

Abschlussbericht

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut

Fraunhofer ITEM

Prüfung Nr.: 19G05014

Auftraggeber:

Bundesamt für Strahlenschutz

Willy-Brandt-Strasse 5

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Monitor:

Bundesamt für Strahlenschutz

Ingolstädter Landstraße 1

85764 Oberschleißheim

Dr. Gunde Ziegelberger

Tel.: 01888/333-2142

Dr. Monika Asmuss

Tel.: 01888/333-2147

Prüfeinrichtung:

**Fraunhofer Institut für Toxikologie
und Experimentelle Medizin**

[Fraunhofer ITEM]

Nikolai-Fuchs-Straße 1

D-30625 Hannover

Tel.: 0511-5350-0

Fax: 0511-5350-155

Institutsleiter (geschäftsführend):

Prof. Dr. Dr. U. Heinrich

Dieser Abschlussbericht besteht

aus 57 Seiten und einem

Appendix bestehend aus 11

Anlagen

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Allgemeine Angaben zur Prüfung	6
2.1 Mitarbeiter der Prüfung	6
2.2 Termine	6
2.3 Richtlinien für die Durchführung der Prüfung	7
2.4 Archivierung	7
3. Erklärungen	8
3.1 Erklärung des Prüfleiters	8
3.2 Erklärung der Qualitätssicherung	9
3.3 Erklärung der beteiligten Wissenschaftler	10
4. Einleitung	11
4.1 Versuchsdurchführung	11
4.2 Arbeitspakete	12
4.3 Ziele der Prüfung	12
5. Material und Methoden	13
5.1 Prüfgegenstand	13
5.2 Gewinnung und Exposition peripherer Lymphozyten	13
5.3. Gewinnung von Proteinen/Western Blotting	13
5.4 Isolierung von RNA und Durchführung der Genexpressionsanalysen mittels Microarrays und RT-PCR.	14
5.4.1 Isolierung von RNA	14
5.4.2 Microarray-Analysen	15
5.4.3 Echtzeit-PCR	17
5.5 Bioinformatik	19
5.5.1 Hauptkomponentenanalyse	19
5.5.2 Hierarchische Genklusteranalysen	20
6. Ergebnisse	20
6.1 Microarray-Analysen	20
6.1.1 Qualitätskontrollen der Microarray-Genexpressionsanalysen	20
6.1.2 Genexpressionsanalysen	21
6.1.3 Festlegung der Bedingungen für signifikant regulierte Gene	22
6.1.4 Biologische Klassifizierung signifikant regulierter Gene.	25
6.2. Bioinformatik	34
6.2.1 Principal components analysis (PCA)	34
6.2.2 Hierarchische Genklusteranalyse	34
6.3 Validierung der Genexpressionsanalysen	36
6.3.1 Echtzeit- PCR (RT-PCR)	37
6.3.2 Nachweis regulierter Proteine mittels spezifischer Antikörper/Western Blotting	39
6.3.3 Nachweis von 7 Proteinen mittels spezifischer Antikörper/Western Blots. (vom Auftraggeber vorgegeben)	45
6.4. Vergleich aller Genexpressionsanalysen	48
7. Diskussion	49
7.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA)	49
7.2 Genexpressionsanalysen	50
7.3 Schlussfolgerungen	53
8. Literatur	54

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Übersicht über die Abbildungen

Abbildung 1: Hierarchische Genklusteranalyse der 84 annotierten Gene	35
Abbildung 2: Beispiel für gegenläufige Signalintensitäten im Western Blot	42
Abbildung 3: Beispiele für Dosierungs-abhängige Signale im Western Blot	43
Abbildung 4: Beispiele für Dosierungs-unabhängige Signale im Western Blot	43
Abbildung 5: Beispiele für Dosierungs-unabhängige Signale im Western Blot	46

Tabellenübersicht

Tabelle 1: Experimenteller Plan der Prüfung.	12
Tabelle 2: Übersicht über die Proben, die für Genexpressionsanalysen mittels Microarrays nicht verwendet wurden.	17
Tabelle 3: Übersicht über die Proben, die für die RT-PCR-Analysen nicht verwendet wurden.	17
Tabelle 4: Übersicht über die Gene für die RT-PCR-Analysen.	19
Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl signifikant regulierter und annotierter Gene.	24
Tabelle 6: Anzahl der Gene, die in Abhängigkeit von der Dosierung nach 1 bzw. 48 Stunden reguliert vorliegen.	25
Tabelle 7: Biologische Klassifizierung signifikant regulierter Gene.	33
Tabelle 8: Übersicht über die ausgewählten Gene für RT-PCR und Western Blot.	36
Tabelle 9: Übersicht über die gepoolten Proben, die keine Werte nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode für ADAMDEC1 zeigten.	39
Tabelle 10: Übersicht über die Häufigkeit von Unterschieden zwischen den Resonatoren 1 bis 3 und der nicht behandelten Kontrolle innerhalb einer Behandlungsgruppe im Western Blot.	41
Tabelle 11: Qualitativer Vergleich der Signalintensitäten zwischen Exposition (R1 bis R3) und Kontrolle im Western Blot.	44
Tabelle 12: Qualitativer Vergleich der Signalintensitäten zwischen Exposition (R1 bis R3) und Kontrolle im Western Blot.	47

Anlagen

- Anlage 1: GLP-Zertifikat
- Anlage 2: Qualitätskontrolle Chip-Analysen
- Anlage 3A: Übersicht über alle annotierten und nicht annotierten signifikant regulierten Gene der Microarrayanalysen ohne Berücksichtigung des Fold Changes (FC) weiblich adulter Spender.
- Anlage 3B: Übersicht über alle annotierten und nicht annotierten signifikant regulierten Gene der Microarrayanalysen ohne Berücksichtigung des Fold Changes (FC) weiblich juveniler Spender.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

- Anlage 3C: Übersicht über alle annotierten und nicht annotierten signifikant regulierten Gene der Microarrayanalysen ohne Berücksichtigung des Fold Changes (FC) männlich adulter Spender.
- Anlage 3D: Übersicht über alle annotierten und nicht annotierten signifikant regulierten Gene der Microarrayanalysen ohne Berücksichtigung des Fold Changes (FC) männlich juveniler Spender.
- Anlage 4: Übersicht über alle annotierten und signifikant regulierten Gene
- Anlage 5: PCA-Analysen
- Anlage 6A: RT-PCR : $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode weiblicher juveniler Spender
- Anlage 6B: RT-PCR : $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode weiblicher adulter Spender
- Anlage 6C: RT-PCR : $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode männlicher juveniler Spender
- Anlage 6D: RT-PCR : $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode männlicher adulter Spender
- Anlage 7A: RT-PCR: ABIPrism-Standard-Methode weiblicher juveniler Spender
- Anlage 7B: RT-PCR: ABIPrism-Standard-Methode weiblicher adulter Spender
- Anlage 7C: RT-PCR: ABIPrism-Standard-Methode männlicher juveniler Spender
- Anlage 7D: RT-PCR: ABIPrism-Standard-Methode männlicher adulter Spender
- Anlage 8A: Vergleich der Genexpressionsanalysen weiblicher juveniler Spender
- Anlage 8B: Vergleich der Genexpressionsanalysen weiblicher adulter Spender
- Anlage 8C: Vergleich der Genexpressionsanalysen männlicher juveniler Spender
- Anlage 8D: Vergleich der Genexpressionsanalysen männlicher adulter Spender
- Anlage 9A: Western Blots (BAG3)
- Anlage 9B: Western Blots (CACYPB)
- Anlage 9C: Western Blots (CKS2)
- Anlage 9D: Western Blots (DNAJA4)
- Anlage 9E: Western Blots (DNAJB4)
- Anlage 9F: Western Blots (FKBP4)
- Anlage 9G: Western Blots (HIPK2)
- Anlage 9H: Western Blots (HIST1H2AC)
- Anlage 9I: Western Blots (HIST1H3D)
- Anlage 9J: Western Blots (LDLR)
- Anlage 10A: Western Blots (c-JUN)
- Anlage 10B: Western Blots (c-Myc)
- Anlage 10C: Western Blots (HSP27)
- Anlage 10D: Western Blots (p-HSP27)
- Anlage 10E: Western Blots (HSP70)
- Anlage 10F: Western Blots (P38MAPK)
- Anlage 11: Amendment zum Prüfplan.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

1. Zusammenfassung

Eine Exposition menschlicher kultivierter Lymphozyten mit GSM-Signalen führt in wenigen Einzelfällen zu einer Regulation von Genen in Microarray Analysen. Von den insgesamt 84 signifikant regulierten Genen wurden 65 nur jeweils in einer Behandlungsgruppe als signifikant reguliert wieder gefunden. Eine strenge Dosierungs-abhängige Wirkungsbeziehung in der Regulation von Genen konnte nicht ermittelt werden.

Mit Ausnahme von HSP27 bei männlichen juvenilen und weiblichen adulten Spendern nach 48 h Exposition wurde keines der untersuchten Proteine im Western Blot als signifikant reguliert bestimmt.

Unter den regulierten Genen befinden sich solche, deren Funktionen in peripheren Lymphozyten bislang unbekannt sind und zum Beispiel neuronalen Funktionen zugeordnet werden. Darüber hinaus lassen die unterschiedlichsten Funktionen der regulierten Gene keine klaren funktionellen Zusammenhänge erkennen, die auf Schädigungen der Lymphozyten hinweisen. Es konnten keine alters- oder geschlechtsspezifischen Effekte ermittelt werden. Nur die Dauer der Kultivierung beeinflusste unabhängig von der Stärke der Befeldung das Expressionsmuster.

Summary

Exposure of human peripheral lymphocytes to GSM-signals resulted in a limited number of regulated genes as determined by microarray analysis. Among the 84 significantly regulated genes 65 were regulated in one treatment group only. Within the exception of heat shock protein HSP27 in juvenile males and adult females none of the studied proteins were significantly regulated.

The function of some of the regulated genes in lymphocytes is unknown, but may play a role in neuronal function. Importantly, no dose response relationship could be determined in exposed lymphocytes to GSM-signals. Based on the results of this study, no age or gender effect was determined. Only the duration of cell culture influenced the gene expression pattern, but this was independent of the exposure dose.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

2. Allgemeine Angaben zur Prüfung

Fraunhofer ITEM Prüfungs Nr:	19G05014
Ort der Durchführung:	Fraunhofer ITEM; Laborräume T3.107, T3.108; T3.111; T3.113; T2.09, T2.010; T3.U02.
Prüfgegenstand:	Isolierte periphere Lymphozyten

2.1 Mitarbeiter der Prüfung

Prüfleiter	Prof. Dr. Jürgen Borlak
Stellv. Prüfleiter	Dr. Roman Halter
Genexpressionsanalysen	Dr. Tatjana Meier (siehe Amendment Nr.1, Änderung 1)
Real-time PCR und Western Blot	Dr. Monika Niehof
Bioinformatik	Dr. Dörte Solle (siehe Amendment Nr.1, Änderung 1)
Qualitätssicherung	Dr. Ilona Fleischhauer Dr. Norbert Lütke

2.2 Termine

Beginn der Prüfung	29. 05. 2006
Beginn der experimentellen Phase der Prüfung (Beginn der Zellkulturarbeiten)	29. 05. 2006
Statusbericht zu Arbeitspaket 1	01. 11. 2006
Statusbericht zu Arbeitspaket 2	25. 01. 2008
Ende der experimentellen Phase der Prüfung	28. 07. 2008
Statusbericht zu Arbeitspaket 3	21. 08. 2008
Abschlussbericht	17. 08. 2009

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

2.3 Richtlinien für die Durchführung der Prüfung

Die Blutabnahme und die Aufreinigung der peripheren Lymphozyten durch die Med. Hochschule Hannover erfolgten nicht nach GLP. Ebenso wurde die Identifizierung signifikant deregulierter Gene, die statistische Auswertung, die bioinformatische Auswertung sowie die Interpretation der Daten nicht nach GLP durchgeführt.

Die Kultivierung der peripheren Lymphozyten sowie alle molekularbiologischen Untersuchungen am Fraunhofer ITEM wurden nach den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP) durchgeführt (Deutsches Chemikaliengesetz § 19a, Anhang1, BGBl Seite 2119-2129, 28. Juni, 2002).

2.4 Archivierung

Nach Abschluss der Prüfung und Erstellung des Abschlussberichts wird ein Original des Abschlussberichts, ein Original des Prüfplans mit einem Original des Amendments Nr. 1 zum Prüfplan, die Rohdaten und weitere Materialien in die Archive des Fraunhofer ITEM gebracht. Alle Unterlagen werden eindeutig gekennzeichnet und während eines Mindestzeitraumes gelagert, der in den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP) genannten Dauer entspricht. Ohne schriftliche Zustimmung des Auftraggebers und des Fraunhofer ITEM werden keine Materialien entsorgt.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

3. Erklärungen

3.1 Erklärung des Prüfleiters

Prüfnummer: 19G05014

Prüfgegenstand: Proben humaner peripherer Blutlymphozyten.

Titel: Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut.

Die Durchführung der Prüfung erfolgte nach den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP) (Deutsches Chemikaliengesetz § 19a, Anhang1, BGBl Seite 2119-2129, 28. Juni, 2002). Für die Blutentnahme an freiwilligen Probanden lag eine Genehmigung der Ethikkommission der MHH vor.

Folgende Teile der Prüfung wurden nicht nach GLP durchgeführt.

1. Blutentnahme und Isolierung peripherer Lymphozyten.
2. Exposition der isolierten Zellen.
3. Festlegung der signifikant regulierten Gene.
4. Statistische Auswertung, die bioinformatische Auswertung sowie die Interpretation der Daten.
5. Auswertung der Western Blot Ergebnisse.

Der Abschlußbericht ist eine korrekte und gewissenhafte Wiedergabe der erzielten Ergebnisse.

Ich akzeptiere die Verantwortung für die korrekte Durchführung der Prüfung.

Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin

Prof. Dr. J. Borlak

Prüfleiter

Datum

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

3.2 Erklärung der Qualitätssicherung

Prüfnummer: 19G05014

Prüfgegenstand: humane periphere Blutlymphozyten

Im Verlauf der Prüfung wurden regelmäßig experimentelle Teile der Prüfung überprüft. Die Ergebnisse dieser Inspektionen wurden dem Prüfleiter und dem Management des Fh-ITEM berichtet.

Dieser Abschlußbericht wurde durch die Qualitätssicherung des Fraunhofer ITEM geprüft. Der Bericht beschreibt korrekt das Vorgehen und die Methoden, die während der Prüfung angewendet wurden und gibt genau die Rohdaten der Prüfung wieder.

Datum der Inspektion	Art der Inspektion	Datum des Inspektionsberichts
24.05.06 + 26.05.06	Prüfplan (4.Entwurf)	26.05.2006
29.05.06	Prüfplan (5.Entwurf / Finale Fassung)	29.05.2006
21.07.06 + 10.08.06	Gewinnung von Proteinextrakten aus peripheren Lymphozyten	11.08.2006
24.01.07	Einengen von RNA-Proben	24.01.2007
04. + 05.03.2007	Western Blotting	05.03.2007
22. + 25.02.2008	Messungen RT-PCR	27.02.2008
25. + 26.02.2008	Vorbereitungen und Messungen RT-PCR	27.02.2008
19./20.1.09 +28.1.09 18.02.09	Unterlagen für Microarray Analysen	18.02.2009
29./30.1.09 +2.2.09 18.02.09	Abschlussbericht (Draft 1)	18.02.2009
06. +23.03 + 22. - 26.06.2009 + 1./2. +06.07.2009	Abschlussbericht (Draft 2+3)	06.07.2009

Fraunhofer Institut für Toxikologie and Experimentelle Medizin (Fraunhofer ITEM)

Dr. I. Fleischhauer

Leiterin, Qualitätssicherung

Datum

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

3.3 Erklärung der beteiligten Wissenschaftler

Wir, die Unterzeichner, erklären, dass die Arbeiten dieser Prüfung durch uns oder unter unserer Aufsicht nach den beschriebenen Methoden durchgeführt wurden und der Bericht eine genaue und getreue Wiedergabe der erzielten Ergebnisse darstellt.

Fraunhofer Institut für Toxikologie and Experimentelle Medizin (Fraunhofer ITEM)

Unterschrift

Datum

Genexpressionsanalyse:

Dr. rer. nat. T. Meier

(siehe Amendment Nr. 1, Änderung 1 zum Prüfplan)

Real-time PCR und Western Blot:

Dr. rer. nat. M. Niehof

Bioinformatik:

Dr. rer. nat. D. Solle

(siehe Amendment Nr. 1, Änderung 1 zum Prüfplan)

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut Abschlussbericht

4. Einleitung

In dieser Prüfung wurde der Einfluss von Handystrahlen auf kultivierte periphere Lymphozyten überprüft. Dabei stand ein möglicher Einfluss der Handystrahlen auf die Genexpression der peripheren Lymphozyten im Vordergrund. Aus diesem Grunde wurden mittels Genexpressionsanalysen Genexpressionsprofile erstellt, um Gene zu identifizieren, deren Expression durch Handystrahlen vermindert bzw. erhöht wurde. Anhand der Funktion dieser verändert regulierten Gene sollte es möglich sein, Rückschlüsse auf mögliche gesundheitliche Risiken durch Handystrahlen abzuleiten. Das Hauptinteresse richtete sich auf Gene, die den Zellzyklus beeinflussen sowie Stressindikatoren und Apoptose induzierende Gene. Zur Validierung dieser Daten wurde eine begrenzte Anzahl an Genen zusätzlich mittels Echtzeit-PCR und im Western Blot auf veränderte Expression überprüft. Darüber hinaus wurde aufgrund von bereits publizierten Ergebnissen 7 ausgewählte Gene auf veränderte Expression auf Proteinebene im Western Blot überprüft.

4.1 Versuchsdurchführung

Periphere Lymphozyten wurden aus menschlichem Blut isoliert und kultiviert. Die kultivierten Lymphozyten eines Spenders wurden in 8 Versuchsgruppen aufgeteilt. Jeweils vier Gruppen wurden 1 oder 48 Stunden exponiert, wobei die Exposition der periphere Lymphozyten in Kulturschalen gegenüber GSM-Signalen mit 3 unterschiedlichen SAR-Werten erfolgte. Eine nicht exponierte Gruppe wurde als Kontrollgruppe eingesetzt. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob nach Exposition Änderungen im Genexpressionsmuster alters- und geschlechtsabhängig vorliegen. Aus diesem Grunde wurden Blutproben von jeweils 10 männlichen und 10 weiblichen Spendern zweier unterschiedlicher Altersgruppen verwendet (siehe Amendment Nr.1, Änderung 2). Insgesamt gab es 32 unterschiedliche Behandlungsgruppen, die sich durch Alter und Geschlecht der Probanden sowie durch Dauer und Höhe der Exposition unterschieden (Tabelle 1).

Nach Exposition wurden die peripheren Lymphozyten einer Behandlungsgruppe aufgeteilt. Ein Teil wurde für die Isolierung von RNA für die Genexpressionsanalysen verwendet und aus dem anderen Teil wurden Proteinextrakte hergestellt, um Proteine mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 1: Experimenteller Plan der Prüfung (m, männlich; w, weiblich).

Behandlung W/kg	0	0,2	2	5	Dauer der Behandlung	Alters- gruppen
Probanden (m/w)	10/10	10/10	10/10	10/10	1 h	50 - 60 Jahre
Probanden (m/w)	10/10	10/10	10/10	10/10	48 h	
Probanden (m/w)	10/10	10/10	10/10	10/10	1 h	18 - 21 Jahre
Probanden (m/w)	10/10	10/10	10/10	10/10	48 h	

4.2 Arbeitspakete

Die Prüfung war in 3 Arbeitspakete aufgeteilt.

Arbeitspaket 1: In diesem Arbeitspaket wurden 7 Proteine im Western Blot getestet, die vom Auftraggeber vorgegeben waren: HSP-27, HSP-27-P; P38MAPK, HSP-70, P21, C-Jun und C-MYC (siehe Amendment Nr.1, Änderung 3).

Arbeitspaket 2: Durchführung der Microarray Analysen.

Arbeitspaket 3: Nachweis der Expression von 20 ausgewählten Genen mittels Echtzeit-PCR und Durchführung von Western Blots für weitere 10 Proteine.

4.3 Ziele der Prüfung

- Genexpressionsanalysen mittels Microarrays von peripheren Lymphozyten, die unterschiedlichen SAR-Werten 0 (Scheinexposition) / 0,2 / 2 / 5 W/kg an GSM-Signalen und mit unterschiedlicher Behandlungsdauer (1h und 48h) exponiert waren. Testpersonen sind adulte und juvenile Spender beiderlei Geschlechts.
- Validierung der durch Microarrays generierten Expressionsdaten mittels Echtzeit-PCR an ausgewählten Genen.
- Validierung der Genexpressionsanalyse durch immunologischen Nachweis ausgewählter Proteine.
- Vergleich der Genexpressionsanalysen (Abhängigkeit von Behandlungsdauer, Expositionshöhe, Alter und Geschlecht).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

5. Material und Methoden

5.1 Prüfgegenstand

Proben humaner peripherer Blutlymphozyten stellten den Prüfgegenstand dar. Insgesamt wurden 320 Proben eingesetzt (Tabelle 1).

5.2 Gewinnung und Exposition peripherer Lymphozyten

Die peripheren Lymphozyten wurden über Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Etwa 3×10^8 Zellen pro Proband wurden auf ca. $1,6 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und auf 64 Kulturschalen mit ca. $4,5 \times 10^6$ Zellen/Schale verteilt. Für die Kultivierung wurde Basalmedium (RPMI 1640 mit L-Glutamin) mit 10% AB-Serum und jeweils 50IU/ml Penicillin und Streptomycin verwendet. Die peripheren Lymphozyten wurden bei 37°C , 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 kultiviert. Vor der Behandlung mit gepulsten GSM-Signalen wurden die Zellen mindestens eine Stunde vorinkubiert.

Die Expositionseinrichtung zur Behandlung der kultivierten peripheren Lymphozyten wurde von der FIRMA IMST als Unterauftragnehmer gebaut und bereitgestellt.

5.3. Gewinnung von Proteinen/Western Blotting

Nach Exposition der peripheren Lymphozyten wurden die Zellen sedimentiert und anschließend aus den Zellpellets Proteinextrakte nach SOP 192206 gewonnen. Im folgenden ist eine Kurzdarstellung dieser Methode wiedergegeben.

Das Zellpellet wurde in SDS-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 10 Min gekocht und in Eis abgekühlt. DNA wurde durch beschallen geschert. Die Proben wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurde 10 Min bei RT und 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt und ein Aliquot (z.B. 20 μl) abgenommen. Für die Proteinbestimmung (SOP 193202) wurden Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:200 hergestellt. Der Überstand wurde gewogen. Das Gewicht in mg entspricht etwa dem Volumen in ml. Zum Überstand wurde 1/3 des Volumens an 4xSDS-Probenpuffer zugegeben und gut gemischt und entsprach nun dem SDS-Direktextrakt.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut

Abschlussbericht

Aliquots von den SDS-Direktextrakten wurden auf 12% SDS-Polyacrylamidgelen (wenn nicht anders angegeben) aufgetrennt und auf Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranen geblottet. Spezifische Antikörper gegen die Zielproteine wurden von entsprechenden Firmen bezogen. Der Antigen-Antikörperkomplex wurde durch einen sekundären, mit Peroxidase konjugierten Antikörper sichtbar gemacht. Nach Inkubation mittels des ECL (enhanced chemiluminescence detection) Systems nach Angaben des Herstellers (Kodak) wurden die Lichtsignale mit dem CCD (charge-coupled device) Kamera Imager System (Kodak) und der Kodak Image Analyser Software ermittelt. Bis zu diesem Schritt erfolgte die Durchführung der Western Blot Analyse nach GLP (SOP 192202). Die Auswertung der erhaltenen Bilder (nicht nach GLP) erfolgte visuell und die Signalstärke wurde abgeschätzt.

Für die Western Blots wurden jeweils die Proteinextrakte zweier Spender der gleichen Behandlungsgruppe gepoolt und mit einer Ausnahme für die zu überprüfenden Proteine beider Arbeitspakete benutzt. Die Ausnahme betraf einen Spenderpool der männlichen juvenilen Spender hinsichtlich des Arbeitspakets 3. Aus den behandelten Zellen eines der für Arbeitspaket 1 eingesetzten Spenders (Spender 16) konnte nicht genügend RNA für die weiteren Genexpressionsanalysen gewonnen werden. Dieser Spender wurde deshalb durch einen anderen Spender (Spender 20) der gleichen Behandlungsgruppe ersetzt, mit dessen RNA auch die Genexpressionsanalysen durchgeführt wurden. Für die weiteren Western-Blot Analysen im Arbeitspaket 3 wurden deshalb Proteinextrakte des anderen (neuen) Spenders eingesetzt.

5.4 Isolierung von RNA und Durchführung der Genexpressionsanalysen mittels Microarrays und RT-PCR.

Für die Genexpressionsanalysen mittels Microarrays und RT-PCR (Echtzeit-PCR) wurde Gesamt-RNA aus den Zellpellets isoliert, die für beide Methoden verwendet wurde.

5.4.1 Isolierung von RNA

Gesamt-RNA aus den Zellpellets wurde mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Ebenso erfolgte die 2. Aufreinigung der RNA mit dem gleichen Kit ("Clean-up")

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Protokoll; SOP 192233). Die 2. Aufreinigung ist für die Microarray-Analysen (Affymetrix) vorgeschrieben. Um die Säulen nicht zu überladen, wurde nicht mehr als Material als das von 12×10^6 Zellen pro Säule eingesetzt (siehe Amendment Nr.1, Änderung 6).

Die Quantifizierung der RNA erfolgte am NanoDrop ND-1000 (SOP 192121 und SOP 192230). Die RNA Qualitätsbestimmung erfolgte am Agilent 2100 Bioanalyzer mit Hilfe des 6000 Nano LabChip Kit von Agilent Technologies (SOP 192116 und SOP 192216) oder mittels RNA-Agarosegelelektrophorese (SOP 192237).

5.4.2 Microarray-Analysen

Die Probenvorbereitung für die Genexpressionsanalysen erfolgte nach Angaben des Herstellers Affymetrix (SOP 192238) und ist im folgenden kurz beschrieben. Die 2-fach aufgereinigte RNA wurde in einer reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben. Dazu nutzte man das Poly-(A)-Ende der mRNA-Moleküle aus und mischt die Gesamt-RNA mit Nukleotiden und Oligonukleotiden, bestehend aus 24 Desoxythymidinbausteinen (inklusive einer T7-Promotorsequenz, die für die spätere in-vitro Transkription benötigt wird) sowie Reverser Transkriptase. Durch die Zugabe weiterer Enzyme wurde die doppelsträngige cDNA gebildet. Die doppelsträngige cDNA wurde aufgereinigt und diente als Matrize für die nachfolgende in-vitro Transkription mittels T7-RNA-Polymerase. Während dieser Reaktion erfolgte neben einer linearen Amplifikation der Transkripte auch ein Einbau von biotinylierten Nukleotiden. Die Biotin-markierte cRNA wurde aufgereinigt und durch metall- und hitzeinduzierte Hydrolyse in Fragmente, bestehend aus 35-200 Basen, gespalten.

Die Quantifizierung der noch nicht fragmentierten cRNA erfolgte am NanoDrop ND-1000 (SOP 192121 und SOP 192230). Die Qualität der cRNA, unfragmentiert und fragmentiert, wurde am Agilent 2100 Bioanalyzer mit Hilfe des RNA 6000 LabChip Kit von Agilent Technologies verfolgt (SOP 192116 und SOP 192216) oder mittels RNA-Agarosegelelektrophorese (SOP 192237) .

1 bis 10 µg der biotinylierten und fragmentierten cRNA wurden für die Hybridisierung des Human Genome U133 Plus 2.0 Array eingesetzt (siehe Amendment Nr.1, Änderung 8). Während der Hybridisierung (SOP 192117 und SOP 192228) binden die fragmentierten cRNA-Moleküle an die genspezifischen Sonden des Arrays.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Während des Waschens und Färbens an der Fluidic Station 450 (SOP 192118 und SOP 192229) erfolgt eine Signalamplifikation, wobei der Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin, der an Streptavidin gekoppelt ist, durch Streptavidin an Biotin gebunden wird. Die Amplifikation des Signals wird durch einen Streptavidin spezifischen mit Biotin markierten Antikörper erzielt, an den weitere Phycoerythrin/Streptavidinkomplexe an Biotin gebunden werden (siehe Amendment Nr.1, Änderung 7).

Die Signale wurden mit dem GeneChip® Scanner 3000 7G von Affymetrix eingelesen (SOP 192120). Die so erhaltenen Bilddateien der Arrays wurden zunächst visuell auf Artefakte untersucht und anschließend analysiert. Um die Vergleichbarkeit der Chips zu gewährleisten, wurden alle Chips zu demselben "Target value" skaliert.

Die GeneChip® Operating Software (GCOS) Version 1.4 wurde sowohl zur Bedienung der Fluidic Station als auch des Scanners verwendet. Außerdem wurden mit dieser Software die Signalwerte analysiert, wobei die Standardparameter der Software verwendet wurden.

Für die Analysen wurde der Genchip HG U133 Plus 2.0 verwendet, mit dem das Expressionsprofil des gesamten menschlichen Genoms (>47.000 Transkriptvarianten: siehe Hersteller, derzeitige Angabe im Internet) erfasst wird.

Von den ursprünglich vorgesehenen 320 Microarray-Analysen konnten 13 nicht durchgeführt werden (Amendment Nr.1, Änderung 4). Der Grund hierfür war die zu geringe Menge an isolierter RNA aus den exponierten Zellen. Aufgrund dieser geringen Anzahl an Ausfällen war die Prüfung nicht gefährdet. Die betroffenen Proben waren 48 Stunden exponiert und betrafen alle Altersstufen, beide Geschlechter sowie alle Expositionsstufen (Tabelle 2).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 2: Übersicht über die Proben, die nicht für Genexpressionsanalysen mittels Microarrays verwendet wurden.

Gruppe	Anzahl Probanden	Exposition 48 h			
		R1	R2	R3	R4
MA	2		2	1	
MJ	1		1		
FA	4	2	3		1
FJ	2		2	1	
		Gesamtanzahl 13			

MA, männlich adult; MJ, männlich juvenil; WA, weiblich adult, WJ, weiblich juvenil.
R1 bis R3: Resonator 1 (0.2W/kg), Resonator 2 (2 W/kg), Resonator 3 (5 W/kg);
R4: Kontrolle (0 W/kg).

5.4.3 Echtzeit-PCR

Für die Echtzeit PCR (RT-PCR) wurden jeweils aufgereinigte RNA zweier Spender der gleichen Behandlungsgruppe gepoolt. Dabei wurde die RNA der gleichen Spender gepoolt, deren Proteinextrakte für die Western Blot Analysen gepoolt wurden. Durch das Poolen zweier Proben wurden pro ausgewähltes Gen 160 RT-PCR Analysen durchgeführt. In 14 Fällen konnten keine 2 Proben gepoolt werden, da die RNA-Konzentration in einer der beiden Proben zu gering war. In diesen Fällen wurde die RT-PCR mit nur einer Probe durchgeführt (Tabelle 3) (Amendment Nr.1, Änderung 5).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 3: Übersicht über die Proben, die nicht für die RT-PCR-Analysen verwendet wurden.

Gruppe	Anzahl Probanden	Exposition 48 h			
		R1	R2	R3	R4
MA	2		1	2	1
MJ	2		1	1	
FA	4	1	2	1	4
		Gesamtanzahl 14			

MA, männlich adult; MJ, männlich juvenil; WA, weiblich adult. R1 bis R3: Resonator 1 (0.2W/kg), Resonator 2 (2 W/kg), Resonator 3 (5 W/kg); R4: Kontrolle (0 W/kg).

Die RT-PCR Analysen wurden mit dem ABI Prism® 7500 PCR- System der Firma Applied Biosystems durchgeführt (siehe Amendment Nr.1, Änderung 9). Zu diesem Zweck wurden jeweils 2 Proben der gleichen Behandlungs- und Spendergruppen vereinigt, wobei für die RT-PCR als auch die Western Blots jeweils Proben der gleichen Spender vereinigt wurden. Für die Auswertung der RT-PCR Ergebnisse wurden 2 Methoden eingesetzt. Unter Zugrundelegung einer Kalibrationskurve erfolgt die Quantifizierung unbekannter DNA-Ausgangsmengen auf den ermittelten CT-Werten eines definierten Standards, während bei der $\Delta\Delta C_t$ - Methode ein stabil exprimiertes Gen, ein so genanntes Housekeeping-Gen als Referenz eingesetzt wird. Für die vorliegende Studie wurde GAPDH verwendet, das eine hohe und eine vergleichbare Expressionsstärke in allen untersuchten Proben mittels Microarrays zeigte.

In Tabelle 4 sind die Gene aufgelistet, deren Expression mittels RT-PCR im Einzelnen untersucht wurden. Darüber hinaus sind in der Tabelle die HS-Nummern der TaqMan-Sonden angegeben (Angaben von Applied Biosystems).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 4: Übersicht über die Gene für die RT-PCR-Analysen (incl. housekeeping gene, GAPDH)

Hs-Nummer	Probe Set ID (Affy)	Gensymbol	Gename
Hs01092525_m1	202068_s_at	LDLR	low density lipoprotein receptor
Hs00936068_m1	206134_at	ADAMDEC1	ADAM-like, decysin 1
Hs99999139_m1	201666_at	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
Hs00854958_g1	204170_s_at	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
Hs00761998_s1	210691_s_at	CACYBP	calcyclin binding protein
Hs00154457_m1	225191_at	CIRBP	cold inducible RNA binding protein
Hs00272706_m1	208319_s_at	RBM3	RNA binding motif protein 3
Hs00388055_m1	225061_at	DNAJA4	DnaJ homolog, subfamily A, member 4
Hs00199826_m1	203810_at	DNAJB4	DnaJ homolog, subfamily B, member 4
Hs00743767_sH	211968_s_at	HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha, class A member 1
Hs00971475_m1	206976_s_at	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1
Hs00190779_m1	230748_at	SLC16A6	solute carrier family 16, member 6
Hs01089954_m1	220924_s_at	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2
Hs00427038_g1	200895_s_at	FKBP4	FK506 binding protein 4
Hs00170236_m1	235086_at	THBS1	thrombospondin 1
Hs00854389_g1	218566_s_at	CHORDC1	cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing 1
Hs00374312_s1	215071_s_at	HISTH2AC	histone cluster 1, H2ac
Hs00371415_s1	214472_at	HIST1H3D	histone cluster 1, H3d
Hs00356629_g1	201841_s_at	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1
Hs00606808_m1	224919_at	MRPS6	mitochondria ribosomal protein S6
Hs00266705_g1	AFFX-HUMGAPDH/M33197_5_at	GAPDH	glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (housekeeping gene)

5.5 Bioinformatik

5.5.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse [(Principal components analysis (PCA)] ist ein Verfahren der multivariaten Statistik. Die komplexen Datensätze der exprimierten Gene werden dadurch strukturiert, vereinfacht und veranschaulicht. Es wird in der Vielzahl an regulierten Genen nach aussagekräftigen Linearkombinationen gesucht.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut Abschlussbericht

Die Varianz innerhalb der Expression einzelner Gene ist ein Maß für ihren Informationsgehalt. Bei der Hauptkomponentenanalyse werden die komplexen Daten in Abhängigkeit von der Varianz der Daten und damit des Informationsgehaltes strukturiert.

Die Daten liegen als Punktwolke in einem n-dimensionalen kartesischen Koordinatensystem vor. Es wird ein Koordinatensystem in die Punktwolke gelegt und dieses Koordinatensystem rotiert: Die erste Achse soll so durch die Punktwolke gelegt werden, dass die Varianz der Daten in dieser Richtung maximal wird (= PC1). Die zweite Achse steht auf der ersten Achse senkrecht. In ihrer Richtung ist die Varianz am zweitgrößten (= PC2).

5.5.2 Hierarchische Genklusteranalysen

Hierarchische Genklusteranalysen werden durchgeführt, um Abhängigkeiten exprimierter Gene von unterschiedlichen Parametern zu bestimmen. In dieser Prüfung sollten Abhängigkeiten exprimierter Gene von der Expositionshöhe, der Dauer der Exposition, dem Alter und dem Geschlecht der Blutspender ermittelt werden. Hier wurden hierarchische Genklusteranalysen mittels der Algorithmen die in Array Track verwendet werden, eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden die "fold changes" verwendet und die "Genesis software (Release: 1.6.0)" (<http://genome.tugraz.at/Software/GenesisCenter.html>).

6. Ergebnisse

6.1 Microarray-Analysen

6.1.1 Qualitätskontrollen der Microarray-Genexpressionsanalysen

Für die Genexpressionsanalysen mittels Microarrays wurde Gesamt-RNA aus den exponierten und Schein-exponierten kultivierten peripheren Lymphozyten extrahiert. Anschließend wurde die RNA für die Microarray Analysen aufgearbeitet und eingesetzt.

Die Qualität der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurde an folgenden Parametern überprüft:

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Beim Vergleich zweier Chips ist der "scale factor" zu beachten. Der Quotient der "scale factors" zweier Chips sollte nicht über 3 liegen. Die "scale factors" aller Chips lagen zwischen 0,530 und 3,296. Das bedeutete, dass der Faktor zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert bei 6,2 lag. Da jedoch nur die Chips eines Spenders miteinander verglichen wurden (Behandlung versus Kontrolle) wiesen die zu vergleichenden Chips "scale factors" auf, deren Quotient bei allen unter 3 lagen.

Weiterhin ist der Quotient der Signalwerte des 5'- und des 3'-Endes von GAPDH ein Maß für die Qualität der Ausgangs-RNA und der Effizienz der einzelnen Probenvorbereitungsschritte. Dieser Quotient sollte nicht größer als 3 sein. Bei den 307 durchgeführten Arrayanalysen war der Quotient in 239 Fällen nicht größer als 3. In weiteren 27 Fällen wurde der Richtwert nur leicht überschritten und lag unter 4. In 30 Fällen lag der Wert zwischen 4 und 7 und in 11 Fällen lag der Wert über 7. Obwohl in diesen Fällen die Qualitätskriterien nicht erfüllt wurden, wurden die Daten in die Auswertung der Genexpressionsanalysen mitberücksichtigt, da sie aufgrund der Gruppengröße von 10 und der Auswahlkriterien für die Findung signifikant exprimierter Gene (siehe unten) nicht ins Gewicht fallen.

Als Hybridisierungskontrolle wurde eine Mischung von biotin-markierten cRNA Transkripten in aufsteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Dabei betrug die geringste Konzentration 1,5 pM für BioB. Dieses Transkript konnte auf allen Chips mit einem "present"-call bei der niedrigsten Konzentration detektiert werden, wobei die Bindungsstelle am 5' Ende der RNA lag. (siehe **Anlage 2**).

6.1.2 Genexpressionsanalysen

Nach dem Scannen der Microarrays wurden mit der GeneChip® Operating Software (GCOS) die Expressionsdaten für jeden Array erzeugt. Weiterhin wurde mit dieser Software für jedes Gentranskript auf dem Array ein Signalwert ermittelt und festgelegt, ob das Gentranskript als "Present" (P) oder als "Absent" (A) vorlag. Beim Vergleich zweier Arrays wurde für jedes Transkript bestimmt, ob eine Zunahme "Increase" oder Abnahme "Decrease" zwischen zwei Arrays einer behandelten gegenüber einer nicht behandelten Gruppe vorlag. Zusätzlich wurde ein logarithmischer Verhältnisswert (SignalLogRatio) ermittelt, der die Stärke der Zu- bzw. Abnahme der einzelnen exprimierten Gene im Vergleich zweier Arrays angab. Eine

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut Abschlussbericht

statistische Auswertung der 10 Spender pro Gruppe wurde mittels der Affymetrix® Data Mining Tool Software durchgeführt. Hierzu wurden die Expressionswerte von jedem Transkript von 10 Spendern einer Expositionsgruppe verwendet und gegen die 10 Spender der Kontrollgruppe verglichen. Die durchschnittlichen Signalwerte und die Standardabweichung wurden berechnet. Für jedes Transkript wurden Mean fold change values (FC) errechnet als Quotient der durchschnittlichen Expressionshöhe in der behandelten und der Kontrollgruppe.

6.1.3 Festlegung der Bedingungen für signifikant regulierte Gene

Die Kriterien für die Auswahl von signifikant regulierten Genen waren ein "Present" call von 100% (d.h. in allen Spendern). Im Vergleich der Kontrollen mit den Behandlungen musste bei mindestens 7 von 10 Spendern (70%) ein "Increase call" oder "Decrease call" vorliegen, eine durchschnittliche Signalintensität von mindestens 70 (2.5 mal höher als das Signal für alle Transkripte auf dem Array, die als "marginal present" vorlagen), entweder in Gruppen mit induzierten Genen oder in den Kontrollen, falls Gene reprimiert waren. Zusätzlich musste bei der statistischen Auswertung zwischen den Behandlungen und Kontrollen ein p-Wert im T-Test unter ≤ 0.05 vorliegen.

Die auf individuelle Spender bezogene statistische Auswertung von "increase und decrease calls" ist notwendig, da die einzelnen Spender eine individuelle Abweichung regulierter Gene voneinander zeigten. Die Individualität der Spender war durch die PCA-Analysen sichtbar geworden (siehe 6.2.1). In **Anlage 3** sind alle Gene tabellarisch erfasst, die unabhängig von FC reguliert vorliegen.

Ein FC, der > -1.5 und < 1.5 ist, wurde als nicht signifikant festgelegt. Die entsprechenden Gene wurden deshalb nicht in die nachfolgenden Analysen miteinbezogen. Ebenso wurden alle nicht annotierten Gene nicht weiter berücksichtigt (siehe **Anlage 3**, Quelle nicht annotierter Gene unter "NetAffx™ Analysis Center", Stand März 2008).

In Tabelle 5 ist die Anzahl aller signifikant exprimierter und annotierter Gene unabhängig von der Richtung des Fold Changes (FC) dargestellt. Im oberen Teil der Tabelle ist die Anzahl der Gene angegeben, die mindestens in einer Behandlungs-

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

gruppe einen $FC \geq 1.5$ und < 1.7 bzw. > -1.7 und ≤ -1.5 zeigen. Im unteren Teil sind die Gene erfasst, die mindestens in einer Gruppe einen $FC \geq 1.7$ oder ≤ -1.7 zeigten. Für weibliche adulte und juvenile Spender wurde keine Zunahme, dafür eine Abnahme regulierter Gene nach 48 Stunden Exposition (siehe Tabelle 5) beobachtet. Auffallend war ebenfalls eine transkriptionelle Änderung bei der mittleren Expositionshöhe vornehmlich juveniler weiblicher Spender nach 1-stündiger Exposition gegenüber der Kontrolle.

Bei den männlichen Spendern ist nach 48 Stunden eine Zunahme regulierter Gene zu erkennen. Die Anzahl aller regulierten Gene ist bei den adulten männlichen und weiblichen Spendern beiderlei Geschlechts nach 48 Stunden etwa gleich, wobei es zumeist unterschiedliche Gene sind. Männliche juvenile Spender weisen zwischen 1 und 48 Stunden fast eine Verdreifachung der Anzahl regulierter Gene auf. Dies entspricht der Anzahl regulierter Gene bei adulten weiblichen Spendern nach 1-stündiger Exposition gegenüber der Kontrolle.

Eine von der Dosierung der SAR-Werte abhängige Regulierung von Genen ist in Tabelle 6 gezeigt. Dosierungs-abhängig regulierte Gene wurden zumeist nur in einer Behandlungsgruppe vorgefunden. Eine Dosierungs-abhängige Regulierung wurde nach einer und nach 48 Stunden Exposition beobachtet, betraf aber in den seltensten Fällen das gleiche Gen. Nur 3 Gene waren sowohl nach einer als auch nach 48 Stunden in der gleichen Behandlungsgruppe reguliert (HSPH1; STIP1; SLC5A3) (siehe **Anlage 4**).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl signifikant regulierter und annotierter Gene.

	weiblich adult (w a)						weiblich juvenil (w j)						männlich adult (m a)						männlich juvenil (m j)					
	1h			48 h			1h			48 h			1h			48 h			1h			48 h		
W/kg	0.2	2	5	0.2	2	5	0.2	2	5	0.2	2	5	0.2	2	5	0.2	2	5	0.2	2	5	0.2	2	5
¹ Anzahl		1	7		2	8		5				4					1	6			5			19
induziert		1	5		2	5						1						5			5			11
reprimiert			2			3		5				3					1	1						8
² Anzahl			16			9		7			1	4						8			6			10
induziert			15			5						2						3			6			5
reprimiert			1			4		7			1	2						5						5
Summe		1	23		2	17		12			1	8					1	14			11			29

¹Mindestens in 1 Gruppe signifikant reguliert mit einem FC ≥ 1.5 und $< 1,7$ bzw. $> -1,7$ und ≤ -1.5 .

²Mindestens in 1 Gruppe signifikant reguliert mit einem FC ≥ 1.7 bzw. ≤ -1.7

Tabelle 6: Anzahl der Gene, die in Abhängigkeit von der Dosierung nach 1 bzw. 48 Stunden reguliert vorliegen.

Expositionsdauer	1 Stunde				48 Stunden			
	0	0,2	2	5	0	0,2	2	5
Dosierungs-abhängig in einer Behandlungsgruppe			13	26 ^a			4 ^b	29
Dosierungs-abhängig in zwei Behandlungsgruppen				4 ^c				7 ^d
Dosierungs-abhängig in drei Behandlungsgruppen								3
Dosierungs-abhängig in vier Behandlungsgruppen								4

^aEin Gen (HSP90AA1) ist zusätzlich nach 48 Stunden bei gleicher Dosierung aber einer anderen Behandlungsgruppe reguliert.

^bZwei Gene (HIST1H2AC und RBM3) sind zusätzlich in allen 4 Behandlungsgruppen nach 48 Stunden bei der höchsten Dosierung reguliert.

^cEin Gen (HSPH1) ist zusätzlich in einer der beiden Behandlungsgruppen nach 48 Stunden bei der höchsten Dosierung reguliert.

^dEin Gen (STIP) ist zusätzlich in einer der beiden Behandlungsgruppen nach 1 Stunde bei der höchsten Dosierung reguliert.

6.1.4 Biologische Klassifizierung signifikant regulierter Gene.

Ein Überblick über die biologische Klassifizierung der Gene, die signifikant reguliert und einen FC von ≥ 1.5 für induzierte und ≤ -1.5 für reprimierte Gene haben, ist in Tabelle 7 dargestellt. Rote Zahlen zeigen die Anzahl induzierter und blau die Anzahl reprimierter Gene an. Das Auswahlkriterium für den FC wurde bewusst niedrig angesetzt, um mögliche toxikologisch relevante Gene nicht zu übersehen. Ein FC zwischen -1.5 und + 1.5 wurde jedoch als nicht signifikant eingestuft.

Insgesamt wurden nach diesem Auswahlkriterium 84 Gene als signifikant reguliert identifiziert. Eine Reihe von Genen konnten nicht biologisch klassifiziert werden. Sie sind in Tabelle 7 nicht aufgeführt (43 Gene).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Unter den 84 regulierten und annotierten Genen waren 19 in mehr als einer Behandlungsgruppe reguliert, 4 Gene in allen 4, 3 Gene in 3 und 12 Gene in 2 Behandlungsgruppen. Weiterhin konnten in 3 Fällen Gene gefunden werden, die bei der höchsten Dosierung sowohl nach 1 als auch nach 48 Stunde reguliert waren (HSPH1, STIP1, SLC5A3). Alle anderen Gene (insgesamt 65) sind signifikant nur in einer Behandlungsgruppe reguliert. Davon haben 33 Gene einem FC zwischen + 1.5 und + 1.7 bzw. - 1.5 und - 1.7. Einen Überblick über die Fold Changes (FC) signifikant regulierter Gene ist in **Anlage 4** dargestellt.

Bei den vier Genen (siehe Anlage 4), die in allen Spendergruppen nach 48 Stunden bei der höchsten Dosierung reguliert vorliegen, handelt es sich um das RNA binding motif protein 3 (**RBM3**), das solute carrier family 16 , member 6 (monocarboxylic acid transporter 7) (**SLC16A6**), solute carrier family 5 (inositol transporters) member 3 (**SLC5A3**) und histone cluster 1, H2ac (**HIST1H2AC**). RBM3 wird u.a. durch Kälteschock induziert. Es ist an der Regulierung der Proteinsynthese unter normalen sowie bei Temperaturerniedrigung beteiligt (Dresios et al., 2005). Dieses Gen wird bei der höchsten Dosierung aller Probanden reprimiert.

SLC5A3 (SMIT) und SLC16A6 werden durch Hyperosmose induziert (Denkert et al., 1998; Boyd et al., 2005). Ein weiteres Osmose regulierendes Gen ist **NFAT5** (Aramburu et al., 2006), das aber nur in einer Spendergruppe reguliert vorlag. Die Vermutung, dass nach 48 Stunden durch möglichen Wasserverlust in den Kulturschalen und Anreicherung von Salzen im Kulturmedium diese Gene induziert werden, kann nicht als Erklärung dienen, da zwei dieser Gene (SLC16A6; NFAT5, siehe Anlage 4) vermindert exprimiert werden. Möglicherweise haben diese Gene neben der Regulierung der Osmose noch andere Funktionen, die jedoch unbekannt sind.

Das Histon **HIST1H2AC** wird signifikant nach 48 h bei der höchsten Dosierung induziert. Ein weiteres Histon, **HIST1H2BD**; wird ebenfalls signifikant in 2 Spendergruppen und **HIST1H3D** in einer Gruppe signifikant nach 48 h bei der höchsten Dosierung induziert. HIST1H3D zeigt teilweise für andere Spendergruppen nach 1 Stunde und bei anderen Dosierungen bereits FCs (> 1.7), die jedoch statistisch nicht signifikant sind. Da Histone in der epigenetischen Regulation von Genen eine wichtige Rolle spielen, liefern diese Ergebnisse Hinweise auf mögliche Behandlungseffekte auf das Chromatin (Chromatinremodeling).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

In 3 Spendergruppen wurden drei Gene nach 48 h bei der höchsten Dosierung reguliert. Hierzu gehören **CIRP** (cold inducible RNA binding protein), **SLC38A2** (solute carrier family 38, member 2) und **MRPS6** (mitochondrial ribosomal protein S6). CIRP liegt reprimiert vor. Man vermutet, dass es bei Temperaturen unter 37°C als RNA-Chaperon wirkt. Es verlängert ebenfalls die Dauer des Zellzyklus und ist an der Zellzyklusregulierung in einigen Geweben beteiligt (Fujita, 1999). SLC38A2 ist, wie die bereits beschriebenen SLC5A3 (SMIT) und SLC16A6, an der Osmose Regulation beteiligt (Bevilacqua et al., 2005). Es war nach 48 Stunden bei der höchsten Dosierung induziert. MRPS6, ein ribosomales Protein, wird in Verbindung mit Parkinson gebracht (Papapetropoulos et al., 2006). Drei weitere Gene, die ebenfalls zumindest in einer Spendergruppe induziert vorlagen, **ACRC** (acidic repeat containing), **CCT4** (chaperonin containing TCP1 subunit 4 (delta)) und **FXR1** (fragile X mental retardation autosomal homolog 1) werden ebenfalls in Verbindung mit neuronalen Erkrankungen gebracht (Nolte et al., 2001; Lee et al., 2003; Inoue et al., 2000). Mögliche Funktionen in den Lymphozyten sind bislang nicht beschrieben.

Darüber hinaus sind 12 Gene zumindest in 2 Spendergruppen reguliert, die im folgenden aufgeführt werden:

LONP2 (Lon peptidase 2, peroxisomal) spielt beim Abbau nicht gefalteter Proteine eine wichtige Rolle (Aksam et al., 2007). Proteine, die an der Proteinfaltung beteiligt sind, sind **HSP90AA1** (heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic) class A member 1), **HSPH1** (heat shock 105kDa/110kDa protein 1), **STIP1** (stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein) und **CHORDC1** (cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing 1). CHORDC1 ist ein Bestandteil des HSP90 Chaperonkomplexes, wird durch HSF1 (heat shock factor 1) induziert und ist an der Regulation des angeborenen Immunsystems beteiligt (Hahn, 2005). STIP1 oder HSP90 organizing protein ist als Komponente des HSP90 Komplexes an der Aktivierung von MMP2 beteiligt (Eustace und Jay, 2004).

CCT4 (Chaperonin containing TCP1, subunit 4) und **CCT5** (chaperonin containing TCP1, 5) sind an der Proteinfaltung beteiligt. CCT5 ist in Lymphknotenmetastasen hochreguliert (Uchikado et al., 2006) und lag bei der höchsten Dosierung nach 1-stündiger Behandlung induziert vor, war jedoch nach 48 Stunden unverändert gegenüber den Kontrollen. Mutationen in CCT4 und ACRC (siehe oben) werden in Verbindung mit bestimmten Erkrankungen des Nervensystems gebracht. Zu dieser Gruppe

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

gehört auch HSPH1. Die beobachtete Immunantwort gegen HSPH1 bei Multipler Sklerose (MS) spielt wahrscheinlich eine regulatorische Rolle bei Entzündungen während der MS (Minohara, 2003). Weitere Gene, die mit Erkrankungen des Nervensystems assoziiert sind und in der vorliegenden Studie reguliert waren, waren **TPP1** (tripeptidyl peptidase I), **UHMK1** (U2AF homology motif (UHM) kinase 1), **FXR1** (fragile X mental retardation, autosomal homolog 1) und **PMP22** (peripheral myelin protein 22). Letzteres Transkript wirkt wahrscheinlich als Autoantigen und ist an der Auslösung von CIDP (Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyradikuloneuropathie) beteiligt.

Der Verlust des lysosomalen Enzyms TPP1 führt zur spätinfantilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose, während UHMK1 ein Kandidatengene für Schizophrenie ist (Puri et al., 2007; Golabek und Kida, 2006). Das Fragile-X-Syndrom ist eine Form erblicher geistiger Behinderung und wird verursacht durch Mutationen im FMR1 Gen. FMR1 wiederum interagiert mit FXR1, die beide für die Neuronenentwicklung essentiell sind (Inoue et al., 2000).

CKS2 (CDC28 protein kinase regulatory subunit 2) ist eines der wenigen regulierten Gene, die am Zellzyklus beteiligt sind. CKS2 ist für den Ablauf der Mitose von Bedeutung und ist bei Leukämie gemeinsam mit CKS1 induziert (Urbanowicz-Kachnowicz et al., 1999). CKS1 war durch GSM-Signale nicht reguliert. CKS2 war nach 1-stündiger Behandlung bei der höchsten Dosierung induziert, nicht aber bei den beiden niedrigeren Dosierungen. Nach 48 Stunden Behandlung war keine Induktion mehr feststellbar. Mit Ausnahme von CKS2 sind alle übrigen, den Zellzyklus beeinflussenden Gene jeweils nur in einer Spendergruppe reguliert. Diese Gene sind im folgenden beschrieben.

UBE2D3 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3), das ebenfalls den Zellzyklus beeinflussen kann, induziert den Abbau von Cyclin D1, das im Zellzyklus eine zentrale Rolle spielt und das Wachstum von Zelllinien stoppen kann (Hattori et al., 2007). Es lag wie CKS2 reguliert vor. Die Tumorsuppressorgene **GAS7** (growth arrest-specific 7) und **HIPK2** (Homeodomain interacting protein kinase 2) wirken negativ auf den Zellzyklus (Calzado et al., 2007). HIPK2 war nach 1 Stunde Exposition bei mittlerer Dosierung reprimiert und Gas 7 nach 48 Stunden bei der höchsten Dosierung in jeweils einer Behandlungsgruppe. **C/EBPalpha** (CCAAT/enhancer binding protein, alpha), dem ebenfalls Tumorsuppressor-

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

eigenschaften zugeschrieben werden (Schuster und Porse, 2006), ist nach 48 Stunden bei der höchsten Dosierung weiblicher adulter Spender induziert. Ein weiteres Gen, **Kif2A** (kinesin heavy chain member 2A) ist an der Ausbildung der Mitosespindel beteiligt und ist selbst nicht regulatorisch tätig.

Thrombospondin 1 (**THBS1**) spielt in Lymphozyten eine wichtige Rolle. Es liegt in aktivierten T-Lymphozyten induziert vor und vermittelt die Adhäsion der Lymphozyten (Li et al., 2006). Durch Behandlung mit GSM-Signalen ist es nach 48 Stunden bei der höchsten Dosierung vermindert exprimiert. Weiterhin war die Expression des LDL-Rezeptors (low density lipoprotein receptor, **LDLR**) bei der höchsten Dosierung nach 48 Stunden induziert. Der Rezeptor spielt beim Fettsäuremetabolismus eine wichtige Rolle. Sein Fehlen verursacht Hypercholesterinämie .

Alle im folgenden beschriebenen Gene sind nur in einer Spendergruppe reguliert. Die größte Gruppe kodiert dabei für Proteine, die dem Immunsystem zuzuordnen sind. **Ficolin 1** und **MASP2** (Mannan-binding lectin serine peptidase 2) sind an der Komplementaktivierung beteiligt (Sørensen et al., 2005), **IL18RAP** (interleukin 18 receptor accessory protein) an der IL-18 induzierten Signaltransduktion (Chiappetta et al., 2005), **PTGDR** (prostaglandin D2 receptor) bei Allergien und Asthma, **CCR2** (chemokine (C-C motif) receptor 2) induziert Monozyteninfiltration (Schober und Zerneck, 2007), **annexin 1** wirkt anti-inflammatorisch (Parente und Solito, 2004), **CXCL16** (chemokine (C-X-C motif) ligand 16) als Adhäsionsmolekül für Leukozyten (Ludwig und Weber, 2007) und **Siglec1** (sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin) beim angeborenen Immunsystem (Crocker und Varki, 2001). **ATF1** (activating transcription factor 1) ist für die T-Zellreifung und Aktivierung notwendig (Baumann et al., 2004). **FKBP4** (FK506 binding protein 4) ist an der Regulierung von Steroidrezeptoren in T-Zellen beteiligt und somit an der Regulierung der Immunreaktion, die durch Glucocorticoide ausgelöst wird (Kochel und Strzadala, 2004). Weiterhin spielt FKBP4 auch eine Rolle bei der Mikrotubulibildung (Chambraud et al., 2007).

Weiterhin wurden Gene reguliert, die Hitzeschockproteine kodieren, bzw. Proteine, welche mit Hitzeschockproteine assoziiert sind. **HSPA1A** (heat shock 70kDa protein 1A) und **HSPB1** (heat shock 27kDa protein 1) sind Hitzeschockproteine, während **DNAJA1** (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1) und **DNAJB1** (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1) insbesondere mit HSP70 assoziiert vorlie-

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

gen. **DNAJB6** oder Mrj kontrolliert die transkriptionelle Aktivität von NFAT im Zellkern durch Interaktion mit Klasse II Histondeacetylase nach Hitzeaktivierung (Dai et al., 2005). **DNAJB4** Expression wirkt der Invasion und dem Wachstum von Krebszellen entgegen und wird als Tumorsuppressor in Lungenkrebs angesehen (Wang et al., 2006). **AHSA1** (AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1) ist ein Activator von Hsp90 ATPase 1, das für die korrekte Faltung von Hormonrezeptoren und Proteinkinasen notwendig ist (Harst et al., 2005).

Apoptose (programmierter Zelltod) kann durch unterschiedliche Mechanismen unter Beteiligung verschiedener Gene induziert werden. Massive Zellschädigungen, insbesondere der DNA sind Auslöser von Apoptose. Durch GSM-Signale wurden 6 Gene reguliert, die sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken. Keines der Gene war mehr als einmal in einer Behandlungsgruppe reguliert. Die beobachteten anti-apoptotischen Transkripte **PDE3B** (Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited) und **NCOA3** (nuclear receptor coactivator 3) wurden nach 1 Stunde reprimiert. Die pro-apoptotischen Transkripte **CACYBP** (calcyclin binding protein), **BCAT1** (branched chain aminotransferase 1, cytosolic), **DYRK2** (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2) und **BAG3** (BCL2-associated athanogene 3) lagen nach 1 Stunde induziert (BAG3) oder reprimiert (DYRK2) vor bzw. nach 48 Stunden induziert (CACYBP) bzw reprimiert (BCAT1). Bei juvenilen männlichen Spendern waren 2 pro-apoptotische Gene nach 48 Stunden Exposition gegenläufig reguliert und nach 1 Stunde lagen bei weiblichen Spendern 2 anti-apoptotische Gene reprimiert vor. An der Phagozytierung apoptotischer Zellen ist **PTDSR** (phosphatidylserine receptor) beteiligt. Dieser Rezeptor lag nach einer Stunde Behandlung induziert vor.

Eine Reihe von Genen lagen nur nach 1 Stunde Behandlung reguliert vor. Neben **Moesin**, das als Tumormarker in Brustkrebs angesehen wird (Charafe-Jauffret et al., 2007), gehören hierzu auch drei Gene, die an der RNA Prozessierung beteiligt sind **MBNL1 und 2** (Muscleblind-like (Drosophila) sowie **DDX17** (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17) (Pascual et al., 2006). Mit Ausnahme von MBNL2 waren alle übrigen Gene reprimiert. **CCT3** (chaperonin containing TCP1, subunit 3), das für die Faltung von Proteinen des Zytoskeletts wie z.B. Aktin und Tubulin zuständig ist (Pappenberger et al., 2006), lag induziert vor. Weitere Gene waren **OXR1** (oxidation resistance 1), das oxidativem Stress entgegenwirkt (Elliott und Volkert, 2004), **USP3**

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

(ubiquitin specific peptidase 3), ein negativer Regulation der "acute phase response" (Whalen et al., 2006) sowie **ZFAND2A** (zinc finger, AN1-type domain 2A), das durch Arsen induziert wird.

Weiterhin spielt die extrazelluläre Matrix (ECM) eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus. **CSPG2** (chondroitin sulfate proteoglycan 2, (versican)) kodiert für ein extrazelluläres Protein, das die Aktivität von Chemokinen reguliert (Hirose et al., 2001). **TIMP1** (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) inhibiert extrazelluläre Proteasen, die für das Remodeling der ECM unerlässlich sind. Darüber hinaus wurde zwei Metalloproteasen reprimiert vorgefunden. **Decysin 1** wird in Makrophagen exprimiert, während **MMP9** (matrix metalloprotease 9) in Non-Hodgkin Lymphomen als prognostischer Faktor angesehen wird (Sakata et al., 2004).

Für die zelluläre Kommunikation spielt **IQGAP1** (Q motif containing GTPase activating protein 1) eine wichtige Rolle. Es ist für die Zellphysiologie von Bedeutung und interagiert mit zahlreichen Proteinen. Es moduliert das Aktincytoskelett über Rac1 und Cdc42 sowie die Zell-Zell-Adhäsion über E-Cadherin and beta-Catenin und ist an der zellulären Signalübertragung beteiligt (Brown und Sacks, 2006). **FNTA** (farnesyltransferase, CAAX box, alpha) spielt bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle, da es eine Reihe von Proteinen von Signaltransduktionswegen durch Isoprenylierung aktiviert (Lane und Beese, 2006). Bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) werden Hemmstoffe gegen Farnesyltransferasen als Therapieansatz eingesetzt (Keating, 2002). FNTA lag nach 1 Stunde reprimiert in juvenilen weiblichen Spendern vor. **Cystatin C**, ein Proteaseinhibitor, ist ein Anzeiger für Nierenschädigungen (Schiffrin et al., 2007). Spezifische Funktionen in Lymphozyten sind nicht beschrieben.

Gene, die an metabolischen Prozessen beteiligt sind, werden mit Ausnahme des bereits beschriebenen LDLR ebenfalls jeweils nur in einer Behandlungsgruppe reguliert. **ALAS1** (aminolevulinate, delta-, synthase 1), das an der Häm-Biosynthese beteiligt ist, war nach 1-stündiger Exposition in Lymphozyten weiblicher adulter Spender induziert. **HBA1** (hemoglobin, alpha1) wurde in Lymphozyten männlicher adulter Spender nach 48 Stunden Exposition bei mittlerer Dosierung reprimiert vorgefunden. Weitere an Stoffwechelvorgängen beteiligten Gene sind **GLUL** (glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)) und **GLS** (glutaminase). Nach 48 Stunden Exposition war GLUL reprimiert und GLS induziert in Lymphozyten männlicher

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

jueniler Spender. Glutamin das Substrat von GLS wird von Lymphozyten als Energiequelle genutzt. Das nach 1 Stunde bei mittlerer Dosierung induziert vorliegende **MVK** (mevalonate kinase (mevalonic aciduria)), spielt eine zentrale Rolle bei der Cholesterinbiosynthese. Defekte im MVK-Gen sind verantwortlich für erblich bedingte Stoffwechselerkrankungen (Haas und Hoffmann, 2006).

An Transportvorgängen beteiligte Gene waren **AQP3** (aquaporin 3), **SLC25A45** (solute carrier family 25, member 45) und **GM2A** (GM2 ganglioside activator) reguliert. Aqp3 ist am Wasser und Glycerintransport beteiligt (Thiagarajah et al, 2007), SLCA25A45 gehört zur Familie von Rezeptoren, die Moleküle durch die mitochondriale Membran transportieren (Haitina et al., 2006) während GM2A als Glycosphingolipid-Transporter fungiert (Yanai et al., 2006).

Darüber hinaus war jeweils ein Gen reguliert, das an der DNA-Reparatur, Ubiquitinierung, Hämostase, Autophagozytose, Vaskularisierung, Transkription und T-Zellentwicklung beteiligt ist. In 4 von 7 Fällen waren die einzelnen Gene nach 1 Stunde Exposition reguliert. Die Anzahl reprimierter Gene lag mit 5 deutlich über der Anzahl von 2 induzierten Genen (siehe Tabelle 7).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 7: Biologische Klassifizierung signifikant regulierter Gene. Anzahl induzierter Gene (rot); Anzahl reprimierter Gene (blau). $FC \leq -1.5$ und ≥ 1.5 .

		Anzahl	FA		FJ		MA		MJ	
			1h	48 h	1h	48 h	1h	48 h	1h	48 h
Stress	Hitzeschock	11	8			1			3	4
	Kälteschock	2		1/1		1		2		1/1
	Arsen-induzierbar	1	1							
	Akutphasenantwort	1	1							
	Oxidativer Stress	1			1					
	Osmolarität	4		2/1	1	2/1		2/1	1	2/1
Zellwachstum	Zellzyklus	2	1						2	
	Wachstumsstop	1								1
	Mitose	1					1			
	Signaltransduktion	2			2					
	Tumorsuppressor	2		1	1					
Apoptose	Pro-apoptotisch	4	1		1					1/1
	Anti-apoptotisch	2			2					
	Phagozytose apoptot. Zellen	1	1							
Immunantwort		11	1/1	2/2				1/1		2/3
Hämostase		1								1
Transkription / Splicing		4			2				1	1
Nervenzellen	neuronale Erkrankung	5	1	1	1	1		1	1	2
	Neuronale Funktion	1								1
Extrazell. Matrix / Zell-Zell-Interaktion		4		2						2
Metabolismus		5	2	1						2/1
DNA Reparatur		1	1							
Protein	Metabolismus	1		1				1		
	Ubiquitinierung	1	1							
	Proteaseinhibitor	1		1						
	Faltung	3	2						3	
Histone		3		2		2		2		1
Vaskularisierung		1	1							
Transport		4				1		1/1		1
Autophagozytose		1						1		
Tumormarker		1	1							
T-Zellentwicklung		1			1					
Summe		84	21/3	12/6	1/11	6/3	0	8/7	11	15/14

6.2. Bioinformatik

6.2.1 Principal components analysis (PCA)

Mittels PCA wurde überprüft, ob in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, Dosierung, Alter und Geschlecht unterschiedliche Genexpressionsmuster zu finden sind. Diese Analysen wurden mit allen Arrays der Prüfung, bzw. der Gruppen durchgeführt. In der **Anlage 4** sind die Score-Plots der PCA abgebildet. Die Ergebnisse sind im folgenden zusammengefasst:

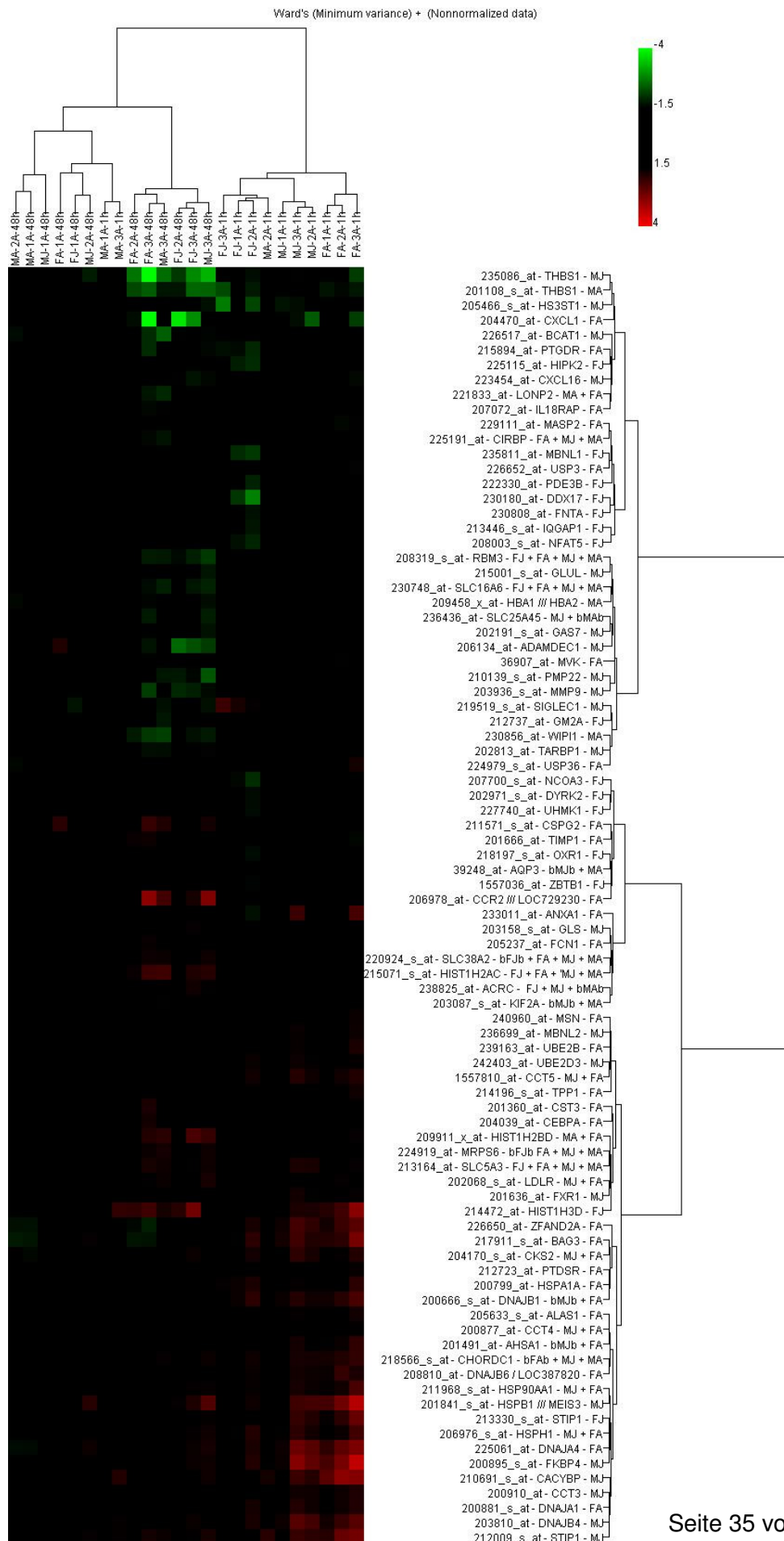
- Die untersuchten Proben lassen sich in zwei Gruppen teilen. Deutliche Unterschiede treten in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung auf (1h versus 48h), diese Gruppen sind deshalb miteinander nicht vergleichbar.
- Nach 1h Exposition zeigen die PCAs weder bezüglich der Dosierung, noch des Geschlechts oder des Alters eine Gruppierung.
- Es sind Ausreißer in den einzelnen Gruppen nach 1h Exposition zu beobachten, die jedoch nicht Dosierungs-abhängig erfolgen und deshalb in die biologische Streuung einfließen.
- Nach 48h Exposition führen die PCA-Analysen zu keiner Gruppierung hinsichtlich der Dosierung.
- Bei den weiblichen Spendern ist ein Alterunterschied erkennbar, nicht jedoch bei den männlichen Spendern.
- Bei den männlichen Spendern beider Altersgruppen sind insbesondere innerhalb der einzelnen Spender deutlich Trends bezüglich der Dosierung sichtbar. Die höchste Dosierung einiger juveniler männlicher Spender (6 von 9) setzt sich deutlich von allen übrigen ab.

6.2.2 Hierarchische Genklusteranalyse

Anhand der Hierarchische Genklusteranalyse lassen sich keine Gruppierungen weder nach Alter noch Geschlecht erkennen. Lediglich die Behandlungsdauer ermöglicht eine Gruppierung der Datensätze (Abb. 1).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Abbildung 1 : Hierarchische Genklusteranalyse der 84 annotierten Gene



Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

6.3 Validierung der Genexpressionsanalysen

Zur Validierung der Genexpressionsanalysen mittels Microarrays wurden 20 Gene ausgewählt, deren Expression mittels Echtzeit-PCR (RT-PCR) überprüft werden sollte. Die Wahl fiel auf solche Gene, die mehr als einmal signifikant reguliert vorlagen oder zumindest, wenn auch nicht signifikant reguliert, zusätzlich für einige Gene einen hohen FC zeigten. Ferner sollten aus diesen 20 Genen 10 für Western-Blot Analysen ausgesucht werden. Die Auswahl der Gene, deren Proteine im Western Blot bestimmt werden sollte, war durch die Verfügbarkeit entsprechender Antikörper beschränkt. Ebenso zeigte sich, dass einige Antikörper unspezifische reagierte und eine spezifische Proteinbande im Western Blot nicht erkannten (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht über die ausgewählten Gene für RT-PCR und Western Blots.

Gensymbol	RT-PCR	Western Blot	Kontrollen für Western Blot
LDLR	+	+	HepG2 Zellextrakt
ADAMDEC1	+	unspezifisch	-
TIMP1	+	unspezifisch	-
HIPK2	-	+	HepG2 Zellextrakt
CKS2	+	+	HeLa Zellextrakt
MRPS6	+	nicht verfügbar	-
CACYBP	+	+	HeLa Zellextrakt
BAG3	-	+	HeLa Zellextrakt
CIRBP	+	nicht verfügbar	-
RBM3	+	nicht verfügbar	-
DNAJA4	+	+	Leberzellextrakt (human)
DNAJB4	+	+	Caco-2 Zellextrakt
HSP90AA1	+	nicht verfügbar	-
HSPB1	+	-	-
HSPH1	+	nicht verfügbar	-
SLC16A6	+	nicht verfügbar	-
SLC38A2	+	nicht verfügbar	-
FKBP4	+	+	HeLa Zellextrakt
THBS1	+	nicht verfügbar	-
CCR2	-	unspezifisch	-
CHORDC1	+	unspezifisch	-
HIST1H2AC	+	+	HeLa Zellextrakt
HIST1H3D	+	+	HepG2 Zellextrakt

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

6.3.1 Echtzeit- PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine weitere Methode, mit der die Menge der von bestimmten Genen in der Zelle hergestellten Kopien ermittelt werden kann. In dieser Prüfung wurde sie zur Überprüfung und Validierung der durch die Microarrays generierten Expressionsdaten ausgewählter Gene eingesetzt.

Die RT-PCR-Daten wurden mittels T-Test auf Signifikanz überprüft. Lag der p-Wert ≤ 0.05 , wurde das Gen als signifikant reguliert angesehen. Diese Ergebnisse wurden mit den Array-Analysen verglichen. **Anlage 8** zeigt den Vergleich zwischen Microarray-Analysen und RT-PCR. Die beiden unterschiedlichen Auswerteverfahren der RT-PCR Daten sind ebenfalls in den Vergleich mit einbezogen. In **Anlage 6** sind die Messwerte der $\Delta\Delta C_t$ Methode und in **Anlage 7** die der ABIPrism-Standard-Methode mit der statistischen Auswertung tabellarisch dargestellt.

Anlage 8A zeigt den Vergleich der Genexpressionsdaten weiblicher juveniler Spender miteinander. In 5 Fällen waren Gene mittels Array-Analysen als statistisch signifikant reguliert detektiert worden. Mittels RT-PCR konnte das jeweils einmal mit der $\Delta\Delta C_t$ Methode bestätigt werden. In allen übrigen Fällen waren die Gene zwar nicht signifikant aber in die gleiche Richtung reguliert. Dies wurde auch in solchen Fällen beobachtet, die nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode und/oder nach der ABIPrism-Standard-Methode signifikant regulierte Gene zeigten (in drei bzw zwei Fällen). Auch hier waren die entsprechenden Gene nach den Array-Daten in die gleiche Richtung reguliert. Eine gegensätzliche Regulation im Vergleich der Methoden wurde nicht beobachtet.

In **Anlage 8B** wurden die Genexpressionsdaten weiblicher adulter Spender miteinander verglichen. In 11 Fällen, waren Gene mittels Microarrays als signifikant reguliert eingestuft. Davon waren Gene nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode in 6 Fällen und nach der ABIPrism-Standard-Methode der RT-PCR in 2 Fällen ebenfalls signifikant in die gleiche Richtung reguliert. Alle übrigen als signifikant reguliert identifizierten Gene mittels Microarrays sind mittels RT-PCR zwar nicht signifikant, jedoch in die gleiche Richtung reguliert. Demgegenüber stehen Gene, die nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode und/oder nach der ABIPrism-Standard-Methode der RT-PCR signifikant in 7 bzw 4 Fällen reguliert vorlagen. Interessant ist, dass die entsprechenden Gene bei den

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Microarray-Daten einem FC aufweisen, der häufig über 2 liegt aber nicht signifikant reguliert war.

In 4 Fällen zeigte die Auswertung der RT-PCR Daten nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode und in 2 Fällen nach der ABIPrism-Standard-Methode eine gegenläufige Regulation zu den Array Daten. In allen Fällen war diese gegenläufige Regulation bei der RT-PCR nicht signifikant. In 3 Fällen betraf es Gene, die mittels Microarrays signifikant reguliert waren. Jedoch lag der FC der Arraydaten nur in einem Fall über 1.6.

In **Anlage 8C** ist der Vergleich der Genexpressionsdaten männlicher juveniler Spender dargestellt. In 18 Fällen lagen Gene anhand der Microarrayanalysen als signifikant reguliert vor. Davon waren Gene nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode in 5 Fällen und nach der ABIPrism-Standard-Methode der RT-PCR in 2 Fällen ebenfalls signifikant in die gleiche Richtung reguliert. Alle übrigen im Microarray Experiment signifikant regulierten Gene sind mittels RT-PCR zwar nicht signifikant, jedoch in die gleiche Richtung reguliert.

In Einzelfällen gab es Gene, die nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode oder nach der ABIPrism-Standard-Methode der RT-PCR signifikant in 1 bzw 2 Fällen reguliert vorlagen, während die Microarraydaten eine nicht signifikante in die gleiche Richtung veränderte Regulation zeigten.

In **Anlage 8D** wurden die Genexpressionsdaten männlicher adulter Spender miteinander verglichen. In einem Fall zeigte die Auswertung der RT-PCR Daten nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode eine gegenläufige Regulation zu den Arraydaten, die jedoch nicht signifikant war. Das entsprechende Gen war mittels Microarrays als signifikant reguliert identifiziert worden. In einem bzw. zwei Fällen waren Gene mittels RT-PCR signifikant reguliert, die anhand der Arraydaten nicht reguliert waren. Nach den Microarraydaten lagen mehr Gene signifikant reguliert vor (9) als nach der RT-PCR (1 nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode; 3 nach der ABIPrism-Standard-Methode). Aber auch hier lag erneut eine große Übereinstimmung bezüglich der Richtung der Regulation vor.

Für alle vier Spendergruppen konnten in 3 Fällen die Auswertung der RT-PCR Daten nicht mit der ABIPrism-Standard-Methode durchgeführt werden. Es konnten keine PCR-Amplifikate erzeugt werden und somit auch keine Expressionswerte abgeleitet werden. Davon betroffen waren bei allen Spendergruppen die gleichen Gene (HSPB1, THBS1, DNAJA4) unabhängig von der Dauer und Intensität der Befeldung.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Für die Auswertung wurden in diesen drei Fällen deshalb nur die Ergebnisse der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode der RT-PCR-Analysen verwendet.

Darüber hinaus konnten für ADAMDEC1 nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode in Einzelfällen nach 1 Stunde Exposition keine Signale erhalten werden. Davon betroffen waren alle Spendergruppen und alle Expositionsstufen (siehe Tabelle 9), so dass keine Abhängigkeit von der Dosierung abgeleitet werden kann. Da mindestens 3 gepoolte Proben Werte lieferten, konnte eine statistische Auswertung durchgeführt werden. Für HIST1H2BD konnte für einen Pool männlich juveniler Spender nach einer Stunde Exposition im Resonator 3 kein Wert ermittelt werden.

Tabelle 9: Übersicht über die Anzahl der gepoolten Proben, die keine Werte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode für ADAMDEC1 zeigten.

Gruppe	Exposition 1 h			
	R1	R2	R3	R4
m a	1	2		
m j		1		1
w a	1	1	1	2
w j		1	1	

m a, männlich adult; m j, männlich juvenil; w a, weiblich adult, w j, weiblich juvenil. R1 bis R3; Resonator 1 bis 3.

6.3.2 Nachweis regulierter Proteine mittels spezifischer Antikörper/Western

Blotting.

Mittels spezifischer Antikörper wurden insgesamt 17 Proteine überprüft, ob infolge der Exposition gegenüber GSM-Signalen eine Regulation erfolgte. Im Arbeitspaket 1 wurden 7 vom Auftraggeber vorgegebene Proteine überprüft (siehe 6.3.3.)

Gemäß Arbeitspaket 3 wurden 10 weitere Proteine anhand der Genexpressionsdaten bestimmt und in Western Blots untersucht. Hierzu gehörten folgende Proteine, wobei in 5 Pools von 2 Spendern Proteinextrakte der einzelnen Spendergruppen auf Expression überprüft wurden: FKBP4, CACYBP, HIST1H3D, DNAJB4; DNAJA4, HIPK2; CKS2, BAG3, HIST1H2AD und LDLR. Mit Ausnahme von LDLR konnten in

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

allen Western Blots spezifische Proteinbanden identifiziert werden. LDLR konnte in keiner Probe nachgewiesen werden, obwohl die Positivkontrolle ein eindeutiges Signal erkennen ließ. Aus diesem Grunde wurden nach 10 Western Blots und mindestens zwei aus jeder Spendergruppe auf die Durchführung der restlichen 10 verzichtet. Es ist davon auszugehen, dass die Menge an Protein unterhalb der Nachweisgrenze liegt und deshalb nicht nachgewiesen werden konnte. In **Anlage 9** sind alle durchgeführten Western Blots (Arbeitspaket 3) abgebildet.

Die Intensität der Protein-spezifischen Banden im Western Blot wurde visuell miteinander verglichen. Da auf einem Blot jeweils eine Spendergruppe einschließlich Blindwert und Positivkontrolle nach 1 und 48 Stunden Exposition aufgetragen waren, konnten die drei behandelten Gruppen (R1 bis R3) direkt mit dem Blindwert (R 4) verglichen werden. Für jedes Protein ergeben sich daraus 6 Behandlungsgruppen (3 Resonatoren x 2 unterschiedliche Expositionszeiten). Da LDLR nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde, liegen bei insgesamt 9 analysierten Proteinen 54 Behandlungsgruppen vor.

Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die Häufigkeit, bei der mit GSM-Signalen behandelte Proben von der Negativkontrolle abgewichen sind. In einigen Fällen zeigen die Untersuchungen innerhalb einer Behandlungsgruppe widersprüchliche Ergebnisse und es wurden sowohl stärkere Signale als auch schwächere Signale im Vergleich zwischen exponierten Proben und der Negativkontrolle unter gleichen Expositionsbedingungen festgestellt.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 10: Übersicht über die Häufigkeit von Unterschieden zwischen den Resonatoren 1 bis 3 und der nicht behandelten Kontrolle innerhalb einer Behandlungsgruppe im Western Blot.

Spendergruppen	Anzahl an Veränderungen				
	k.V.	1/5	2/5	3/5	4/5
männl. adult.	27	15	9 (6)	3 (3)	
männl. juvenil	19	14	11 (5)	8 (5)	2 (2)
weibl. adult	20	20	13 (4)	1	
weibl. juvenil	18	17	12 (1)	6	1 (1)

k.V., keine Veränderung; 1/5; 2/5, 3/5, 4/5: Häufigkeit, mit der Unterschiede in einem, zwei, drei oder vier von 5 Western Blots innerhalb einer Behandlungsgruppe auftreten. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Analysen an, wo innerhalb einer Behandlungsgruppe widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden (siehe Text).

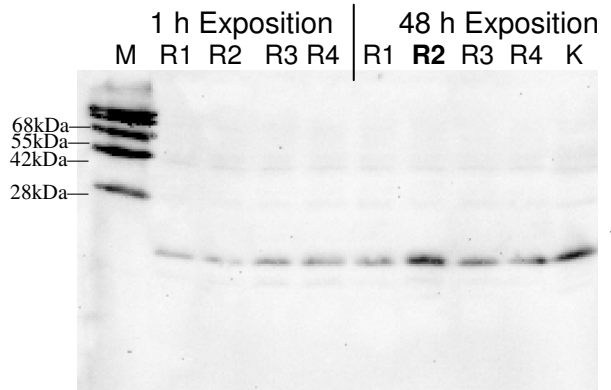
Aus Tabelle 10 geht hervor, dass die Fälle ohne Veränderungen zwischen den exponierten und Schein-exponierten Proben innerhalb einer Behandlungsgruppe bei allen Spendergruppen zumeist den größten Anteil stellen. Zusammen mit den Fällen, bei denen nur eine von 5 Veränderungen innerhalb einer Behandlungsgruppe festgestellt wurden und deshalb als nicht signifikant zu bewerten sind, stellen diese den Hauptanteil.

Die Bewertung, wann eine signifikante Veränderung bei den Western Blot Analysen vorliegt, ist willkürlich und kann weniger stringent bei 3 von 5 beobachteten Veränderungen bzw. stringent bei 4 von 5 Veränderungen als signifikant festgelegt werden. In Tabelle 10 sind 3 Fälle aufgeführt, wo in 4 von 5 Western Blots Abweichungen in den Behandlungsgruppen festgestellt wurden. Es zeigte sich aber, dass bei diesen Western Blots mindestens in einem Fall im Vergleich zur Scheinexposition die Signalintensität gegenläufig reguliert war und das Kriterium 4 von 5 Veränderungen als signifikant in eine Richtung reguliert nicht erfüllt ist. Abbildung 2 zeigt ein Beispiel für Hist1H3D. In Abbildung 2 A und B wurden jeweils Pools von Proteinextrakten zweier männlicher juveniler Spender aufgetragen. In Abb. 2 A zeigt R2 nach 48 Stunden ein stärkeres Signal gegenüber R4, während in B nach 48 Stunden R2 schwächer ist als R4. Eine genaue Übersicht über gegenläufige Signalintensitäten ist in Tabelle 11 enthalten.

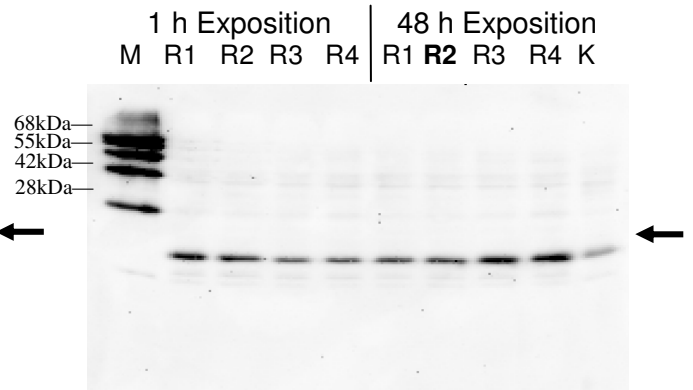
Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Abbildung 2: A: Beispiel für gegenläufige Signalintensitäten im Western Blot. R1 (0,2 W/kg), R2 (2 W/kg), R3 (5W/kg); R4 (Scheinexposition, 0 W/kg). M: Molekulargewichtsmarker.

A: Spender 6+12 (HIST1H3D)



B: Spender 20+41 (HIST1H3D)

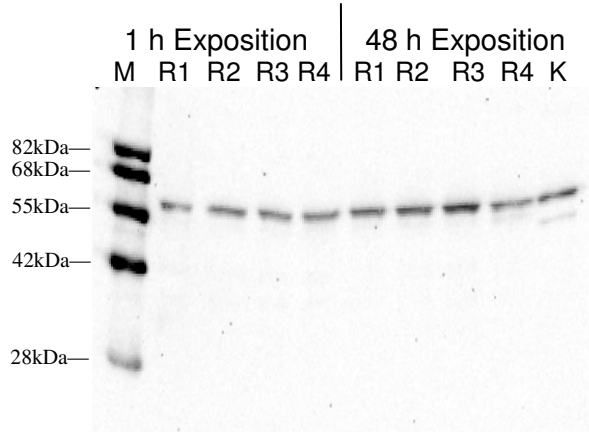


Im folgenden sind weitere Beobachtungen der visuellen Auswertungen beschrieben, die in Tabelle 10 nicht berücksichtigt worden sind. Die Intensitätsunterschiede der Signale im Western Blot zwischen den behandelten Proben und Negativkontrolle waren zumeist gering. In Abbildung 3 sind zwei Western Blots für FKBP4 von männlichen juvenilen Spendern gezeigt, wo nach 48 Stunden Exposition R2 und R3 einen leichten Dosierungs-abhängigen Anstieg zeigen. Dieses Ergebnis wurde in 2 von 5 Western Blots für FKBP4 für männliche juvenile Spender vorgefunden. In Einzelfällen wurde eine Abhängigkeit von der Dosierung auch bei anderen Spendergruppen für unterschiedliche Proteine nachgewiesen.

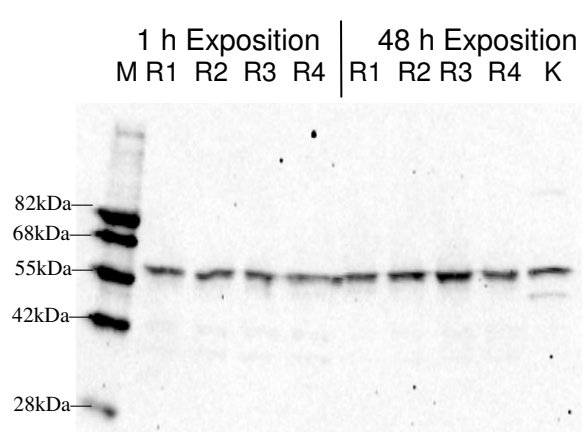
Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Abb. 3: Beispiele für Dosierungs-abhängige Signale im Western Blot. R1 (0,2 W/kg), R2 (2 W/kg), R3 (5W/kg); R4 (Scheinexposition, 0 W/kg). M: Molekulargewichtsmarker.

A: Spender 1+10 (FKBP4)



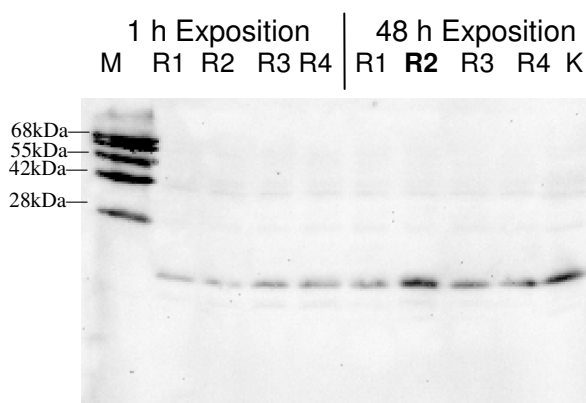
B: Spender 2+8 (FKBP4)



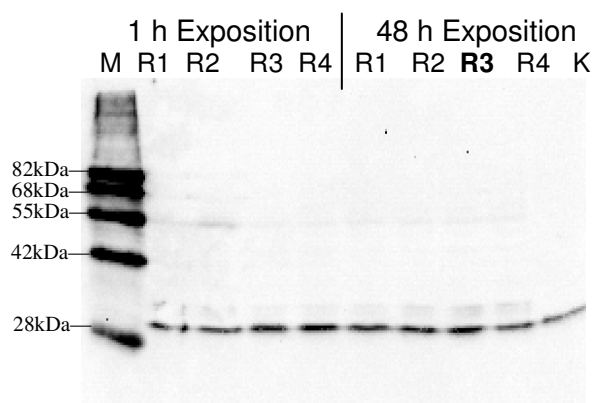
In einigen Fällen (siehe Tabelle 11) wurde eine zufällige, aber nicht Dosierungs-abhängige Regulation der Proteinexpression beobachtet. In Abb. 2 und 4 sind Beispiele gezeigt. In Abb. 2B zeigen nach einer Stunde Exposition die Proben aus R1 und R2 stärkere Signale als R3 und R4, während nach 48 Stunden Exposition die Proben aus R1 und R2 schwächer als R3 und R4 sind. In Abb. 4 A zeigt nach 48 h Exposition die Probe aus R2 das stärkste Signal und in Abb. 4 B die Probe aus R3. Die Dosierungs-unabhängige Regulation wurde untermauert durch die Tatsache, dass in R3 die höchste Exposition und in R4 die Scheinexposition erfolgte.

Abb. 4: Beispiele für Dosierungs-unabhängige Signale im Western Blot. R1 (0,2 W/kg), R2 (2 W/kg), R3 (5W/kg); R4 (Scheinexposition 0 W/kg). M: Molekulargewichtsmarker.

A: Spender 6+12 (HIST1H3D)



B: Spender 39+44 (CACYPB)



Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 11: Qualitativer Vergleich der Signalintensitäten zwischen Exposition (R1 bis R3) und Kontrolle im Western Blot.

Gruppe	Protein	Exposition 1 h			Exposition 48 h		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
m j	FKBP4	k.V.	+ (1)	+ (1)	- (1)	+ (2) - (1)	+ (3)
m a	FKBP4	k.V.	k.V.	k.V.	- (1)	+ (1)	+ (1)
w j	FKBP4	k.V.	+ (1)	k.V.	+ (1)	+ (2)	+ (2)
w a	FKBP4	+ (1)	+ (1)	k.V.	- (1)	- (1)	+ (1)
m j	CACYBP	+ (2)	+ (2)	k.V.	- (2)	- (2) + (1)	+ (1)
m a	CACYBP	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1) - (1)	+ (1) - (1)	k.V.
w j	CACYBP	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1)
w a	CACYBP	- (1)	- (1)	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1)
m j	HIST1H3D	+ (2) - (2)	+ (2) - (1)	+ (1) - (1)	- (3)	+ (1) - (3)	- (1)
m a	HIST1H3D	+ (1) - (1)	+ (1)	+ (2)	- (2)	+ (1) - (2)	+ (1) - (2)
w j	HIST1H3D	+ (1)	+ (1)	+ (1)	- (3)	- (3)	- (2)
w a	HIST1H3D	+ (1)	+ (1)	k.V.	+ (2)	+ (1)	+ (1)
m j	DNAJB4	k.V.	+ (1)	k.V.	- (1)	+ (1) - (1)	+ (1)
m a	DNAJB4	+ (1)	+ (1)	k.V.	- (1)	- (1)	k.V.
w j	DNAJB4	k.V.	+ (1)	k.V.	- (3)	- (3)	- (3)
w a	DNAJB4	k.V.	k.V.	k.V.	- (1)	- (1)	k.V.
m j	DNAJA4	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	+ (2)	+ (3)
m a	DNAJA4	k.V.	k.V.	+ (1)	k.V.	k.V.	+ (1)
w j	DNAJA4	- (1)	k.V.	- (1)	k.V.	+ (1)	+ (2)
w a	DNAJA4	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1)
m j	HIPK2	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1)
m a	HIPK2	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w j	HIPK2	- (2)	- (3)	- (2)	- (1)	- (1)	- (1)
w a	HIPK2	- (2)	- (2)	- (2)	+ (2)	+ (2)	k.V.
m j	CKS2	+ (1) - (1)	+ (2) - (1)	k.V.	+ (1) - (2)	- (2)	+ (1)
m a	CKS2	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	- (1)	- (1)
w j	CKS2	- (1)	- (1)	k.V.	k.V.	+ (1)	+ (1)
w a	CKS2	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1) - (1)	+ (1) - (1)	+ (1) - (1)
m j	BAG3	+ (1)	k.V.	k.V.	+ (1) - (1)	+ (1) - (1)	+ (1)
m a	BAG3	+ (1) - (1)	+ (1) - (1)	+ (1)	+ (2)	+ (2) - (1)	+ (1) - (1)
w j	BAG3	k.V.	+ (3) - (1)	+ (1) - (1)	- (1)	- (2)	- (2)
w a	BAG3	+ (1)	+ (2)	k.V.	+ (3)	+ (2)	+ (1)
m j	HIST1H2AD	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1)	+ (1)	k.V.
m a	HIST1H2AD	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1)	+ (1)	k.V.
w j	HIST1H2AD	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	- (1)	+ (1) - (1)
w a	HIST1H2AD	k.V.	+ (1)	k.V.	+ (1) - (1)	+ (1) - (1)	+ (1) - (1)

R1 (0,2 W/kg), R2 (2 W/kg), R3 (5W/kg). k.V, keine Veränderung; "+", "-" Zu- bzw Abnahme der Signalstärke. Zahlen in Klammern: Häufigkeit der Intensitätsänderung innerhalb einer Behandlungsgruppe (max. 5). Gegenläufig regulierte Proteine innerhalb einer Behandlungsgruppe sind sowohl an einer Zu- bzw. Abnahme der Signalintensität zu erkennen. m j, männlich juvenil; m a, männlich adult; w j, weiblich juvenil; w a, weiblich adult.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

In Tabelle 10 wurden die Beobachtungen aus Abb. 4 nicht aufgenommen. Diese Tabelle beinhaltet somit auch Ergebnisse, die nicht auf die Exposition zurückzuführen sind. Die Anzahl scheinbar Dosierungs-abhängiger Expression, wie sie in Tabelle 10 aufgelistet sind, wurde dadurch zusätzlich relativiert. Dies lässt den Schluss zu, dass in Einzelfällen zwar Unterschiede zwischen Kontrolle und Exposition festgestellt wurden, jedoch keine Dosierungs-abhängige signifikant veränderte Expression von Proteinen vorliegt.

6.3.3 Nachweis von 7 Proteinen mittels spezifischer Antikörper/Western Blots. (vom Auftraggeber vorgegeben)

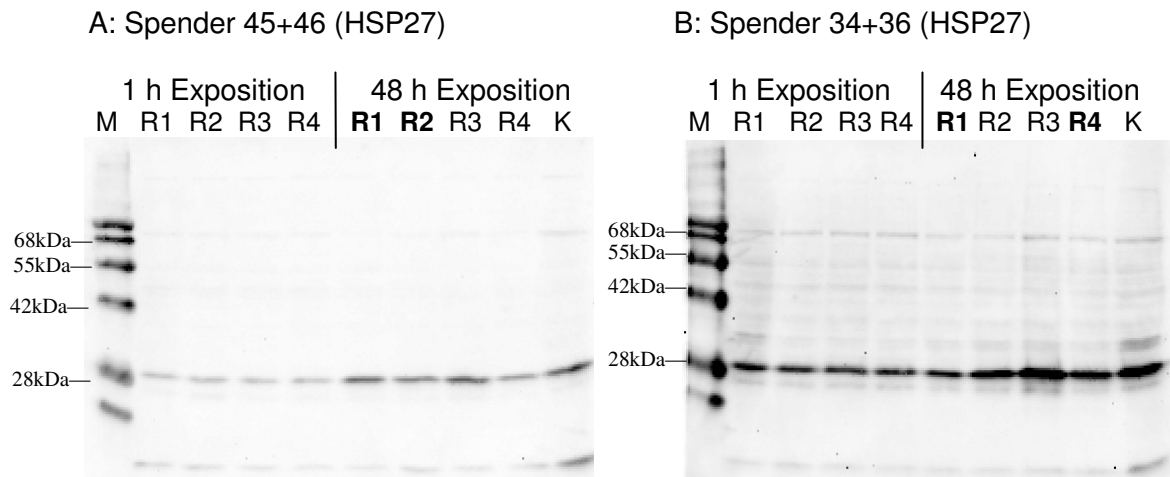
Wie im Arbeitspaket 1 vom Auftraggeber vorgegeben, wurden 7 weitere Proteine mittels Western-Blot-Analysen untersucht (**Anlage 10**). In Tabelle 12 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Mit Ausnahme von p21 (Amendment Nr.1 , Änderung 3) konnten in allen Fällen Proteinbanden identifiziert werden.

Nach 1-stündiger Exposition wurden keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Exposition vorgefunden. Während für c-MYC, c-JUN, p38MAPK sowie HSP70 nach 48 stündiger Exposition keine Expositions-abhängige Expression festgestellt wurde, zeigte phosphoryliertes HSP-27 und nicht phosphoryliertes HSP-27 eine erhöhte Expression in einigen exponierten Gruppen gegenüber der Kontrolle. Die phosphorylierte Form von HSP-27 war weniger häufig reguliert als die nicht phosphorylierte Form und zeigte bei den männlichen adulten Spendern keine Unterschiede. Nur bei männlich juvenilen Spendern lag in der höchsten exponierten Gruppe in 3 von 5 Fällen ein stärkeres Signal der phosphorylierten Form nach 48 h Exposition gegenüber der Kontrolle vor (Tabelle 12).

Die nicht phosphorylierte Form von HSP-27 zeigt nach Exposition häufig ein stärkeres Signal. Besonders ausgeprägt war dieser Befund bei männlich juvenilen und weiblich adulten Spendern. Jedoch war auch hier nicht in allen Fällen eine Abhängigkeit von der Expositionshöhe zu erkennen. In Abbildung 5A zeigt nach 48 Stunden Exposition die Probe aus R1 (0,2 W/kg) ein stärkeres Signal als R2 (2 W/kg) und in Abbildung 5B ist R1 (0.2 W/kg) schwächer als R4 (Scheinexposition).

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Abb. 5: Beispiele für Dosierungs-unabhängige Signale im Western Blot. R1 (0,2 W/kg), R2 (2 W/kg), R3 (5W/kg); R4 (Scheinexposition 0 W/kg). M: Molekulargewichtsmarker.



Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Tabelle 12: Qualitativer Vergleich der Signalintensitäten zwischen Exposition (R1 bis R3) und Kontrolle im Western Blot.

Gruppe	Protein	Exposition 1 h			Exposition 48 h		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
m j	Hsp-70	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
m a	Hsp-70	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w j	Hsp-70	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w a	Hsp-70	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
m j	HSP-27	k.V.	k.V.	k.V.	+ (4)	+ (4)	+ (5)
m a	HSP-27	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1)	+ (1)	+ (2)
w j	HSP-27	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	+ (2)	+ (3)
w a	HSP-27	k.V.	k.V.	k.V.	- (2) + (3)	+ (4)	+ (4)
m j	P-HSP-27	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	+ (2)	+ (3)
m a	P-HSP-27	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w j	P-HSP-27	k.V.	k.V.	k.V.	+ (2)	+ (2)	+ (1)
w a	P-HSP-27	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	+ (1)	+ (1)
m j	c-JUN	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
m a	c-JUN	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w j	c-JUN	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w a	c-JUN	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
m j	c-MYC	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
m a	c-MYC	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w j	c-MYC	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w a	c-MYC	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
m j	p-38MAPK	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
m a	p-38MAPK	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w j	p-38MAPK	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
w a	p-38MAPK	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
m j	p21	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.
m a	p21	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.
w j	p21	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.
w a	p21	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.	k. S.

R1 (0,2 W/kg), R2 (2 W/kg), R3 (5W/kg). k.S., keine Signale; k.V, keine Veränderung; "+" , "-" Zu- bzw Abnahme der Signalstärke. Zahlen in Klammern: Häufigkeit der Intensitätsänderung innerhalb einer Behandlungsgruppe (max. 5). Gegenläufig regulierte Proteine innerhalb einer Behandlungsgruppe sind sowohl an einer Zu- bzw. Abnahme der Signalintensität zu erkennen. m j, männlich juvenil; m a, männlich adult; w j, weiblich juvenil; w a, weiblich adult.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

6.4. Vergleich aller Genexpressionsanalysen

Mittels Microarrays wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, die das gesamte menschliche Genom umfassen. Unter den als signifikant regulierten Gene wurden 20 ausgewählt, deren Expression durch Echtzeit-PCR und 10 Gene, deren Genprodukte mittels spezifischer Antikörper überprüft wurden. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Untersuchungen sind tabellarisch in **Anlage 8** zusammengefasst.

Der Vergleich der Microarraydaten mit den RT-PCR Daten zeigte in wenigen Fällen Unterschiede in der Richtung der Expressionsstärke. In den meisten Fällen waren die Gene in beiden Methoden in die gleiche Richtung reguliert. Unterschiede gab es bezüglich der statistischen Signifikanz veränderter regulierter Gene. Sie lag bei den Microarraydaten deutlich über denen der RT-PCR Daten. Dies liegt darin begründet, dass die RT-PCR Daten nach einem statistischen Programm ausgewertet wurden, während für die Microarraydaten entsprechende Kriterien für signifikant regulierte Gene festgelegt wurden. In der vorliegenden Studie wurden die Kriterien mit $FC \geq 1.5$ bzw. ≤ -1.5 sowie eine Regulation in mindestens 7 von 10 Spendern festgelegt.

Die Ergebnisse der Western Blots werden ebenfalls in **Anlage 8** mit den Genexpressionsanalysen verglichen. Für jede Behandlungsgruppe ist die Anzahl der Unterschiede nach Exposition in den drei Resonatoren zur Kontrolle angegeben. Die Western Blots zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Proteinexpression in Abhängigkeit von den Resonatoren. Vorliegende Unterschiede waren in der Regel unabhängig von der Exposition, zeigten keinen einheitlichen Trend und waren oft nur in Einzelfällen zu beobachten. Sie bestätigen damit den Trend der RT-PCR Ergebnisse.

Unter den zusätzlich durchgeführten Western Blots (siehe Tabelle 12) zeigte HSP-27 bei weiblichen adulten und männliche juvenilen Spendern eine deutliche Zunahme der Signalintensität in Abhängigkeit von den Resonatoren in mindesten 4 von 5 Fällen. Dieses Ergebnis war weder nach den Microarrayanalysen noch nach den RT-PCR-Daten zu erwarten. Die phosphorylierte Form von HSP-27 zeigte ein Verhalten wie die übrigen untersuchten Proteine. Nur in Einzelfällen war eine Abhängigkeit von der Dosierung zu beobachten. Einzig männliche juvenile Spender zeigten bei der höchsten Exposition in 3 von 5 Fällen ein stärkeres Signal (siehe Tabelle 12) .

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

7. Diskussion

Die Studie hatte zum Ziel, den Einfluss von GSM-Signalen auf das Genom menschlicher peripherer Lymphozyten unter strikt kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Im folgenden werden die wesentlichen Ergebnisse diskutiert.

7.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

In den Hauptkomponentenanalysen wird nach globalen Zusammenhängen gesucht. Es wurden deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer (1 und 48 h Exposition) beobachtet. Nach 1 h Exposition zeigte die PCA keine Auffälligkeiten, dies bedeutet, dass durch eine 1-stündige Behandlung keine Genexpressionsveränderungen zu erwarten sind. Nach 48 Stunden wurden geschlechtsspezifische Unterschiede ermittelt. Bei den weiblichen Spendern wurde der Altersunterschied sichtbar, nicht aber bei den männlichen Spendern. Zwischen den einzelnen Spendern wurde keine Abhängigkeit von der Dosierung in der Regulation differentiell exprimierter Gene beobachtet; hingegen konnten in der Gruppe männlicher Spender innerhalb einzelner Spender Abhängigkeiten von der Dosierung beobachtet werden. In der durchgeführten Hauptkomponentenanalyse liegt der Datensatz bei der höchsten Dosierung verschiedener Spender deutlich getrennt von den übrigen Dosierungen einschließlich der Kontrolle (Anhang A: PCA, Seite 19 und 20).

Nach 48 stündiger Exposition der Lymphozyten juveniler männlicher Spender (Anhang A, Seite 19, farbig umkreist) sind die Unterschiede bei der höchsten Dosierung bezüglich der 2. Hauptkomponente (PC2-Achse) am stärksten ausgeprägt (Verschiebung nach oben entlang der PC2-Achse). Ein negatives Loading (Loadings legen die Größe des Beitrags jeder originalen Variablen zu den Hauptkomponenten fest) zeigte hier, dass eine Reprimierung der Gentranskripte zu einer Verschiebung der Punkte auf der PC2-Achse führte. Hieraus folgt, dass die Abnormität einiger Proben der höchsten Dosierung hauptsächlich durch die Reprimierung von Genen bewirkt wurde. Von diesen Genen wurden solche weiter untersucht, die ein Loading < -0.025 (insgesamt 55) oder > 0.15 (insgesamt 27) aufwiesen. Jedoch befand sich keines dieser Gene unter den mittels der Affymetrix Plattformtechnologie als statistisch signifikant reguliert identifizierten Gene und bestätigte deshalb ihre "individuelle Regulation" infolge der Exposition zu GSM-Signalen. Unter den ausgewählten 82 Genen konnten 47 keinen biologischen Funktionen zugeordnet werden.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

7.2 Genexpressionsanalysen

Die signifikant regulierten Gene, mit Ausnahme der nicht annotierten Genen, ließen sich bestimmten Funktionen zuordnen. Insbesondere Gene, die an der Faltung von Proteinen beteiligt sind und vornehmlich durch Hitze, Kälte und osmotischen Stress induzierbar sind. Die Anzahl der induzierten Gene in den einzelnen Behandlungsgruppen zeigte jedoch gravierende Unterschiede. So waren die meisten Gene, die durch Hitze induzierbar sind bei adulten weiblichen Spendern nach 1 Stunde Exposition induziert. Bei männlichen juvenilen Spendern war die Anzahl induzierter Gentranskripte gleichmäßig zwischen der kurzen (drei Gene) und der langen Behandlungsdauer (vier Gene) verteilt. Männliche adulte und weibliche juvenile Spender zeigten fast oder keine regulierten Gene aus dieser Gruppe. Durch osmotischen Stress regulierte Gene wurden in allen Behandlungsgruppen zumeist nach 48 Stunden vorgefunden. Die betroffenen Gene waren teilweise gegensätzlich reguliert, wodurch eine Interpretation der Ergebnisse erschwert wurde. Ein möglicher Verlust von Wasser aus den Kulturschalen während der Behandlung konnte ausgeschlossen werden. Ihre Repression infolge geringfügiger Temperaturschwankungen erscheint wenig plausibel.

Darüber hinaus wurden Gene reguliert, die eine Rolle im Immunsystem spielen. Solche Gene lagen in unterschiedlicher Anzahl in allen Behandlungsgruppen induziert und reprimiert vorwiegend nach 48 stündiger Behandlung vor. Diese Gene waren bevorzugt in weiblichen adulten und männliche juvenilen Spendern reguliert. Von den 11 signifikant regulierten Genen war jedoch nur ein Gen in mehr als einer Behandlungsgruppe reguliert. Weder eine Geschlechtsspezifität noch eine Altersabhängigkeit konnte beobachtet werden.

Weitere Gene, die an neuronalen Erkrankungen beteiligt sind, wurden ebenfalls in allen Behandlungsgruppen reguliert vorgefunden. Aus dieser Gruppe waren 4 von 6 Genen jeweils nur in einer Behandlungsgruppe reguliert, eine Beobachtung, die auch auf zahlreiche andere Gene mit unterschiedlichen biologischen Funktionen zutrifft. Ob deshalb die Regulation solche Gene eine spezifische Antwort nach Befeldung mit GSM Signale darstellt, ist unklar, da keine Dosierungs-Wirkungsbeziehung vorlag. Weiterhin ist die Höhe der Induktion bzw. Repression (Fold Change) bei zahlreichen Genen mit einem Wert unter ± 1.7 sehr gering wenn auch statistisch signifikant.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

Ein besonderes Interesse lag an der Identifizierung von Genen, die das Zellwachstum beeinflussen und zur Tumorbildung beitragen könnten. Es wurden aber keine typischen Protoonkogene, so beispielsweise c-Myc, Cycline und Raf-Kinase reguliert vorgefunden. Die wenigen am Zellzyklus beteiligten regulierten Gene verteilen sich auf alle Behandlungsgruppen. Zwei am Zellzyklus beteiligte Gene (UBE2D3 und CKS2) waren nur nach 1-stündiger Exposition in adulten weiblichen bzw. adulten weiblichen und juvenilen männlichen Spendern induziert reguliert, während Tumorsuppressorgene wie das Gas 7 und der Zellzyklusregulator CEBPalpha entweder reprimiert oder induziert in jeweils einer der Behandlungsgruppen vorlagen.

Unser Augenmerk richtete sich auch auf den programmierten Zelltod (Apoptose). Dieser spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen biologischen Prozessen. Apoptose von spontan entstandenen Krebszellen ist essentiell. Neben Genen, die Apoptose induzieren; wurden Gene reguliert beobachtet, die Apoptose unterbinden und häufig in Krebszellen aktiviert vorliegen. Apoptose spielt aber auch eine wichtige Rolle, um geschädigte Zellen, die nicht mehr in der Lage sind, sich zu reparieren, zu beseitigen. Solche Schädigungen können durch äußere Einflüsse hervorgerufen werden. Insgesamt wurden 6 Gene gefunden, die für pro- und anti-apoptische Proteine kodieren. Davon waren 4 Gene nur nach 1 Stunde zumeist bei mittlerer Dosierung in verschiedenen Behandlungsgruppen reguliert. Alle anti-apoptischen sowie zwei pro-apoptische Gene waren reprimiert. Nur drei der regulierten Gene zeigten einen FC der größer 1.7 oder kleiner -1.7 war. Die vielfach sporadische Regulation der pro- und anti-apoptisch kodierenden Gene lässt kein klares Bild erkennen.

Induzierte DNA-Schädigungen verursachen in der Regel eine Induktion von DNA-Reparaturenzymen. Ein einziges Gen, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist, wurde nur in einer Behandlungsgruppe nach 1 stündiger Befeldung mit GSM-Signalen induziert vorgefunden. Da dieses Gen aber auch im Zellzyklus eine Rolle spielt, lassen sich insgesamt keine Hinweise auf die Regulation von DNA-Reparaturenzymen finden.

Von den 39 Genen, die nur nach einer Stunde reguliert vorliegen, ist nicht auszuschließen, dass ihre veränderte Expression eine initiale Antwort darstellt. Weiterhin stellt sich die Frage, ob eine geringfügige Veränderung mit einem FC zwischen 1.5 und 1.7 tatsächlich als biologisch signifikant angesehen werden kann, insbesondere wenn nur eine Behandlungsgruppe davon betroffen ist. Dies betrifft 34 regulierte Gene.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut Abschlussbericht

Insgesamt sind nur 19 Gene in mehr als einer Behandlungsgruppe reguliert, wobei in 6 Fällen der FC unter -1.7 bzw. über +1.7 liegt. Unter Berücksichtigung eines FC von ± 1.7 und eine Festlegung auf eine veränderte Expression in mindestens 2 Behandlungsgruppen würden 13 Gene als reguliert definiert verbleiben. Darunter befinden sich 2 Histone kodierende Gene, zwei Gene der Osmose Regulation, 2 Proteine, die an der korrekten Proteinfaltung beteiligten und durch Hitze induzierbar sind, ein durch Kälte induzierbares Gen, ein Gen das in Verbindung mit Parkinson gebracht wird, ein am Zellzyklus beteiligtes Protein (ist aber nur nach 1 Stunde induziert), ein am Fettsäuremetabolismus beteiligtes Gen sowie 2 Gene, die an der korrekten Proteinfaltung beteiligt sind bzw. Proteine abbauen. Diese Gene sind hauptsächlich in der höchsten Expositionsstufe reguliert.

Eine systematische Veränderung in der Expression von Genen in einzelnen Behandlungsgruppen in Abhängigkeit von der Dosierung und Behandlungsdauer (Dosierung x Zeit) konnte nicht beobachtet werden. Dies spiegelt sich auch in den Fold Changes wieder (**Anlage 4**). Weiterhin lassen sich in der Genklusteranalyse keine Gruppierungen weder nach Alter noch Geschlecht erkennen. Lediglich die Behandlungsdauer ermöglicht eine Gruppierung der Datensätze.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurden für ausgewählte Gene mittels RT-PCR Analysen validiert. Insgesamt konnten mit beiden Verfahren signifikant regulierte Gene ermittelt werden, wenngleich die mittels Biochip gewonnenen Ergebnisse im Einzelfall durch quantitative RT-PCR nicht bestätigt wurden. Gene, die im Vergleich mit der anderen Methode, Microarray versus RT-PCR, als nicht signifikant reguliert identifiziert wurden, zeigten in der Regel eine Regulation in die gleiche Richtung mit den signifikant regulierten Gene der jeweiligen anderen Methode. Daraus kann abgeleitet werden, dass keine widersprüchlichen Ergebnisse mit beiden Methoden erzielt wurden.

Ebenso wurden Proteine im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert, deren Gene reguliert vorliegen. Die Western Blots zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Proteinexpression in Abhängigkeit von den Resonatoren. Vorliegende Unterschiede waren häufig unabhängig von der Exposition, zeigten keinen einheitlichen Trend und waren oft nur in Einzelfällen zu beobachten. Sie bestätigen damit den Trend der RT-PCR, dass wenn überhaupt nur sehr wenig Gene und in Einzelfällen innerhalb einer Behandlungsgruppe reguliert waren.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut Abschlussbericht

Eine mögliche Ausnahme bildete die nicht phosphorylierte Form von HSP27. Dieses Protein zeigte bei männlich juvenilen und weiblich adulten Spendern in mindestens 4 von 5 Fällen eine Zunahme der Signalstärke im Western Blot im Vergleich zur den Kontrollen. Darüber hinaus ist bekannt, dass HSP27 durch Stress phosphoryliert wird. Die phosphorylierte Form von HSP27 zeigte bei männlichen juvenilen Spendern in 3 von 5 und bei weiblichen adulten Spendern in 1 von 5 Fällen ein stärkeres Signal. Da nur die phosphorylierte Form von HSP-27 die biologisch aktive Form darstellt, ist nicht klar, ob die erhöhte Expression von HSP-27 tatsächlich bedeutsam ist.

7.3 Schlussfolgerungen

Die Exposition peripherer Lymphozyten aus menschlichem Blut gegenüber GSM-Signalen lässt nur bei wenigen Genen und nur für einzelne Individuen eine Regulierung von Genen erkennen. Von den mittels Microarrays als signifikant reguliert identifizierten 84 Gene wurden 65 nur jeweils in einer Behandlungsgruppe als signifikant reguliert vorgefunden. Die mittels RT-PCR erzielten Ergebnisse zeigten weniger signifikant regulierte Gene. Diese Unterschiede in beiden Methoden könnte darin begründet sein, dass das Auswahlkriterium für die Signifikanzkriterien der Microarrayanalysen zu niedrig angesetzt war. Von den 84 als reguliert eingestuft Gene zeigten nur 23 Gene einen FC über 2.

Unter den als reguliert identifizierten Genen befinden sich solche, deren Funktion in peripheren Lymphozyten bislang nicht bekannt sind und denen zum Beispiel Funktionen in anderen Zellen (z.B. Neuronen) zugeschrieben werden. Dies könnte darin begründet sein, dass in manchen Geweben Gene zwar transkribiert aber nie translatiert werden (Wen et al., 1995). Möglicherweise trifft das auch hier für eine Reihe von Genen zu, insbesondere jene, die nur in einer Behandlungsgruppe reguliert vorliegen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Gene epigenetisch reguliert sind. Die Vielzahl der unterschiedlichsten Funktionen, welche die regulierten Gene aufweisen, sowie die Tatsache, dass diese Gene zumeist nur in einer Behandlungsgruppe reguliert sind, lässt keine regulatorischen Netzwerke erkennen. Eine Ableitung eines möglichen Gefahrenpotenzials von Handystrahlen ist deshalb nicht möglich.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

8. Literatur

- Aksam EB, Koek A, Kiel JA, Jourdan S, Veenhuis M, van der Klei IJ. A peroxisomal lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells. *Autophagy*. 2007 Mar-Apr;3(2):96-105.
- Aramburu J, Drews-Elger K, Estrada-Gelonch A, Minguillón J, Morancho B, Santiago V, López-Rodríguez C. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochem Pharmacol*. 2006 Nov 30;72(11):1597-604.
- Baumann S, Kyewski B, Bleckmann SC, Greiner E, Rudolph D, Schmid W, Ramsay RG, Krammer PH, Schütz G, Mantamadiotis T. CREB function is required for normal thymic cellularity and post-irradiation recovery. *Eur J Immunol*. 2004 Jul;34(7):1961-71.
- Bevilacqua E, Bussolati O, Dall'Asta V, Gaccioli F, Sala R, Gazzola GC, Franchi-Gazzola R. SNAT2 silencing prevents the osmotic induction of transport system A and hinders cell recovery from hypertonic stress. *FEBS Lett*. 2005 Jun 20;579(16):3376-80.
- Boyd LM, Richardson WJ, Chen J, Kraus VB, Tewari A, Setton LA. Osmolarity regulates gene expression in intervertebral disc cells determined by gene array and real-time quantitative RT-PCR. *Ann Biomed Eng*. 2005 Aug;33(8):1071-7.
- Brown MD, Sacks DB. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol*. 2006 May;16(5):242-9.
- Calzado MA, Renner F, Roscic A, Schmitz ML. HIPK2: a versatile switchboard regulating the transcription machinery and cell death. *Cell Cycle*. 2007 Jan 15;6(2):139-43.
- Chambraud B, Belabes H, Fontaine-Lenoir V, Fellous A, Baulieu EE. The immunophilin FKBP52 specifically binds to tubulin and prevents microtubule formation. *FASEB J*. 2007 Sep;21(11):2787-97.
- Charafe-Jauffret E, Monville F, Bertucci F, Esterni B, Ginestier C, Finetti P, Cervera N, Geneix J, Hassanein M, Rabayrol L, Sobol H, Taranger-Charpin C, Xerri L, Viens P, Birnbaum D, Jacquemier J. Moesin expression is a marker of basal breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15;121(8):1779-85.
- Chiappetta G, Ammirante M, Basile A, Rosati A, Festa M, Monaco M, Vuttariello E, Cheung H, Chen NJ, Cao Z, Ono N, Ohashi PS, Yeh WC. Accessory protein-like is essential for IL-18-mediated signaling. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5351-7.
- Crocker PR, Varki A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol*. 2001 Jun;22(6):337-42.
- Dai YS, Xu J, Molkentin JD. The DnaJ-related factor Mrj interacts with nuclear factor of activated T cells c3 and mediates transcriptional repression through class II histone deacetylase recruitment. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(22):9936-48.
- Denkert C, Warskulat U, Hensel F, Häussinger D. Osmolyte strategy in human monocytes and macrophages: involvement of p38MAPK in hyperosmotic induction of betaine and myoinositol transporters. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Jun 1;354(1):172-80.
- Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, Mauro VP. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels,

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

- and enhances global protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 8;102(6):1865-70.
- Elliott NA, Volkert MR. Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Mol Cell Biol*. 2004 Apr;24(8):3180-7.
- Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle*. 2004 Sep;3(9):1098-100.
- Fujita J. Cold shock response in mammalian cells. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 1999 Nov;1(2):243-55.
- Golabek AA, Kida E. Tripeptidyl-peptidase I in health and disease. *Biol Chem*. 2006 Aug;387(8):1091-9.
- Haas D, Hoffmann GF. Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Apr 26;1:13
- Hahn JS. Regulation of Nod1 by Hsp90 chaperone complex. *FEBS Lett*. 2005 Aug 15;579(20):4513-9.
- Haitina T, Lindblom J, Renström T, Fredriksson R. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics*. 2006 Dec;88(6):779-90.
- Harst A, Lin H, Obermann WM. Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *Biochem J*. 2005 May 1;387(Pt 3):789-96.
- Hattori H, Zhang X, Jia Y, Subramanian KK, Jo H, Loison F, Newburger PE, Luo HR. RNAi screen identifies UBE2D3 as a mediator of all-trans retinoic acid-induced cell growth arrest in human acute promyelocytic NB4 cells. *Blood*. 2007 Jul 15;110(2):640-50.
- Hirose J, Kawashima H, Yoshie O, Tashiro K, Miyasaka M. Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses. *Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):5228-34.
- Inoue SB, Siomi MC, Siomi H. Molecular mechanisms of fragile X syndrome. *J Med Invest*. 2000 Aug;47(3-4):101-7.
- Keating A. Chronic myeloid leukemia: current therapies and the potential role of farnesyltransferase inhibitors. *Semin Hematol*. 2002 Jul;39(3 Suppl 2):11-7.
- Kochel I, Strzadała L. [FK506 - binding proteins in the regulation of transcription factors activity in T cells] *Postepy Hig Med Dosw* 2004 Feb 27;58:118-27.
- Lane KT, Beese LS. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J Lipid Res*. 2006 Apr;47(4):681-99.
- Lee MJ, Stephenson DA, Groves MJ, Sweeney MG, Davis MB, An SF, Houlden H, Salih MA, Timmerman V, de Jonghe P, Auer-Grumbach M, Di Maria E, Scaravilli F, Wood NW, Reilly MM. Hereditary sensory neuropathy is caused by a mutation in the delta subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct4) gene. *Hum Mol Genet*. 2003 Aug 1;12(15):1917-25.
- Li SS, Liu Z, Uzunel M, Sundqvist KG. Endogenous thrombospondin-1 is a cell-surface ligand for regulation of integrin-dependent T-lymphocyte adhesion. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3112-20.
- Ludwig A, Weber C. Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost*. 2007 May;97(5):694-703.

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

- Minohara M. [Heat shock protein 105 in multiple sclerosis] *Nippon Rinsho*. 2003 Aug;61(8):1317-22.
- Nolte D, Ramser J, Niemann S, Lehrach H, Sudbrak R, Muller U. ACRC codes for a novel nuclear protein with unusual acidic repeat tract and maps to DYT3 (dystonia parkinsonism) critical interval in xq13.1. *Neurogenetics*. 2001 Oct;3(4):207-13.
- Papapetropoulos S, Ffrench-Mullen J, McCorquodale D, Qin Y, Pablo J, Mash DC. Multiregional gene expression profiling identifies MRPS6 as a possible candidate gene for Parkinson's disease. *Gene Expr*. 2006;13(3):205-15.
- Pappenberger G, McCormack EA, Willison KR. Quantitative actin folding reactions using yeast CCT purified via an internal tag in the CCT3/gamma subunit. *J Mol Biol*. 2006 Jul 7;360(2):484-96.
- Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res*. 2004 Apr;53(4):125-32.
- Pascual M, Vicente M, Monferrer L, Artero R. The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation*. 2006 Mar;74(2-3):65-80.
- Puri V, McQuillin A, Choudhury K, Datta S, Pimm J, Thirumalai S, Krasucki R, Lawrence J, Quested D, Bass N, Moorey H, Morgan J, Pudukollu B, Kandasami G, Curtis D, Gurling H. Fine mapping by genetic association implicates the chromosome 1q23.3 gene UHMK1, encoding a serine/threonine protein kinase, as a novel schizophrenia susceptibility gene. *Biol Psychiatry*. 2007 Apr 1;61(7):873-9.
- Sakata K, Satoh M, Someya M, Asanuma H, Nagakura H, Oouchi A, Nakata K, Kogawa K, Koito K, Hareyama M, Himi T. Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2004 Jan 15;100(2):356-65.
- Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007 Jul 3;116(1):85-97.
- Schuster MB, Porse BT. C/EBPalpha: a tumour suppressor in multiple tissues? *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1766(1):88-103.
- Sørensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol*. 2005 Nov;27(3):299-319.
- Thiagarajah JR, Zhao D, Verkman AS. Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in a mouse model of colitis. *Gut*. 2007 Nov;56(11):1529-35.
- Uchikado Y, Inoue H, Haraguchi N, Mimori K, Natsugoe S, Okumura H, Aikou T, Mori M. Gene expression profiling of lymph node metastasis by oligomicroarray analysis using laser microdissection in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2006 Dec;29(6):1337-47.
- Urbanowicz-Kachnowicz I, Baghdassarian N, Nakache C, Gracia D, Mekki Y, Bryon PA, Ffrench M. cks1b expression is linked to cell proliferation in normal and malignant human lymphoid cells. *Int J Cancer*. 1999 Jul 2;82(1):98-104.
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*. 2004 Oct 14;431(7010):873-8.
- Wen J, Kawamata Y, Tojo H, Tanaka S, Tachi C. Expression of whey acidic protein (WAP) genes in tissues other than the mammary gland in normal and transgenic

Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut
Abschlussbericht

mice expressing mWAP/hGH fusion gene. Mol Reprod Dev. 1995 Aug;41(4):399-406.

Whalen R, Liu X, Boyer TD. Identification of a short form of ubiquitin-specific protease 3 that is a repressor of rat glutathione S-transferase gene expression. Biochem J. 2006 Mar 1;394(Pt 2):519-26.

Yanai H, Yoshida H, Tomono Y, Tada N, Chiba H.J The possible contribution of a general glycosphingolipid transporter, GM2 activator protein, to atherosclerosis. J Atheroscler Thromb. 2006 Dec;13(6):281-5.