter für Tc sind in diesem Modell die Kombination  $p_e$ /pH, DOC und OC-Gehalt. Letztere sind auch die wichtigsten sorbierenden Phasen. Für Se sind die wichtigsten Parameter pH und Phosphatgehalt sowie Redoxzustand für  $p_e < 3$  und  $p_e > 8$ . Die relevanten Festphasen sind in erster Linie Sesquioxide. Für die Interaktion mit organischer Substanz existiert in der Literatur zurzeit noch kein thermodynamisches Modell.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Folgende Arbeiten sind für den nächsten Berichtszeitraum geplant:

- Entwicklung eines Gleichgewichtsmodells für Iod, mit dem entsprechende  $K_d$ -Matrizen erstellt werden können
- Überprüfung und ggf. Modifizierung des bisher entwickelten geochemischen Modells anhand der experimentellen Daten der Projektpartner
- Berechnung weiterer  $K_d$ -Matrizen

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Auf dem internationalen Workshop “How to integrate geochemistry at affordable costs into reactive transport for large-scale systems” vom 5. – 7. Februar 2020 am Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf wurde ein Vortrag mit dem Titel “Estimation of Radionuclide Partitioning in Agricultural Soils - Calculation of  $K_d$  for Various Parameter Combinations“ gehalten.

Eine bereits angenommene „oral presentation“ auf der ICRER-Konferenz im April 2020 konnte nicht gehalten werden, da die Veranstaltung abgesagt wurde.

Zurzeit wird ein Artikel über die Validierung und Sensitivitätsanalyse der Modelle für Am, Pu und Se verfasst, der in einer Fachzeitschrift zur Veröffentlichung eingereicht werden soll.

<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 31.12.2020		<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<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 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

- 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 Klima-Zustände (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: Die Arbeiten zu AP1.1.2b, AP1.2.1, AP1.3.1, AP1.3.2, AP1.4.1 sind abgeschlossen.
- AP1.5.1: Dient dem Austausch der Projektpartner. Letztes Meeting zum Austausch der Projektpartner mit Fokus Modellierung und Experimentanpassungen konnte in Jena am 5.3./6.3. stattfinden (FSU-AnGeo/ÖI/UB-IUP). Die aufgrund der COVID-19-Pandemie verhängten Zugangsbeschränkungen für die Gebäude haben zu Verzögerungen im Experimentablauf und Messwerterfassung geführt, weitere Absprachen konnten nicht wie geplant durchgeführt werden.
- AP2.1.2: Der Aufbau der Datenbank der bodenhydrologischen und transportrelevanten Parameter konnte aufgrund der Verzögerungen der Bodenexperimente (AnGeo/LUH-IRS) nicht nach Plan fortgesetzt werden, dies betrifft auch die Parameter des Transfers Boden-Wurzelzone Pflanze (AP4.4 - LUH-IRS/HZDR/LUH-IfB). Der zentrale Parameter -  $K_d$ -Wert (pH/pe Abhängigkeiten) - konnte in den ECOLEGO-Ansatz nicht entsprechend implementiert werden (siehe auch AP2.5.2b).
- AP2.4.1b: Ist abgeschlossen. Die Kooperation FS-AnGeo/ÖI wird im AP2.5.2b fortgesetzt.
- AP2.5.2b: Die Programmierarbeiten konnten mit Einschränkungen fortgesetzt werden, auch aufgrund der Ausfälle der Mitarbeiter wegen fehlender Kinderbetreuung. Die Wasserbewegung im kapillaren Saum und die Transportberechnungen im ein- und Mehrschichtmodell (ECOLEGO) sind nicht finalisiert. Die großskalige Darstellung (Aufskalierung) mit der 1D-Richards-Gleichung bzw. der 1-D Konvektions-Dispersions-Gleichung (Finite Volumen Methode) befindet sich in einer Testphase. Die Unterstellung der Klimabedingungen der Bodengenese (AP1.3.1, 1.3.2) in Form von Niederschlagsmengen und Evapotranspiration wurde zum Teil implementiert. Der Ansatz zur Wechselwirkung Gravitations-/Kapillarwasser und wie dadurch der Transport beeinflusst wird kann erst nach der vollumfänglichen Umsetzung der Experimente bewertet werden. Die von UB-IUP bislang ermittelten  $K_d$ -Werte und pH/pe Abhängigkeiten (Smart- $K_d$ ) konnten in der ECOLEGO-Parametrisierung probeweise zum Teil angepasst und berücksichtigt werden (AP2.1.2). Die Abstimmung zu den Zwischenergebnissen (FS-AnGeo/Öko-Institut) zur Bewertung des Einflusses der unterschiedlichen Parametrisierung sowie der Vereinfachung der Darstellung der Retentionskurve konnte geringfügig fortgesetzt werden. Die Implementierung der Verteilungsfunktionen der Parameterwerte im Modul „Monte-Carlo“ ist in der Testphase (AP2.1.2). Das Tool zur Berechnung der Langzeitreihen von Biosphere Dose Conversion factors (BDCF) mit der Implementierung des Bodenmodells in das Expositionsmodell wird entwickelt.
- AP4.4: Der konzeptuelle Ansatz zum Kompartimentmodell der pflanzlichen Systeme in ECOLEGO konnte mit LUH-IfB und HZDR aufgrund der Verzögerung bei Experimenten und somit Ausfällen der Ergebnisse nur eingeschränkt abgestimmt werden. Dadurch ist die geplante Implementierung in ECOLEGO nicht wie geplant umgesetzt worden, welche auf den Wurzel-Boden Bereich fokussiert.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1.5.1: Verschiebung der Absprachen mit Projektpartnern über den 31.08.2020 hinaus.
- AP2.1.2: Fortsetzung des Aufbaus der Datenbank mit Parametern zur Bodenhydrologie je nach Fortsetzung der Experimente.
- AP2.5.2b: Die Arbeiten zum Aufbau der Modelltools in ECOLEGO im Austausch mit FS-AnGeo und UB-IUP werden nach Möglichkeit über 31.08.2020 hinaus fortgesetzt.
- AP4.4: Fortsetzung Modelkonzept ECOLEGO, Austausch mit LUH-IfB und HZDR-IRE zu deren Experimentaufbau und –Ergebnissen. Konsultationen mit Fa Facilia (ÅF) zu Software ECOLEGO: Zurzeit deutlich eingeschränkt, wird im August und darüber hinaus intensiviert.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

International Workshop on How to integrate geochemistry at affordable costs into reactive transport for large-scale systems” des HZDR Dresden (5.-7. Februar 2020): Posterpräsentation “Up-scaling in Radioecology: The Up-scaling of Transport Phenomena in Groundwater and Soil as a Basis for Long-Term Considerations within Radioecological Modeling”

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Str., 52428 Jülich		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 053A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalen- übergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2018 bis 31.03.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 631.302,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Bosbach	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Mit dem – komplementär aus Mitteln des BMBF und der HGF geförderten – multidisziplinären Vorhaben iCross sollen wissenschaftliche Grundlagen für die Beantwortung dringender Fragen und Herausforderungen im Zusammenhang mit der sicheren Entsorgung radioaktiver Abfälle geschaffen werden. Wesentliches Ziel dabei ist die Entwicklung eines umfassenden Prozessverständnisses auf Basis fortschrittlicher Experimente im Labormaßstab sowie in Untertagelaboren, um Unsicherheiten quantifizieren zu können und wesentliche Prozesse inkl. ihrer Kopplungen zu beschreiben und relevante Prozessparameter zu identifizieren. Diese Prozesse und Prozessparameter sollen in innovative Simulations- und Modellprogramme implementiert werden, um verlässliche und realitätsnähere Vorhersagen für die Entwicklung eines Endlagersystems vornehmen zu können. Das Vorhaben soll dabei u. a. auch die wissenschaftlichen Grundlagen für einen kriterien-basierten Vergleich verschiedener Endlagersysteme in unterschiedlichen Wirtsgesteinsformationen sowie unterschiedlichen Standortregionen liefern.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Vorhaben gliedert sich in 4 Arbeitspakete (AP):

- AP1: Laborexperimente: Charakterisierung von Probenmaterial aus der sandigen Fazies des Opalinuston und Durchführung von Diffusionsexperimenten mit HTO und Ra-226.
- AP2: Feldexperimente in URLs: Analyse des Einflusses makroskopischer Heterogenitäten und von Temperatureffekten auf Radionuklidmigration und Nahfeldgeochemie.
- AP3: Simulation: Entwicklung mathematisch und physikalisch konsistenter Beschreibungen gekoppelter Prozesse sowie modellbasierte Analyse von Effekten von Heterogenitäten.
- AP4: Integration: Wissenschaftlich/technische Koordination des Vorhabens; Integration der Ergebnisse.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Weiterführung der mineralogisch/geochemischen und mikrostrukturellen Charakterisierung von Proben aus der sandigen Fazies des Opalinustons (OPA) aus dem Untertage-labor Mont Terri (u. a. mittels XRD, SEM/EDX und  $\mu$ XCT) sowie weitere Untersuchungen der Sorptionseigenschaften bzgl.  $^{226}\text{Ra}$  (Kinetik, Isothermen). Abschluss der Vorbereitungsarbeiten zur Durchführung der HTO-Durchdiffusionsexperimente.
- AP2: Teilnahme am Mont Terri Technical Meeting TM-38; Weiterführung der Planungsarbeiten zum DR-C Experiment; erste Abstimmungen zum Modellierungstasks im Rahmen des CI-D Experiments; Beginn von Planungen zum vom KIT initiierten DR-D Experiment ("Heterogeneity of sandy facies by geophysical characterization and diffusion studies").
- AP3: Evaluierung des Einflusses von hydraulischen Heterogenitäten auf Lösungs-/Fällungsprozesse in porösen und geklüfteten Medien; Adaption eines "Bottom-up" Ansatzes zur Modellierung der  $^{226}\text{Ra}$ -Sorption in der sandigen OPA-Fazies; Durchführung von orientierenden Modellrechnungen zum Einfluss der elektrischen Doppelschicht (EDL) auf den reaktiven Stofftransport in nanoskaligen Medien auf dem Porenmaßstab.
- AP4: Weitere Abstimmung mit den iCross-Partnern bzgl. der Durchführung von koordinierten und kohärenten "Proof-of-concept" Studien zu den Themen "Radionuclide and gas transport across an evolving near field" und "Heterogeneity across scales".

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Im 2. Halbjahr 2020 sollen im Rahmen des AP1 die Arbeiten zur Charakterisierung von Proben aus der sandigen OPA Fazies fortgesetzt werden und die HTO Durchdiffusionsexperimente durchgeführt werden. Zudem sollen (in Zusammenarbeit mit dem PSI) die Methodentwicklung für die "in-diffusion" Experimente mit  $^{226}\text{Ra}$  abgeschlossen und die entsprechenden Versuche gestartet werden.

In AP2 sind weitere Planungsarbeiten bzgl. der Experimente DR-C und DR-D sowie der Beginn der Arbeiten zum Modellierungstask im Rahmen des CI-D Experiments vorgesehen. Im Rahmen von AP3 ist die Weiterführung der Arbeiten zur Integration realitätsnäherer Prozesskopplungen und zur Berücksichtigung des Einflusses der EDL in reaktive Stofftransportmodelle auf dem Kontinuums- und Porenmaßstab geplant. Des Weiteren sollen die Arbeiten zu den Benchmarkstudien und den "Proof-of-concept" Studien weitergeführt werden (AP4).

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Poonoosamy, J., Haber-Pohlmeier, S., Deng, H., Klinkenberg, M., Deissmann, G., Gizatullin, B., Stapf, S., Brandt, F., Bosbach, D., Pohlmeier, A. 2020: Combination of MRI and SEM to assess changes in chemical properties and permeability of porous media due to barite precipitation. *Minerals* 10, 226. <https://doi.org/10.3390/min10030226>

Trincherro, P., Cvetkovic, V., Selroos, J.O., Bosbach, D., Deissmann, G. 2020: Upscaling of radionuclide transport and retention in crystalline rocks exhibiting micro-scale heterogeneity of the rock matrix. *Adv. Water Res.* 142, 103644

Poonoosamy, J., Soullaine, C., Burmeister, A., Deissmann, G., Bosbach, D., Roman, S. 2020: Microfluidic flow-through reactor and 3D Raman imaging for in situ assessment of mineral reactivity in porous and fractured porous media. *Lab Chip* <https://doi.org/10.1039/D0LC00360C>

3 Tagungsbeiträge (Mont Terri Annual Technical Meeting TM-38, EGU General Assembly 2020, Goldschmidt 2020)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V.; Bautzner Landstr. 400, 01328 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 053B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalen- übergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2018 bis 30.06.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 502.109,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Stumpf	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das interdisziplinäre Vorhaben "iCross" bündelt F+E Expertisen in der Helmholtz Gemeinschaft zu den Themen Nuklear-, Geo-, Biowissenschaften sowie Umweltsimulationen in einem forschungsbereichsübergreifenden Projekt. Dabei werden bislang nicht vollständig verstandene Prozesse von der molekularen Ebene bis zur regionalen Skala untersucht, bewertet und beschrieben. Ziel ist es, gezielt Laborexperimente zu planen und durchzuführen, Parameter abzuleiten, und relevante Abläufe skalenübergreifend mit fortgeschrittenen Simulationen zu beschreiben ("Upscaling"). Die Validierung der Simulationen erfolgt experimentell, teils in Untertagelabors (URL). Die Arbeiten konzentrieren sich auf Wirtsgesteine (Kristalline und Ton), die in der Vergangenheit nicht im Fokus der deutschen Endlagerforschung standen.

Das Projekt wird im Rahmen eines Verbundvorhabens mit dem FZJ, KIT, UFZ und GZF durchgeführt.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Vorhaben gliedert sich in Arbeitspakete:

- AP1: Laborexperimente
- AP2: Feldexperimente in URLs
- AP3: Modellentwicklung, Simulation
- AP4: Integration

Der Verbundprojektpartner HZDR liefert im Rahmen der Förderung Beiträge zu den Arbeitspaketen AP1 und AP3.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1: Untersuchungen zur Sorption von Eu(III) und Cm(III) an Graniten: Durchführung von örtlich aufgelösten Interferometrie-, Autoradiografie-, Raman- und  $\mu$ TRLFS-Messungen an Granitdünnschliffen (Eibenstock Sachsen und Aspö Schweden) beladen mit Eu(III) und Cm(III).

Computertomografische Analyse von OPA-SF-Proben für Petrografie und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen, Fokus auf Auswahl von Kompositionsunterschieden (Schichtsilikat-, Karbonat-, Sulfidkonzentrations-unterschiede). Rasterelektronenmikroskopische Analysen zur Morphologie, Menge und Heterogenität der Verteilung von Calcit. Auswahl von Probenabschnitten für FIB-SEM-Analytik.

AP3: Validierung des neuentwickelten SCM-Ansatzes auf Basis weiterer nanotopografischer Daten und neuer statistischer Rauheitsauswertung. Test von reaktiven Transportmodellen bzgl. des Einflusses der Mikrotopografie auf Sättigungsgradienten bei Karbonatauflösung.

Implementierung des Smart- $K_d$ -Konzeptes in OpenGeoSys (OGS) basierend auf 2D-Testfall und Verifizierung der Ergebnisse vergleichend zur direkten Kopplung OGS-PHREEQC.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP1: Vergleich der Ergebnisse der Sorption an verschiedenen Graniten sowie Vergleich der Sorption von Eu(III) und Cm(III).

Diffusionsexperimente mit PET-Analytik zur Untersuchung der Heterogenität der Fluidausbreitung unter niedrigpermeablen Bedingungen in OPA-SF unter Berücksichtigung neu aufgesättigten Probenmaterials.

AP3: Entwicklung eines reaktiven Transportmodelles auf der Poren-/ Korngrenzenskala der OPA-SF. Implementierung von SCM/ MC und des diffusionskontrollierten Transports. Validierung mit experimentellen Daten.

Überarbeitung Benchmark für OGS-Simulationen sowie Zuarbeit für UFZ. Benchmark-Buch, dazu regelmäßige Arbeitstreffen mit Projektpartner UFZ. Durchführung weiterer Arbeitstreffen mit Projektpartner GFZ zur Weiterentwicklung deren konzeptuellen Modelles.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

T. Bollermann, C. Fischer: Temporal evolution of dissolution kinetics of polycrystalline calcite, *Am. J. Sci.* 320 (1) 53-71 (2020). <https://doi.org/10.2475/01.2020.04>

W.-A. Kahl, T. Yuan, T. Bollermann, W. Bach, C. Fischer: Crystal surface reactivity analysis using a combined approach of X-ray micro-computed tomography and vertical scanning interferometry, *Am. J. Sci.* 320 (1) 27-52 (2020). <https://doi.org/10.2475/01.2020.03>

<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 053C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2018 bis 30.06.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 540.067,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Geckeis	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das interdisziplinäre Vorhaben „iCross“ bündelt F+E Expertisen in der Helmholtz Gemeinschaft zu den Themen Nuklear-, Geo-, Biowissenschaften sowie Umweltsimulationen in einem forschungsbereichsübergreifenden Projekt. Dabei werden bislang nicht vollständig verstandene Prozesse von der molekularen Ebene bis zur regionalen Skala untersucht, bewertet und beschrieben. Ziel ist es, gezielt Laborexperimente zu planen und durchzuführen, Parameter abzuleiten, und relevante Abläufe skalenübergreifend mit fortgeschrittenen Simulationen zu beschreiben ("Upscaling"). Die Validierung der Simulationen erfolgt experimentell, teils in Untertagelabors (URL). Schwerpunkt der Arbeiten in URLs liegt auf Mt. Terri (Tonstein), wo derzeit mit starker deutscher Beteiligung ein neuer Experimentaltunnel entsteht. Weitere Beteiligungen an Experimenten im Grimsel Felslabor (Kristallingestein) sind vorgesehen. Die Arbeiten konzentrieren sich damit auf Wirtsgesteine, die in der Vergangenheit nicht im Fokus der deutschen Endlagerforschung standen. Ein weiterer Fokus liegt auf der Einbindung und Vernetzung junger Wissenschaftler/innen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Die Arbeiten von KIT-INE im Rahmen von iCross gliedern sich in folgende Arbeitspakete:

- AP1: Laborexperimente: Diffusion und Grenzflächenprozesse
- AP2: In-situ-Experimente Untertagelabor
- AP3: Reaktive Transport Modellierung
- AP4: Koordination und Integration der Projektergebnisse

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Abholung sandiger Opalinustonproben zusammen mit HZDR (BCL-1, unter Inertgas gebohrt und gelagert); Literaturrecherche und Entwicklung des experimentellen Setups zum REV-Diffusionsexperiment. Äquilibrierung der Diffusionsproben und Initialisierung eines Diffusionsversuchs mit  $^{243}\text{Am(III)}$  und  $^{233}\text{U(VI)}$  in Opalinuston (tonige Fazies). Beginn der Doktorarbeit von Florian Steegborn. Zusammenfassung der Opalinuston Charakterisierung und Start von Sorptionsversuchen mit  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  und  $^{152}\text{Eu}$ .
- AP2: Teilnahme am Mont Terri Technical Meeting-38 in Porrentruy; beim Mont Terri DR-C-Experiment (Diffusion in a thermal gradient) wurden neue Partner (Andra, ENSI) hinzugewonnen; ein neues Mont Terri Diffusionsexperiment DR-D (Heterogeneity of sandy facies by geophysical characterization and diffusion studies) wurde beantragt und genehmigt, dazu wurden neben KIT-INE als Partner GFZ, FZJ, HZDR, BGR und BGE gewonnen, es fand ein erstes Kick-off-Meeting aller Partner im Juni statt.
- AP3: Der reaktive Transport der Kanister-Bentonit-Wechselwirkung wird über 10.000 Jahre modelliert. Einführung von Fehlstellen in das Montmorillonit Modell zur Bestimmung des Einflusses auf Diffusion und Komplexierung auf atomarer Ebene.
- AP4: Weiterbearbeitung der „Proof-of Concept“-Beschreibungen. Planung eines AP4-Arbeitstreffens. Planung eines großen Workshops/Konferenz (TransRet2020) zu iCross-verwandten Themen im Oktober.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Charakterisierung der Mineralogie von Opalinuston-Diffusionsproben (BAD-1, BCL-1) mittels SEM-EDX, Raman-Spektroskopie, XRD + Rietveld, ICP-MS, XRF; Durchführung von Durchdiffusionsversuchen mit HTO und  $^{36}\text{Cl}$ - zur Bestimmung von Transportparametern, auch hinsichtlich des REV; Autoradiographie zur Bestimmung präferierter Transportpfade. Beendigung des Diffusionsversuchs mit  $^{243}\text{Am(III)}$  und  $^{233}\text{U(VI)}$  in Opalinuston (tonige Fazies); Diffusionsprofilermittlung mittels abrasiven Abtragens; Nuklidgehaltbestimmung mittels ICP-MS und AMS (Beschleunigermassenspektrometrie). Auswertung der Sorptionsversuche und neue Sorptionsansätze mit intakten Opalinustonoberflächen. Weitere Charakterisierung der Heterogenität der sandigen Fazies des Opalinustons.
- AP2: DR-C: Kapitelbeitrag zur Technical Note zum DR-C Test Plan; DR-D: Abstimmung von DR-C und DR-D bezüglich Versuchsort; Literaturrecherche zur Porenwassergewinnung; detaillierte Planung der seismischen Charakterisierung mit swisstopo, GFZ und BGR.
- AP3: Der reaktive Transport zur Endlagerentwicklung eines generischen Endlagernahfelds im Tongestein wird modelliert. Fertigstellung und Sammlung der atomistischen Simulationsergebnisse und Publikation der Rechnungen zum Illit-System.
- AP4: AP4-Arbeitstreffen und TransRet2020 Workshop.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Vorträge:

J. M. Soler, L. Fernández-Rojo, M. C. Chaparro, I. Queralt, S. Galí, J. Cama: Flow and reaction along the cement-rock interface during  $\text{CO}_2$  injection. Laboratory experiments and modeling, EGU 2020, 4-8 May 2020, Online

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz-Zentrum Potsdam Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ, Telegrafenberg, 14473 Potsdam		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 053D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalen- übergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt D		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2018 bis 30.06.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.279.364,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Kühn	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das interdisziplinäre Vorhaben „iCross“ bündelt F+E Expertisen in der Helmholtz Gemeinschaft zu den Themen Nuklear-, Geo-, Biowissenschaften sowie Umweltsimulationen in einem forschungsbereichsübergreifenden Projekt. Dabei werden bislang nicht vollständig verstandene Prozesse von der molekularen Ebene bis zur regionalen Skala untersucht, bewertet und beschrieben. Ziel ist es, gezielt Laborexperimente zu planen und durchzuführen, Parameter abzuleiten, und relevante Abläufe skalenübergreifend mit fortgeschrittenen Simulationsmethoden zu beschreiben ("Upscaling"). Die Validierung der Simulationen erfolgt experimentell, teils in Untertagelabors (URL). Schwerpunkt der Arbeiten in URLs liegt auf Mont Terri (Tonstein), wo derzeit mit starker deutscher Beteiligung ein neuer Experimentaltunnel entsteht. Weitere Beteiligungen an Experimenten im Grimsel Felslabor (Kristallingestein) sind vorgesehen. Die Arbeiten konzentrieren sich damit auf Wirtsgesteine, die in der Vergangenheit nicht im Fokus der deutschen Endlagerforschung standen.

Verbundpartner des iCross-Projektes sind die folgenden Helmholtz-Zentren:

- Forschungszentrum Jülich GmbH (FZJ)
- Helmholtz-Zentrum Potsdam Deutsches GeoForschungsZentrum (GFZ)
- Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (HZDR)
- Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
- Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH (UFZ)

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Gesamtvorhaben iCross ist in folgende vier Arbeitspakete (AP) untergliedert:

- AP1: Laborexperimente
- AP2: Experimente in Untertagelaboren
- AP3: Modellierungen und Simulationen zum Prozessverständnis und der Systemanalyse
- AP4: Integration

Im Rahmen des BMBF-Vorhabens erfolgen vom GFZ Beiträge in folgenden Arbeitspaketen:

- AP1 - Aufgabe 1.4: Temperatureffekte auf geomechanische Prozesse
- AP2 - Aufgabe 2.5: Seismische Erkundung, Charakterisierung und Überwachung
- AP4 - Aufgabe 4.3: Koordination der Experimente in Untertagelaboren

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

#### *Aufgabe 1.4: Temperatureffekte auf geomechanische Prozesse:*

Die bisher erzielten experimentellen Ergebnisse wurden ausgewertet und ein Manuskript zur Veröffentlichung in einem peer-reviewed Journal erarbeitet. Des Weiteren wurde Probenmaterial (Opalinus Ton der sandigen Fazies) mittels Röntgendiffrakometrie charakterisiert sowie auf kompositionelle Änderungen in Folge der Versuchsbedingungen untersucht. Dabei wurde keine nennenswerte Mineralumwandlung/-alteration durch eine Temperaturvariation zwischen 25 - 200 °C festgestellt. Zudem erfolgten Untersuchungen an Opalinus Ton zum triaxialen Deformationsverhalten mittels einer servohydraulischen Prüfmaschine. Erste verschiebungskontrollierte Deformationstests an Vollproben der sandigen Fazies parallel und senkrecht zur Schichtung dienten der Kalibrierung der Sensoren und Optimierung der Triggerschwellwerte.

#### *Aufgabe 2.5: Seismische Erkundung, Charakterisierung und Überwachung:*

Die Auswertung der im Januar 2019 durchgeführten seismischen Messungen wurden weitgehend abgeschlossen und in zwei Manuskripten zusammengefasst. In diesem Berichtszeitraum war die Wiederholung und Verdichtung der in 2019 durchgeführten Messungen vorgesehen, die jedoch aufgrund der Corona-Pandemie abgesagt werden mussten. Es ist geplant, diese Messungen im September 2020 nachzuholen. Die dafür notwendige Messinfrastruktur (Meilenstein M2.4) ist im Felslabor Mont Terri vorhanden.

#### *Aufgabe 4.3: Koordination der Experimente in Untertagelaboren:*

Im ersten Halbjahr 2020 fand das Technical Meeting im Felslabor Mont Terri statt, das eine wichtige Rolle bei der Planung der Experimente für die Phase 01.07.2020 bis 30.06.2021 spielt. Bei zwei Steering Meetings (02.04. und 14.05.2020) wurde der neue Versuchsplan erarbeitet und beschlossen. Das iCross-Konsortium ist an insgesamt zehn Experimenten beteiligt und leitet davon zwei. Das Untertagelabor war aufgrund der CORONA-Pandemie für einige Monate geschlossen. Dies hat umfangreiche zusätzliche Managementaufgaben notwendig gemacht.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

#### Aufgabe 1.4:

Neben der Auswertung der bisher durchgeführten Versuche zur Charakterisierung der anisotropen rheologischen Eigenschaften von Opalinus Ton sind weitere triaxiale Deformationsexperimente (MTS) geplant. Insbesondere sollen Experimente zur Untersuchung der seismischen, hydraulischen und mechanischen Eigenschaften von Zylinderproben mit künstlich hergestellten Störungen durchgeführt werden.

#### Aufgabe 2.5:

Im September 2020 wird eine seismische Wiederholungsmessung im Mont Terri durchgeführt, um die Wiederholbarkeit seismischer Messungen zu untersuchen, verbunden mit einer Verdichtung der Messpunkte im Bereich der tonigen Fazies des Opalinus-Tons. Eine weitere Messkampagne zur großräumigen Umfelderkundung im Mont Terri Felslabor mit einer Scherwellenquelle ist für den November 2020 geplant. Die Auswertungen werden sich auf die Wiederholbarkeit der Messungen sowie die detaillierte tomographische Abbildung (tonige Fazies, karbonatreiche sandige Fazies) konzentrieren.

#### Aufgabe 4.3:

Umsetzung der dritten Experimentierphase im Projekt iCross. Zusätzlich ist die Organisation und Umsetzung der durch CORONA verzögerten Arbeiten in Mont Terri nötig.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 053E</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt E		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Entsorgung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.07.2018 bis 31.03.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 740.139,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Kolditz	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Ziel des iCross-Vorhabens ist die Entwicklung einer experimentellen und numerischen Plattform für die Endlagerforschung, die ein verbessertes, skalenübergreifendes Prozessverständnis der thermo-hydro-mechanischen (THM) und chemisch-mikrobiologischen (CB) Vorgänge im Nah- und Fernfeld potenzieller Endlagerstandorte in verschiedenen Wirtsgesteinen gewährleistet. Die Projektarbeiten dienen wesentlich der Entwicklung und Validierung von Methoden zur Beschreibung des Systemverhaltens in verschiedenen, wechselwirkenden Kompartimenten eines Endlagersystems. Das BMBF-Vorhaben ist eng verknüpft mit einer Sondermaßnahme des Impuls- und Vernetzungsfonds der Helmholtz-Gemeinschaft (FKZ SO-093). Durch das multidisziplinäre Vorhaben werden die Forschungsaktivitäten des FZJ, KIT und HZDR im Bereich Radio-, Geo- und Biochemie (Helmholtz-Programm NUSAFE im Forschungsbereich Energie) mit der Expertise von UFZ und GFZ (Forschungsbereich Erde und Umwelt) in den Geowissenschaften und der Systemanalyse verknüpft.

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Das Gesamtvorhaben ist in vier interagierende Arbeitspakete strukturiert: Laborversuche (WP1), Experimente in Untertagelaboren (WP2), Modellierung und Simulation für Prozess- und Systemanalyse (WP3) sowie Integration/Synthese der Arbeiten und Ergebnisse (WP4).

Durch den Zuwendungsempfänger werden im Bereich der Simulation numerische Methoden zur Analyse von THM- und THC-Prozessen in untertägigen Gesteinen unter Berücksichtigung struktureller Diskontinuitäten und geochemischer Heterogenitäten entwickelt und in die wissenschaftliche Open-Source-Software OpenGeoSys (OGS) implementiert. Als Gesteine werden Ton und Kristallin mit dafür typischen Diskontinuitäten sowie Heterogenitäten unter Verwendung spezieller numerischer Ansätze betrachtet. Die biogeochemischen Randbedingungen der Metallkorrosion unter typischen Bedingungen eines möglichen Endlagers werden darüber hinaus in Laborexperimenten untersucht. Damit erarbeitet das UFZ spezifische Beiträge zu den Arbeitspaketen WP1, WP3-AP1 (Mehrphasenprozesse), WP3-AP2 (reaktive Transportprozesse), WP3-AP3 (stochastische FEM und Unsicherheitsanalyse) sowie WP4.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Im Berichtszeitraum wurden durch den Zuwendungsempfänger folgende Arbeiten durchgeführt und die nachfolgend aufgeführten wesentlichen Ergebnisse erzielt:

WP1: Mikrobiologie

- Mikrobielle Korrosion von Stahlcoupons mit dem korrosiven Stamm IM1-8 und Untersuchungen des während der Methanogenese gebildeten Methans und CO<sub>2</sub> auf stabile Isotopenfraktionierung (Stahl, Wasserstoff als Elektronendonatoren), Analyse des Genoms des korrosiven Stammes IM1-8
- Mikroanalytische Untersuchungen der von den Mikroben gebildeten Kruste mittels Rasterelektronenmikroskopie (SEM), Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDS), Heliumionenmikroskopie (HIM) und Raman-Mikrospektroskopie.
- Kooperation mit GFZ: Imaging des Stammes *S.bentonitica* mittels SEM und HIM

WP3-AP1: Mehrphasen-Mechanik (TH2M)

- Fertigstellung eines Konstitutivmodells zur Beschreibung des Dampf-Flüssigkeits-Gleichgewichts bei geotechnischen Prozessen (Grunwald et al. 2020)
  - Fertigstellung des voll gekoppelten TH2M-Moduls in OGS6 und Validierung durch Benchmark-Tests unterschiedlicher Komplexität (TM, HM, H2M, TH2M)
  - Erste (vereinfachte) Berechnungen von im Rahmen von EURAD-GAS geplanten Versuchen zum Gastransport in Tongesteinen mit variabler Sättigung
- WP3-AP2: Reaktive Transportprozesse (RTP)
- Implementierung in OGS-6 von Porositätsänderungen mit Reaktionen (gemeinsam mit FZJ)
  - Experimentelle Planung“ für das DR-C Experiment in Mt. Terri (Diffusionsprozesse in thermischen Gradienten)
  - Neues Benchmark für die Modellierung des Betonabbaus im Kontakt mit Tongestein (Idiart et al. 2020)
- WP3-AP3: Unsicherheitsanalyse
- Studie zur Anwendung und Validierung der „Design-of-Experiments“ Methode für die Unsicherheitsanalyse (Buchwald et al. 2020, submitted) mit einem analytischen THM-Problem.
  - Studie zur Orts- und Zeitaufgelösten globalen Sensitivitätsanalyse (Chaudhry et al. 2020, submitted) mit einem analytischen THM-Problem
  - Entwicklung zweier komplexitätsreduzierter TH(M) Modelle für
  - Erste Validierungstests zum Fernfeldverhalten des Mt. Terri FE-Experiment mit OpenGeoSys-6.
- WP4: Networking und Synthese
- Trainingskurs Umweltgeotechnik: Gekoppelte Prozesse und Materialmodelle (14. - 16.01. Peine)
  - Präsentationen: 38. Mt. Terri Technical Meeting (29.-30.01. Porentruy) Präsentation des VR Tasks (visuelle Daten- und Modellintegration); Smart-K<sub>d</sub>-Workshop (05.-07.02. HZDR Dresden): Montoya et al. (2020) und Shao et al. (2020); EGU Session “Towards a safe nuclear waste repository - assessment of barrier integrity, geoscientific, technological, societal and regulatory challenges and approaches”; DECOVALEX Kick-off (27-30.04, Videokonferenz)

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- WP3-AP1/2/3: Erstellung einer systematischen Benchmark-Reihe zur Validierung des OGS-TH2M-Gesamtmodells (alle Prozesskopplungen) und für reaktive Transportprozesse mit zunehmender Komplexität; Erweiterung des TH2M-Moduls zur Berücksichtigung von Phasenübergängen (z. B. Evaporation, Gaslösung), Auswertung von EURAD-GAS; Anwendung des Workflows für Unsicherheitsanalysen unter Verwendung der entwickelten komplexitätsreduzierenden TH(M)-Modelle auf vorhandene experimentelle Daten (z. B. FE-Experiment in Mt. Terri), Einbeziehung von Heterogenitäten in die Unsicherheitsbetrachtungen.
- WP4: Virtuelle und hybride iCROSS Konferenzen auf WP- und Projektebene; Weiterentwicklung des VR Tasks Mt. Terri in Zusammenarbeit mit swisstopo; Präsentation auf der INTERPORE 2020 (31.08. - 04.09. virtuelle Konferenz).

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

- Buchwald et al. (2020): DoE-based history matching for probabilistic uncertainty quantification of thermo-hydro-mechanical processes around heat sources in clay rocks. *Int J Rock Mech and Mining Sci* (in rev.)
- Chaudhry et al. (2020): Local and global spatio-temporal sensitivity analysis of thermal consolidation around a point heat source. *Int J Rock Mech and Mining Sci* (in review)
- Idiart, Montoya et al. (2020): Reactive transport modelling of a low-pH concrete/clay interface. *Appl. Geochem.* 115, art. 104562
- Grunwald et al. (2020): Non-iterative phase-equilibrium model of the H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>-NaCl-system for large-scale numerical simulations. *Math. Comput. Simul.* 178, 46 - 61
- Montoya et al. (2020): A benchmark for single-and multi-species sorption-diffusion models, Smart-K<sub>d</sub>-Workshop, 05.-07.02, HZDR Dresden
- Montoya et al. Near field evolution of a spent fuel repository in an argillaceous rock formation and impact on radionuclide migration. EGU General Assembly, 04.-08.05 (Virtual Conference)
- Shao et al. (2020): OpenGeoSys-6 development of reactive transport modeling with the application for radionuclides sorption processes, Smart-K<sub>d</sub>-Workshop, 05.-07.02, HZDR Dresden



## **2.3 Strahlenforschung**

<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 30.06.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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 Tumorpatienten 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 Prostatatumoren 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 Tumordinaktivierung 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: Arbeiten zur Bedeutung von ERG für Reparaturdefekte in Prostatatumoren wurden an Hand von frischen Gewebeproben weitergeführt. Zudem wurden Experimente sowie ein Manuskript zum Einfluss von Androgen-Antagonisten auf DSB-Reparatur und Strahlenempfindlichkeit fertiggestellt und zur Veröffentlichung eingereicht. Des Weiteren wurde ein Übersichtsartikel zur DSB-Reparatur bei Prostatatumoren in Trends in Cancer veröffentlicht (Burdak-Rothkamm et al. 2020).
- AP2: Ein Manuskript zur Bedeutung von Chk1 für die zelluläre Toleranz von DNA-Replikationsstress wurde in Cells veröffentlicht (Meyer et al. 2020).
- AP3: Ein Manuskript zur Identifikation, Charakterisierung und mechanistischen Analyse eines für das Therapieansprechen bei GBM relevanten Signalwegs (M3.2/3.3) wurde in Oncogene veröffentlicht (Struve et al. 2020). Untersuchungen zu Targets und Biomarkern wurden fortgeführt, u. a. mittels Kinom-Analysen. Ein Manuskript zur Rolle der Src-Kinasefamilie bei Kopf-Halstumoren wurde überarbeitet und erneut eingereicht.
- AP4: Ein Manuskript zum Einfluss der Expression von Ku auf das Überleben von Kopf-Halstumortpatienten in Abhängigkeit vom HPV-Status (M4.4) wurde revidiert und erneut zur Veröffentlichung eingereicht. Ein massenspektrometrischer Vergleich von HPV-positiven und –negativen Kopf-Hals-Tumoren wurde veröffentlicht (Wurlitzer et al. 2020).
- AP5: Strahlenbiologische Lehrinhalte wurden angesichts der COVID-bedingten Beschränkungen in ein für die Online-Lehre kompatibles Format überführt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Weiterarbeit an M1.4 und M1.5.
- AP2: Zusammenstellung, finale Auswertung, Interpretation und Veröffentlichung der verbleibenden Daten.
- 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. Insbesondere Integration strahlenbiologischer Inhalte in das Lehrkonzept der Graduiertenschule des Hamburger Krebszentrums, der „Hamburg School of Oncology“.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

- Burdak-Rothkamm S, Mansour WY, Rothkamm K.: DNA Damage Repair Deficiency in Prostate Cancer. Trends Cancer. 2020 Jun 6:S2405-8033(20)30166-7. doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.011
- Meyer F, Becker S, Classen S, Parplys AC, Mansour WY, Riepen B, Timm S, Ruebe C, Jasin M, Wikman H, Petersen C, Rothkamm K, Borgmann K.: Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer. Cells. 2020 Jan 17;9(1):238. doi: 10.3390/cells9010238
- Struve N, Binder ZA, Stead LF, Brend T, Bagley SJ, Faulkner C, Ott L, Müller-Goebel J, Weik AS, Hoffer K, Krug L, Rieckmann T, Bußmann L, Henze M, Morrissette JJD, Kurian KM, Schüller U, Petersen C, Rothkamm K, O'Rourke DM, Short SC, Kriegs M.: EGFRvIII upregulates DNA mismatch repair resulting in increased temozolomide sensitivity of MGMT promoter methylated glioblastoma. Oncogene. 2020 Apr;39(15):3041-3055. doi: 10.1038/s41388-020-1208-5
- Wurlitzer M, Möckelmann N, Kriegs M, Vens M, Omid M, Hoffer K, Barga CV, Möller-Koop C, Witt M, Droste C, Oetting A, Petersen H, Busch CJ, Münscher A, Schlüter H, Clauditz TS, Rieckmann T.: Mass Spectrometric Comparison of HPV-Positive and HPV-Negative Oropharyngeal Cancer. Cancers (Basel). 2020 Jun 11;12(6):E1531. doi: 10.3390/cancers12061531

<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 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.171.890,00 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. Tumoransprechen 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 Gewebespezifischen 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 Tumoransprechen korrelieren.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP2: Um den Einfluss einer fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf eine potentiell chronische Neuroinflammation zu untersuchen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung (1 m, 3 m, 6 m post-IR) die Neuroglia in der Hippocampus-Region quantifiziert. Die Zellzahlen für die Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten ergaben signifikante Veränderungen, die insgesamt für eine chronische Entzündungsreaktion sprechen. Darüber hinaus wurden bei diesen Versuchstieren Perfusions- und Diffusions-Messungen mittels MRT-Untersuchungen durchgeführt, um regionale Blutflussänderungen im Rahmen einer potentiellen Neuroinflammation zu diagnostizieren. Auch hier zeigten sich nach einer fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unbestrahlten Kontroll-Tieren. Die Ergebnisse werden derzeit zu einem Publikationsmanuskript zusammengefasst.

AP4: Nach low-LET (Photonen) und high-LET (Kohlenstoff- und Calcium-Ionen) Bestrahlung humaner Fibroblasten wurden die Foci im Kontext des Chromatins mittels TEM charakterisiert. Es zeigten große Unterschiede in der Komplexizität der DNA Schäden. Die entsprechenden Publikationsmanuskripte befinden sich in Vorbereitung.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Bei Patienten unterschiedlichen Alters wurden im Rahmen operativer Eingriffe Hautproben asserviert. Diese humanen Hautproben wurden ex-vivo mit unterschiedlichen Strahlendosen bestrahlt, um die DNA Schadensantwort in Abhängigkeit vom Alter zu untersuchen. Neben den strahleninduzierten Foci wird in der Epidermis insbesondere die strahleninduzierte Seneszenz mit verschiedenen Markern analysiert. Durch ELISA-Messungen soll die strahleninduzierte Sekretion inflammatorischer Zytokine gemessen werden.

Bei der Charakterisierung strahleninduzierter Foci in humanen Fibroblasten wurden mit der seriellen Block-Raster-Elektronenmikroskopie ganze Zellkerne mittels eines integrierten Ultramikrotoms seriell geschnitten, und die Anschnittflächen wurden automatisiert durch einen feingebündelten Elektronenstrahl abgerastert, um entsprechende Schnittbild-Ebenen zu generieren. Um eine hochaufgelöste 3D-Architektur dieser Zellkerne zu erhalten, sollen diese sehr umfangreichen 2D-Bildstapel mit Hilfe des Visualisierungs- und Segmentierungs-Programms AMIRA™ zu einer hochaufgelösten 3D-Bildgebung zusammengesetzt werden. Die präzise 3D-Rekonstruktion ganzer Zellkerne ermöglicht es strahleninduzierter Foci in der globalen Chromatinstruktur mit einer Nanometer-Auflösung zu visualisieren.

In Kooperation mit AP3 (RF als Marker für unterschiedliche Reparaturmechanismen, AG Mansour/Rothkamm, UKE1) wurden in A549 Tumorzellen nach Bestrahlung die RPA-Foci in den S/G2-Zellen im Chromatinkontext mittels TEM charakterisiert. Die Ergebnisse werden derzeit zu einem Publikationsmanuskript zusammengefasst.

In Kooperation mit AP5 (RF als Marker der Tumorstrahlenempfindlichkeit, AG Krause, UKD) wurden bei FaDu-Tumorzellen nach in-vitro und in-vivo Bestrahlung die  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci im Chromatinkontext mittels TEM charakterisiert. Die Ergebnisse werden derzeit zu einem Publikationsmanuskript zusammengefasst.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

A novel role for RAP80 in DNA double strand break end resection through targeting EXO1 to proteasomal degradation. Bakr A, Siegmund M, Lorat Y, Elsesy M, Rieckmann T, Meien S, Oing C, Rube CE, Petersen C, Rothkamm K, Mansour W, in preparation

Human skin aging is associated with increased expression of the histone variant H2A.J in the epidermis. Rube CE, Bäumert C, Isermann A, Schmal Z, Glanemann M, Mann C, Scherthan H; Journal of Investigative Dermatology, 2020 submitted

H2A.J involved in persisting DNA damage signaling triggers senescence-associated secretory phenotype. Isermann A, Lorat Y, Mann C, and Rube CE. Journal of Cell Science, 2020 submitted

Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer. Meyer F, Becker S, Classen S, Parplys AC, Mansour WY, Riepen B, Timm S, Ruebe C, Jasin M, Wikman H, Petersen C, Rothkamm K, Borgmann K. Cells. 2020 Jan 17;9(1):238. doi: 10.3390/cells9010238

Assessment of DNA-damage by 53BP1 and pKu70 detection in peripheral blood lymphocytes by immunofluorescence and high resolution transmission-electron-microscopy. Lorat Y, Fleckenstein J, Görlinger P, Rube C, Rube CE. Strahlenther Onkol. 2020 Jan 31. doi: 10.1007/s00066-020-01576-1. Online ahead of print, PMID: 32006067

<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 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.300.920,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Rothkamm	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das grundsätzliche Ziel dieses Forschungsverbundes ist es, durch den Nachweis von DNA Reparaturfoci (RF) biologische Marker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit zu etablieren. Die Detektion und Reparatur strahleninduzierter DSBs erfolgt in der komplexen Chromatin-Architektur des Zellkerns. In Abhängigkeit von einer Schadenslokalisierung im Eu- bzw. Heterochromatin sind unterschiedlich komplexe Prozesse der Umstrukturierung des Chromatins erforderlich, die wahrscheinlich nicht nur die Reparaturdynamiken beeinflussen, sondern auch die erforderlichen Reparaturmechanismen bestimmen. In diesem Aufstockungsantrag sollen für die verschiedenen Fragestellungen die RF mit hochauflösenden, korrelativen Mikroskopie-Techniken im Chromatinkontext ultrastrukturell charakterisiert werden, um den Einfluss der lokalen Chromatinstruktur auf die DNA Reparatur zu untersuchen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

In diesem Verbundprojekt sollen die RF in Normal- und Tumor-Zelllinien, Experimental-Tumoren, Tumorbiopsien mit hochauflösenden, korrelativen Mikroskopie-Techniken ultrastrukturell charakterisiert werden, um die wechselseitigen Beziehungen zwischen der lokalen Chromatinstruktur auf den verschiedenen Reparaturwegen (NHEJ, HR, PARP1-EJ) zu untersuchen.

In AP3 sollen RF zur Untersuchung der Wechselwirkung unterschiedlicher DNA-Reparaturmechanismen mit der Chromatinstruktur eingesetzt werden. Ziel ist es, für jeden Reparaturmechanismus eine spezifische Chromatinsignatur zu identifizieren, die Strahlenempfindlichkeit durch Targeting der Chromatinstruktur zu modulieren sowie einen automatisierten Chromatin-Score zu etablieren.

In AP6 soll mit Hilfe von RF der Einfluss der Chromatinstruktur auf die durch DNA-Replikations- und -Reparaturprozesse vermittelte genomische Stabilität untersucht werden. Resistenzmechanismen und der Einfluss von Histondeacetylaseinhibitoren auf Tumorstammzellen stehen hierbei besonders im Fokus.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP3: Ein Manuskript zum Einfluss von ERG auf die Regulation der DSB-Reparaturwege und Verschiebung der Reparatur hin zum PARP1-abhängigen Endjoining wurde weiterbearbeitet.

Experimente zur Interaktion von Chromatinstruktur und DSB-Reparatur unter Einsatz verschiedener Marker für posttranslationale Histonmodifikationen wurden soweit möglich unter Covid-Bedingungen fortgeführt. Ein entsprechendes Manuskript wurde weiter vorbereitet. Zudem wurde ein Übersichtsartikel zur DSB-Reparatur bei Prostata-tumoren in Trends in Cancer veröffentlicht.

AP6: Vergleichende Analyse von DNA Reparaturfoci in Tumorzelllinien mit ihren isogenen, radioresistenten Subklonen unter Berücksichtigung der für die genomische Instabilität relevanten DNA-Reparatur- und Replikationsprozesse. Untersuchung des Einflusses von Sauerstoffradikalen in radioresistenter Tumorzelllinien zur weiteren Charakterisierung der in der S-Phase generierten genomische Instabilität. Eine Publikation zum Thema wurde im Journal Cells veröffentlicht.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP3: (1) Die o. g. Manuskripte fertigstellen und publizieren.

(2) „High throughput“ Analyse von RF und Charakterisierung der DSB-Reparatur unter verstärkter Berücksichtigung von Einflüssen der Chromatinstruktur und epigenetischer Prozesse.

AP6: Charakterisierung des für die Strahlenresistenz wichtigsten an der DNA Replikationsgabel befindlichen DNA Reparaturprozesses in Tumorstammzellen unter Berücksichtigung des Einflusses der Chromatinstruktur.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Burdak-Rothkamm S, Mansour WY, Rothkamm K.: DNA Damage Repair Deficiency in Prostate Cancer. Trends Cancer. 2020 Jun 6: S2405-8033(20)30166-7. doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.011

Meyer F, Becker S, Classen S, Parplys AC, Mansour WY, Riepen B, Timm S, Ruebe C, Jasin M, Wikman H, Petersen C, Rothkamm K, Borgmann K.: Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer. Cells. 2020 Jan 17;9(1):238. doi: 10.3390/cells9010238

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 035C</b>
<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 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 412.218,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Krause	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das grundsätzliche Ziel dieses Forschungsverbundes ist es, durch den Nachweis von DNA Reparaturfoci (RF) biologische Marker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit zu etablieren. Die Detektion und Reparatur strahleninduzierter DSBs erfolgt in der komplexen Chromatin-Architektur des Zellkerns. In Abhängigkeit von einer Schadenslokalisation im Eu- bzw. Heterochromatin sind unterschiedlich komplexe Prozesse der Chromatin-Umstrukturierung erforderlich, die wahrscheinlich nicht nur die Reparaturdynamiken beeinflussen, sondern auch die erforderlichen Reparaturmechanismen bestimmen. In diesem Aufstockungsantrag sollen für die verschiedenen Fragestellungen die RF mit hochauflösenden, korrelativen Mikroskopie-Techniken im Chromatinkontext ultrastrukturell charakterisiert werden, um den Einfluss der lokalen Chromatinstruktur auf die DNA Reparatur zu untersuchen.

Das Ziel dieses Arbeitspakets 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 (UKE2)

AP5.2 -> AP4 bzgl. ex vivo Bestrahlung von Gewebebiopsien (UKS2)

### 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

In Dresden erfolgt die Bearbeitung des AP5: „RF als potentielle Marker der Tumorstrahlenempfindlichkeit“. 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 einzusparen zu können.

AP5.1: Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren und Biopsien

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. 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. Die DNA aus den vorhandenen Xenograft-Proben und aus Tumorbiopsien von Patienten sollen isoliert und die Methylom-Analysen durchgeführt werden

AP5.2: Bioinformatische Modellentwicklung

In einem systembiologischen Ansatz sollen vorhandenen Ergebnisse bzgl. RF in ex vivo bestrahlten Biopsien und in vivo bestrahlten Xenograft-Tumoren, mit den Proteom- und Transkriptom- und den neu erhobenen Methylom-Daten integriert werden.

AP5.3: Automatisierung der RF-Detektion in Biopsien

Ein Verfahren basierend auf einer Open Source Software (Fiji ImageJ) zur automatischen Detektion von RF in toxischen Arealen von in vivo Tumoren und ex vivo bestrahlten Tumorbiopsien soll entwickelt werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

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

Tumoren (*in vivo*) und Tumorbiopsien (*ex-vivo*) der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom (HNSCC) Xenograftmodelle wurden immunohistologisch untersucht und Gamma H2AX Foci ausgewertet. Dabei zeigt der dosis-abhängige Kurvenanstieg (SDRC) eine signifikant negative Korrelation zu den Tumorkontrolldosen (TCD<sub>50</sub>) (Meneceur et al. 2019, Radiother. Oncol). Die erhöhte Heterogenität von RF in den *ex vivo* bestrahlten Tumorbiopsien verglichen zu den *in vivo* bestrahlten Tumoren wurde durch das entwickelte gemischte Modell (Rassamegevanon et al. 2017, Radiother Oncol) nachgewiesen (Rassamegevanon et al. 2018, Int J Mol Sci). Der SDRC von bestrahlten Tumoren und Tumorbiopsien zeigte in 4 von 5 Tumormodellen keinen statistisch signifikanten Unterschied. Dadurch lassen sich die Tumoren in zwei Resistenzkategorien klassifizieren (Rassamegevanon et al. 2019, Radiother Oncol). Zudem wurde die *ex vivo* Kultivierung und die Bestrahlung auf lebende Tumorschnitte in HNSCC Xenograftmodellen etabliert. Das Assay stellt somit eine präklinische und robuste Funktionalität dar (Suckert et al. 2020, Cancers). In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner des Universitätsklinikums Saarland (AP4) wurden die epigenetischen Modifikationen zwischen den beiden Bedingungen untersucht. Es zeigt sich dabei eine signifikante Veränderung der H3K9-Methylierung und die Verteilung des gamma-H2AX Clusters in den *ex-vivo* bestrahlten Tumorbiopsien verglichen zu den *in vivo* bestrahlten Tumoren. Ein Manuskript dazu ist in Vorbereitung. Die Methylom-Analyse wurde aus den *in vivo*, *ex-vivo* und *in-vitro* bestrahlten und unbestrahlten Proben von zwei Tumormodelle durchgeführt. Zusätzlich wurde der Methylom-Profil von humanen Epithelzelllinie vor und nach Bestrahlung *in-vitro* untersucht. Das Ergebnis zeigt einen signifikanten Unterschied im Methylierungsprofil zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben bzw. zwischen den Modellen.

#### AP5.2: Bioinformatische Modellentwicklung

In einem systembiologischen Ansatz sollen vorhandenen Ergebnisse bzgl. RF in *ex-vivo* bestrahlten Biopsien und *in-vivo* bestrahlten Xenograft-Tumoren, mit den Proteom- und Transkriptom- und den neu erhobenen Methylom-Daten integriert werden.

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

Das automatische RF Detektion Verfahren basiert auf das Open Source Software (Fiji ImageJ) wurde entwickelt. Die Validierung und Re-Evaluierung den RF wurde durchgeführt. Das Ergebnis zeigt eine adäquate Korrelation zwischen manuelle und automatische RF-Auszählung. Das RF Detektion Verfahren wurde auf Glioblastom und HNSCC Patienten-Materialen umgesetzt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

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

Zusätzliche Daten aus verschiedenen primären Patientenproben sollen erhoben und mit den Ergebnissen der *in vivo* Tumoren verglichen bzw. mit den Behandlungsergebnissen korreliert werden. Es wird eine Publikation angestrebt. Reparaturfoci-Daten aus den lebenden Tumorschnitten im HNSCC Xenograftmodellen und die verbleibenden vier Tumormodelle werden erhoben und die Analyse der gewonnenen Daten wird fortgeführt. Dabei soll die erhöhte Heterogenität in *ex vivo* kultivierten, bestrahlten Tumorbiopsien weiter untersucht werden. Durch die Unterstützung einer Laser-Mikrodissektion, die lokal-spezifische DNA- und RNA Isolation aus den FFPE Materialien von bestrahlten und unbestrahlten Proben, werden etabliert und das gewonnene Material wird für die Omics-Untersuchung und Genexpression verwendet.

#### AP5.2: Bioinformatische Modellentwicklung

Die vorhandenen Daten sollen bzgl. RF in *ex-vivo* bestrahlten Biopsien und *in-vivo* bestrahlten Xenograft-Tumoren, mit den phänotypischen Charakteristik der Tumor wie Vaskularisation und Hypoxie, und den neu erhobenen Methylom-Daten integriert werden.

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

Das automatische RF Detektion Verfahren wird für die Foci-Auszählung von den verbleibenden Tumormodellen verwendet. Zur Validierung werden sämtliche erhobene Daten re-evaluiert und eine Korrelation zwischen manueller und automatischer Auszählung analysiert.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Suckert T, Rassamegevanon T, Müller J, et al.: Applying Tissue Slice Culture in Cancer Research-Insights from Pre-clinical Proton Radiotherapy. Cancers (Basel). 2020;12(6):E1589. Published 2020 Jun 16. doi:10.3390/cancers12061589

<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 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 461.008,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Gomolka	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das grundsätzliche Ziel dieses Forschungsverbundes ist es, durch den Nachweis von DNA Reparaturfoci (RF) biologische Marker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit zu etablieren. Die Detektion und Reparatur strahleninduzierter DSBs erfolgt in der komplexen Chromatin-Architektur des Zellkerns. In Abhängigkeit von einer Schadenslokalisation im Eu- bzw. Heterochromatin sind unterschiedlich komplexe Prozesse der Chromatin-Umstrukturierung erforderlich, die wahrscheinlich nicht nur die Reparaturdynamiken beeinflussen, sondern auch die erforderlichen Reparaturmechanismen bestimmen. In diesem Aufstockungsantrag sollen für die verschiedenen Fragestellungen die RF mit hochauflösenden, korrelativen Mikroskopie-Techniken im Chromatin-kontext ultrastrukturell charakterisiert werden, um den Einfluss der lokalen Chromatinstruktur auf die DNA Reparatur zu untersuchen:

- AP1: RF als Marker einer genetisch bedingten Strahlenempfindlichkeit
- AP2: RF als Marker der Schadensakkumulation nach Niedrig-Dosis-Bestrahlung
- AP3: RF als Marker für unterschiedliche Reparaturmechanismen
- AP4: RF als Marker zur klinischen Prädiktion in der Strahlentherapie
- AP5: RF als Marker der Tumorstrahlenempfindlichkeit
- AP6: RF als Marker einer genomischen Instabilität
- AP7: Automatisierung der RF-Detektion
- AP8: Ultrastruktur Charakterisierung der RF

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1 (BfS): RF als Marker einer berufsbedingten chronischen Strahlenexposition und RF als Marker einer genetisch bedingten Strahlenempfindlichkeit

Die Arbeiten RF als Marker einer berufsbedingten chronischen Strahlenexposition sind abzuschließen. Im weiteren Verlauf ist der Fokus auf einer genetisch bedingten Strahlenempfindlichkeit. Hier ist zu klären, welche Signalwege/-moleküle bei Kindern mit Ataxia Telangiectasia (AT) und somit genetisch bedingter Strahlenempfindlichkeit individuell verändert sind. Im Fokus stehen hier, mit  $\gamma$ H2AX assoziierte Signalwege und Netzwerke (Up- and Downstream) und Proteine, die in der Chromatin-Organisation eine Rolle spielen. Als Untersuchungskollektiv stehen fünf lymphoblastoide Zelllinien und eine Fibroblasten-Zelllinie (Kooperation UKS) von AT-Kindern zur Verfügung. Somit stehen Zelllinien zur Verfügung, an denen eine bekannte genetisch bedingte Strahlenempfindlichkeit unterschiedlicher Ausprägung systematisch charakterisiert werden kann.

*Versuch 1 (VI.1):* Rolle von Strukturproteinen in der Foci-Antwort, Untersuchung der Proteinexpression von verschiedenen Strukturproteinen in Zusammenhang mit einer auffälligen  $\gamma$ H2AX Foci-Antwort in einem Kollektiv von 5 AT-Zelllinien

*Versuch 2 (VI.2):* Veränderung von vorgeschalteten und nachfolgenden Signalproteinen in der  $\gamma$ H2AX Signalkaskade und Foci-Induktion in Abhängigkeit zur Zellzyklusphase in den Zelllinien

*Versuch 3 (VI.3):* Identifizierung individuell veränderter Signalstrukturen und Netzwerke mittels Gesamt-Proteom-Analyse in den Zelllinien der AT-Patienten

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

V1.1: Zur Untersuchung der Rolle von Struktur- und Chromatin-assoziierten-Proteinen in der Foci-Antwort (API Strahlenempfindlichkeit), wurde die Antikörperetablierung zur mikroskopischen Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Dafür konnte der Nachweis von Heterochromatin mit H3K9me3- und Euchromatin mit H3K9ac und H4K16ac mit Fluoreszenz markierten AK durchgeführt werden. Zusätzlich wurde der mikroskopische Nachweis für das Heterochromatin-assoziierte Protein HP 1 alpha, -beta und -gamma etabliert werden. In ersten Untersuchungen wurde 1 h nach Bestrahlung mit 0,5 und 1 Gy keine Ko-Lokalisierung zwischen  $\gamma$ H2AX Foci und H3K9me3 Signalen beobachtet, während  $\gamma$ H2AX Foci häufig in Bereichen mit H3K9ac vorzufinden war. Des Weiteren wurde für HP1 alpha eine starke Zunahme der Signalintensität über die Zeit (4Gy, 1 vs. 20h) beobachtet, wobei  $\gamma$ H2AX und HP1 alpha nicht ko-lokalisierten. Für HP1 beta wurde gelegentlich eine Ko-Lokalisierung ermittelt (4 Gy, 1 und 20h). In weiteren Versuchen wurde der mikroskopische Nachweis von H4K20me2 und H4K20me3 etabliert.

V1.2: Zur Untersuchung von Veränderungen in vorgeschalteten und nachfolgenden Signalproteinen in der  $\gamma$ H2AX Signalkaskade und Foci-Induktion in Abhängigkeit zur Zellzyklusphase (API Strahlenempfindlichkeit) wurde EDU als Marker für S-Phase Zellen, Ki67 als Marker für proliferierende Zellen (nicht G0) etabliert. Zusätzlich wurde eine automatische Analyse der DAPI-Intensität im Zellkern zur Einschätzung der Zellzyklusphase etabliert.

Mit der Analyse von Reparaturfoci ( $\gamma$ H2AX und 53BP1) in den 7 Patienten-Zelllinien und 3 Kontroll-Zelllinien wurde begonnen. Dazu werden die Zelllinien *in vitro* bestrahlt (1 und 4 Gy, Röntgenstrahlung) und nach Reparaturzeitpunkten (1, 8 und 24 h) die Anzahl der Foci semi-automatisch bestimmt. Mit diesen Untersuchungen sollen die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit primären Lymphozyten von AT Patienten bestätigt werden. Der Nachweis von pDNA-PK (Thr2609) wurde für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie etabliert und zeigte nach Bestrahlung eine Ko-Lokalisierung mit  $\gamma$ H2AX.

V1.3: Validierung der in-vivo Strahlenexposition mittels mFISH (API Chronische Strahlenexposition): die mFISH Untersuchung von 89 Wismut-Bergarbeitern zeigte tendenziell eine Zunahme der geschädigten Zellen bei ansteigender RBM Dosis durch chronische Exposition. Da dieses Ergebnis statistisch nicht robust ist, wird die Untersuchung der kryokonservierten Lymphozyten um 22 weitere Probanden erweitert. Die Auswertung wird aktuell noch durchgeführt. Identifizierung individuell veränderter Signalstrukturen und Netzwerke in Zelllinien von AT-Patienten (API Strahlenempfindlichkeit): Die Identifizierung individuell veränderter Signalstrukturen und Netzwerke mittels Gesamt-Proteom-Analyse in den Zelllinien der AT-Patienten wird in Kooperation mit der *Research Unit Protein Science* (HMGU) durchgeführt. Die AT-Zelllinien sowie LCLs gesunder junger Spender werden mittels eines speziellen Lyse-Verfahrens so aufgeschlossen, dass chromatin-assoziierte Proteine in der Massenspektrometrie zugänglich sind. Dies wurde qualitativ mit Westernblot überprüft (HP1 alpha, H3K9me3). Die erste Probemessung einer Kontroll-Zelllinie und einer Patienten Zelllinie 24 h nach 10 Gy Bestrahlung wurde erfolgreich durchgeführt. Es konnten mehr als 4700 Proteine identifiziert werden, die nach Bestrahlung unterschiedlich exprimiert vorliegen. Mehr als 300 der identifizierten deregulierten Proteine sind nur im Zellkern lokalisiert und mehr als 2100 Proteine im Zellkern und Cytosol, was eine umfangreiche Untersuchung chromatin-assoziiierter Proteine ermöglicht. Die Messung aller experimentell relevanten Proben wird in drei Replikaten im August/September durchgeführt. Hierbei werden in einem ersten Versuchsansatz die auffälligsten Patienten-Zelllinien im dreifach-Ansatz in Kombination mit Kontroll-Linien 24 h und 72 h nach 10 Gy gemessen. Anschließend wird eine Netzwerkanalyse durchgeführt, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in strahleninduzierten Signalwegen zu identifizieren. Das statistische Verfahren hierfür ist bereits etabliert.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die geplante Weiterarbeit folgt dem Arbeitsprogramm.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Bucher M, Duchrow L, Endesfelder D, Roessler U and Gomolka M.: Comparison of inexperienced operators and experts in  $\gamma$ H2A.X and 53BP1 foci assay for high-throughput biodosimetry approaches in a mass casualty incident. *International Journal of Radiation Biology*, 2020, in press

Bucher M, Endesfelder D, Roessler U, Borkhardt A, Dücker G, Kirlum HJ, Lankisch P, Oommen PT, Niehues T, Rübke CE, Moertl S, Hornhardt S and Gomolka M.: Analysis of chromosomal aberrations and  $\gamma$ H2A.X foci to identify radiation-sensitive ataxia-telangiectasia patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2020 submitted

<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 31.08.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.251.694,00 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. Generelles Untersuchungsprogramm:

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/Telomerlängenregulation 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 2.2) • Vergleichende Untersuchungen von Hautäquivalenten zu chronischer Bestrahlung mit UVA+B und KAUVIR

3D OTKs mit NHEKs wurden für 4 Wo mit UVA+B oder KAUVIR (Gesamtspektrum) 3x/Woche mit 0,65 MED (= 0.67 kJ/m<sup>2</sup> UVB + 23.9 kJ/m<sup>2</sup> UVA) für 4 Wo bestrahlt. Interessanterweise induzierte keiner der Bestrahlungsarten einen epidermalen Phänotyp (Histologie, Expression und Verteilung der epidermalen Differenzierungsmarker). Es waren auch keine „sunburn cells“ (UVB-induzierte Apoptose) erkennbar; auch die Basalmembran blieb unbeschädigt (Col VII, Col IV, Laminin). Auch die Erhöhung der Strahlendosis (bis 8 J/cm<sup>2</sup> UVA und 17 mJ/cm<sup>2</sup> UVB) in den UVA+B Ansätzen sowie die kontinuierliche Bestrahlung der NHEK mit KAUVIR für 6 Wochen hatten keine phänotypischen Konsequenzen. Erst nach 10 Wochen Bestrahlung mit KAUVIR kam es zu epidermaler Atrophie. Zur Frage der individuellen Strahlensensitivität wurden Hautäquivalente mit NHEKs von 3 verschiedenen Spendern für 6 Wochen mit KAUVIR (0.65 MED) bestrahlt. In keinem der Ansätze kam es zur Schädigung des Epithels. D. h., selbst chronische Bestrahlung mit UVA+B oder KAUVIR (komplettes Sonnenlicht Spektrum) wird prinzipiell gut vertragen und die NHEKs bleiben in der Lage, potenzielle Schäden zu eliminieren. Die Analyse von DNA Schäden (ds Brüche -  $\gamma$ H2AX/p53BP1) und dem Reparatur Pathway (pATM) 72 h nach 4-wöchiger Bestrahlung zeigt, dass die chronische Bestrahlung nicht zur „Erschöpfung“ des Reparatursystems führt.

Im Gegensatz zur Epidermis wurden im Stroma (dermales Äquivalent) Effekte chronischer Bestrahlung deutlich: Es kam zu Veränderung der Kollagen Fibrillen (col I) – Reduktion und veränderte Konfiguration der Fibrillen bei UVA+B *versus* Aggregation der Fibrillen durch KAUVIR; Induktion von Decorin und Reduktion von Hyaluron Säure. Neben der unterschiedlichen Wirkung auf die Kollagenfibrillen scheinen die beiden Strahlenqualitäten auch unterschiedliches toxisches Potenzial gegenüber den dermalen Fibroblasten zu haben. Während es durch UVA+B zu einer Dosis-abhängigen Reduktion der Fibroblasten Zahl kam, blieb in den KAUVIR Bestrahlungsexperimenten (auch nach 10 Wochen Bestrahlung) die Fibroblastenzahl weitgehend unverändert. D. h., in Kombination mit VIS und IRA (KAUVIR) erscheint das Toxizitätsspektrum der UV-Strahlung (UVA+B) verändert, was auf eine interaktive Regulation hindeutet.

#### Zu 2.3) • Age-OTKs:

Erste wesentliche und reproduzierbare Befunde aus dem Vergleich von Hautäquivalenten mit jungen (23-jähriger Spender) und alten (74-jähriger Spender) Fibroblasten, die mit UVA+B bzw. KAUVIR für 2 Wochen (1MED Einzeldosis, 3x/W) bestrahlt wurden, zeigen:

- NHEK auf jungen Fibroblasten verhalten sich identisch zu den oben beschrieben.
- NHEK auf alten Fibroblasten sind in ihrer Epidermis Bildung stark eingeschränkt. Es entstehen atrophische Epithelien. UVA+B und speziell KAUVIR bewirken wesentliche Verbesserungen bezüglich epidermale Stratifizierung und Differenzierung (Marker Expression und Lokalisation). Dies geht mit signifikanten Veränderung im dermalen Äquivalent einher. Die Bestrahlung bewirkt die Aktivierung der Fibroblasten. Der Myofibroblasten ( $\alpha$ SMA-positiv) Anteil ist stark reduziert und die Produktion aberranter Matrixproteine (z. B. Aggrekan) inhibiert und es kommt zur Normalisierung der Matrix. Dies impliziert, dass chronische Bestrahlung mit niedrigen KAUVIR Dosen (1 MED) die Revertierung des „Altersphänotyps“ (Rejuvenierung) der Fibroblasten induziert, mit der Konsequenz der Normalisierung der dermalen-epidermalen Interaktion und damit verbesserter epidermaler Gewebestruktur.

## 4. Geplante Weiterarbeiten

2.2) • Weitere Experimente zur akuten Bestrahlung von Hautäquivalenten mit KAUVIR *versus* UV und weiterführende detaillierte molekulare Auswertung bezüglich Unterschiede/Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Bestrahlungsqualitäten.

Zu 2.3) • Fortsetzung der molekularen Analyse der verschiedenen NHEK Experimente zum Unterschied „Alt“ *versus* „Jung“ und der Rolle von Bestrahlung (UVA+B/KAUVIR Gesamtspektrum) auf den Fibroblastenphänotyp. Neues Experiment mit transformierten Keratinozyten. Die RNAseq Analyse musste Corona-bedingt verschoben werden und ist für Oktober 2020 vorgesehen.

2.4) • Fertigstellung der Publikation durch Dr. Philipp Worst zu: “Role of CsA and solar radiation (KAUVIR spectrum) on human skin equivalents“

## 5. Berichte, Veröffentlichungen

Fertigstellung und Einreichung des Manuskripts: Characterisation of the novel spontaneously immortalized and invasively growing human skin keratinocyte line HaSKpw. Elizabeth Pavez Lorie, Nicola Stricker, I-Peng Chen, Beata Plitta-Michalak, Beate Volkmer, Rüdiger Greinert, Anna Jauch, Petra Boukamp, Alexander Rapp. Scientific Reports

<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 KAUVIR: 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 31.08.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.295.176,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Greinert	

### 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

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 Schadensinduktion 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 Schadensinduktion 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: Epigenetische Veränderungen in chronisch UV/VIS/IR-bestrahlten HaCaT und Messung der Reparaturkapazität in chronisch bestrahlten Zellen.

AP2: Mediatoren der UV/VIS/IR-induzierten epigenetischen Veränderungen.

AP3: Korrelation von miRNA-Expression mit Genexpressionsdaten in HaCaT Zellen nach UV/VIS/IR-Bestrahlung.

AP4: Epigenetische Veränderung in tumorigenen HaCaT Zellen durch UV/VIS/IR-Bestrahlung.

AP5: Epigenetische Veränderung in 3D-Hautkulturen nach UV/VIS/IR-Bestrahlung.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

AP1: Epigenetische Veränderungen in chronisch UV/VIS/IR-bestrahlten HaCaT und Messung der Reparaturkapazität in chronisch bestrahlten Zellen.

Ergebnisse: Zur Untersuchung der Auswirkung einer chronischen Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten auf die Reparaturkapazität von HaCaT-Zellen wurden die Zellen zuerst zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von sechs Wochen bestrahlt. Dabei erhielten die Zellen über die sechs Wochen eine Gesamtdosis von 3600 J/m<sup>2</sup> UVB, 182,4 kJ/m<sup>2</sup> UVA, 414 kJ/m<sup>2</sup> Vis und 903,6 kJ/m<sup>2</sup> IRA (gesamtes Spektrum) oder nur UVB + UVA mit der KAUVIR-Lampe. Drei Tage nach der

letzten Bestrahlung wurden die meisten Schäden in den chronisch bestrahlten Zellen repariert und die Zellen zeigten nur noch geringe Rest-CPD-Schäden:  $1098 \pm 78$  a.u. CPD bei Bestrahlung mit dem gesamten Spektrum und  $1153 \pm 81$  a.u. CPD mit UVB + UVA im Vergleich zu einem Kontrollwert von  $880 \pm 105$  a.u. bei den nicht bestrahlten Kontrollzellen. Die Zellen wurden nun mit einer Challenge-Dosis mit dem gesamten Spektrum (UVB  $400 \text{ J/m}^2$  + UVA  $20,2 \text{ kJ/m}^2$  + Vis  $46 \text{ kJ/m}^2$  + IRA  $100 \text{ kJ/m}^2$ ) bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen sofort nach der Bestrahlung oder nach unterschiedlichen Reparaturzeitpunkten über eine Woche abgelöst und die CPD-Schäden im Flusszytometer vermessen. Die Zell-Proben, die unmittelbar nach der Challenge-Bestrahlung entnommen wurden, dienten zur Bestimmung der CPD-Induktion. Eine deutlich erhöhte CPD-Induktion um  $\sim 20\%$  konnte bei den chronisch bestrahlten Zellen ( $6548 \pm 390$  a. u. CPD bei der chronischen Bestrahlung mit gesamtem Spektrum und  $6343 \pm 274$  a.u. CPD mit chronisch UVB + UVA im Vergleich zu  $5159 \pm 191$  a.u. CPD in den Kontrollzellen) nachgewiesen werden. Bei der Reparaturkinetik konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede durch die chronische Bestrahlung beobachtet werden. Die Reparaturzeitkonstante betrug  $20,41 \pm 3,08$  h für die Bestrahlung mit dem Gesamtspektrum,  $22,94 \pm 2,00$  h für UVB + UVA und  $19,61 \pm 1,56$  h für die Kontrolle. Bei den chronisch bestrahlten Zellen gingen die durch die Challenge-Bestrahlung induzierten Schäden eine Woche nach der Bestrahlung weitgehend zurück auf das basale Niveau wie auch im Fall der Kontrolle. Mögliche Mechanismen, die zu der hier beobachteten erhöhten Schadensinduktion durch die vorherige chronische Bestrahlung führten sowie dessen Bedeutung bei der Hautkarzinogenese werden momentan untersucht. Histonmodifikationen wie z. B. H3K4me3 (permissive Markierung), H3K9me3 (Heterochromatin-Markierung), H3K27me3 (repressive Markierung) und H3K27ac (Markierung aktiver Promotoren) sind wichtige epigenetische Merkmale. Sie regulieren Genaktivitäten, Chromatinstruktur und Genomintegrität. Wir konnten bereits früher zeigen, dass an der Induktion von cSCCs nach chronischer UVA-Bestrahlung humaner Keratinozyten Histonmodifikation beteiligt sind. Deshalb ist es für das aktuelle Projekt von großer Bedeutung, die Histonmodifikationen nach der Bestrahlung mit der KAUVIR-Lampe im Detail zu untersuchen. Hierfür wurde ein Protokoll für die Messung von modifizierten Histonen auf globale Ebene mittels Flusszytometrie etabliert. Zuerst wurde H3K27me3 in den sechsmal bestrahlten Zellen (zweimal wöchentlich mit Strahlenkombinationen UVB  $300 \text{ J/m}^2$  + UVA  $15,2 \text{ kJ/m}^2$  + Vis  $34,5 \text{ kJ/m}^2$  + IRA  $75,3 \text{ kJ/m}^2$  (gesamtes Spektrum) oder mit UVB + UVA) quantifiziert. Im Vergleich zu der nicht bestrahlten Kontrolle konnte mit beiden Strahlenkombinationen 24 h nach der letzten Bestrahlung eine Erhöhung von H3K27me3 um 20-40 % gemessen werden. Die H3K27me3-Induktion schwächte sich 72 h nach der Bestrahlung ab und lag nur noch  $\sim 10\%$  höher als die Kontrolle. Eine ähnliche Veränderung von H3K4me3 ( $\sim 20\%$  Erhöhung bei den beiden Strahlenkombinationen) konnte ebenfalls 24 h nach der letzten Bestrahlung detektiert werden. Diese Induktion schien auch transient zu sein und ging 72 h nach der Bestrahlung auf das Grundniveau zurück. Die Bestrahlungen hatten zu keinem der beiden Zeitpunkte (24 h und 72 h nach der Bestrahlung) einen Einfluss auf die globale H3K9me3-Markierung.

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP2: Mediatoren der UV/VIS/IR-induzierten epigenetischen Veränderungen

AP4: Epigenetische Veränderung in tumorigenen HaCaT Zellen durch UV/VIS/IR-Bestrahlung

AP5: Epigenetische Veränderung in 3D-Hautkulturen nach UV/VIS/IR-Bestrahlung

#### 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 31.08.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 822.834,00 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

Arbeitspakete 1, 2:

Die Daten der RNA-Sequenzierung wurden nach Qualitätskontrolle und Adapterclipping weiterverarbeitet. Die differentiell exprimierten Gene der unterschiedlichen Bestrahlungsregime wurden als erstes qualitativ in Mengen-Diagrammen miteinander verglichen. Die quantitative Analyse der Expressionsstärke einzelner Gene wird im Anschluss durchgeführt.

Arbeitspakete 3, 4, 5:

Die Proben aus dem Tierversuche mit akuter Bestrahlung unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2018-A024 (Experiment A) wurden aufgearbeitet. Dabei wurden Strahlungsinduzierte Schäden der DNA mittels Southwesternblot und die Signaltransduktion im Westernblot analysiert.

Der Langzeitversuch (Experiment B) ist abgeschlossen. Alle Gruppen wiesen Tumore auf, die mit UVB-Strahlung alleine oder einer Kombination mit anderen Quellen simultan behandelt wurden. Die Tumore wurden gezählt und die Tumorlast berechnet. Zur Charakterisierung der Tumore wurden Gewebeprobe entnommen, entwässert, in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt. Tumorgewebe wurde aufgearbeitet und die Tumore mittels Westernblot.

Ergebnisse:

Unsere bisherigen Befunde zeigen, 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. (iv) Dieser Effekt lässt sich nicht nur in HaCaT Keratinozyten, sondern auch in primären humanen Keratinozyten beobachten. (v) Die ersten Daten der RNA-Sequenzierung zeigen, dass die UVB-Strahlung den größten Einfluss auf das Expressionsprofil der Zellen hat. In diesem Berichtszeitraum konnte neu gezeigt werden, dass Unterschiede des Expressionsprofils zwischen UVB-Strahlung und einer Kombination aus UVB+UVA Strahlung zum frühen Zeitpunkt (4 h) qualitativ nicht zu sehen ist (vi) Im Tierversuch zeigte die Langezeitbestrahlung mit UVB den stärksten Einfluss auf die Tumorentstehung. Unterschiede zwischen den Tumorarten in Abhängigkeit zur Kombination verschiedener Wellenlängen konnten nicht identifiziert werden. (vii) Trotz einer verminderten Apoptose entstehen bei der Kombinationsbestrahlung im Tierversuch weniger Tumore.

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

Arbeitspaket 1, 2:

Die qualitative Auswertung der differentiell exprimierten Gene soll in den kommenden Monaten analysiert werden. Die Versuche zur Bestimmung der Unterschiede der Apoptose werden wiederholt und der Induzierte DNA Schaden mittels Southwesternblot analysiert.

Arbeitspakete 3, 4, 5:

Die histologische Analyse der Karzinome aus Experiment B wird durchgeführt. Die Zucht von Mäusen für eine Fortführung von Experiment A soll eingeleitet werden. Dabei soll der Fokus diesmal auf akuten DNA Schäden nach der Bestrahlung mit unterschiedlich kombinierten Wellenlängen liegen.

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

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 036D</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt KAUVIR: 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 31.08.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.444.215,00 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

In diesem Berichtszeitraum wurden die Zellzyklusmessungen für alle spektralen Bereiche individuell sowie in Kombination in HaCaT Zellen abgeschlossen. Die Anzahl der biologischen und technischen Replikate wurde erhöht, um eine statistisch sichere Aussage zu erreichen. Zellzyklusveränderungen (G1 Arrest und G2 Arrest) wurden sowohl nach UVB als auch nach Kombinationsbestrahlung gefunden. Die Exposition aller spektralen Bereiche simultan verringert diese Zellzyklus Arrests. Alle Klonogenen Assays wurden abgeschlossen und es zeigte sich erneut der Effekt, dass UVB+nIR Exposition im Überleben einen additiven Effekt aufzeigt. Dieser Befund konnte ebenso durch MTT Assays für alle Bestrahlungskombinationen bestätigt werden, wobei die Effekte eher später (nach drei Tagen) auftreten.

Dem hingegen zeigt die Reparaturkinetik von CPDs durch Ko-Exposition mit nIR eine Beschleunigung auf. Dies konnte nicht nur mittels Slot Blot, sondern auch mittels Immunfärbung und Comet-Assay bestätigt werden. Auf der Suche nach der Ursache dieser Beschleunigung wurde die Chromatinkompaktierung als zumindest ein verantwortlicher Faktor identifiziert. Dieser Effekt ist auch von der Inkubationstemperatur abhängig. Diese wird durch Kombinationsbestrahlung signifikant verändert. Dieser Effekt lässt sich durch artifizielle Kontaktierung des Chromatins oder chemisch induzierte Auflockerung der Chromatin Struktur beeinflussen. Diese Veränderung in der Chromatinstruktur führt zu einer veränderten Reparaturkinetik, wobei die Qualität der Reparatur nicht verbessert wird. Diese Chromatinveränderungen wurden sowohl auf der DNA Kompaktierungsebene als auch auf der Ebene von spezifischen Histon-Modifikationen (Histon-Acetylierung) nachgewiesen.

Studien zur DNA Doppelstrangbruchinduktion der spezifischen spektralen Bänder wurden mittels  $\gamma$ H2AX Färbung und neutralem Comet-Assay untersucht. Dabei zeigte sich, dass wiederum die Kombination von UVB und nIR zu einer S-Phase abhängigen, verstärkten Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen führt. Dieser Prozess ist wiederum abhängig von enzymatischer Aktivität und lässt sich durch die Inkubations-Temperatur beeinflussen.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die Veränderungen der Histon-Modifikationen werden weitergehend mit unterschiedlichen Kombinationen und für weitere spezifische Histonmodifikationen untersucht. Darüber hinaus werden ebenso Histon-Ubiquitinierung untersucht. Weitere Arbeiten werden sich mit der lokalen Schadensinduktion nach micro-pore Exposition beschäftigen, wobei zum momentanen Zeitpunkt die Dynamik der DNA Reparatur in fixierten Zellen mittels Antikörper Färbung analysiert werden. Die Zellzyklus Analysen werden im kommenden Projektzeitraum in HaSKpw Zellen fortgeführt, um den Effekt der p53 Mutation in HaCaT Zellen auf die Zellzyklusarretierung zu erfassen. Die bereits begonnenen Studien zur Induktion von oxidativen Schäden durch die individuellen und kombinierten Spektralen Bereiche soll fertig gestellt werden. Zuletzt werden noch die fehlenden Zeitpunkte für die Apoptose Induktion für alle spektralen Bereiche und Kombinationen abgeschlossen. Dies wird für zwei unterschiedliche Dosen und Zeitpunkte bis zu fünf Tagen nach Exposition erstellt.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<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 30.09.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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 sensibler 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 (Siewert 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 C57Bl/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

In vorausgegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass nach einer lokalen Herz-Bestrahlung bestimmte Entzündungsmarker wie ICAM-1 und VCAM-1 auf Herz-Endothelzellen bis zu 50 Wochen nach Bestrahlung mit 8 und 16 Gy signifikant erhöht waren, die eine chronische Entzündung mit anschließenden kardiovaskulären Schäden verursachen können. Dabei fällt im Vergleich zu 8 Gy die Erhöhung für 16 Gy höher aus. Die Quantifizierung beider Marker auf den Herz-Endothelzellen fand auf isolierten Einzelzellen statt, wobei deutlich weniger Endothelzellen aus bestrahlten Herzen (250.000 Zellen/100 mg) im Vergleich zu nicht bestrahlten Herzen (400.000 Zellen/100 mg) gewonnen werden konnten. Die erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Erniedrigung der Gefäßdichte auf Einzelzellebene wurden auch auf intakten Gefäßen im unveränderten Zellverband nach Etablierung eines geeigneten Protokolls mittels konfokaler Mikroskopie bestätigt. Weitere bestrahlte Herzen wurden bereits isoliert und werden zurzeit analysiert.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die restlichen bereits isolierten bestrahlten Herzen sollen mittels konfokaler Mikroskopie hinsichtlich ihrer Gefäßdichte (PECAM-1 Färbung) und Inflammation (ICAM-1 und VCAM-1 Färbung) untersucht werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Manuskript: Wolfgang Sievert, Jos Philipp, Omid Azimzadeh, Soile Tapio, Gabriele Multhoff: Increased expression of ICAM-1 and VCAM-1 on heart endothelial cells 50 weeks after local heart irradiation (in Vorbereitung)

Manuskript: Wolfgang Sievert, Jos Philipp, Omid Azimzadeh, Kristian Unger, Soile Tapio, Gabriele Multhoff: Loss of shear stress increases inflammatory effects on primary heart endothelial cells (in Vorbereitung)

Jos P, Sievert W, Azimzadeh O, Toerne C, Metzger F, Posch A, Hladik D, Subedi P, Multhoff G, Atkinson MJ, Tapio S. Data independent acquisition mass spectrometry of irradiated mouse lung endothelial cells reveals a STAT-associated inflammatory response. *Int J Radiat Biol*, <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1712492>, 2020

Shevtsov M, Balogi Z, Khachatryan W, Gao H, Vigh L, Multhoff G. Membrane-associated heat shock proteins in oncology: from basic research to new theranostic targets. *Cells* 9(5): E1263. doi 10.3390/cells9051263, 2020

Fellinger H, Stangl S, Schnelzer AH, Schwab M, Di Genio T, Pieper M, Werner C, Shevtsov M, Haller B, Multhoff G. Time- and dose-dependent effects of ionizing irradiation on the membrane expression of Hsp70 on glioma cells. *Cells* 9(4): 912. doi:10.3390/cells9040912, 2020

<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 31.03.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 3.336.492,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Schmidberger	

### 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 Tumorereignis 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 susceptibilität
- AP3: Statistische Techniken zur integrativen genomweiten Analyse
- AP4: Copy-Number-Variation und Methylierung vor und nach Bestrahlung
- AP7a: Genomische Stabilität bei Malignomerkrankungen im Kindesalter
- AP7b: Biologische Dosimetrie nach Radiotherapie
- AP Koord.: Koordination des ISIBELA-Verbundes sowie der Aus- und Weiterbildung

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

- AP1: Die Leitung des AP1 wurde zum 01.06.2020 von Herrn Dr. Scholz-Kreisel an Herrn PD Dr. Daniel Wollschläger übergeben. Eine Zusammenführung der unterschiedlichen Datenquellen verzögert sich, da eine korrigierte Version der VIVE Daten bisher nicht geliefert wurde. Die Dosimetrie wurde mit Simulationen von ZNS-Bestrahlung an Phantomen für unterschiedliche Altersgruppen und Berechnung von Organdosen fortgeführt. Die Bestrahlung von Patienten mit Hodgkin-Lymphom wurde ebenfalls an Phantomen simuliert und Organdosen berechnet. Zur Validierung wurde damit begonnen, Bestrahlungspläne aus Patientenakten der Universitätsmedizin Mainz und anderer Therapiezentren zu rekrutieren.
- AP2: Im ersten Halbjahr des Jahres 2020 wurden in AP2 an den Standorten Bremen und Mainz Abgleiche zur Vollständigkeit aller Studienunterlagen durchgeführt und fehlende Rekrutierungsunterla-

gen der Studienleitung in Bremen übergeben. Zudem wurden letzte fehlende Bioproben für die geplanten Analysen von AP2 an das Labor für die Sequenzierung weitergeleitet. Um die Ergebnisse der Sequenzierungen zu validieren, wurde damit begonnen, ausgewählte Markergene mittels qPCR in Zusammenarbeit mit AP4 zu validieren. Erste Ergebnisse hierzu werden in Kürze publiziert (siehe 5.).

- AP3: Neue Whole Genome Sequencing (WGS) Daten wurden unter Verwendung des Großrechners MOGON prozessiert. Die Analyse der differentiellen Gen-Expression (RNA-seq) wurde abgeschlossen und ein Manuskript gemeinschaftlich mit AP2 eingereicht (siehe 5.). Die WGS-Simulation zur Optimierung statistischer Methoden wurde fortgesetzt und der SAP finalisiert.
- AP4: Die 265 Proben des ISIBELA Kollektivs wurden Bisulfit-sequenziert. Es wurden Bestätigungsexperimente mittels qPCR für Manuskripte aus AP2 durchgeführt. Die Untersuchung der Expression von TP53 und dessen Isoform  $\Delta 133p53$  in KIKME Fibroblasten wurde abgeschlossen. Die Studien zur Kopienzahlvariation wurden abgeschlossen und publiziert (siehe 5.).
- AP7a: Die Analyse der zellulären und chromosomalen Strahlensensitivität der GenKiK/ KIKME-Spender wurde abgeschlossen und publiziert (siehe 5.) Aktuell werden diese Zellen auf ihre genomische Stabilität nach induziertem Replikationsstress untersucht.
- AP7b: Die Studie zur biologischen Dosimetrie nach Radiotherapie des Fersensporns mittels Orthovolt-Röntgenstrahlung oder einem medizinischen Linearbeschleuniger wurde erfolgreich abgeschlossen und publiziert (siehe 5.).

#### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Die Integration der Datensätze aus den unterschiedlichen Quellen (VIVE Datenbank, Deutsches Kinderkrebsregister, frühere Studien). Validierung der simulierten Strahlentherapie bei Patienten mit Hodgkin-Lymphom anhand von Therapieplänen früherer Patienten der HD-90-Studie. Berechnung typischer Organdosen. Abschätzung der Unsicherheiten bei der Schätzung der Organdosen.
- AP2: Im kommenden Halbjahr sollen für die geplanten Publikationen von AP2 die Validierungen der RNA-Sequenzierungen mittels qPCR in Zusammenarbeit mit AP4 abgeschlossen werden.
- AP3: Geplant sind der Abschluss der WGS-Simulationen und das Verfassen eines entsprechenden Manuskripts, die Analyse aller Sequenzierungsdaten (WGS, WES und lncRNA-Seq) sowie die Validierung der identifizierten Einzelnukleotid-Polymorphismen in den WGS-Daten.
- AP4: Die 265 Bisulfit-sequenzierten Proben des ISIBELA Kollektivs sollen für die geplanten Publikationen zeitnah ausgewertet und durch Bestätigungs- und Wiederholungsexperimente validiert werden.
- AP7a: Die Experimente zu Untersuchung der genomischen Stabilität nach induziertem Replikationsstress der GenKiK/ KIKME-Fibroblasten sollen bis Ende des Jahres 2020 abgeschlossen und bis zum Ende der Aufstockung publiziert werden.
- AP7b: Zur Erzeugung von Referenzdaten für die der biologischen Dosimetrie nach Strahlenunfällen werden derzeit Experimente am TRIGA-Forschungsreaktor der Uni-Mainz für Expositionen verschiedener Zelltypen mit Neutronenstrahlung vorbereitet.

#### 5. Berichte, Veröffentlichungen

- Brackmann LK, et al.: Comparison of time and dose dependent gene expression and affected pathways in primary human fibroblasts after exposure to ionizing radiation. Angenommen in J Mol Med (2020)
- Marron M, et al.: KiKme - A nested case-control study to identify genetic predispositions related to ionizing radiation in childhood and second primary cancers: Design and implementation. Unter Begutachtung in Front. Oncol.
- Galetzka D, et al.: Molecular karyotyping and gene expression analysis in childhood cancer patients. J Mol Med (2020). <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01937-4>
- Zahnreich S, et al.: Radiation-induced DNA double-strand breaks in peripheral leukocytes and therapeutic response of heel spur patients treated by orthovoltage X-rays or a linear accelerator. Strahlenther Onkol (2020). <https://doi.org/10.1007/s00066-020-01662-4>
- Zahnreich S, et al.: Spontaneous and Radiation-Induced Chromosome Aberrations in Primary Fibroblasts of Patients with Pediatric First and Second Neoplasms, Front. Oncol. (2020) doi: 10.3389/fonc.2020.01338
- Zahnreich S, et al.: Compromised repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in Fanconi anemia fibroblasts in G2. DNA Repair, in Revision

<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 30.04.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.066.254,00 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 Folge-Neoplasien 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 2020 insgesamt 324 RNA-Proben humaner Fibroblasten-Zellkulturen (erhalten von AP2) als Gesamt-RNA aufgearbeitet und qualitätsüberprüft. Für die Analyse der lncRNA-Komponente geeignete Sequenzier-Bibliotheken wurden erstellt. 198 der hieraus resultierenden Bibliotheken wurden bereits mit dem Illumina-Hochdurchsatzverfahren auf dem HiSeq 2500 sequenziert und die Daten an die Bioinformatik-Gruppe am IMBEI (AP3) weitergeleitet. Aktuell läuft die Sequenzierung weiterer 63 Proben. Somit konnte die im Bericht 2/2019 geplante Analyse der lncRNA aus humaner Fibroblasten-Zellkulturen erfolgreich begonnen werden.

Im Arbeitspaket „DNA-Sequenzierung von Gesamt-Genomen“ wurde die zu analysierenden DNAs stichprobenartig qualitätsüberprüft. Die Proben wurden mittlerweile allesamt in passenden Triplets auf der NovaSeq-Plattform sequenziert. Die Sequenzdaten wurden an AP3 zur Überprüfung und Auswertung weitergeleitet.

Für das Bestätigungskollektiv wurden die mehr als 500 DNA-Proben qualitätsüberprüft, quantifiziert und in entsprechender Konzentration abgefüllt an den Dienstleister Life & Brain, Bonn, zwecks SNP-Analytik versendet. Die Daten werden in Kürze erwartet.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Weitere 189 RNA-Proben werden plangemäß im zweiten Halbjahr 2020 zu lncRNA aufgearbeitet und qualitätsüberprüft. Nach der Erstellung entsprechender Sequenzier-Bibliotheken werden diese gemeinsam mit den verbleibenden 63 Bibliotheken aus dem 1. Halbjahr mit dem Illumina-Hochdurchsatzverfahren sequenziert und die Daten an die Bioinformatik weitergeleitet.

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

Diverse Manuskripte sind in verschiedenen Stadien der Publikation begriffen. Siehe Auflistungen der anderen Projektpartner.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Leibniz-Institut für Präventionsforschung und Epidemiologie – BIPS GmbH, Achterstr.30, 28359 Bremen		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 042C</b>
<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 30.04.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 711.627,00 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 für die wissenschaftliche Leitung des Arbeitspaketes 2 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 welcher 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

Im vergangenen Halbjahr wurde die Publikation mit der Beschreibung des KIKME Studiendesign und des Rekrutierungsverhaltens (101 SPN Patienten, 340 FPN Patienten und 150 krebsfreie Unfallpatienten) nach Ablehnung durch das erste Journal überarbeitet und bei einem zweiten Journal zur Veröffentlichung

eingereicht. Die zweite Publikation zu ersten Ergebnissen der Bestrahlungsexperimente zu verschiedenen Zeitpunkten wurde bei Molecular Medicine zur Publikation eingereicht und nach einem ersten Review um umfangreiche Analysen ergänzt. So konnten beispielsweise einzelne Markergene zur Zellseneszenz aus den RNA-Sequenzierungen mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) in Zusammenarbeit mit AP4 zu den verschiedenen Zeitpunkten und Strahlendosen validiert werden. Darüber hinaus wurden die Analysen zu differentiell exprimierten Genen und Pathways um mögliche vorgeschaltete Genregulatoren und um nachgeschaltete Erkrankungen und Funktionen erweitert. Hier zeigte sich erneut, dass sich das Expressionsmuster über die Zeit verschiebt. So wurden 2 Stunden nach Bestrahlung hauptsächlich Funktionen des Zellzyklus und nach 4 Stunden Funktionen der Seneszenz gefunden. Die Publikation wurde wieder eingereicht und vom „Journal of Molecular Medicine“ zur Publikation akzeptiert. Die dritte Publikation zu einer weiteren Reihe von Bestrahlungsexperimenten zur Identifikation von Unterschieden in der Genexpression je Probandengruppen auf Pathway-Ebene wurde im vergangenen Halbjahr fortgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Fibroblastenzelllinien von ehemaligen Kinderkrebspatienten und krebsfreien Kontrollen unterschiedlich auf hohe und niedrige Strahlendosen reagieren. In Reaktion auf niedrige Strahlendosen scheinen besonders Zellreparaturmechanismen und der kontrollierte Zelltod bei ehemaligen Kinderkrebspatienten nur eingeschränkt zu funktionieren. Mutationen könnten so möglicherweise in folgende Zellgeneration übertragen werden, akkumulieren und ultimativ Krebserkrankungen bedingen. In Reaktion auf eine hohe Strahlendosis wurde nur bei SPN Patienten der Schlüssel-*p53-Signalweg* nicht aktiviert. Dies könnte erhöhte Genotoxizität, Inflammation und schlussendlich auch ein erhöhtes Krebsrisiko bedingen. Der dazugehörige Publikationsentwurf wurde zur Zirkulation im ISIBELA Verbund verschickt. Ebenfalls wurde im vergangenen Halbjahr die Auswertung der inter-individuellen Variation in der Genexpression vor und nach Bestrahlung stratifiziert nach Gruppen fortgeführt. Hier zeichnen sich gruppenspezifische Unterschiede im Bereich der zellulären Strahlungsantwort, insbesondere im Umgang mit Sauerstoff- und Stickstoffradikalen ab. Die zugehörige Publikation wird ebenfalls in den nächsten Wochen im ISIBELA Verbund zirkuliert. Für die Evaluierung der Verlässlichkeit des entwickelten Fragebogens als Instrument zur lebenslangen, medizinischen Strahlenexpositionseinschätzung in einer weiteren Publikation fehlen aktuell noch die finalen Klinikdaten aus AP1. Die Nacherhebung zur Komplettierung des Studienkollektivs wurde in Zusammenarbeit mit Mainz erfolgreich abgeschlossen. Die nacherhobenen Fragebogeninformationen von Teilnehmern wurden im vergangenen Halbjahr standardisiert und über eine parallele Doppelteingabe von zwei Personen an getrennten Bildschirmen qualitätsgesichert beendet. Der finale Datenstand wird aktuell letzten Plausibilitätsprüfungen (automatisch und manuell) unterzogen und Ende Juli für alle geplanten Analysen zur Verfügung stehen. Im ersten Halbjahr 2020 wurden zudem alle Laboranalysen der DNA und der RNA in Zusammenarbeit mit AP8 abgeschlossen und die Experimentaldaten an AP3 weitergeleitet. Die Informationen zu vorhandenen Bioproben wurden fortlaufend qualitätsgesichert in der Bioprobandatenbank aktualisiert. Derzeit befinden sich 6.566 Bioproben in der Datenbank, von denen 33,3 % für Analysen genutzt wurden.

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

Im kommenden Halbjahr sollen die umfangreichen Analysen aller erhobenen Studiendaten fortgesetzt werden. In Zusammenarbeit mit AP4 soll zudem an weiteren Laborbestätigungen der Experimentaldaten gearbeitet werden. Neben der Auswertung weiterer Experimentaldaten (Long-noncoding-RNA, Copy Number Variation, genomweite DNA Sequenzierung) in Zusammenarbeit mit AP3 sollen zudem auch die ersten Analysen der dann finalen Fragebogendaten durchgeführt werden. Dies beinhaltet unter anderem die Analyse des Auftretens von Krebserkrankungen in der Familie und die klinische Beschreibung der KiKme Probanden. Nach Erhalt der Therapiedaten (z. B. zu Strahlen- und Chemotherapiedosen) aus AP1 soll zudem die Validierung der Fragebogeninformationen zur Krebstherapie und zu lebenslanger medizinischer Strahlenexposition fortgeführt werden.

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

Brackmann, L. K. et al.: Comparison of time and dose dependent gene expression and affected pathways in primary human fibroblasts after exposure to ionizing radiation. Journal of Molecular Medicine, July 2020, accepted and in press

<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 31.08.2021	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.190.568,00 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 sowie ab 09/2021 Analyse von spontanen Doppelstrangbrüchen:

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 Folge-neoplasie 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 sowie im Rahmen der Projektaufstockung ab 09/21 im Hinblick auf spontane Doppelstrangbrüche (DSBs) analysiert. Hier werden in verschiedenen Experimenten die Ursachen von spontan auftretenden Doppelstrangbrüchen analysiert, dabei soll die Rolle von Replikationsstress und anderen physiologischen Stressoren untersucht werden. Diese Studien werden durch ChIP-seq-Analysen zur Positionsanalyse spontaner Brüche komplementiert.

### 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: Aufgrund der in AP5 und AP6 beobachteten hohen Inter-Individualität beim Auftreten von spontanen DSBs stehen diese nun im Fokus der Arbeiten von AP5. Dabei komplementieren ChIP-Seq-Analysen zur genaueren Lokalisation von spontan auftretenden DSBs im Genom die molekularbiologischen Analysen.

Im aktuellen Berichtszeitraum wurde die Etablierung der ChIP-Experimente mit Hilfe von Modellzelllinien fortgesetzt. Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ist eine Methode, um Fragen in Bezug auf die Wechselwirkung von Proteinen und Chromatin zu beantworten. Kombiniert mit einer Sequenzierung (ChIP-Seq) können die Sequenzen, an denen DSB-abhängige Proteinmodifikationen auftreten, ermittelt und kartiert werden. Zur Etablierung der ChIP wurde die Zelllinie DivA (DSB Inducible via AsiSI) eingesetzt, bei der es sich um genetisch veränderte U2OS-Zellen mit ca. 100 annotierten Schnittstellen des Restriktionsenzym AsiSI handelt. Dadurch konnte die Sequenzierung zunächst durch eine kostengünstigere qPCR ersetzt werden und ermöglichte die erste Etablierung der ChIP mit dem DSB-Marker  $\gamma$ H2AX und die Optimierung des Verfahrens. Darauf aufbauend wurde die Etablierung der ChIP in Kombination mit einer Sequenzierung anhand einer gut charakterisierten Fibroblasten-Zelllinie (82-6 hTERT) fortgesetzt. Obwohl die Proben in der qPCR für zufällig überprüfte Stellen im Genom vielversprechende Ergebnisse zeigten, stellte sich bei der Sequenzierung der Proben heraus, dass einerseits die Größenverteilung der isolierten DNA-Stücke nicht optimal war und andererseits viele unspezifische Signale/Sequenzdaten vorlagen. Daher wurden die Etablierungsexperimente wieder aufgenommen. Derzeit werden erneut weitere Antikörper für die ChIP getestet (um unspezifische Signale zu reduzieren) sowie das Protokoll zur Sonifizierung verändert (um kleinere DNA-Fragmente zu generieren).

Neben der Etablierung der ChIP-Seq wurde mit der Analyse der spontanen DSBs mit molekular-biologischen Analysen begonnen. Um zu untersuchen, ob Zellen mit einem sehr niedrigen oder hohen Level spontan auftretender DSBs möglicherweise bereits ein Problem mit physiologischen Prozessen (wie dem Zellwachstum oder der DNA-Reparatur von spontan auftretenden Schäden) haben, werden derzeit 3 Zelllinien gesunder Spender mit unterschiedlichem Level an spontanauf tretenden Brüchen untersucht.

AP6: Die Experimente zur Analyse der Reparaturkapazität wurden abgeschlossen und die aufgenommenen Bilder mit Hilfe der halbautomatischen Analysesoftware "AutoFoci" ausgewertet. Diese zeitnahe Auswertung aller Bilddateien bei der keine separate Analyse von Zwischenergebnissen einzelner Versuchsdurchläufe vorgenommen wurde, sollte einen möglichen subjektiven Bias bei der Auswertung verhindern. Derzeit erfolgen die Sichtung und die erste Analyse der Daten. Anschließend wird die Analyse der Daten im Bezug auf die Inter-Individualität der spontan auftretenden Brüche sowie das Reparaturverhalten von Patienten und gesunden Probanden bei niedrigen Strahlendosen fortgesetzt. Diese Analyse wird zeigen, ob die Ergebnisse zum Reparaturverhalten aus dem kleinen Kollektiv (GenKiK) bestätigt werden können.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

AP5: Die Etablierung der ChIP-Experimente wird fortgesetzt, um die identifizierten Probleme zu beheben. Nach erfolgreicher Etablierung der ChIP-Sequenzierung werden die Fibroblasten der Krebspatienten mit Hilfe dieser Methode untersucht, um die Stellen der spontan auftretenden DSBs im Genom zu charakterisieren.

Die molekular-biologischen Analysen werden derzeit auf Zelllinien gesunder Spender mit unterschiedlichem Level an spontan auftretenden Brüchen des Kollektivs ausgeweitet.

AP6: Diese Auswertung wird zeigen, ob einzelne Zelllinien (und deren Triplets) wegen schlechten Wachstums oder schlechter Färbequalität erneut getestet werden müssen. Ist dies nicht der Fall, werden die Daten für die statistische Analyse (AP3) vorbereitet.

Zusätzlich wird die begonnene Bildaufnahme zur Analyse der Checkpoint-Induktion nach hohen Bestrahlungsdosen fortgesetzt. Nach Abschluss der Bildaufnahme erfolgt die Computergestützte Auswertung aller Bildaufnahmen.

### 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 31.12.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 883.050,00 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 gentoxischen 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 DSBs die in heterochromatischen Bereichen lokalisiert sind im Vergleich zu euchromatisch lokalisierten DSBs? 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 und 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 euchromatischen 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 Niveau 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, Mutationstyp und Mutationslokation untersucht werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Für die Analyse von Chromosomenaberrationen sowie Mikrokerninduktion wurden Jurkat-Zellen im Zellzyklus synchronisiert, mit Tritium-Thymidin oder mit I-125-UdR in der frühen S-Phase (Replikation von Euchromatinbereichen) bzw. späten S-Phase (Replikation von Heterochromatinbereichen) für 1 h puls-gelabelt und i) unmittelbar nach dem Labeln, ii) in der G2/M- oder ii) in der G1-Zellzyklusphase für die Akkumulation radioaktiver Zerfälle eingefroren. Nach erfolgter Zerfallsakkumulation wurden die Zellen aufgetaut, präpariert und analysiert. Um die Analysen strahlenbiologisch besser einzuordnen, wurden die Experimente auch nach Exposition mit 10 Gy  $\gamma$ -Strahlung ( $^{137}\text{Cs}$ -Quelle) in tiefgefrorenen Zellen, die sich analog in der späten S-, G2/M- oder G1-Zellzyklusphase befanden, durchgeführt.

Bei Analyse der Mikrokerninduktion zeigten G2/M-Phase Zellen eine signifikante Erhöhung nach Tritium-Exposition in Euchromatinbereichen im Vergleich zur Exposition in Heterochromatinbereichen. Bezogen auf die Exposition in Hetero- versus Euchromatin-Bereichen zeigten sich ansonsten keine signifikanten Unterschiede, weder bei den restlichen Tritium-Proben noch bei den Proben nach I-125-UdR-Exposition.

Beim Vergleich der verschiedenen Zellzyklusphasen wurde eine signifikant erhöhte Mikrokernrate in G2/M- gegenüber G1-Zellzyklusphase-Zellen nach Tritium-Exposition in Euchromatinbereichen nachgewiesen. In  $\gamma$ -bestrahlten Zellen konnte eine signifikant erhöhte Mikrokern-Induktion in G1- gegenüber späte S-Phase Zellen festgestellt werden. Bei den restlichen Tritium- bzw. Gamma-exponierten, als auch bei allen I-125 exponierten Proben gab es bzgl. der verschiedenen Zellzyklusphasen keine signifikant veränderten Unterschiede.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Abschluss der unter Punkt 3 beschriebenen Arbeiten bzgl. Induktion von Mikrokern- und Chromosomenaberrationen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<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 30.06.2020	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 2.279.559,00 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: Unter Verwendung multiparametrischer quantitativer bildbasierter Hochdurchsatz-Zytometrie (QIBC), wurden Entstehung und Abbau von  $\gamma$ H2AX-Foki als Funktion der Zeit nach DSB-Induktion durch I-SceI-Transfektion gemessen.  $\gamma$ H2AX-Foki wurden zellzyklusspezifisch nach G1- und G2-Phase getrennt analysiert. Die QIBC-Ergebnisse zeigen, dass die Kinetik der Auflösung von  $\gamma$ H2AX-Foki in G1-Phase-Zellen schnell und von der Clusterkomplexität unabhängig ist. Auch die Verteilung residualer  $\gamma$ H2AX-Foki in G1-Zellen war, unabhängig von der DSB-Komplexität, in allen getesteten Zelllinien ähnlich. Bemerkenswerterweise ergab die Analyse von G2-Phase-Zellen eine abgeschwächte Auflösung insgesamt und einen noch langsameren Abbau der  $\gamma$ H2AX -Foki, wenn DSB-Paare und -Vierlinge mit inkompatiblen Enden induziert wurden. Andererseits lösten sich die  $\gamma$ H2AX-Foki, die einzelne DSBs und DSB-Paare mit kompatiblen Enden trugen, in G2 deutlich schneller auf.

Frühere Ergebnisse zum Beitrag von HRR zur Reparatur einzelner/geclusterter DSBs wurden unter Verwendung von QIBC um verbesserte zellzyklusspezifische Analysen erweitert. Die QIBC-Ergebnisse bestätigten die frühere Analyse, dass Rad51 mit höherer Affinität an DSB-Clustern als an einzelnen DSBs akkumuliert. Die Rolle der HRR bei der Reparatur von DSB-Clustern wurde durch RNAi vermittelten Knockdown von Rad51 in Verbindung mit zytogenetischer Analyse weiter untersucht. Die Rad51-Herunterregulierung führte in Zellen, die einzelne DSBs und DSB-Paare mit kompatiblen Enden enthalten, zu einem Anstieg der Translokationen um 25-35 %. Erstaunlicherweise führte Rad51-Knockdown zu einem signifikanten Translokationsanstieg um > 60 % in Zellen, die DSB-Cluster höchster Komplexität enthalten, und bestätigte die wichtige Rolle der HRR bei der Reparatur solcher Läsionen.

UDE-2: Die für dieses Projekt angestellten Doktoranden Fr. Shipra Chaudhary und Hr. Mortoga Sharif haben im letzten Berichtszeitraum intensiv an der Fertigstellung ihrer Dissertation gearbeitet. Fr. Dr. Shipra Chaudhary konnte zuletzt erfolgreich die Verteidigung ihrer Promotion abschließen. Hr. Sharif hat weiter an der Analyse und Interpretation seiner Daten gearbeitet.

UDE-3: Die Wirkung von Cisplatin und Mirin auf die Strahlungsempfindlichkeit humaner Hautfibroblasten aus neonatalen (HDFN) und adulten Geweben (HDFa) wurde analysiert. Zellen in Plateau- und exponentieller Wachstumsphase wurden verwendet. Zunächst wurden die Auswirkungen von Cisplatin, Mirin und kombinierter Behandlung auf die Koloniebildung dieser Zellen bewertet. Mirin hatte eher einen leichten Anstieg der überlebenden Fraktion der mit Cisplatin behandelten Gruppen zur Folge. In den Fibroblasten führte die Behandlung mit Cisplatin zu einem Anstieg der S-Phase, wobei Mirin alleine oder in Kombination keinen zusätzlichen Effekt auf den Zellzyklus hatte. Mirin hatte auch keinen signifikanten Einfluss auf die Reparaturfoki nach Bestrahlung ( $\gamma$ H2AX, 53BP1, Rad51). Interessanterweise wurde sowohl in Plateau- als auch in exponentiell wachsenden HDFa- und HDFN-Zellen festgestellt, dass Mirin signifikant die Bildung von Cisplatin Addukten verringert. Diese reduzierte Adduktbildung nach Behandlung mit Mirin würde teilweise den leichten Anstieg der Überlebensfraktion nach kombinierter Behandlung mit Cisplatin und Mirin erklären.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

UDE-1: Abschließende zytogenetische Experimente werden noch ausgewertet werden und die gewonnen Ergebnisse werden zusammengefasst und zur Veröffentlichung aufbereitet. Eine in Vorbereitung befindliche Publikation befindet sich bereits im Stadium der Fertigstellung und wird in Kürze zur Veröffentlichung in einer anerkannten *peer-review* Zeitschrift eingereicht.

UDE-2: Die Suche nach einem geeigneten induzierbaren System wird nicht weiter fortgesetzt, da es sich herausgestellt hat, dass Leaks im System das Überleben und die genomische Stabilität der generierten Zellen negativ beeinträchtigen. Hr. Sharif wird die Analyse und Interpretation seiner Daten abschließen und in einer Promotionsarbeit zusammenfassen und zur Begutachtung einreichen.

UDE-3: Die experimentellen Arbeiten wurden am 31.3.2020 abgeschlossen.

### 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> 02 NUK 047A
<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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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 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 (HGMU; 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 (HGMU, 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

Zeitaufgelöste Transkriptomdaten der Cal33 und LUCY Zellkulturmodelle wurden bezüglich strahlenassoziierter differentieller Pathwayregulation analysiert. Progeny, SPEED2 und g:Profiler Analysen wurden durchgeführt. Des Weiteren wurden Gene, die sich bezüglich zeitabhängiger Expressionsdynamik in sensitiven/resistenten unterscheiden, identifiziert und konnten den IL-1, TNFa, NFKb, MAPK, PI3K, Hippo und Wnt Signalwegen zugeordnet werden.

Vom UKF wurden Keratinozytenzellen aus der Mundschleimhaut von zwei gesunden Spendern mit hoher und niedriger Strahlensensitivität zur Verfügung gestellt, die zu acht verschiedenen Zeitpunkten (20 min, 2 h, 7 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h nach Bestrahlung) nach Bestrahlung mit 0 Gy (sham)/8 Gy geerntet wurden. Nach der RNA-Isolation wurden Genexpressionszeitreihen mittels Microarrays generiert, die derzeit bezüglich zeitabhängiger Unterschiede in Genexpression, Pathways und Signalwegen analysiert werden.

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

AP2.1: Funktionelle Analyse der Wirkung von Repräsentanten der untersuchten Netzwerke auf die Strahlensensitivität von Tumorzellen *in vitro*

In enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern (BfS, IFZ, LMU, CUB) wurden die Analysen der generierten Daten zur molekularen und funktionellen Charakterisierung des HNSCC-Zelllinien Panels (n=11) und den *in vivo* Tumorproben des Panels weitergeführt und am HMGU in den Manuskript-Entwurf integriert.

AP3: Translationale Validierung von Netzwerken und Markern in Patientengewebe

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

Im Berichtszeitraum wurde die RNAseq der noch ausstehenden Fälle des LMU-KKG Kollektivs adjuvant strahlentherapierter HNSCC Patienten sowie der *Spread Assay* Proben vom UKF durchgeführt. Vom UKF wurden weitere Mundschleimhautproben (n=12) zur Verfügung gestellt, die mittels *Spread Assay* hinsichtlich der *in vitro* Strahlenempfindlichkeit charakterisiert wurden. Es wurde erfolgreich RNA isoliert und eine Sequenzierbibliotheken (0 Gy und 6 Gy) erstellt.

Von der Pathologie des UKF wurden Tumorgewebeproben von n=19 HNSCC Patienten erhalten, wobei für n=11 Patienten auch Normalgewebe vorlag. Die simultane DNA/RNA Isolation wurde mit dem AllPrep FFPE DNA/RNA Kit durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein weiteres RNA-Isolations-Protokoll für die mikroskopische Dissektion benachbarter Normal- und Tumorgewebsareale nach HE-Färbung etabliert (RNeasy FFPE Kit).

Bedingt durch die Corona-Pandemie konnte das für Mai geplante Projekttreffen in Berlin nicht stattfinden. Stattdessen wurde am 06.05.2020 eine Videokonferenz durchgeführt, an der H. Zitzelsberger, P. Weber, K. Unger, S. Mwiberi und J. Hess für das HMGU teilnahmen. Das Verbundtreffen in Berlin soll im November/Dezember 2020 nachgeholt werden.

### 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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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 Primärgewebeproben. 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 den mit 2D-DIGE Screen identifizierten Proteinen der HNSCC-Linie Cal33 und deren abgeleiteten strahlensensitiven Klon #303 und strahlenresistenten Klon #327 wurden Netzwerkanalysen in Zusammenarbeit mit Partner HMGU durchgeführt. Es wurden übereinstimmende Ergebnisse mit metabolischen Analysen und Transkriptomanalysen festgestellt. Weiterhin wurden massenspektrometrische Analysemethoden zur Untersuchung des Sekretoms der wertvollen primären Mundschleimhautkulturen der Hals-Kopf-Tumor Patienten und Blutplasma evaluiert.
- AP2: Zur Charakterisierung der in die Untersuchungen einbezogenen HNSCC-Zelllinien wurden Wachstumskurven dieser Zelllinien angefertigt. Darüber hinaus wurden die Zelllinien mittels Luminex Technik auf Zytokinsekretion untersucht. Dazu wurden die Zellkulturüberstände nach Bestrahlung verwendet. Dabei ließen sich radiosensitive und radioresistente Zelllinien anhand der Ähnlichkeit der Zytokinprofile gruppieren. Die Ergebnisse werden in eine gemeinsame Publikation aller Projektpartner einfließen.  
Ein Panel aus 30 lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) generiert aus Blutzellen von Brustkrebs und HNSCC-Patienten mit beschriebener Strahlenreaktion (15 reagierten sensitiv, 15 normal (gemacht)) wurde mittels WST Assay auf metabolische Aktivität (indirekter Nachweis für Zelltod) 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung untersucht, um besonders empfindliche Zelllinien für weitere Analysen zu identifizieren. Eine signifikante Assoziation zwischen klinischer Strahlenempfindlichkeit und verringerter metabolischer Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Einzelne Zelllinien reagierten reproduzierbar strahlensensitiv. Weiterhin wurde ein „Limiting dilution assay“, etabliert, um das klonogene Zellüberleben nach Bestrahlung zu erfassen. Aus der Literatur gibt es Hinweise, dass dieser Test mit der klinischen Strahlensensitivität korreliert. Weiterhin wurden DNA-Reparatur mit dem  $\gamma$ H2AX-Assay und Zellzyklusanalysen (FACS) untersucht. Abschließend werden die Untersuchungen an den LCLs basierend auf Zellüberleben (metabolische, klonale Messung), zu DNA-Reparatur und Zellzyklus zusammengeführt.
- AP3: Es wurden mit allen Verbundpartnern Grundlagen zur Aufarbeitung und Analyse des Patientenmaterials des Partners Universitätsklinikum Freiburg ausgearbeitet. Es werden regelmäßig Blutproben von Patienten aus Freiburg im BfS aufgearbeitet. Die Verteilung und Aufarbeitung der Mundschleimhautkulturen wurde mit den Verbundpartnern abgestimmt.  
Die in Freiburg gesammelten Mundschleimhautproben sollen mittels Reparaturfoci-Assay (RF-Assay,  $\gamma$ H2AX/53BP1) und massenspektrometrischer Proteinanalytik untersucht werden. Nach einem Pilotversuch wurde der RF-Assay an Zellen von drei weiteren gesunden Probanden erfolgreich durchgeführt und die ausgewerteten Daten nach Freiburg übermittelt. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Zellzahl der Keratinozyten müssen dazu diese adhärennten Zellen auf Objektträgern kultiviert werden. Weitere Untersuchungen an im BfS kultivierten Keratinozyten sind geplant. Für die Massenspektrometrie wurde ein geeigneter Kooperationspartner gefunden: die Research Unit Protein Science des Helmholtz Zentrums München. Nach einem ersten Testlauf mit Proben von Mundschleimhautzellen wurde ein zweiter Testlauf mit einem erweiterten Protokoll durchgeführt, um die Probenvorbereitungs- und Messmethoden zu optimieren. Dazu wurden Mundschleimhautzellen von vier Probanden nach in vitro- Bestrahlung zu zwei Zeitpunkten untersucht, nach 24 h und 96 h. Mit dem neuen Protokoll konnten jeweils über 5000 Proteine detektiert werden. Erste Analysen zeigen unterschiedlich deregulierte Proteine bzw Signalwege nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen. Damit ist die massenspektrometrische Analyse etabliert.
- AP4: Das erste Projekttreffen 2020 musste aufgrund der Corona-Situation als Videokonferenz am 6.5.2020 durchgeführt werden.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die Weiterarbeit wird nach Arbeitsplan durchgeführt.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Ein Abstract bei der DEGRO 2020 wurde eingereicht. Die Veranstaltung wurde aufgrund der Corona-Situation abgesagt.

<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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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-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

Im vorliegenden Bericht werden Arbeiten des Projektpartners LMU zu AP1-4 dargestellt. Im Rahmen der übergeordneten Lockdown-Maßnahmen der Covid-19-Pandemie wurde der experimentelle Forschungsbetrieb in der Klinik für Strahlentherapie in der Zeit vom 13.03.2020 bis zum 13.04.2020 auf einen Notversorgungsbetrieb von Labor und Tierstall umgestellt. In dieser Zeit waren

alle nicht an der klinischen Versorgung der Patient\*innen beteiligten Berufsgruppen in Home-Office-Arbeitssituation, und es wurde lediglich eine Notversorgung von Labor und Tierhaus aufrecht erhalten. Ab dem 14.04.2020 wurde auf reduzierten Normalbetrieb mit Rotationssystem umgestellt, in dem eingeschränkt Experimente durchgeführt werden konnten. Seit 20.07.2020 findet wieder Normalbetrieb (mit Einschränkungen durch die vorgegebenen Hygiene-Richtlinien) statt.

Die Home-Office-Phase und die Phase des reduzierten Normalbetriebs wurden genutzt, um Auswertearbeiten durchzuführen, Experimente zu planen, Literaturrecherche zu betreiben, Publikationen und Übersichtsartikel vorzubereiten und zu schreiben. In der experimentellen Bearbeitung des vorliegenden Projektvorhabens haben diese Lockdown-Maßnahmen aber zu einer Verzögerung von etwa 3 Monaten geführt.

Für die geplante Publikation zur Bedeutung der zellulären Seneszenz und des damit verbundenen sekretorischen Phänotyps wurden letzte RNASeq-Analysen gemeinsam mit den anderen Projektpartnern durchgeführt, und die erhaltenen Ergebnisse wurden in die Publikation eingearbeitet. Abbildungen und Publikationstext befinden sich in der Finalisierungsphase. Eine Submission ist für Q3-2020 geplant.

Die experimentellen Arbeiten zur Beteiligung eines Stammzell-Oberflächenrezeptors an den Mechanismen der Radioresistenz von HNSCC-Zellen sind abgeschlossen. Finale RNASeq-Analysen von HNSCC-Zellen mit bzw. ohne Rezeptor-spezifischer RNA-Interferenz sind fertig ausgewertet. Aktuell befinden sich Abbildungen und Publikationstext in der Fertigstellung. Eine Submission ist für Q4-2020 geplant.

Für die geplante HNSCC-Zelllinien-Publikation wurden bestrahlte und unbestrahlte Proben aller Zelllinien generiert, die aktuell vom Projektpartner CUB in CyTOF-Analysen charakterisiert werden.

Als Nebenprojekt und Produkt der Erfahrungen aus den gesammelten Klonogenitätsanalysen in diesem Projektvorhaben wurde gemeinsam mit dem Projektpartner HMGU ein Manuskript zu den gravierenden methodischen Limitationen der aktuellen Standard-Auswertemethode von Koloniebildungstests vorbereitet. Die Submission ist geplant für Q3-2020.

Im Teilprojekt mit den generierten radioresistenten Cal33-Zellklonen führt der Partner HMGU aktuell noch die Auswertung von RNASeq-Analysen aus Gewebeproben explantierter Tumore durch. Danach soll zeitnah ein Publikationskonzept erstellt werden.

Die aus der heterogenen Ausgangszelllinie Cal33 isolierten 20 neuen Subklone werden aktuell zellbiologisch im Hinblick auf die Strahlenantwort charakterisiert (Zellzyklus-Arrest, Induktion von Apoptose, Nekrose und Seneszenz). Darüber hinaus werden bestrahlte und unbestrahlte Zellpellets für RNASeq-Analysen beim Projektpartner HMGU vorbereitet.

Sonstiges:

Statt des geplanten Halbjahres-Meeting des Verbundes in Berlin fand eine abstimmende Videokonferenz am 06.05.2020 statt. Für den Partner LMU nahmen Dr. Radostin Galabov und Prof. Dr. Kirsten Lauber teil.

Über das Promotionsprogramm der medizinischen Fakultät der LMU konnte ein Promotionsstipendiat gewonnen werden, der seit 2020-07 am Projekt mitarbeitet.

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

Das Projekt wird wie im Projektantrag geplant weiterbearbeitet. Covid-19-bedingt liegt die Gesamtverzögerung des Projektvorhabens beim Projektpartner LMU jetzt bei 15 Monaten.

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

Ernst, A, Hennel, R, Krombach, J, Kapfhammer, H, Brix, N, Zuchtriegel, G, Uhl, B, Reichel, CA, Frey, B, Gaipl, US, Winssinger, N, Shirasawa, S, Sasazuki, T, Sperandio, M, Belka, C, Lauber, K (2020): Priming of anti-tumor immune mechanisms by radiotherapy is augmented by inhibition of heat shock protein 90. *Frontiers in Oncology*, in press.

Abgeschlossene Doktorarbeit: Dr. med. Heidi Kapfhammer: Strahlentherapie plus HSP90-Inhibition: Radiosensibilisierung von strahlenresistenten, aggressiven Weichgewebssarkomen Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2020, Note: Magna cum laude

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 047D</b>
<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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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 (HGMU; 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 Projekt ist Teilprojekt eines Verbundes dessen 4 Arbeitspakete von 6 Projektpartnern in München (BfS, LMU, HMGU), Berlin (CUB), Essen (IFZ) und Freiburg (UKF) gemeinsam bearbeitet werden.

AP1: Netzwerkanalyse und Systemmodellierung

AP2: HNSCC-Tumormodelle und Normalgewebsmodelle zur funktionellen Charakterisierung und präklinischen 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 API-4:*

Zur Ergänzung der Untersuchungen zur Charakterisierung des HNSCC Zelllinien Panels (n = 11) wurde eine weitere Zelllinie bzgl. der Tumorigenität in vivo untersucht und erwies sich als nicht tumorigen. In enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern (HMGU, BfS, LMU, CUB) wurde die Analysen zur molekularen und funktionellen Charakterisierung weitergeführt und unter Federführung des HMGU in einen Manuskript-Entwurf integriert.

Die Versuchsserien zur in vivo Analyse des Einflusses der Inhibition eines SASP Faktors und eines Immunmodulators auf frühe (0-3 Wochen) und späte (ca. 25 Wochen) Normalgewebsveränderungen nach Thoraxbestrahlung (Ausschluss einer gesteigerten Toxizität) wurden zur statistischen Absicherung fortgesetzt (vgl. Zwischenbericht 2-19). Parallel dazu wurden weitere komplementäre in vitro Untersuchungen mit humanen und murinen Normalgewebs- und Tumorzellen durchgeführt und ausgewertet.

Die Datensätze zu zeitabhängigen Veränderungen im Transkriptom muriner Lungengewebsproben nach Thoraxbestrahlung (0 und 15 Gy) wurden bioinformatisch ausgewertet (HMGU); in Vorbereitung der anschließenden Validierung läuft derzeit die tiefergehende Analyse zur Identifizierung regulatorischer Signalwege und einzelner involvierter Kandidaten. Die Etablierung des set-ups für ein in vivo Mucositis-Modell (Kooperation mit LMU und Klinik für Radioonkologie Essen) sowie die Erstellung des Tierversuchsantrags zur Analyse der pathologischen Rolle von Immunveränderungen beim Tumorwachstum und bei strahleninduzierter Mukositis wurden fortgesetzt.

Vom Partner UKF wurden weitere retrospektiv gesammelte Speichelproben (Zellpellets und variable Mengen Speichelüberstand (0,5-5 ml)) von Patienten mit bekannter Mukositis-Reaktion erhalten. Derzeit werden diese Proben aufgearbeitet (RNA/Protein-Isolation) und bzgl. einer veränderten Expression bereits identifizierter Faktoren mit Bedeutung für pathologische Normalgewebs-Reaktionen hin untersucht. Die systematische Analyse dauert noch an.

Bedingt durch die Corona-Pandemie konnte das für Mai geplante Projekttreffen in Berlin nicht stattfinden. Stattdessen wurde am 06.05.2020 eine Videokonferenz durchgeführt, an der V. Jendrossek, D. Klein, F. Wirsdörfer für das IFZ teilnahmen. Das Verbundtreffen in Berlin soll im November/Dezember 2020 nachgeholt werden.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die geplante Weiterarbeit folgt dem Arbeitsprogramm, allerdings mit einer weiteren zeitlichen Verzögerung.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Hansel C, Jendrossek V, Klein D.: Cellular Senescence in the Lung: The Central Role of Senescent Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 May 6;21(9):3279. doi: 10.3390/ijms21093279

Ketteler J, Wittka A, Leonetti D, Roy VV, Estephan H, Maier P, Reis H, Herskind C, Jendrossek V, Paris F, Klein D.: Caveolin-1 regulates the ASMase/ceramide-mediated radiation response of endothelial cells in the context of tumor-stroma interactions. *Cell Death Dis.* 2020 Apr 9;11(4):228. doi: 10.1038/s41419-020-2418-z

Hansel C; Wiesemann A; Lauber K; Heß J; Unger K; Gomolka M, Hornhardt S, Blüthgen N, Zit-zelsberger H.; Jendrossek V.; Klein D. Normal tissue protection by targeting radiation-induced senescence. 5th EACR Conference - A Matter of Life or Death, 12 - 14 February 2020, Bergamo, Italy. (Poster)

Jendrossek V. Novel opportunities for a biologic optimization of radiotherapy. 5th EACR Conference: A Matter of Life or Death, 12 - 14 February 2020, Bergamo, Italy. (Vortrag)

<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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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**

Um die zelluläre Strahlenantwort in einzelnen Zelle zu untersuchen, wurden Assays zur Einzelzellmessung von Signalmolekülen etabliert, und in der Berichtsperiode getestet. Insbesondere wurden in der Berichtsperiode weitere Einzelzell-assays zur Messung der phänotypischen Antwort der Zelle (Apoptose, Seneszenz, Zellzyklus) etabliert und Auswertelgorithmen entwickelt. Hier war der Focus auf Algorithmen, die die Zellzyklusphase aufgrund der gemessenen Zellzyklusmarker automatisch bestimmen können. Auch wurden die experimentellen Fixierungsbedingungen und die Inkubationsbedingungen optimiert, so dass es uns nun möglich ist, große Anzahl von Samples effizient zu messen (> 40). Weiterhin wurden die Barcodes, mit denen man einzelne Samples markiert, um sie dann gemeinsam zu prozessieren, von 20 Samples auf 40 Samples erweitert, so dass sich nun aufwendigere und längere Zeitreihen messen lassen. In einem ersten Schritt wurden diese Einzelzellanalysen gemeinsam mit der AG Lauber (LMU) genutzt, um das ZISS-Trans-Zelllinienpanel von und nach Bestrahlung zu charakterisieren. Die Daten sind derzeit in der Auswertung.

Weiterhin wurde der SPEED2-Algorithmus zur Analyse von Signalwegaktivitäten aus Transkriptomdaten als Webserver und R-Paket implementiert, der nun auch anderen Wissenschaftlern erlaubt, diese Methoden einfach zu nutzen.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Im 2. HJ 2020 sind weitere Experimente zur Validierung des Signalwegs ZISS1 geplant (in enger Kooperation mit den Partnern). Weiterhin werden die ersten Experimente zu Zeitreihen mit Einzelzellmessungen von Signalwegen durchgeführt.

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

Rydenfelt M, Klinger B, Klünemann M, Blüthgen N.: SPEED2: inferring upstream pathway activity from differential gene Expression, Nucleic Acids Res. 2020 Jul 2;48(W1):W307-W312. doi: 10.1093/nar/gkaa236

<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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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. Darüber hinaus 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:

Seit letzter Berichterstattung wurden 55 Proben retrospektiv asservierter Speichelzellen von Patienten (43 prätherapeutisch, 5 während und 7 nach Behandlung) an das IFZ zur Genexpressionsanalyse verschickt. Von diesen Patienten wurden die klinischen Daten über den Verlauf der Radiomukositis für die danach zu erfolgende Analyse aufgearbeitet.

Aufgrund der COVID-19-Pandemie konnten prospektive klinische Untersuchungen seit Ende Februar nicht

protokollgemäß durchgeführt werden; die Kontakte mit Patienten/innen waren auf medizinische Notwendigkeiten (vertretbares Minimum) beschränkt. Eine Rekrutierung von Patienten/innen erfolgte somit lediglich im Februar 2020. Ab Juni wurde die klinische Aktivität entsprechend den Hygienevorgabe wiederaufgenommen.

Zwischenzeitlich wurden die Behandlungspläne bereits bestrahlter ZiSstrans-Patienten für anstehende Analysen aufbereitet und retrospektive Daten für eine Korrelation von Normalgewebsreaktion zu Tumorkontrolle vorbereitet. Spread-Assay Daten wurden validiert. Humane Keratinozyten wurden für zeitabhängige bestrahlungsinduzierte Veränderungen des Transkriptoms, von Proteinmuster und Protein-shedding behandelt und zur Analyse in den Partnerinstitutionen aufgearbeitet.

#### Arbeiten des UKF in AP4:

Zu Patientengewebe und Normalgewebsreaktionen vergleiche auch oben, AP3. Das Studienprotokoll erfasst die Tumorkontrolle. Die im Protokoll vorgesehenen und entnommenen Proben – insbesondere auch die FF-Tumorgewebsproben - werden zur prospektiven Validierung der präklinisch identifizierten prädiktiven Biomarker (vgl. AP1-3) verwendet. Daten bisher eingebrachter und behandelter Patienten sind erfasst, und entsprechende Biomaterialien für die spätere Analyse asserviert. Weitere Präparate teilnehmender Patienten der prospektiven Kohorte werden zur Analytik (Genexpression, Massenspektrometrie) vorbereitet.

#### Arbeiten des UKF in AP5:

Nachwuchsförderung, Training und interdisziplinärer Austausch erfolgten im Berichtszeitraum (s. auch Bericht des Sprechers, Prof. Dr. Zitzelberger) angesichts der Pandemie ab März 2020 lediglich telefonisch und im Rahmen von Videokonferenzen. Die Frequenz dieser virtuellen Treffen wurde erhöht, um einen ausreichenden Austausch aufrecht zu erhalten. In der letzten Januarwoche, also unmittelbar vor Beginn des Berichtszeitraumes, war eine Wissenschaftlerin vom HGMU für 2 Tage in Freiburg zu Gast, um die Methodik mit primären Keratinozyten zu verfeinern sowie um bisherige Ergebnisse und weiteres Vorgehen zu diskutieren.

## **4. Geplante Weiterarbeiten**

FF-Biopsien/Resektate, Speichelproben, Serumproben und Mundschleimhautbiopsien werden nun wieder – das Hygienekonzept berücksichtigend – protokollgemäß gesammelt, tiefgefroren gelagert und die klinischen Daten (Demographie, Tu-Charakteristika, Interventionsparameter und Mukositis-Assessments sowie Überlebens und Tumorkontrolldaten) 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.

*In-vitro*-Radiosensitivitätsteste (spread-assay) der Mundschleimhaut-Keratinozyten der neu-rekrutierten Patienten werden regelhaft durchgeführt. Überstände entsprechender spread-assays werden für die SASP-Analyse (LMU) asserviert.

In Zusammenarbeit mit dem BfS sollen bisherige Daten-Korrelationen von spread-assay und  $\gamma$ H2AX/53BP1-foci validiert werden. Die Methodik zellulärer, *in vitro*-exkretorischer und Serum-exkretorischer Proteomveränderungen nach Strahlenexposition wird in enger Zusammenarbeit mit dem BfS verfeinert.

In Kollaboration mit Kollegen des HMGU werden Veränderungen des Transkriptoms nach Bestrahlung *in vitro* expandierter Keratinozyten – zunächst von Spendern, des Weiteren auch von Patienten – fortgesetzt.

Vorbereitend auf die angestrebte Korrelation von klinischen Befunden mit Daten der Proteom- und Transkriptom-Analysen werden erste Daten-Standardisierungen, -Bereinigungen und Test-Evaluationen durchgeführt.

## **5. Berichte, Veröffentlichungen**

Der Manuskript-Entwurf, in dem der in Vorberichten geschilderte Spread Assay (Testung der bestrahlungsveränderten Proliferations- und die Migrationsfähigkeit von Mundschleimhaut-Keratinozyten) als Methode beschrieben wird, konnte durch die Kooperationspartner mit Details bereichert werden und wird derzeit wieder primär in Freiburg bearbeitet.

<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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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 Brustkrebsdiagnose. 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: Recherche zum Vitalstatus/Todesursachen abgeschlossen/multikausale Codierung der Todesursachen abgeschlossen.
- AP2a: Fragebogensurvey abgeschlossen (Response 80 % von 396 in Frage kommenden Studienteilnehmerinnen). Validierungsstudie: die selbstberichteten Angaben zum Gesundheitsstatus wurden (bei Vorliegen des schriftlichen Einverständnisses der Studienteilnehmerinnen) in einer repräsentativen 10 %-Stichprobe den behandelnden Ärzten (gegen Aufwandsentschädigung) zur Prüfung vorgelegt. Validierungsstudie abgeschlossen.
- AP2b: Kohortenabgleich mit dem Krebsregister Rheinland-Pfalz erst im Quartal III möglich. Verzögerung wurde vom Krebsregister durch die Corona-Krise begründet.  
Krebsregister Baden-Württemberg: das Landeskrebsregister hat um eine detaillierte Güter- und Interessensabwägung unter besonderer Berücksichtigung datenschutzrechtlicher Aspekte gebeten. Diese wurde in Mainz erstellt. Zudem wurde das Votum des Vorsitzenden der „Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister“ (A. Katalinic) eingeholt. Aktuell wird die „Güter- und Interessensabwägung“ vom zuständigen Beauftragten für den Datenschutz (des Landes Baden-Württemberg) geprüft.  
Krebsregister Bayern: Kooperationsbereitschaft liegt vor. Umsetzung jedoch nur, wenn sich das Krebsregister Baden-Württemberg zum Kohortenabgleich bereit erklärt.
- AP3: Datenaustausch mit Ulm ist abgeschlossen, es liegen etwas mehr als 400 Datensätze zur statistischen Auswertung vor.  
Die Datenerhebung in Mainz ist abgeschlossen, es liegen 143 Datensätze für die Fall-Kontroll-Studie vor. Der Datenaustausch mit der Strahlentherapie Süd verlief sehr gut, bis dato konnten ca. 100 Datensätze in die Studiendatenbank übernommen werden. Weitere Datensätze sollen bis Oktober noch folgen.  
Der Datenbankabgleich und die vertragliche Organisation des Datenaustauschs mit der Strahlentherapie Heidenheim ist erfolgt, ein erster Datensatz wurde transferiert. Bis August soll die Initiierung abgeschlossen sein. Bis Oktober sollen 50 Datensätze transferiert und in die Studiendatenbank aufgenommen werden.  
Der Datenbankabgleich und die vertragliche Organisation des Datenaustauschs mit der Strahlentherapie Villingen-Schwenningen ist erfolgt, elf Datensätze wurde transferiert, die Initiierung ist somit abgeschlossen. Bis Oktober sollen 50 Datensätze transferiert und in die Studiendatenbank aufgenommen werden.  
Als weitere Partner wurden die Netzwerkkliniken in Esslingen (Ruit) kontaktiert. Bedingt durch die träge Kommunikation scheint das Interesse an der Studie mitzuarbeiten gering zu sein. Unter Berücksichtigung des zeitlichen Horizontes des Projektes haben wir uns entschlossen, mit den Kollegen nicht weiter zusammenzuarbeiten.  
Aufgrund der Pandemie haben wir uns entschlossen, die Datenerhebung aus den Netzwerkkliniken bis Oktober zu verlängern – ursprünglich war Juli angedacht.
- AP4: Workflow zur Konsolidierung der verschiedenen Datenquellen aus PASSOS und ESKaRa etabliert. Berücksichtigt werden bisher: Daten Mortalitätsstudie PASSOS, Daten Inzidenzstudie PASSOS (Fragebogenstudie), Daten Dosimetriestichprobe PASSOS, Dosis-Daten und Therapie-Daten Dosimetriestichprobe ESKaRa Mainz/Ulm, Daten Dosimetriestichprobe NWK. Beginn der Dokumentation aller Variablen in einem Codebuch.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP2a: Die Formulare der Validierungsstudie (Mainz und Ulm) werden in Quartal III eingegeben (Auftragsvergabe). Plausibilitätsprüfung der Fragebogendaten: vorgesehen für Quartal III. Deskriptive Analysen: Erstellung der SOPs. Durchführung Quartal III – IV.
- AP2b: Das Record Linkage mit den drei in Frage kommenden Krebsregistern (Rheinland-Pfalz, Baden-Württemberg, Bayern) ist für Quartal III/VI 2020 geplant. Verzögerungen durch Corona möglich.
- AP3: Fortführung des Datentransfers und der Datengenerierung aus dem Bereich Strahlentherapie Süd, Villingen-Schwenningen sowie Abschluss der Pilotphase und der Datenerhebung die Strahlentherapie Heidenheim betreffend. Transfer der DICOM-Studiendatensätze aus den Netzwerkkliniken auf den dedizierten Server sowie Export der für die statistische Auswertung relevanten DVHs. Abschluss der gesamten Datenerhebung im 3. Quartal 2020.
- AP4: Abschluss der Konsolidierung und Zusammenführung aller Datensätze aus den epidemiologischen und dosimetrischen Teilstudien. Abschluss der Daten-Dokumentation. Erstellung des Statistical Analysis Plan.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Veröffentlichungen zur ESKaRa-Vorläuferstudie (PASSOS): In Planung: „Impact of self-reported alterations in lifestyle factors and cardiac late effects in breast cancer patients“

<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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<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: Der Vitalstatusabgleich/Adressabgleich über die Einwohnermeldeämter in Ulm und den 16 externen Zentren ist abgeschlossen (insgesamt ca. 8400 Patientinnen); bei „neu“ verstorbenen Patientinnen erfolgt aktuell die individuelle Todesursachen-Recherche über die zuständigen Gesundheitsämter. Anfragedatum am 27.05.2019 (1208 Patientinnen bei 70 Gesundheitsämtern). Nachdem die Unbedenklichkeitserklärungen von Bayern und Baden-Württemberg über Ministerien eingeholt wurden, haben 68 Gesundheitsämter unsere Anfrage beantwortet (1206 Patientinnen). Insgesamt

sind inzwischen 3885 Patientinnen verstorben, von 3775 Patientinnen liegt die Todesbescheinigung vor.

Der Versand der Patientenbefragungen zu Zweitmalignomen und kardialen Ereignissen, welche im Rahmen der Passos-Herzstudie einer erneuten Befragung zugestimmt hatten (Versand der Fragebögen am 05.06.2019 an 1868 Patienten) ist erfolgt. Im Oktober 2019 wurde nochmals an 546 Patientinnen ein Erinnerungsschreiben versendet. Insgesamt haben 1557 Patientinnen eine erneute Einwilligung erteilt und den Fragebogen ausgefüllt zurückgeschickt.

Zur Validierung der Patientinnen-Angaben zu Gesundheitsereignissen ist eine Validierung über den behandelnden Arzt erfolgt. Hierfür wurde eine 15 % - Stichprobenanalyse von Ulmer Patientinnen mit vorliegender Einwilligung zum Arztkontakt durchgeführt. Für die Analyse wurde eine Deskription der 10-Jahres-Altersklassen der in Frage kommenden Stichproben erstellt. Es wurden 54 Ärzte angeschrieben, um die Angaben für 68 Patientinnen zu validieren. Für 48 Patientinnen wurde das Formular von den Ärzten ausgefüllt zurückgeschickt, womit die geplante 10 %-Stichprobe für die Validierung erreicht werden konnte.

Die Patientenfragebögen, die Todesbescheinigungen und die Formulare der Arztanschreiben wurden pseudonymisiert zur Dokumentation und Codierung an das IMBEI Mainz versendet.

Somit konnten bis Juni 2020 die Arbeitspakete 1 und 2 abgeschlossen werden.

- 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. Inter-Observer-Vergleich zum PASSOS-Herzatlant. Für insgesamt 416 Patienten Herz mit Teilstrukturen Myokard, linke/rechte Herzvorderwand, Aortenklappe, Pulmonalklappe, Reizleitungssystem, Lunge konturiert und Dosisvolumenhistogramme erstellt. Für insgesamt 416 Patienten eine verbesserte Teilstruktur zur Repräsentation des Reizleitungssystems konturiert. Dokumentation zugehöriger Fall- und Behandlungsdaten in ESKaRa-spezifischem Standard-Format. Verschlüsselung der Patientenennung zum Abgleich zwischen Gynäkologie- und Strahlentherapie-Patienten bei Studienzentrale Mainz. Die anonymisierten Bilddatensätze, Bestrahlungsplandaten und Dokumentation wurden Datenschutz-konform von Ulm nach Mainz transferiert. Konturierungsanleitung für die Segmentierung der Lunge erstellt. Lunge Rechts/Links/Gesamt für 416 Patienten konturiert und dosimetriert.

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

AP1+2: Abgeschlossen.

AP3: Vorauswertung der Daten für Publikation.

#### **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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 984.192,00 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**

Trotz der Covid-19 Pandemie und einem stark eingeschränkten Laborbetrieb konnten dennoch einige Arbeiten fortgeführt werden: Im Rahmen des GSI-FAIR Phase 0 Strahlzeitbetriebs konnten weitere Bestrahlungen von Organoiden an Tag 20 der Differenzierung mit Kohlenstoffionen durchgeführt werden. Damit liegen nun drei unabhängige Versuchsreihen mit diesem Ion vor und werden mit entsprechenden Versuchsreihen mit Röntgenstrahlung verglichen. Die am Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum durchgeführten Bestrahlungen von reifen Organoiden (d80) mit Protonen unter Therapiebedingungen (3, 6, 10 und 15 Gy; SOBP; 200 MeV) wurden fortgeführt. Hier zeigte sich, dass sehr spät nach Bestrahlung ( $\geq 80$  Tage) Strahlennekrose-artige morphologische Veränderungen zu beobachten sind, die im SOBP Bereich (entsprechend dem Tumorgewebe) deutlich häufiger und stärker auftraten als im Plateaubereich (entsprechend dem Normalgewebe). Dies entspricht der in vivo Situation, in der strahlenbasierte nekrotische Prozesse lange nach Therapie auftreten. Das in vitro System bildet daher die in vivo Situation optimal ab.

Die Differenzierung mit Protokollen, welche die Bildung von Gliazellen begünstigen, wurde begonnen. Hier befinden sich die Proben in einem Differenzierungsstadium, in dem die ersten Proben genommen und analysiert werden können.

Für das AP2 wurden weiterhin Neurosphären und Organoide zur Verfügung gestellt, um Messungen der Zellfunktion mithilfe von MEAs zu optimieren.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Die Bestrahlungsversuche von reifen Organoiden mit konventioneller Röntgenstrahlung, Protonen und Kohlenstoffionen werden weitergeführt und mit der Gabe des Chemotherapeutikums Cisplatin kombiniert. Diese Versuche finden sowohl in der GSI als auch am Heidelberger Ionen-Therapiezentrum (HIT) statt.

Fortgeführt wird ebenfalls die Generierung von Organoiden mit einem höheren Anteil an Gliazellen und Mikroglia.

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

Celine Schielke, Carola Hartel, Marco Durante, Sylvia Ritter, Insa S Schroeder: Solving the issue of ionizing radiation induced neurotoxicity - new state of the art cell models meet state of the art accelerator facilities, *Frontiers in Physics, Section Medical Physics and Imaging* (in revision)

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Hochschule 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> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 678.020,00 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 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 Chemotherapie, 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

Trotz des sehr stark eingeschränkten Laborbetriebs während der Covid-19 Pandemie, konnten im ersten Halbjahr 2020 sowohl die Arbeiten mit den Neurosphären, als auch die Experimente mit den von AP1 zur Verfügung gestellten Organoiden fortgesetzt werden.

Bereits im Berichtszeitraum 2019/2 wurden – durch die Verwendung von Platingewichten und MEAs mit dreidimensionalen, pyramidenförmigen Elektroden – erfolgreich neuronale Signale von Organoid-Slices an vereinzelt Elektroden detektiert. Im Berichtszeitraum wurde dieser Versuch wiederholt und die Ergebnisse validiert. Erneut konnten neuronale Signale in Form einzelner Spikes und Bursts detektiert werden. Um zu überprüfen, ob dieses Protokoll zur funktionalen Analyse der Organoid-Slices auf Standard MEAs mit planaren Elektroden übertragen werden kann – was aufgrund der hohen Anzahl im Labor vorhandener Standard MEAs zu einer deutlich höheren Probenanzahl führen würde - wurde eine umfangreiche Versuchsreihe hierzu durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei vereinzelt Proben und an vereinzelt Elektroden neuronale Signale detektiert werden können, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als mit dreidimensionalen Elektroden.

Das Modellsystem der Neurosphären wurde verwendet, um die Auswirkungen einer chronischen Exposition des Chemotherapeutikums Cisplatin zu untersuchen. Um die Effekte dieser Exposition auf das Größenwachstum der Neurosphären und damit auf das Proliferationsverhalten der Zellen analysieren zu können, wurde zunächst das Herstellungsprotokoll modifiziert, um die Bildung von Neurosphären mit einer homogenen Größe zu gewährleisten. Hierfür wurden die Neurosphären nicht wie sonst in low-adhesion Zellkulturflaschen, sondern in Biofloat™ 96-well Platten angesetzt. Die Ergebnisse zeigen die Bildung einzelner Neurosphären in den Wells, deren Größe untereinander vergleichbar ist. Die so hergestellten Neurosphären werden seit einigen Wochen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Cisplatin kultiviert und hinsichtlich ihrer Größe analysiert. Die Auswertung der Daten wird derzeit durchgeführt. Ferner werden die Neurosphären für die Aussaat und die anschließende funktionale Analyse mit MEA Chips vorbereitet.

Im Rahmen einer Projektarbeit wurde des Weiteren eine umfangreiche Studie zum Thema „Das Medulloblastom bei Kindern und Jugendlichen und ihre Behandlung“ durchgeführt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die Experimente zur Auswirkung von Cisplatin auf die Funktionalität von Neurosphären werden fortgeführt. Der Schwerpunkt wird hierbei auf der Langzeitexposition der Neurosphären mit Cisplatin unterschiedlicher Konzentrationen sowie auf den anschließenden funktionalen Analysen liegen. Ferner sollen die Neurosphären nach einer ca. 3 Wochen andauernden Cisplatin Exposition mit Röntgenstrahlung bestrahlt und nachfolgend auf die MEA Chips aufgebracht werden.

Fortgeführt werden ebenfalls die elektrophysiologischen Ableitungen der Organoid-Slices.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

M. Mayer, O. Arrizabalaga, M. Ciba, I. S. Schröder, S. Ritter and C. Thielemann: Novel in Vitro Assay to Investigate Radiation Induced Changes in the Functionality of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurospheres, *Neurotoxicology* 79, p. 40-47, 2020

Julia Schuba: Das Medulloblastom bei Kindern und Jugendlichen und ihre Behandlung, Projektarbeit, Hochschule Coburg/Technische Hochschule Aschaffenburg, 2020

<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 31.01.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 3.335.237,00 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: Es fanden ergänzende Messungen an einem freiwilligen Patienten nach Radonkur sowie mit dem mechanischen Lungenmodell statt. Die Messungen zur Radon-Löslichkeit und des Diffusionsverhaltens wurden fortgeführt und um Experimente zur Dosisbestimmung während der Exposition ergänzt. Der neu bestellte Detektor ist mittlerweile eingetroffen. Schwerpunkt der Arbeiten war die Analyse bereits gesammelter Daten. Eine Publikation zu Wirkung und Risiko der Radontherapie wurde fortgesetzt, weitere Veröffentlichungen zur Radonlöslichkeit, mechanischem Lungenmodell und den Probandenmessungen sind in Vorbereitung. Für andere APs wurden Bestrahlungen an der Alphaquelle durchgeführt.
- AP3: Das Zellüberleben von undifferenzierte Bronchialepithelzellen (NHBE) von 2 jungen Spendern wurde nach einer Bestrahlung mit  $\alpha$ -Teilchen ( $n = 5$ ) gemessen. Bei gleicher Dosis führt  $\alpha$ -Strahlung zu einem deutlich geringeren Zellüberleben als Röntgenstrahlung. Für die Analyse der Funktionalität des ausdifferenzierten Bronchialepithels, d. h. der mukoziliären Reinigung, wurde eine video-basierte Software entwickelt. Erste Experimente zeigen, dass Röntgenstrahlung den Mucustransport beeinträchtigt. Für die Untersuchung von Chromosomenschäden im Rahmen der RAD-ON02 Studie wurden weitere Proben nach der 2. Bäderserie erhalten und aufgearbeitet; die Analyse der Proben der 1. Bäderserie wurde fortgesetzt.
- AP4: Die antioxidativen Mechanismen der Endothelzellen wurden unter laminaren (Flow Chamber) Bedingungen nach Helium- und Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlung weiter untersucht (mit AP6). Nukleäre Translokationsstudien des Hauptregulatorgens NFATc1 für die Osteoklasten-Aktivität wurden nach Röntgenbestrahlung mittels konfokalen Mikroskop durchgeführt. Gene, die downstream von NFATc1 liegen, wurden über Literaturrecherche zur qPCR-Analyse identifiziert. Trotz der Pandemie und den eingeschränkten Bedingungen im Labor wurden drei weitere humane Gewebeproben aus dem Knie von Gelenkersatz-Operationen (mit Prof. Rehart, Agaplesion Markus Krankenhaus Frankfurt) bearbeitet. Im Rahmen der RAD-ON02-Studie wurden die letzten zwei Zeitpunkte und weitere Proben der IMMO-LDRT-Studie aufgearbeitet. Ein Hauptschwerpunkt war die Analyse der bereits gesammelten und aufgearbeiteten Proben zur Osteoklasten-Differenzierung und Aktivität.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- AP1: Die Auswertung der bisherigen Probandenmessungen soll durch Experimente ergänzt und finalisiert werden. Der neue Detektor soll in Betrieb genommen und für weiterführende Experimente am Probanden sowie zur Löslichkeits- und der Diffusionsverhaltensmessung genutzt werden. Die Publikation zum therapeutischen Effekt und dem Risiko der Radontherapie soll eingereicht und weitere Publikationen zur Löslichkeit, Lungenmodell und Probandenmessung vorbereitet werden. Bestrahlungsservice für andere APs ist eingeplant.
- AP3: Es soll die Wirkungen von  $\alpha$ -Strahlung auf die Differenzierungsfähigkeit der NHBE der beiden Spender in der „AirLiquid Interphase“-Kultur untersucht werden. Weiterhin ist geplant, die Altersabhängigkeit der Strahlenreaktion von NHBE zu analysieren. Für die zytogenetischen Untersuchungen im Rahmen der RAD-ON02 Studie sind alle Proben vorhanden und zur Aufnahme und Auswertung vorbereitet, so dass nun schwerpunktmäßig an den Mikroskopaufnahmen und der Chromosomenanalyse gearbeitet wird. Bei der Analyse hat sich das System der internen Verblindung der Proben vor und nach Therapie bewährt und wird routinemäßig eingesetzt.
- AP4: Weitere Experimente zur Untersuchung der antioxidativen Mechanismen in Endothelzellen mit Röntgenbestrahlung unter laminaren Bedingungen und weiteren Adhäsionsassays werden durchgeführt (mit AP4). Die Etablierung der Methode zum Live-Imaging auf Knochen und die Überprüfung strahleninduzierter Änderungen in OC durch automatisierte 3D Aufnahmen werden weiter fortgesetzt. Die Gewebeproben aus dem Knie von Gelenkersatz-Operationen werden weiter untersucht. Die ausgewählten Gene in Adipozyten und Osteoklasten werden mittels qPCR untersucht. Die IMMO-LDRT Studie läuft bis zum Abschluss der Probensammlung weiter. Die Proben der RAD-ON02-Studie werden aufgearbeitet.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Johanna Mirsch, Lisa Hintz, Andreas Maier, Claudia Fournier, Markus Löbrich: An assessment of radiation doses from radon exposure using a mouse model system. International Journal of Radiation Oncology, biology, physics; Accepted for publication: 18 May 2020

<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 31.01.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.046.137,00 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

Im letzten Halbjahr wurden mechanistische Studien zur beobachteten ineffizienten Reparatur nach niedrigen Strahlendosen durchgeführt. Vorangegangene Studien in kultivierten Fibroblasten zeigten, dass die ineffiziente Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) nach einer Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung durch Radikale stimuliert werden kann (Grudzenski et al., DOI: 10.1073/pnas.1002213107, Dissertation J. Mirsch). Unsere Experimente zeigten, dass die Reparatureffizienz und die Aktivität von DNA-PK, der hauptverantwortlichen Kinase für die Reparatur, gleichermaßen durch Radikale (induziert durch eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung) verbessert werden kann.

Wir vermuten daher, dass die ineffiziente Reparatur mit der verminderten Aktivität der DNA-PK zusammenhängt. Um die Rolle der Radikale bei der Stimulation der DNA-PK bzw. der Reparatureffizienz zu überprüfen, nutzten wir Neocarcinostatin (NCS) als Radiomimetikum, um DSBs in den Zellen zu erzeugen. In diesen Experimenten wurde ein stärkerer Reparaturdefekt als nach der Bestrahlung, mit einer im Bezug auf die Anzahl der induzierten DSBs vergleichbaren Strahlendosis, beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Reparaturprozesse stärker von einem global erhöhten Radikallevel in der Zelle nach Bestrahlung stimuliert werden als durch das von NCS lokal um die Bruchstelle generierte Radikallevel. Die Schlüsselexperimente der Studie wurden inzwischen mit einer zweiten Zelllinie (Epithelzellen) bestätigt. Leider erwies sich der Assay zur direkten Messung des Radikallevels als nicht sensitiv genug für die vorgesehenen Analysen, weshalb wir andere Assays auf ihre Eignung prüfen werden.

Darüber hinaus haben wir mit den Untersuchungen zur Regulation der DNA-PK-Aktivität in Abhängigkeit der Strahlendosis bzw. des Radikallevels begonnen. Wir vermuten, dass die DNA-PK-Aktivität durch andere Proteine gesteuert wird, die auf das Radikallevel in der Zelle reagieren können. Ein solcher Regulationsmechanismus ist z. B. bei den Peroxiredoxinen (PRDX) bekannt und wurde von Somayjit et al. (2017, DOI: 10.1126/science.aao3172) für den Replikationsapparat beschrieben. In weiteren Experimenten werden wir untersuchen, ob hier ein ähnlicher Mechanismus vorliegt.

Neben den mechanistischen Studien wurde im Dezember 2019 das Manuskript "An assessment of radiation doses from radon exposures using a mouse model system" zur Biodosimetrie fertiggestellt (in Zusammenarbeit mit AP1) und zur Veröffentlichung eingereicht. Im Rahmen des Review-Prozesses beim International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics (Red Journal) wurden weitere Experimente durchgeführt, um die Ergebnisse der Biodosimetrie durch die Färbung eines weiteren Schadenmarkers im Gewebe bzw. Experimenten zur Dosisrate in kultivierten Zellen zu untermauern. Das resultierende Manuskript wurde zur Publikation angenommen.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die mechanistischen Studien zum Zusammenhang zwischen der Aktivierung von DNA-PK und der Reparatureffizienz werden fortgesetzt. Um den Mechanismus zu charakterisieren, werden wir neben den molekular-biologischen auch biochemische Techniken etablieren und einsetzen. Darüber hinaus werden wir die Etablierung der Mess- und Aufnahmeeinstellungen am Mikroskop für die Lebendzellmikroskopie fortsetzen und wichtige Experimente aus den mechanistischen Studien wiederholen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Im Mai 2020 wurde die Biodosimetrie in Mäusen nach Radonexposition vom Red Journal zur Veröffentlichung angenommen: Mirsch J. et al.: Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2020 May (online ahead of print)

<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 31.01.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 657.792,00 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

In dem Arbeitsprogramm werden weiterhin die kausalen Zusammenhänge zwischen der Wirkung von ionisierender Strahlung und der Stimulation von T-Zellen über eine definierte  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Signalkaskade untersucht. Im letzten Arbeitsbericht wurde bereits eine Publikation zu dem Thema angekündigt, die weiterhin in Arbeit ist und kurz vor dem Abschluss steht. Die Fertigstellung der Publikation hat sich verzögert, da wir für einige Messbedingungen die Anzahl an Versuchswiederholungen erhöhen mussten. Die neuen Experimente haben im Wesentlichen die vorherigen Arbeiten bestätigt; dadurch konnten wir eine viel bessere und statistisch solidere Datenlage erlangen, um die Dynamik der Strahleninduzierten Translokation des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  abhängigen *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NF-AT) vom Cytosol in den Zellkern zu dokumentieren und mit anderen etablierten Faktoren zur Stimulation von T-zellen zu vergleichen. Parallel dazu haben wir für eine folgende Publikation einen weiteren Aspekt in dem System experimentell aufgegriffen. In den vorliegenden Daten fällt auf, dass zwischen der akuten Bestrahlung und dem Auftreten von  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillationen bis zu 30 Minuten vergehen. Diese lange Latenzzeit ist schwer zu erklären, da anders als ursprünglich angenommen, strahleninduzierte Radikale dafür nicht verantwortlich sein können. Diese wurde inzwischen durch Experimente mit Radikalfängern in den Zellen untermauert. Um die Prozesse, die in der

Latenzzeit durch Strahlung ausgelöst werden, besser zu verstehen haben wir untersucht ob der Bestrahlungsstress möglicherweise auf eine frühe Interaktion mit der *Store operated Ca<sup>2+</sup> entry* (SOCE) Signalkaskade erklärbar ist. Offensichtliche Kandidaten sind die Phospholipase C (PLC), die für die Aktivierung des Botenstoffes IP<sub>3</sub> verantwortlich ist und der IP<sub>3</sub> Rezeptor der die Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup> aus internen Speichern auslöst. Die ersten Messungen zeigen, dass eine Inhibierung des IP<sub>3</sub> Rezeptors in der Tat die Translokation von NF-AT in den Zellkern reduziert. Da Inhibitoren immer ungewollte Nebeneffekte haben, werden wir das gleiche mit einem genetischen Ansatz testen indem die Expression der PLC durch siRNA unterdrückt wird. Die methodischen Vorbereitungen für diese Untersuchungen sind im Gange. Im zweiten Arbeitsprogramm wird die Wirkung von Radon auf die Schmerzweiterleitung untersucht. Mittels Western Blot wurden Hirne von Radon behandelten arthritischen Mäusen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktor C-fos nach Radon Behandlung vermindert ist. Dieses Ergebnis deutet auf eine veränderte Schmerzverarbeitung nach Radonbehandlung hin. Experimentell konnte durch gezieltes einbringen von NMDA Rezeptoren in CHO Zellen eine erhöhte Radondosisdeposition in Zellsystemen mit NMDA Rezeptoren festgestellt werden. Erste Dosisberechnungen zeigen, dass durch die NMDA Rezeptoren die deponierte Dosis um ca 50 % erhöht ist.

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

In den laufenden Arbeiten werden Experimente durchgeführt, die den Einfluss von Strahlung auf die frühen Schritte der *Store operated Ca<sup>2+</sup> entry* (SOCE) wie IP<sub>3</sub> Synthese und primäre Ca<sup>2+</sup> Freisetzung präzisieren. Dadurch soll eine Antwort auf die Frage nach den primären Targets der Strahlenwirkung gegeben werden. In laufenden Arbeiten in Arbeitspaket 7.2 werden weiterhin die Effekte von äquivalenten Dosen Röntgenstrahlung in einem neuronalen Netzwerk (*in vitro*) mithilfe des Multi Electrode Arrays analysiert. Um ein genaueres Bild der Rezeptororganisation zu erhalten, werden die Post-Synaptischen Hirn Fraktionen sowie das Rückenmark von Radon behandelten Tieren untersucht.

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

Tandl, D., Fuck, S., Sponagel, T., Jacob, B., Fournier, C. Rödel, F., Moroni, A., Thiel, G.: Low dose ionizing radiation induces morphological and immunological modulation of Jurkat cells. (in prep.)

Bachelorarbeit:

Viola Lember: „Auswirkung von Radonexposition auf die Organisation der Rezeptoren im K/BxN arthritischen Mausmodell“

<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 31.01.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 710.793,00 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

Bislang konnte im Rahmen des Projektes eine anti-entzündliche Wirkung von niedrig dosierter Strahlung in Form einer verminderten Leukozytenadhäsion in Zusammenhang mit einer nicht-linearen Expression anti-oxidativer Faktoren wie Superoxid-Dismutase 1 (SOD1), Glutathionperoxidase 1 (GPx1), Catalase und des Transkriptionsfaktors Nrf2 und einer erhöhten intrazellulären ROS-Produktion gebracht werden.

Im vorangegangenen Berichtszeitraum wurden dazu weitere *in vivo* Untersuchungen nach Radonbestrahlung eines Serumtransfer-Mausmodells in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern in Erlangen (AP5) und Darmstadt (AP1, AP4) durchgeführt. Es wurden Blutproben von jeweils 5 unbehandelten und 5 mit Radon bestrahlten Tieren (440 kBq/m<sup>3</sup>) 7 d nach Radonexposition entnommen und RNA daraus isoliert. Die Quantifizierung und Auswertung der mRNA Expression von SOD1, GPx1, Catalase und Nrf2 erfolgte mittels Real-Time PCR. Hierbei zeigte sich eine leichte Erhöhung der Catalase Expression nach Radonbestrahlung.

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen ROS und der Expression anti-oxidativer Faktoren sowie regulatorischer miRNAs unter physiologischeren Bedingungen, wurden im Berichtszeitraum primäre Endothelzellen sowohl mit Kohlenstoff- als auch mit Helium-Ionen unter statischen und dynamischen Bedingungen bestrahlt (Kooperation mit AP4). Nach 24 h wurde die intrazelluläre ROS-Menge durchflusszytometrisch bestimmt und sowohl RNA als auch miRNA isoliert und mit den im vorangegangenen Berichtszeitraum mit Röntgenstrahlung behandelten Proben verglichen. Nach Röntgenbestrahlung zeigte sich dabei ein lokales Minimum der ROS-Produktion sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen bei 0,1 Gy und ein lokales Maximum bei 0,5 Gy, während anti-oxidative Faktoren nach 0,1 Gy unter dynamischen Bedingungen maximal exprimiert waren. Auch Bestrahlungen mit Kohlenstoff- und Helium-Ionen resultierten in einer nicht-linearen Dosis-Wirkungsbeziehung unter dynamischen Bedingungen im Hinblick auf die Expression anti-oxidativer Faktoren und der intrazellulären ROS-Menge. Dabei zeigte sich insbesondere nach Schwereionenbestrahlung eine deutlich geringere Regulation bei statischen im Vergleich zu dynamischen Verhältnissen.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Im Rahmen des Projektes wird fortlaufend RNA/miRNA aus Blutproben von Patienten, die im Rahmen der RADON-02 und IMMO-LDRT01 Studien vom Projektpartner in Erlangen (AP5) gesammelt werden, isoliert (Task 23). Direkt im Anschluss wird cDNA aus den RNA-Proben synthetisiert. Zur Aufschlüsselung der genauen Zeitkinetik der Expression anti-oxidativer Faktoren, regulatorischer miRNAs und der daraus resultierenden intrazellulären ROS-Menge werden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung von primären Endothelzellen mit 0 bis 1 Gy unter statischen und dynamischen Bedingungen die mRNA Expression anti-oxidativer Faktoren, ROS Produktion und die Adhäsion von Leukozyten überprüft. Die Ergebnisse sollen weiteren Aufschluss über den genauen zeitlichen Zusammenhang zwischen intrazellulärer ROS-Produktion und der Leukozytenadhäsion an Endothelzellen unter physiologischeren dynamischen Bedingungen liefern (Task 25).

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Schlossplatz 4, 91054 Erlangen		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 050E</b>
<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 31.01.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 1.292.552,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Gaipf	

## 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

Die Daten der IMMO-LDRT01- und der RAD-ON02-Studie wurden im Februar 2020 auf dem *European Workshop of Rheumatology Research* (EWRR) in Leuven, Belgien präsentiert. Die neue Multi-Array Technologie von MSD wurde für die Analyse von Zytokinen und Entzündungsmediatoren aus humanem Serum im Labor etabliert. Im Rahmen einer zahnmedizinischen Doktorarbeit wurden dann Seren von 100 IMMO-LDRT01 Patienten hinsichtlich der Modulation von 40 verschiedenen Zytokinen untersucht. Passend dazu wurden die Daten zu Lebensqualität und Schmerzen der IMMO-LDRT01 Patienten ausgewertet. Zur Analyse der Daten aus den Schmerz- und Medikamententagebüchern in der RAD-ON02 Studie wurden zwei weitere medizinische Doktorarbeiten vergeben. Die Daten der Immunphänotypisierung wurden für die erste Hälfte der RAD-ON02 Studie bereits ausgewertet. Die aktive Phase der Studie wird im Juli 2020 beendet sein. Im Rahmen der Charakterisierung humaner Osteoklasten wurden Assays zur Analyse der Differenzierung und Knochenresorption etabliert. Ebenso wurden Analysen zur Genexpression etabliert und durchgeführt und sollen nun im Rahmen einer zahnmedizinischen Doktorarbeit fortgeführt werden. Des Weiteren wurde eine retrospektive Analyse der Effektivität von LDRT bei Finger-Polyarthritis durchgeführt und die Daten zur Publikation beim *International Journal of Molecular Science* eingereicht. Diese Publikation dient als Grundlage für eine zukünftige, Placebo-kontrollierte LDRT Studie. Für diese Studie wurde bereits ein Studienschema entworfen und mit der Erstellung eines Ethikantrags begonnen. Außerdem wurde ein Review Paper verfasst, welches den aktuellen Stand der Forschung zur Interaktion zwischen Osteoklasten und Bestrahlung zusammenfasst. Diese Publikation wird ebenfalls im *International Journal of Molecular Science* eingereicht werden. Auf dem EWRR wurden ebenfalls zwei Poster präsentiert auf denen zum einen die aktuellen Ergebnisse des Makrophagen Projekts und zum anderen die des FLS (Synovialfibroblasten) Projekts vorgestellt wurden. Die Teilnahme an diesem Kongress wurde von der DGfI (Deutsche Gesellschaft für Immunologie) mit einem Reisestipendium gefördert. Die longitudinalen Analysen der hTNF- $\alpha$ -tg Tiere wurden fortgesetzt und, da aufgrund der aktuellen COVID-19-Lage zum Versuchszeitpunkt keine Dienstreisen stattfinden konnten, die Proben für die APs Fournier und Rödel/Hehlhans entsprechend den im Jahr zuvor etablierten Protokollen aufgearbeitet und gelagert. Die geplanten Versuche zur Erhöhung der Fallzahl zum Einfluss von LDRT auf den Phänotyp von FLS wurden abgeschlossen. Die Versuche der Doktorarbeiten welche im Teilprojekt FLS sowie der immunologischen Charakterisierung des hTNF- $\alpha$ -tg Mausmodells angesiedelt sind wurden abgeschlossen und die beiden Doktorarbeiten sollen bis Ende 2020 fertig zusammengeschrieben werden. Im Januar 2020 begann eine weitere medizinische Doktorarbeit, welche die geschlechts- sowie entzündungsstatusspezifische Effekte niedriger Strahlendosen auf den Phänotyp sowie die Aktivität von Makrophagen untersucht. In Zusammenhang mit dieser Doktorarbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem AP Rödel/Hehlhans ein Protokoll zur Messung der ROS-Freisetzung mittels Durchflusszytometrie etabliert und schon erfolgreich eingesetzt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Die Rekrutierung in der IMMO-LDRT01-Studie soll weiter vorangetrieben werden. Im Rahmen der RAD-ON02-Studie sollen die immunologischen Daten für die zweite Hälfte der Studie ausgewertet werden. Außerdem wird das Patientenserum mit Hilfe der Multi-Array Technologie von MSD hinsichtlich einer Vielzahl von Zytokinen und Analyten im Rahmen einer zahnmedizinischen Abschlussarbeit untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wird außerdem die Auswertung der Patientenfragebögen vervollständigt. Bei der Charakterisierung humaner Osteoklasten werden die erhobenen Daten zunächst analysiert und dann die im letzten halben Jahr etablierten Assays zur Genexpression und Knochenresorption mit einer Reihe von Spendern durchgeführt. Außerdem sollen weitere Analysen zum Metabolismus der Osteoklasten unter Bestrahlung durchgeführt werden. Des Weiteren soll die Planung und die Anträge für die zukünftige, Placebo-kontrollierte LDRT-Studie vorangetrieben werden. Ein weiterer Radonkammerversuch mit hTNF- $\alpha$ -tg sowie Serumtransfermodell Mäusen soll geplant und durchgeführt werden, sobald sich die COVID-19-Lage weiterhin stabilisiert. Da die Versuche der Doktorarbeiten der Teilprojekte FLS und osteoimmunologische Charakterisierung des hTNF- $\alpha$ -tg Mausmodells abgeschlossen sind, sollen die Daten aufbereitet, mit Daten aus ebenfalls bereits abgeschlossenen Versuchen im jeweiligen Themenkomplex ergänzt, und zur Publikation vorbereitet werden. Im Makrophagenprojekt sollen die Versuche der laufenden medizinischen Doktorarbeit bis Ende des Jahres abgeschlossen werden, ebenso wie eine weitere zahnmedizinische Doktorarbeit im Makrophagenprojekt zu Genexpressionsanalysen nach Strahlenexposition. Die gewonnenen Daten aus beiden Projekten sollen im Anschluss mit Versuchen zur Phagozytose- sowie Migrationsfähigkeit nach Strahlungsexposition ergänzt und publiziert werden. Die medizinische Doktorarbeit, welche sich mit dem Einfluss von niedrig dosierter Strahlung auf Chondrozyten beschäftigt, wird im November 2020 wiederaufgenommen.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Donaubauer A. J. et al.: *Methods Enzymol.* 2020;632:389-415

Frey B. et al.: *Strahlenther Onkol.* 2020 Jun 9.doi:10.1007/s00066-020-01637-5

<b>Zuwendungsempfänger:</b> GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 054A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2020 bis 31.12.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 935.813,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Jakob	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Gegenstand dieses Verbundprojektes ist ein besseres Verständnis des Zusammenspiels von Strahlenqualität (unter besonderer Berücksichtigung dichtungisierender Teilchenstrahlung) und DNA-Reparatur im Chromatinkontext in Abhängigkeit spezifischer Tumorzelleigenschaften um diese Tumorzellen durch gezielte Inhibition für die in der Radiotherapie eingesetzte ionisierende Strahlung zu sensibilisieren, Normalgewebszellen aber nach Möglichkeit unbeeinflusst zu lassen. Um dieses Ziel zu erreichen werden in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen Prof. Dr. M. Löbrich (TU Darmstadt) und Prof. Dr. G. Iliakis (Universität Duisburg-Essen) verschiedene Schwerpunkte bearbeitet und die übergeordnete Fragestellung dieser potentiell sensibilisierenden Tumorzelleigenschaften aus unterschiedlichen Blickwinkeln (Chromatinstruktur, Reparaturwege, Energiemetabolismus) angegangen. Ein fundiertes mechanistisches und molekulares Verständnis ist eine unverzichtbare Grundlage für einen auf wissenschaftlicher Erkenntnis basierenden kombinatorischen Therapieansatz. Neben den wissenschaftlichen Forschungszielen ist auch der Kompetenzerhalt in der Strahlenforschung ein wichtiger Aspekt des Verbundprojektes, dem durch die Ausbildung von wissenschaftlichem Nachwuchs Rechnung getragen wird. Dazu zählen die Einbindung und Ausbildung von Doktoranden ebenso wie die Rekrutierung oder Weiterbeschäftigung talentierter Nachwuchswissenschaftler (Postdoktoranden). Neben der Forschungsarbeit erlaubt das Verbundprojekt dem Nachwuchs durch den regelmäßigen Austausch eine erleichterte Heranführung an die Strahlenforschung beziehungsweise eine Vertiefung vorhandener Kenntnisse sowie eine Vernetzung auf nationaler Ebene.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

AP1 (GSI): Eine der seit langem identifizierten Änderung vieler Tumore ist ihre ausgeprägte Fähigkeit auch unter aeroben Bedingungen Glykolyse zu betreiben und so ihre Energie und Stoffwechselprodukte für eine schnelle Proliferation zu gewinnen und eine dem Tumorwachstum förderliche Umgebung zu schaffen. Ziel in diesem Arbeitspaket ist es den tumor-spezifischen Energiestoffwechsel zu hemmen der normalerweise auch die notwendige Energie bereitstellt um die Reparatur von DNA-Schäden zu gewährleisten, zudem die Reparatur durch eine offene Chromatinstruktur begünstigt und ein reduktives Milieu schafft und so zur Strahlenresistenz beiträgt. Untersucht werden soll, wie sich die Hemmung der Glykolyse auf den Energiehaushalt, die Chromatinstruktur sowie die Wahl der Reparaturwege nach einer Bestrahlung auswirkt und wie dadurch das Überleben der Zellen beeinflusst wird. Zusätzlich soll auch der Einfluss einer Bestrahlung auf das Redoxpotential und die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) analysiert werden, da Tumorzellen oft schon ein erhöhtes oxidatives Stresslevel aufweisen, welches durch die Inhibition der aeroben Glykolyse weiter gesteigert und somit zum Zelltod beitragen könnte. Ein besonderes Augenmerk wird im Rahmen des AP1 auf den Einfluss der Strahlenqualität und der, damit einhergehenden, größeren Schadenskomplexität durch die vergleichende Verwendung dicht ionisierender Teilchenstrahlung gelegt werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Projektbeginn war der 01.01.2020. In dem Berichtszeitraum bis zum 30.06.2020 wurden die projektgebundenen Stellen ausgeschrieben und das Personal rekrutiert. Am 01.03.2020 wurde die Stelle der Postdoktorandin mit Frau Dr. Katja Kratz besetzt, einer Molekularbiologin, die schon zu ihren Studienzeiten in der Biophysik-Abteilung der GSI gearbeitet hat und in den letzten Jahren im Ausland viel Erfahrung in dem Feld der DNA-Reparatur erwerben konnte und nun diese Kenntnisse in Bezug zur Strahlenbiologie vertiefen kann. Am 15.05.2020 wurde der Doktorand Dmitri Baulin eingestellt, der seine bisherigen Erfahrungen in der Zellbiologie im Bereich der DNA-Reparatur erweitern will. Die Stelle der technischen Assistentin wurde am 01.06.2020 mit Frau Dr. Lisa Sha besetzt, die mit ihrem pharmazeutischen Wissen sowie ihren Kenntnissen in der Zellkultur- und molekularbiologischen Methoden das Projekt unterstützen wird.

Nach methodischer Planung wurde mit den praktischen Forschungsarbeiten aufgrund der Laboreinschränkungen durch die Corona-Krise und dem Lüftungsumbau Mitte Mai gestartet. In dem Zeitraum bis Ende Juni wurde das Personal in die nötigen Techniken für dieses Projekt eingewiesen und die Nutzung bestimmter Methoden und Geräte etabliert und optimiert. Es wurde begonnen, die in unserem Institut vorhandenen Tumor- und Normalgewebszelllinien systematisch bezüglich ihres metabolischen Verhaltens zu charakterisieren, um geeignete Kandidaten als Modellsystem zu identifizieren.

Das für Mai/Juni geplante Kick-off Meeting wurde aufgrund der Einschränkungen durch Covid-19 auf September verschoben und wird voraussichtlich virtuell abgehalten werden. Der Berichtszeitraum wurde aber genutzt, um nach intensiven Beratungen der Projektpartner einen gemeinschaftlichen Strahlzeitantrag (Teilchenstrahlung an den Beschleunigern der GSI) beim GSI-BIO-PAC (Program Advisory Committee) zu stellen. Dieser wurde am 22. Juni vorgetragen. Die Entscheidung über die Strahlzeitvergabe steht noch aus.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

Zuerst sollen anhand bestehender Literatur Zelllinien ausgewählt werden, deren spezifische Eigenheiten, z. B. der Verlust von p53, wie er in Tumoren häufig vorkommt, einen Einfluss auf deren Metabolismus ausüben könnten. Mittels Proteinextrakten soll die An-/Abwesenheit der Zielproteine mittels Western Blot verifiziert und anschließend die Zelllinien im Seahorse-Analyser auf ihre metabolische Aktivität getestet werden. So sollen Tumorzelllinien identifiziert werden, die für unser Projekt einen ausreichend glykolytischen Metabolismus aufweisen.

Die potentiellen Kandidaten-Zelllinien werden intensiver getestet um ihr metabolisches Verhalten unter verschiedenen Kulturbedingungen, wie zum Beispiel zuckerhaltiges oder zuckerarmes Kulturmedium, zu charakterisieren. Anschließend wird der Einfluss von 2-Deoxyglukose, einem HexokinaseII (HKII) Inhibitor, auf den glykolytischen Metabolismus getestet. Vergleichende Untersuchungen mit Kontrollzellen sind geplant.

Im nächsten Schritt soll die Strahlenempfindlichkeit der ausgewählten Zelllinien mittels Röntgenstrahlung charakterisiert werden. Nach einer Dosisoptimierung des Inhibitors (Toxizitätstests) ist geplant die Sensibilisierung von Tumor- und Kontrollzellen auf Strahlung durch Behandlung mit dem HKII-Inhibitor zu analysieren sowie den optimalen Behandlungszeitpunkt (Inhibitorgabe) festzulegen. Dazu wird das zelluläre Überleben sowie DNA-Reparaturkinetiken mittels  $\gamma$ -H2AX Assay gemessen. Weitere Methoden zur Messung der Chromatindichte und des Redoxzustandes bzw. der ROS Produktion sollen in Hinblick auf die geplanten Strahlzeiten mit Kohlenstoffionen (Frühjahr 2021) etabliert werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen	<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 054B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt B	
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung	
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2020 bis 31.12.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 913.833,01 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Iliakis

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Vorarbeiten in unserem Labor konnten zeigen, dass globale Manipulationen der Chromatinstruktur, z. B. hervorgerufen durch Tonizitätsveränderungen, erheblich die Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur durch Homologe Rekombinationsreparatur (HRR) verschlechtern und gleichzeitig Single Strand Annealing (SSA) deutlich verbessern. Da dieser Eingriff in die Chromatinstruktur jedoch von begrenzter physiologischer Relevanz ist, werden in diesem Projekt die Rollen zweier Schlüsselkomponenten der Chromatinorganisation untersucht: CTCF und Cohesin, die für die globale Organisation des Chromatins essentiell sind und zudem eine noch nicht aufgeklärte Rolle in der HRR spielen. Da die topologische Organisation des Chromatins u. a. die Reaktion auf DSBs sowie die Wahrscheinlichkeit und Beschaffenheit von Verarbeitungsfehlern (z. B. Translokationen), die zur Karzinogenese führen können, bestimmt, werden wir die Rollen von CTCF und Cohesin auf die Gesamtantwort auf DSBs untersuchen. Hierbei liegt ein besonderer Fokus auf der Analyse der Verarbeitung von DSBs unterschiedlicher Komplexität, die durch Teilchenbestrahlung bei der GSI, aber auch enzymatisch lokal induziert werden kann.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- Etablierung des Knockdowns von CTCF und Cohesin mithilfe der RNA Interferenz in normalen humanen Fibroblasten und Epithelzellen sowie in humanen Tumorzellen. Außerdem Einarbeitung in CRISPR/Cas9 Technologie für Knockout Experimente von CTCF in A549 Zellen.
- Untersuchung der Rolle von CTCF und Cohesin auf verschiedene DSB Reparaturwege mithilfe von U2OS Reporter Assay Zelllinien sowie tiefergehende Analyse hinsichtlich der HRR mittels Rad51 Foci Analyse in der S/G2-Phase des Zellzyklus mithilfe konfokaler Mikroskopie.
- Untersuchung der Rolle von PAR in der Rekrutierung von CTCF und Cohesin an DNA Schäden. Hier sollen verschiedene PARP1 Inhibitoren sowie PARP1<sup>-/-</sup> A549 Zellen genutzt werden (in Zusammenarbeit mit AP2).
- Analyse des Einflusses von CTCF und Cohesin auf DSB Reparatur durch klassische Nicht-Homologe Endverknüpfung (cNHEJ) nach hoher Strahlendosis (5 – 40 Gy) mittels PFGE sowie im Niedrigdosisbereich durch die Auswertung von  $\gamma$ H2AX Foci mittels konfokaler Mikroskopie. Fokus liegt hier auch auf der  $\gamma$ H2AX Fokusgröße (in Zusammenarbeit mit AP1). Zusätzlich sollen DNA-PK Inhibitoren eingesetzt werden, um die Funktion der alternativen Endverknüpfung (altEJ) ebenfalls zu untersuchen.
- Untersuchung der Rolle von CTCF und Cohesin auf die ATM und ATR Signalwege und die G2-Kontrollpunktaktivierung. Hier soll zwischen Zellen, die in der S- bzw. G2-Phase bestrahlt wurden,

unterschieden werden. Zusätzlich soll der S-Phase Kontrollpunkt mithilfe der Inkorporation von radioaktiv markiertem Thymidin analysiert werden.

- Mittels klassischer Zytogenetik soll die Bildung von Chromosomenaberrationen in normalen humanen Fibroblasten und RPE-1 hTert Zellen untersucht werden, in denen CTCF bzw. Cohesin herunterreguliert wurde. Fokus liegt hier auf der G1- bzw. G2-Phase

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

In der Anfangsphase des Projekts wurde vor allem eine siRNA vermittelte Herunterregulierung von CTCF und Cohesin angestrebt. Hierfür wurden zunächst verschiedene siRNAs für CTCF sowie für verschiedene Untereinheiten des Cohesins in U2OS Zellen getestet. Nachdem zunächst der Knockdown von CTCF etabliert werden konnte und mittels Western Blot Analyse bestätigt werden konnte, wurden vier verschiedene Reporter Assay Zelllinien (U2OS DRGFP, U2OS SAGFP, U2OS EJ5GFP, U2OS EJ2GFP) eingesetzt, mit denen die Reparatureffizienz verschiedener DSB Reparaturwege nach DSB Induktion mittels I-SceI Endonuklease untersucht werden konnte. Die Induktion der DSBs erfolgte 24 Stunden nach siRNA Transfektion und mittels Durchflusszytometrie wurden GFP-positive Zellen 24 Stunden nach I-SceI vermittelter DSB Induktion gemessen. In diesen Experimenten konnten wir keinen Effekt des CTCF Knockdowns auf die cNHEJ (U2OS EJ5GFP) feststellen. Die anderen Reporter Zelllinien zeigten jedoch deutliche Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, so dass wir annehmen, dass CTCF einen Einfluss auf die DNA Endresektion hat. Abgesehen von cNHEJ (U2OS EJ5GFP) sind alle anderen Reparaturwege (HRR (DRGFP), SSA (SAGFP), altEJ (EJ2GFP)) resektionsabhängig. Die Rolle von CTCF in diesen Reparaturwegen soll in weiteren Experimenten eruiert werden.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

- Die siRNA vermittelte Herunterregulierung von CTCF sowie von Cohesin soll in humanen Epithelzellen (RPE-1 hTert), in humanen Fibroblasten (82-6 hTert) und humanen Tumorzellen (A549) etabliert werden.
- Da CTCF einen Einfluss auf resektionsabhängige DSB Reparaturwege zu haben scheint, soll mithilfe der Durchflusszytometrie die DNA Endresektion in Zellen nach CTCF Knockdown und Bestrahlung untersucht werden. Hierfür wird eine kombinierte EdU-RPA70-Färbung angewendet, um nur Zellen in der G2-Phase zu analysieren.
- Um ebenso den Einfluss vor allem auf die HRR zu untersuchen, sollen Rad51 Foci sowie RPA70 Foci in Zellen nach CTCF Knockdown und Bestrahlung durch konfokale Mikroskopie untersucht werden. Zusätzlich wird hier ebenso die Bildung von  $\gamma$ H2AX und 53BP1 Foci untersucht.
- Außerdem soll der Einfluss der Herunterregulierung von CTCF und Cohesin auf die Bildung von Chromosomenaberrationen (z. B. Translokation) mithilfe der klassischen Zytogenetik in humanen Epithelzellen, Fibroblasten und Tumorzellen bestimmt werden. Hier soll zunächst der Fokus auf Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus gelegt werden, da in dieser Phase alle Reparaturwege aktiv sein können.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Krieger L.M., Mladenov E., Soni A., Demond M., Iliakis G.: Global chromatin decondensation disrupts DDR signaling and shifts DSB repair to single strand annealing. DNA Repair (Amst). 2020 – under revision

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 054C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2020 bis 31.12.2023	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 804.799,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Löbrich	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Der Schwerpunkt des geförderten Projekts liegt auf der Charakterisierung der beiden Faktoren Rad52 und ATRX, welche Ansatzpunkte für eine individualisierte Strahlentherapie darstellen können. Ziel ist es dabei, die Funktion von Rad52 und ATRX während der Homologen Rekombination (HR) in Normalgewebs- und Tumorzellen aufzuklären, somit einen wichtigen grundlagenwissenschaftlichen Beitrag zum Verständnis der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) im Kontext von Chromatin zu leisten und letztendlich zu einer klinischen Anwendung dieser Erkenntnis beizutragen.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

Bisherige Studien konnten zeigen, dass BRCA2-defiziente Tumorzellen durch einen Verlust von Rad52 effektiv abgetötet werden. Eigene Vorarbeiten gaben Hinweise darauf, dass dies auf die Nutzung eines fehlerbehafteten Reparaturwegs (Alt-NHEJ) zurückzuführen ist, der zur Ausbildung toxischer chromosomaler Veränderungen führt. Dieser Prozess, welcher durch die Polymerase Pol $\theta$  vermittelt wird, scheint von Rad52 unterdrückt zu werden.

Im *ersten Teil* des Teilprojekts soll diese Hypothese überprüft und das Wechselspiel von Rad52 und Pol $\theta$  an resektierten DSBs genauer charakterisiert werden. Dadurch sollen die Mechanismen, die zur Empfindlichkeit von BRCA2-defizienten Tumoren gegenüber einer Rad52-Inhibierung beitragen, genauer verstanden und ein wichtiger Beitrag für den Einsatz von Rad52-Inhibitoren in der Krebstherapie geleistet werden.

Der *zweite Teil* des Teilprojekts beschäftigt sich mit dem Chromatin-Remodellierer ATRX und baut auf den im Vorgänger-Projekt (02NUK037C) gewonnenen Erkenntnissen auf. Hier konnten wir zeigen, dass ATRX während der HR für die Chromatin-Wiederherstellung beim Schritt der DNA-Synthese entscheidend ist. Darauf aufbauend soll nun die Bedeutung des ATRX-abhängigen Reparaturwegs für verschiedene Entitäten von DSBs untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen einen Beitrag zur Etablierung von Therapieansätzen leisten, bei denen Tumore mit ATRX-Defekten (etwa 10-15 % aller Tumore) gezielt und unter Schonung von Normalgewebszellen mit DNA-schädigenden Agenzien inaktiviert werden.

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

1. Teil: Ein Verlust von Rad52 führt zu einem starken Absterben von BRCA2-defizienten Zellen. Eigene Vorarbeiten ergaben Hinweise darauf, dass dies auf die Nutzung des fehlerbehafteten Wegs des Pol $\theta$ -vermittelten Alt-NHEJ zurückzuführen ist, welcher durch Rad52 unterdrückt zu werden scheint. Im ersten Berichtszeitraum sollte das Wechselspiel von Rad52 und Pol $\theta$  genauer charakterisiert werden. Dazu wurde zunächst die Bedeutung von Pol $\theta$  für die Reparatur spontan auftretender DSBs bestimmt. Diese DSBs entstehen während der Replikation und werden ausschließlich über den HR-Weg repariert. HR-defiziente Zellen zeigen folglich in der G2-Phase des Zellzyklus einen starken Reparaturdefekt und treten mit einer erhöhten Zahl an DSBs (gemessen als  $\gamma$ H2AX-Foci und Chromatidbrüche) in die Mitose ein. Zu unserer Überraschung nahm die Zahl an DSBs in HR-defizienten Zellen beim Durchlaufen der Mitose kontinuierlich ab und lag in der nächsten G1-Phase fast auf dem Niveau von Wildtyp-Zellen. Dieser Effekt war nahezu komplett unterbunden, wenn Pol $\theta$  zusätzlich depletiert war. Somit konnten wir die wissenschaftlich völlig neue Erkenntnis gewinnen, dass das Pol $\theta$ -vermittelte Alt-NHEJ in der Mitose einen alternativen Weg zur Reparatur resektierter DSBs darstellt, welche nicht via HR in der G2-Phase repariert werden konnten. Unsere Studien zeigen zudem, dass Rad52 in BRCA2-defizienten Zellen essentiell ist, um eine verfrühte Nutzung des Pol $\theta$ -vermittelten Alt-NHEJ zu verhindern, welche mit der Ausbildung chromosomaler Fusionen in der G2-Phase verbunden ist. Um die molekulare Wirkungsweise von Rad52 bei der Unterdrückung des Alt-NHEJ besser zu verstehen, wurden Pilotexperimente mit Rad52-Mutanten durchgeführt, bei denen unterschiedliche Protein-Domänen von Rad52 deletiert waren. Diese Experimente gaben erste Hinweise darauf, dass die DNA-Bindedomäne und die BRCA2-Interaktionsdomäne von Rad52 hierfür essentiell sind, wohingegen eine Interaktion mit Rad51 nicht von Bedeutung zu sein scheint.

2. Teil: Etwa 10-15 % aller Tumore zeigen eine Defizienz für den Chromatin-Remodellierer ATRX, welchem eine wichtige Funktion bei der Chromatin-Wiederherstellung während der HR zukommt. ATRX-defiziente Zellen können einen Unterweg der HR nicht anwenden, scheinen dies aber durch Verwendung anderer Unterwege zu kompensieren. Unsere weiterführenden Studien konnten nun zeigen, dass die HR in ATRX-defizienten Zellen über den Unterweg des sogenannten *synthesis-dependent strand-annealing* (SDSA) erfolgt. So führt eine Depletion der am SDSA beteiligten Helikase RecQ5 zu einem vollständigen HR-Defekt in ATRX-defizienten Zellen, zeigt aber kaum Effekte in Zellen mit ATRX. Interessanterweise erfolgt die Reparatur der DSBs in ATRX-komplementierten Zellen wieder über den ATRX-vermittelten Weg, was auf eine Unterdrückung des SDSA-Wegs durch ATRX hindeutet.

Neben den beschriebenen experimentellen Arbeiten wurde von den Verbundpartnern im Berichtszeitraum ein Antrag auf Strahlzeiten mit Schwerionen an der GSI gestellt.

### 4. Geplante Weiterarbeiten

1. Teil: Bisher wurden erste Experimente mit Rad52-Deletionsmutanten durchgeführt. Diese beruhen auf einer transienten Transfektion von Zellen, was die anwendbaren Analysemethoden einschränkt. Aktuell sind wir dabei stabil transfizierte Mutanten zu generieren, mit denen die Beobachtungen der Pilotexperimente bestätigt und weiterführende Experimente (z. B. Wachstumskurven) durchgeführt werden sollen. Des Weiteren soll das Zusammenspiel von Rad52 und Pol $\theta$  bei der Reparatur resektierter DSBs weiter charakterisiert werden.

2. Teil: Die bisher durchgeführten Studien deuten darauf hin, dass ATRX die Verwendung des RecQ5-abhängigen SDSA-Wegs unterdrückt. Im weiteren Verlauf des Projekts sollen die molekularen Mechanismen der ATRX-vermittelten SDSA-Hemmung genauer charakterisiert werden. Außerdem sollen die zellulären Konsequenzen der unterschiedlichen HR-Unterwege in ATRX-defizienten im Vergleich zu ATRX-profizienten Zellen genauer untersucht werden.

### 5. Berichte, Veröffentlichungen

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Leibniz-Institut für Alternsforschung – Fritz-Lipmann-Institut e. V. (FLI), Beutenbergstr. 11, 07745 Jena		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 055A</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt A		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2020 bis 31.12.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 269.836,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Dr. Pospiech	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Gesamtziel des Vorhabens ist die Aufklärung des Beitrages von Stoffwechselwegen und extranukleären Signalkaskaden für die S-Phasen-spezifische Strahlenempfindlichkeit, um neue Targets für eine therapeutische Intervention zu identifizieren. Dabei sollen strahleninduzierte Veränderungen in Metabolom und zellulären Signalkaskaden während der S-Phase identifiziert und mechanistisch aufgeklärt werden. Die dadurch identifizierten extranukleären Zielmoleküle sollen dann für eine therapeutische Intervention evaluiert werden.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Metabolom, Kinom und Transkriptom nach ionisierender Bestrahlung in der S-Phase
- AP2: Einfluss von extranukleären Signalkaskaden und Stoffwechselwegen auf die DNA-Reparatur und -Schadensantwort nach Bestrahlung in der S-Phase
- AP3: Einfluss von extranukleären Signalkaskaden und Stoffwechselwegen auf den DNA-Replikationsstress nach Bestrahlung
- AP4: Evaluierung der in den vorgeordneten APs identifizierten Modulatoren der Strahlensensibilität in Hinblick auf eine therapeutische Intervention

Die AP1 und 2 werden hauptverantwortlich durch den Verbundpartner geleitet.

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

Im hier abgefragten Berichtszeitraum (01.01.2020 – 30.06.2020) fand die Etablierung des Synchronisationsprotokolls statt. Des Weiteren wurden die im Projekt genutzten Zelllinien in niedriger Passagenzahl expandiert und die Herstellung von MDA-MB-231 Zelllinien mit (partiell) knock-out der BRCA1 und BRCA2-Gene initiiert. Entsprechenden Linien, die sich von der Brustkrebszelllinie MCF7 ableiten, liegen bereits vor.

Verzögerungen der experimentellen Arbeiten sind durch eine längerfristige Erkrankung des in Projekt beschäftigten Mitarbeiters und den Notbetrieb unseres Institutes aufgrund der Corona Pandemie verursacht.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Die experimentellen Arbeiten werden wie vorgesehen und gemäß dem beschriebenen Untersuchungsprogramm durchgeführt.

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

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20251 Hamburg		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 055B</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt B		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2020 bis 31.12.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 256.960,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Borgmann	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Gesamtziel des Vorhabens ist die Aufklärung des Beitrages von Stoffwechselwegen und extranukleären Signalkaskaden für die S-Phasen-spezifische Strahlenempfindlichkeit, um neue Targets für eine therapeutische Intervention zu identifizieren. Dabei sollen strahleninduzierte Veränderungen in Metabolom und zellulären Signalkaskaden während der S-Phase identifiziert und mechanistisch aufgeklärt werden. Die dadurch identifizierten extranukleären Zielmoleküle sollen dann für eine therapeutische Intervention evaluiert werden.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Metabolom, Kinom und Transkriptom nach ionisierender Bestrahlung in der S-Phase
- AP2: Einfluss von extranukleären Signalkaskaden und Stoffwechselwegen auf die DNA-Reparatur und -Schadensantwort nach Bestrahlung in der S-Phase
- AP3: Einfluss von extranukleären Signalkaskaden und Stoffwechselwegen auf den DNA-Replikationsstress nach Bestrahlung
- AP4: Evaluierung der in den vorgeordneten APs identifizierten Modulatoren der Strahlensensibilität in Hinblick auf eine therapeutische Intervention

Das AP3 wird hauptverantwortlich durch die Verbundpartnerin geleitet.

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

Im Berichtszeitraum 01.01.2020 – 30.06.2020 wurde die Herstellung der Zelllinien mit einem GFP-basierten HR-Reporterkonstrukts in Nachbarschaft eines durch EBNA1 induzierbaren Replikationsursprungs fertig gestellt. Die Visualisierung der durch Fanconi-Anämie vermittelten DNA Reparatur durch Konjugation eines Oligonukleotids an das GFP-basierte HR-Reporterkonstrukt zur Herstellung eines Interstrand-Crosslinks in Nachbarschaft eines durch EBNA1 induzierbaren Replikationsursprungs wird momentan durchgeführt. Des Weiteren wurde für die weiteren Untersuchungen in Kooperation mit PD Dr. H. Pospiech die Methodik des DNA Fiber Combing etabliert.

Bedingt durch die Coronakrise kam es zu Verzögerungen der experimentellen Arbeiten. Der Laborbetrieb konnte seit März 2020 nur im Notbetrieb aufrechterhalten werden. Durch einen Doodle-basierten Belegungsplan wird erst seit Juni 2020 in annähernd Vor-Coronazustand unter Ausnutzung von Abend- und Wochenendzeiten weitestgehend wieder normal gearbeitet.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Die experimentellen Arbeiten werden wie vorgesehen und gemäß dem beschriebenen Untersuchungsprogramm durchgeführt.

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

Keine.

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden		<b>Förderkennzeichen:</b> <b>02 NUK 055C</b>
<b>Vorhabensbezeichnung:</b> Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt C		
<b>Zuordnung zum FuE-Programm:</b> Nukleare Sicherheitsforschung: Strahlenforschung		
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.01.2020 bis 31.12.2022	<b>Berichtszeitraum:</b> 01.01.2020 bis 30.06.2020	
<b>Gesamtkosten des Vorhabens:</b> 337.786,00 EUR	<b>Projektleiter:</b> Prof. Dr. Cordes	

## 1. Vorhabensziele/Bezug zu anderen Vorhaben

Das Gesamtziel des Vorhabens ist die Aufklärung des Beitrages von Stoffwechselwegen und extranukleären Signalkaskaden für die S-Phasen-spezifische Strahlenempfindlichkeit, um neue Targets für eine therapeutische Intervention zu identifizieren. Dabei sollen strahleninduzierte Veränderungen in Metabolom und zellulären Signalkaskaden während der S-Phase identifiziert und mechanistisch aufgeklärt werden. Die dadurch identifizierten extranukleären Zielmoleküle sollen dann für eine therapeutische Intervention evaluiert werden.

## 2. Untersuchungsprogramm/Arbeitspakete

- AP1: Metabolom, Kinom und Transkriptom nach ionisierender Bestrahlung in der S-Phase
- AP2: Einfluss von extranukleären Signalkaskaden und Stoffwechselwegen auf die DNA-Reparatur und -Schadensantwort nach Bestrahlung in der S-Phase
- AP3: Einfluss von extranukleären Signalkaskaden und Stoffwechselwegen auf den DNA-Replikationsstress nach Bestrahlung
- AP4: Evaluierung der in den vorgeordneten APs identifizierten Modulatoren der Strahlensensibilität in Hinblick auf eine therapeutische Intervention

Die AP1 und 4 werden hauptverantwortlich durch den Verbundpartner geleitet.

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

Im hier abgefragten Berichtszeitraum (01.01.2020 – 30.06.2020) fand die Stellenausschreibung, hiermit verbundene Bewerbergespräche inklusive Entscheidung sowie die Initiierung der Einstellung eines Bewerbers statt.

Experimentelle Arbeiten wurden nicht durchgeführt.

Die verzögerte Personalrekrutierung und das Ausbleiben experimenteller Arbeiten wurde durch die Corona Pandemie verursacht.

### **4. Geplante Weiterarbeiten**

Sobald der PhD-Student am Universitätsklinikum Dresden eingestellt ist (frühestens 08/2020), werden die experimentellen Arbeiten wie vorgesehen und gemäß dem beschriebenen Untersuchungsprogramm durchgeführt.

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

Keine.



### 3 Verzeichnis der Forschungsstellen

- |   |  |       |
|---|--|-------|
| 02 NUK 047F   | <b>Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Friedrichstr. 39, 79098 Freiburg</b>             | 📖 94  |
| Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt F   |  |       |
| 02 NUK 035D   | <b>Bundesamt für Strahlenschutz, Willy-Brandt-Str. 5, 38226 Salzgitter</b>               | 📖 60  |
| Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D   |  |       |
| 02 NUK 047B   | <b>Bundesamt für Strahlenschutz, Willy-Brandt-Str. 5, 38226 Salzgitter</b>               | 📖 86  |
| Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B   |  |       |
| 02 NUK 047E   | <b>Charité - Universitätsmedizin Berlin, Hindenburgdamm 30, 14195 Berlin</b>             | 📖 92  |
| Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt E   |  |       |
| 02 NUK 036B   | <b>Elbe Kliniken Stade-Buxtehude GmbH, Bremervörder Str. 111, 21682 Stade</b>            | 📖 64  |
| Verbundprojekt KAU VIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt B   |  |       |
| 02 NUK 043A   | <b>Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich</b>                | 📖 80  |
| Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt A  |  |       |
| 02 NUK 053A   | <b>Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich</b>                | 📖 40  |
| Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt A  |  |       |
| 02 NUK 050E   | <b>Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Schlossplatz 4, 91054 Erlangen</b> | 📖 112 |
| Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt E   |  |       |
| 02 NUK 051C   | <b>Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fürstengraben 1, 07743 Jena</b>                  | 📖 34  |
| Verbundprojekt TRANS-LARA: Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen, Teilprojekt C       |  |       |
| 02 NUK 049A   | <b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt</b> | 📖 100 |
| 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 |  |       |
| 02 NUK 050A   | <b>GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstr. 1, 64291 Darmstadt</b> | 📖 104 |
| Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt A   |  |       |

- 02 NUK 054A Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt A  114

**Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e. V., Bautzner Landstr. 400, 01328 Dresden**

- 02 NUK 041B Verbundprojekt PANAS: Untersuchungen zu passiven Nachzerfallswärme-Abfuhrsystemen; Teilprojekt B: Untersuchungen zu Kondensationsprozessen im Notkondensator und numerische Simulation einer passiven Wärmeabfuhrkette  12
- 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  26
- 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  32
- 02 NUK 053B Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt B  42

**Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig**

- 02 NUK 053E Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt E  48

**Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg**

- 02 NUK 047A Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A  84

**Helmholtz-Zentrum Potsdam Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ, Telegrafenberg, 14473 Potsdam**

- 02 NUK 053D Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt D  46

**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  102

**IUF – Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf**

- 02NUK 036AX Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR  62  
Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt A
- 02 NUK 036C Verbundprojekt KAUVIR: Kombination statt Addition – UV bis IR  66  
Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt C

**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  110

**Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Saarstr. 21, 55122 Mainz**

- 02 NUK 042B Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt B  74
- 02 NUK 044B Verbundprojekt SIRIUS: Sekundärionisation radioaktiver Isotope zur ortsaufgelösten Ultrapurenanalyse, Teilprojekt B  22

**Klinikum der Universität München, Marchioninstr. 15, 81377 München**

- 02 NUK 047C Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C  88

**Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 München**

- 02 NUK 038A Verbundprojekt Endothelzellen: Effekte niedriger, mittlerer und hoher Strahlendosen auf primäre mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Normalgewebe; Teilprojekt A  70

**Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut e. V. (FLI), Beutenbergstr. 11, 07745 Jena**

- 02 NUK 055A Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt A  120

**Leibniz-Institut für Präventionsforschung und Epidemiologie – BIPS GmbH, Achterstr. 30, 28359 Bremen**

- 02 NUK 042C Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt C  76

**Leibniz Universität Hannover, Welfengarten 1, 30167 Hannover**

- 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  30

<b>Öko-Institut. Institut für angewandte Ökologie e. V., Merzhauser Str. 173, 79100 Freiburg</b>
--

- 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  38

<b>Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Grabengasse 1, 69117 Heidelberg</b>
---

- 02 NUK 039C Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt C  20

<b>Sondervermögen Großforschung beim Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen</b>
---

- 02 NUK 039A Verbundprojekt ThermAc: Aufklärung von Thermodynamik und Speziation von Actiniden bei höheren Temperaturen in Kombination von Schätzmethoden, spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden; Teilprojekt A  18

- 02 NUK 053C Verbundprojekt iCross: Integrität von Endlagersystemen für radioaktive Abfälle - Skalenübergreifendes Systemverständnis und Systemanalyse, Teilprojekt C  44

<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  14

<b>Technische Universität Darmstadt, Karolinenplatz 5, 64289 Darmstadt</b>
--

- 02 NUK 036D Verbundprojekt KAU VIR: Kombination statt Addition – UV bis IR Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung, Teilprojekt D  68
- 02 NUK 042D Verbundprojekt ISIBELA: Intrinsische Strahlenempfindlichkeit: Identifikation biologischer und epidemiologischer Langzeitfolgen, Teilprojekt D  78
- 02 NUK 050B Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender  $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt B  106
- 02 NUK 050C Verbundprojekt GREWISalpha: Genetische Risiken und entzündungshemmende Wirkung von dicht-ionisierender  $\alpha$ -Strahlung, Teilprojekt C  108
- 02 NUK 054C Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt C  118

<b>Technische Universität Dresden, Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden</b>
--

- 02 NUK 035C Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Maker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt C  58
- 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  10
- 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  24
- 02 NUK 055C Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt C  124

<b>Universität Bremen, Bibliothekstr. 1, 28359 Bremen</b>
---

- 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  36

<b>Universität des Saarlandes, Campus, 66123 Saarbrücken</b>
--

- 02 NUK 035A Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Maker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt A  54

<b>Universität Leipzig, Ritterstr. 26, 04109 Leipzig</b>
--

- 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  28

<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  98

<b>Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen</b>
---

- 02 NUK 043B Verbundprojekt COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung, Teilprojekt B  82
- 02 NUK 047D Verbundprojekt ZiSStrans: Zielstrukturen der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt D  90
- 02 NUK 054B Verbundprojekt VERCHROMT II: Erkennung, Verarbeitung und biologische Konsequenzen von Chromatinschäden nach Teilchenbestrahlung II, Teilprojekt B  116

<b>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20251 Hamburg</b>
--

- 02 NUK 032 DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Tumoren: Mechanismen und Targets  52
- 02 NUK 035B Verbundprojekt DNA-Reparaturfoci: DNA-Reparaturfoci als Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit, Teilprojekt B  56
- 02 NUK 055B Verbundprojekt Radiometabolom: Outside in: Wie wird die Strahlenresistenz in der S-Phase durch den Metabolismus moduliert?, Teilprojekt B  122

<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  72
- 02 NUK 048A Verbundprojekt ESKaRa: Epidemiologische Studie zu Kardialen Spätfolgen und Zweitmalignomen nach Radiotherapie bei Brustkrebspatientinnen, Teilprojekt A  96