

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben:

In vitro-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten
elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation

C. Blut-Hirn-Schranke

Universitätsklinik Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Projektleitung: Prof. Dr. med. Peter Young
Autor: Dr. rer. nat. Helmut Franke

März 2008

1.	Einleitung.....	3
2.	Zielsetzung.....	4
3.	Methoden.....	5
3.1.	Isolierung und Kultivierung von RBEC.....	5
3.2.	Charakterisierung der BHS Zellkultur.....	5
3.3.	RF-EMF Exposition und RNA-Extraktion.....	5
3.4.	Qualitätskontrolle RNA.....	6
3.5.	Positivkontrollen.....	8
3.6.	Prozessierung der Genchip Arrays.....	8
3.7.	Auswertung der Genchip Arrays.....	9
3.8.	Quantitative real time RT-PCR.....	10
3.9.	Aufbau der Expositionsapparatur.....	12
3.9.1.	Feldverteilung und Dosimetrie: GSM1800.....	14
3.9.2.	Kalibrierung und Steuerung der Anlage.....	17
3.9.3.	Aufbau der UMTS-Anlage.....	18
3.9.4.	Feldverteilung und Dosimetrie: UMTS.....	19
3.9.5.	Kalibrierung und Steuerung der Anlage.....	21
4.	Ergebnisse.....	22
4.1.	RBEC als in vitro-Modell für die BHS.....	22
4.2.	Temperatureffekte.....	25
4.3.	Auswertung der Genchip Arrays.....	25
4.4.	Validierung der Genchip-Analyse mit quantitativer RT-PCR.....	30
5.	Diskussion.....	32
5.1.	Vasoaktive Rezeptoren.....	34
5.2.	Zelluläre Differenzierung.....	34
5.3.	<i>Tight Junctions</i> und Barrierefunktion.....	35
5.4.	Adhäsion.....	36
5.5.	Signaltransduktion.....	36
5.6.	Transportproteine.....	37
6.	Zusammenfassung / Summary.....	37
7.	Literatur.....	39
8.	Anhang.....	42
9.	Literaturstudie.....	46

1. Einleitung

Die rasante Entwicklung des Mobilfunks hat nicht nur in der Öffentlichkeit sondern auch bei einigen Wissenschaftlern die Sorge geweckt, dass die dadurch bewirkte Exposition des Gehirns mit Mikrowellen zu gesundheitlichen Schädigungen führen könnte. Diese Befürchtungen wurden bestärkt durch experimentelle Beobachtungen, dass nach Exposition im thermischen und möglicherweise auch subthermischen Bereich Permeabilitätsstörungen der Blut-Hirn-Schranke auftreten können. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine hirnspezifische Gefäßschranke die, anders als dies in den peripheren Blutgefäßen der Fall ist, den freien Übertritt von Proteinen aus dem Blut in das Gewebe verhindert. Ihre Aufgabe besteht somit in einer Trennung des Hirngewebes von Blutmilieu. So kann das empfindliche Nervensystem des Gehirns vor dem Einfluss neurotoxischer Verbindungen geschützt werden. Wichtiger aber noch ist die Aufrechterhaltung eines konstanten stofflichen Milieus im Gehirn, das den korrekten Ablauf der komplexen neurochemischen Vorgänge ermöglicht. Die zelluläre Basis der Blut-Hirn-Schranke bilden die Endothelzellen der cerebralen Kapillargefäße. Anatomisches Substrat der BHS sind sogenannte tight junctions, die die Endothelzellen der Hirnkapillaren miteinander verbinden und gleichzeitig versiegeln. Dadurch stellen sie sicher, dass der Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn über spezifische Transportprozesse geregelt wird, welche die Endothelzellen kontrollieren. Damit wird klar, dass nicht nur die Barrierefunktion der BHS eine zentrale Rolle für den Organismus spielt, sondern auch eben diese Transportsysteme einen essentiellen Beitrag zur Versorgung des Gehirns u.a. mit Nährstoffen leisten und so für dessen Funktion von entscheidender Wichtigkeit sind. Nichtsdestotrotz beschränkt sich der Fokus vieler Arbeiten häufig ausschließlich auf die passive Schrankenfunktion der BHS. Dies ist zwar aus methodischer Sicht teils pragmatisch und evtl. nicht zu umgehen, beleuchtet aber nur einen Teil des Problems.

In diesem Rahmen versuchen vielfältige Ansätze auf Basis epidemiologischer Untersuchungen, an Tiermodellen sowie auch an isolierten Geweben und Zellkulturen, einen nichtthermischen Einfluss von elektromagnetischen Feldern (EMF) der Mobilfunktechnologie auf Funktionen biologischer Systeme aufzuklären. Die bisher vorliegenden Erkenntnisse werden in der Fachliteratur äußerst kontrovers diskutiert, noch ist allerdings kein reproduzierbarer experimenteller Beweis für eine physiologische Veränderung aufgrund nichtthermischer Feldeinwirkungen geführt worden. Effekte im thermischen Bereich sind durchaus bekannt, z.B. bei fiebrigen Erkrankungen oder als Folge eines Sonnenstichs.

Regionale Temperaturerhöhungen innerhalb des ZNS können Veränderungen der Membraneigenschaften hervorrufen, so eine Veränderung der Permeabilität oder der Aktivität von membranständigen Enzymen und Transportern. So wird die Aktivität von Ornithin-Decarboxylase (ODC) im Kapillarendothel über einen temperatursensitiven Calciumstrom erhöht. Interessanterweise konnte eine Aktivierung der Ornithin-Decarboxylase nach EMF-Exposition mit niederfrequenten Feldern [3,4], wie auch in hochfrequenten Feldern [21,29] gefunden werden. Bei SAR von 2,5 W/kg verdoppelte sich im letztern Fall die ODC Aktivität in Fibroblasten nach achtstündiger Exposition. ODC ist bekannt als Mediator einer reversiblen Permeabilitätserhöhung der BHS [18]. Höytö und Kollegen konnten die von Litovitz [21] und Penafiel [29] beschriebene Erhöhung der ODC-Aktivität nicht reproduzieren [13], zeigten aber, dass schon geringe Temperaturerhöhungen von etwa 0,8-0,9°C einen Einfluss auf die ODC-Aktivität haben [14].

Übersichtsartikel von Stögbauer [35], Hossmann und Hermann [11,12], D'Andrea [5], Glaser [10], Naarala [24] sowie Repacholi [32] fassen die Thematik zusammen und gehen z.T. über die auf die BHS fokussierte Fragestellung hinaus.

Viele der Forschungsarbeiten, die sich mit der Auswirkung von EMF auf die Dichtigkeit der BHS befassen, sind bisher vorzugsweise als Tierexperiment, also in vivo durchgeführt worden.

Die Auswahl eines in vitro Modells als Experimentelle Basis beinhaltet allerdings auch zahlreiche Vorzüge, da sowohl unter reproduzierbaren Bedingungen exponiert werden kann, als auch die Zahl der möglichen Störeinflüsse geringer ist und, verglichen mit einem vollständigen Organismus, ein zumindest partiell einfacheres System untersucht wird.

Andere Arbeiten befassen sich zwar mit in vitro Systemen, verwenden jedoch Zellkulturen, die für das Forschungsobjekt BHS keinerlei Relevanz besitzen, da sie aus völlig anderen Geweben, so zum Beispiel der Nabelschnur [20] gewonnen wurden. Daraus gezogene Rückschlüsse auf Interaktionen mit der BHS sind daher rein hypothetischer Natur. Da cerebrale Kapillarendothelzellen die zellulären Bausteine der BHS darstellen, sind Kulturen eben dieser Zellen als Modell für die BHS auf jeden Fall vorzuziehen.

Die bisher publizierten Forschungsarbeiten zum Einfluss von EMF auf die BHS ergeben ein sehr uneinheitliches Bild. Eine wissenschaftlich haltbare Klärung, ob bzw. wie Felder der Mobilfunktechnologie für die Funktion Blut-Hirn-Schranke des Menschen schädlich sein können, liefern sie bislang nicht. Weiterhin unbekannt in diesem Szenario sind die Zielmoleküle, welche quasi als Antennen mit dem EMF in direkte Wechselwirkung treten oder aber mittelbar oder unmittelbar durch Einfluss des EMF verändert werden.

Ein hypothesenfreier Ansatz, wie die hier durchgeführte Genchip Analyse, hilft auf der Suche nach diesen Zielstrukturen zunächst den Ort der Wechselwirkung des biologischen Systems mit dem elektromagnetischen Feld zu identifizieren und die Wirkung zunächst auf Genexpressionsebene zu quantifizieren.

2. Zielsetzung

Ziel dieses Projekts war die Untersuchung der Frage, ob und wie Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke durch hochfrequente Felder der Mobilfunktechnologie beeinflusst werden. Diese Studie versucht dabei explizit eine mögliche Wechselwirkung des elektromagnetischen Feldes mit dem biologischen System auf zellulärer bzw. molekularer Ebene aufzuklären. Sie verfolgt nicht die Intention, die Fragestellung nach einer Gesundheitsgefährdung des Menschen durch Mobilfunk abschließend zu beantworten.

Als in vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke werden primäre cerebrale Kapillarendothelzellen der Ratte verwendet. Mit Hilfe eines Screeningverfahrens zur differentiellen Genexpression (Chip Arrays) werden die Einflüsse von Feldern des Mobilfunks (GSM und UMTS, SAR 0.4, 1, 3 und 8 W/kg) auf das Genexpressionsmuster dieses Zellkulturmodells untersucht. Das Screening erfolgt auf Ebene der mRNA, um eine verstärkte oder abgeschwächte Expression einzelner Gene zu identifizieren. Für eine Auswahl an Kandidatengenen wird eine beobachtete Änderung der Genexpression mittels quantitativer real time PCR verifiziert.

Durch das in dieser Studie eingesetzte Screeningverfahren können Gene der Blut-Hirn-Schranke identifiziert werden, deren Expression durch Felder der Mobilfunktechnologie beeinflusst wird und somit ggf. auch die Expression der Proteine für die sie codieren verändern.

3. Methoden

3.1. Isolierung und Kultivierung von RBEC

Die Methode zur Isolierung einer primären Zellkultur cerebraler Kapillarendothelzellen aus dem Rattenhirn beruht auf einer von Bowman et al. [1,2] entwickelten Vorschrift zur Präparation von Endothelzellen, die von Hughes und Lantos [15] optimiert wurde. Uns liegt eine weiter aktualisierte Vorschrift vor, nach der die Isolierung des Rattenendothels durchgeführt wurde. (Preparation of primary rat brain capillary endothelial cell culture, NJ Abbott, PA Revest et al., Blood-Brain Barrier Group, King's College, London, unpubliziertes Manuskript). Die Idee dieser Präparationsmethode beruht darauf, einzelne Kapillarfragmente aus dem Säugerhirn zu isolieren. Die Methode ist dabei so ausgerichtet, dass bei der Isolation von Blutgefäßen möglichst nur Kapillargefäße gewonnen werden. Dies limitiert die Kontamination der Primärkultur durch Glattmuskelzellen. Ferner wird der Eintrag von Endothelzellen vom nicht schrankenbildenden Phänotyp aus größeren Gefäßen in die resultierende Zellkultur umgangen. Ausgesät auf Kulturschalen, die mit einer entsprechenden Collagenmatrix beschichtet wurden, wachsen aus den Kapillarfragmenten dann die Endothelzellen von BHS Phänotyp aus.

Die Präparation liefert aus 4 Rattenhirnen ausreichend Zellen für ein Expositionsexperiment bei dem 10 Petrischalen zu je 10cm² eingesetzt werden. Die RBEC Kulturen bilden nach etwa 7 Tagen einen konfluenten Zellrasen aus und können für maximal 14 Tage kultiviert werden, so dass die EMF Exposition innerhalb dieses Zeitfensters durchzuführen war.

3.2. Charakterisierung der BHS Zellkultur

Morphologische Eigenheiten der isolierten Zellen wie die Ausbildung eines einschichtigen, aus langgezogenen, spindelförmigen Zellen aufgebauten Zellrasens sowie der positive Nachweis der Endothelzellmarker vWF-8 und Vimentin erlauben eine eindeutige Identifizierung als Endothelzellen. Der charakteristische Nachweis der in die Ausbildung von *tight junctions* involvierten Proteine Occludin und ZO-1 belegt die barrierebildenden Eigenschaften der Endothelzellen. Für beide Proteine konnte die für diese Zellen typische Lokalisation im Bereich des Zellrandes gezeigt werden. Somit ist sichergestellt, dass die RBEC neben ihrem endothelialen Phänotyp auch BHS-Eigenschaften ausprägen.

Eine Kontamination der Primärkultur von RBEC mit Gliazellen und Makrophagen konnte anhand immunocytochemischer Färbungen ausgeschlossen werden. Ebenso ist eine Kontamination durch Fibroblasten auszuschließen, da die für Vimentin positiven Zellen jeweils gleichzeitig einen positiven vWF-8 Nachweis zeigten. Der Nachweis von Zellen die α -SMA (Glattmuskelaktin) exprimieren zeigt eine Kontamination mit Pericyten an, wie sie typisch für Primärkulturen von cerebralem Kapillarendothel ist.

Der Anteil an Pericyten liegt auch nach längerer Kulturdauer nach Abschätzungen deutlich unter 1% und deckt sich insofern mit dem bisher in unserem Labor erfolgreich zur in vitro-Simulation der BHS genutzten Modell aus porcinen Kapillarendothelzellen.

3.3. RF-EMF Exposition und RNA-Extraktion

Primärkulturen cerebraler Kapillarendothelzellen der Ratte (RBEC) als in vitro-Modell der BHS wurden elektromagnetischen Feldern nach dem GSM1800- oder dem UMTS-Standard kontinuierlich ausgesetzt. In Anlehnung an frühere Experimente [9] wurden als Expositionsdauer 72 h gewählt. Die Exposition bei Spezifischen Absorptionsraten (SAR) von 0.4, 1.0, 3.0 oder 8.0 W/kg erfolgte in radialen Hohlwellenleitern unter kontinuierlicher Aufzeichnung von Feldstärke und Temperatur. Jeweils 5 Petrischalen aus einer identischen Präparationscharge wurden parallel exponiert bzw. scheinexponiert. Unmittelbar nach der Exposition wurden die Zellen einer kurzen mikroskopischen Beurteilung unterzogen und sofort lysiert. Die Aufarbeitung des Lysats zur Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, D) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die aufgereinigten RNA-Proben wurden bei -80°C tiefgekühlt gelagert.

Alle weiteren Arbeitsschritte bis hin zur Genchip-Analytik wurden von den Mitarbeitern der IFG (Integrierte Funktionelle Genomik am IZKF, Uniklinik Münster) durchgeführt.

3.4. Qualitätskontrolle RNA

Bei Arbeiten mit RNA muss besonderes Augenmerk auf deren enzymatische Zersetzung durch die quasi überall vorkommenden Ribonukleasen (RNasen) gelegt werden. RNA ist ein recht instabiles Molekül, welches in der Zelle beständig aufgebaut und zur erneuten Verwendung wieder zerlegt wird, meist mit Hilfe eben dieser RNasen. Neben einer besonders sorgfältigen und sauberen Vorgehensweise bei der Isolierung von RNA, beispielsweise der Verwendung von RNasen dekontaminierter Laborgeräte, muss daher vor der kostenintensiven Prozessierung der RNA und der Hybridisierung auf dem Chip-Array die Integrität der RNA sichergestellt werden. Das erfordert eine besonders aufmerksame Qualitätskontrolle der RNA.

Quantität und Qualität der isolierten RNA wurden mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Böblingen) auf dem *RNA 6000 Nano LabChip* kontrolliert. Dieses System trennt die Proben mittels einer Kapillarelektrophorese auf und ermöglicht, die Kettenlänge der RNA-Moleküle digitalisiert zu erfassen. Neben der Quantifizierung der RNA-Ausbeute liefert es eine Qualitätsaussage in Form einer RIN (*RNA Integrity Number*). Die von Schröder et al. [33] eingeführte RIN ermöglicht eine objektive Standardisierung der Qualitätsaussage. Klassisch wurde zur Bestimmung der RNA-Qualität das angefärbte Bandenmuster eines Agarosegels subjektiv durch den Experimentator interpretiert. Als qualitativ hochwertig wurden Proben mit einem Verhältnis der Intensität der 28S:18S RNA-Banden von 2:1 angesehen. Der Vergleich von Ergebnissen verschiedener Forschungseinrichtungen ist bei Verwendung dieser subjektiven Methode entsprechend großen Unsicherheiten unterworfen. Im Detail macht die RIN eine Aussage über die Integrität der RNA in der Probe. Eine hohe RIN spricht für hohe Integrität, entsprechend einer geringen Zersetzung der RNA. Die Skala umfasst Werte von vollständig zerfallen (RIN=1) bis völlig intakt (RIN=10). Eine RIN größer als 6 wird allgemein als Kriterium für gute RNA-Qualität angesehen. Den absoluten Wert der RIN ermittelt eine adaptive Software. Sie sucht selbstständig Bereiche im Messsignal, die Informationen tragen und wurde durch Lernen mit neuronalen Netzen auf einer großen Datenbasis trainiert.

Weiterhin wird mit dem Chip noch das Verhältnis von 28S:18S rRNA (Kontamination mit ribosomaler RNA) ermittelt und ein virtuelles Elektropherogramm (Abb.1a) der Proben ausgegeben.

Die RNA-Ausbeute je Probe war ausreichend hoch, um auf die zunächst vorgesehene Amplifikation der RNA vor der Genchip Analyse verzichten zu können werden. Die RIN wurde für jede RNA-Probe individuell bestimmt und lag im Mittel bei 9,6. Eine hohe Qualität der RNA war somit gewährleistet.

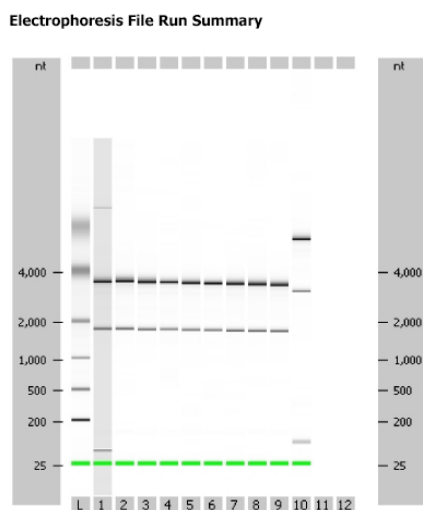


Abb.1a: Virtuelles Elektropherogramm von RNA-Proben aus RBEC, ausgegeben vom Agilent Bioanalyzer 2100

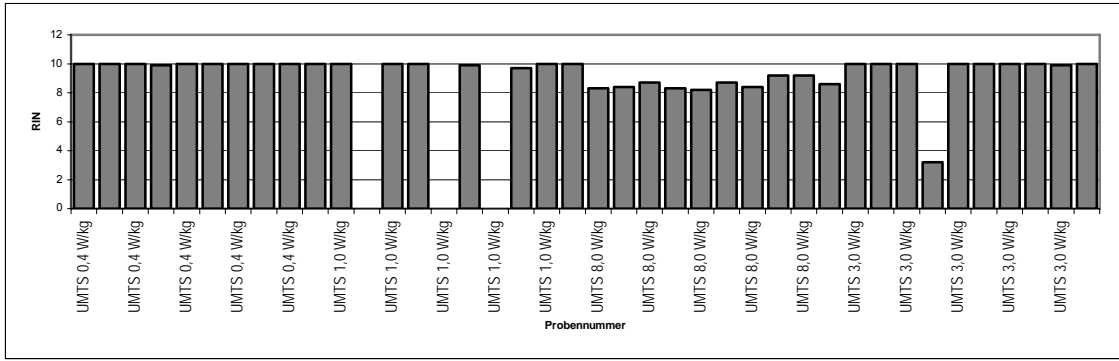


Abb.1b: Übersicht der RIN für die RNA-Proben aus UMTS exponierten und scheinexponierten Endothelzellen. Für 3 Proben konnte die Software keine RIN berechnen, die Lücken entsprechen daher nicht RIN=0

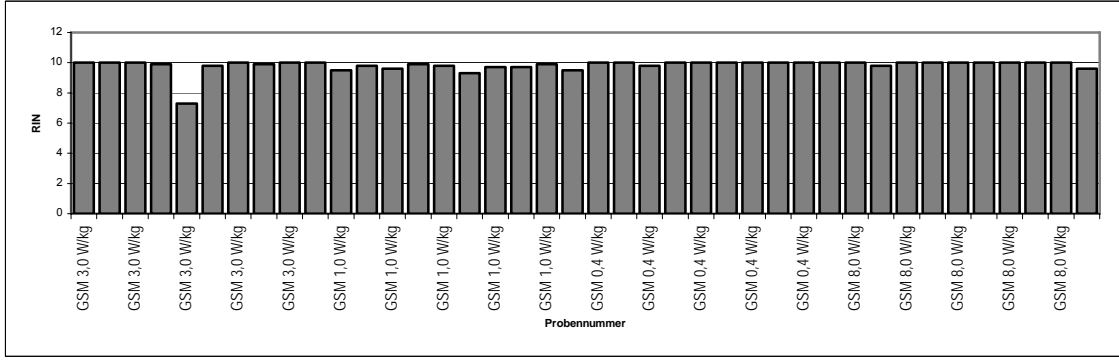


Abb.1c: Übersicht der RIN für die RNA-Proben aus GSM1800 exponierten und scheinexponierten Endothelzellen

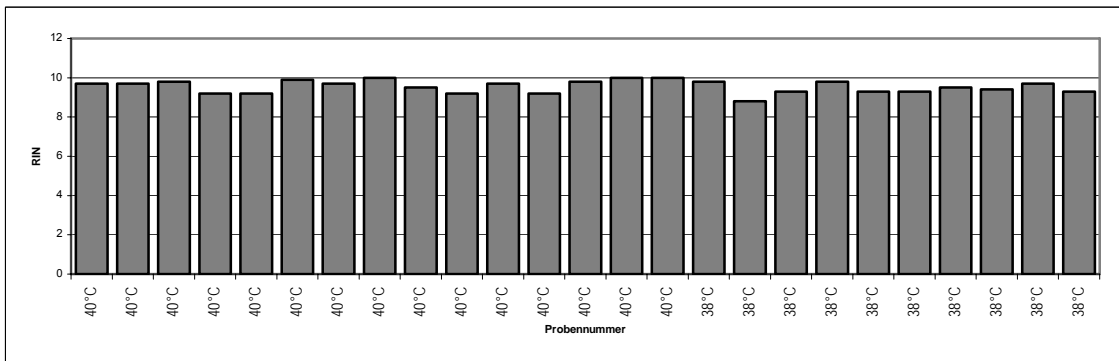


Abb.1d: Übersicht der RIN für die RNA-Proben der Temperaturkontrollen

3.5. Positivkontrollen

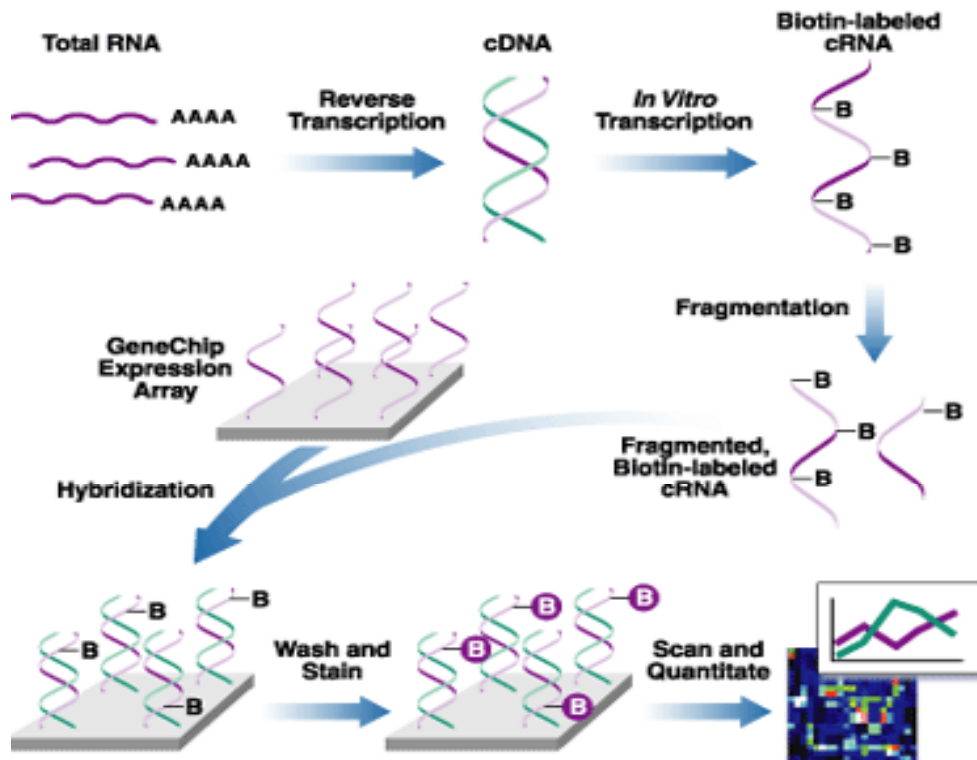
Zur Simulation der rein thermischen Beeinflussung der Genregulation wurden Kontrollexperimente bei erhöhter Temperatur von 38°C sowie 40°C durchgeführt. Die Zellkulturen wurden dazu ebenfalls im Hohlleiter, bei erhöhter Brutschranktemperatur und ausgeschaltetem Feld über 72 h inkubiert. Die entsprechende Kontrollgruppe wurde bei 37°C in einem anderen Brutschrank gehalten.

3.6. Prozessierung der Genchip Arrays

Für die Genchip Analytik wurden Chips vom Typ *Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array* verwendet. Bevor die Proben auf die einzelnen Chips gebracht werden konnten, war noch eine Prozessierung der RNA notwendig. Bei den Affymetrix Chips handelt es sich um Oligonucleotid-Arrays, auf denen 25 Basen lange DNA Abschnitte auf einem Glasträger fixiert sind. Diese „Probes“ oder „Sonden“ genannten Oligonucleotide sind zum Zielgen perfekt komplementär und jeweils zu mehrere identischen Kopien auf dem Chip immobilisiert. Daher spricht man bei einer solchen Gruppe identischer Probes auch von einem „Probe-Set“. Da von jedem Gen meist mehrere Probe-Sets aus verschiedenen Abschnitten dieses Gens auf dem Chip vorliegen, ist die Anzahl der Probe-Sets größer als die der auf dem Chip repräsentierten Gene. Im Fall der vorliegenden Rat Genome 230 2.0 Arrays gibt Affymetrix an, dass insgesamt „gut 28.000 Gene“ (eine genauere Information ist nicht verfügbar) durch die 31.099 Probe-Sets auf dem Chip repräsentiert werden .

Jede RNA-Probe wurde zunächst in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. In einem zweiten, in vitro Transkription genannten Schritt entsteht aus dieser cDNA wiederum cRNA, die mit einzelnen Biotin-Markierungen versehen ist. Diese Markierungen sind wichtig, um bei der späteren „Entwicklung“ der Chip Arrays die an den Chip gebundene cRNA anfärben und somit für die Analyse sichtbar machen zu können (Abb.2).

Die markierte cRNA wird passend zur geringen Länge der Probe-Sets gleichfalls fragmentiert und kann dann auf dem Chip hybridisiert werden. Bei dieser typischerweise über Nacht angesetzten Reaktion lagern sich die Fragmente der markierten cRNA fest an komplementäre, auf dem Chip immobilisierte Probe-Sets an. Nach Abwaschen der nichtgebundenen cRNA können die gebundenen RNA-Fragmente angefärbt werden. Zur Datengenerierung wird der gefärbte Chip in einem speziellen hochauflösenden Scanner ausgelesen und die Fluoreszenzsignale in einer Bilddatei gespeichert. Aus jedem Experiment wurden sämtliche fünf exponierten und jeweils zwei scheinexponierte Proben prozessiert und auf Chip Arrays hybridisiert. Drei weitere scheinexponierte Proben wurden als Backup und für die RT-PCR Analyse zurückgehalten.



Quelle: www.affymetrix.com

Abb.2 Schema zur Aufarbeitung der RNA von der Prozessierung und Hybridisierung bis zum Erhalt des Rohdatensatzes der Genexpressionsanalyse

3.7. Auswertung der Genchip Arrays

Die Auswertung der Genchip Arrays umfasst zwei Stufen. Zunächst muss eine Umwandlung der vom Scanner ausgegebenen Bilddatei erfolgen, dabei wird eine tabellarische Datei erzeugt, in der jedem einzelnen Probe-Set eine gemittelte Signalintensität zugeordnet ist. Danach gilt es im Rahmen einer bioinformatischen Analyse aus dem Pool aller detektierten Gene schrittweise die zu identifizieren, die auf die Exposition mit dem elektromagnetischen Feld reagiert haben.

Zur Auswertung der vom Scanner aus den Fluoreszenzintensitäten erfassten Rohdaten wurden diese mit dem MAS5.0 (MicroArray Suite 5.0, Affymetrix) Algorithmus prozessiert. Dabei werden die Signale der einzelnen Chips auf eine durchschnittliche Fluoreszenz angeglichen (normalisiert). Auf Grundlage komplexer Algorithmen berechnet MAS5.0 des weiteren ein Maß für die Zuverlässigkeit der Meßwerte. Die einzelnen Signale der Gene werden durch die Software als *absent*, *marginal* oder *present* charakterisiert. Dabei macht sich die Software zunutze, dass sich auf dem Chip zusätzlich zu den perfekt komplementären DNA-Sonden, den *perfect-match* Sonden, auch sogenannte *mismatch* Sonden befinden. Bei diesen ist die mittlere (die 13.) Base gegen ein falsches Nucleotid ausgetauscht. Die Software vergleicht nun die Fluoreszenzintensität der zueinandergehörigen *perfect-match* und *mismatch* Sonden und bestimmt aus dem Quotienten ein Maß für die Häufigkeit von Fehlhybridisierungen und macht somit eine klassifizierende Qualitätsaussage. Im Rahmen der folgenden bioinformatischen Analyse gilt es dann, sukzessive Werte mit schlechtem statistischen Support und schwach regulierte Gene zu entfernen. Für die weitere Auswertung wurden daher zunächst Gene gefiltert, die in den jeweils fünf exponierten Replikaten weniger als drei *present* Notationen aufwiesen. Diese wurden in den folgenden Analyseschritten nicht berücksichtigt. Strenggenommen handelt es sich hier um die bereits beschriebenen Probe-Sets welche die Gene

repräsentieren. Da der Unterschied zwischen den Begriffen Probe-Set und Gen aber ohnehin nur darin besteht, dass ein bestimmtes Gen ggf. durch zwei oder mehrere Probe-Sets auf dem Chip repräsentiert sein kann, wird der besseren Lesbarkeit halber im Folgenden ausschließlich der Begriff Gene verwendet.

Der vollständige Datensatz wurde einer Korrelationsanalyse unterworfen, um eine Gruppierung der experimentellen Gruppen kenntlich zu machen und gegebenenfalls eine Unterscheidung der exponierten von scheinexponierten Proben zu ermöglichen. Die Korrelationsanalyse vergleicht die globalen Datensätze, nicht die Expression einzelner Gene, also quasi das Gesamtbild jedes einzelnen Chips mit den anderen. Es wird analysiert, ob sich Expressionsmuster einzelner Chips ähnlich sind und die Ähnlichkeiten in einem Korrelationsplot gegenübergestellt. Ein Farbcode dient in dem Plot der quantitativen Darstellung, in diesem Falle steht gelb für hohe, blau für keine Ähnlichkeit.

Im folgenden Schritt wurden die Signalintensitäten der exponierten und scheinexponierten Proben zueinander ins Verhältnis gesetzt und Gene mit einer Expressionsänderung von weniger als 1,4-fach herausgefiltert. Um in diesem Selektionsschritt nicht voreilig interessante Kandidaten zu verlieren wurde die Grenze sehr konservativ gewählt. In diesem Selektionsschritt wurde nicht differenziert, bei welcher SAR ein betreffendes Gen 1,4-fach reguliert wurde. Hier blieben demnach alle Gene in der Auswahl, die bei mindestens einer SAR (egal welcher) hoch- oder herunterreguliert waren.

Mit Hilfe eines t-Tests wurden im nächsten Schritt die Daten der Temperaturkontrollen in die Analyse einbezogen. Auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden dabei Gene gefiltert, deren Expression sich lediglich bzw. auch aufgrund der Temperaturerhöhung geändert hatte. Beide Temperaturkontrollen wurden hier gleichwertig behandelt, d.h. eine veränderte Genexpression schon bei einem der Experimente mit erhöhter Temperatur (38°C oder 40°C) führte zum Ausschluss des betreffenden Gens aus der Kandidatenliste.

Die Expositionintensitäten der mittleren SAR-Werte flankieren den in der 26. BlmSchV festgelegten Grenzwert für die Teilkörperexposition (2 W/kg), weshalb dem Vergleich der bei diesen beiden SAR-Werten exponierten Proben besondere Bedeutung beigemessen wurde. Dazu wurden mit Hilfe der SAM (*statistical analysis of microarrays*) die Expressionsmuster der Proben verglichen und solche Gene selektiert, bei denen der Unterschied der Regulation zwischen 1 W/kg und 3 W/kg besonders hoch war. Die SAM (siehe auch Tusher et al. [36]) ist eine softwarebasierte Methode zur diskriminatorischen Genanalyse und vergleicht hier speziell die Genexpressionprofile der Zellen, die bei 1 W/kg und 3 W/kg exponiert wurden. Die Parameter der Softwareanalyse wurden so eingestellt, dass keine falsch positiven Treffer identifiziert wurden, d.h. die FDA (*false discovery rate*) wurde auf null gesetzt.

3.8. Quantitative real time RT-PCR

Die Genchipanalyse ist, bedingt durch die Komplexität und die große Menge an Daten die mit ihrer Hilfe generiert werden, eine Methode bei deren Auswertung verschiedene Optionen zur Analyse und Interpretation offen stehen. Entsprechend gibt es kein standardisiertes Verfahren zur Auswertung, welches anhand eines starren Schemas aufgearbeitet werden kann und zu einem eindeutigen Ergebnis führt. Aus dem identischen Datensatz könnten daher durchaus auch abweichende Ergebnisse generiert werden. Bereits für die Normalisierung der im Genchip Scanner erzeugten Bilddaten stehen unterschiedliche Algorithmen zur Auswahl. Auch die weitere Analyse ist u.a. abhängig von der Auswahl der statistischen Werkzeuge, der Schwellenhöhe für Ausschlusskriterien (verlangte Mindestregulation) und individuell vorzunehmender Wichtung weiterer Informationen, die zu den untersuchten Genen vorliegen.

Die sich hieraus ergebenden Spielräume bei der Datenauswertung machen eine Absicherung der Ergebnisse obligatorisch. Einerseits wurde dies hier durch den Einsatz von fünf biologischen Replikaten für jedes Experiment erreicht, andererseits ist aber auch immer die Überprüfung von Genchip-Analysen mit einer unabhängigen Methode erforderlich. Typischerweise, so auch hier, wird auf die quantitative real time RT-PCR zurückgegriffen.

Zur Verifikation der Ergebnisse wurden unter den gemäß der Genchipanalyse regulierten Gene (Kandidatengene) solche ausgewählt die a) von besonderer Relevanz für die BHS und

mindestens 2x reguliert waren, b) in der SAM-Analyse signifikant zwischen 1 W/kg und 3 W/kg mindestens 3x reguliert waren sowie c) alle Gene die mindestens 5x reguliert waren. Diese Auswahl ist innerhalb der einzelnen Gruppen (a-c) unabhängig voneinander, da die im Bereich der BHS interessanten und die mindestens 5-fach regulierten Gene aus dem gesamten Pool der temperaturunabhängig regulierten Gene gezogen wurde, die SAM Analyse stellt eine weitere, eigenständige Methode zur Selektion von Kandidaten dar.

Die Kandidaten aus der GSM1800 Exposition und der UMTS Exposition wurden jeweils getrennt untersucht.

Die RT-PCR Experimente wurden mit Hilfe von *TaqMan*[®] *Low Density Arrays* (TLDA, *Applied Biosystems*, Darmstadt) durchgeführt. Diese erlauben die Untersuchung einer deutlich größeren Anzahl von Kandidatengenen, als dies mit herkömmlicher real time PCR Technik handhabbar wäre. Bei diesem Array System sind auf einer speziellen Mikrotiterplatte die für die PCR benötigten Primer und Sonden in den Vertiefungen entsprechend Kundenvorgaben als Lyophilisat vorgelegt, jeweils 48 Vertiefungen sind zu einem Kanal gebündelt und werden mit der gleichen Probe beladen. In den Vertiefungen befinden sich insgesamt Primer für 47 ausgewählte Kandidatengene plus ein „*house-keeping*“ Gen, auf dessen Signalstärke bei der Auswertung normiert wird. Als *house-keeping* Gene bezeichnet man Gene, die unabhängig von äußeren Einflüssen stets gleich stark exprimiert werden. Aus diesen 48 Genen ergibt sich bei 8 Kanälen die je Platte angeordnet sind, eine Summe von 384 PCR-Reaktionen je TLDA-Platte (Abb.3).

Für die RT-PCR Reaktionen wurde RNA von sämtlichen exponierten und scheinexponierten Proben (also auch von den bis dahin in der Genchipanalytik nicht berücksichtigten scheinexponierten Proben) mit einem kommerziellen Kit (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, *Applied Biosystems*, Darmstadt) in cDNA umgeschrieben. 200 ng cDNA einer Probe wurden dann mit einem *TaqMan*[®] *Universal Master Mix* vermischt und auf jeweils einen Kanal einer TLDA Platte gegeben. Die RT-PCR Reaktionen wurden auf dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (*Applied Biosystems*, Darmstadt) ausgeführt.

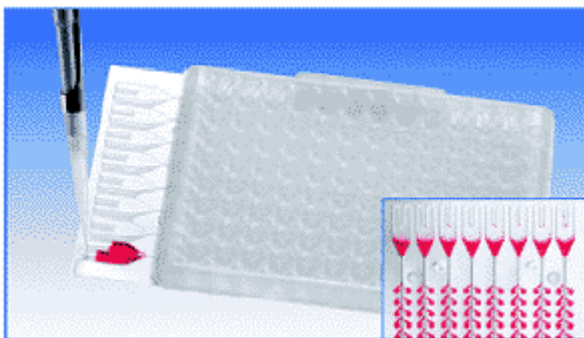


Abb.3 TLDA-Platte: Befüllung eines Kanals für 48 RT-PCR Reaktionen. Die in den Fillport pipettierte Probe gelangt durch Zentrifugation in die einzelnen Vertiefungen

Mit der Steuerungssoftware des ABI PRISM 7900HT, SDS 2.2.2, wurde die Bestimmung der Ct-Werte aus den RT-PCR Kurven vorgenommen. Ein Ct-Wert bezeichnet denjenigen Zyklus der PCR, in dem das Fluoreszenzsignal einen Schwellenwert innerhalb der exponentiellen Amplifikationsphase überschreitet. SDS 2.2.2 berechnet diese Ct-Werte vollautomatisch erlaubt im Einzelfall aber auch manuelle Korrekturen.

Die Auswertung und statistische Analyse der RT-PCR wurde mit Hilfe der Software REST[®] (*Relative Expression Software Tool*) vorgenommen. Dieses Programm wurde von Pfaffl [30] beschrieben und ist auf der Seite www.gene-quantification.info kostenlos verfügbar. Das von REST[®] verwendete mathematische Modell beruht auf einer Korrektur für die exakte PCR Effizienz und quantifiziert die relative Expression des jeweils untersuchten Gens im Vergleich zu einem *Housekeeping* Gen (in dieser Studie 18S-RNA). Anschließend wird die Differenz der Genexpression zwischen EMF exponierter und scheinexponierter Probe berechnet. Zudem bestimmt REST[®] die Signifikanz der Expressionsunterschiede mit einem „*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*“[®] und einen Standardfehler (SE) mittels eines

komplexen Taylor Algorithmus. Die Anzahl der im Test durchzuführenden Randomisierungen wurde auf 2000 gesetzt.

3.9. Aufbau der Expositionsapparatur

Die Hochfrequenz(HF)-Exposition der Zellkulturen sollte mit GSM1800- und UMTS-Signalen erfolgen. Da jeweils eine scheinexponierte Kontrolle mitgeführt wurde, war die Entwicklung von zwei Versuchskammern erforderlich, die gleichzeitig in einem Inkubator untergebracht werden konnten. Abb.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Komponenten der GSM1800-Expositionsanlage.

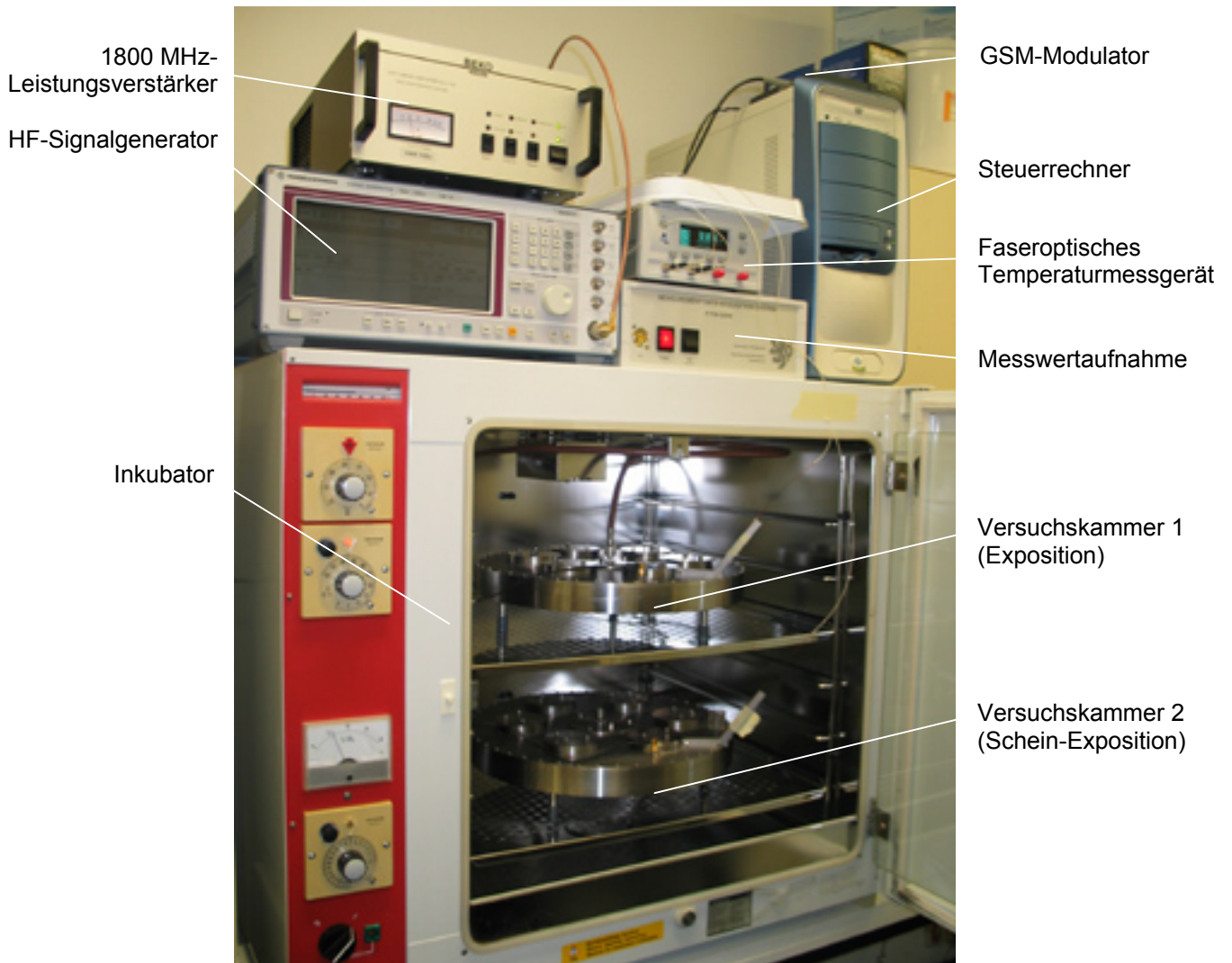


Abb.4: Expositionsanlage für GSM1800 mit zwei radialen Wellenleitungen im Inkubator

Die Versuchskammern sind als radiale Wellenleitungen ausgeführt, die jeweils 6 Probengefäße aufnehmen können. Abb.5 zeigt eine größere Außenansicht einer Wellenleitung. Der Durchmesser beträgt 40 cm, die innere Höhe 32 mm. Als Material kam ausschließlich rostfreier Stahl zum Einsatz. Die Deckel, an denen die Halter für die Probengefäße befestigt sind, schließen aufgrund ihres Gewichtes HF-dicht und sind mit einer Verdrehsicherung ausgestattet. Durch den allseits geschlossenen Aufbau der Versuchskammern konnte eine Abstrahlung des Hochfrequenzfeldes in die Umgebung vollständig vermieden werden, sodass die Unterbringung beider Leitungen im selben Inkubator problemlos möglich war.

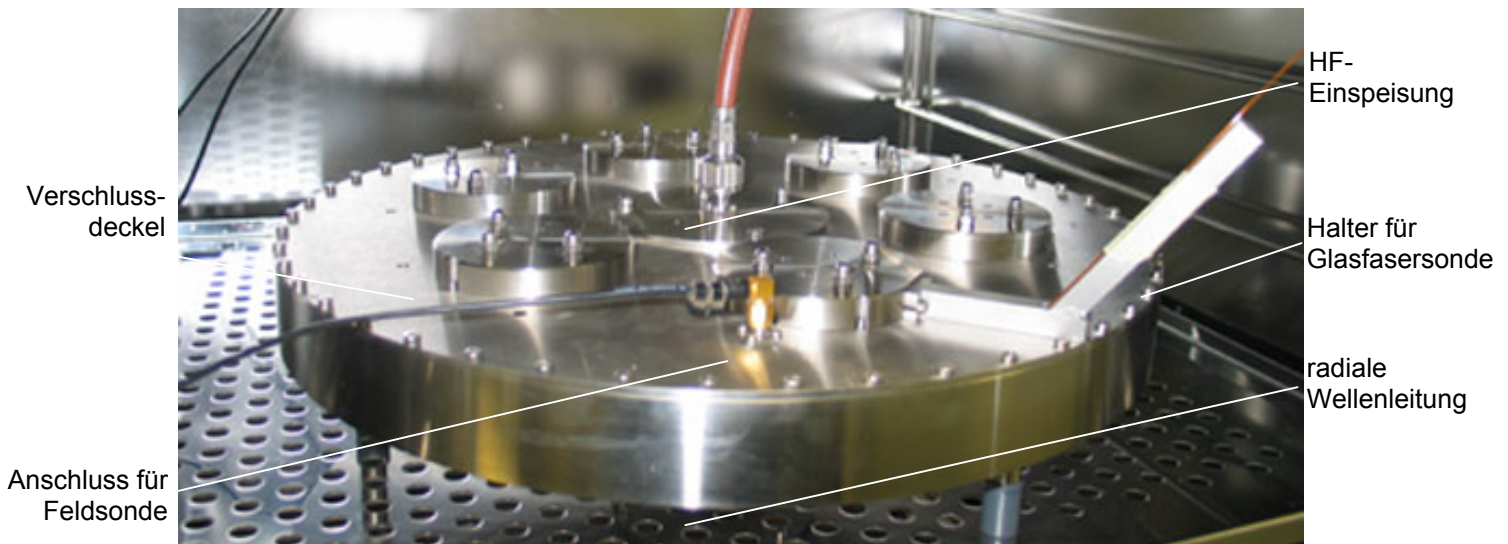


Abb.5 Versuchskammer für 1800 MHz mit 6 Probengefäßen, HF-Einspeisung, Feld- und Temperatursonde

Eines der 6 Probengefäße jeder Wellenleitung diente grundsätzlich der Temperaturmessung während der Exposition und wurde daher lediglich mit einer Pufferlösung, aber nicht mit Zellkulturen bestückt. In Abb.6 ist das entsprechende Probengefäß mit eingeführter Glasfasersonde gezeigt.

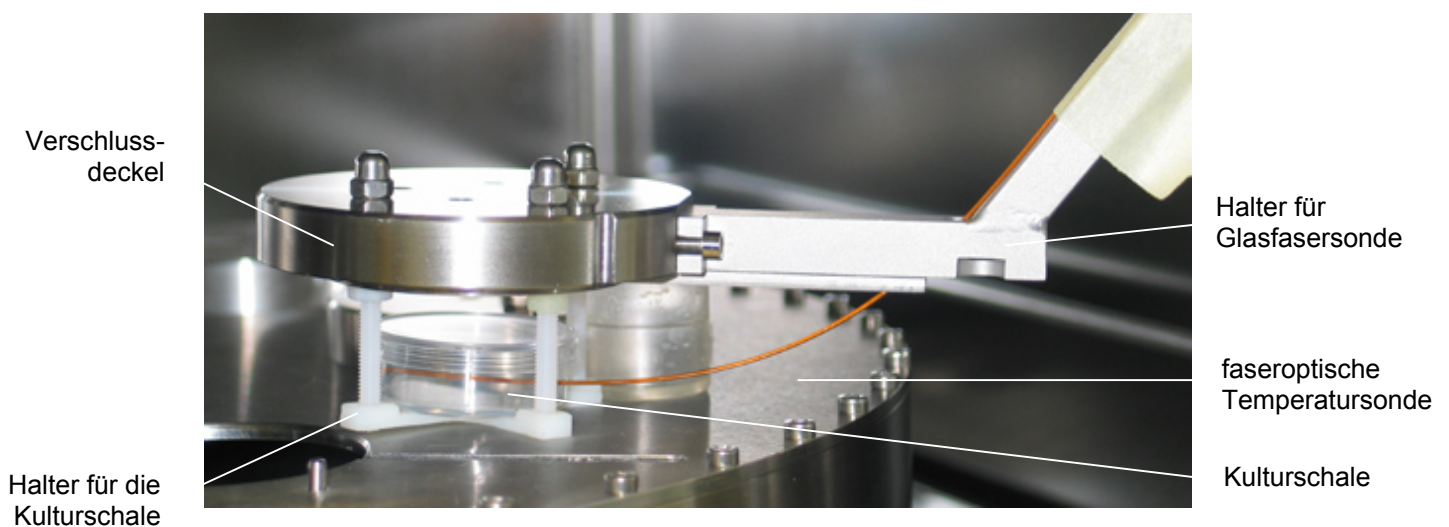


Abb.6 Halter aus Polyamid für die Kulturschale und in das Probengefäß eingeführter faseroptischer Temperatursensor (Konfiguration für das Foto auf den Deckel der Wellenleitung gestellt)

Der Realisierung der Expositionsanlage waren umfangreiche numerische Modellrechnungen für die Feld- und SAR-Verteilung vorausgegangen, bei denen der Einfluss unterschiedlicher Geometrien der Probenhalterung und insbesondere des internen Abschlusses der radialen Wellenleitung (Absorber oder Kurzschluss) untersucht wurden. Der gewählte Kurzschluss am Außenrand der Wellenleitungen, der konstruktiv bereits durch die ausgedrehten Metallronden in idealer Weise gegeben war, bedingte eine exakte, von der jeweiligen Expositionsfrequenz abhängige Positionierung der Probengefäße (ca. Halbwellenlängenabstand vom Zentrum der Kulturschale bis zum Leitungsrand, wobei eine Positionskorrektur aufgrund der inhomogenen Materialverteilung durch numerische Rechnungen zu berücksichtigen war). Durch den Kurzschlussaufbau ergaben sich für das Speisetzwerk zwei Optionen:

Der Einsatz eines Anpassungsgliedes ('stub') wurde verworfen, weil
a) die optimale Einstellung nur zu gewährleisten ist, wenn die Ohmsche Last in der Leitung, d.h. insbesondere die Menge an biologischem Material, exakt konstant gehalten wird. Eine Nachkalibrierung vor Ort ist in einem Zellkulturlabor ohne Spezialgeräte (Netzwerk-analysator, Leistungsmessplatz, etc.) nicht durchführbar.

b) im UMTS-Experiment, bedingt durch die 5 MHz Bandbreite des Signals, diese Methode an ihre Grenzen gestoßen wäre.

Es wurde daher unter Inkaufnahme einer relativ hohen aufzuwendenden Generatorleistung ein Zirkulator mit 50 Ω-Abschluss am Ausgang des Verstärkers eingesetzt.

Abb.7 gibt das Schema der Gesamtanlage wieder.

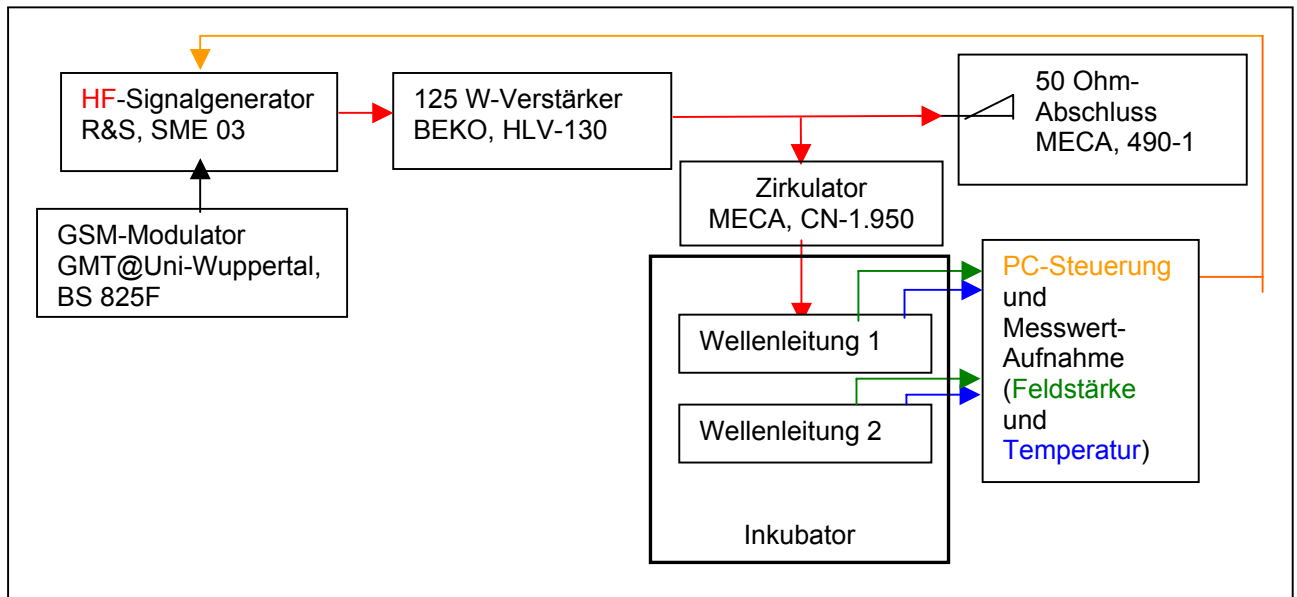


Abb.7: Schematische Darstellung der 1800 MHz-Expositionsanlage

3.9.1. Feldverteilung und Dosimetrie: GSM1800

Ein wesentliches Ziel bei der Entwicklung der Expositionsanlage war, über der gesamten Schicht, die durch die Endothelzellkulturen gebildet wird, eine möglichst gleichmäßige Feldverteilung mit den mittleren SAR-Werten 0,4 W/kg, 1 W/kg, 3 W/kg und 8 W/kg zu erzeugen. Nachstehend werden Ergebnisse der numerischen Simulationen angegeben.

In Abb.8 sind die für einen 60°-Sektor der radialen Wellenleitung bei 1800 MHz berechneten elektrischen (a) und magnetischen (b) Feldverteilungen in einer Voxelschicht unmittelbar über dem Boden des Probengefäßes (Aufenthaltsort der Zellen) dargestellt. Augenfällig sind die ausgeprägte Stehwelligkeit des Feldes außerhalb der Kulturschale, bedingt durch den Kurzschluss am Rand der Leitung, der typische Einbruch der elektrischen Feldstärke innerhalb der biologischen Probe sowie die Positionierung des Probengefäßes nahe des H-Feld-Maximums.

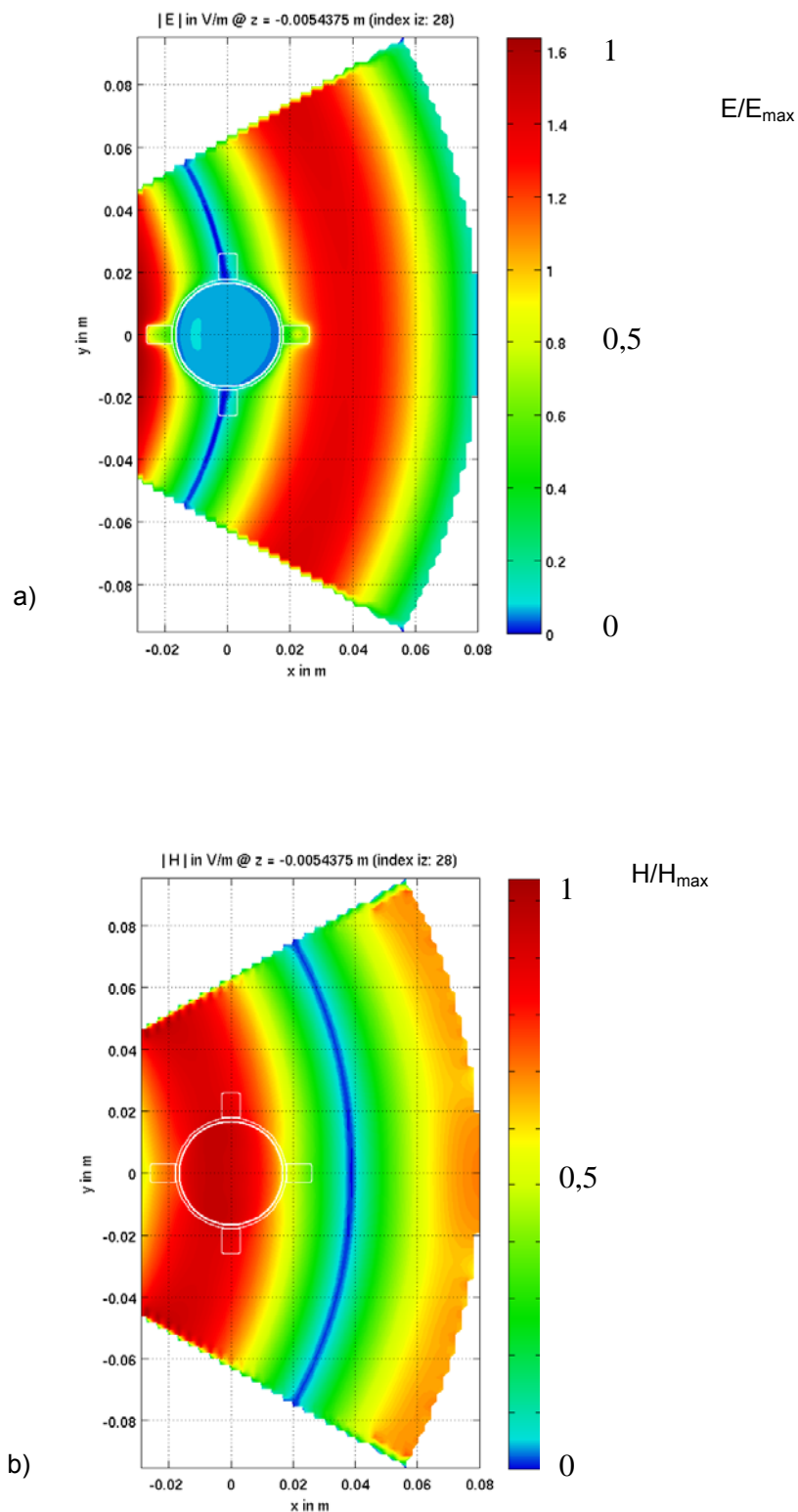


Abb.8 Berechnete Beträge der elektrischen (a) und magnetischen (b) Feldstärke in einem 60°-Sektor der für 1800 MHz konstruierten radialen Wellenleitung; Füllmenge im Probengefäß: 2 mL

Abb.9 zeigt die SAR-Verteilung in drei verschiedenen Schnittebenen durch das Probengefäß. Die Standardabweichung der SAR über der Zellschicht (vgl. Abb.9 oben)) errechnet sich zu $\sigma_{\text{SAR}} = 24,52\%$ und liegt damit im üblichen, durch zylindrische Probengefäße der vorliegenden Größe bedingten Variationsbereich. Aus den numerischen

Ergebnissen ergibt sich außerdem, dass zur Erzielung der maximalen, über die Zellschicht gemittelten SAR von 8 W/kg eine Generatorleistung von ca. 25 W aufzuwenden ist.

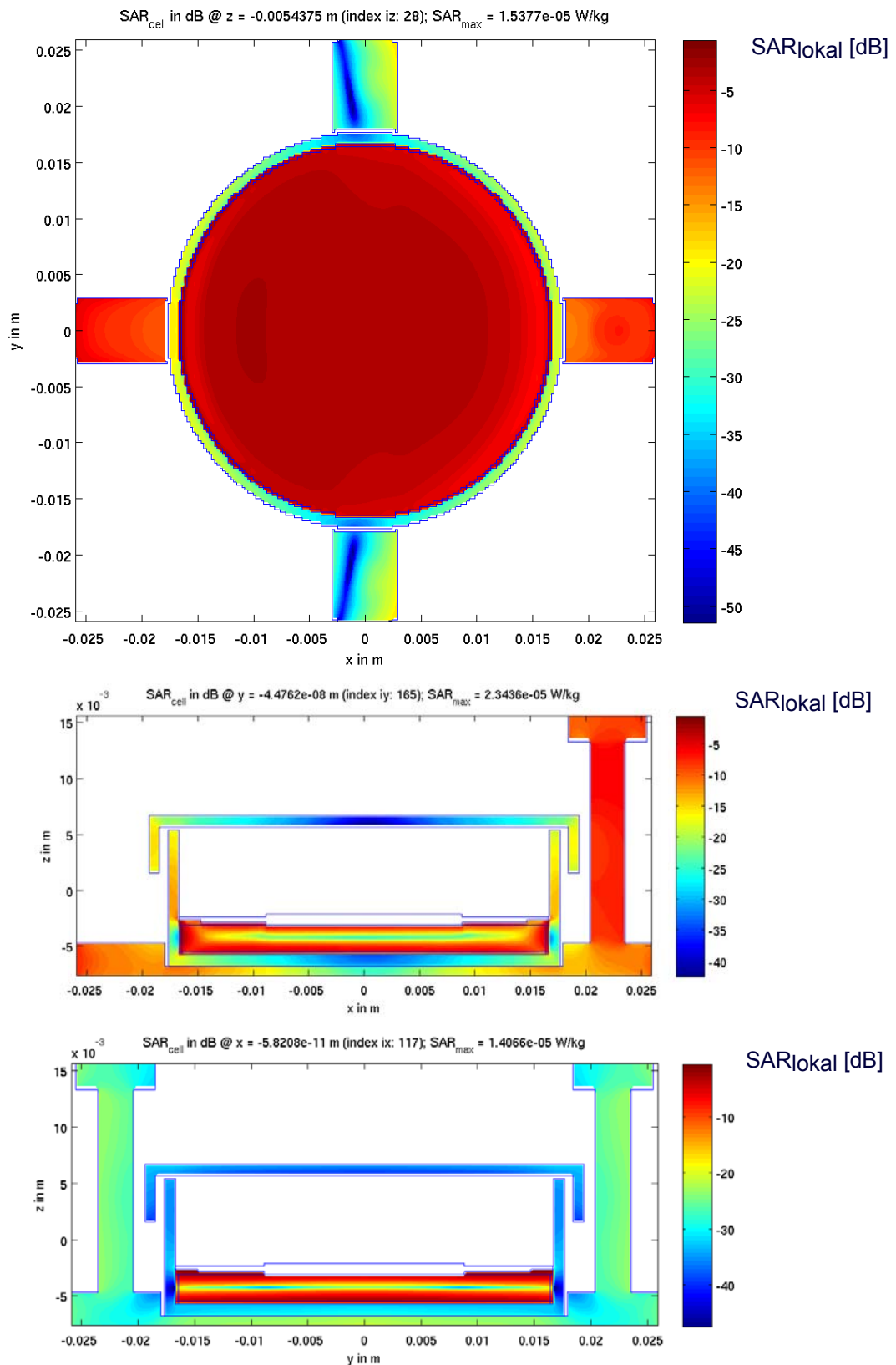


Abb.9 Berechnete Verteilung der Spezifischen Absorptionsrate im Probengefäß, eingesetzt in die für 1800 MHz konstruierte radiale Wellenleitung; Füllmenge: 2 mL

3.9.2. Kalibrierung und Steuerung der Anlage

Die Expositionsanlage wurde durch Messungen der Feldstärke an einem Referenzort innerhalb der Wellenleitungen und Vergleich mit den numerischen Ergebnissen kalibriert, d.h. es wurde ermittelt, welche Einstellungen am Signalgenerator vorgenommen werden müssen, um die vier vorgegebenen SAR-Werte zu erzielen. Dabei wurde auch der durch das Modulationsschema des synthetischen GSM-Signals (Abb.10) auftretende 'pulse duty'-Faktor von ca. 7:8 berücksichtigt. Die Einstellungen wurden in die Steuer-Software übernommen, sodass die Umschaltung auf die gewünschte Expositionsstärke vom PC aus vorgenommen werden konnte.

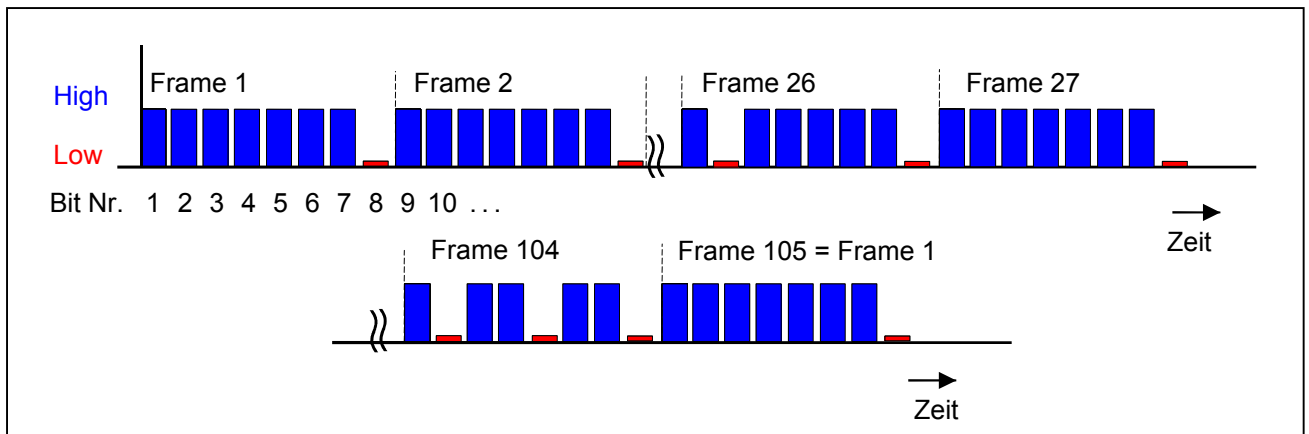


Abb.10 Pulsstruktur des synthetischen GSM-Signals [34]

Auf einem Monitor wurden in Echtzeit die Temperaturen sowie die Feldstärke in den beiden Wellenleitungen angezeigt. Alle Daten wurden außerdem automatisch für die spätere Verwendung abgespeichert.

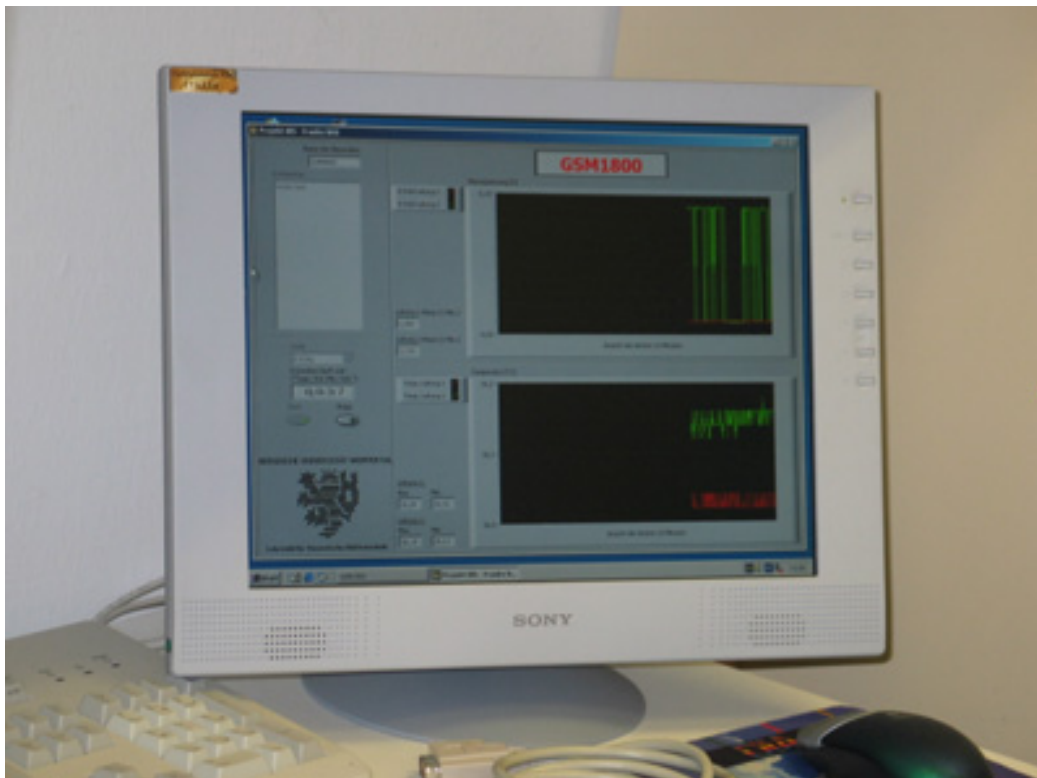


Abb.11: Monitoranzeige während der laufenden Exposition

3.9.3. Aufbau der UMTS-Anlage

Abb.12 zeigt den HF-Sender der UMTS-Expositionsanlage sowie die unverändert weiter verwendeten Komponenten.



Abb.12: Elektronische Komponenten der UMTS-Expositionsanlage

Die Funktion der beiden im Inkubator untergebrachten radialen Wellenleitungen wurde gegenüber der GSM1800 Anordnung vertauscht, d.h. die für die GSM-Exposition verwendete Leitung übernahm die Rolle der Schein-Exposition, und die für den UMTS-Betrieb bei 1966 MHz optimierte Wellenleitung wird mit dem HF-Signal gespeist. Abb.13 gibt das geänderte Expositionsschema an.

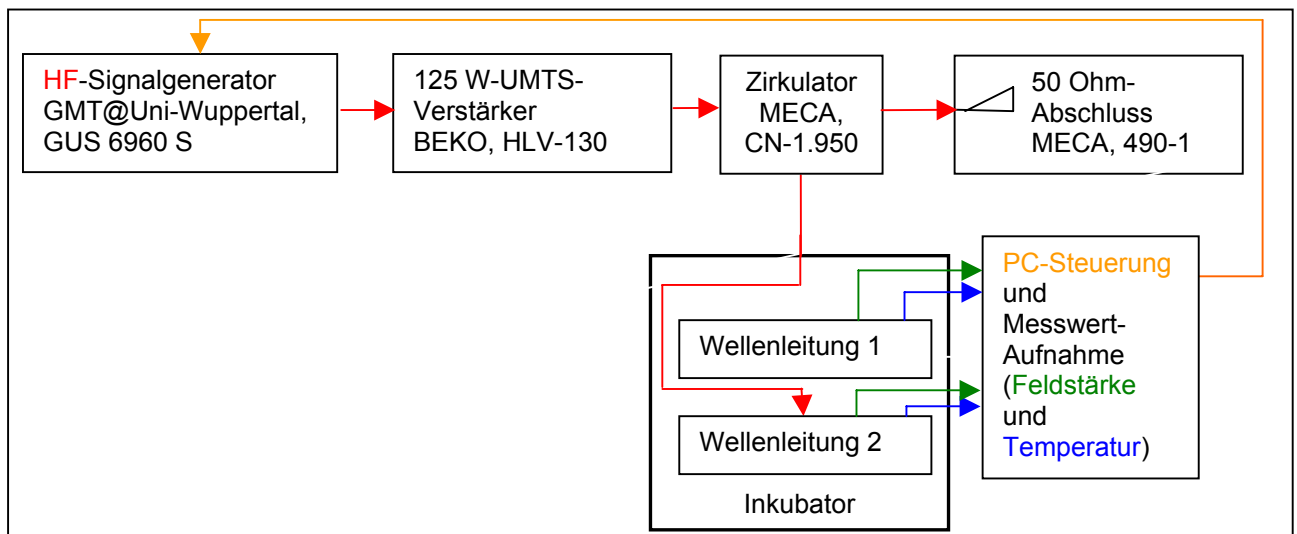


Abb.13: Schematische Darstellung der UMTS-Expositionsanlage

3.9.4. Feldverteilung und Dosimetrie: UMTS

Abb.14 zeigt die für einen 60°-Sektor der radialen Wellenleitung bei 1966 MHz berechnete elektrische Feldverteilung in einer Voxelschicht unmittelbar über dem Boden des Probengefäßes (Aufenthaltort der Zellen), wobei das Probengefäß in vertikaler Richtung mit Hilfe des hängenden Probenhalters mittig zwischen den Platten der Wellenleitung angeordnet ist.

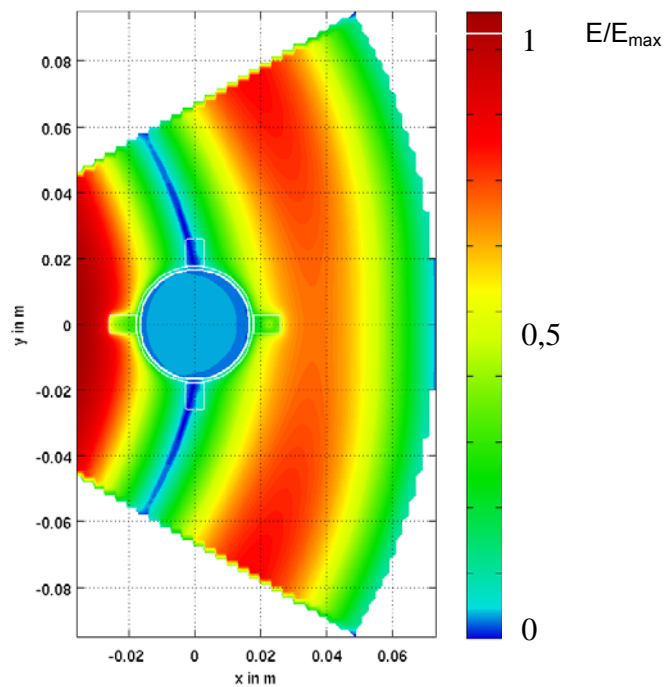


Abb.14 Numerisch berechnete Verteilung der elektrischen Feldstärke in der für 1966 MHz konstruierten radialen Wellenleitung; Füllmenge im Probengefäß: 2 mL

In Abb.15 ist die zugehörige SAR-Verteilung in drei verschiedenen Schnittebenen durch das Probengefäß dargestellt. Die Standardabweichung der SAR über der Zellschicht (vgl. Abb.15 oben) errechnet sich zu $\sigma_{\text{SAR}} = 26,37\%$ und liegt damit im üblichen, durch zylindrische Probengefäße der vorliegenden Größe bedingten Variationsbereich. Aus den numerischen Ergebnissen ergibt sich außerdem, dass zur Erzielung der maximalen, über die Zellschicht gemittelten SAR von 8 W/kg eine mittlere Generatorleistung von ca. 18 W aufzuwenden ist.

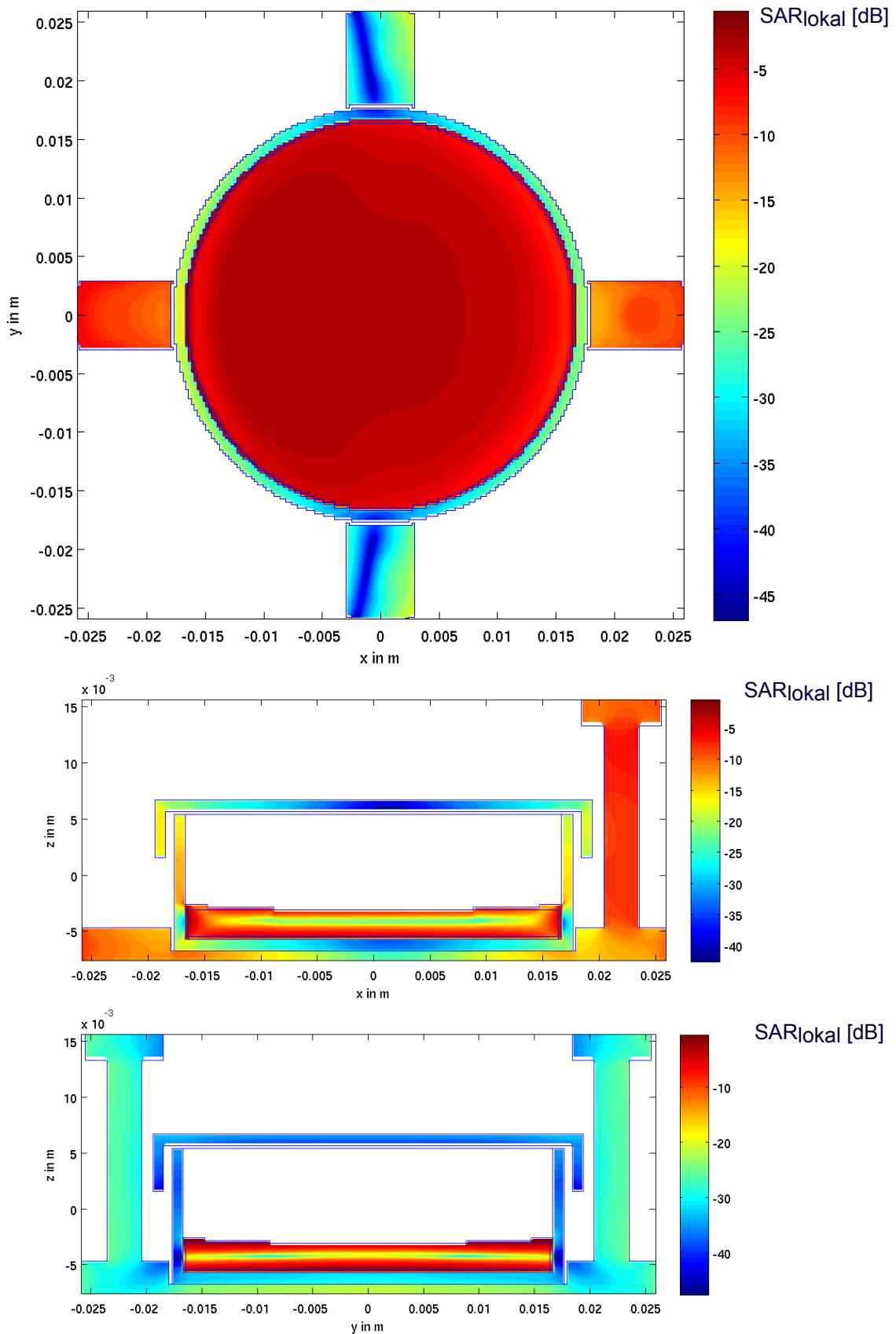


Abb.15 Berechnete Verteilung der Spezifischen Absorptionsrate im Probengefäß, eingesetzt in die für 1966 MHz konstruierte radiale Wellenleitung; Füllmenge: 2 mL

3.9.5. Kalibrierung und Steuerung der Anlage

Die Expositionsanlage wurde durch Messungen der Feldstärke an einem Referenzort innerhalb der Wellenleitungen und Vergleich mit den numerischen Ergebnissen kalibriert, d.h. es wurde ermittelt, welche Einstellungen am Signalgenerator vorgenommen werden müssen, um im zeitlichen Mittel die vier vorgegebenen SAR-Werte (0,4 W/kg, 1 W/kg, 3 W/kg und 8 W/kg) zu erzielen. Dabei wurde die zeitliche Struktur des speziellen generischen UMTS-Signals (vgl. Abb.16) berücksichtigt. Die Einstellungen wurden in die Steuer-Software übernommen, sodass die Umschaltung auf die gewünschte Expositionsstärke vom PC aus vorgenommen werden kann.

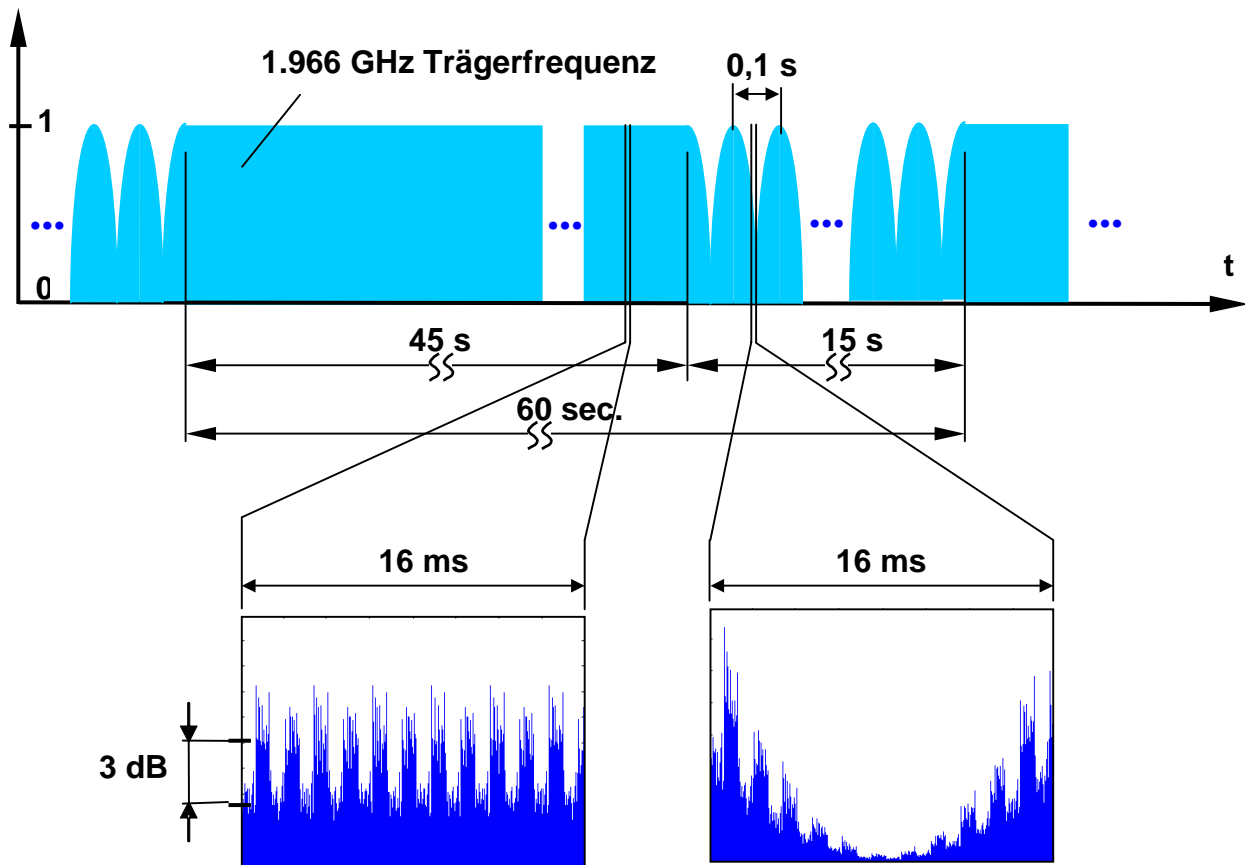


Abb.16 Zeitverlauf des mit 1 Minute periodischen generischen UMTS-Testsignals nach Ndoumbé et al. 2004 [27] (Grafik: G. Schmid, ARCS Seibersdorf)

4. Ergebnisse

4.1. RBEC als in vitro-Modell für die BHS

Zuerst galt es eine Isolationsmethode für RBEC aus Rattenhirnen zu etablieren. Die Methode konnte im Labor von Dr. Dolman (Blood-Brain Barrier Group, King's College, London, UK) erlernt und erfolgreich übernommen werden. Die Isolationsmethode liefert kurze Kapillarfragmente, aus denen im Laufe der Kultur Endothelzellen auswachsen und ab dem 7. Kulturtag eine dichte, einlagige Zellschicht ausbilden (Abb. 17).

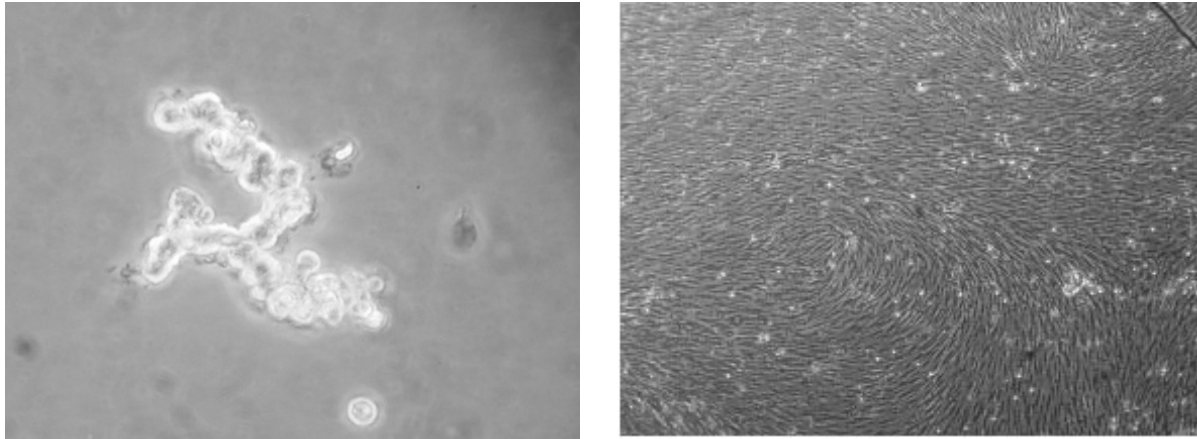


Abb.17 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen eines Kapillarfragments unmittelbar nach der Aussaat (links) und einer Endothelzellkultur nach 9 Kulturtagen (rechts). Die gesamte Wachstumsfläche ist mit den typisch spindelförmigen, in einschichtigen Wirbeln wachsenden Endothelzellen bedeckt.

Zur Identifikation der Endothelzellen diente neben ihrer morphologischen Beurteilung die Markierung charakteristischer Epitope mittels Antikörpern. Die Identifikation als Endothel erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers gegen das „von Willebrand Faktor-VIII related Antigen“ (vWF-8) und durch Färbung des ebenfalls von Endothelzellen exprimierten Intermediärfilamentproteins Vimentin. Zwar wird Vimentin auch von Fibroblasten exprimiert, jedoch sind diese von Endothelzellen klar anhand der Morphologie zu unterscheiden. Abb.18 zeigt die typische, granuläre Anfärbung des vWF-8 Antigens sowie den positiven Nachweis von Vimentin.

Der schrankenbildende Charakter der Zellkulturen wurde anhand von Immunfluoreszenzen der *tight junction* Proteine Occludin und ZO-1 nachgewiesen. Abb.19 zeigt zwei Aufnahmen der Präparate. Die für beide Proteine gleichermaßen typische perizelluläre Färbung an den Zell-Zell Kontakten belegt die Ausbildung von tight-junctions.

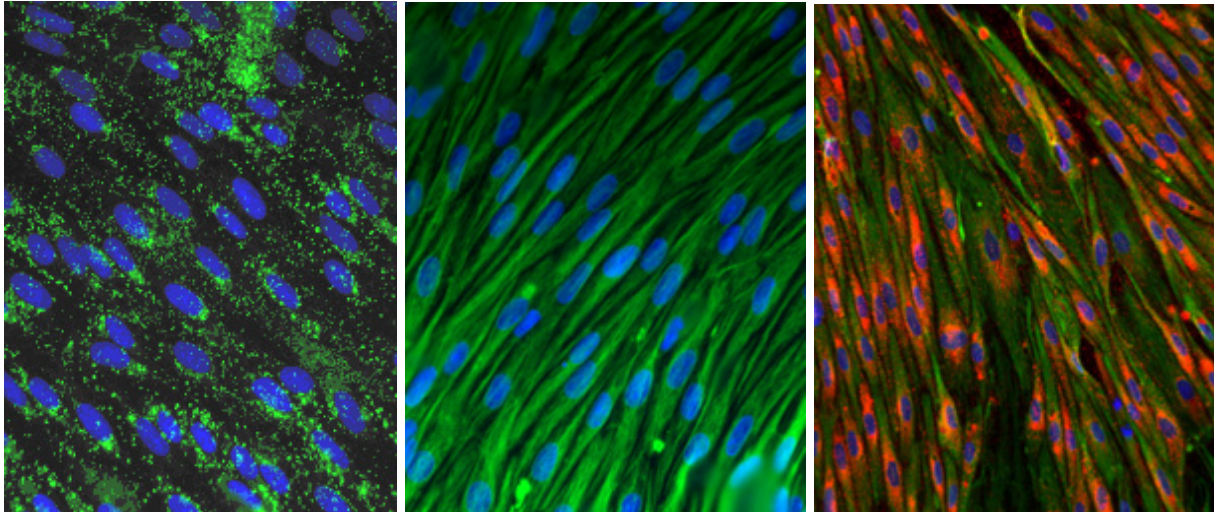


Abb.18 Immuncytochemischer Nachweis des von-Willebrand-Faktor-VIII related antigen und von Vimentin an RBEC. Links: Anfärbung des vWF-8. Die positive Anfärbung erlaubt die Identifikation der Endothelzellen und zeigt das für vWF-8 typische granuläre Färbemuster. In dieser Kultur ist keine Kontamination durch Pericyten zu erkennen. Mitte: Die Vimentin-Färbung verdeutlicht den positiven Nachweis sowie auch die spindelförmige Endothelmorphologie. Rechts: Die Doppelfärbung gegen Vimentin (grün) und vWF-8 (rot) zeigt, dass jeweils beide Marker gleichzeitig an den RBEC nachgewiesen werden konnten. Die Zellkerne wurden jeweils mit DAPI gegengefärbt (blau).

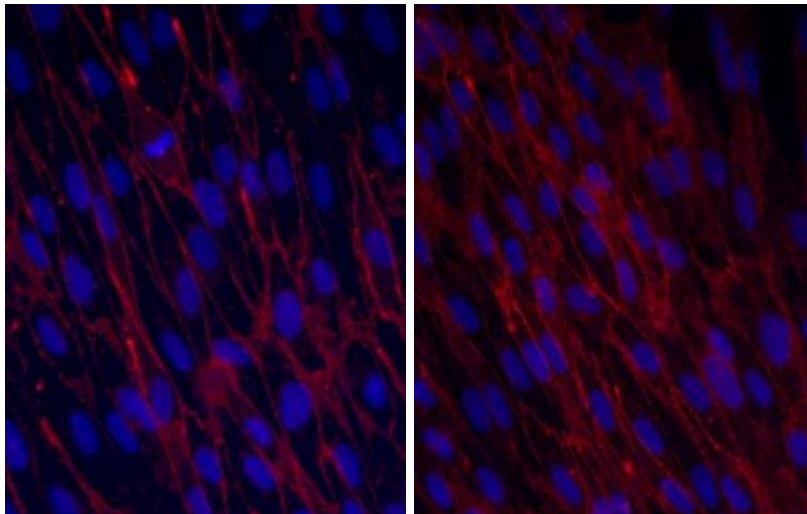


Abb.19 Immuncytochemischer Nachweis der tight-junction Proteine ZO-1 (links) bzw. Occludin (rechts) an RBEC. Mit zusätzlicher Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Auf beiden Aufnahmen ist das typische perizelluläre Färbemuster zu erkennen.

Eine Abgrenzung möglicher Fremdzellkontaminationen erfolgte durch Anfärbung von Glattmuskelaktin einem Pericytenmarker und GFAP (glial fibrillary acidic protein) einem Marker für Astrocyten und andere Gliazellen. Wie aus Abb.20 ersichtlich wird, konnte eine Kontamination der RBEC mit Zellen glialen Ursprungs ausgeschlossen werden. Als Positivkontrolle zeigt Abb.20 zusätzlich eine GFAP-Färbung an einer Astrocytenkultur.

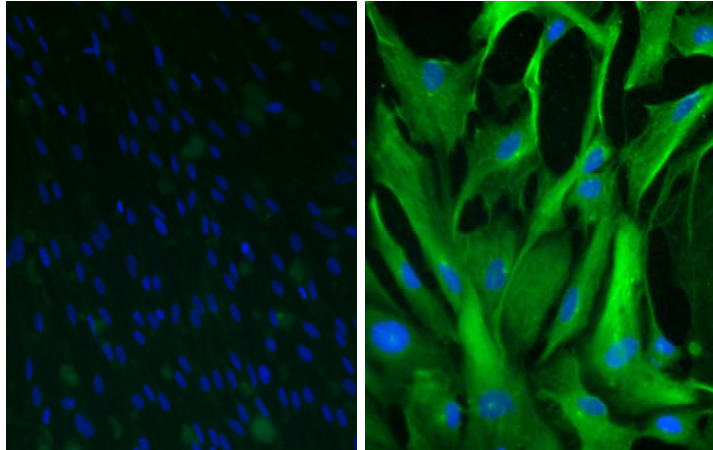


Abb.20 Immuncytochemischer Nachweis von GFAP in einer RBEC-Kultur (links). Die Aufnahme zeigt lediglich eine leichte unspezifische Hintergrundfärbung. Zum Vergleich rechts die positive Farbreaktion mit Kulturen von Rattenastrocyten (rechts).

Am ehesten wahrscheinlich ist, bedingt durch die Isolierungsmethodik, eine Kontamination mit Pericyten. Diese liegen in vivo auf den Kapillargefäßen auf und sind gemeinsam mit der Kapillare von einer Basallamina aus Collagen umhüllt, die erst im 2. Verdauungsschritt des Isolationsprozesses aufgebrochen wird. Im Gegensatz zu allen anderen Zellen des Gehirngewebes können also die Pericyten nicht schon in vorhergehenden Schritten abgetrennt werden. Sie lassen sich über den Marker α -smooth muscle actin (α -SMA, Glattmuskelaktin) identifizieren.

Ergebnisse der immuncytochemischen Anfärbung des α -SMA in RBEC Primärkulturen zeigten, dass eine geringe Kontamination durch Pericyten beobachtet wurde. Abb. 21 zeigt außerhalb des RBEC Zellrasens gewachsene Pericyten. Abb.22 verdeutlicht die allgemein geringe Kontaminationsintensität. Oft waren große mit Endothelzellen bewachsene Bereiche ohne positiven α -SMA Nachweis zu finden.

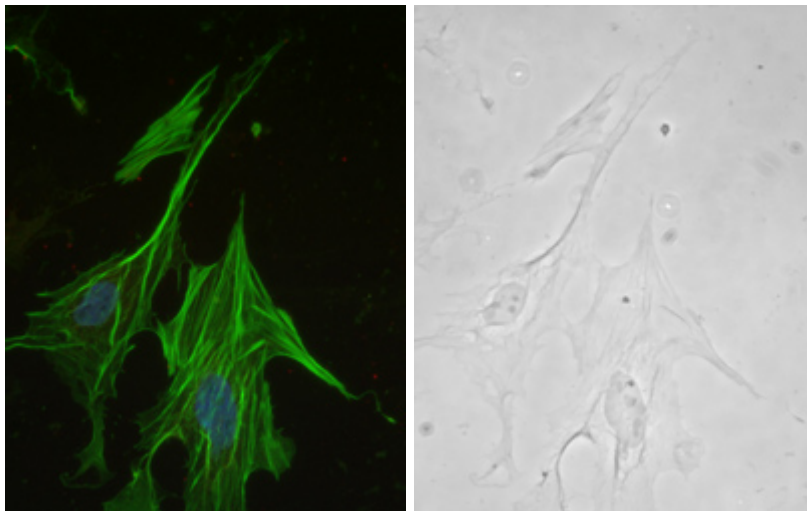


Abb.21 Immuncytochemischer Nachweis von α -SMA an Pericyten in einer RBEC-Kultur. Die Phasenkontrastaufnahme (rechts) zeigt den auffälligen Unterschied zur spindelförmigen Morphologie der Endothelzellen.

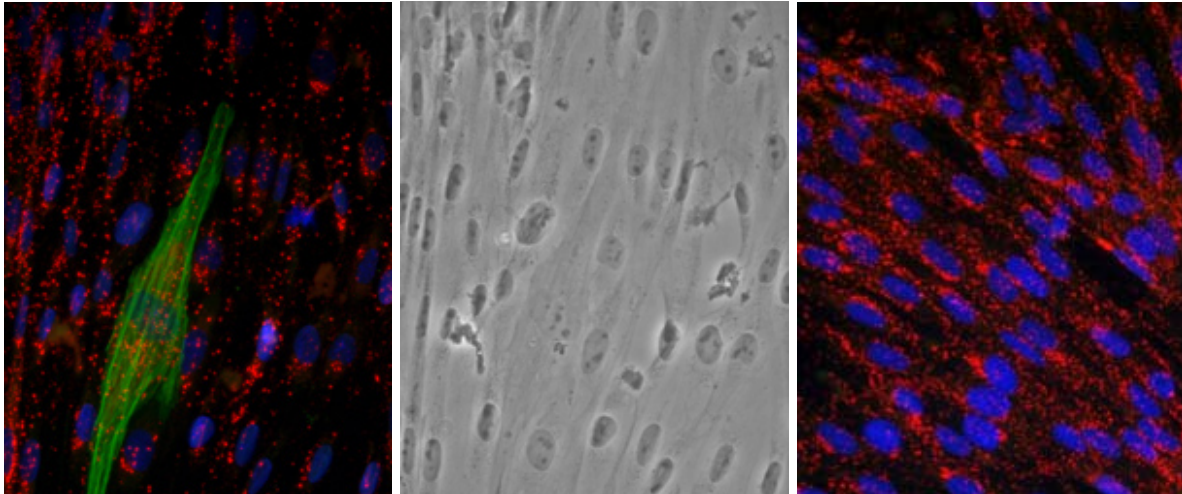


Abb.22 Immunocytochemischer Nachweis von vWF-8 und α -SMA. Links: Die Doppelimmunfluoreszenz zeigt exemplarisch einen Pericyten (grün), der auf der Endothelschicht (rote, granuläre Anfärbung) aufliegt. Mitte: Abgebildet ist die Phasenkontrastaufnahme desselben Ausschnitts. Rechts: Die Doppelimmunfluoreszenz weist lediglich vWF-8 nach, eine Kontamination mit α -SMA positiven Zellen ist nicht erkennbar.

4.2. Temperatureffekte

Während sich bei den geringeren Expositionsleistungen die Temperatur des Kulturmediums nicht (0,4 und 1 W/kg) oder nur sehr geringfügig (0,1°C bei 3 W/kg) änderte, führte die Exposition bei 8 W/kg zu einer Temperaturerhöhung von genau 1°C. Aus diesem Grund wurde eine weitere Positivkontrolle in die Untersuchung aufgenommen, indem Endothelzellen bei ausgeschaltetem Feld 72 h bei 38°C anstelle der üblichen 37°C kultiviert wurden.

4.3. Auswertung der Genchip Arrays

Als Qualitätskontrolle wurden die Rohdaten der gescannten Genchip Arrays anhand der Affymetrix Reportfiles, die zu jedem Chip erzeugt werden, sowie mit Hilfe der Software *Refiner* (Genedata, Basel, CH) untersucht. Es konnte eine durchgehend gute Qualität der Array-Daten verifiziert werden. Die einzelnen Chips zeigten in der Korrelationsanalyse eine klare Gruppierung entsprechend der verschiedenen Expositionsparameter (GSM oder UMTS sowie SAR-Wert).

Die Korrelationsanalyse vergleicht die globale Genexpression eines jeden Chiparrays mit jedem anderen. Aus den Korrelationsplots (Abb. 23) wird ersichtlich, dass sich die größte Ähnlichkeit (gelbe Färbung) jeweils für die fünf Chips aus der gleichen Expositionsgruppe ergaben. Dementsprechend ist die Übereinstimmung der Daten zwischen den einzelnen Replikaten recht hoch, die Streuung nicht besonders stark. Die Reaktion der Zellen auf die EMF-Exposition war jedoch bei jeder SAR anders. Andererseits ist die Korrelation zwischen den (rechte untere Ecke in beiden Plots in Abb. 23) Temperaturkontrollen bei 38°C und 40°C auch zwischen diesen beiden Gruppen vergleichbar hoch wie innerhalb einer EMF-exponierten Gruppe. Die Antwort der Zellkulturen auf die verschiedenen Temperaturerhöhungen ist also einheitlicher als die auf die unterschiedlichen Feldexpositionen.

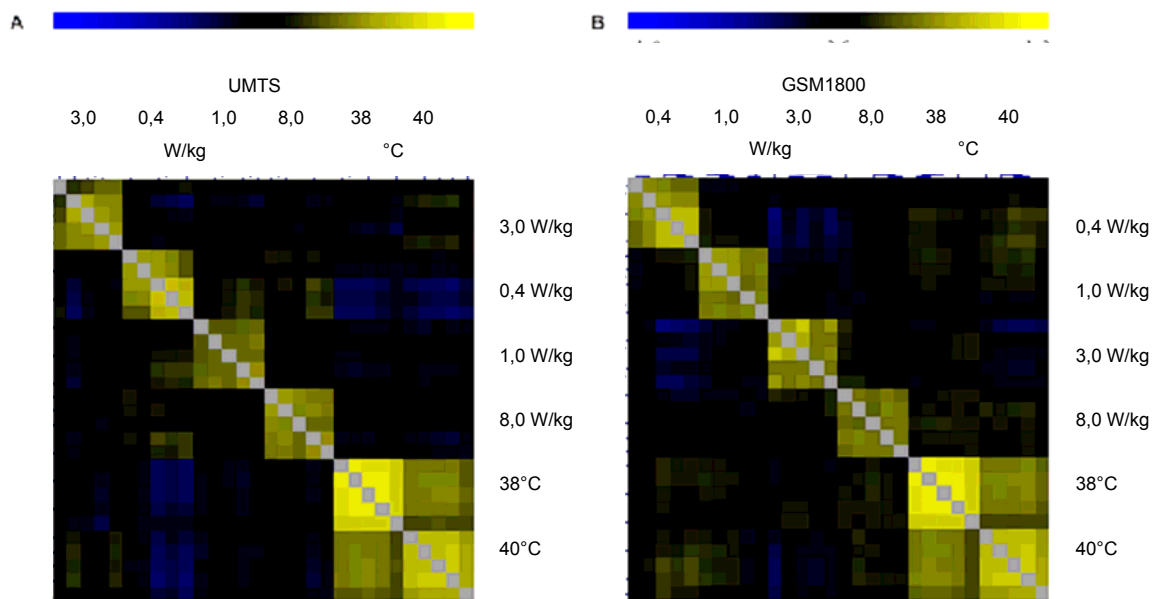


Abb.23 Korrelationsplots der MAS5.0 prozessierten Datensätze. A: UMTS exponierte Proben; B: GSM 1800 exponierte Proben. In der Darstellung steht die gelbe Farbe für hohe, blau für geringe Ähnlichkeit der Daten. Man erkennt klar die Gruppierung die je fünf Replikate der einzelnen Gruppen, unten rechts die Temperaturkontrollen bei 38° und 40°C. Die graue Diagonale ergibt sich durch die Gegenüberstellung jedes Chips mit sich selbst.

Auf dem *Rat Genome 230 2.0* Chip befinden sich insgesamt 31099 Probe-Sets. Nach der Normalisierung der Signalstärken konnten von diesen 18663 zuverlässig detektiert, d.h. mit Hilfe des MAS5.0 Algorithmus als „present“ charakterisiert werden. Im folgenden wurde die Gruppe der Kandidatengene durch Selektion solcher Gene, die mindestens eine 1,4-fache Änderung der Expression im Vergleich zu den scheinexponierten Kontrollen zeigten, auf 14287 Probe-Sets reduziert. Bei einzelnen Genen wurden maximale Expressionsveränderungen von +13-fach bzw. -15-fach beobachtet.

Ein Vergleich der Proben mit den Positivkontrollen konnte auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ solche Probe-Sets aus der Liste eliminieren, die allein schon durch die Temperaturerhöhung reguliert worden waren. Nach diesem Filterschritt verblieben in dem Satz der GSM1800 exponierten Zellkulturen 11488, bei den UMTS exponierten 8900 Probe-Sets. Dieser Pool wurde von zwei Personen, die seit vielen Jahren mit Zellkulturmodellen der BHS arbeiten, unabhängig nach solchen Genen durchsucht, die für die BHS von besonderer Relevanz sind oder sein könnten. Beispiele sind insbesondere Transportproteine und Ionenkanäle, welche für die Versorgung des Gehirns eine unerlässliche Rolle spielen, sowie Adhäsionsproteine (Integrine, Cadherine, Catenine) und andere strukturelle Proteine des Zytoskeletts oder der tight junctions. Hierdurch ergab sich ein weiteres „intelligentes“ Auswahlkriterium. Aus diesem Satz wurden, wie bereits im Methodenteil beschrieben, für die folgende RT-PCR Analyse alle mindestens 2-fach regulierten Gene mit potentieller BHS-Relevanz sowie sonstige mindestens 5-fach regulierte Gene ausgewählt.

Nach einer SAM-Analyse bei dem Vergleich der bei 1 W/kg und der bei 3 W/kg exponierten Endothelzellen wurden 360 (GSM1800) bzw. 231 (UMTS) Gene identifiziert, deren Expression sich besonders stark zwischen diesen zwei SAR unterschieden.

Zur Verifikation der Resultate der Chiparray Analysen mit quantitativer real time RT-PCR wurden zusätzlich zu den bereits oben genannten alle mindestens 3-fach regulierten Gene aus der SAM-Analyse ausgewählt. Insgesamt umfasste die Liste der BHS-relevanten und 2-fach regulierten Gene, der des SAM Vergleichs 1 W/kg vs. 3 W/kg und mindestens 3-fach regulierten sowie der sonstige Gene die mindestens 5-fach reguliert waren 68 (GSM1800) bzw. 61 (UMTS) Gene. Claudin1 wurde jeweils zweifach, also repräsentiert durch zwei verschiedene Probe-Sets identifiziert. Die vollständige Liste incl. der quantitativen Ergebnisse der Genchip-Analyse findet sich im Anhang.

Für eine RT-PCR Analyse mit den hier verwendeten *TaqMan Low Density Arrays* können allerdings grundsätzlich nur solche Gene ausgewählt werden, die die Fa. Applied Biosystems in einer für diese Arrays begrenzten Auswahl zu Verfügung stellt, im Hausterminus sind dies sogenannte inventarisierte Gene. Unter den mittels der Genchip Analyse identifizierten Genen konnten 44 (GSM1800) bzw. 43 (UMTS) inventarisierte Gene gefunden werden. Da ein TaqMan Array die Untersuchung von bis zu 47 verschiedenen Genen erlaubt, wurde für die RT-PCR Experimente die Auswahl entsprechend um 3 bzw. 4 Gene aus der Liste BHS-relevanter Gene ergänzt, deren Regulation etwas geringer als 2-fach quantifiziert worden war. Tab.1 listet die für die Validierung der Genchipdaten selektierten Kandidatengene auf. Wie der Tabelle des weiteren zu entnehmen ist, sind 14 Gene, also etwa 1/3 der ausgewählten Kandidaten sowohl in der UMTS, als auch in der GSM1800 exponierten Gruppe zu finden.

Nicht inventarsiert war leider *Tjp1_predicted*, ein Gen welches voraussichtlich (daher „*predicted*“) für das *tight junction* protein1, auch ZO-1 genannt, welches ein wichtiger Bestandteil der *tight junctions* ist. Die *Tjp1_predicted* Expression war nach UMTS-Exposition lt. Genchipanalyse 2,7-fach erhöht bei 0,4W/kg und 1,6-fach erhöht bei 8 W/kg.

Tab.1a: Für die quantitative real time RT-PCR Analyse ausgewählten Gene (GSM1800 Exposition).

Gensymbol	Name
Abcc8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
ACE2	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2
ACTC1	actin alpha cardiac 1
Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1 (AT1A)
Aldh1a4	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A4
Asam	adipocyte-specific adhesion molecule
ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide
Bdkrb2	bradykinin receptor, beta 2
CAMK2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta
Casp1	caspase 1
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
Casr11 /// LOC365807	calcium-sensing receptor like 1 /// similar to putative pheromone receptor V2R2
Catna1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1
Cfh	complement component factor H
Cldn1	claudin 1
CNNM2	Cyclin M2
Cntn3	contactin 3
Col5a3	procollagen, type V, alpha 3
Ece1	endothelin converting enzyme 1
EPN1	Epsin 1
HAAO	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase
Hcn1	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1
Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor
Il22ra2	interleukin 22 receptor, alpha 2
JUNDP2	Jun dimerization protein 2
KARS	lysyl-tRNA synthetase
MCF2L	mcf.2 transforming sequence-like
Mmp2	matrix metalloproteinase 2
Msln	mesothelin
MUSK	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase
PGK1	phosphoglycerate kinase 1
PRRX1	Paired related homeobox 1
PTGER2	Prostaglandin E receptor 2, subtype EP2
PTGER4	prostaglandin E receptor 4, subtype EP4
RELN	reelin
RGD1309718	Similar to sperm antigen HCMOGT-1
SDC2	syndecan 2
Serpib7	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 7
Slc19a1	solute carrier family 19, member 1
Slc33a1	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1
SLC6A9	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
SLC7A3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 3
Sox6	SRY-box containing gene 6
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2
TXNL1	thioredoxin-like 1
VSNL1	visinin-like 1
ZDHHC23	zinc finger, DHHC domain containing 23

Tab.1b: Für die quantitative real time RT-PCR Analyse ausgewählte Gene (UMTS Exposition).

Gensymbol	Name
Alcam	activated leukocyte cell adhesion molecule
Abcc8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
Actn1	actinin, alpha 1
Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1 (AT1A)
Asam	adipocyte-specific adhesion molecule
Bdkrb2	bradykinin receptor, beta 2
Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A
Casr11 /// LOC365807	calcium-sensing receptor like 1 /// similar to putative pheromone receptor V2R2
Catna1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1
Clcn4-2	putative chloride channel 4-2
Cldn1	claudin 1
Col5a3	procollagen, type V, alpha 3
Csf2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
Csh111	Chorionic somatomammotropin hormone 1-like 1
Cspg6	chondroitin sulfate proteoglycan 6
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1
Dusp5	Dual specificity phosphatase 5
Ece1	endothelin converting enzyme 1
Etfb	Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide
F3	coagulation factor III
Gimap4	GTPase, IMAP family member 4
Hspa1a /// Hspa1b_mapped	heat shock 70kD protein 1A;heat shock 70kD protein 1B (mapped)
Igfbp5	insulin-like growth factor binding protein 5
LOC286989	UDP-glucuronosyltransferase
LOC316432	Ica69-related protein
Mcf2l	mcf.2 transforming sequence-like
Mmp2	matrix metalloproteinase 2
Msln	mesothelin
Mylk2	myosin light chain kinase 2, skeletal muscle
Nf1	Neurofibromatosis 1
Pla2g6	phospholipase A2, group VI
Prkcb1	Protein kinase C, beta 1
Ptger4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
Rgs2	regulator of G-protein signaling 2
Scarb1	scavenger receptor class B, member 1
SDC2	syndecan 2
Serpnb2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2
Slc19a1	solute carrier family 19, member 1
Slc27a1	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1
Slc33a1	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1
spon1	Spondin 1
Srpx	sushi-repeat-containing protein
Tgfb3	transforming growth factor, beta 3
Thrb	thyroid hormone receptor beta
Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)
Tpm1	tropomyosin 1, alpha
Wnt5a	Wingless-type MMTV integration site 5A

4.4. Validierung der Genchip-Analyse mit quantitativer RT-PCR

Der erste Schritt der RT-PCR Analyse ist die Generierung einzelsträngiger cDNA aus den vorliegenden RNA-Proben mittels reverser Transkription. Die erfolgreiche Umschreibung der RNA in cDNA konnte in einem Vorexperiment belegt werden.

Zur RT-PCR Reaktion wurde von jeder experimentellen Gruppe cDNA aus sämtlichen 5 exponierten und scheinexponierten Proben im Sinne einer Doppelbestimmung auf die TaqMan Array Platten pipettiert. Die Reaktion umfasste insgesamt 40 PCR Zyklen. Abb.24 zeigt als Beispiel den Amplifikationsplot einer TDLA Platte, auf der alle 384 Reaktionen gleichzeitig dargestellt werden.

Wie aus diesem Amplifikationsplot ersichtlich wird, erreichten nicht alle untersuchten Proben innerhalb der 40 Zyklen die exponentielle Phase der PCR Reaktion. Daher konnte für einzelne Gene bzw. einzelne Proben kein Ct-Wert ermittelt werden.

Aus der Gruppe der UMTS-Kandidatengene konnten aus diesem Grunde folgende RT-PCR nicht ausgewertet werden: Abcc8, Bmpr1a (nur 0,4 W/kg), Csh 1|1, LOC 286989, LOC 316432, Mylk2, Serpinb2. Unter den GSM1800 Kandidatengenen waren die Reaktionen für Abcc8, Ace2, Actc1, Aldh1a4, Cfh (nur 3 W/kg), Cntn3, Haa0, Ptger2 und Vsnl1 nicht auswertbar.

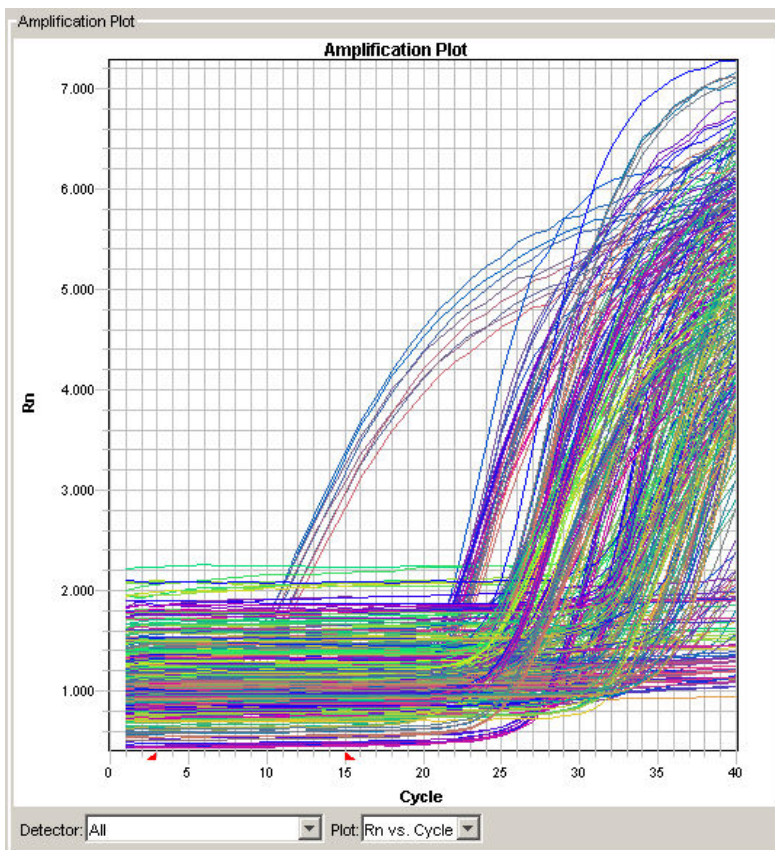


Abb.24 Amplifikationsplot eines TaqMan® Low Density Array Laufs mit RNA Proben nach UMTS-Exposition. Aufgetragen sind die durchlaufenen Zyklen der RT-PCR gegen die Signalstärke (Fluoreszenzintensität) des gebildeten PCR-Produkts für 384 einzelne Reaktionen.

Für 14 Gene aus der UMTS- sowie 7 Gene aus der GSM1800 exponierten Gruppe konnte eine differentielle Expression durch die quantitative RT-PCR gezeigt werden. Für Mcf2l (UMTS), Camk2b und Serpinb7 (GSM1800) bestätigt dieses Resultat allerdings nicht den Trend aus der Genchipanalyse. Hier zeigte die Regulation in die jeweils andere Richtung.

Tab. 2 fasst diese Gene zusammen und listet die Quantität der Expressionsänderungen und den p-Wert des statistischen Tests. Signifikante Änderungen ($p < 0,05$) sind in der Tabelle durch Fettdruck hervorgehoben. Auf die Auflistung von Genen, die bei keinem der gewählten SAR-Werte eine signifikante Änderung zeigten, wurde der Übersicht halber verzichtet. Im

Unterschied zu der Überlappung von etwa einem Drittel der Kandidatengene welche durch die Genchipsanalyse identifiziert wurden, war nach der RT-PCR Analyse kein Gen sowohl in der UMTS als auch der GSM exponierten Gruppe zu finden, dass gleichzeitig auch signifikant reguliert war.

Signifikante Änderungen der Genexpression konnten für SAR-Werte von 0,4-3,0 W/kg bestätigt werden. Nach Exposition bei 8 W/kg konnte in der RT-PCR lediglich für das GSM1800 Signal eine signifikante Änderung der Expression von Camk2b gezeigt werden.

Die beobachteten Änderungen liegen bis auf eine Ausnahme im Bereich von 1,5-fach bis etwa 3-fach. Eine Genregulation um den Faktor 2 und höher wurde bei 7 Genen (UMTS) bzw. 2 Genen (GSM) gezeigt, 2 Gene aus der UMTS Gruppe waren stärker als 3-fach hochreguliert. Bei dem um den Faktor 6,82 hochregulierten bone morphogenetic protein receptor, type 1 (Bmpr1a, UMTS bei 3,0 W/kg) zeigten lediglich zwei der fünf exponierten Kulturen in der RT-PCR ein auswertbares Signal.

Tab. 2 Liste von Genen, die nach UMTS bzw. GSM1800 Exposition gemäß RT-PCR Analyse signifikant ($p < 0,05$) in ihrer Expression verändert waren.

	<u>UMTS 0.4 W/kg</u>		<u>UMTS 1.0 W/kg</u>		<u>UMTS 3.0 W/kg</u>		<u>UMTS 8.0 W/kg</u>	
	R	p	R	p	R	p	R	p
Agtr1a	1,43	0,025	-1,25	0,078	1,08	0,639	1,22	0,359
Asam	-1,52	0,546	-1,60	0,033	1,09	0,924	-1,07	0,921
Bdkrb2	1,14	0,298	-1,12	0,447	1,96	0,001	1,35	0,151
Bmpr1a	-	-	-1,50	0,044	6,82	0,006	1,09	0,827
Cldn1	1,15	0,521	-1,11	0,419	3,07	0,001	-1,06	0,699
Csf2	1,18	0,198	1,00	0,988	1,55	0,003	-1,00	0,996
Cyp1a1	-1,61	0,046	-1,72	0,002	-1,47	0,229	1,12	0,540
F3	1,12	0,658	-1,15	0,341	2,25	0,003	-1,03	0,868
Gimap4	1,49	0,012	1,06	0,688	1,78	0,001	1,21	0,550
Igfbp5	2,01	0,012	-1,31	0,151	2,20	0,001	-1,11	0,716
Mcf2l	1,05	0,727	-1,11	0,459	2,35	0,001	1,07	0,725
Msln	-2,24	0,204	-2,48	0,001	2,61	0,355	-1,31	0,423
Ptger4	1,13	0,479	-1,26	0,022	-1,61	0,093	1,16	0,330
Sdc2	1,58	0,181	-1,23	0,092	2,25	0,021	1,17	0,413
Srpx	1,29	0,114	-1,11	0,314	1,33	0,046	1,05	0,788

	<u>GSM 0.4 W/kg</u>		<u>GSM 1.0 W/kg</u>		<u>GSM 3.0 W/kg</u>		<u>GSM 8.0 W/kg</u>	
	R	p	R	p	R	p	R	p
Camk2b	1,43	0,024	1,14	0,425	1,13	0,674	-1,66	0,027
Ece1	1,30	0,046	1,15	0,449	1,14	0,106	1,03	0,874
Jundp2	1,20	0,097	1,21	0,278	1,45	0,043	-1,02	0,926
Serpnb7	1,09	0,559	1,98	0,025	-1,11	0,416	-1,13	0,650
Slc19a1	1,14	0,223	1,18	0,209	-1,25	0,009	1,01	0,966
Slc6a9	1,11	0,310	1,21	0,230	2,09	0,039	1,02	0,918
Tgfb2	1,19	0,143	1,15	0,455	1,38	0,025	1,10	0,635

Neben den in Tab. 2 aufgeführten Genen konnte in der GSM 1800 exponierten Gruppe bei drei Genen eine Änderung lediglich auf einem Niveau von $p < 0,1$ bestätigt werden, welches nicht den hier angelegten Signifikanzkriterien entspricht. Dies sind Asam: -3,6x bei 0,4 W/kg ($p = 0,097$); Cfh: 2,1x bei 8 W/kg ($p = 0,054$) sowie Hcn1: 2,1x bei 3 W/kg ($p = 0,067$).

5. Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss elektromagnetischer Felder nach dem GSM1800- sowie dem UMTS-Standard auf die differentielle Genexpression eines Zellkulturmodells für die Blut-Hirn-Schranke der Ratte. Bei SAR-Werten unterhalb (0,4 W/kg und 1,0 W/kg) und oberhalb (3,0 W/kg und 8,0 W/kg) des gem. 26. BImSchV für die Teilkörperexposition festgelegten Grenzwertes (2,0 W/kg) wurden Kulturen von cerebralen Kapillarendothelzellen exponiert. Mit Genchip Arrays wurde die Genexpression bestrahlter Kulturen mit der unbestrahlter Kontrollkulturen verglichen. Das Ergebnis der Genchipanalyse wurde dann mittels quantitativer RT-PCR für ausgewählte Gene einer Verifikation unterworfen.

Die hier verwendeten Genchip Arrays umfassen das gesamte Genom der Ratte und liefern eine extrem umfangreiche Datenmenge, die mit Hilfe statistischer Methoden gesichtet werden muss. Für die viele Schritte umfassende Auswertung steht eine große Vielzahl von Werkzeugen zur Auswahl. Es gibt zu diesem Zweck daher keine Standardmethode oder eine die allgemein empfohlen wäre. Ebenso wenig gibt es einen vorgeschriebenen Weg für die Datenanalyse. Die Auswertung ist vielmehr der jeweiligen Fragestellung individuell anzupassen.

Deshalb darf bei der Verwendung von Genchip Arrays keine eindeutige ja/nein Antwort erwartet werden, im Sinne einer klar definierten Liste differentiell exprimierter Gene inklusive entsprechender Quantifikation der Regulierung. Dagegen sprechen neben der Flexibilität der Auswertung, auch ganz natürliche Varianzen, denen jedes biologische System unterliegt. Man findet mit der Genchip Analyse daher mehr oder weniger stark signifikante Hinweise, welche Gene für die vorliegende Fragestellung in Betracht kommen um die gewonnene Aussage dann in weiteren Experimenten zu untermauern.

Zur Verifikation von Ergebnissen der Genchip Analyse gilt dagegen eine Methode als anerkannter Standard: die quantitative real time RT-PCR. Allerdings hätte die Anwendung klassischer RT-PCR Techniken zu einer starken Einschränkung geführt, da diese lediglich die Untersuchung einer geringen Anzahl an Kandidatengenen zur Verifikation der Genchipergebnisse erlaubt hätte. Eine Untersuchung von mehr als 5 Kandidaten je Feldtyp (UMTS/GSM1800) wäre u.a. aus zeitlichen Gründen nicht möglich gewesen. Besonders schwierig wäre es dabei gewesen, ein klares, nachvollziehbares Votum für eine Auswahl von nur wenigen Genen und den Ausschluss vieler anderer Kandidaten zu formulieren. Der Einsatz von TLDA's für die RT-PCR hat die Anzahl der hier überprüfaren Kandidaten (47) deutlich erweitert und stellt im hier präsentierten Ansatz die Daten aus insgesamt 7680 einzelnen PCR Experimenten zur Verfügung.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Genchip Analytik zeigen, dass eine quantitative Änderung der Genexpression durch die Exposition mit RF-EMF nicht auszuschließen ist. Die Intensität der Änderung ist allerdings für eine große Anzahl an Genen nicht besonders stark ausgeprägt. Schon wenn eine 3-fache Regulation als Ausschlusskriterium zu Grunde gelegt wird, umfasst die mit der Genchip Analyse gewonnene Liste nur noch etwa 250 Gene.

Grundsätzlich wurde diese Aussage durch die RT-PCR Analyse bestätigt. Von den jeweils 47 untersuchten Kandidaten konnte eine signifikante Expressionsänderung nur für eine begrenzte Anzahl von Genen, 14 (UMTS) bzw. 7 (GSM1800) nachgewiesen werden. Von diesen waren wiederum nur 7 (UMTS) und 2 (GSM) mehr als 2-fach in ihrer Expression verändert. Für 13 (UMTS) bzw. 5 (GSM1800) Gene wurde der Trend bzgl. einer hoch- oder herunterregulierung aus der Genchipanalyse mit der RT-PCR bestätigt.

Die beobachteten Effekte sind relativ schwach, allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse für die UMTS und die GSM1800 Exposition voneinander. Während nach der Genchipauswertung etwa 1/3 der untersuchten Gene als Kandidaten jeweils in der GSM1800 und der UMTS-exponierten Gruppe auftauchten, wurden mittels RT-PCR in der GSM- und der UMTS-Gruppe ausschließlich verschiedene Gene als differentiell exprimiert bestätigt.

Mit 10 Genen aus der UMTS-Gruppe sowie 4 Genen aus der GSM-Gruppe konnten in beiden Fällen jeweils für den SAR-Wert 3,0 W/kg die meisten signifikant regulierten Gene

gefunden werden. Während nach UMTS Exposition bei 3 W/kg alle signifikant regulierten Gene hochreguliert waren, finden sich unter den bei 1 W/kg UMTS exponierten Zellkulturen ausschließlich herunterregulierte Gene. Dies mag an der Auswahl durch die vergleichende SAM Analyse der bei 1 und 3 W/kg exponierten Proben begründet liegen, welche die Unterschiede in der Genexpression zwischen diesen beiden SAR Werten besonders betont. Andererseits ist eine ähnliche Verteilung bei den GSM1800 exponierten Zellen nicht zu erkennen. Dabei sei hier nochmals darauf hingewiesen, dass die für die PCR ausgewählten mindestens 2-fach regulierten Gene der „BHS-Auswahl“ und auch die 5-fach regulierten Gene nicht aus dem Datensatz der SAM-Analyse gewählt wurden, sondern aus dem gleichen Pool, der auch mit der SAM-Analyse untersucht wurde. Entsprechend war nur ein Teil der für die RT-PCR Untersuchung ausgewählten Gene durch die SAM ausgewählt worden.

Ein Trend in der Genregulation im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte in den vorliegenden Daten nicht beobachtet werden. Ferner ist keines der als reguliert charakterisierten Gene bei mehr als zwei verschiedenen SAR signifikant beeinflusst worden. Dieser Befund deckt sich mit einer Beobachtung, die sich bei der Analyse der Genchipdaten zeigte. So konnte im Verlauf der Analyse der Genchipdaten keine Zugehörigkeit der Proben zu verschiedenen experimentellen Gruppen erkannt werden, so lange diese noch verblindet waren. Lediglich die Temperaturkontrollen unterschieden sich nach Aussage der Bioinformatiker auch wenn sie noch verblindet waren erkennbar von den exponierten- wie auch von den scheinexponierten Proben.

Da die regulierten Gene mit Hilfe zweier verschiedener Methoden und an jeweils fünf Replikaten identifiziert wurden ist eine rein zufällige Beobachtung jedoch zumindest unwahrscheinlich. Auch die allen biologischen Systemen eigene natürliche Varianz kann hier nicht als Grund für die beobachtete Genregulation herhalten, da zu jeder exponierten Zellkultur scheinexponierte Kontrollen aus der identischen Charge zum Vergleich eingesetzt wurden.

Sicherlich wären dazu Wiederholungsexperimente wünschenswert, aufgrund der Komplexität der Untersuchungen und des hohen Aufwands zur Generierung der Proben waren diese aber im vorgesehenen Rahmen nicht möglich.

Ein fehlender Nachweis einer Dosis-Wirkungs-Beziehung widerspricht zunächst den Erwartungen nach einem Zusammenhang von Dosis und eingetretener Wirkung, wie man sie aus der Pharmakodynamik und der Toxikologie kennt. Für die (ausschließliche) Wechselwirkung von EMF des Mobilfunks mit einem biologischen System ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bisher allerdings noch nicht zuverlässig nachgewiesen worden, auch wenn es Hinweise auf einen solchen Zusammenhang gibt. So schreiben Regel et al. [31], dass ihre Ergebnisse auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen SAR und Schlaf bzw. Kognitiver Leistungsfähigkeiten bei GSM900 Exposition von Probanden hindeuten. Allerdings werden hier lediglich zwei SAR-Werte untersucht, so dass die Datenlage recht schwach ist.

Grundsätzlich sind für die Beschreibung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung mehrere Fragen relevant: Welche Dosen sind wirkungslos und ab welchen Dosen treten Effekte auf, also wo liegt der Schwellenwert? Welche Dosen sind toxisch? Wie stark sind die Effekte in Abhängigkeit von der Dosis? Eine Verdopplung der Dosis muss z.B. nicht zwingend zu einem doppelt so starken Effekt führen, da auch nicht-lineare Wirkungsprofile bekannt sind. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung kann aber auch interindividuell verschieden sein. Es werden also für den gleichen Effekt bei verschiedenen Individuen unterschiedliche Dosierungen benötigt [22] was eine genaue Bestimmung der Beziehung erschwert.

Das typische Profil einer Dosis-Wirkungs-Beziehung wird durch einen sigmoiden Kurvenverlauf beschrieben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die für den hier abgedeckten Leistungsbereich von 0,4-8 W/kg beobachteten Effekte sich noch am unteren Grenzbereich, also dem unteren Plateau dieser Kurve bewegen, so dass der Nachweis einer Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht zu führen ist. Entsprechend ließe sich ein solcher Bezug erst bei deutlich höheren Feldstärken nachweisen. Dabei wäre sicherzustellen, dass das untersuchte System eine ausreichende Kühlung erhält, damit nicht thermische Effekte mit

der Feldexposition konkurrieren und diese ggf. überlagern. Generell stellt die bei höheren Feldstärken oft auftretende thermische Belastung ein Problem dar wenn es gilt einen quantitativen Zusammenhang zwischen elektromagnetischem Feld und dessen Wirkung aufzustellen.

Möglicherweise sieht man einen solchen Effekt in der vorliegenden Untersuchung nach Exposition bei einer SAR von 8,0 W/kg, wo nur für ein Gen aus der GSM1800 Gruppe eine Genregulation durch die RT-PCR bestätigt werden konnte. Die geringe Anzahl kann als Beleg gewertet werden, dass der hier bei der Auswahl der Gene durchgeführte Vergleich mit thermischen Kontrollen erfolgreich zu einer Selektion geführt hat, die fast ausschließlich Kandidaten umfasste, deren Expressionsänderung nicht durch die bei dieser SAR gemessene Temperaturerhöhung provoziert worden war. Warum allerdings die schon bei geringeren SAR beeinflussten Gene nicht auch bei 8 W/kg reagiert haben, erklärt diese Interpretation nicht. Es ist aber möglich, dass die EMF induzierte, veränderte Genexpression durch thermischen Stress vollständig überlagert wurde, weil die Endothelzellen im Falle einer Temperaturerhöhung wie sie bei 8 W/kg beobachtet wurde eine grundsätzlich andere Reaktion zeigen. Entsprechend würden die feldbedingten Effekte in den Hintergrund treten oder nicht mehr nachweisbar sein.

Interessant ist in diesem Zusammenhang sicherlich auch eine Betrachtung der häufig diskutierten „Fenstereffekte“, die bereits von Oscar und Hawkins [28] beschrieben wurden. Dieses bisher wissenschaftlich nicht belegte Phänomen postuliert, dass ein Effekt nur bei einer bestimmten Dosis oder einem eingeschränkten Dosisbereich auftritt. Beschrieben wird dieser Fenstereffekt typischerweise für in vivo Studien, also wenn Reaktionen eines ganzen Organismus untersucht werden. Sollte ein solches Fenster bei der Wirkung von EMF auf ein biologisches System tatsächlich existieren wäre sicherlich zu fragen, ob dieses Fenster auf molekularer Ebene für jeden einzelnen Effekt bei der gleichen Dosis zu suchen wäre oder nicht auch verschiedene Antworten in unterschiedlichen Fenstern möglich sein können. Ein Nachweis eines solchen Fenstereffekts ist aus den hier gewonnenen Daten allerdings nicht zu führen.

Für die in Tab.2 aufgeführten regulierten Gene soll hier, nach funktionellen Gruppen zusammengefasst, ein Überblick über die Funktion und (falls beschrieben) den Bezug zur BHS der von den Genen codierten Proteine gegeben werden. Sie umfasst einige Gene, deren Genprodukte, also Proteine, von Bedeutung für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke sind.

5.1. Vasoaktive Rezeptoren

Agtr1a codiert für den Angiotensin-II Rezeptor Typ1, dieser bindet Angiotensin-II, einen potenten Vasokonstriktor (Verengung der Blutgefäße).

Bdkrb2 codiert für einen Bradykinin-Rezeptor der eine Rolle bei der Vasodilatation (Blutgefäßerweiterung) spielt, wird diskutiert im Zusammenhang mit einer Permeabilitäts-erhöhung an der BHS in Tumorgewebe [37]. Dieser Rezeptor erhöht nach Bindung eines Agonisten (Bradykinin, Labradimil) die Permeabilität der BHS [7].

Endothelin Converting Enzyme (Ece1) ist eine Zink-Metalloprotease die aus „großen Endothelinen“, das sind Vorläufermoleküle des Endothelins, Endothelin freisetzen kann. Endothelin ist ein potenter Vasokonstriktor und wird vornehmlich aber nicht ausschließlich in Endothelzellen gebildet. Morimoto et al. [23] hatten eine durch Thrombin induzierte Verringerung von Endothelin-1 in Aortenendothel nach EMF-Exposition beobachtet. Nach intracisternaler Injektion (in den Liquorraum des Kopfes) von Endothelin-1 beobachteten Narushima et al. [26] einen starken Anstieg der BHS Permeabilität.

5.2. Zelluläre Differenzierung

Asam, das adipocytenspezifische Adhäsionsmolekül, wird während der Differenzierung von Adipocytan hochreguliert.

Das *bone morphogenic protein* (Bmpr1a) gehört zusammen mit TGF- β (s.u.) zur „*transforming growth factor* Superfamilie“. Ihre Funktion ist die u.a. Kontrolle von Proliferation und Differenzierung in vielen Zelltypen. Yamada et al. beschrieben, dass Mäuse, die kein Bmpr1a exprimieren, keine BHS aufbauen können [39].

Igfbp5 gehört zu einer Familie von Proteinen die IGFs (insulin-like growth factors) binden können. Igfbp5 ist ein multifunktionelles Protein welches neben seiner Rezeptorfunktion auch IFG unabhängig als Wachstumsfaktor wirkt.

Jundp2 wird nur für die Ratte und die Maus beschrieben. Das humane Analogon heißt JDP-2, beide werden aber übereinstimmend *jun dimerization protein* genannt. JDP-2 zählt zur Familieder AP-1 (*activating protein*) Proteine und ist ein Transkriptionsfaktor. AP-1 können die Transkription bestimmter Gene erhöhen, sind also mitverantwortlich für eine Erhöhung der Genexpression.

Der Transforming growth factor-beta 2 (TGF- β 2, Gensymbol Tgfb2) zählt zu den Zytokinen, somit den Substanzen die im Organismus als Botenstoffe dienen. TGF spielen eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung. Proteine der TGF- β Gruppe können auch auf die Zellproliferation Einfluss nehmen. TGF- β 2 überwindet die BHS sehr gut.

Gimap4 ist ein Regulator der Apoptose, also des programmierten Zelltods und hat somit keine unmittelbare Funktion für die BHS. Die Apoptose kann durch innere wie auch äußere Einflüsse in der Zelle ausgelöst werden. Sie ist ein sehr bedeutender Mechanismus des Zellstoffwechsels der indirekt nicht nur auf die BHS, sondern auf jeden Zellverband Einfluss nehmen kann.

5.3. *Tight Junctions* und Barrierefunktion

Unter den regulierten Genen nach UMTS-Exposition findet sich mit Cldn1 ein Gen welches für Claudin-1 codiert, einem Protein das für die passive Schrankenfunktion eine essentielle Rolle spielt. Claudin-1 zählt zur Familie der Claudine, das sind relativ kleine Transmembranproteine, die die Zellmembran mehrfach durchspannen und über interzelluläre Loops Kontaktpunkte mit benachbarten Zellen herstellen. Claudin-1 bildet mit anderen *tight junction* Proteinen (Occludin, E-Cadherin, ZO-1, JAM-1, Cingulin, Actin und Cateninen) einen Komplex, der für die Versiegelung des interzellulären Spalts, also unmittelbar für die Schrankenfunktion der BHS verantwortlich ist.

Besonderes interessant ist die erhöhte Expression von Cldn1 vor dem Hintergrund der Experimente von Ladage [19], die im Rahmen ihrer Dissertation mittels quantitativer real time PCR die Genexpression zu Claudin-1 und weiteren *tight junction* Proteinen nach UMTS-Exposition sowohl an Ratten als auch an isolierten Hirngefäßen untersucht hat. Ladage konnte nach zweistündiger Feldexposition eine im Vergleich zur Käfigkontrolle und zum Teil auch zur Scheinexposition signifikant erhöhte Cldn1 Expression beobachten. Bei einer SAR von 2 W/kg war die Expression um das 3,5-fache gegenüber der Käfigkontrolle erhöht, bei 10 W/kg um das 6,4-fache im Vergleich mit der Käfigkontrolle und um das 1,8-fache gegenüber der scheinexponierten Ratten. Die maximale Temperaturerhöhung lag bei 0,5°C und somit im physiologischen Toleranzbereich der Ratten. Somit ist, wie in der vorliegenden Untersuchung, ein durch die Temperaturerhöhung hervorgerufener Effekt auszuschließen. Zwar ist die von Ladage gewählte Expositionsleistung mit 10 W/kg höher als in dieser Studie, allerdings war die Expositionsdauer mit 2h (Ratten, in vivo) bzw. 24h (Hirngefäße, ex vivo) entsprechend kürzer, so dass mit gewissen Einschränkungen von recht ähnlichen Ergebnissen gesprochen werden kann.

Nach 24-stündiger UMTS-Exposition von isolierten Hirngefäßen bei 1,8 W/kg beobachtete Ladage eine nicht signifikant erhöhte Expression von Claudin-1 und Claudin-5 (jeweils 1,3-fach) sowie eine signifikant erhöhte Expression von Claudin-11 (2,7-fach). Thermischer Stress bei 42°C führte in ihren Experimenten jeweils zu einer herunterregulierten Expression der drei Claudin Gene.

Für Claudin-1 war in unserer Untersuchung laut Genchipanalyse auch für das GSM Signal bei 3 W/kg die Expression erhöht, dies konnte in der RT-PCR auch in Form einer 1,7-fachen Erhöhung gezeigt, allerdings nicht signifikant bestätigt werden. Eine Exposition im GSM1800 Feld wurde von Ladage nicht untersucht. Die Ergebnisse zur hier, wie auch von Ladage

untersuchten Expression von MMP-2 (Matrix-Metalloprotease 2) nach UMTS-Exposition decken sich ebenfalls. In beiden Studien konnte keine veränderte MMP-2 Expression nachgewiesen werden.

Syndecan 2, ein Heparansulfatproteoglykan (HSPG), wird im Gegensatz zu anderen HSPG speziell in Kapillarendothelzellen des Gehirns exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Expedition von Monozyten/Immunzellen über die BHS [8].

Das Genprodukt von Csf2 wird auch als *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) bezeichnet und hat neuroprotektive Eigenschaften beim Schlaganfall [25]. Desweiteren soll es die Permeabilität der BHS herabsetzen können (Kraus, J. Pers. Mitteilung).

Neben der auf die Schrankenbildung gründenden Diffusionsbarriere existiert zusätzlich eine sogenannte metabolische Blut-Hirn-Schranke. Enzyme wie z.B. die P450 Cytochrome zu denen Cyp1a1 zählt, können unerwünschte Substanzen durch Degradation aus dem Gehirn eliminieren bzw. an der Endothelgrenze abfangen und abbauen, bevor die unerwünschten Substanzen das Hirn erreichen.

F3 (Thrombomodulin) spielt eine wichtige Rolle für die antithrombotischen Eigenschaften von Endothelzellen. F3 ist der Rezeptor für Thrombin auf der luminalen (der blutzugewandten) Seite von Endothelzellen [38] und wird im Gehirn exklusiv in Kapillarendothelzellen der BHS gefunden. Die Herunterregulation von F3 wird von Zytokinen (IL-1beta, TNF-alpha), die Hochregulation von Retinsäure oder cAMP beeinflusst. Diese Substanzen beeinflussen ebenfalls die Dichtigkeit der BHS.

ZO-1 ist ein Protein, das ausschließlich auf der cytoplasmatischen Seite der *tight junctions* vorkommt. Dort interagiert es u.a. mit den Proteinen Occludin und Claudin wie auch mit den Aktin-Filamenten des Cytoskeletts. Es verbindet die *tight junctions* mit dem Zellskelett und trägt zur Stabilität bei. Das Gen TJP1_predicted codiert in der Ratte wahrscheinlich für ZO-1, die differentielle Expression konnte aber, da es nicht zu den „invertarisierten Genen“ zählte nicht zusätzlich mit der RT-PCR untersucht werden.

5.4. Adhäsion

Mesothelin (Msln) ist ein Oberflächenantigen an Mesothelioma Zellen, also normalerweise nur an der Oberfläche von Tumoren präsent. Ihm wird eine Zelladhäsionsfunktion zugeschrieben.

Srpx codiert für ein sogenanntes *sushi-repeat-containing protein* das möglicherweise bei der Zelladhäsion beteiligt ist.

5.5. Signaltransduktion

Die *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II-β* (Cam2kb) ist in die Signaltransduktion involviert, Kaiser und Nisenbaum [16] berichten über eine Herunterregulation des Gens nach einem Hirntrauma.

Ptger4 zählt zu den Prostaglandin-E Rezeptoren. Der EP4-Rezeptor hält den Ductus arteriosus offen, welcher im fötalen Blutkreislauf eine Verbindung zwischen Hauptschlagader (Aorta) und Lungenschlagader herstellt. Khan et al. [17] berichten, dass der Entzündungsmediator Prostaglandin-E2 (PGE2), vermittelt über die Rezeptoren EP2, EP3 und EP4 die Migration von Kapillarendothelzellen induzieren kann. PGE2 spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese wie auch in ischämischen und entzündlichen Störungen der Hirnfunktion gepaart mit einem Zusammenbruch der BHS.

Serpine gehören zur Gruppe der Serin Protease Inhibitoren, diese Enzyme weisen in ihren aktiven Zentren Serin-Reste auf, die essentiell für die enzymatische Aktivität sind. Der Name Serpin leitet sich als Akronym direkt aus Serin Protease Inhibitor ab. Im menschlichen Blutplasma sind Serpine die wichtigsten Protease-Inhibitoren und machen etwa 10 % des Gesamteiweißes aus und sind in die Blutgerinnungskaskade involviert.

Serpinb7, auch Megsin genannt wird besonders hoch von mesangialen Zellen der Niere exprimiert, allerdings nur sehr schwach im Gehirn und in Endothelien. Ein Bezug zur BHS ist

offensichtlich nicht vorhanden. Serpinb7 war in der qRT-PCR das am schwächsten exprimierte Gen unter allen, die eine signifikante Expressionsänderung zeigten und konnte nur knapp über der Nachweisgrenze detektiert werden.

5.6. Transportproteine

Von besonderer Bedeutung an der BHS sind Proteine, die die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen sicherstellen. Zu ihnen zählen Proteine der *solute carrier family* (SLC), die eine erleichterte Diffusion (Uniport) oder als Symporter oder Antiporter unter indirektem Energieverbrauch ihre Transportfunktion ausüben, wie auch die Mitglieder der ABC-Proteine (ATP Binding Cassette) die unter direktem ATP-Verbrauch Substanzen durch das Endothel bewegen können. ABC-Proteine sind auch ursächlich bei der sog. *multidrug resistance* involviert, einem u.a. BHS-typischen Phänomen, bei dem der Transport von Arzneistoffen in das Gehirn behindert wird. Sowohl SLCs als auch ABC-Proteine sind in der Genchipanalyse mit einer veränderten Expression detektiert worden. Eine signifikante Expressionsänderung wurde nach GSM-Exposition für Slc19a1 und Slc6a9 bestätigt. Slc19a1 codiert für einen Folat-Transporter (RFC, reduced folate carrier), Slc6a9 für einen Glycin-Transporter.

Von den hier beschriebenen Genen verdient die Hochregulierung des Cldn1 welches für das *tight junctions* Protein Claudin-1 codiert einen besonderen Fokus, insbesondere da auch Ladage [19] an der Ratte eine Hochregulierung von Cldn1 nach UMTS-Exposition beschreibt. Weiterhin waren mehrere Gene (Agr1a, Bdkrb2 und Ece1) differentiell exprimiert, die für vasoaktive Rezeptoren codieren. Es ist bekannt, dass vasoaktive, also blutgefäßerweiternde oder -verengende Substanzen die Integrität der BHS stören können [6] weshalb auch diese Gene interessante Kandidaten für weiterführende Untersuchungen darstellen. Zweites essentielles Standbein der BHS sind neben den für die passive Barriere verantwortlichen *tight junctions* die Transporter, die dem kontrollierten Stoffimport in das Gehirn dienen. Hier sind mit dem Folat- und der Glycin-Transporter (Slc19a1 und Slc6a9) zwei Kandidaten identifiziert worden, die sich für weiterführende Studien anbieten. Dabei könnten speziell funktionelle Untersuchungen herangezogen werden, um zu überprüfen ob die Transportrate der Slc-Proteine durch EMF verändert wird. Als weiterer Kandidat wäre TGF- β für weitere Untersuchungen auszuwählen, seine Funktionen in der Zelldifferenzierung und -proliferation sind für das BHS-Endothel von grundsätzlicher Bedeutung.

Abschließend bleibt nochmals zu betonen, dass eine Interpretation der pathophysiologischen Relevanz der hier gefundenen hoch- oder herunterregulierten Gene, wie bereits in der Einleitung beschrieben, nicht zielführend ist. Diese Untersuchung zeigt aber, dass die Endothelzellen auf den äußeren Einfluss des elektromagnetischen Feldes mit einer moderaten Genregulation reagiert haben. Dies ist grundsätzlich ein ganz natürlicher Vorgang mit dem Zellen auf Reize reagieren, wobei diese Reize nicht notwendigerweise schädlich für die Zelle sind. Dennoch ist es interessant, diese Befunde weiterzuverfolgen da einige Gene identifiziert werden konnten, die an der BHS relevante Effekte hervorrufen können.

6. Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung: Diese Studie sollte die Wirkung hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf die Blut-Hirn-Schranke in vitro für untersuchen. Mit einem hypothesenfreien Ansatz, der Analyse der differentiellen Genexpression, sollten Gene identifiziert werden, die durch EMF-Einfluss hoch- oder herunterreguliert werden. Primärkulturen cerebraler Endothelzellen der Ratte wurden in einem radialsymmetrischen Hohlwellenleiter 72 h lang kontinuierlich UMTS- oder GSM1800-Signalen bei SAR-Werten zwischen 0,4 W/kg und 8 W/kg ausgesetzt oder scheinexponiert. Die aus den Zellkulturen isolierte RNA wurde mit Genchip Arrays und nachfolgend quantitativer real time PCR

untersucht und die Genexpression exponierter Zellen mit der von scheinexponierten Kontrollen verglichen.

Es konnten 13 (UMTS) bzw. 5 (GSM1800) Gene ermittelt werden, deren Expression sowohl im Genechip-Array als auch mit RT-PCR bei mindestens einem der getesteten SAR-Werte signifikant verändert war. Unter diesen waren für die Funktion der BHS relevante Kandidaten codierend für Transportproteine aus der SLC Familie, Rezeptoren vasoaktiver Substanzen, zelluläre Differenzierung, Signaltransduktion oder das tight junction Protein Claudin-1. Die Erhöhung oder Verringerung der Genexpression war allgemein relativ schwach ausgeprägt und in den meisten Fällen etwa 1,5- bis 3-fach im Vergleich zur Kontrolle verändert. Ein Vergleich der Daten der vier untersuchten SAR-Werte konnte keinen Hinweis auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung geben. Insgesamt konnten in dieser Studie einige Kandidatengene identifiziert werden, deren Expression im nichtthermischen Bereich (Temperaturerhöhung unter 1°C) von EMF verändert wurde. Hinweise auf eine pathophysiologische Relevanz für den Menschen lassen sich aus den Daten allerdings nicht ableiten.

Summary: The present study aimed to investigate the impact of mobile phone electromagnetic fields on the blood brain-barrier in vitro. The analysis of differential gene expression was chosen as hypothesis-free screening tool in order to identify genes that were up- or downregulated due to RF-EMF exposure. Primary cultures of rat brain microvascular endothelial cells were permanently exposed for 72 hours to either UMTS or GSM1800 signals at SAR-values ranging from 0.4 to 8.0 W/kg in a radial waveguide. A sham exposure was performed for each experiment in parallel. RNA was isolated from the cell cultures and underwent genechip array and quantitativ real time PCR analysis. A comparison of expression profiles of exposed and sham exposed revealed 13 (UMTS) or respectively 5 (GSM1800) genes that were significantly regulated at least at one SAR. These genes include candidates encoding for proteins know for their relevance for proper BBB function such as members of the SLC-Transporter family, vasoactive receptors, cellular differentiation, signal transduction and the tight junction protein claudin-1. Up- or downregulations in gene expression were relatively weak for all samples and typically ranges between 1.5 to 3-fold changes when compared to sham exposed controls. The comparison of data for all four SAR-values tested here did not identify any dose-response relationship. Overall this study identified severnal candidate genes that showed differential expression due to non-thermal (less than +1°C warming) EMF influence. The study design and the data obtained here do not point towards any pathophysiologically relevant events in human.

7. Literatur

- [1] Bowman, P.D., Betz, A.L., Ar, D., Wolinsky, J.S., Penney, J.B., Shivers, R.R. and Goldstein, G.W., Primary culture of capillary endothelium from rat brain, *In Vitro*, 17 (1981) 353-62.
- [2] Bowman, P.D., Ennis, S.R., Rarey, K.E., Betz, A.L. and Goldstein, G.W., Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability, *Ann Neurol*, 14 (1983) 396-402.
- [3] Byus, C.V., Kartun, K., Pieper, S. and Adey, W.R., Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells exposed to low energy modulated microwave fields and phorbol ester tumor promoters, *Cancer Res*, 48 (1988) 4222-6.
- [4] Byus, C.V., Pieper, S.E. and Adey, W.R., The effects of low-energy 60-Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase, *Carcinogenesis*, 8 (1987) 1385-9.
- [5] D'Andrea, J.A., Chou, C.K., Johnston, S.A. and Adair, E.R., Microwave effects on the nervous system, *Bioelectromagnetics*, Suppl 6 (2003) S107-47.
- [6] Deli, M.A., Abraham, C.S., Kataoka, Y. and Niwa, M., Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology, *Cell Mol Neurobiol*, 25 (2005) 59-127.
- [7] Emerich, D.F., Dean, R.L., Osborn, C. and Bartus, R.T., The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation, *Clin Pharmacokinet*, 40 (2001) 105-23.
- [8] Floris, S., van den Born, J., van der Pol, S.M., Dijkstra, C.D. and De Vries, H.E., Heparan sulfate proteoglycans modulate monocyte migration across cerebral endothelium, *J Neuropathol Exp Neurol*, 62 (2003) 780-90.
- [9] Franke, H., Streckert, J., Bitz, A., Goeke, J., Hansen, V., Ringelstein, E.B., Nattkamper, H., Galla, H.J. and Stogbauer, F., Effects of Universal Mobile Telecommunications System (UMTS) electromagnetic fields on the blood-brain barrier in vitro, *Radiat Res*, 164 (2005) 258-69.
- [10] Glaser, R., Beeinflussen Felder des Mobilfunks die Blut-Hirn-Schranke, *FGF-Newsletter*, 11 (2003) 17-21.
- [11] Hermann, D.M. and Hossmann, K.A., Neurological effects of microwave exposure related to mobile communication, *J Neurol Sci*, 152 (1997) 1-14.
- [12] Hossmann, K.A. and Hermann, D.M., Effects of electromagnetic radiation of mobile phones on the central nervous system, *Bioelectromagnetics*, 24 (2003) 49-62.
- [13] Hoyto, A., Juutilainen, J. and Naarala, J., Ornithine decarboxylase activity of L929 cells after exposure to continuous wave or 50 Hz modulated radiofrequency radiation - a replication study, *Bioelectromagnetics*, 28 (2007) 501-8.
- [14] Hoyto, A., Sihvonen, A.P., Alhonen, L., Juutilainen, J. and Naarala, J., Modest increase in temperature affects ODC activity in L929 cells: Low-level radiofrequency radiation does not, *Radiat Environ Biophys*, 45 (2006) 231-5.
- [15] Hughes, C.C. and Lantos, P.L., Brain capillary endothelial cells in vitro lack surface IgG Fc receptors, *Neurosci Lett*, 68 (1986) 100-6.
- [16] Kaiser, S. and Nisenbaum, L.K., Evaluation of common gene expression patterns in the rat nervous system, *Physiol Genomics*, 16 (2003) 1-7.
- [17] Khan, G.A., Konger, R. and Rizzo, M.T., Abstract 823: Cooperation of the EP2, EP3 and EP4 Receptors in Regulation of Prostaglandin E2-induced Human Brain Microvascular Endothelial Cell Migration, *Circulation*, 114 (2006) II_145-a.
- [18] Koenig, H., Goldstone, A.D. and Lu, C.Y., Polyamines mediate the reversible opening of the blood-brain barrier by the intracarotid infusion of hyperosmolal mannitol, *Brain Res*, 483 (1989) 110-6.
- [19] Ladage, K., Molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluss von Entzündungsmediatoren und elektromagnetischen Feldern auf tight junction

- Komponenten der Blut-Hirn-Schranke. *Lehrstuhl für Neuroanatomie und Molekulare Hirnforschung*, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, 2006.
- [20] Leszczynski, D., Joenvaara, S., Reivinen, J. and Kuokka, R., Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects, *Differentiation*, 70 (2002) 120-9.
- [21] Litovitz, T.A., Krause, D., Penafiel, M., Elson, E.C. and Mullins, J.M., The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity, *Bioelectromagnetics*, 14 (1993) 395-403.
- [22] Lüllmann, H., Mohr, K. and Ziegler, A., *Taschenatlas der Pharmakologie*, 3. Auflage edn., Thieme, 1996.
- [23] Morimoto, S., Takahashi, T., Shimizu, K., Kanda, T., Okaishi, K., Okuro, M., Murai, H., Nishimura, Y., Nomura, K., Tsuchiya, H., Ohashi, I. and Matsumoto, M., Electromagnetic fields inhibit endothelin-1 production stimulated by thrombin in endothelial cells, *J Int Med Res*, 33 (2005) 545-54.
- [24] Naarala, J., Hoyto, A. and Markkanen, A., Cellular effects of electromagnetic fields, *Altern Lab Anim*, 32 (2004) 355-60.
- [25] Nakagawa, T., Suga, S., Kawase, T. and Toda, M., Intracarotid injection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neuroprotection in a rat transient middle cerebral artery occlusion model, *Brain Res*, 1089 (2006) 179-85.
- [26] Narushima, I., Kita, T., Kubo, K., Yonetani, Y., Momochi, C., Yoshikawa, I., Ohno, N. and Nakashima, T., Highly enhanced permeability of blood-brain barrier induced by repeated administration of endothelin-1 in dogs and rats, *Pharmacol Toxicol*, 92 (2003) 21-6.
- [27] Ndoumbè Mbonjo Mbonjo, H., Streckert, J., Bitz, A., Hansen, V., Glasmachers, A., Gencol, S. and Rozic, D., A generic UMTS test signal for RF bio-electromagnetic studies., *Bioelectromagnetics*, 25 (2004) 415-425.
- [28] Oscar, K.J. and Hawkins, T.D., Microwave alteration of the blood-brain barrier system of rats, *Brain Res*, 126 (1977) 281-93.
- [29] Penafiel, L.M., Litovitz, T., Krause, D., Desta, A. and Mullins, J.M., Role of modulation on the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity in L929 cells, *Bioelectromagnetics*, 18 (1997) 132-41.
- [30] Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res*, 30 (2002) e36.
- [31] Regel, S.J., Tinguely, G., Schuderer, J., Adam, M., Kuster, N., Landolt, H.P. and Achermann, P., Pulsed radio-frequency electromagnetic fields: dose-dependent effects on sleep, the sleep EEG and cognitive performance, *J Sleep Res*, 16 (2007) 253-8.
- [32] Repacholi, M.H., Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs, *Bioelectromagnetics*, 19 (1998) 1-19.
- [33] Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. and Ragg, T., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, *BMC Mol Biol*, 7 (2006) 3.
- [34] Schüller, M., Streckert, J., Bitz, A., Menzel, K. and Eicher, B., Proposal for a generic GSM test signal., *Proc. 22nd BEMS annual Meeting, Munich, Germany* (2000) 122-123.
- [35] Stögbauer, F., Beeinflussung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke durch elektromagnetische Felder, *Edititon Wissenschaft, Forschungsgemeinschaft Funk e.V.*, 15 (2002) 1-16.
- [36] Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G., Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 5116-21.
- [37] Uchida, M., Chen, Z., Liu, Y. and Black, K.L., Overexpression of bradykinin type 2 receptors on glioma cells enhances bradykinin-mediated blood-brain tumor barrier permeability increase, *Neurol Res*, 24 (2002) 739-46.

- [38] Wang, L., Tran, N.D., Kittaka, M., Fisher, M.J., Schreiber, S.S. and Zlokovic, B.V., Thrombomodulin Expression in Bovine Brain Capillaries : Anticoagulant Function of the Blood-Brain Barrier, Regional Differences, and Regulatory Mechanisms, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17 (1997) 3139-3146.
- [39] Yamada, M., Araya, R., Kitamura, N. and Mishina, Y., Astrocytic BMP signalling and glial scarring, *J Neurochem*, 98 (Suppl. 1) (2006) 61.

8. Anhang

Liste der für die RT-PCR Validierung in Frage kommenden Gene. Die Markierungen „x“ geben die Zuordnung der Gene zu den Auswahlkriterien an. Dazu ist die quantitative Änderung der Genexpression gemäß Genchipanalyse bei den unterschiedlichen Signalstärken angegeben.

UMTS	BHS 2x	SAM 3x	div. 5x	RT-PCR	0,4 W/kg	1 W/kg	3 W/kg	8 W/kg	
Aass_predicted		x			1,2	-2,4	4,6	-1,0	aminoadipate-semialdehyde synthase (predicted)
Abcc8	x			x	-1,2	-1,8	5,7	-1,0	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
Actn1	(x)			x	1,8	1,1	-1,0	-1,1	Actinin, alpha 1
Adamts8_predicted	x				-2,6	-1,2	1,1	1,3	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8 (predicted)
Agtr1a	x			x	2,1	-1,5	-1,9	2,4	angiotensin II receptor, type 1 (AT1A)
Alcam	x			x	1,7	-3,2	1,3	2,1	activated leukocyte cell adhesion molecule
Asam		x		x	-3,7	-1,3	1,9	-1,8	adipocyte-specific adhesion molecule
Bdkrb2		x		x	1,0	-2,5	3,3	1,4	bradykinin receptor, beta 2
Bmpr1a		x	x	x	-1,6	-1,0	6,2	1,6	bone morphogenetic protein receptor, type 1A
Casr1 /// LOC365807			x	x	4,0	-1,6	-1,1	1,7	calcium-sensing receptor like 1 /// similar to putative pheromone receptor V2R2
Catna1	x			x	2,6	-1,4	1,7	1,6	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1
Clcn4-2			x	x	-1,5	-1,2	5,5	1,8	putative chloride channel 4-2
Cldn1	x		x	x	1,3	2,4	5,7	-2,3	claudin 1
Cldn1 *	x		x	x	-1,2	-1,2	5,0	-1,8	claudin 1
Col5a3	x			x	1,1	1,1	-2,5	5,5	procollagen, type V, alpha 3
Csf2			x	x	-1,3	-1,1	1,5	-5,4	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
Csh111			x	x	9,0	1,5	1,3	-2,6	Chorionic somatomammotropin hormone 1-like 1
Cspg6		x		x	-1,5	-3,1	1,7	-1,8	chondroitin sulfate proteoglycan 6
Ctdspl_predicted			x		1,9	-5,7	-1,7	2,0	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like (predicted)
Cyp1a1			x	x	-6,2	-3,7	-4,0	-2,4	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1
Dst_predicted			x		10,0	-1,2	1,4	1,5	dystonin (predicted)
Dusp5			x	x	5,5	-1,0	-1,2	1,4	Dual specificity phosphatase 5
Ece1	x			x	1,9	1,2	-1,1	-1,0	endothelin converting enzyme 1
Egfl4		x			-1,7	-1,2	3,0	-2,9	EGF-like-domain, multiple 4
Etfb		x		x	-1,3	-1,6	3,1	-1,3	Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide
F3			x	x	1,1	1,0	5,3	2,4	coagulation factor III
Fxr2h_predicted		x			1,4	-2,9	3,0	-1,1	Fragile X mental retardation gene 2, autosomal homolog (predicted)
Gimap4		x	x	x	-1,5	-1,4	5,4	1,2	GTPase, IMAP family member 4
Hspa1a /// Hspa1b_mapped	x			x	-1,1	1,0	1,0	2,4	heat shock 70kD protein 1A;heat shock 70kD protein 1B (mapped)
Igfbp5		x	x	x	-1,4	-1,3	5,2	2,3	insulin-like growth factor binding protein 5

Kif21a_predicted		x			-1,1	1,5	4,9	1,2	Kinesin family member 21A (predicted)
Kif7_predicted		x			-1,0	-1,2	3,7	-1,1	Kinesin family member 7 (predicted)
LOC286989		x		x	-1,2	-3,1	4,4	1,4	UDP-glucuronosyltransferase
LOC316432				x	1,7	1,0	3,9	5,0	Ica69-related protein
LOC367746				x	-5,4	-1,2	2,4	2,2	LOC367746 (Rattus norvegicus) similar to Spindlin-like protein 2 (SPIN-2)
Mcf2l				x	-1,5	1,4	-1,1	-6,7	mcf.2 transforming sequence-like
Mfap3l				x	6,0	-2,6	1,2	-1,1	microfibrillar-associated protein 3-like
Mmp2	(x)			x	-1,3	-1,3	1,5	1,5	matrix metalloproteinase 2
Msln		x		x	-2,7	-1,4	3,6	-1,7	mesothelin
Mylk2				x	1,4	6,2	1,1	-2,5	myosin light chain kinase 2, skeletal muscle
Nf1		x		x	-1,6	-1,0	7,3	-2,1	Neurofibromatosis 1
Nid1	x				2,5	1,1	-1,0	1,1	nidogen 1
Pla2g6	x			x	2,2	1,3	-1,1	1,0	phospholipase A2, group VI
Ppp1r12b_predicted		x		x	1,8	6,0	-1,6	1,1	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B (predicted)
Prkcb1		x		x	1,7	-1,6	3,1	4,4	Protein kinase C, beta 1
Ptger4		x		x	-1,2	-1,2	-1,6	1,2	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
Rgs2		x		x	1,4	3,5	-1,4	1,2	regulator of G-protein signaling 2
Sat2_predicted				x	-3,5	1,3	1,3	-8,3	spermidine/spermine N1-acetyl transferase 2 (predicted)
Scarb1	x			x	1,8	1,1	1,1	1,0	scavenger receptor class B, member 1
Sdc2	x			x	-2,3	-1,5	4,2	1,2	syndecan 2
Serpinb2				x	-3,5	-5,2	1,0	-1,7	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2
Setbp1_predicted				x	1,1	-1,2	7,1	1,1	SET binding protein 1 (predicted)
Slc19a1	x			x	-1,8	-1,2	1,0	1,5	solute carrier family 19, member 1
Slc27a1	x			x	1,5	-1,1	1,0	-1,0	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1
Slc33a1	x			x	2,5	-1,3	1,3	1,7	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1
Smc4l1		x			1,1	-1,4	3,7	-1,3	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)
Srpx		x		x	-1,2	1,4	4,9	1,2	sushi-repeat-containing protein
Tgfb3	x			x	-1,2	1,3	-2,5	3,0	transforming growth factor, beta 3
Thrb				x	5,2	-1,2	-1,4	1,3	thyroid hormone receptor beta
Timp3				x	1,5	-1,1	-1,6	5,5	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)
Tjp1_predicted	x				2,7	-1,1	1,2	1,6	tight junction protein 1 (predicted)
Tpm1	x	x		x	-1,9	-2,1	3,0	1,3	tropomyosin 1, alpha
Ube1l_predicted				x	7,4	-1,9	-2,7	-2,5	ubiquitin-activating enzyme E1-like (predicted)
Usp13_predicted		x		x	2,0	-1,2	8,3	-1,7	ubiquitin specific protease 13 (isopeptidase T-3) (predicted)
Wnt5a				x	-1,5	-1,7	-1,6	8,7	Wingless-type MMTV integration site 5A

* Cldn1 ist auf dem Genchip mit zwei Probe-Sets repräsentiert und erscheint daher in dieser Liste zweifach

	BHS 2x	SAM 3x	div. 5x	RT-PCR	0,4 W/kg	1 W/kg	3 W/kg	8 W/kg	
GSM1800									
Abcc8	x			x	-1,5	2,4	-1,1	-1,3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
ACE2;TMEM27		x		x	-1,2	3,8	-1,4	-1,6	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2
ACTC1		x		x	1,3	-1,0	3,5	1,1	actin alpha cardiac 1
Adamts8_predicted	x				2,2	-2,5	1,5	1,4	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8 (predicted)
Agtr1a	x			x	-1,5	1,4	1,0	-1,3	angiotensin II receptor, type 1 (AT1A)
Aldh1a4			x	x	5,5	1,3	-1,7	-1,9	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A4
Asam			x	x	-5,1	-2,8	-2,6	1,0	adipocyte-specific adhesion molecule
ATP1B1		x		x	-1,7	3,9	-1,0	1,1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide
BCL3_hum_680611;LOC686871		x			-1,3	1,0	3,5	-1,1	B-cell leukemia/lymphoma 3 (predicted)
Bdkrb2			x	x	-2,1	-6,6	-1,3	-5,0	bradykinin receptor, beta 2
Bhlhb5_predicted			x		-1,8	-1,0	6,2	1,1	basic helix-loop-helix domain containing, class B5 (predicted)
CAMK2B		x		x	-1,4	2,3	-3,0	1,6	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta
Casp1	x			x	1,1	1,5	-1,4	-1,4	caspase 1
CASP4		x		x	-1,1	1,2	5,8	-1,1	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
Casr1 /// LOC365807			x	x	6,4	-1,6	-1,7	-2,1	calcium-sensing receptor like 1 /// similar to putative pheromone receptor V2R2
Catna1	(x)			x	1,4	-1,1	-1,4	-1,7	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1
Cfh			x	x	-1,7	7,1	1,2	-1,7	complement component factor H
Cldn1	x			x	-1,0	-1,2	2,3	-3,2	claudin 1
CLDN18_hum_315953		x			-1,4	-1,7	3,0	-2,1	similar to claudin-18A1.2
CNNM2		x		x	1,1	-1,1	5,2	1,0	Cyclin M2
Cntn3	x			x	3,4	-4,7	1,1	-1,7	contactin 3
Col5a3	x			x	-1,3	1,2	2,1	-2,2	procollagen, type V, alpha 3
Ece1	(x)			x	1,6	1,0	1,8	-1,2	endothelin converting enzyme 1
EPN1		x		x	-4,2	-1,7	2,9	-3,8	Epsin 1
HAAO		x		x	-1,0	1,2	3,0	1,2	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase
Hcn1			x	x	1,4	33,0	3,6	1,1	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1
Igf2r	x			x	-1,4	2,3	1,2	1,1	insulin-like growth factor 2 receptor
Il22ra2			x	x	5,0	1,4	-1,3	-1,0	interleukin 22 receptor, alpha 2
JUNDP2		x		x	1,1	-1,2	3,5	-1,2	Jun dimerization protein 2
KARS		x	x	x	-2,8	5,1	-2,4	1,4	lysyl-tRNA synthetase
KIFAP3		x			3,6	4,9	1,0	-1,2	Kinesin-associated protein 3 (predicted)
LOC498276			x		-1,9	1,7	7,5	1,8	Fc gamma receptor II beta

LOC499782			x		9,0	1,1	1,0	1,1	Similar to 60S ribosomal protein L12
MCF2L		x		x	3,7	-1,6	2,2	1,1	mcf.2 transforming sequence-like
Mmp2	(x)			x	-1,1	-1,2	1,4	1,7	matrix metalloproteinase 2
Msln			x	x	-1,5	5,6	1,4	1,2	mesothelin
MUSK		x		x	-1,1	-1,0	3,1	1,2	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase
Pbx1_predicted			x		1,0	-1,5	-1,9	6,7	pre-B-cell leukemia transcription factor 1 (predicted)
PGK1		x		x	-1,2	-2,2	4,5	-1,2	phosphoglycerate kinase 1
Pkp1_predicted	x				-1,5	-1,2	1,6	-1,3	plakophilin 1 (predicted)
PRRX1		x	x	x	1,1	-2,0	11,7	-2,1	Paired related homeobox 1
PRSS32		x			-1,2	3,0	-1,0	1,1	protease, serine, 32 (predicted)
PTGER2		x	x	x	-1,0	6,3	1,2	-1,9	Prostaglandin E receptor 2, subtype EP2
PTGER4		x		x	-1,0	-4,6	3,1	1,0	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
RELN		x	x	x	-1,3	-1,5	5,6	1,1	reelin
RGD1309718			x	x	-1,7	-1,7	5,3	1,3	Similar to sperm antigen HCMOGT-1
SDC2	x	x		x	-4,1	-5,4	2,4	5,8	syndecan 2
Serpib7			x	x	-2,2	-5,4	-1,3	-2,6	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 7
Slc19a1	x			x	1,3	-1,2	-1,8	-1,2	solute carrier family 19, member 1
Slc27a4	x				-1,0	-1,0	2,1	-1,4	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4
Slc33a1	x			x	-1,5	1,0	2,3	-2,3	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1
SLC6A9		x	x	x	-1,1	-1,1	5,7	-1,1	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
SLC7A3		x	x	x	-1,1	-1,2	5,5	-1,1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3
Sox6			x	x	-5,2	3,5	-3,4	-1,6	SRY-box containing gene 6
SPECC1_hum_303208		x	x		-1,7	-1,7	5,3	1,3	spectrin domain with coiled-coils 1 (human)
Svs7		x			-1,1	3,2	-1,5	1,1	seminal vesicle protein, secretion 7 (predicted)
Tgfb2	x			x	1,1	1,1	1,7	1,0	transforming growth factor, beta 2
TNS;TNS1_hum_301509		x			-1,1	3,5	1,2	1,4	Tensin, similar to human tensin1
TXNL1		x		x	2,7	-1,4	3,2	3,3	thioredoxin-like 1
Uap1_predicted		x	x		1,2	1,6	13,1	-2,9	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1 (predicted)
UBE1L		x			-1,6	1,4	-3,2	-1,9	ubiquitin-activating enzyme E1-like (predicted)
Usp8_predicted			x		-1,4	-5,3	-1,2	-2,5	Ubiquitin specific protease 8 (predicted)
Vcl_predicted	x				-1,7	1,0	1,6	-1,1	vinculin (predicted)
VSNL1		x	x	x	2,1	10,1	-1,4	-1,9	visinin-like 1
Wdr37_predicted			x		-5,8	-1,7	-1,4	1,1	WD repeat domain 37 (predicted)
ZDHHC23		x	x	x	-1,8	5,5	1,2	-1,4	zinc finger, DHHC domain containing 23
Zfx_predicted			x		-1,2	1,3	10,3	-2,9	Zinc finger protein X-linked (predicted)

9. Literaturstudie

Literaturstudie zum Forschungsvorhaben:

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

Universitätsklinik Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Projektleitung: Prof. Dr. med. Peter Young
Autor: Dr. rer. nat. Helmut Franke

Stand: Juni 2004

Inhalt

Einleitung	48
Zielsetzung.....	50
Ältere Arbeiten und Übersichtsartikel	51
Aktuelle Arbeiten	54
<i>L. Salford und B.R.R. Persson</i>	<i>54</i>
<i>D. Leszczynski</i>	<i>57</i>
<i>A. Schirmacher.....</i>	<i>59</i>
<i>G. Tsurita</i>	<i>60</i>
<i>J.W. Finnie</i>	<i>61</i>
<i>K.-A. Hossmann</i>	<i>62</i>
<i>J.C. Lin.....</i>	<i>63</i>
<i>H. Masuda.....</i>	<i>64</i>
<i>P. Aubineau.....</i>	<i>64</i>
Effekte von HF-EMF auf die Genexpression in Zellkulturen	66
Abschließende Betrachtung.....	68
Literatur	71

Einleitung

Die rasante Entwicklung des Mobilfunks hat nicht nur in der Öffentlichkeit sondern auch bei einigen Wissenschaftlern die Sorge geweckt, dass die dadurch bewirkte Exposition des Gehirns mit Mikrowellen zu gesundheitlichen Schädigungen führen könnte. Diese Befürchtungen wurden bestärkt durch experimentelle Beobachtungen, dass nach Exposition im thermischen und möglicherweise auch subthermischen Bereich Permeabilitätsstörungen der Blut-Hirn-Schranke auftreten können. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine hirnspezifische Gefäßschranke, die im Gegensatz zu den Blutgefäßen aller anderen Körperorgane den freien Übertritt von Proteinen aus dem Blut in das Gewebe verhindert. Ihre Aufgabe besteht somit in einer Trennung des Hirngewebes von Blutmilieu. So kann das empfindliche Nervensystem des Gehirns vor dem Einfluss neurotoxischer Verbindungen geschützt werden. Wichtiger aber noch ist die Aufrechterhaltung eines konstanten stofflichen Milieus im Gehirn, das den korrekten Ablauf der komplexen neurochemischen Vorgänge ermöglicht. Die zelluläre Basis der Blut-Hirn-Schranke bilden die Endothelzellen der cerebralen Kapillargefäße. Anatomisches Substrat der BHS sind sogenannte tight junctions, die die Endothelzellen der Hirnkapillaren miteinander verbinden und gleichzeitig versiegeln. Dadurch stellen sie sicher, dass der Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn über spezifische Transportprozesse geregelt wird, welche die Endothelzellen kontrollieren. Damit wird klar, dass nicht nur die Barrierefunktion der BHS eine zentrale Rolle für den Organismus spielt, sondern auch eben diese Transportsysteme einen essentiellen Beitrag zur Versorgung des Gehirns u.a. mit Nährstoffen leisten und so für dessen Funktion von entscheidender Wichtigkeit sind. Nichtsdestotrotz beschränkt sich der Fokus vieler Arbeiten häufig ausschließlich auf die passive Schrankenfunktion der BHS. Dies ist zwar aus methodischer Sicht teils pragmatisch und evtl. nicht zu umgehen, beleuchtet aber nur einen Teil des Problems.

In diesem Rahmen versuchen vielfältige Ansätze auf Basis epidemiologischer Untersuchungen, an Tiermodellen sowie auch an isolierten Geweben und Zellkulturen, einen bisher nicht zuverlässig nachgewiesenen, nichtthermischen Einfluss von EMF der Mobilfunktechnologie auf Funktionen biologischer Systeme aufzuklären. Die bisherigen Erkenntnisse werden in der Fachliteratur äußerst kontrovers diskutiert. Bisher ist allerdings kein reproduzierbarer experimenteller

Beweis für eine physiologische Veränderung aufgrund **nicht**thermischer Feldeinwirkungen geführt worden. Effekte im thermischen Bereich sind durchaus bekannt: Regionale Temperaturerhöhungen innerhalb des ZNS können Veränderungen der Membraneigenschaften hervorrufen, so eine Veränderung der Permeabilität oder der von membranständigen Enzymen und Transportern. So wird die Aktivität von Ornithin-Decarboxylase im Kapillarendothel über einen temperatursensitiven Calciueinstrom erhöht. Interessanterweise konnte eine Aktivierung der Ornithin-Decarboxylase nach EMF-Exposition gefunden werden [27,35]. Diese Aktivitätserhöhung führt zu einer reversiblen Permeabilitätserhöhung der BHS [21].

Zielsetzung

Diese Recherche soll einen Überblick über wissenschaftliche Fachpublikationen geben, die sich mit den Auswirkungen elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf die Blut-Hirn-Schranke auseinandersetzen. Als wissenschaftliche Fachpublikationen wurden dabei vorzugsweise solche aus sogenannten *peer-reviewed Journals* ausgewählt. Durch diesen Review-Prozess wird gewährleistet, dass die Beiträge einer kritischen wissenschaftlichen Begutachtung durch ausgewiesene Experten unterzogen und somit entsprechende Qualitätskriterien eingehalten wurden. Dem Laien sollte dabei aber klar sein, dass dies nicht die uneingeschränkte „Richtigkeit“ einer Arbeit verbürgt oder unumstößliche Fakten garantiert.

Als Literaturdatenbanken dienten eine eigene Kartei mit Fachpublikationen und Tagungsbeiträgen, die Datenbank Medline und die „WBLDB Database“ der RWTH-Aachen (<http://wbldb.femu.rwth-aachen.de>). Beiträge zu Tagungen sind teils als Zusammenfassungen (*abstracts*), teils vollständig im Internet abrufbar. Für die COST281-Workshops in Reisensburg *“The Blood-Brain Barrier (BBB) - Can it be influenced by RF-field interactions?”* und Helsinki *“Influence of RF Fields on the Expression of Stress Proteins”* unter <http://www.cost281.org/events.php>, sowie für die Jahrestagungen der BEMS (*Bioelectromagnetics Society*) unter <http://www.bioelectromagnetics.org>.

Entsprechend den im Rahmen der von uns geplanten Studie vorgesehenen Untersuchungen liegt der Schwerpunkt dieser Literaturstudie auf solchen Referenzen, die eine mögliche Beeinträchtigung der **BHS** durch **hochfrequente elektromagnetische Felder** (EMF), wie sie typisch für den Mobilfunk sind, thematisieren. Als Auswahlkriterium unerheblich war die Modulation des Feldes. So wurden sowohl Arbeiten mit verschiedenen Arten von gepulsten- (PW, *pulsed wave*) als auch ungepulsten Feldern (CW, *continuous wave*) berücksichtigt.

Suchkriterien waren daher Kombinationen der Schlagworte *Mikrowellen*, *elektromagnetische Strahlung/Felder*, *Mobilfunk* (beziehungsweise alle diesen Begriffen nahestehenden deutsch- oder englischsprachigen Bezeichnungen) mit den Begriffen *Blut-Hirn-Schranke* (BHS), *Schrankenpermeabilität / Schranken-Marker* und *Extravasation* (auch hier einschließlich der diesen Begriffen nahestehenden deutsch- und englischsprachigen Bezeichnungen).

Ergänzt wird diese Liste durch aktuelle Publikationen, die sich speziell mit der Beeinflussung der Genexpression bzw. –regulation an Zellkultursystemen befassen.

Ältere Arbeiten und Übersichtsartikel

Bereits seit etwa 30 Jahren widmen sich Forscher der Fragestellung, ob die Funktion der BHS durch hochfrequente EMF beeinträchtigt werden kann. Als wissenschaftlich geklärt gilt seit den ersten Arbeiten lediglich, dass eine deutliche Temperaturerhöhung im Gehirn zu einer Irritation der Schrankenfunktion führt. Ein Effekt, der in der Medizin auch bei fiebrigen Erkrankungen und in Folge eines Sonnenstichs bekannt ist. Die BHS wird dabei durchlässig für wasserlösliche Moleküle, welche im Blutkreislauf transportiert werden. Eine Großzahl von ihnen wird normalerweise von der BHS am unkontrollierten Übertritt ins Gehirn gehindert, wogegen die meisten lipidlöslichen Moleküle sich durch eine gute Hirngängigkeit auszeichnen.

Mehrere Übersichtsartikel („Reviews“), teils auch in deutscher Sprache geben einen Überblick über zu diesem Thema veröffentlichte Arbeiten. Stögbauer [46], Hossmann und Hermann [19,20], D’Andrea [6], Glaser [16] sowie Repacholi [40] fassen die Thematik zusammen und gehen z.T. über die auf die BHS fokussierte Fragestellung hinaus. Auch die schwedische Strahlenschutzkommission fasst aktuelle Arbeiten zum Thema zusammen, eine Stellungnahme der IEEE (*Institution of Electrical and Electronics Engineers*) vom Mai diesen Jahres stellt die Position dieser renommierten Organisation klar. Beide sind im Internet abrufbar unter:

www.ssi.se/english/EMF_exp_Eng_2003.pdf

www.iee.org/Policy/Areas/BioEffects/POSTAT02final.pdf.

Forschungsarbeiten, die sich mit der Auswirkung von EMF die Dichtigkeit die BHS befassen, sind bisher vorzugsweise als Tierexperiment, also in vivo durchgeführt worden. Einzelne Arbeiten befassen sich zwar mit in vitro Systemen, verwenden jedoch Zellkulturen, die für das Forschungsobjekt BHS keinerlei Relevanz besitzen, da sie aus völlig anderen Geweben, so zum Beispiel der Nabelschnur [23] gewonnen wurden. Daraus gezogene Rückschlüsse auf Interaktionen mit der BHS sind daher rein hypothetischer Natur. Interessant im Feld der in-vitro- Studien sind besonders zwei Arbeiten [44] [32], die Zellkulturen von Kapillarendothelzellen aus dem Gehirn als biologisches System verwenden. Diese Endothelzellen sind die zellulären

Bausteine der BHS und können daher exklusiv als in-vitro-Modell für die BHS eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der folgend zitierten Forschungsarbeiten lassen sich in drei Kategorien einordnen: solche die keinen Effekt von EMF auf die BHS berichten, die lediglich thermische Effekte beobachten und solche die Einflüsse auf die BHS einer nichtthermischen Wirkung zuordnen. Speziell in älteren Arbeiten benutzen Autoren allerdings mitunter Analyseverfahren, die einer heutigen wissenschaftlichen Überprüfung nicht mehr standhalten können. So wertete Frey [12] die Fluoreszenz einer Markersubstanz in Hirnschnitten mit bloßem Auge aus.

i) keine Effekte von EMF auf die BHS

Verschiedene Studien an feldexponierten Ratten zeigten keinerlei Belege für eine Permeabilitätserhöhung an der BHS. So die Untersuchungen von Gruenau [18] et al. für Saccharose (2,8 GHz; 1-40 W/kg), Ward et al. [51,52] für Saccharose und Inulin (2,45 GHz, 2-6 W/kg), Preston et al. [38,39] für Saccharose (2,45 GHz; 0,1-30 mW/cm²), Chang et al.[3] für Albumin (1 GHz, 2-200 mW/cm²) sowie Merrit et al. [29] für Mannitol (1,3 GHz, 2-75 mW/cm²), letztere sofern die Exposition nicht zu einer Temperaturerhöhung führte.

ii) thermische Effekte von EMF auf die BHS

Bei einigen Untersuchungen wurde die Bestrahlungsleistung so hoch gewählt, dass die beobachtete Permeabilitätserhöhung klar einer Temperaturerhöhung zu geordnet werden konnte. Viele davon untersuchten die Frequenz von 2450 MHz, die auch in Mikrowellenherden Verwendung findet und durch ihre intensive Wechselwirkung mit Wassermolekülen leicht zur Erwärmung von wasserhaltigem Gewebe führen kann.

Williams et al. 1994 bestrahlten Ratten bei einer Frequenz von 2,45 GHz (CW, 4-13 W/kg; 30-90 min.) und konnten eine Permeabilitätserhöhung für Saccharose dokumentieren. Die Permeabilität steigt dabei mit steigender SAR, was mit dem thermischen Einfluss der Strahlung begründet wird.

Sutton und Carrol [47] (2,45 GHz, 8,1 W/kg, CW) wiesen ebenfalls darauf hin, dass eine Erwärmung des Gehirns für die beobachtete erhöhte Proteinaufnahme verantwortlich ist.

Untersuchungen von Goldman [17](2,45 GHz, 240 W/kg), Lin und Lin [24,25], Neilly und Lin [31] Ohmoto [33] und Moriyama [30] (2,45 GHz, bis über 400 W/kg) die eine Permeabilitätszunahme beschreiben, sind eindeutig thermischen Effekten zuzuordnen. So auch die von Lange und Sedmak [22] beschriebene erhöhte Passage des JEV-Virus bei 2,45 GHz (CW, 24-98 W/kg) über die BHS von Mäusen.

iii) Athermische Effekte von EMF auf die BHS

Andere Arbeiten berichteten dagegen von Permeabilitätsänderungen, bei denen die Autoren eine Temperaturerhöhung als Ursache ausschließen. Albert und Kerns [1] beschreiben eine erhöhte Permeabilität für Meerrettichperoxidase nach Exposition von Hamstern (2,45 GHz, 2,5 W/kg) die aber innerhalb von 2 Stunden reversibel war. Oscar und Hawkins [34] (1,3 GHz; 3mW/cm²; CW und PW) beobachteten eine Permeabilitätserhöhung für Mannitol und Inulin, nicht aber für größere Dextran Moleküle. In einer weiteren Untersuchung mit Saccharose, einem ähnlich dem Mannitol sehr kleinen Molekül, als Permeabilitätsmarker konnte die Gruppe [18] diesen Effekt nicht mehr bestätigen.

Neubauer et al. [32] exponierten in ihrer Untersuchung Ratten für 30 min. bei 2 W/kg (Teilkörperexposition auf das Gehirn) und 2,45 GHz. Dadurch wurde die Permeabilität der BHS für einen Rhodamin-Ferritin-Komplex erhöht, die jedoch nach einer Vorbehandlung mit Colchicin nicht mehr nachzuweisen war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Pinocytose ähnlicher Mechanismus verantwortlich sein könnte. Schon nach 15 min. Exposition wurde eine messbare Aufnahme des Rhodamin-Ferritin-Komplex durch die Endothelzellen detektiert. Quantitativ fand sich ungefähr eine Verdopplung der Aufnahmerate. Zur Erklärung des Phänomens wurde eine Öffnung der *tight junctions* und somit ein erhöhter parazellulärer Durchtritt des Komplexes oder eine Pinocytose- Aktivierung, die zu einer Erleichterung des transzellulären Transportes führen könnte, postuliert. In weiter führenden Experimenten wurde der Einfluss von Colchicin auf die Komplexaufnahme untersucht. Colchicin, das Gift der Herbstzeitlosen, würde eine pinocytotische Aufnahme hemmen, was auch experimentell bestätigt wurde. Die Autoren folgerten daher, dass ein pinocytosischer Mechanismus als Angriffspunkt für die beobachtete Feldwirkung zu vermuten ist.

Dem widerspricht jedoch eine Untersuchung von Salford et al. [42] an Ratten die sie bei 915 MHz mit verschiedenen Modulationsfrequenzen (0,016-5 W/kg) exponierten. Dabei zeigte sich eine Permeabilitätserhöhung für Albumin, nicht aber für Fibrinogen. Albumin hat jedoch wesentlich geringeres Molekulargewicht als Fibrinogen. Da die Pinocytose jedoch nicht vom Molekulargewicht der transportierten Substanz abhängig ist, müsste auch Fibrinogen eine veränderte Permeation über die BHS zeigen. Eine Beteiligung der Pinocytose an den von Neubauer beschriebenen Effekten ist demzufolge wiederum unwahrscheinlich. Ohnehin zeichnen sich gerade die Endothelien der BHS durch eine prinzipiell sehr geringe pinocytotische Aktivität aus.

Aktuelle Arbeiten

Ausführlich besprochen werden hier aktuelle Arbeiten die etwa in den letzten zehn Jahren publiziert wurden und von denen zu Teilen auch große Notiz in der Öffentlichkeit genommen wurde. Inhalte dieser Publikationen wurden häufig in den Medien nur ungenau oder stark vereinfacht wiedergegeben, wodurch ein falscher Eindruck über die Ergebnisse gewonnen werden konnte. Zur besseren Übersicht sind sie nach den erstgenannten Autoren der entsprechenden Artikel sortiert.

L. Salford und B.R.R. Persson

Besondere Beachtung in der Öffentlichkeit fand in letzter Zeit die Studie einer Gruppe um den schwedischen Mediziner Salford [43]. In dieser Veröffentlichung wird der Einfluss von EMF des Mobilfunks auf die Ausbildung sogenannter „Dark Neurons“ (DN, dunkle Neurone) sowie von Leckstellen für Albumin im Gehirn beschrieben. In einer ausreichend hohen Konzentration würde durch solche Lecks austretendes Albumin eine toxische Wirkung im Gehirn haben. Untersucht wurden Fisher-Ratten, die einem Feld entsprechend dem GSM-Standard, bei einer Leistungsdichte von 0,24-2,4 W/m² in einer TEM-Zelle (*transverse electromagnetic transmission line cell*) exponiert wurden. Die Expositionsparameter wurden nicht exakt beschrieben, die Frequenz wird nicht angegeben, eine Dosimetrie ist ebenfalls nicht dokumentiert. Die Leistungen wurden mit 10, 100 und 1000 mW angegeben, daraus wurden numerisch die SAR bezogen auf das gesamte Tier auf 2 W/kg, 20 mW/kg und 200 mW/kg berechnet. Angaben über die Homogenität des Feldes in der TEM Zelle sowie die spezifische SAR bezogen auf das ZNS fehlen. Eine Temperaturkontrolle war nur marginal durchgeführt. Die Variation der SAR-Verteilung

wird mit 6 dB angegeben. Auch wenn dies auf den ersten Blick eine geringe Variationsbreite suggeriert, entspricht dies einer Schwankungsbreite um den Faktor vier. Eine hohe Schwankung bzgl. der SAR ist auch aufgrund der starken Streuung des Gewichts der Ratten zu erwarten. Bei der geringen Zahl untersuchter Ratten ist die Wahrscheinlichkeit einer ungleichmäßigen Verteilung leichter und schwerer Tiere zwischen exponierter und Kontrollgruppe recht groß. Die untersuchten DN werden in der Literatur als Manifestation vielfältiger Verletzungen von Neuronen, verursacht durch verschiedene Arten mechanischer und pathometabolischer Prozesse beschrieben [50]. Eine konkrete Ursache bleibt dabei unklar: (wörtlich zitiert) „*DN [...] are formed in such varied conditions that the cause(s) of their formation remains a mystery.*“ Gallyas et al. [15] beschreiben zahlreiche Ursachen für die Ausbildung von DN. Dabei ist weiterhin das Erscheinungsbild der DN unabhängig von deren Ursache. Selbst post mortem auftretende Erschütterungen des unfixierten Gehirns können für das Auftreten von DN verantwortlich sein; diese sind aber nicht von solchen DN zu unterscheiden, die bereits im lebenden Tier ausgebildet wurden.

Neben der möglichen Induktion der Entwicklung von DN durch die applizierte Mobilfunkstrahlung bestehen also grundsätzlich zahlreiche weitere Möglichkeiten, die als Ursache für die Ausbildung der DN in Frage kommen. Abgesehen von der post-mortalen Traumatisierung werden andere Ursachen von Salford und Kollegen aber weder in Betracht gezogen und diskutiert, noch durch entsprechende Kontrollversuche ausgeschlossen. Dass die Feldexposition als alleinige Ursache für die Ausbildung der DN verantwortlich ist bleibt zweifelhaft. Unverständlich erscheint, warum die Tiere nach der zweistündigen Bestrahlung erst nach Ablauf von weiteren 50 Tagen untersucht wurden. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass Vohra et al. [50] das Auftreten von DN als bisher nicht näher aufgeklärtes Altersphänomen beschreiben. So zeigen schon 6 Monate alte Ratten nahezu die doppelte Anzahl an DN im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren. Genau diese Altersdifferenz weisen die von Salford eingesetzten Ratten aber schon zu Beginn des Experiments auf.

Mit einer sehr geringen Individuenzahl von 32 untersuchten Tieren (davon je 8 in insgesamt 4 Gruppen) bewegt sich die Studie in einem Bereich, in dem die Berechnung der Signifikanz der Ergebnisse mit statistischen Methoden äußerst unsicher werden lässt. Die Auswertung der Ergebnisse ist lediglich beschreibend. Es wurde weder eine Quantifizierung der *Dark Neurons* noch des Albuminaustritts in das Gehirn

vorgenommen, sondern lediglich eine Rangeinteilung. Die Färbung für Albumin wird lediglich qualitativ beschrieben. Die Zuordnung in diese Ränge übernahm ein an der Untersuchung beteiligter Pathologe, der vorab nicht informiert war, welche der Tiere exponiert waren und welche nicht (verblindeter Aufbau). Es drängt sich die Frage auf, inwieweit diese Einteilung eine zuverlässige Zuordnung in die einzelnen Ränge darstellt und ob diese Beurteilung durch einen anderen Pathologen reproduzierbar wäre. In der Darstellung der Ergebnisse der Albumin-Färbungen stellt Salford heraus, dass die Färbung der Kontrollgruppe häufig eine zweifelhafte Positivreaktion zeigte. Demzufolge ist eine zuverlässige Zuordnung in die drei von ihm festgelegten Ränge zur Beurteilung der Albuminhistochemie offenbar nicht gegeben. („*Control animals showed either no or an occasional and often questionable positivity for albumin outside the hypothalamus*“).

Auch die in der Publikation gezeigten Abbildungen geben Anlass zur Kritik: In Abb. 1 vergleicht Salford Fotos von Hirnschnitten eines exponierten Tieres und eines aus der Kontrollgruppe. Betrachtet man die äußere Form der Hirschnitte fällt auf, dass diese offenbar nicht aus der gleichen Region des Rattenhirns stammen, was jedoch für einen qualitativen Vergleich wie er hier präsentiert wird zu verlangen wäre. Abb. 2 zeigt ausschließlich die Färbung der DN bei feldexponierten Ratten. Die Abbildung einer Negativkontrolle fehlt. Welcher Strahlungsleistung diese Aufnahmen zuzuordnen sind, wird in beiden Abbildungen nicht angegeben.

Für eine wissenschaftliche Publikation ist auffällig, dass Salford et al. in der Diskussion ihrer Ergebnisse keine weiteren Referenzen zitieren, die ihre Ergebnisse untermauern könnten. Auch mit Untersuchungen, die frühere Ergebnisse ihrer Arbeitsgruppe nicht reproduzieren konnten, setzen sich die Autoren nicht auseinander. Hier wird unter anderem die Hypothese einer sekundären Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, welche durch den Austritt des Albumins verursacht werden soll, nicht näher erläutert oder begründet und bleibt unverständlich. Besonders die Feststellung, dass 12-26 Wochen alte Ratten besonders gut mit dem Entwicklungsstand von mobilfunksüchtigen menschlichen Teenagern zu vergleichen sind, erscheint fragwürdig.

Sehr kritisch wurde die Expositionseinrichtung der Salford-Gruppe auf dem COST281 Workshop in Reisenburg beurteilt. Die Workshop-Teilnehmer bemängelten die unklare Dosimetrie bei der Exposition in TEM-Zellen, deren Dimensionen im Vergleich zur Größe der Versuchstiere relativ klein bemessen

waren. Es ist nicht auszuschließen, dass die Tiere die Seitenwände der TEM-Zelle während des Experiments berührten

Die Extravasation von Albumin, wie sie von Salford und Kollegen beschrieben wird, ist Gegenstand einer aktuellen Untersuchung des U.S. Air Force Research Laboratory, in Brooks, Texas, USA und soll der Reproduzierung der Ergebnisse der schwedischen Gruppe dienen. Darüber berichtete Stefanie Miller ebenfalls auf dem Reizensburg-Workshop. Die Ergebnisse hierzu liegen allerdings noch nicht vor.

Schwerwiegende methodische Mängel an den Arbeiten von Salford und Kollegen erkennt auch die IEEE (position statement - May 2004) und die Schwedische Strahlenschutzkommission (siehe auch o.g. *links* im Internet).

D. Leszczynski

In einer Arbeit aus dem Jahr 2002 befassen sich Leszczynski et al. [23] mit der Fragestellung des Einflusses von EMF auf die Genexpression, z.B. der BHS. Diese Untersuchungen sind in diesem Abschnitt mit aktuellen, weiterführenden Daten die Leszczynski auf dem Reizensburg-Workshop (2003) präsentierte ergänzt.

Der Titel seiner Publikation „*Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects*“ impliziert zunächst, dass hier auf molekularer Ebene ein Mechanismus gezeigt werden konnte, auf dem die Blut-Hirn-Schranke (BHS) durch Einwirkung von Mobilfunkstrahlung beschädigt wird. Dies wurde bereits intensiv in den Medien (BBC, Bild der Wissenschaft) diskutiert und in dieser Weise missinterpretiert. Tatsächlich beschränkt sich Leszczynski in seinen Ausführungen jedoch ausschließlich auf Hypothesen und Postulierungen über den Einfluss der beobachteten Effekte auf die Blut-Hirn-Schranke. Es handelt sich bei den vom ihm verwendeten *EA.hy926* nicht um Zellen, welche die BHS repräsentieren, sondern um Endothelzellkulturen aus der Nabelschnur. Die Morphologie, also das äußere Erscheinungsbild der Zellen auf den von ihm präsentierten Photos, hat keinerlei Ähnlichkeit mit der typischen Spindelform von BHS-Endothelzellen. Auf die wichtige Eigenschaft der Schrankenbildung durch sogenannte "*tight junctions*" geht die Arbeit nicht ein.

Bei Exposition (GSM 900; 2W/kg; 1h) mit Mobilfunkstrahlung findet Leszczynski unter nichtthermischen Bedingungen eine Steigerung der Phosphorylierung des Hitzeschockproteins 27 (*hsp27*) und eine erhöhte Expression der Proteine *hsp27* und

p38-map-kinase. Bei einem Screening wurden mittels 2D-Gelelektrophorese und Westernblots über 1200 verschiedene Signale erhalten. 372 Phosphoproteine zeigten einen Phosphorylierungsgrad der nach Mobilfunkbestrahlung verändert war, 324 Phosphoproteine konnten ausschließlich in den exponierten Zellkulturen nachgewiesen werden. Von diesen konnte er bisher das oben genannte *hsp27* durch MADLI-TOF-MS Analyse und Western Blotting identifizieren. Mittels der Immunopräzipitation von ³²P-markiertem *hsp27* wurde eine SAR-Dosis abhängige Steigerung der Expression und Phosphorylierung von *hsp27* nachgewiesen, die 1 h, aber nicht mehr 2 h nach der Exposition detektierbar war. Die Phosphorylierung von *hsp27* erfolgt durch p38 MAP-Kinase, die ebenfalls eine erhöhte Expression und Phosphorylierung 1 h nach Exposition aufwies, jedoch nicht mehr 2 h nach Exposition. Der Einsatz eines p38 MAP-Kinase-Inhibitors konnte die Steigerung der Phosphorylierung von *hsp27* 1 h nach Exposition verhindern. In seiner dephosphorylierten Form liegt *hsp27* hauptsächlich als Oligomer vor und fungiert als Chaperon. Nach der Phosphorylierung wird es vorzugsweise in seine monomere Form überführt, in der es neben der Apoptose und Transkription auch das Cytoskelett beeinflussen kann, indem es Aktin-Stressfasern stabilisiert. Dementsprechend wurden immunocytochemische und durchflusscytometrische Analysen des zellulären Aktin-Cytoskeletts vor und nach Exposition durchgeführt. Sie zeigten eine gemeinsame Lokalisation von *hsp27* und Aktin sowie eine Zunahme der Aktin-Stressfasern 1 h und auch noch 2 h nach Exposition, inhibierbar durch einen p38 MAP-Kinase-Inhibitor. Hieraus wurde geschlossen, dass aktives, durch p38 MAP-Kinase phosphoryliertes *hsp27* die Stabilität von Aktin-Stressfasern reguliere. Untersuchungen an Zell-Linien, die mutiertes oder Wildtyp-*hsp27* exprimieren, unterstützten diese Auffassung. Daher wurde die Hypothese formuliert, dass stabilisierte Aktin-Stressfasern, die hauptsächlich am Rand der Zelle lokalisiert sind, ein Schrumpfen der Zellen induzieren könnten, welches eventuell von möglichen Veränderungen der BHS gefolgt sein könnte.

Ein Zusammenhang dieser Beobachtung mit einer Schädigung der Barrierefunktion der BHS wird allerdings bisher nur als eine mögliche Interaktion vermutet. Auf eine Eignung der *EA.hy926* Zellkultur als Modell für die BHS geht diese Arbeit nicht ein. Im Rahmen von Tagungsbeiträgen stellte Leszczynski allerdings auch klar, dass die ausgewählten Zellkulturen lediglich aufgrund ihrer einfachen Verfügbarkeit zur Etablierung des Messaufbaus und des Analysesystems dienten. Weitere

Experimente mit Endothelzellen der BHS, welche aber deutlich schwieriger zu Handhaben sind, sollen später folgen. Eine neue Faktenlage bringt die Arbeit daher bezüglich der Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke durch elektromagnetische Felder nicht.

In Diskussionen zu seinen Arbeiten betonte Leszczynski, dass ein auf *proteomics* oder *genomics* basierender Forschungsansatz, keinerlei Abschätzung möglicher gesundheitlicher Risiken erlaube. Er sieht einen solchen Forschungsansatz jedoch als geeignet an zur Identifikation von Zielstrukturen, die als Endpunkte nachfolgender Studien zum Gesundheitsrisiko eingesetzt werden könnten. Weiterhin seien sie notwendig, sofern eine vollständige Charakterisierung aller möglichen Strahlungseinflüsse erfolgen soll.

In einer kürzlich auf dem Workshop "*Influence of RF Fields on the Expression of Stress Proteins*" in Helsinki vorgestellten Untersuchung präsentierte Poullétier de Gannes (PIOM/Bioelectromagnetics laboratory, Pessac, Frankreich) vorläufige Ergebnisse einer Reproduktionsstudie zur hsp-Induktion mit verschiedenen Zellkulturen, u.a. den auch von Leszczynski verwendeten *EA.hy926* Endothelien. Ihre Ergebnisse konnten jedoch in allen untersuchten Zellkulturen keine statistisch signifikante hsp-Induktion bestätigen.

A. Schirmacher

Schirmacher et al. [44] verwandten ein in vitro System der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bestehend aus Endothelzellen porciner Hirnkapillaren und Astrocyten neugeborener Ratten. Dies Modell ist in der Literatur vielfach beschrieben und wird allgemein als valide anerkannt [7]. Exponiert wurde in einem Hohlleiter nach dem GSM1800-Standard (1800MHz, gepulst mit einer Repetitionsrate von 217 Hz und einer Pulsdauer von 0,577 ms). Die SAR wurde numerisch kalkuliert und mit 0,3 W/kg angegeben. Durch eine Temperaturkontrolle wurden athermische Bedingungen garantiert. Die Integrität der BHS wurde mittels der Permeabilität für ¹⁴C-Saccharose überprüft. Die Exposition dauerte 4 Tage, direkt im Anschluss wurde die spezifische Permeabilität gemessen. Eine Positivkontrolle findet sich nicht.

Die Autoren finden eine über die Beobachtungszeit zunehmende, statistisch signifikante Permeabilitätszunahme der BHS für Saccharose um den Faktor 2 bezogen auf die Kontrollen (Tag 2: p=0,002; Tag 4: p<0.001). Dies ist als Hinweis auf eine Alteration der BHS durch die Exposition zu bewerten.

Die Studie ist methodisch aufwändig, dennoch sorgfältig durchgeführt. Da ein *in-vitro*- Ansatz gewählt wurde, sind die dem *in vivo* Experiment immanenten methodischen Probleme wie Stress durch Immobilisation nicht vorhanden. Die Übertragung auf die Risikosituation eines gesamten Organismus ist jedoch nicht ohne weiteres gegeben. Darüber hinaus ist festzustellen, dass die gefundene Permeabilitätserhöhung um den Faktor 2 als marginal anzusehen ist im Vergleich zu Positivkontrollen wie Hitzeexposition, die die Permeabilität der BHS in *in-vitro*-Systemen um mindestens das 100fache steigert (eigene, nicht publizierte Untersuchungen). Somit ist der gefundene Effekt als mit höchster Wahrscheinlichkeit biologisch irrelevant zu bewerten.

Eigene Untersuchungen mit einem optimierten BHS-Modell [10,11] konnten die von Schirmacher et al. beobachteten Effekte nicht reproduzieren. (Die Daten befinden sich im Publikationsprozess).

G. Tsurita

In der Arbeit von Tsurita et al. [49] wurden erwachsene, männliche und nicht anästhesierte Sprague-Dawley Ratten in einem Rondell exponiert. Die Expositionsbedingungen sind exakt angegeben (1439 MHz TDMA entsprechend dem japanischen Mobilfunkstandard). Die SAR – bezogen auf das Gehirn – wird mit 2 W/kg angegeben, wobei die diesbezügliche Methodik nicht eingegangen wird, jedoch auf eine entsprechende frühere Beschreibung verwiesen wird [2]. Temperaturmessungen wurden nicht durchgeführt. Die Tiere waren in der Expositionseinrichtung fixiert, eine Gewöhnung an diese Situation wurde nicht durchgeführt. Es wurde über 2 oder 4 Wochen exponiert (jeweils 60 min/Tag und 5 Tage/Woche), und direkt im Anschluss die Integrität der BHS mittels Nachweis des Übertritts von Evans blue (noch intravital peripher injiziert) in das ZNS oder immunhistologischer Detektion von Serumalbumin im ZNS überprüft. Als Positivkontrollen dienten Hitze- und Kälte-Läsionen. Das methodische Vorgehen ist als reliabel anzusehen und erlaubt eine Reproduktion. Als einziger Kritikpunkt ist anzumerken, dass eine Gewöhnung der Versuchstiere an den Immobilisationsstress nicht durchgeführt wurde. (Kritikpunkt. Tierzahl s.o.). Dies wird von einer Reihe von Autoren gefordert, um Missinterpretationen der erhaltenen Daten vorzubeugen [45]. Zu kritisieren ist auch in dieser Arbeit die geringe Anzahl der verwendeten Tiere. Je Versuchsgruppe wurden lediglich sechs Tiere eingesetzt. Eine statistische Evaluierung der Signifikanz der Daten ist daher kaum möglich. Die Autoren finden

bezüglich der eingesetzten Methoden keine Veränderungen in der Permeabilität der BHS in Kontrollen oder exponierten Tieren zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Numerische Signifikanzen werden nicht angegeben. Lediglich in der Positivkontrolle, in der mittels Exposition mit einer SAR von 20 W/kg thermische Effekte ausgelöst wurden, konnte an wenigen Stellen des ZNS perikapillär Albumin nachgewiesen werden, was unter diesen Bedingungen auf eine Alteration der BHS hinweist. Zusammenfassend wurde in dieser methodisch sauberen Studie kein Hinweis für eine Alteration der BHS unter athermischer Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (EMF) des japanischen Mobilfunkstandards gefunden.

J.W. Finnie

Die Arbeiten von Finnie et al. aus den Jahren 2001 und 2002 [8,9] beruhen auf einer identischen Methodik und werden daher zusammenhängend besprochen. Beide Studien entspringen einer größer angelegten Replikationsstudie zur Karzinogenese unter Exposition mit EMF [41]. Es wurden weibliche, adulte C57BL Mäuse verwendet, die während der Exposition nicht anästhesiert waren. Der Expositionsaufbau bestand aus einem Rondell mit einer mittelständigen Dipolantenne, vergleichbar mit [49]. Die Tiere waren ebenfalls fixiert, eine Habituation wurde nicht durchgeführt. Die Temperatur wurde kontrolliert. Exponiert wurde mit einem GSM Signal (898,4 MHz, gepulst mit einer Repetitionsrate von 217 Hz und einer Pulsdauer von 0,6 ms) bei einer SAR von 4 W/kg [9] und 0,25, 1, 2, 4 W/kg [8]. Die SAR wurden dosimetrisch bestimmt. Positivkontrollen wurden nach Gabe des Toxins von *Clostridium perfringens*, das zu einer schweren Alteration der BHS führt, durchgeführt. Die Expositionsdauer betrug in der ersten Arbeit [9] 60 min., danach wurden die Gehirne der Tiere direkt für die Immunhistochemie fixiert. In der folgenden Arbeit [8] wurde über 2 Jahre an 5 Tagen/Woche über 60 min. exponiert. Am Ende der 2jährigen Versuchsdauer wurde wie o.a. verfahren, wobei nur Tiere verwendet wurden, die keine ZNS-Tumore oder andere pathologische Veränderungen aufwiesen. Als Marker der Integrität der BHS wurde der immunhistochemische Nachweis von Serumalbumin im ZNS gewählt.

In der Arbeit aus 2001 [9] konnten sowohl in den Kontrollen wie auch in den exponierten Tieren eine sehr geringe Anzahl (1-4) von Blutgefäßen gefunden werden, die eine Extravasation von Albumin aufwiesen. Prädominant waren diese Befunde in der Leptomenix, deren Gefäße jedoch keine BHS ausbilden. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden nicht ($p=0,739$). Die darauf folgende

Langzeitstudie [8] erbrachte ebenfalls keine Hinweise auf eine Disruption der BHS, auch konnte keine Dosisabhängigkeit gefunden werden. Eine diesbezügliche statistische Auswertung wurde nicht angegeben, aus den angegebenen Werten lässt sich jedoch berechnen, dass bzgl. der Albumin Extravasation in allen Dosisgruppen keine signifikant unterschiedlichen Werte vorliegen (0,25 W/kg; $p=0,150$; 1 W/kg: $p=0,620$; 2W/kg: $p=0,056$; 4 W/kg: $p=0,272$).

Zusammenfassend sind beide Studien als methodisch gut durchgeführt zu bewerten mit der Einschränkung, dass in der Arbeit aus 2002 [8] ein gewisser Selektionsbias vorliegt, da nur solche Tiere aus der zugrunde liegenden Karzinogenesestudie ausgewertet wurden, die nach Ablauf von 2 Jahren keine ZNS-Tumoren aufwiesen. Hervorzuheben ist, dass durch den Vergleich mit nicht immobilisierten Tieren der Einfluss von Immobilisationsstress weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Hinweise auf eine Alteration der BHS unter Befelderung mit EMF wurden nicht gefunden.

K.-A. Hossmann

In einer Studie der Gruppe um K.-A. Hossmann [13] wurden immobilisierte Ratten über 4 Stunden Mobilfunkstrahlung (GSM 900 MHz, spezifische Absorptionsrate (SAR) 0.3-1.5 W/kg in Puls-modulierter Form (PW) oder bei 7.5 W/kg als continuous wave (CW)) ausgesetzt. Jeweils 1 und 7 Tage nach Exposition wurde das Austreten von Serumalbumin aus Blutgefäßen durch immunhistochemische Färbung von Hirnschnitten untersucht.

Zusätzlich zum Vergleich bestrahlter und unbestrahlter Tiere dient hier als Positivkontrolle eine Öffnung der BHS nach einer Kälte-Läsion. Die Färbereaktion an der geöffneten BHS überdeckte größere Teile einer Hirnhälfte, wogegen der bei Bestrahlten, wie auch bei Kontrolltieren vereinzelt beobachtete Austritt von Albumin in Form kleiner Punkte in Hirnschnitten zu erkennen war. Durch Auszählen dieser Punkte wurde der Albuminaustritt in das Hirngewebe quantifiziert. Eine statistisch signifikante Zunahme von Albumin-Punkten im Vergleich zu scheinexponierten Kontrollen wurde lediglich bei einer SAR von 7,5 W/kg (CW) detektiert, aber die physiologische Relevanz dieser Zunahme wurde als fehlend erachtet. Des weiteren zeigte sich dieser Versuchsserie einen Einfluss der Immobilisierung der Tiere auf das Versuchsergebnis. Die Extravasation von Serum-Albumin konnte auch in nichtexponierten Tieren der Kontrollgruppe beobachtet werden.

In einer weiteren Arbeit [14] berichtete Hossmann auch über Einflüsse von EMF auf die Genexpression. Bei der höchsten getesteten Strahlungsintensität von 7,5 W/kg konnte er mittels *in situ* Hybridisierung eine geringe Induktion der mRNA von hsp70 im Kleinhirn und Hippocampus von exponierten Tieren detektieren. Des Weiteren beobachtete er eine Erhöhung der C-fos mRNA, jedoch nicht von C-jun und GFAP (Gliazellenmarker: *glial fibrillary acidic protein*). Eine immunocytochemische Anfärbung von FOS, JUN oder KROX Proteinen sowie hsp70 konnte nach 24-stündiger Exposition keine Veränderungen zeigen. Auch nach 7-tägiger Exposition waren keine Änderungen in der Zellproliferationsrate und der Expression von Gliamarkerproteinen zu verzeichnen. Er folgert, dass bei derart hoher Intensität leichte, akute Störungen der BHS möglich sind, die mit einer Stressreaktion der Tier einhergehen. Eine dauerhafte Schädigung ist dennoch nicht zu erwarten.

Qualitativ erscheinen Hossmanns Daten bezüglich einer Albumin Extravasion nicht grundsätzlich von denen der Salford Gruppe abzuweichen. Beide Studien zeigen ein gelegentliches Auftreten von Punkten in Hirngewebschnitten bei denen das Albumin mittels einer Färbereaktion sichtbar gemacht wurde. Hossmann liefert jedoch eine genau konträre Interpretation und kann diese anhand der von ihm durchgeführten Quantifizierung der Befunde, sowie der dargestellten Positivkontrollen gut untermauern.

J.C. Lin

Im Kontext einer Schädigung der BHS durch elektromagnetische Felder werden oft Arbeiten von Lin (Chicago, USA) zitiert, der eine erhöhte Permeabilität der BHS nach Bestrahlung mit Mikrowellen nachweisen konnte. Im Gegensatz zu vielen Anderen weist Lin in seinen Studien aber deutlich darauf hin, dass die von ihm beobachteten Effekte ihre Ursache in einer mikrowelleninduzierten Erwärmung des Gewebes haben. In einer Publikation aus 1998 [26] beschreibt er die selektive Exposition einer Hirnhälfte von anästhesierten Ratten bei 2,45 GHz (2,6 W/cm², 208 W/kg, CW). Die bis zu 20 min. andauernde Bestrahlung führte zu einer Erhöhung der Permeabilität der BHS für das Cytostatikum Methotrexat. Während in der exponierten Gehirnhälfte eine Temperaturerhöhung auf 42,7 °C gemessen wurde, stieg die Rektal gemessene Körpertemperatur während der Exposition um weniger als 0,5 °C auf 37,8 °C. Die Permeabilitätserhöhung der BHS war innerhalb von 45 min reversibel und wurde in einem Tagungsbeitrag (Reisensburg, 2003) in ähnlichem Umfang für ein gepulstes Feld (2,45 GHz, 240 W/kg) beschrieben.

H. Masuda

Hiroshi Masuda aus der Arbeitsgruppe von Ohkubo aus Tokio stellte seine Arbeiten bisher im Rahmen von Vorträgen auf verschiedenen Fachtagungen vor (BEMS Jahrestagungen 2001-2003, Reisenburg-Workshop). Mit Hilfe der sogenannten intravitalem Mikroskopie wurden Filmsequenzen vom Blutfluss im Rattenhirn aufgenommen. Die Ratten wurden dazu operativ mit einem kleinen Fenster in der Schädeldecke versehen und die so präparierten Tiere für 3 x 10 Minuten einem elektromagnetischen 1439 MHz TDMA (time division multiple access)-Signal für ein PDC-System (Personal Digital Cellular, japanischer Mobilfunkstandard) mit SAR von 0.6-4.8 W/kg bezogen auf die Hirnmasse ausgesetzt. Daraufhin wurde der Austritt von Fluorescein und FITC-markiertem Albumin aus den Blutgefäßen, das Verhalten von Leukocyten sowie der Gefäßdurchmesser mittels intravitalem Mikroskopie untersucht. Keiner dieser Parameter wies nach der Exposition Veränderungen auf. Selbst nach 2-stündiger Exposition bei 35 W/kg konnte kein Durchtritt von Evans Blue, FITC-Albumin und endogenen Immunglobulinen durch die BHS beobachtet werden. Die sowohl faszinierende also auch sorgfältig durchgeführte Videotechnik konnte in ihrer Auswertung überzeugen. Zweifel kamen in der Diskussion lediglich auf, ob die Eindringtiefe dieser Technologie wirklich auch Kapillaren der BHS abbildet oder hauptsächlich periphere Gefäße ohne BHS-Phänotyp beobachtet wurden.

P. Aubineau

Ebenfalls auf dem Reisenburg Workshop präsentierte Aubineau (Bordeaux, F) Ergebnisse von Experimenten zur Albumin Extravasation (siehe auch [48]). In den Experimenten wurden immobilisierte Ratten für bis zu 2 Stunden elektromagnetischer Strahlung (GSM 900 MHz, SAR 0.2-3 W/kg) ausgesetzt. Albumin Extravasation wurde an der *Dura mater* und an der BHS durch qualitative Analyse ausgetretenen Albumins in Hirnschnitten untersucht. Eine Quantifizierung der Signale (Punkte) erfolgte nicht. Als Positivkontrolle diente wie bei Miller (s.o.) der hyperosmotische Schock. Nach der Exposition wurde ein verstärkter Austritt von Albumin an der Dura mater und an der BHS beobachtet. Obwohl das Signal des die BHS passierenden Albumins noch durch Immunfärbungen mit Antikörpern verstärkt wurde konnte er eine starke Anfärbung, wie er sie im Vortrag präsentierte nur in wenigen ausgewählten Hirnschnitten finden. In Anbetracht der geringen Anzahl an

Evidenzen die Aubineau zeigen konnte bleibt fraglich, ob seine Beobachtungen wissenschaftlich reproduzierbar sind und falls ja, ob eine derart geringe Albumin Extravasion eine pathophysiologische Relevanz besitzt.

Effekte von HF-EMF auf die Genexpression in Zellkulturen

Bisher sind in der Literatur keine Untersuchungen bekannt, die sich der Genexpression von BHS-Zellkulturmodellen unter EMF Einfluss widmen. Daher sollen hier exemplarisch aktuelle Arbeiten einiger Arbeitsgruppen aufgeführt werden, die sich speziell mit dem Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Expression von mRNA an Zellkulturen befassen, die allerdings nicht die BHS repräsentieren.

Czyz et al. [4] beschreiben in ihrer Arbeit den Einfluss von EMF nach dem GSM 1800 Standard auf pluripotente embryonale Stammzellen in vitro. Sie vergleichen die Auswirkung auf den Wildtyp sowie auf Tumor Suppressor p53 defiziente (R1 ES p53^{-/-}) Zellen. Thermische Einflüsse sind durch in die Expositionsapparatur integrierte Kühlungssysteme auszuschließen. Bei einer Leistung von 1,5-2 W/kg und einer Expositionsdauer von 6 bzw. 48h konnte eine erhöhte Konzentration an mRNA für das Hitzeschockprotein hsp70 lediglich in p53 defizienten Stammzellen nach 48-stündiger Exposition nachgewiesen werden. In Einzelfällen wurde, ebenfalls nur in p53^{-/-} Zellen, eine schwache transiente Erhöhung von C-jun, C-myc und p21 beobachtet. Die Erhöhung des hsp70 Spiegels war lediglich bei einer Modulation von 217 Hz zu beobachten. Andere Modulationen, wie sie während einer Gesprächssituation auftreten (GSM-talk) hatten keine erhöhte mRNA Konzentration zur Folge. Die zusätzlich untersuchte Differenzierung der R1 ES Zellen in Herzmuskelzellen und deren Genexpression wies in keinem der gewählten Versuchschemata einen Expositionseffekt auf. Aus den vorliegenden Daten ist nach Einschätzung Gruppe um Czyz ein Schädigung gesunder Zellen mit intakten Reparaturmechanismen eher unwahrscheinlich. Ähnliche Ergebnisse beschrieb dieselbe Gruppe [5] unter Einfluss von 50 Hz EMF des elektrischen Stromnetzes. Auch hier wurden Effekte jeweils nur in p53 defizienten Zellen, nicht aber im Wildtyp beobachtet.

In ihren Untersuchungen der humanen promyelocytische Leukämie-Zelllinie HL60 mittels Arrays zur differentiellen Expression von insgesamt 1176 Genen nach Exposition bei 400 MHz, 50 kV/m (entspricht dem 50-fachen des von der ICNIRP empfohlenen Grenzwerts) bei einer Pulsung von 1 Hz beschreiben Port et al. [37] eine marginale Veränderung der Genexpression nur für 0,2 % der untersuchten Gene. Diese Änderungen lagen jedoch ausschließlich im Bereich der Fehlertoleranz

und waren nicht signifikant. Veränderungen des Expressionsmusters wurden außerdem jeweils nur in einzelnen Experimenten gefunden und konnten nicht reproduziert werden. Weiterhin wurden keine Änderungen der Zellvitalität sowie der Quantitäten von Mikronuklei und abnormaler Zellen beobachtet.

Yao et al. [53] untersuchten den Einfluss von Mikrowellenstrahlung (2,45 GHz) auf Kulturen des Linsenepithels von Kaninchen. Diese wurden bei Leistungsdichten von 0,1-2 mW/cm² über 8 h exponiert. Beobachtet wurden Änderungen der Morphologie sowie eine reduzierte Viabilität ab einer Leistung von 0,5 mW/cm². Ebenfalls oberhalb dieser Leistungsdichte wurde eine vermehrte Arretierung in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus sowie eine verminderte Anzahl an Zellen in der S-Phase und somit eine verminderte Proliferation gezeigt. Die Expression von P21^{WAF1} und P27^{Kip1} (Mitglieder der Familie der CKIs ‚cyclin dependent kinase inhibitors‘) welche per RT-PCR untersucht wurde, zeigte keine Veränderungen auf der mRNA-Ebene, obwohl eine signifikante Erhöhung des Proteingehalts von P27^{Kip1} nachgewiesen werden konnte. Diese soll für die oben erwähnte Proliferationsinhibierung verantwortlich sein. Marinelli et al. [28] legen den Fokus ihrer Studie ebenfalls auf die Regulation des Zellzyklus. Sie exponieren T-lymphoblastoide Leukämie Zellen (CCRF-CEM) mit einem ungepulsten Feld von 900 MHz, bei 3 V/m und einer Leistungsdichte von 24 mW/m² über einen Zeitraum von 2-48 h. Dabei beobachten sie im Gegensatz zur o.g. Studie von Yao et al. eine Reduktion der Zellen in der G₀/G₁ Phase bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Zellzahl in der S-Phase. Die Untersuchung der Genexpression einiger für den Zellzyklus relevanter Gene zeigte einen initialen Anstieg von p53, p73, P21^{WAF1} sowie des pro-apoptotischen Gens *bax* die nach 48-stündiger Expositionsdauer jedoch wieder auf ihre ursprüngliche Expression zurückfielen. Die mRNA Konzentration des *bax* Antagonisten Bcl-2 sowie von pRb/p105 und E2F1 (zuständig für eine Proliferationsinhibierung) stieg kontinuierlich und hatte nach 48 Stunden ein maximales Level erreicht hatte. Entsprechend der anfangs hochregulierten *bax* Expression wurde nach 2-stündiger Exposition eine mehr als 4-fach erhöhte Apoptose der CCRF-CEM beobachtet. Ein thermischer Effekt ist den Autoren zufolge auszuschließen.

Abschließende Betrachtung

Die bisher publizierten Forschungsarbeiten zum Einfluss von EMF auf die BHS ergeben ein sehr uneinheitliches Bild. Eine wissenschaftlich haltbare Klärung, ob Felder der Mobilfunktechnologie für den Menschen, in diesem Falle die Funktion Blut-Hirn-Schranke des Menschen schädlich sein können, liefern sie bislang nicht.

Im Rahmen der Risikoabschätzung darf jedoch nicht vergessen werden, die biologische bzw. pathologische Relevanz von messbaren Veränderungen zu evaluieren. Der Mensch unterliegt sehr komplizierten biochemischen Regelmechanismen, die in großer Zahl auf externe Einwirkungen reagieren und so dazu beitragen, Schaden vom Organismus abzuwenden. Beispielsweise beschreiben zahlreiche Arbeiten Änderungen in der Expression von Hitzeschockproteinen als Folge einer Exposition mit hochfrequenten EMF. Zwar befassen sich die meisten nicht direkt mit der BHS, dennoch wird eine breite Vielfalt in vivo untersuchter Spezies wie auch verschiedene Zellkulturen untersucht. Zunächst ist eine erhöhte Expression dieser Proteine jedoch nur eine Reaktion auf einen externen Stimulus, der ein biologisches System im Gleichgewicht hält und nicht als Schädigung überinterpretiert werden darf. Im Beispiel der *hsp* wäre unerlässlich zu wissen, welcher Größenordnung einer Expressionsänderung es bedarf, damit ein negativer Effekt auf das untersuchte biologische System als nachgewiesen gelten kann. Auch die weiter oben genannte Leckage von Albumin in das Gehirn bedarf, um als Kriterium für eine pathologische Veränderung gelten zu können, einer Quantifizierung und einer entsprechenden Einordnung in ein System, welches der Quantität des Austritts eine Schädigungsintensität zuordnen kann. Fragwürdig bleibt, warum viele Experimentatoren [8,9,13,36,42,43,49] endogenes Albumin als Markersubstanz untersuchen und nicht von außen zugegebene Tracer. Substanzen die nicht natürlicherweise im Körpergewebe vorkommen (beispielsweise mit Radioisotopen markierte Moleküle) wären im Gegensatz zu körpereigenen zweifelsfrei einer Leckage der BHS zuzuordnen. Auch aufgrund seiner Größe ist Albumin mit einem Molekulargewicht von etwa 67.000 Da, in der Studie Salfords das kleinste Markermolekül, eine ungewöhnlich Wahl. Typischerweise werden, gerade um auch kleine Lecks der BHS aufzudecken, Substanzen wie Saccharose und

Mannitol, die mit einem Molekulargewicht von nur etwa 400 Da um Größenordnungen kleiner sind, verwendet.

Es gilt daher, die verschiedenen Regulationen oder Veränderungen zugrunde liegenden Mechanismen nicht nur aufzuklären und potentielle Veränderungen zu quantifizieren, sondern auch auf ihre pathologische Relevanz hin zu untersuchen und sie einem potentiellen Krankheitsbild zuzuordnen.

Dazu ist es allerdings notwendig, zunächst die Wechselwirkungen des biologischen Systems mit dem elektromagnetischen Feld zu identifizieren und biologische Marker zu finden, mittels derer in objektiver und somit wissenschaftlicher Art und Weise eventuelle Risiken definiert und dann in epidemiologisch orientierten Studien auf ihre Relevanz für größere Populationen untersucht werden können. Als Standard für eine so orientierte Forschung können in-vitro- Experimente gelten, da in diesen sowohl unter reproduzierbaren Bedingungen exponiert werden kann, als auch die Zahl der Randvariablen beherrschbar bleibt. Natürlich müssen diese Experimente breitest angelegt sein und sich nicht auf Einzeleffekte fokussieren. Die so gewonnen Ergebnisse sollten in einem zweiten Schritt dann in in-vivo- Experimenten weiteruntersucht werden und, um die oben geforderte Zuordnung zu einem Krankheitsbild zu belegen, in epidemiologischen Studien münden. Mittels vorgeschalteter in-vitro- Untersuchungen sind somit Endpunkte (i.e. regulierte Zielmoleküle) zu definieren, deren in-vivo- Untersuchung nicht der Problematik von Fehlern erster Ordnung unterliegt.

Eine große Zahl von Untersuchungen hat sich bisher mit dem Einfluss hochfrequenter EMF auf Zellkulturen auseinandergesetzt, allerdings ohne einen speziellen Bezug zur BHS (s.o.) und beschreiben Änderungen der zellulären Genexpression. Es erscheint daher nicht unwahrscheinlich, dass auch in Zellkulturen der BHS eine entsprechende Interaktion mit EMF auf die Genexpression beobachtet werden könnte, sofern der Screeningansatz nicht auf einzelne Teile des Genoms beschränkt bleibt. Effekte auf die Proteinexpression und deren Folgen zu postulieren, ist jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich.

Bezogen auf die BHS bleibt grundsätzlich zu betonen, dass die Untersuchung der bloßen Schrankenfunktion nicht richtungsweisend sein darf. Die Permeabilität der BHS von Vertebraten wird über außerordentlich komplexe Mechanismen gesteuert mit dem Ziel, diese zu kontrollieren in dem Sinne, dass erwünschter und notwendiger

Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem zentralen Nervensystem (ZNS) reguliert zugelassen wird und für das ZNS schädliche Veränderungen der Zusammensetzung der Blutkomposition ausgeschlossen werden. Es gilt, in Untersuchungen diesen komplexen Zusammenhang in seiner Gesamtheit zu betrachten, mögliche Irritationen zu quantifizieren und deren pathologische Relevanz zu belegen.

Literatur

- [1] Albert, E.N. and Kerns, J.M., Reversible microwave effects on the blood-brain barrier, *Brain Res*, 230 (1981) 153-64.
- [2] Burkhardt, M., Spinelli, Y. and Kuster, N., Exposure setup to test effects of wireless communications systems on the CNS, *Health Phys*, 73 (1997) 770-8.
- [3] Chang, B., Huang, A., Joines, W. and Kramer, R., The effect of microwave irradiation (1.0 GHz) on the blood-brain barrier in dogs, *Radio Sci*, 17 (1982) 165-168.
- [4] Czyz, J., Guan, K., Zeng, Q., Nikolova, T., Meister, A., Schonborn, F., Schuderer, J., Kuster, N. and Wobus, A.M., High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells, *Bioelectromagnetics*, 25 (2004) 296-307.
- [5] Czyz, J., Nikolova, T., Schuderer, J., Kuster, N. and Wobus, A.M., Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50 Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells-the role of tumour suppressor p53, *Mutat Res*, 557 (2004) 63-74.
- [6] D'Andrea, J.A., Chou, C.K., Johnston, S.A. and Adair, E.R., Microwave effects on the nervous system, *Bioelectromagnetics*, Suppl 6 (2003) S107-47.
- [7] Dehouck, M.P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C. and Cecchelli, R., An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood- brain barrier in vitro, *J Neurochem*, 54 (1990) 1798-801.
- [8] Finnie, J.W., Blumbergs, P.C., Manavis, J., Utteridge, T.D., Gebski, V., Davies, R.A., Vernon-Roberts, B. and Kuchel, T.R., Effect of long-term mobile communication microwave exposure on vascular permeability in mouse brain, *Pathology*, 34 (2002) 344-7.
- [9] Finnie, J.W., Blumbergs, P.C., Manavis, J., Utteridge, T.D., Gebski, V., Swift, J.G., Vernon-Roberts, B. and Kuchel, T.R., Effect of global system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain, *Pathology*, 33 (2001) 338-40.
- [10] Franke, H., Galla, H. and Beuckmann, C.T., Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro, *Brain Res Brain Res Protoc*, 5 (2000) 248-56.
- [11] Franke, H., Galla, H.J. and Beuckmann, C.T., An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol, *Brain Res*, 818 (1999) 65-71.
- [12] Frey, A.H., Feld, S.R. and Frey, B., Neural function and behavior: defining the relationship, *Ann N Y Acad Sci*, 247 (1975) 433-9.
- [13] Fritze, K., Sommer, C., Schmitz, B., Mies, G., Hossmann, K.A., Kiessling, M. and Wiessner, C., Effect of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat, *Acta Neuropathol (Berl)*, 94 (1997) 465-70.
- [14] Fritze, K., Wiessner, C., Kuster, N., Sommer, C., Gass, P., Hermann, D.M., Kiessling, M. and Hossmann, K.A., Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain, *Neuroscience*, 81 (1997) 627-39.

- [15] Gallyas, F., Zoltay, G. and Dames, W., Formation of "dark" (argyrophilic) neurons of various origin proceeds with a common mechanism of biophysical nature (a novel hypothesis), *Acta Neuropathol (Berl)*, 83 (1992) 504-9.
- [16] Glaser, R., Beeinflussen Felder des Mobilfunks die Blut-Hirn-Schranke, *FGF-Newsletter*, 11 (2003) 17-21.
- [17] Goldman, H., Lin, J.C., Murphy, S. and Lin, M.F., Cerebrovascular permeability to ⁸⁶Rb in the rat after exposure to pulsed microwaves, *Bioelectromagnetics*, 5 (1984) 323-30.
- [18] Gruenau, S.P., Oscar, K.J., Folker, M.T. and Rapoport, S.I., Absence of microwave effect on blood-brain barrier permeability to [¹⁴C]sucrose in the conscious rat, *Exp Neurol*, 75 (1982) 299-307.
- [19] Hermann, D.M. and Hossmann, K.A., Neurological effects of microwave exposure related to mobile communication, *J Neurol Sci*, 152 (1997) 1-14.
- [20] Hossmann, K.A. and Hermann, D.M., Effects of electromagnetic radiation of mobile phones on the central nervous system, *Bioelectromagnetics*, 24 (2003) 49-62.
- [21] Koenig, H., Goldstone, A.D. and Lu, C.Y., Polyamines mediate the reversible opening of the blood-brain barrier by the intracarotid infusion of hyperosmolal mannitol, *Brain Res*, 483 (1989) 110-6.
- [22] Lange, D.G. and Sedmak, J., Japanese encephalitis virus (JEV): potentiation of lethality in mice by microwave radiation, *Bioelectromagnetics*, 12 (1991) 335-48.
- [23] Leszczynski, D., Joenvaara, S., Reivinen, J. and Kuokka, R., Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects, *Differentiation*, 70 (2002) 120-9.
- [24] Lin, J.C. and Lin, M.F., Studies on microwave and blood-brain barrier interaction, *Bioelectromagnetics*, 1 (1980) 313-23.
- [25] Lin, J.C. and Lin, M.F., Microwave hyperthermia-induced blood-brain barrier alterations, *Radiat Res*, 89 (1982) 77-87.
- [26] Lin, J.C., Philip, M.K. and Jung, D.T., Enhancement of anticancer drug delivery to the brain by microwave induced hyperthermia, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 47 (1998).
- [27] Litovitz, T.A., Krause, D., Penafiel, M., Elson, E.C. and Mullins, J.M., The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity, *Bioelectromagnetics*, 14 (1993) 395-403.
- [28] Marinelli, F., La Sala, D., Ciccotti, G., Cattini, L., Trimarchi, C., Putti, S., Zamparelli, A., Giuliani, L., Tomassetti, G. and Cinti, C., Exposure to 900 MHz electromagnetic field induces an unbalance between pro-apoptotic and pro-survival signals in T-lymphoblastoid leukemia CCRF-CEM cells, *J Cell Physiol*, 198 (2004) 324-32.
- [29] Merritt, J.H., Chamness, A.F. and Allen, S.J., Studies on blood-brain barrier permeability after microwave-radiation, *Radiat Environ Biophys*, 15 (1978) 367-77.
- [30] Moriyama, E., Salcman, M. and Broadwell, R.D., Blood-brain barrier alteration after microwave-induced hyperthermia is purely a thermal effect: I. Temperature and power measurements, *Surg Neurol*, 35 (1991) 177-82.
- [31] Neilly, J.P. and Lin, J.C., Interaction of ethanol and microwaves on the blood-brain barrier of rats, *Bioelectromagnetics*, 7 (1986) 405-14.

- [32] Neubauer, C., Phelan, A.M., Kues, H. and Lange, D.G., Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex, *Bioelectromagnetics*, 11 (1990) 261-8.
- [33] Ohmoto, Y., Fujisawa, H., Ishikawa, T., Koizumi, H., Matsuda, T. and Ito, H., Sequential changes in cerebral blood flow, early neuropathological consequences and blood-brain barrier disruption following radiofrequency-induced localized hyperthermia in the rat, *Int J Hyperthermia*, 12 (1996) 321-34.
- [34] Oscar, K.J. and Hawkins, T.D., Microwave alteration of the blood-brain barrier system of rats, *Brain Res*, 126 (1977) 281-93.
- [35] Penafiel, L.M., Litovitz, T., Krause, D., Desta, A. and Mullins, J.M., Role of modulation on the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity in L929 cells, *Bioelectromagnetics*, 18 (1997) 132-41.
- [36] Persson, B.R., Salford, L.G. and Brun, A., Blood-brain barrier permeability in rats exposed to electromagnetic fields used in wireless communication, *Wireless Networks*, 3 (1997) 455-461.
- [37] Port, M., Abend, M., Romer, B. and Van Beuningen, D., Influence of high-frequency electromagnetic fields on different modes of cell death and gene expression, *Int J Radiat Biol*, 79 (2003) 701-8.
- [38] Preston, E. and Prefontaine, G., Cerebrovascular permeability to sucrose in the rat exposed to 2,450-MHz microwaves, *J Appl Physiol*, 49 (1980) 218-23.
- [39] Preston, E., Vavasour, E.J. and Assenheim, H.M., Permeability of the blood-brain barrier to mannitol in the rat following 2450 MHz microwave irradiation, *Brain Res*, 174 (1979) 109-17.
- [40] Repacholi, M.H., Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs, *Bioelectromagnetics*, 19 (1998) 1-19.
- [41] Repacholi, M.H., Basten, A., Gebiski, V., Noonan, D., Finnie, J. and Harris, A.W., Lymphomas in E mu-Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHz electromagnetic fields, *Radiat Res*, 147 (1997) 631-40.
- [42] Salford, L.G., Brun, A., Sturesson, K., Eberhardt, J.L. and Persson, B.R., Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz, *Microsc Res Tech*, 27 (1994) 535-42.
- [43] Salford, L.G., Brun, A.E., Eberhardt, J.L., Malmgren, L. and Persson, B.R., Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones, *Environ Health Perspect*, 111 (2003) 881-3; discussion A408.
- [44] Schirmacher, A., Winters, S., Fischer, S., Goeke, J., Galla, H.J., Kullnick, U., Ringelstein, E.B. and Stogbauer, F., Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood-brain barrier in vitro, *Bioelectromagnetics*, 21 (2000) 338-45.
- [45] Stagg, R.B., Hawel, L.H., 3rd, Pastorian, K., Cain, C., Adey, W.R. and Byus, C.V., Effect of immobilization and concurrent exposure to a pulse-modulated microwave field on core body temperature, plasma ACTH and corticosteroid, and brain ornithine decarboxylase, Fos and Jun mRNA, *Radiat Res*, 155 (2001) 584-92.
- [46] Stögbauer, F., Beeinflussung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke durch elektromagnetische Felder, *Edititon Wissenschaft, Forschungsgemeinschaft Funk e.V.*, 15 (2002) 1-16.
- [47] Sutton, C.H. and F.B., C., Effects of microwave-induced hyperthermia on the blood-brain barrier of the rat, *Radiation Science*, 14 (1979) 329-334.

- [48] Töre, F., Dulou, P.E., Haro, E., Veyret, B. and Aubineau, P., Two-hour exposure to 2 W/kg, 900 MHz GSM microwaves induces plasma protein extravasation in rat brain., *Proceedings from the 5th International Congress of the European Bioelectromagnetics Association, 6 September 2001, Helsinki, Finland* (Hietanen M, Jokela K, Juutilainen, J, eds). (2001) 43-45.
- [49] Tsurita, G., Nagawa, H., Ueno, S., Watanabe, S. and Taki, M., Biological and morphological effects on the brain after exposure of rats to a 1439 MHz TDMA field, *Bioelectromagnetics*, 21 (2000) 364-71.
- [50] Vohra, B.P., James, T.J., Sharma, S.P., Kansal, V.K., Chudhary, A. and Gupta, S.K., Dark neurons in the ageing cerebellum: their mode of formation and effect of Maharishi Amrit Kalash, *Biogerontology*, 3 (2002) 347-54.
- [51] Ward, T.R. and Ali, J.S., Blood-brain barrier permeation in the rat during exposure to low-power 1.7-GHz microwave radiation, *Bioelectromagnetics*, 6 (1985) 131-43.
- [52] Ward, T.R., Elder, J.A., Long, M.D. and Svendsgaard, D., Measurement of blood-brain barrier permeation in rats during exposure to 2450-MHz microwaves, *Bioelectromagnetics*, 3 (1982) 371-83.
- [53] Yao, K., Wang, K.J., Sun, Z.H., Tan, J., Xu, W., Zhu, L.J. and Lu de, Q., Low power microwave radiation inhibits the proliferation of rabbit lens epithelial cells by upregulating P27Kip1 expression, *Mol Vis*, 10 (2004) 138-43.