

## Zwischenbericht für das Projekt

*In vitro*-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten  
elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation  
C. Blut-Hirn-Schranke

**Universitätsklinikum Münster**

Februar 2005

Der Zwischenbericht gibt die Auffassung und Meinung des Forschungsnehmers wieder und muss nicht mit der Meinung des Auftraggebers (Bundesminister für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) übereinstimmen.

**Zielsetzung:**

Das Gehirn wird von einem Netzwerk feiner Blutgefäße durchzogen. Durch diese Blutgefäße, die Kapillaren, wird das Gehirn u.a. mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Die Wände aller dieser Blutgefäße bilden zusammen die Blut-Hirn-Schranke. Zwischen benachbarten Gefäßwandzellen (Kapillar-Endothelzellen) bestehen feste Verbindungen. Sie werden von speziellen Eiweißkomplexen gebildet und als "tight junctions" (dichte Verbindungen) bezeichnet. Diese Verknüpfungen minimieren den Durchtritt von Stoffen zwischen den Zellen hindurch. Substanzen, die aus dem Blut ins Gehirn bzw. aus dem Gehirn ins Blut gelangen sollen, müssen mittels spezieller Transportsysteme durch die Gefäßwandzellen hindurchgeschleust werden. Dieser kontrollierte Prozess ermöglicht einen gezielten Stoffaustausch zwischen Nervenzellen und Blut und schützt die Nervenzellen vor dem Eindringen schädlicher Substanzen.

Ziel des Forschungsvorhabens ist die Untersuchung der Frage, ob und ggf. wie Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke durch hochfrequente Felder der Mobilfunk-Technologie (GSM und UMTS) beeinflusst werden.

**Methode:**

Als Zellkultur-Modell der Blut-Hirn-Schranke werden primäre Kapillarendothelzellen aus Rattenhirn verwendet. Mit Hilfe eines Screeningverfahrens zur differentiellen Genexpression (Chip Arrays) werden die Einflüsse von Feldern des Mobilfunks (GSM und UMTS, SAR 0.4, 1, 3 und 8 W/kg) auf das Genexpressionsmuster dieses Zellkulturmodells untersucht, d.h. es wird analysiert, ob bestimmte Proteine unter Einfluss der hochfrequenten elektromagnetischen Felder verstärkt oder vermindert in den Zellen gebildet werden. Das Screening erfolgt zunächst auf Ebene der mRNA, im weiteren Verlauf des Projekts wird überprüft, ob die Regulationsänderung auf RNA-Ebene zu quantitativen Änderungen auf der Proteinebene führt, ggf. schließen sich weitere protein-biochemische Analysen bestimmter Proteine an.

Durch das in dieser Studie eingesetzte Screeningverfahren können ggf. Zielproteine der Blut-Hirn-Schranke identifiziert werden, die durch Felder der Mobilfunk-technologie beeinflusst werden.

**Status:**

Zur Zeit wird die Methode zur Präparation und Kultivierung primärer Kapillarendothelzellen aus Rattenhirn etabliert. Die Methode ist so ausgerichtet, dass bei der Isolation von Blutgefäßen möglichst nur Kapillargefäße gewonnen werden. Dies begrenzt die Verunreinigung der Primärkultur durch Glattmuskelzellen. Ferner wird der Eintrag von Endothelzellen vom nicht schrankenbildenden Phänotyp aus größeren Blutgefäßen in die Zellkultur umgangen. Ausgesät auf Kulturschalen, die mit einer entsprechenden Collagenmatrix beschichtet wurden, wachsen aus den Kapillarfragmenten dann die Endothelzellen vom Blut-Hirn-Schranken-Phänotyp und bilden in der Folge einen dichten Zellrasen aus. Die Charakterisierung der RBEC-Kultur (Rat brain endothel cells) erfolgt anhand ihrer Morphologie und mittels immunhistochemischer Färbungen. Letztere ermöglichen eine Identifizierung der Endothelzellen und eine Quantifizierung der natürlicherweise in Primärkulturen auftretenden Fremdzellkontamination.

Die aus zahlreichen aufwändigen Einzelschritten bestehende Isolierung der RBEC erfordert etwa 8-9 Stunden Zeit. Die Kapillarfragmente heften sich innerhalb eines Tages nach der Aussaat auf der collagenbeschichteten Wachstumsfläche an. Nach etwa dreitägiger Kultivierungsdauer sind aus den ausgesäten Kapillarfragmenten Endothelzell-Kolonien ausgewachsen, die nach 10-12 Tagen eine nahezu zusammenhängende Zellschicht auf dem Substrat ausbilden. Die isolierten RBEC zeigen in Kultur das für Endothelzellen typische, spindelförmige Erscheinungsbild. Im späteren Kulturverlauf treten weitere Zellen auf, die auf der Endothelschicht in zweiter Ebene wachsen und teils noch verbliebene Lücken im Zellrasen besiedeln. Aufgrund ihres Erscheinungsbildes wird angenommen, dass es sich hierbei um Pericyten (relativ undifferenzierte Bindegewebszellen, die die von Endothelzellen gebildeten Blutkapillaren umgreifen) handeln kann. Dies bestätigt auch eine frühere Arbeit von Abbott et al. (1992).

Für die Exposition der Zellkulturen mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern werden radialsymmetrische Hohlleiter aus Edelstahl aufgebaut, in die die in Petrischalen kultivierten Zellen eingesetzt werden können. Die radiale Symmetrie gewährleistet in allen Proben eine gleichartige Feldverteilung, die Materialauswahl erlaubt die Sterilisation aller Komponenten im Autoklaven. Mit dem Aufbau der Anlage wurde parallel zu den biologischen Arbeiten begonnen.

Die bisherigen Arbeiten mit der RBEC Zellkultur bieten die Grundlage, um mit der Charakterisierung der Zellen zu beginnen. Mittels immunhistochemischer Färbemethoden wird die Identität der Endothelzellen nachgewiesen. Die in einer Primärkultur zwangsläufig auftretende Fremdzellpopulation soll ebenfalls identifiziert und quantifiziert werden. Es ist sicherzustellen, dass die Population an nicht-Endothelzellen vernachlässigbar gering ist. Gegebenenfalls ist eine Methode zur Reduzierung der Fremdzellen zu etablieren.