

Abschlußbericht für das Forschungsvorhaben

Untersuchungen zu Wirkmechanismen an Zellen unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunktechnologie. C Funktionen

**Forschungsnehmer:
Institut für Zelltechnologie e.V. Rostock**

PD Dr. M. Simkó

Februar 2007

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

INHALTSANGABE

ZUSAMMENFASSUNG	2
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG	4
1.1 Hochfrequente elektromagnetische Felder - Physikalische Grundlagen	4
1.2 Wirkung auf zelluläre Systeme	5
1.2.1 Zellproliferation - Apoptose	5
1.2.2 Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies / Monozyten	6
2 ZIELSETZUNG DES PROJEKTES	10
2.1 Arbeitsprogramm	11
3 METHODIK	12
3.1 Kultivierung der Zellen	12
3.2 Expositionsanlage	12
3.3 Exposition der Zellen	14
3.4 Nachweis freier Radikale	14
3.5 Phagozytose	15
3.6 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	15
3.7 Zellzyklus Kontrolle	15
3.8 Apoptose-Induktion	15
3.9 Hitzeschockprotein 70	16
3.10 Protein-Array	16
3.11 Real time RT-PCR	16
3.12 Statistische Auswertung	16
3.13 Durchführung	17
4 ERGEBNISSE	17
4.1 Bildung freier Radikale	17
4.1.1 Exposition der Mono Mac 6 Zellen mit 2, 5 oder 10 W/kg SAR Wert (DTX-Signal) für 45 Minuten	22
4.1.2 ROS-Produktion nach Exposition mit Frequenzmodulierten 1800 MHz RF-EMF	23
4.2 Phagozytose von Ultrafeinpartikeln	24
4.2.1 Superoxidradikalbildung als Maß der Phagozytoseaktivität	25
4.3 Hsp70 Expression	26
4.3.1 Zeitabhängige HSP70 Expression	26
4.3.2 Hsp70 Expression im Gesamtzelllysat	27
4.3.3 Hsp70 Expression in Einzelzellmessungen nach der Exposition mit unterschiedlichen RF-Signalen und SAR-Werten	28
4.4 Zellzyklusregulation	32
4.5 Apoptoseinduktion	33
4.6 Proteinexpression	35
4.7 Genexpression	38
5 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	39
5.1 Einfluss auf die Redox-Homeostase nach RF-Exposition in immunologisch relevanten Zellen	39
5.2 Stressantwort	40
5.3 Einfluss auf die Zellproliferation und der Apoptose	40
5.4 Molekulare Mechanismen	40
6 SCHLUSSBEMERKUNG	41
7 LITERATURVERZEICHNISS	42
8 EIGENE PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN	43
6 ANLAGEN	45

ZUSAMMENFASSUNG

Im vorliegenden Projekt wurde die aktivierende Wirkung von RF-EMF-Felder wie sie von Mobiltelefonen ausgestrahlt werden, auf die Bildung von freien Radikalen (Superoxideanion und ROS) in vier unterschiedlichen immunitätsrelevante Zelltypen untersucht. Die Analysen wurden mit vier unterschiedlichen RF-EMF Signalen (continuous wave, 217 Hz, GSM-nonDTX und GSM-DTX) und unterschiedlichen SAR Werten (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 und 10 W/kg) durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Produktion von freien Radikalen konnte nur nach der Exposition mit dem RF-Signal GSM-DTX bei 2 W/kg SAR Wert für 45 Minuten in menschlichen Monozyten und in Mono Mac 6 Zellen, nicht jedoch in primären Lymphozyten und in K562 Zellen nachgewiesen werden. Diese Änderungen wurden hingegen nur dann ermittelt, wenn die Daten gegen die Sham-Kontrolle verglichen wurden nicht jedoch gegen die Brutschrankkontrolle. Die Positivkontrollen wie PMA oder Wärmebehandlung (°C 42) verursachten einen signifikanten Anstieg freier Radikale in allen Untersuchungen, aber keine additiven Effekte zwischen RF-EMF und PMA konnten ermittelt werden. Die Modulation der Phagozytose in Mono Mac 6 Zellen durch alle getesteten RF-Signale blieb unbeeinflusst. Die Untersuchungen zur Zellproliferation, Zellzykluskontrolle und zur Induktion von Apoptose oder Nekrose zeigten keine Veränderungen zur Sham oder zur Brutschrankkontrolle. Ebenfalls keine Effekte konnten in der Stressantwort (HSP-Expression) oder Veränderungen in physiologischen Prozessen ermittelt werden.

Um die Wirkmechanismen der auftretenden Effekte zu analysieren, wurde eine Proteinanalyse auf Mikro-Arrays mit den humanen Monozyten (GSM-DTX, 2 W/kg für 45 Minuten) durchgeführt und dabei die Veränderung der Expression zahlreicher Proteine festgestellt. Die Daten zeigen die Verringerung des Zellmetabolismus im Sham, während im RF-Ansatz die Aktivierung des zellulären Metabolismus (Proliferation/Differentiation) ermittelt wurde.

Die Genexpressionsanalyse bestimmter Gene (PIK3R1, CCNC, Raf 1, HPRT) nach RF-EMF Exposition (GSM-DTX, 2 W/kg, 45 min) in humanen Nabelschnurblutmonozyten zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen RF, Sham und Brutschrankkontrolle.

Unsere Daten zeigen, dass RF-EMF Exposition mit hohen peak-SAR Werten (GSM-DTX) die Modulation in der freien Radikalproduktion und die Expression von bestimmten Proteinen verursacht. Diese Modifikationen führen jedoch nicht zur Änderung physiologischer Prozesse wie die Phagozytose, Zellproliferation, Apoptose oder Nekrose.

ABSTRACT

In the present study we investigated the activating capacity of mobile phone like emitted RF fields to induce free radicals (superoxide radical anion and ROS) using different immune relevant cells, RF-EMF signals (continuous wave, 217 Hz, GSM-nonDTX und GSM-DTX) and different SAR values (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 und 10 W/kg). We found a statistically significant elevation of free radical release only after one of the RF signals (GSM-DTX) for 45 min in primary human monocytes and Mono Mac 6 cells but not in primary lymphocytes and K562 cells. However, this change in free radical release could be detected if data were compared to sham and not to the incubator control. Positive controls such as PMA or heat treatment (42 °C) induced a significant elevation of free radical level in all cases, but no additive effects of RF and PMA could be detected. A modulated phagocytic uptake after any of the used signals was not detected in Mono Mac 6 cells. Investigations to cell proliferation, cell cycle control and the induction of apoptosis or necrosis showed no differences to both, sham and control conditions. We found no effects of RF signal exposure on different stress response relevant parameters (HSP expression) or changes in cell physiological processes. Performing a protein micro-array analysis using primary human monocytes to detect the underlying mechanisms, for how RF exposure (GSM-DTX, 2 W/kg for 45 min) exerts this effect we found alterations in numerous protein expressions after RF exposure. The array data indicated a decreased cell metabolism in the sham exposed population, whereas the activation of cellular metabolism and cell proliferation/differentiation in the RF exposed cells was detected. Investigating the gene expression on certain genes (PIK3R1, CCNC, Raf 1, HPRT) after RF-EMF (GSM-DTX, 2 W/kg, 45 min) in human umbilical cord blood derived monocytes we found no effects of RF exposure compared to sham and to incubator control. Our data demonstrate that RF-EMF exposure with high peak SAR values (GSM-DTX) induce alterations in free radicals release and changes in numerous protein expression levels. However, these alterations do not induce changes in physiological processes such as phagocytosis, cell proliferation, apoptosis and necrosis.

1 EINLEITUNG

Die weltweite Zunahme der Mobilfunk-Nutzer (2001 etwa 500 Mio. und 2003 bis 700 Mio.) führt zu wachsender Besorgnis in der Bevölkerung, wegen der diskutierten möglichen gesundheitlichen Schädigungen. Dieser Besorgnis wächst auch wegen der widersprüchlichen Ergebnisse der durchgeführten Studien, die oft mit fehlenden oder ungenauen Kontrollen durchgeführt wurden oder auch mit Messungenauigkeiten behaftet sind.

Bei hohen Leistungsdichten (Feldstärken) werden in biologischen Systemen thermische Effekte induziert. Die Basisgröße für thermische Wirkungen ist die spezifische Absorptionsrate (SAR) angegeben in W/kg, bei der biologische Wirkungen aufgrund von Wärmeentwicklung auftreten. Die Frage, ob niedrigere Leistungsdichten hochfrequenter elektromagnetischer Felder (EMF), die nicht zu einer messbaren Erwärmung von Geweben führen, athermische Wirkungen hervorrufen können, ist immer noch offen. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, um diese Frage zu beantworten, aber die Frage der biologischen Relevanz ist noch unklar.

1.1 Hochfrequente elektromagnetische Felder - Physikalische Grundlagen

Hochfrequente (radiofrequente) elektromagnetische Felder (RF-EMF) werden im Allgemeinen von einem Sender (Antenne) abgestrahlt und breiten sich mit Lichtgeschwindigkeit aus. Dabei ist es möglich, Energie und damit Informationen über große Entfernungen zu übertragen. Diese Eigenschaft wird besonders für die moderne Kommunikation verwendet, wie z.B. für Rundfunk, Fernsehen, Mobilfunk sowie für schnurlose Telefone, Wireless LAN und Bluetooth. Im elektromagnetischen Spektrum befinden sich die hochfrequenten elektromagnetischen Felder im Frequenzbereich zwischen 3 Kilohertz und 300 Gigahertz (1GHz = 1.000.000.000 Hz).

Als unumstritten gilt die Wirkung hochfrequenter Felder auf die Erwärmung des Körpers. Bei den Untersuchungen der biologischen Wirkungen hochfrequenter Felder geht es deshalb darum, wie viel zusätzliche Wärme der Körper verträgt, ohne biologischen Schaden zu erleiden. Eine spezifische Absorptionsrate von 4 W/kg bei einer Expositionsdauer von 30 min kann im Gewebe unter normalen Bedingungen eine Temperaturerhöhung von 1 °C hervorrufen. Ab 1 °C Erwärmung sind Effekte in biologischem Gewebe nachweisbar. Durch Erwärmung können Proteine denaturiert werden und Nervenerregung kann induziert werden. Durch Resonanzeffekte oder Resonanzüberlagerungen kann es in lokalen eng begrenzten Bereichen zu besonders starker Erwärmung kommen, den sog. "Hot Spots", die dann besondere Wirkungen zur Folge haben können (z.B. in Keimzellen). Ferner können Organe oder Gewebe mit geringer Wärmeleitfähigkeit und vor allem schlechter Durchblutung, wie z.B. das Auge, die zugeführte Wärme schlechter abführen und somit beschädigt werden.

Durch die Einführung der Grenzwerte und der neuen Mobilfunktechnologie, können thermische Effekte nahezu ausgeschlossen werden. Gesetzlich wurden Grenzwerte festgelegt (ICNIRP), um mögliche biologische Auswirkungen zu begrenzen. Die Basisgrenzwerte liegen

bei 0,08 W/kg SAR (Ganzkörper) und 2 W/kg SAR (Teilkörper). Es handelt sich hierbei um Durchschnittswerte bezogen auf 10 g Gewebe. Aus diesem Grund steht die Untersuchung der so genannten athermischen Effekte im Vordergrund der Forschung.

1.2 Wirkung auf zelluläre Systeme

1.2.1 Zellproliferation - Apoptose

Zellen proliferieren, indem aus einer Zelle zwei Tochterzellen durch Teilung entstehen. Damit es zur Zellteilung kommt, müssen die Zellen einen Zellzyklus durchschreiten.

Der Zellzyklus kann in die vier Hauptphasen M-, G₁-, S- und G₂-Phase eingeteilt werden (Abb. 1). In der M-Phase (Mitose) findet die Teilung des Zellkerns statt. Am Ende der M-Phase beginnt die Cytokinese (Zellteilung), nach deren Abschluss zwei Tochterzellen entstanden sind. Nach der Zellteilung durchlaufen die Zellen die G₁-Phase, wobei G (*gap*) für den Zeitraum zwischen dem Ende der Cytokinese und dem Beginn der DNA-Synthese steht. Im Verlauf dieser Phase können die Zellen aus dem Zellzyklus austreten und in die so genannte G₀-Phase übergehen. Wird der Zellzyklus weitergeführt, so gelangen die Zellen in die S-Phase oder Synthesephase, in der die DNA verdoppelt wird. In der G₂-Phase bereiten die Zellen die biochemischen Voraussetzungen für die Mitose vor. Die M-Phase wird in fünf Unterphasen eingeteilt (Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase) an die sich dann die Cytokinese anschließt und der Zellzyklus erneut beginnt.

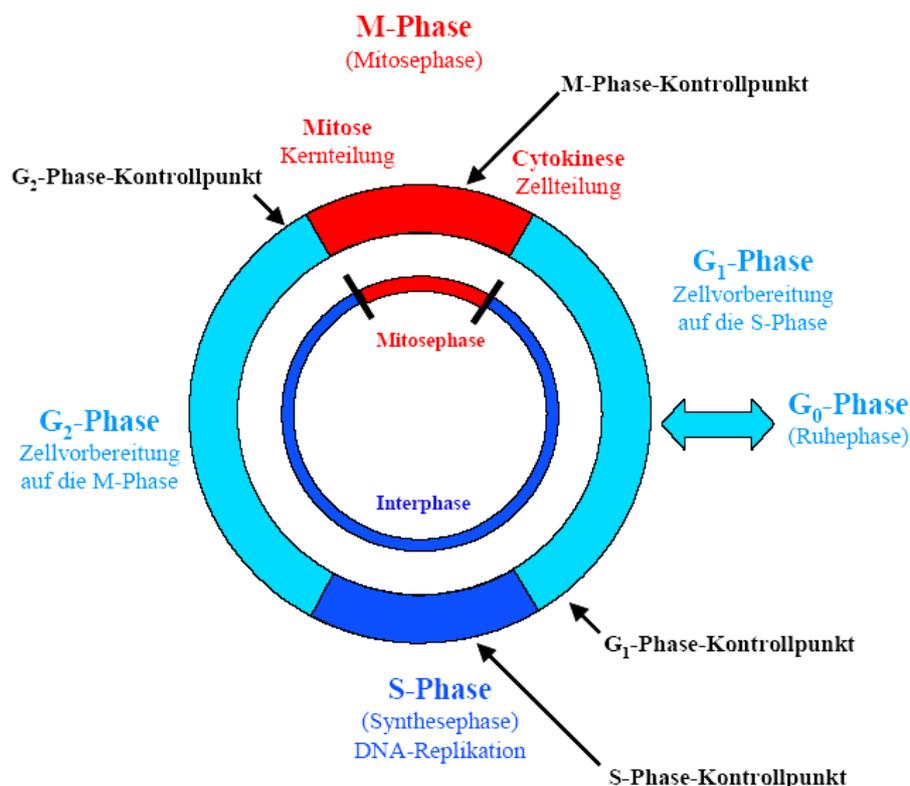


Abb. 1 Schematische Darstellung des Zellzyklus mit den Kontrollpunkten. In der Interphase wächst die Zelle kontinuierlich. In der M-Phase teilen sich zuerst der Kern und dann die Zelle. Die DNA-Replikation ist auf die S-Phase beschränkt, die G₁-Phase entspricht dem Zeitraum zwischen M- und S-Phase, die G₂-Phase dem Zeitraum zwischen S- und M-Phase. (in Anlehnung an Alberts et al., 2001)

Innerhalb des Zellzyklus befinden sich verschiedene Zellzykluskontrollsysteme, die von zyklisch aktivierten Proteinkinasen und Phosphatasen gesteuert werden. Werden Schädigung der DNA induziert oder treten andere Fehler bei der Mitose bzw. der DNA-Replikation auf, wird der Zellzyklus am nachfolgenden Kontrollpunkt angehalten und Reparaturmechanismen aktiviert. Kommt es vermehrt zu Zellzyklusarresten aufgrund von z.B. DNA-Schäden verlangsamt sich die Zellproliferation. Ist die aufgetretene Schädigung irreversibel und kann nicht repariert werden, leitet die Zelle die so genannte Apoptose (programmierter Zelltod) ein oder die Zellen sterben nekrotisch ab. Außerdem können sich die Schäden manifestieren und den Tochterzellen weitergegeben werden.

Die Wirkung auf die Zellproliferation von RF-EMF wurde unter anderem von Vijayalaxmi et al. (2001) in humanen Lymphozyten mit 847,74 MHz RF-EMF (CDMA) und mit 4,9 bzw. 5,5 W/kg SAR-Werten (24 Stunden Exposition) untersucht. Die Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen exponierten Lymphozyten und der Kontrolle. Die Arbeitsgruppe Velizarov et al. (1999) beschreibt eine Steigerung der Zellproliferation von humanen Amnionzellen nach 30 minütiger Exposition mit 960 MHz GSM-Feldern (2,1 W/kg SAR) bei 35 und 39 °C. Diese Temperaturen wurden gewählt, um zu zeigen dass der Effekt nicht thermalen Ursprungs ist, sondern auf der Einwirkung des RF-EMF beruht. Zu keinem Effekt auf die Zellproliferation führte die RF-EMF Exposition (1, 2, 10 W/kg 1950 MHz CW) von 1 und 2 Stunden in humanen Glioma Zellen (MO54) bei der Untersuchung von Miyakoshi et al. (2005). Die Autoren untersuchten die Zellproliferation nach der Exposition über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die Studien zeigen, dass eine abschließende Beurteilung über die Auswirkungen von RF-EMF auf die Zellproliferation, noch nicht möglich ist.

1.2.2 Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies / Monozyten

Freie Radikale und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine wichtige Rolle in vielen lebenden Systemen. Sie sind an der Entstehung und Pathophysiologie vieler Krankheiten und in der Wirkung vieler Toxine beteiligt. Freie Radikale sind instabile hochreaktive Moleküle mit freien Außenelektronen. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählen unter anderem das Superoxid-Radikalanion (O_2^-), das Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Stickstoffmonoxid (NO^\cdot). In Folge der Zellatmung ist immer eine bestimmte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen vorhanden, die bei Stressreaktionen als Zellantwort verändert werden kann. Die Bildung von ROS erfolgt über intrazelluläre Signalwege, die von Enzymen wie der NAD(P)H-Oxidase oder der Xanthin-Oxidase katalysiert werden (Dröge, 2002). So wird z.B. molekularer Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) durch die NAD(P)H-Oxidase reduziert. Die erhöhte ROS Bildung in den Zellen kann endogen oder exogen induziert werden. Da die Bildung von ROS eine Begleiterscheinung aerober Lebensweise darstellt, besteht bei normalen Bedingungen in Zellen ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und antioxidativ wirkenden Substanzen (Scavenger), wie z.B. die Superoxiddismutase (SOD), Katalase und das

Glutathionredoxsystem. Sie sind die Gegenspieler der freien Radikale, indem die Radikale durch enzymatische Reaktionen in weniger reaktive Moleküle umgewandelt werden (Abb. 2). Oxidativer Stress entsteht also immer dann, wenn die ROS-Generierung die antioxidative Kapazität übersteigt. Wird der Abwehrmechanismus der Zellen überfordert, z.B. durch chronische Entzündungen, wird oxidativer Stress ausgelöst. In immunrelevanten Zellen wird das reaktive Potential von ROS auch als zellulärer Abwehrmechanismus bei eindringenden Pathogenen genutzt (z.B. bei Infektionen). Die erhöhte ROS Produktion kann die eigenen Zellkompartimente schädigen und es kann zu DNA-Brüchen, Schäden an Proteinen und auch zu zellulärer Dysfunktion kommen, was den Zelltod oder die Kanzerogenese zur Folge haben kann (Dröge, 2002).

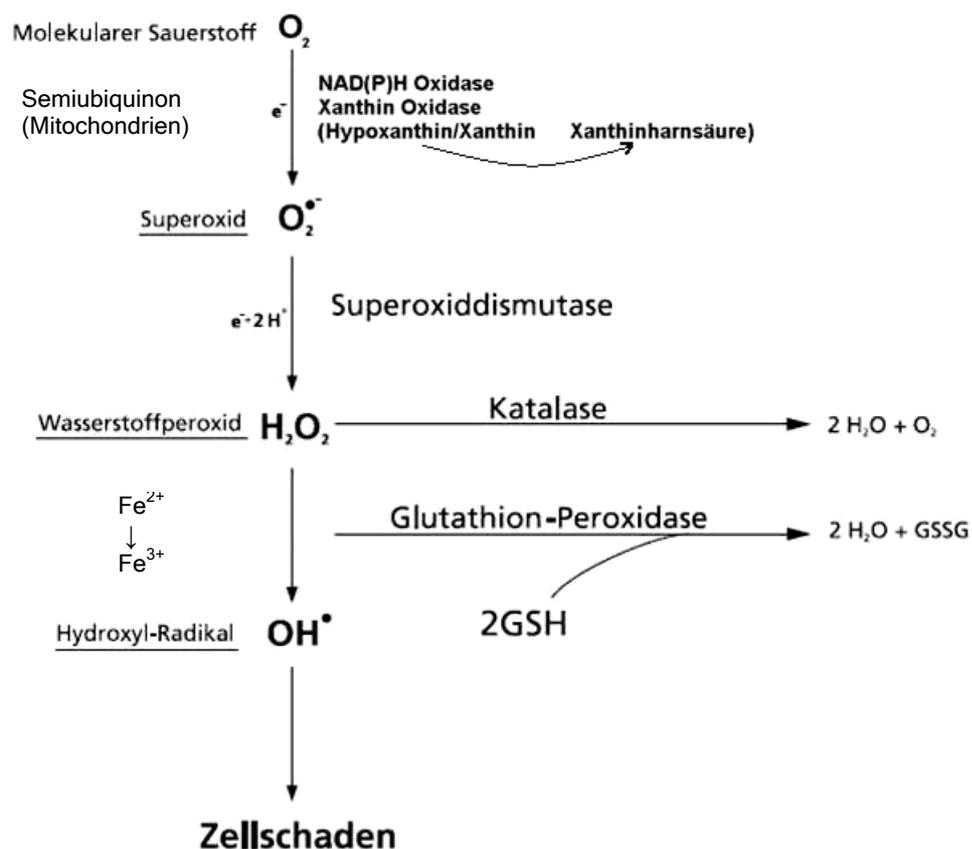


Abb. 2 Signalwege der ROS-Produktion und Beseitigung, GSH (Glutathion), GSSG (Glutathiondisulfid), Die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanionen wird durch enzymatische Komponenten (NAD(P)H-Oxidase und Xanthinoxidase) oder durch nicht enzymatische Redoxkomponenten (Semiubiquinon, Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette) vermittelt. Superoxiddismutase wandelt Superoxid enzymatisch in Wasserstoffperoxid um. Sind reduzierende Metallionen (z.B. zweiwertiges Eisen Fe^{2+}) vorhanden, wird Wasserstoffperoxid in das reaktivste Hydroxyl-Radikal umgewandelt. Andererseits kann Wasserstoffperoxid durch Katalase oder Glutathionperoxidase in Wasser umgewandelt werden. (in Anlehnung an Dröge, 2002)

Hook et al. (2004) untersuchten die ROS-Induktion an Mausmakrophagen (J 774.16) nach der Exposition mit frequenzmodulierten CW-Signal (continuous wave, 835,62 MHz) oder mit CDMA Signal (code division multiple access, 847,74 MHz) bis zu 22 Stunden und fanden

keine Veränderungen. Der Nachweis von oxidativem Stress infolge der RF-EMF Exposition wurde daher nicht erbracht. Die Erhöhung von NO nach RF-EMF (900 MHz) Exposition für 2 Wochen in Zellen der Nasenschleimhaut von Ratten wurde von Yarıktas et al. (2005) beschrieben. In einer Studie von İlhan et al. (2004) konnte durch die Exposition mit 900 MHz Feldern, wobei Mobiltelefone als Expositionsquellen verwendet wurde, ein Anstieg der Konzentrationen an NO und Xanthin-Oxidase im Gehirnzellen von Ratten nachgewiesen werden. Der Level an Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase in den Zellen wurde leicht, jedoch nicht signifikant gesenkt. Pacini et al. (2002) wählten als Marker für die Bestimmung des Einflusses von RF-EMF auf die Radikalbildung in menschlichen Fibroblastenzellen (über NADPH-Oxidase Aktivierung) die Änderung der Konzentration an Diacylglycerol und Inositolphosphat. Dabei zeigte sich durch die Exposition der Zellen mit 902,4 MHz die Erhöhung der Markerkonzentrationen. Keinen Einfluss durch RF-EMF auf die Produktion freier Radikale im Gehirn von Kaninchen zeigt eine Studie von Irmak et al. (2002). In den Untersuchungen wurden auf "stand by" geschaltete 900 MHz Mobiltelefone verwendet und verschiedene Oxidantien und Antioxidantien bestimmt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle.

1.2.3 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine sind hoch konservierte zelluläre Stressproteine. Ihre Aminosäurezusammensetzung hat sich im Verlauf der Evolution nicht wesentlich verändert. Sie werden sowohl von Prokaryonten als auch von Eukaryonten in ausgeprägter Homologie exprimiert. Die Hitzeschock-Superfamilie beinhaltet verschiedene Familien, die anhand ihres Molekulargewichtes klassifiziert werden können. Die wichtigsten Familien sind Hsp10, Hsp25, Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und Hsp110. Man unterteilt Hitzeschockproteine außerdem in konstitutive Hitzeschockproteine (HSCs) und induzierbare Hitzeschockproteine (HSPs). HSCs werden unter physiologischen Bedingungen permanent produziert. Sie sorgen in den Zellen für einen geregelten Ablauf von anabolischen und katabolischen Prozessen. Sie sind für die geregelte Faltung und Translokation von Proteinen (Chaperonfunktion) und den Abtransport von nicht mehr gebrauchten Proteinen zuständig (Ubiquitin-Familie). HSPs werden in der Zelle als Antwort auf verschiedene physikalische und chemische Stress-Stimuli synthetisiert. Man bezeichnet sie auch als Stressproteine, da sie eine Zellschutzfunktion wahrnehmen. Zellstress auslösende Faktoren können beispielsweise Hitze und Kälte, Schwermetalle, Alkohole, Aminosäureanalogons, DNA-schädigende Agenzien wie ROS, die Hemmung der Zellatmung, Wachstumsfaktoren und Differenzierungsprozesse in der Zelle sein. Die Regulation der Hitzeschockproteine erfolgt in allen Eukaryonten auf der Ebene der Transkription und/oder sie können posttranslationalen modifiziert (phosphoryliert) werden. Nach Stimulus werden spezifische Hitzestresstranskriptionsfaktoren (HSFs) aus ihrer inaktiven, regulatorgebundenen, monomeren Form in eine aktive Form überführt, die aus dem Cytoplasma in den Kern transportiert wird. Im Nukleus erfolgt die Bindung an regulatorische

Hitzestresselemente in den Promotorregionen der Hitzestressproteingene und deren Translation (Nover & Scharf 1997, Schöffl et al. 1998).

Verschiedene Studien verweisen auf mögliche Zusammenhänge zwischen der nichtthermischen Exposition mit RF-EMF und der Aktivierung der Hitzestressantwort in Zellen, sowie einen Zusammenhang mit der Onkogenese und dem induzierten Zelltod. Leszczynski et al. (2002) zeigt den Zusammenhang zwischen 900 MHz Feldern und der Aktivierung der Hsp27/p38MAPK Stresskaskade auf. Dabei weist er in den verwendeten humanen Endothelzellen einen Anstieg der Hsp27 Expression und einen veränderten Phosphorylierungsstatus nach. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden diese Untersuchungen nicht reproduziert. Untersuchungen von de Pomerai et al. (2000) an *Caenorhabditis elegans* zeigen die Aktivierung einer Hitzeschockantwort durch die Exposition mit 750 MHz CW-Feldern niedriger Intensität. Dabei wurde ein Hsp16 mit der Hitzestressantwort in Zusammenhang gebracht. Diese Untersuchungen konnten jedoch durch die Autoren selbst nicht reproduziert werden (Dawe et al. 2005). Die Produktion von Hitzeschockproteinen als Stressantwort auf die RF-EMF Exposition wurde in unterschiedlichen Studien untersucht. Miyakoshi et al. (2005) berichten über keine Veränderung der Hsp70 und Hsp27 Expression nach RF-EMF Exposition (1, 2, 10 W/kg, 1950 MHz) bis zu 2 Stunden in humanen Gliomazellen. Interessant an dieser Studie ist außerdem, dass 1 und 2 Stunden nach der Exposition mit 10 W/kg eine geringere Menge an phosphoryliertem Hsp27 bei den exponierten Zellen festgestellt wurde. French et al. (2000) verweist auf die Möglichkeit, dass RF-EMF über die chronische Aktivität der Hitzestressantwort Krebs induzieren kann. Die Autoren entwickelten ein Modell, welches die Zusammenhänge klären soll. Jolly und Morimoto (2000) beschrieben die suprimierende Wirkung von verschiedenen Hitzeschockproteinen und deuten auf die Aktivierung durch freie Radikale vermittelte Signaltransduktionskaskaden. Ein indirekter Zusammenhang von RF-EMF und der Funktion von Radikalen als Vermittler schnell aktivierbarer Signalkaskaden wurde diskutiert.

1.2.4 Monozyten, Makrophagen, und Phagozytose

Eine Schlüsselrolle in der Abwehr und Vernichtung von körperfremden, pathogenen Eindringlingen wie beispielsweise Parasiten, Protozoen, Pilzen sowie in der Bekämpfung entarteter körpereigener Zellen besonders bei metastasierenden Tumoren, kommt den Makrophagen zu. Vorläufer dieser Makrophagen sind die Monozyten. Deren Entwicklung beginnt im Knochenmark unter Einfluss von Wachstumsfaktoren wie Interleukinen, Granulozyten/Monozyten-, „colony stimulating faktor“ (GM-CSF) und Monozyten/Makrophagen colony stimulating factor (M-CSF). Aus den Blutstammzellen entwickeln sich die Vorstufen der Monozyten, die Monoblasten und Promonozyten. Diese differenzieren später zu Monozyten aus, welche sich zunächst noch im Knochenmark befinden, später aber ins periphere Blut auswandern. Einige der Monozyten bleiben im Körper universell einsetzbar, andere treten nach einer Verweildauer von bis zu 40 Stunden in verschiedene Gewebe über und siedeln sich als Gewebsmakrophagen an. Je nach Gewebetyp können sie

verschiedene Funktionen wahrnehmen. So sind sie beispielsweise an Entzündungsprozessen beteiligt, sie tragen zur Wundheilung bei und gehen gegen pathogene Erreger vor. Eine der wichtigsten Funktionen von Makrophagen und Monozyten, ist die Phagozytose. Phagozytierende Zellen sind in der Lage, Fremdkörper wie Bakterien oder Partikel zu zerstören, indem sie diese ins Zellinnere aufnehmen und dort speziellen zelleigenen Abwehrmechanismen, wie die Radikalbildung, aussetzen. Die Fremderkennung erfolgt dabei anhand spezifischer Rezeptoren an der Membranoberfläche der phagozytierenden Zellen. Die Oberflächenrezeptoren erkennen unspezifisch verschiedene Liganden wie Glykoproteine, Oligosaccharide und Lektine auf der Zelloberfläche der Bakterien. Körperfremde Partikel dagegen müssen erst vermittelt durch Immunglobuline (Ig) und Komponenten des Komplementsystems opsoniert werden. Derart markierte Partikel docken an den spezifischen IgG-Rezeptoren und Komplementrezeptoren der Monozyten und Makrophagen an (FcγR- und iC3b-Rezeptoren bei Blutmonozyten). Die eigentliche Aktivierung und Stimulierung der Phagozytose wird durch die Rezeptor-Ligandenbindung ausgelöst (Abb. 3). Auf die spezifischen Erkennungsprozesse der C3b-Komplementrezeptoren folgt unter Beteiligung spezieller Zytokine die Aktivierung einer Proteinkinase C vermittelte Reaktionskaskade.

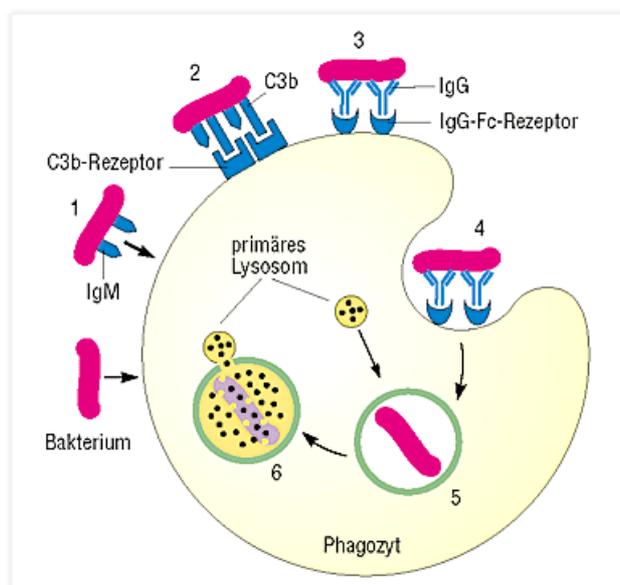


Abb. 3 Verlauf der Phagozytose am Beispiel der Aufnahme eines Bakteriums, 1: Opsonierung der Bakterienzelle mit IgM, 2: Opsonierung des Bakteriums mit Komponenten des Komplementsystems (C3b) und Bindung an spezifische Komplementrezeptoren, 3: Bindung eines mit IgG markierten Bakteriums an spezifischen Fc-Rezeptor, 4 und 5 Aufnahme des Bakteriums in die Zelle, 6: Fusion von Lysosomen mit dem Phagosom und Verdauung des Bakteriums durch lysosomale Enzyme aus den Lysosomen (aus Klein, Immunologie).

2 ZIELSETZUNG DES PROJEKTES

Das vorliegende Forschungsvorhaben soll zur Aufklärung der Wirkung und der beteiligten Wirkmechanismen EMF-induzierter biologischer Prozesse beitragen. Dabei stehen im Mittelpunkt der Untersuchungen Analysen der Wirkungen von RF-EMF, wobei ein für niederfrequente EMF bereits beschriebener und reproduzierter Effekt (Simkó et al. 2001a) an

immunrelevanten Zellen untersucht wird. Die Studie soll Auskunft darüber geben, ob RF-EMF biologische Wirkungen induzieren und ob diese Effekte, z.B. bedingt durch die NF-Modulation, auf analogen Mechanismen beruhen, wie z.B. auf spezifischen Sekundärantworten. Hierzu werden primäre nichttransformierte Zellen, wie Zellen des Immunsystems verwendet, um die Analysen an einem "nicht-geschädigten" System durchzuführen. Die Untersuchungen sollen zelltypspezifische Funktionen, wie die Phagozytoseaktivität und die Produktion von freien Radikalen (Superoxide) berücksichtigen. Studien zur Zellzyklusregulation sollen in die Untersuchungen mit eingeschlossen werden. Zur Aufklärung der Wirkmechanismen soll die Expression für die auftretenden biologischen Effekte die relevanten Proteine auf Protein- und eventuell zusätzlich auf Genom-Ebene (mRNA) untersucht werden. Eine Screening-Analyse der Zellextrakte für 512 verschiedene Proteinspezies mit monoklonalen Antikörpern (BD-Array) soll über das durch EMF veränderte Proteinexpressionsmuster Auskunft geben und Kandidatenproteine aufspüren, die dann weiter analysiert werden sollen. Durch diese Studien können Markerproteine oder Gene bestätigt oder neu identifiziert werden, die als Indikatoren oder als Parameter für eine spezifische RF-EMF-Antwort gewertet werden können.

2.1 Arbeitsprogramm

Nach Aufbau der RF-Expositionseinrichtung und Erarbeitung des Expositionsprotokolls in Absprache mit Herrn Dr. Niels Küster, ETH Zürich, wurde als Ausgangsbasis die Radikalbildung in unterschiedlichen Zelllinien und in primär gewonnenen menschlichen Monozyten aus Nabelschnurblut durchgeführt. In der Studie wurden zelltypspezifische Aktivierungsmechanismen auf zellbiologischer (Funktion) und auf biochemischer (Proteom) Ebene nach Exposition mit RF-EMF an nicht aktivierten Makrophagen untersucht. Dabei waren i. die Intensität (SAR: 0,4; 1,0; 1,5; 2, 5 und 10 W/kg) ii. die Pulsmodulierung (on- und off- Zeiten) und iii. die Amplitudenmodulation der Felder variiert. Positivkontrollen (Aktivierung mit TPA, LPS, Hitze) entsprechen den Leitlinien für eine gute Laborpraxis und werden standardmäßig bei Bedarf mitgeführt.

a) Untersuchungen zur Zellaktivierung

1. Präparation der Zellen: Da es sinnvoller erschien mit humanen anstatt mit Mauszellen zu arbeiten wurde das Zellsystem geändert und humane Nabelschnurblutmonozyten anstatt den MBM-Zellen verwendet.
2. Bestimmung der Produktion freier Radikale wie O_2^- und NO. Nach Phagozytose und/oder Aktivierung erhöhen die Monozyten die Ausschüttung von "reactive oxygen species" (ROS) und Stickoxiden (NO) als zytotoxische Abwehrstoffe gegen eingedrungene Pathogene. Daher wurde die Bildung von Superoxid-Radikalen sowie NO in Abwesenheit von Phagozytose nach der EMF-Exposition ermittelt. Die Superoxid-Radikale wurden durch das Nitrotetrazoliumblau-Assay, die ROS durch das DHR-Assay (Durchflußzytometrie), die Stickoxide durch das Griess-Reagenz-System nachgewiesen.

3. Bestimmung der Phagozytoseaktivität der Zellen nach EMF-Expositionen mit unterschiedlichen RF-Signalen: Als Marker für die Phagozytoseaktivität wurden Ultrafeinpartikel (UFP) den Zellen verabreicht und die gebildete ROS-Konzentration als Maß für die Phagozytose ermittelt (Photometrie).
4. Bestimmung der Produktion von Interleukin IL-1 β . Entfallen, da kein Einfluss bei der Phagozytose aufgetreten ist, war dieser Ansatz nicht sinnvoll.
5. Die durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasen und der Apoptose: Gibt Auskunft über die Teilungsaktivität der Zellen, bzw. über die induzierte Apoptose die als weiteres Maß der Aktivierung gewertet werden kann.
6. BrdU-Einbau-Assay zur Bestimmung der DNA-Synthese (S-Phase-Aktivität) unter EMF-Einfluss (Durchflußzytometrie).

a) Proteom-Untersuchungen potentieller Ziel-Proteine

1. Herstellung von Zell-Lysaten in Gegenwart von Proteaseinhibitoren, wobei das Poolen der primären Monozyten notwendig war, um eine genügende Proteinmenge zu erhalten.
2. Protein-Profilung der Lysate an Protein-Arrays (512 verschiedene monoklonale Antikörper), um potenzielle Targetproteine aufzuspüren.
3. Hsp70-Bestimmung, um die Bildung von Stressproteinen nachzuweisen
4. Real-time (RT)-PCR von ausgewählten Proteinen

3 METHODIK

3.1 Kultivierung der Zellen

Für die vorliegende Studie werden humane Monozyten aus dem Nabelschnurblut und humane immunrelevante Zelllinien (Mono Mac 6, K562-Zellen) verwendet. Die humanen Monozyten werden direkt nach der Entbindung aus dem Nabelschnurblut gewonnen (Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Köpcke, Südstadtklinik und Universitäts-Frauenklinik Rostock). Das Blut wird dann durch einen Ficoll-Gradienten vorgereinigt und anschließend werden die Monozyten mit einer anti-CD14-Anikörper gekoppelten Säule (MACS) gereinigt. Mit dieser Technik ist es möglich, eine sehr gut gereinigte Monozytenfraktion zu erhalten. Die für die Untersuchungen verwendeten Zelllinien werden standardmäßig kultiviert.

3.2 Expositionsanlage

Für die Untersuchung der verwendeten Zellen wurde die Hochfrequenzanlage SxC1800, ITIS, Zürich, verwendet. Diese Anlage erzeugt eine konstante stehende Welle mit 1800 MHz, wobei die Felder moduliert werden können. Das verwendete RF-Expositionssystem besteht aus 2 Resonanzkammern (Sham und HF Abb. 4), welche in einem CO₂ Brutschrank (Binder) platziert sind. In den Wellenleitern können je 6 Petrischalen mit Zellen exponiert werden, wobei ein Petrischalhalter die korrekte Platzierung der Petrischalen im Feldmaximum garantiert (Abb. 5). Um eine stabile Exposition sicherzustellen, sind Sensoren in der Anlage

integriert, die die Felder (Angabe in SAR-Wert (W/kg), die Temperatur und die Resonanz kontrollieren. Das Auftreten von Temperaturunterschieden von mehr als 0.3°C kann nach Angabe des Herstellers ausgeschlossen werden, da bei einer Temperaturdifferenz von $> 0,3^{\circ}\text{C}$ zwischen Sham- und Exposition, die Anlage mit Hilfe einer Abschaltautomatik abschaltet (Schuderer et al. 2004). Alle Daten werden kontinuierlich in computergestützten Dateien gespeichert und die verschlüsselten Dateien nach Durchführung der Experimente ausgewertet (Abb. 6).



Abb. 4 Hochfrequenzexpositionssystem SxC1800 ITIS. Links) Signaleinheit, rechts) 2 Resonanzkammer (WG1, WG2).

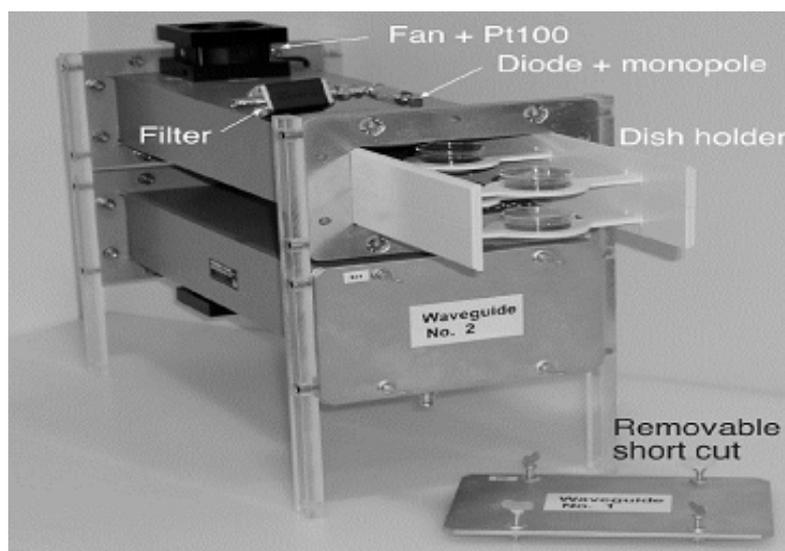


Abb. 5 Innenansicht der Wellenleiter (Wave Guides) mit den herausnehmbaren Petrischalenhalterungen für die 35 mm Petrischalen.

3.3 Exposition der Zellen

Im Allgemeinen werden für die Durchführung der Experimente Standard-Techniken angewendet mit folgender Exposition der Zellen: 45 min Exposition mit 1,8 GHz: a) continuous wave, b) moduliert mit 217 Hz, c) GSM-nonDTX, d) GSM-DTX, e) GSM-Talk, mit SAR-Werten von 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0 W/kg. Die Induktion von ROS wurde zusätzlich bei Exposition mit 5 W/kg und 10 W/kg (im DTX-Modus) untersucht.

Unterschiedliche Zeitregime wurden ebenfalls getestet (5 min on/5 min off für 2 h, 10 min on/10 min off für 2 h, sowie 30 min kontinuierliche Exposition), für die Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen 12 h kontinuierliche Exposition.

Die Expositionen werden mit folgenden Behandlungen (Kontrollen) parallel durchgeführt: Brutschrankkontrolle, Sham, PMA, LPS und Hitze (40°C). Hierbei dient PMA (auch TPA [Tetradecanoylphorbolacetate] genannt) als Positivkontrolle für die Induktion rezeptorunabhängiger Mechanismen, da PMA direkt mit der Proteinkinase C interagiert und somit Signalkaskaden induziert. LPS (Lipopolysaccharid) imitiert das Andocken eines Bakteriums an die Zellmembran und induziert somit einen rezeptorabhängigen Mechanismus, während die Hitzebehandlung Stressinduktion hervorruft. Weiterhin wurden Kombinationen zwischen RF-EMF und Chemikalien durchgeführt um synergistische oder additive Effekte zu beobachten.

Alle Funktionsuntersuchungen wurden in mehreren Parallelansätzen (Durchflußzytometrie = 3, NBT-Assay = 8) und in mehreren unabhängigen Untersuchungen ($n > 3$) durchgeführt.

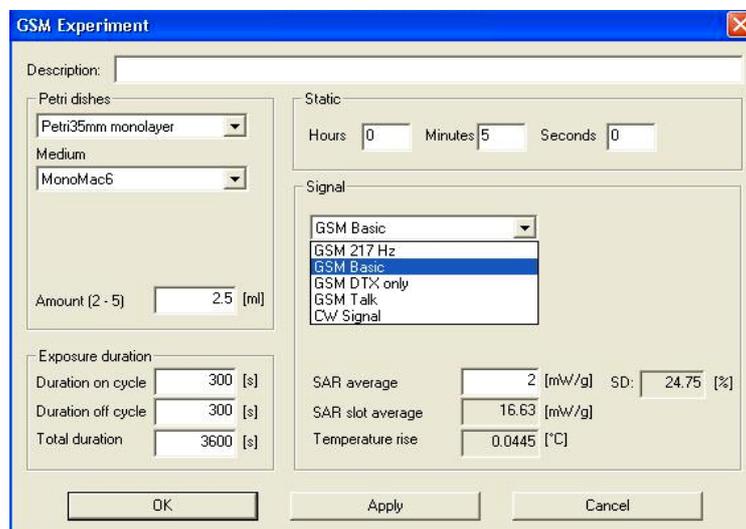


Abb. 6 Computergestütztes Kontrollprotokoll des Expositionssystems von ITIS: Versuchsdauer, Signal, SAR-Wert, Startzeit, Zellen, Petrischalentyp und Füllmenge der Petrischalen.

3.4 Nachweis freier Radikale

Zum Nachweis der Bildung freier Radikale nach der Exposition der Zellen mit Chemikalien (PMA bzw. LPS), Hitze oder RF-EMF wurden zwei verschiedene Techniken verwendet, da die Anwendung der jeweiligen Technik auf den Zelltyp abgestimmt ist. Der kolorimetrische Nachweis von Superoxidanionradikalen gibt die Menge an O_2^- -Radikalen an (NBT-Assay)

während die durchflußzytometrische Methode die Gesamtmenge an freien Radikalen (ROS) nachweist (DHR-Assay). Da ROS aus Superoxideradikalen entstehen, erlauben beide Methoden den direkten Vergleich. Der NBT-Assay ermöglicht acht, der DHR-Assay drei Parallelmessungen.

3.5 Phagozytose

Phagozytierende Makrophagen und Monozyten erzeugen während der Phagozytose im Zellinneren freie Radikale, insbesondere Superoxidradikale. Diese Radikale diffundieren durch die Membran nach außen in die Zellumgebung. Die Bestimmung der extrazellulären Superoxidkonzentration über die Reduktion von Cytochrom C ist eine indirekte Methode durch welche sich Rückschlüsse auf die intrazelluläre Superoxidradikalkonzentration bzw. auf die Phagozytoseaktivität ziehen lassen. Oxidiertes Cytochrom C (Ferricytochrom, Cyt. C³⁺) wird durch sich im Medium befindende Superoxidradikale reduziert (Cyt. C²⁺). Die Reduktion bewirkt eine Absorptionszunahme des Cytochrom C bei 550 nm, welche photometrisch bestimmt werden kann.

3.6 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Für die Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Untersuchungen wurde vor jedem Versuchsansatz eine Zellzahlbestimmung durchgeführt und die Zelldichte entsprechend eingestellt. Hierfür wurden die Zellen resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.7 Zellzyklus Kontrolle

Das Prinzip der Zellzyklusmessung mit Propidiumiodid (PI) beruht auf der Anfärbung der DNA, wobei die Menge des fluoreszierenden Farbstoffes (Stärke des Fluoreszenzsignals) direkt proportional zur Menge an der DNA in der Zelle ist. Die Zellzyklusphasenverteilung wird im Durchflußzytometer in einem Histogramm durch charakteristische Peaks dargestellt. Der G1-Peak stellt in der Regel den größten Peak dar, da sich die meisten Zellen in der G1-Phase befinden. Da apoptotische Zellen einen geringeren DNA-Gehalt besitzen (degradierte DNA), stellen sich die apoptotischen Zellen bei der durchflußzytometrischen Messung als Sub-G1 Peak dar.

3.8 Apoptose-Induktion

RF-EMF, Sham, PMA (1 µM) und/oder Gliotoxin (3 mM, Positivkontrolle) behandelte Mono Mac 6 Zellen wurden für die Ermittlung der Apoptoseinduktion verwendet. Hierfür wurde der Annexin V-FITC/7-AAD Kit (Beckman Coulter) verwendet und durchflußzytometrisch ausgewertet.

3.9 Hitzeschockprotein 70

Die Bestimmung der Hsp70 Expression wurde direkt in den Zellen mit dem Durchflusszytometer mit Anti-Hsp70 Antikörper oder in Zell-Lysaten mittels Immunoblot (SDS-PAGE, Westernblot, Immuninkubation) durchgeführt.

3.10 Protein-Array

Die Veränderungen des Proteinexpressionlevels wurde in humanen Monozyten nach 45 minütiger RF-Exposition an "human BD Biosciences Clontech™ Antibody Microarray 500" (BD Biosciences Clontech, USA) durchgeführt. Die Microarrays (75×25×1 mm) enthalten 512 doppelt gespottete Antikörper mit positiven and negativen Kontrollen. Drei Arrays wurden verwendet: Kontrolle, Sham und exponiert.

Die Fluoreszenzfärbung der Proteine erfolgte mit Cy5 (rot) und Cy3 (grün). Die Färbung generierte somit Verhältnisse (Ratio) zwischen exponierten, nicht-exponierten oder sham-exponierten Lysaten (Cy5/Cy3 and Cy3/Cy5). Zwei Arrays pro Ansatz wurden verwendet, so dass für die Auswertung vier Datenpunkte erhalten wurden (doppelt gespottete Antikörper per Array x zwei). Die Zellen (100 mg) wurden von 67 gesunden Spendern gesammelt und nach der Präparation mit GSM-DTX RF-EMF (2 W/kg) für 45 min exponiert. Die Auswertung erfolgte mit dem GenePix Pro 5.0 Software (Axon Instruments, USA). Diese Untersuchung wurde im Auftrag von BD Biosciences in Heidelberg (Dr. C. Märcker, DKFZ) durchgeführt.

3.11 Real time RT-PCR

Die gepoolte gesamt RNA exponierter, nicht-exponierter oder sham-exponierter humaner Monozyten wurde von 20 gesunden Spendern nach Standardmethoden gereinigt und in cDNA umgeschrieben. Drei unabhängige Untersuchungen wurden für die real time RT-PCR mit folgenden Primern durchgeführt: HPRT - 345 bp, (forward) 5'-acgtcttgctcgagatgtga-3', (reverse)- 5'-cttgcgaccttgaccatctt-3'; Raf 1 - 280 bp, (forward) 5'-agtgttcagactctccacgaac-3', (reverse) 5'-gatgttactccagtcacacaca-3'; PIK3R1 - 200 bp, (forward) 5'-agcagtaaacagggtgctatg-3', (reverse) 5'-tcaatgtcacactagcctacc-3'; CCNC - 251 bp, (forward) 5'-cggatctttgctactgtatcc-3', (reverse) 5'-ctctccttcactgtttggaggt-3'. Die Menge der mRNA von HPRT, PIK3R1, CCNC and Raf 1 wurde mit der Korrelation zu einer Standardkurve (Threshold Cycle (C_T)) verglichen und berechnet.

3.12 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten zur Induktion von Superoxidradikalen, ROS und Cytochrom C (Phagozytoseaktivität) erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen ungepaarten Student t-Tests. Jeweils 3 oder 8 Parallelansätze wurden gemittelt. Die Daten der unabhängigen Untersuchungen wurden durch die dazugehörigen Kontrollen geteilt und diese E/C-Werte für die Ermittlung der Signifikanzanalyse der t-Tests verwendet (p≤0,05).

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Hsp70 Expression mit Hilfe des Immunoblots wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten Student t-Test und dem n-abhängigen t-Test gegen eine Konstante ausgewertet, um signifikante Unterschiede im Vergleich von Kontrolle und

Experiment aufzuzeigen. Für den t-Test wurden jeweils gegen Tubulin normierte Werte verwendet. Die jeweilige Bandenintensität, der zu untersuchenden Proteine, wurde zunächst durch die dazugehörige Tubulinbandenintensität geteilt. In einem zweiten Schritt wurden die Ergebnisse der einzelnen Parallelmessungen einander gleichgestellt, indem die normierten Rohdaten durch die jeweilige Kontrolle geteilt wurden (E/C-Werte). Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte unter Verwendung der E/C-Werte, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$. Für die Auswertung der Hsp70 Expression unter Verwendung des Durchflusszytometers war keine Normierung der Daten notwendig. Für die Ermittlung der Signifikanz ($p \leq 0,05$) unter Verwendung des zweiseitigen, gepaarten t-Tests wurden die Rohdaten durch die Kontrolldaten geteilt (E/C).

3.13 Durchführung

Die Bildung freier Radikale wurde in humanen Nabelschnurblut-Monozyten, Mono Mac 6 und/oder K562 Zellen nach a) RF-EMF-Exposition, b) 1 μ M PMA (aktiviert PKC), c) 1 μ g/ml LPS (Rezeptoraktivierung), d) Hitze (40°C oder 42°C) sowie e) in Koexposition RF/Chemikalien oder Ultrafeinpartikel untersucht. Die Zellen wurden mit 1800 MHz RF-EMF (IT'IS, Zürich, Schweiz) oder mit den Chemikalien oder Hitze für 45 Minuten oder mit intermittierenden Zeitregimes (wie angegeben) behandelt. Als Negativkontrollen wurden jeweils ein schein-exponierter Ansatz (Sham) und eine Brutschrankkontrolle parallel mitgeführt. Die RF-EMF Exposition wurde mit unterschiedlichen Signalen (continuous wave, 217 Hz, GSM-non DTX, GSM-DTX, GSM-Talk oder andere) und SAR-Werten (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 5,0 oder 10 W/Kg durchgeführt. Daten wurden mit Sham und/oder Brutschrankkontrolle verglichen und die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Student-t Test ($p < 0,05$) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

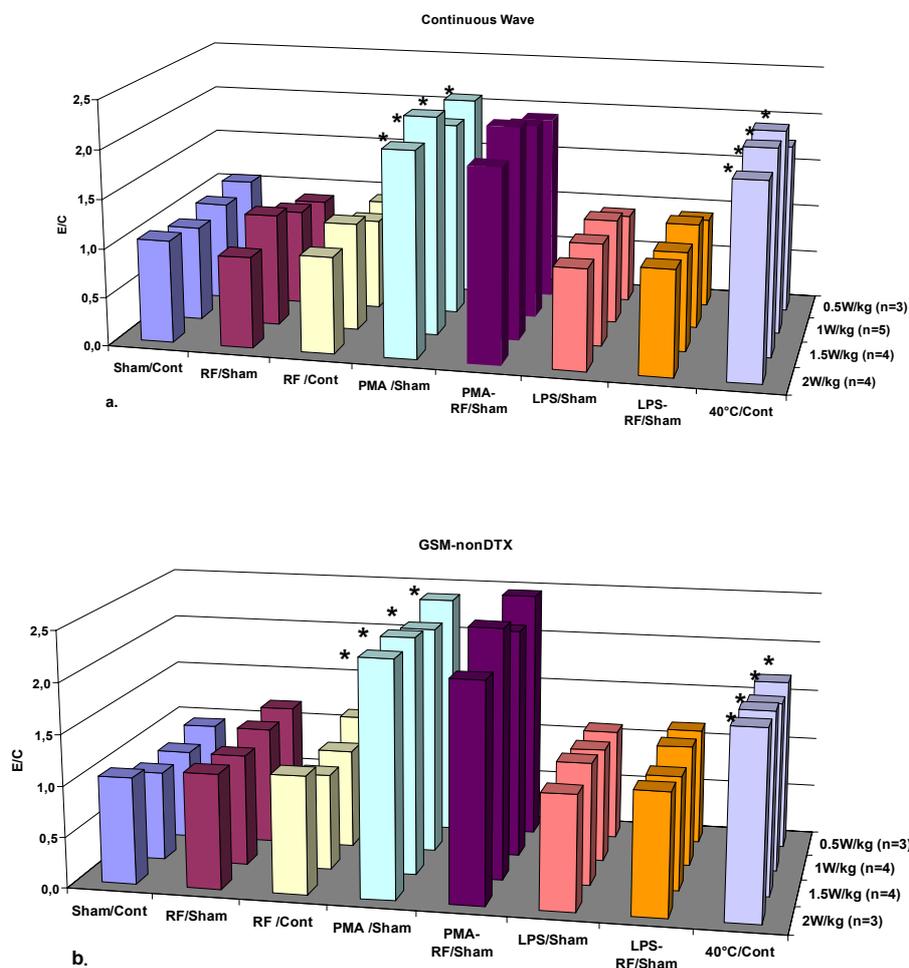
4.1 Bildung freier Radikale

Die Hitze (40°C) und die PMA-Behandlungen der Zellen verursachen eine signifikante Zunahme der Superoxidanionradikal- und der ROS-Produktion in fast allen untersuchten Zellen sowohl im Vergleich zur Sham-Exposition als auch zur Brutschrankkontrolle (Abb. 7). Die verwendeten K 562 Zellen werden durch die PMA-Behandlung in die Ausdifferenzierung getrieben, so dass sie nicht in der Lage sind, freie Radikale zu produzieren. Dieses Phänomen ist aus der Literatur bekannt und hat sich in unserem Ansatz bestätigt (Abb. 8). Die negativen Resultate bezüglich der LPS-induzierten Superoxidradikalproduktion in Mono Mac 6 Zellen sind durch das Fehlen des LPS-Rezeptors dieser Zellen bedingt, was ebenfalls in unserem Ansatz bestätigt werden konnte. Die humanen Monozyten sind unveränderte Zellen und werden deshalb im Vergleich für die weiteren Analysen verwendet.

Die Untersuchungen mit unterschiedlichen Signalen (continuous wave, 217 Hz, GSM-nonDTX und GSM-Talk) und SAR-Werten bis 2 W/kg zeigten keinen Einfluss auf die freie Radikalproduktion in den verwendeten Zellen. Wurden jedoch die humanen Monozyten oder

die Mono Mac 6 Zellen mit 2 W/kg GSM-DTX-Signal exponiert, stieg die Superoxidradikalanion- und die ROS-Produktion (signifikant) um den Faktor 1.4 im Vergleich zur Sham-Exposition an (Abb. 7-9), jedoch nicht im Vergleich zur Brutschrankkontrolle. Diese Resultate konnten mit den K562 Zellen nicht gezeigt werden (Abb. 8). Es scheint, dass es sich um eine zelltypspezifische Antwort auf einen unbekanntem physikalischen Parameter im Sham-Ansatz handelt.

Zusammenfassend zeigen die bisher erhaltenen Ergebnisse, dass die verwendeten RF-Expositionen continuous wave, 217 Hz, GSM-nonDTX und GSM-Talk keine Induktion von Superoxidradikal- und ROS-Produktion in den getesteten Zellen hervorgerufen haben. Bei der Verwendung des GSM-DTX-Signals trat jedoch bei 2 W/kg eine Herabsenkung des Kontrolllevels in der Sham-Exposition auf, die zu einer signifikanten Steigerung der freien Radikalbildung in den exponierten Zellen führt. Es stellt sich die Frage, ob der im scheinexponierten Ansatz induzierter Effekt durch die RF-Exposition wieder aufgehoben wird (entgegengesetzte Wirkung) und somit das Kontrollniveau wieder erreicht, da der unbestimmter physikalischer Parameter, welcher die Effekte auslöst in beiden Expositionskammern vorhanden sein könnte, oder ob dieser Sham-Effekt nur in den Sham-Wave Guides auftritt.



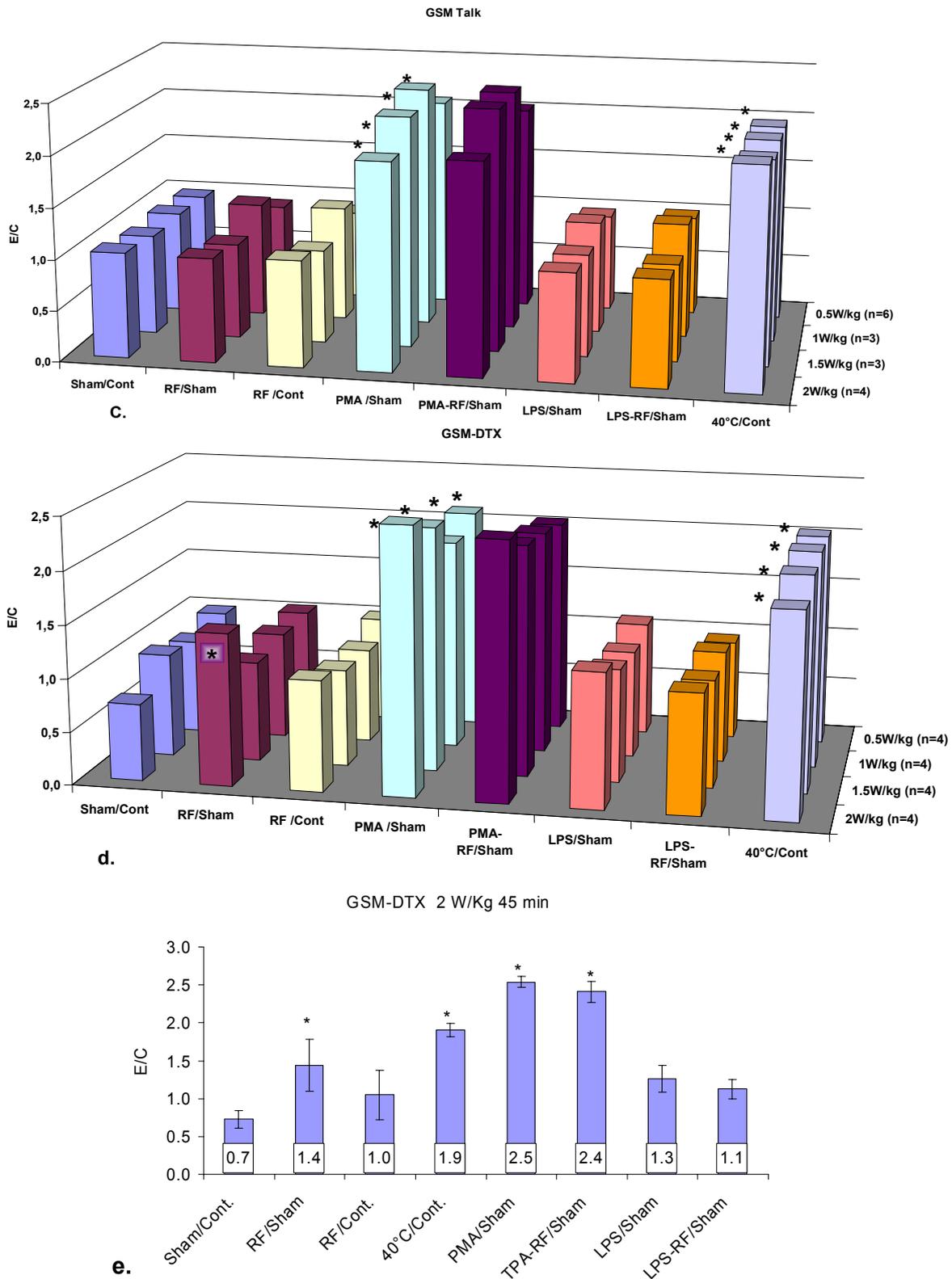


Abb.7 Bildung von Superoxidradikalanionen (NBT-Assay) in humanen Mono Mac 6 Zellen nach der Exposition mit unterschiedlichen RF-EMF Signalen für 45 min und unterschiedlichen SAR-Werten (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 W/kg). Der Nachweis erfolgte mit dem kolorimetrischen NBT-Assay. a) continuous waves, b) GSM-nonDTX, c) GSM-Talk und d) GSM-DTX. e) zweidimensionalen Darstellung der GSM-DTX Ergebnisse (\pm SD). Die Inkubation der Zellen mit LPS (1 μ g/ml), PMA (1 μ M) und die Hitzebehandlung (40°C) wurden als Positivkontrollen verwendet. Die Standardabweichungen sind wegen der besseren Übersichtlichkeit in a.-d. nicht dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte von 3-6 unabhängigen Untersuchungen (n) mit 8 Parallelmessungen. * zeigen die signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollen ($p < 0.05$).

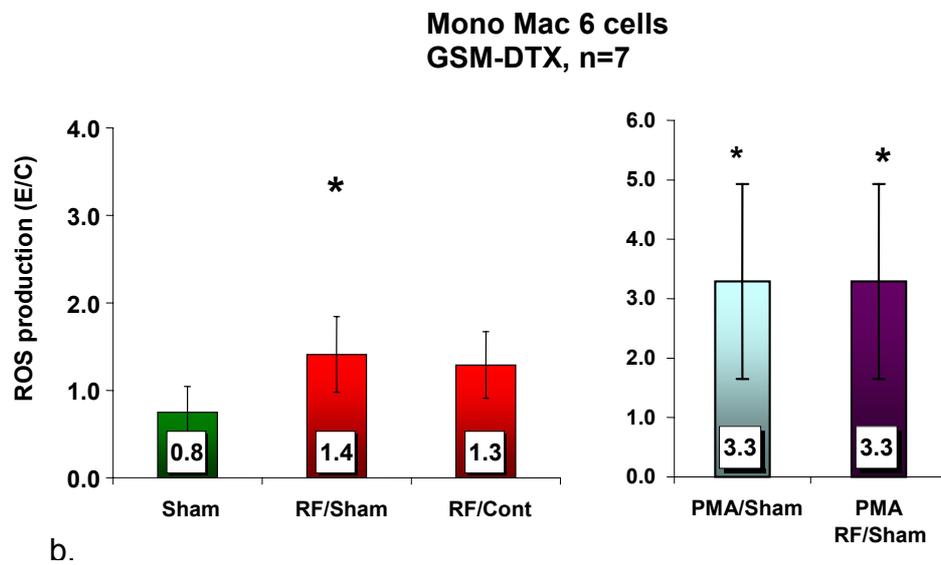
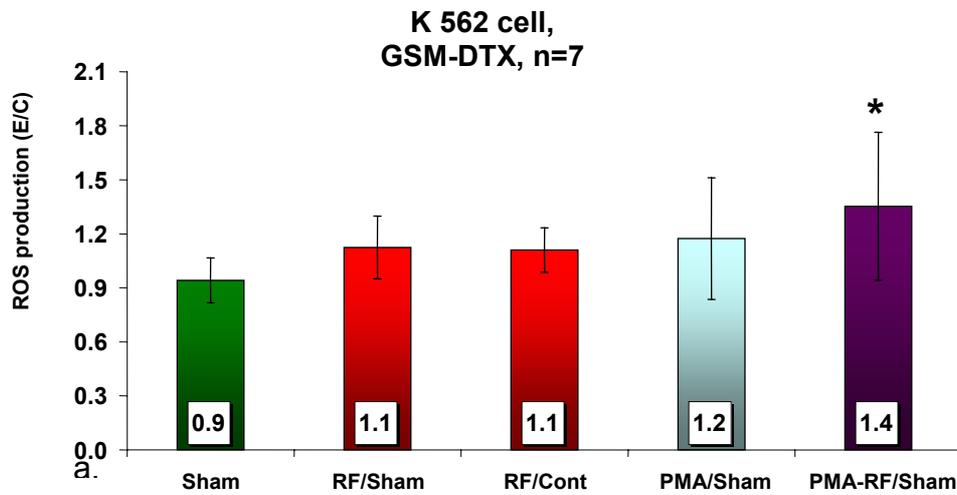


Abb. 8 Nachweis der ROS-Produktion in a) K 562 and b) Mono Mac 6 Zellen nach der Exposition mit GSM-DTX Signal und 2 W/kg für 45 min, mit dem DHR-Assay. * zeigen die signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollen ($n>5$, $p<0.05$).

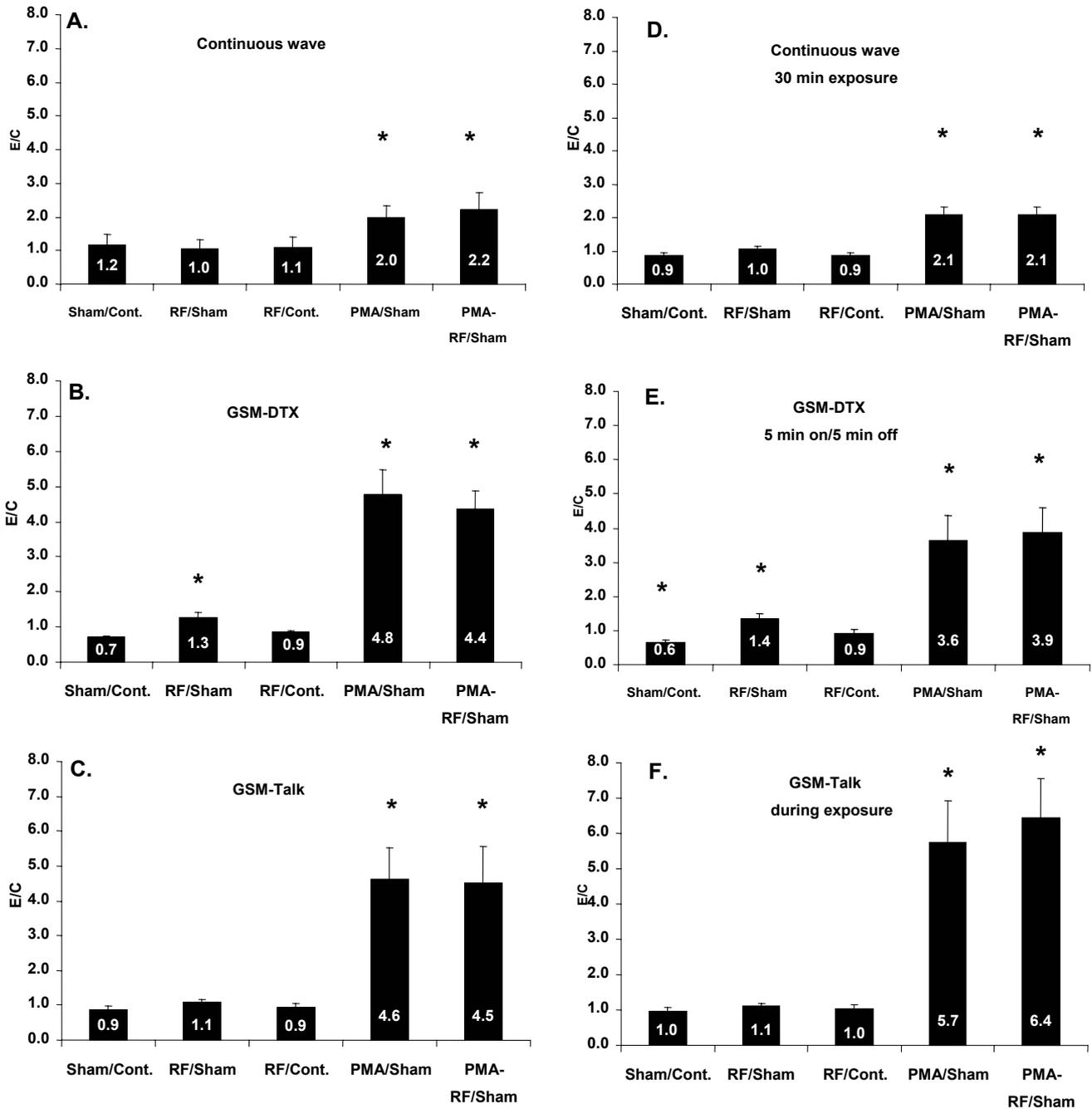


Abb. 9 Nachweis der Bildung von ROS in humanen Monozyten aus dem Nabelschnurblut nach RF-EMF Exposition mit 2 W/kg und unterschiedlichen Signalen und Expositionszeiten. a) continuous wave b) GSM-DTX, c) GSM-Talk(nonDTX) für 45 min Exposition d) continuous wave für 30 min e) GSM-DTX für 5 min on/5 min off für 45 min und f) GSM-Talk(nonDTX) während der Exposition für 30 min. * zeigen die signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollen ($n > 5$, $p < 0.05$).

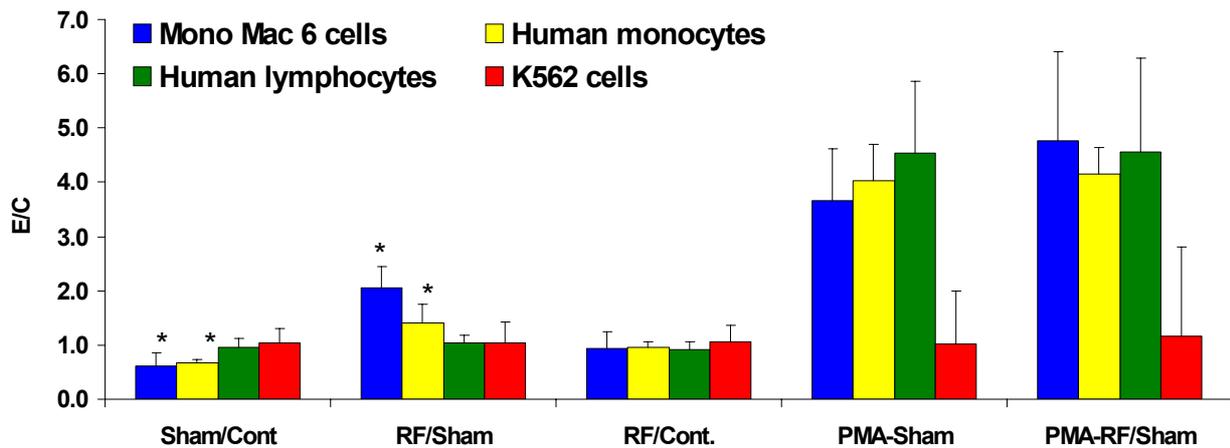


Abb. 10 ROS-Bildung in unterschiedlichen Zellen nach der Exposition mit dem DTX Signal (2 W/kg, 45 min). Es wurden mindestens 3 aber meist mehrere unabhängige Untersuchungen mit jeweils 3 Parallelen zusammengefasst (SD). Signifikante Unterschiede wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

4.1.1 Exposition der Mono Mac 6 Zellen mit 2, 5 oder 10 W/kg SAR Wert (DTX-Signal) für 45 Minuten

Um den so genannten Sham-Effekt aufzuklären, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Kuster (ETH Zürich) ein neues Expositionsprotokoll erarbeitet und ein neuer Verstärker installiert und alle Untersuchungen erneut durchgeführt. Expositionen der Mono Mac 6 Zellen mit 2, 5 und 10 W/kg wurden mit dem DTX Signal für 15 und für 45 min durchgeführt. Wie die Abbildung 11 zeigt, verursachen 2 und 10 W/kg SAR (45 min) die Verringerung der ROS-Bildung im Sham in Vergleich zu den Kontrollen. Der Wert nach der Exposition mit 5 W/kg SAR ist geringer als die Kontrolle, dieser Wert ist jedoch nicht signifikant. Entsprechend sind die Vergleiche zwischen Sham und RF nach 2 und 10 W/kg SAR positiv ausgefallen, während der 10 W/kg-Wert wegen der größeren Varianz der Daten nicht signifikant ist. Der Vergleich zwischen RF und Kontrollwert zeigt, dass alle Expositionen geringer als die Kontrollen ausfallen, diese sind jedoch nicht signifikant. Aufgrund der Ergebnisse ist es offensichtlich, dass die Sham-Exposition bei 2 und 10 nicht aber bei 5 W/kg SAR eine Herabsenkung der ROS-Produktion induziert. Erwartet wurde eine kontinuierliche SAR-abhängige Veränderung der ROS-Produktion, dies jedoch konnte nicht ermittelt werden. Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt um den Effekt aufzuspüren. Untersuchungen wurden durchgeführt zu den Kontrollen (Sham/Sham), zur Temperaturabfall oder Anstieg, zur Medium-Verdunstung, Vibration, Einkoppelung von Feldern in die Sham.Kammer und zur pH-Änderung aber ohne Erfolg. Die genannten Parameter waren konstant geblieben, sodass dieser Ansatz nicht zum Aufklärung des Sham-Effektes geführt hat.

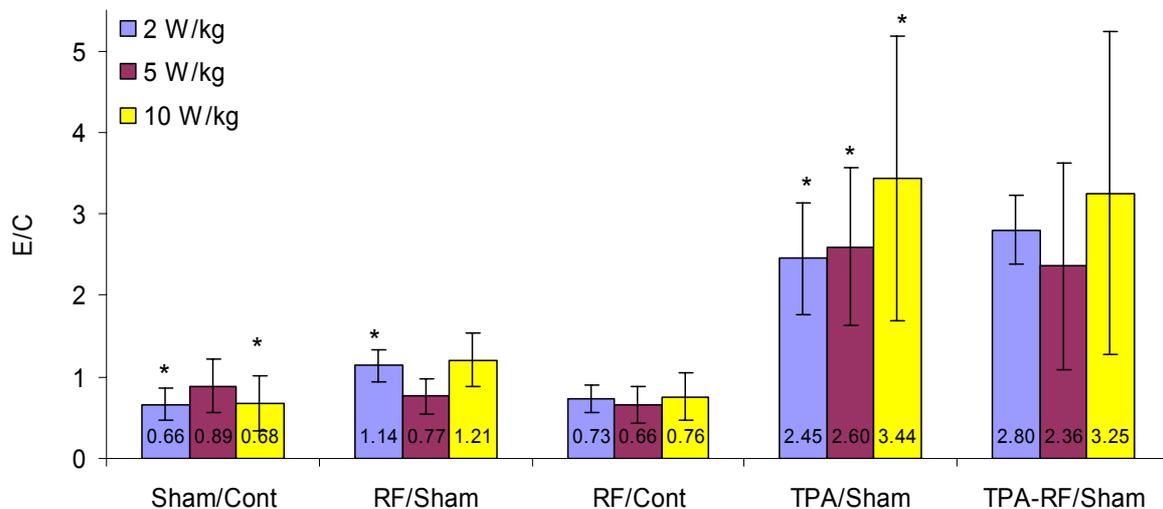


Abb. 11 ROS-Produktion in Mono Mac 6 Zellen nach der Exposition mit dem DTX Signal mit 2, 5 und 10 W/kg SAR. Es wurden 3 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 3 Parallelen zusammengefasst (SD). Signifikante Unterschiede wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

4.1.2 ROS-Produktion nach Exposition mit Frequenzmodulierten 1800 MHz RF-EMF

Um zu untersuchen, ob die ermittelten Sham-Effekte von der Frequenzamplitude des RF-EMF Feldes abhängig sind, wurden die Mono Mac 6-Zellen mit 1800 MHz exponiert, wobei das RF-Signal unterschiedlich (2 Hz, 8 Hz, 50 Hz und 217 Hz) moduliert und die ROS-Produktion in Folge untersucht wurde. Da das DTX Signal diese Modulationen beinhaltet wurden diese Frequenzen gewählt. Die 50 Hz Modulation wurde zusätzlich gewählt, da Mobiltelefone generell ein 50 Hz Signal aufweisen.

In Abbildung 12 ist die ROS-Produktion der Untersuchungen mit dem frequenzmodulierten 1800 MHz mit einem durchschnittlichen SAR-Wert von 2 W/kg für 45 min Expositionszeit dargestellt. Es wurde eine sehr stark erhöhte ROS-Bildung bei den scheinexponierten Zellen mit 2 Hz Signal festgestellt. Mit 4-fach erhöhtem Wert im Sham ist der gemessene ROS-Wert signifikant größer als der Kontrollwert. Da RF ebenfalls die Erhöhung an ROS induziert, ist dieser Wert (als E/C) unverändert. Der Vergleich zwischen RF und Kontrolle bestätigt, dass sowohl Sham als auch RF die ROS-Produktion modulieren.

Interessanterweise ist der Einfluss im Sham mit den 8 und 217 Hz modulierten Signalen negativ. Die RF-Expositionen induzieren im Gegensatz die Herabsenkung der ROS-Bildung sowohl im Vergleich RF/Sham als auch RF/Kontrolle. Das 50 Hz modulierte Signal induziert sowohl im Sham als auch in RF die Absenkung der ROS-Produktion, dass keine Veränderung im Vergleich RF/Sham zur Folge hat. Bemerkenswert sind die Ergebnisse der Positivkontrollen. Auch diese wurden sowohl im Sham als auch in der Koexposition mit RF

moduliert. Es scheint, dass alle Frequenzmodulationen die Zellen Aktivieren oder Inhibieren. In der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse könnte die Frequenzmodulation als Ursache für den Sham-Effekt in Betracht gezogen werden, wobei die 2, 8 und 217 Hz Modulationen eine wichtige Rolle spielen.

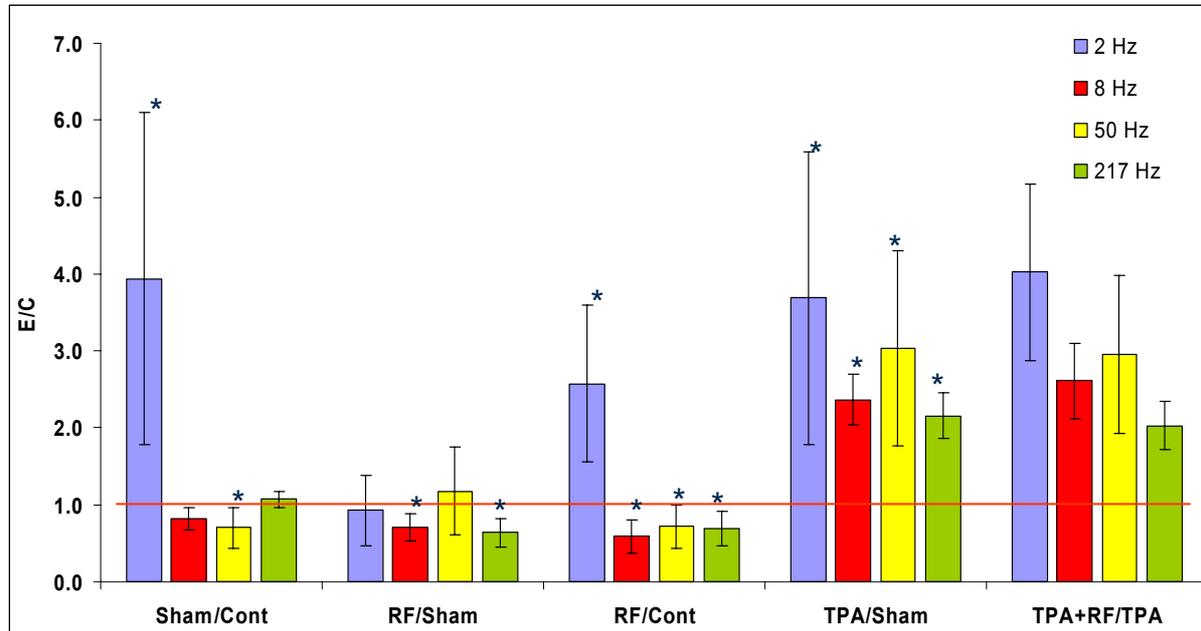


Abb. 12 ROS-Bildung in Mono Mac 6 Zellen nach 45 Minuten Expositionszeit mit 1800 MHz RF-EMF, 2 W/kg gepulst mit 2, 8, 50 oder 217 Hz.. Es wurden 3 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 3 Parallelen zusammengefasst (SD). Signifikante Unterschiede wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

4.2 Phagozytose von Ultrafeinpartikeln

Die Mono Mac 6 Zellen entstammen einer humanen Monozyten Zelllinie und sind in der Lage, Partikel durch Phagozytose ins Zellinnere aufzunehmen. Um diesen Vorgang zu dokumentieren, wurden die Zellen mit Ultrafeinpartikeln (UFP) versetzt und der Verlauf der Phagozytose mikroskopisch festgehalten.

Mono Mac 6 Zellen besitzen eine kugelige Form mit einem Durchmesser von 10-15 μm , einen großen, mittig im Zelllumen gelagerten Zellkern und einen schmalen Zytoplasmasaum (Abb. 13). Bereits nach kurzer Zeit lagern sich UFP-Koagulate an den Zellen an und die Zellen beginnen einzelne Partikel zu phagozytieren. Die UFP liegen zunächst, trotz Ultraschallbehandlung, als Koagulate vieler einzelner Partikel vor. In Abbildung 13c ist der Zustand der Mono Mac 6 Zellen nach 5 h Inkubation mit UFP aufgezeigt. Einige UFPs wurden bereits ins Zytoplasma der Zelle aufgenommen und sind im Bild als dunkle Punkte gut zu erkennen (Pfeile).

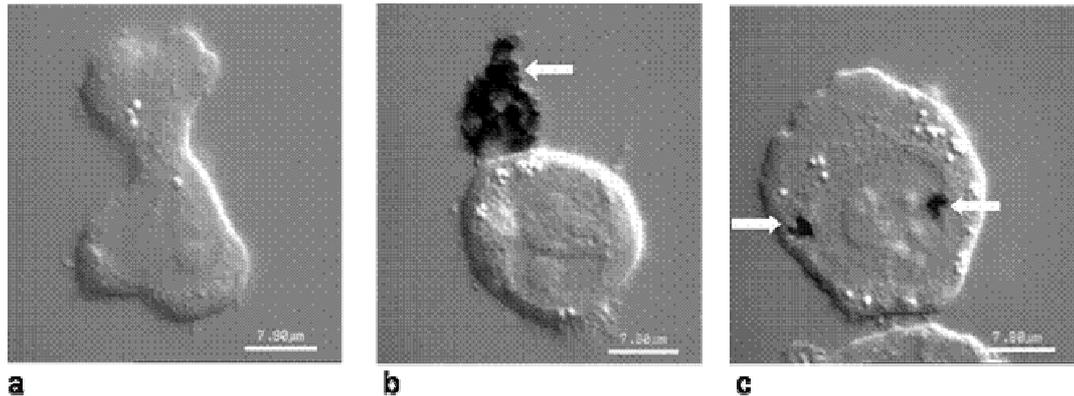


Abb. 13 Differential-Interferenzkontrast-mikroskopische (DIC) Aufnahmen der Mono Mac 6 Zellen vor und während der Inkubation mit Ultrafeinpartikeln. Mono Mac 6 Zellen a) ohne UFP, b) 0 h nach UFP Gabe (Pfeil zeigt Koagulat von UFP außerhalb der Zelle) und c) 5 h nach UFP Gabe (Pfeile zeigen phagozytierte UFP im Zytoplasma).

4.2.1 Superoxidradikalbildung als Maß der Phagozytoseaktivität

Um zu bestimmen, welche Wirkung RF-EMF und UFP auf die Aktivierungskapazität von Mono Mac 6 Zellen ausüben, wurden Untersuchungen zur Bestimmung der Superoxidradikalproduktion als Maß der Phagozytoseaktivität in den Zellen vorgenommen. Die Analyse der Superoxidradikalkonzentration erfolgte dabei indirekt über die Bestimmung der Cytochrom C Reduktion. Für die Exposition der Zellen mit RF-EMF wurden 3 verschiedene RF-Signale verwendet: CW, 217 Hz und GSM-nonDTX. Die Exposition erfolgte für 1 h bei einem SAR-Wert von je 2 W/kg. Außerdem erfolgte eine Koexposition der Zellen mit UFP und mit RF-EMF. Als Vergleich dienten unbehandelte, Sham exponierte und bei 42-43 °C für 1 h hitzeexponierte Zellen. Die verschiedenen Ansätze wurden untereinander und mit den dazugehörigen Kontrollen verglichen. Insgesamt wurden 8 unabhängige Untersuchungen mit je 8 Parallelen zusammengefasst. In den Untersuchungen zeigte sich, dass die Mono Mac 6 Zellen in jedem Fall durch Stressinduktion (Erwärmung) aktivierbar sind (Abb. 14). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen stieg die Superoxidradikal- Konzentration signifikant auf das 1,15-1,21fache an. Andererseits war nach Exposition der Zellen mit RF-EMF in keinem der Signale ein Anstieg der Superoxidradikalkonzentration festzustellen. Die Inkubation der Zellen mit UFP führte bei allen Untersuchungen zu einem signifikanten Anstieg der Superoxidradikalkonzentration auf das 1,45fache (CW), 1,40fache (217 Hz) und 1,42fache (GSM-nonDTX), im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Durch die Kombination von RF-EMF und UFP konnte die Steigerung der Superoxidradikalkonzentration nicht weiter erhöht werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Aktivierung der Zellen sowohl durch Inkubation mit UFP, als auch durch Hitzestressbehandlung möglich ist. Durch RF-EMF sind Mono Mac 6 Zellen zur ROS-Produktion nicht aktivierbar.

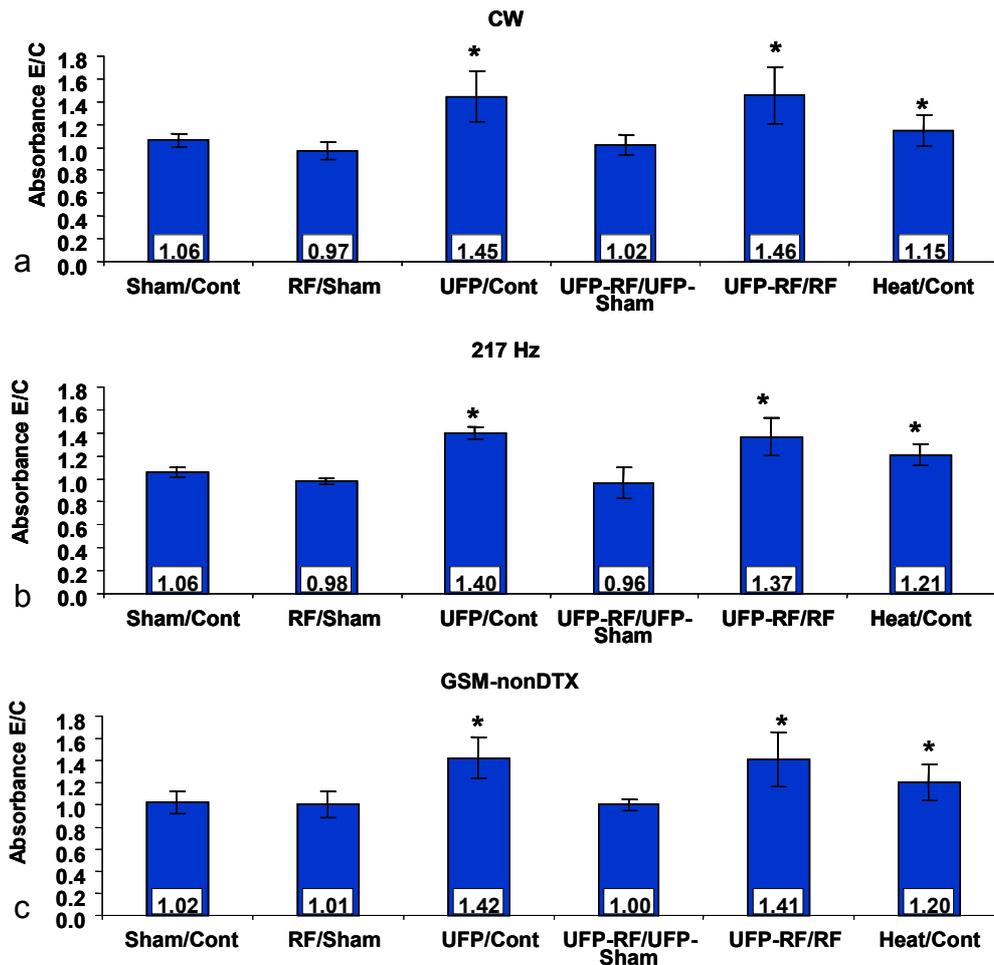


Abb. 14 Superoxidradikal Produktion in Mono Mac 6 Zellen nach Exposition mit verschiedenen RF-EMF Signalen für 1h mit 2 W/kg SAR-Wert in Abwesenheit oder in Gegenwart von Ultrafeinpartikeln (UFP, 5 h, 100 µg/ml). Als RF-Signale wurden a) Continuous Wave, b) 217 Hz und c) GSMnon-DTX modulierte 1800 MHz-Felder verwendet. Als Positivkontrolle diente die Hitzeexposition der Zellen bei 42-43 °C (1 h). Die Balken zeigen die Mittelwerte von je 8 unabhängigen Experimenten mit 8 Parallelen.

4.3 Hsp70 Expression

4.3.1 Zeitabhängige HSP70 Expression

In den Untersuchungen wurde der Zeitpunkt der maximalen Hsp70 Expression in den Mono Mac 6 Zellen nach Hitzeinduktion bestimmt. Die Hsp70 Expression wurde von 0-24 h nach Exposition mit 42-43 °C Hitze ermittelt. Nach 2-6 h kann eine vermehrte Expression von Hsp70 (1,51-1,56fache Erhöhung) in den Zellen festgestellt werden, diese sinkt jedoch nach 8- 12 h wieder auf annähernd Kontrollniveau (1,16fache nach 12 h). Im Verlauf von 8 h nach Absinken der Hsp70 Expression kann ein erneuter Anstieg verzeichnet werden. Die Konzentration von Hsp70 in den Zellen steigt dabei fast auf das Doppelte (24 h, 1,90fache) der Kontrollkonzentration (Abb. 15). In weiterführenden Untersuchungen wurde die Hsp70 Konzentration der Mono Mac 6 Zellen jeweils erst 2 h nach Exposition bestimmt. Die Hsp70 Konzentration war in den Zellen zwar nach 24 h am höchsten, messtechnisch gesehen war ein kürzerer Zeitraum (2 h) günstiger.

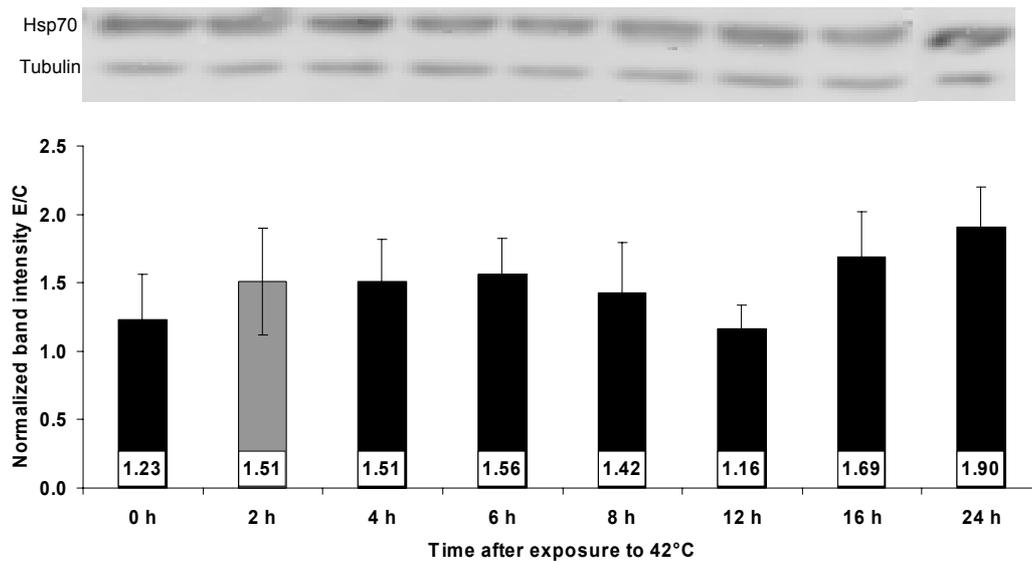


Abb. 15 Bestimmung der zeitabhängigen Hsp70 Expression in Mono Mac 6 Zellen nach Hitzeexposition (42-43 °C für 1 h) im Westernblot. Die Balken stellen die Mittelwerte der Bandenintensitäten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-6 parallelen Untersuchungen dar (SD). Für die semiquantitative Bewertung wurden die Hsp70 Banden mit der dazugehörigen Tubulinbande normiert. Oben ist ein repräsentatives Beispiel der zeitabhängigen Proteinexpression im Westernblot abgebildet.

4.3.2 Hsp70 Expression im Gesamtzellysat

Wie in den Untersuchungen zur Phagozytose wurden auch in den Analysen zur Bestimmung der Hsp70 Expression die 3 RF-Signale CW, 217 Hz und GSMnon-DTX verwendet (1 h mit 2 W/kg). Die Wirkung von UFP auf die Proteinexpression wurde durch die Inkubation der Zellen für 5 h mit UFP (Endkonzentration 100 µg/ml) untersucht (Abb. 16).

Die Daten zeigen weiterhin, dass durch Hitzestress die Produktion von Hsp70 signifikant steigt. Im Vergleich mit den unbehandelten Zellen erhöht sich die Hsp70 Konzentration auf das 1,51-1,65fache. Durch die Exposition der Zellen mit RF-EMF konnte dagegen bei keinem der Signale eine signifikante Steigerung der Hsp70 Expression induziert werden, wenn diese zu Sham verglichen wurden. Auch die Inkubation der Zellen mit UFP führte nicht zu einer Steigerung der Hsp70 Konzentration in den Zellen. Es lässt sich erkennen, dass ausschließlich die Induktion von Hitzestress in den Mono Mac 6 Zellen zu einer Steigerung der Hsp70 Expression führt.

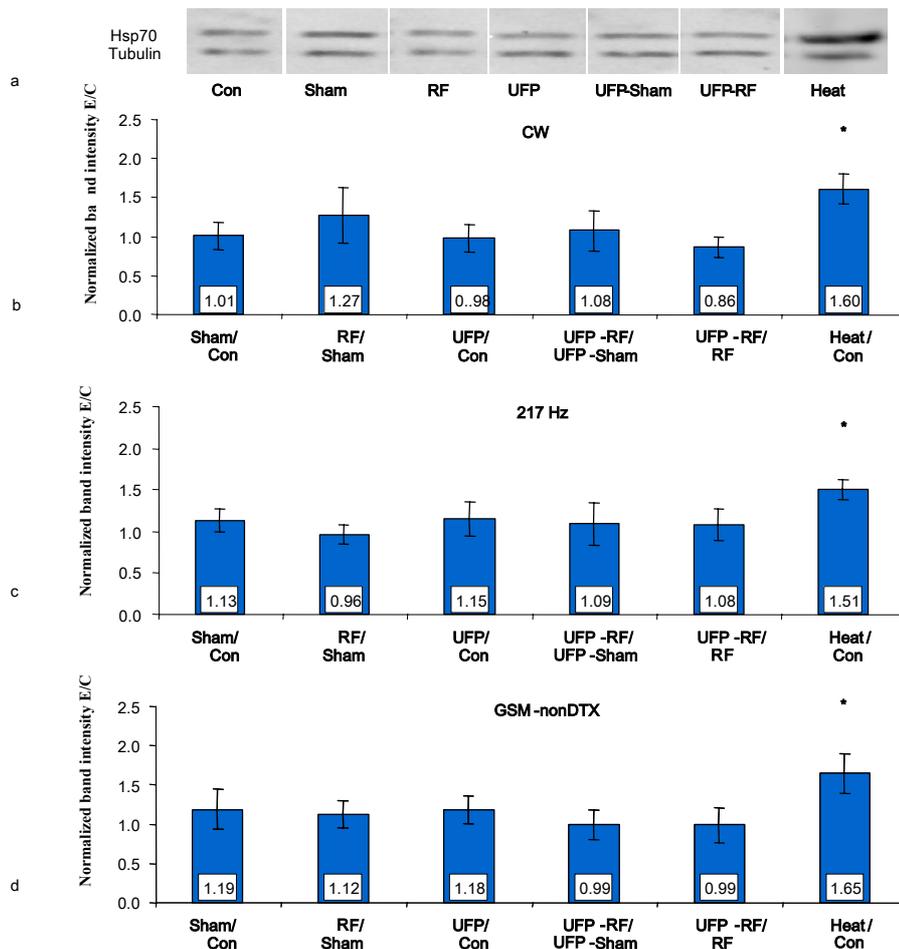


Abb. 16 Hsp70 Expression in Mono Mac 6 Zellen nach Exposition mit RF-EMF und /oder UFP nach der Exposition mit CW, 217 Hz und GSMnon-DTX Signalen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen wurden mit einem * gekennzeichnet ($n > 9$; $p < 0,05$, t-Test gegen eine Konstante). Oben ist das repräsentative Bandenmuster der Hsp70 Expression im SDS-Page zu sehen.

4.3.3 Hsp70 Expression in Einzelzellmessungen nach der Exposition mit unterschiedlichen RF-Signalen und SAR-Werten

Um die Ergebnisse der Westernblot Analysen zu verifizieren, wurden Einzelzellmessungen von Mono Mac 6 Zellen zur Hsp70 Expression durchflusszytometrisch durchgeführt, um geringfügige Veränderungen in der Hsp70 Expression genauer zu ermitteln. Für die Untersuchungen wurden mit den 217 Hz Signal RF exponierte Zellen verwendet. Die Untersuchungen zeigen, dass durch Hitzebehandlung, die Konzentration von Hsp70 in den Zellen signifikant gesteigert werden kann. Die Werte verdoppeln sich dabei im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 17). Durch die Exposition mit allen Signalen (2 W/kg) und drei unterschiedlichen Zelltypen (konnte keine Steigerung der Hsp70 Expression induziert werden (Abb. 18).

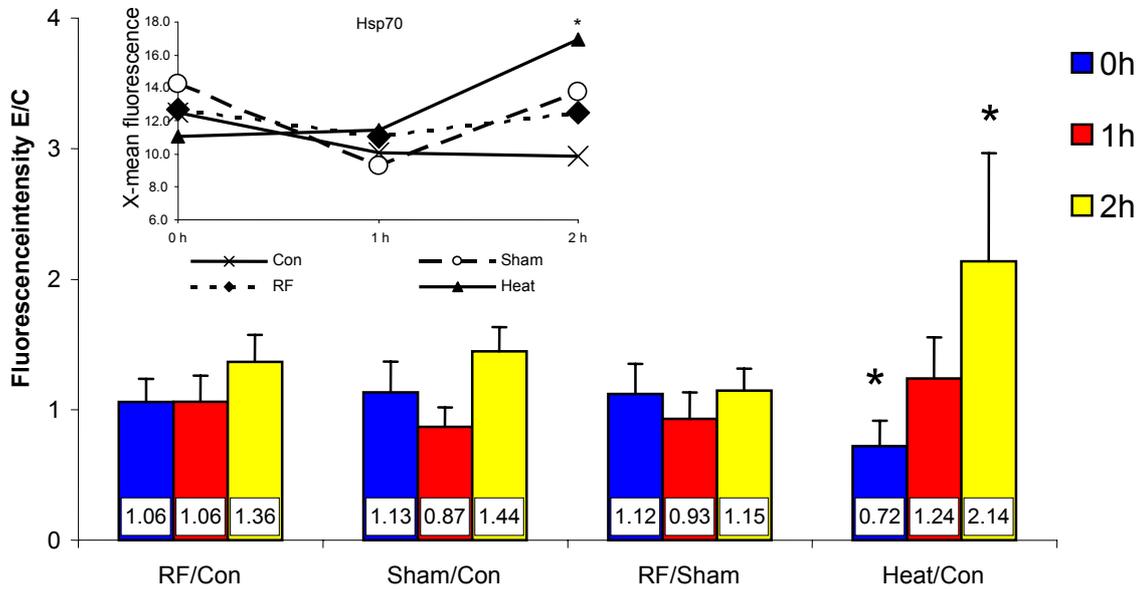


Abb. 17 Graphische Darstellung der Hsp70 Expression in Mono Mac 6 Zellen nach Exposition mit dem 217 Hz RF-Signal (2 W/kg). Die Balkenmuster zeigen die zeitabhängige Proteinexpression nach 0 h, 1 h und 2 h. Als Vergleich für die Hsp70 Expression dienten 1 h bei 42-43 °C hitzeexponierte, Sham exponierte und unbehandelte Zellen. Gezeigt sind die E/C Werte der Rohdaten. Es wurden 5 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 2-3 Parallelen zusammengefasst und graphisch dargestellt (SEM aufgezeigt). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

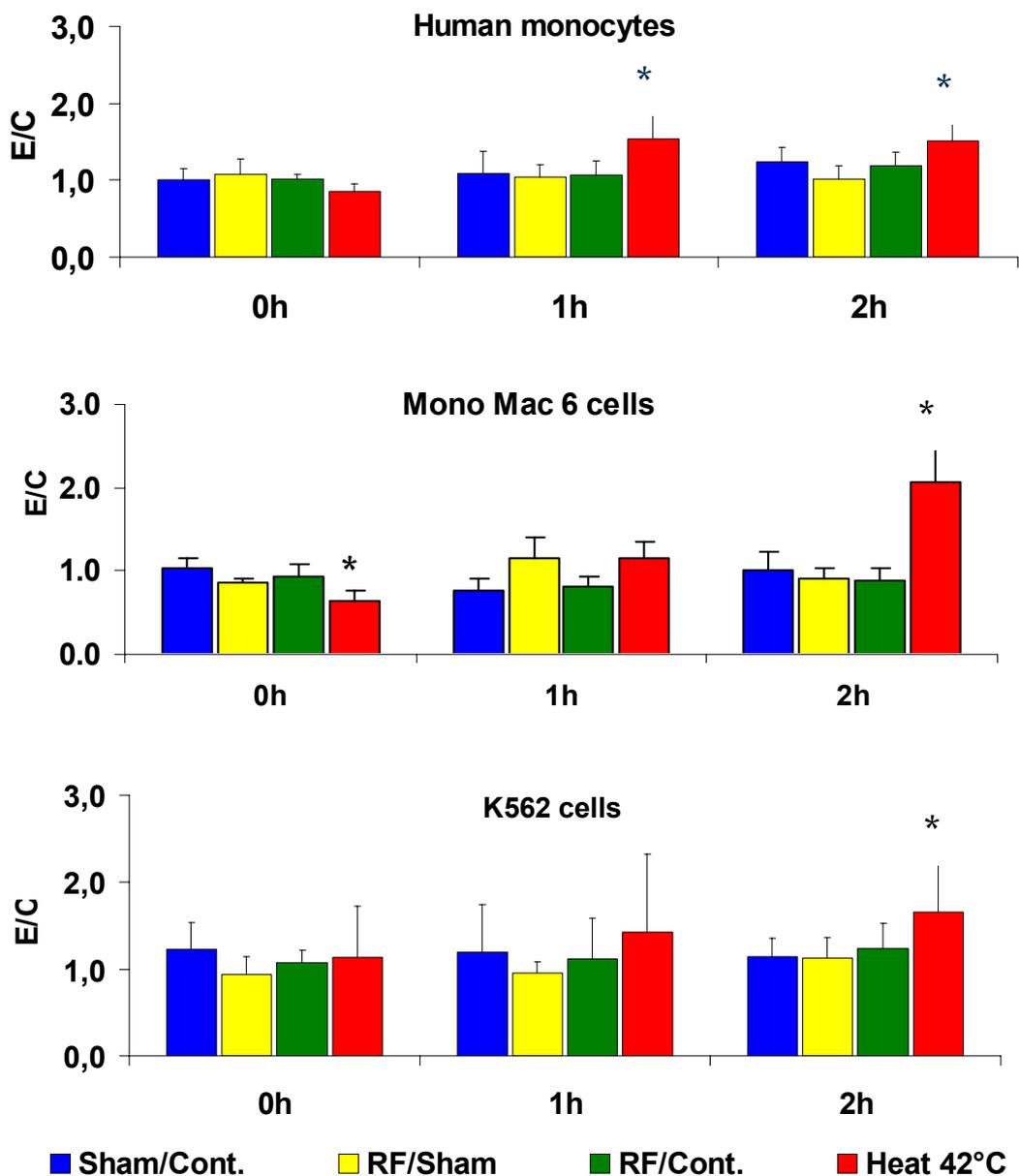


Abb. 18 Zusammenfassung der Hsp70 Expression mit dem DTX Signal modulierten 1800 MHz RF-EMF in verschiedenen Zelltypen. Mindestens 3 meist aber mehr unabhängige Untersuchungen wurden mit jeweils 3 Parallelen zusammengefasst und graphisch dargestellt (SD). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

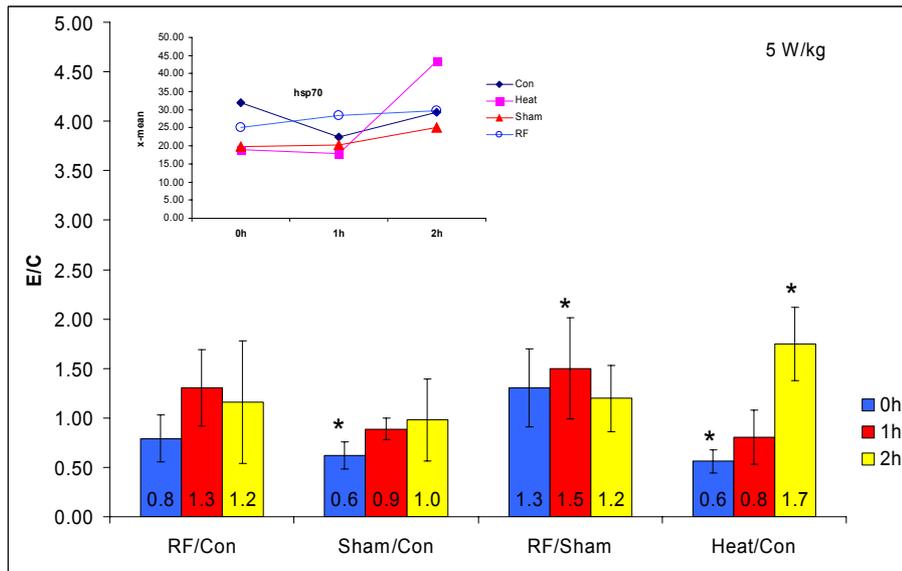


Abb. 19 Graphische Darstellung der Hsp70 Expression in Mono Mac 6 Zellen nach Exposition mit dem DTX RF-Signal (5 W/kg). Die Balkenmuster zeigen die zeitabhängige Proteinexpression nach 0 h, 1 h und 2 h. Als Vergleich für die Hsp70 Expression dienten 1 h bei 42-43 °C hitzeexponierte, Sham exponierte und unbehandelte Zellen. Gezeigt sind die E/C Werte der Rohdaten. Es wurden 3 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 2-3 Parallelen zusammengefasst und graphisch dargestellt (SEM aufgezeigt). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

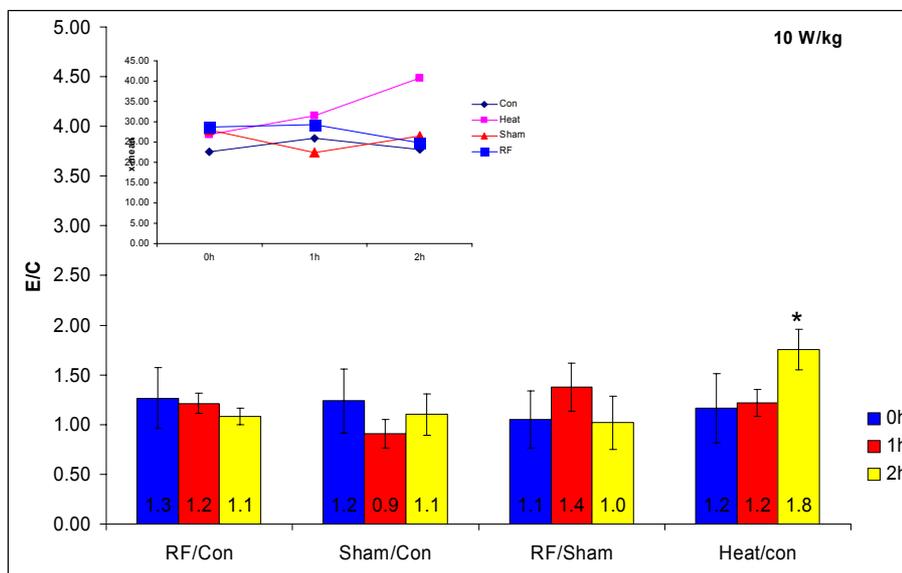


Abb. 20 Graphische Darstellung der Hsp70 Expression in Mono Mac 6 Zellen nach Exposition mit dem DTX RF-Signal (10 W/kg). Die Balkenmuster zeigen die zeitabhängige Proteinexpression nach 0 h, 1 h und 2 h. Als Vergleich für die Hsp70 Expression dienten 1 h bei 42-43 °C hitzeexponierte, Sham exponierte und unbehandelte Zellen. Gezeigt sind die E/C Werte der Rohdaten. Es wurden 3 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 2-3 Parallelen zusammengefasst und graphisch dargestellt (SEM aufgezeigt). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

4.4 Zellzyklusregulation

Um festzustellen ob RF-EMF die Zellproliferation beeinflusst, wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Zellzyklusphasenverteilung hin untersucht.

Die Generationszeit von Mono Mac 6 Zellen, welche nicht synchronisiert waren, beträgt ca. 60-63 Stunden. Nach einer RF-EMF Expositionszeit von 12 h bei einem SAR Wert von 2 W/kg im DTX-Modus ist keine Veränderung der Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus über die 72 Stunden zu ermitteln. Die Werte der exponierten Zellen (RF) unterscheiden sich weder zu den scheinexponierten Zellen noch zu den Werten der Brutschrankkontrolle (Tabelle I).

Tabelle I: Zellzyklusverteilung von MONO MAC 6-Zellen nach RF-EMF Exposition (2 W/kg 12 h), mit * markierte Werte sind signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kon) ($p < 0,05$)

%	Zeit in Stunden						
	0	12	24	36	48	60	72
G1-Phase							
Kon	74,83 ± 4,65	62,77 ± 2,88	48,97 ± 3,27	56,83 ± 0,81	56,00 ± 1,66	56,93 ± 0,91	63,43 ± 2,02
HF	74,83 ± 4,65	64,67 ± 1,81	51,43 ± 4,23	57,43 ± 1,50	56,40 ± 1,90	56,07 ± 1,15	62,80 ± 2,42
Sham	74,83 ± 4,65	65,53 ± 2,83	50,17 ± 2,60	56,60 ± 4,24	56,90 ± 2,12	58,47 ± 0,46	61,13 ± 1,28
TPA 100nM	74,83 ± 4,65	68,53 ± 8,55	65,10 ± 0,26 *	62,53 ± 3,03 *	68,20 ± 3,07 *	67,17 ± 4,02 *	65,90 ± 5,33
S-Phase							
Kon	13,97 ± 3,31	28,90 ± 1,45	34,10 ± 2,70	26,43 ± 0,41	29,23 ± 0,85	28,17 ± 0,40	21,27 ± 1,20
HF	13,97 ± 3,31	26,27 ± 1,16	32,37 ± 3,00	24,43 ± 1,35	29,17 ± 1,96	28,50 ± 0,86	22,30 ± 3,29
Sham	13,97 ± 3,31	25,07 ± 3,72	33,23 ± 4,47	26,33 ± 3,86	27,60 ± 2,17	27,03 ± 0,63	24,67 ± 1,12
TPA 100nM	13,97 ± 3,31	17,03 ± 12,55	22,93 ± 4,00 *	25,00 ± 9,72	17,90 ± 2,51 *	17,57 ± 3,75 *	19,23 ± 6,75
G2/M-Phase							
Kon	11,13 ± 1,36	8,33 ± 1,75	16,97 ± 0,80	16,70 ± 0,34	14,70 ± 0,79	14,90 ± 0,52	15,27 ± 1,34
HF	11,13 ± 1,36	9,13 ± 0,82	16,17 ± 1,42	18,13 ± 0,23	14,40 ± 0	15,23 ± 0,63	14,90 ± 0,86
Sham	11,13 ± 1,36	9,40 ± 1,25	16,67 ± 1,98	17,07 ± 0,57	15,50 ± 0,92	14,50 ± 0,95	14,17 ± 0,11
TPA 100nM	11,13 ± 1,36	14,43 ± 4,22	12,07 ± 3,76	12,43 ± 8,71	13,87 ± 1,07	15,17 ± 0,91	14,87 ± 1,71

Im Falle der mit 100 nM TPA behandelten Zellen ist eine signifikante Verschiebung der Zellzyklusphasen festzustellen (Abb. 21). Der Unterschied der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, ist zwischen den mit TPA behandelten Zellen (22,93 % in S) und der Brutschrankkontrolle (34,1 % in S) nach 24 Stunden signifikant. Der Anteil der Zellen in der S-Phase ist deutlich geringer, als bei der Kontrolle. Das gleiche Ergebnis ist für die TPA - behandelten Zellen in der G1-Phase festzustellen. Nach 24 Stunden zeigt sich ein signifikanter Unterschied der mit TPA behandelten Zellen (65,1 % in G1) zu den Kontrollzellen (48,97 %) in der G1-Phase. Dieser Unterschied bleibt auch nach 60 Stunden erhalten. Es kommt bei den TPA behandelten Zellen nicht zu einem Absinken des Anteils in der G1-Phase, sondern der Anteil bleibt stets mit über 60 % konstant.

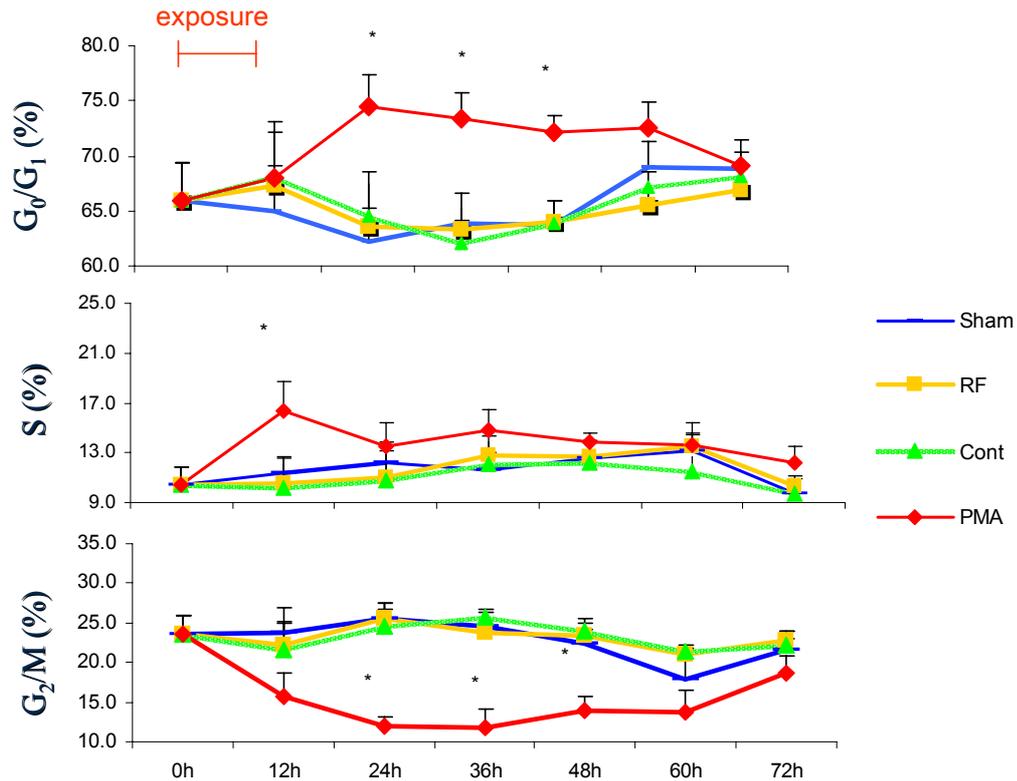


Abb. 21 Zellzyklusphasenverteilung (G1, S, G2/M-Phase) von Mono Mac 6 Zellen nach 12 h Expositionszeit mit 2 W/kg (DTX-Signal). Dargestellt ist die prozentuale Phasenverteilung der exponierten Zellen. Es wurden 3 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 3 Parallelen zusammengefasst und graphisch dargestellt (SD). Signifikante Unterschiede wurden mit einem * gekennzeichnet (p<0,05, Student t-Test).

4.5 Apoptoseinduktion

Für die Bestimmung der Apoptoseinduktion sind unterschiedliche Techniken möglich. Die Zellvitalitätsbestimmung gibt Auskunft über die Ausgangssituation des Zellen, welche am Anfang aller Versuche ermittelt wurde (Abb. 22).

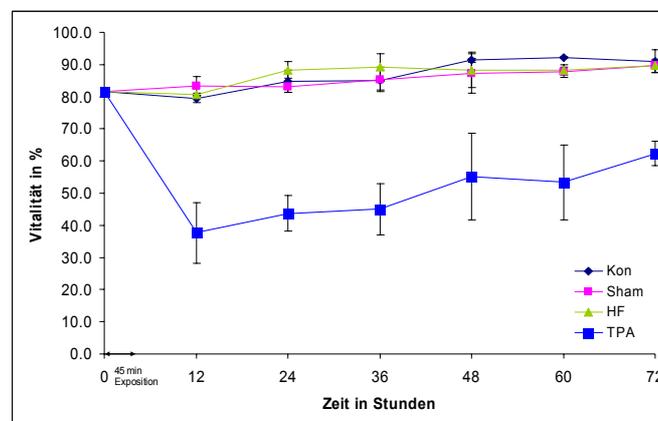


Abb. 22 Vitalitätsbestimmung von Mono Mac 6 Zellen: Brutschrankkontrolle, scheinexponierten Zellen (Sham), und nach 45 min Expositionszeit mit 2 W/kg (DTX-Signal) exponierten Zellen (RF) und TPA behandelten Zellen (TPA). Es wurden 3 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 3 Parallelen zusammengefasst und graphisch dargestellt (SD). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem * gekennzeichnet (p<0,05, Student t-Test).

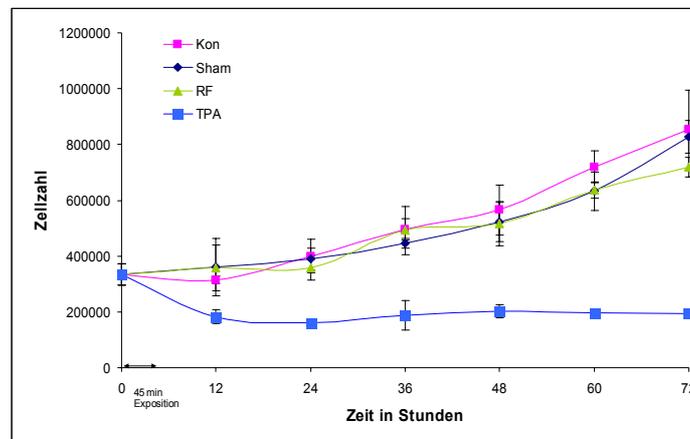


Abb. 23 Wachstumskurve von Mono Mac 6 Zellen (absolute Zellzahl) über die Zeit, nach 45 Minuten Exposition (DTX, 2 W/kg), mit der Brutschrankkontrolle (Kon), den scheinexponierten Zellen (Sham), den exponierten Zellen (RF) und den TPA -behandelten Zellen (TPA). Es wurden 3 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 3 Parallelen zusammengefasst und graphisch dargestellt (SD). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

Die Abbildung 23 zeigt die Wachstumskurve der verschieden behandelten Zellen, wobei zu erkennen ist, dass sich die Kurve der Brutschrankkontrolle von der Kurve der exponierten Zellen und der scheinexponierten Zellen nicht signifikant unterscheidet. Die Wachstumskurve der TPA-behandelten Zellen hingegen unterscheidet sich signifikant von der Kontrollkurve (auch hier ist TPA Positivkontrolle). Die absolute Zellzahl nimmt über die Zeit kaum zu, was durch die Zellzyklusanalyse mit dem Verharren in der G1-Phase bestätigt wird. Des Weiteren ist bei den TPA-behandelten Zellen zu sehen, dass die absolute Zellzahl von der Nullstundenkontrolle bis zum ersten Zeitpunkt von 12 Stunden nach TPA-Gabe abnimmt. Hier können sowohl nekrotische, wie auch apoptotische Vorgänge eine Rolle spielen.

Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und Gliotoxin als Positivkontrolle verwendet. Wie die Abbildung 24 zeigt, konnten keine apoptotischen oder nekrotischen Zellen nach 12 h RF-EMF Expositionszeit gezeigt werden. Die Gliotoxinbehandlung induzierte einen signifikanten Anstieg an "early und late" Apoptosen sowie an nekrotischen Zellen.

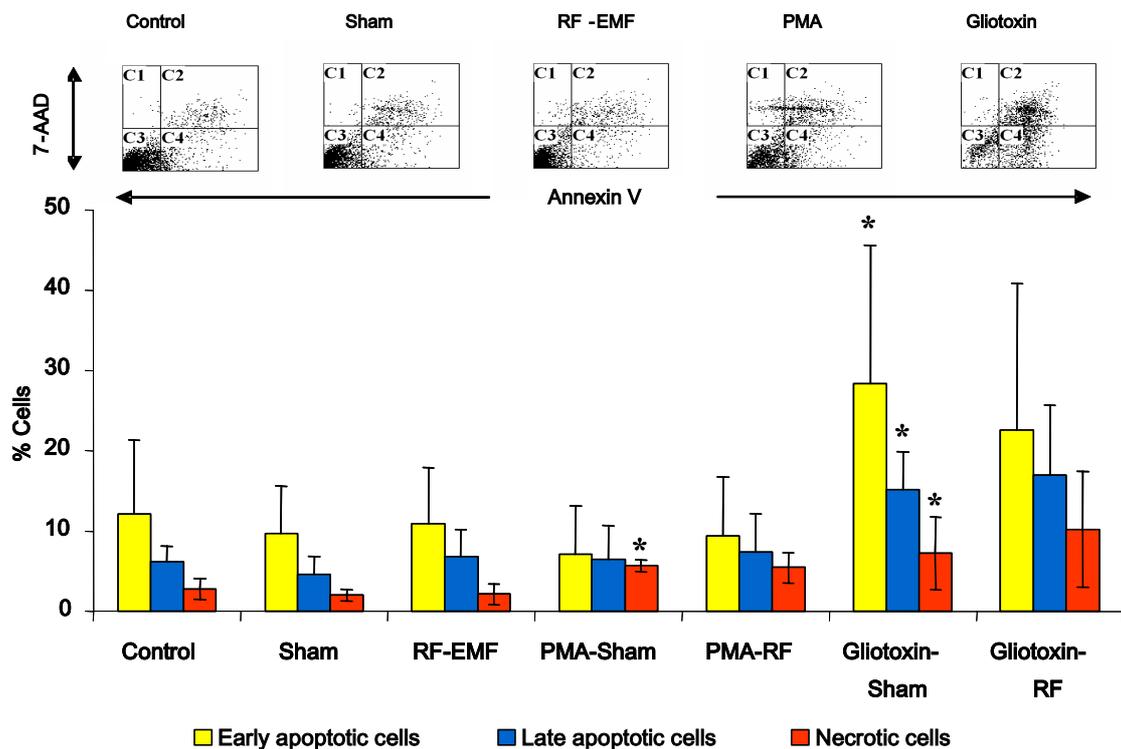


Abb. 24 Apoptoseinduktion nach Behandlung der Mono Mac 6 Zellen mit RF-EMF (DTX, 2 W/kg), PMA, Gliotoxin oder in Koexposition für 12 h. Es wurden 5 unabhängige Untersuchungen mit jeweils 3 Parallelen zusammengefasst und graphisch dargestellt (SD). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$, Student t-Test).

4.6 Proteinexpression

Für die Untersuchungen zur Proteinexpression wurden ausschließlich humane Monozyten verwendet welche auf das DTX-Signal (2 W/kg) positiv reagierten. Hierzu wurden die Zellen von 67 gesunden Spendern entsprechend exponiert (Kontrolle, Sham und RF), gesammelt, gereinigt und lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und auf die Mikroarrays gegeben, wobei folgende Kombinationen angewandt wurden: RF-Cy3/Sham-Cy5, RF-Cy5/Sham-Cy3, Kontrolle-Cy3/Sham-Cy5, Kontrolle-Cy5/Sham-Cy3. Da die Antikörper doppelt auf dem Array aufgetragen sind, wurden vier Datenpunkte von jedem Antikörperauftrag erhalten. Leider erlaubt diese Technik keine quantitative Analyse der Proteinexpression, sodass nur eine qualitative Analyse durchgeführt wurde. Die Tabelle II zeigt die Auflistung der regulierten (up, down) Proteine, wobei mindestens 3 der 4 Datenpunkte in die gleiche Richtung um mindestens 30% reguliert sein sollten. Entsprechend diesen Kriterien wurden 15 Proteine im Sham (vs. Kontrolle) reguliert, während 27 Proteine im RF-exponierten (vs. Sham) Lysat detektiert wurden. Die Proteine wurden nach ihren Funktionen in Klassen wie folgt geordnet: Zellzyklusregulation, Apoptose, Zellaktivierung und Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren und andere physiologische Prozesse. An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass keine weiteren Proteine als die

genannten reguliert waren und dass keine Übereinstimmungen zwischen Sham und RF vorlag. Die meisten regulierten Proteine waren in der Kategorie Zellzyklusregulation involviert, nämlich 4 in Sham und 7 in RF, sowie in der Klasse Zellaktivierung und Signalkaskaden, nämlich 3 in Sham und 8 in RF. Lediglich ein (Sham) bzw. zwei Proteine (RF) konnten der Apoptose zugeordnet werden und jeweils zwei zu den regulierten Transkriptionsfaktoren. Fünf Proteine in Sham und acht in RF zeigten bei ihrer Regulation kein spezifisch funktionelles Muster. Interessanterweise wurden keine Proteine reguliert, die dem oxidativen Stress oder ähnlichen Redoxmechanismen zuzuordnen sind, so wie gp91phox, p21phox, p67phox, p47phox, p40phox, oder rac2. Diese Proteine sind bei der Produktion von freien Radikalen beteiligt (NAD(P)H-Oxidase abhängige Pathway). Darüber hinaus wurden keine Hitzchockproteine oder Angehörige dieser Familie in Sham oder in RF reguliert.

Tabelle II Analyse der relativen Proteinexpressionen in Lysaten von humanen Monozyten nach der Exposition mit GSM-DTX Signal modulierten 1.8 GHz RF-EMF (2 W/kg) für 45 min. Aufgeführt sind die Verhältnisse der regulierten Proteine zwischen Sham und Kontrolle sowie RF und Sham. Hochregulierung (+) bzw. Runterregulierung (-) der Proteine wurde wie im Text spezifiziert, analysiert.

		Sham exposure vs. control				RF exposure vs. sham			
		Antibody	Swiss Prot ID	Function	Reg	Antibody	Swiss Prot ID	Function	Reg
Cell cycle relevant		Cyclin D1	P24385	G ₁ /S-specific, regulatory subunit for cyclin-dependent kinases	-	Cyclin C	P24863	G ₀ /G ₁ -specific cyclin-C	+
		Cyclin D3	P30281	G ₁ /S-specific, regulatory subunit for cyclin-dependent kinases	-	NPAT	Q13632	Substrate for Cyclin E-Cdk2 kinase, nuclear protein	+
		Topoisomerase II b	Q02880	DNA replication, transcription and cell cycle progression, ubiquitous, normally not regulated	+	XPA	P23025	DNA repair/Xeroderma pigmentosum group A protein	+
		Cdk7	P50613	G ₁ /S-specific cell division protein kinase 7, part of the Cdk1 subfamily	+	TRF2	Q15554	Telomeric repeat binding factor 2, protection of telomeres from DNA damage responses	+
						DDX1	Q92499	Nuclear RNA metabolism regulation, DEAD box protein	+
Apoptosis		Bak	Q16611	Bcl-2 homologous antagonist, apoptosis promotion	-	Fos	P01100	Proto-oncogene, signal transduction, cell proliferation and differentiation	-
						Topoisomerase II a	P11388	DNA replication, transcription and cell cycle progression, rise during late S-phase and peak in G ₂ /M	-
						Caspase-9 / Apaf-3	P55211	Apoptotic protease-activating factor 3	+
						DFF 45 (ICAD)	O00273	DNA fragmentation factor alpha subunit, DNA fragmentation during apoptosis	+

Cell activation/cell signalling	MST3	O00506	Serine/threonine- protein kinase 25, upstream of the MAP kinase module	+	Inhibitor 2	P41236	Protein phosphatase inhibitor, regulatory subunit of protein phosphatase 1	+
	ERp72	P13667	Protein disulfide-isomerase A4, Ca ²⁺ dependent chaperone	+	cRAF-1	P04049	proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	+
	G alpha t	P11488	Guanine nucleotide-binding protein G	-	AMPK b	Q9Y478	5'-AMP-activated protein kinase, beta-1 subunit, regulation of fatty acid and cholesterol synthesis	+
					MCP-1	P13500	Small inducible cytokine A2, chemotactic factor	+
					PKC b	P05771	Protein kinase C beta type, serves as the receptor for phorbol esters	+
					PI-3 Kinase (p85a)	P27986	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory alpha subunit, bind to activated receptors, serve as tyrosine kinase substrate	+
					AF6	P55196	Ras signaling pathway regulation, ALL-1 fusion partner in chromosome 6/p180	+
					Psme3/PA28-g	Q12920	Proteasome activator complex, generation of antigenic peptides	+
Transcription factors	p63	Q9UBV9	Tumor protein p73-like, sequence specific DNA binding transcriptional activator or repressor, negatively regulates the expression of G ₂ /M regulators	+	Roaz	O08961	Rat Olf-1/EBF-associated zinc finger protein/transcriptions factor	+
	PU.1(Spi-1)	P17947	Transcription factor, differentiation or activation of macrophages or B-cells, regulates the expression of M-CSF receptor	+	SIII p15	Q15369	Transcription elongation factor B polypeptide 1	+
Other functions	Integrin b1 (CD29)	P05556	Integrin beta-1	+	Acetylcholine Receptor (b)	P11229	Muscarinic acetylcholine receptor M1, inhibition of adenylate cyclase, modulation of potassium channels	+
	Mint3	O88888	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A	+	Amphiphysin	P49418	major autoantigen in Stiff-Mann Syndrome	+
	rSec8	Q62824	Exocyst complex component 4	+	COMT	P21964	Catechol O-methyltransferase, degradation of the catecholamine neurotransmitters	-
	Syntaxin 11	O75558	Syntaxin-11	+	Endoglin	P17813	CD105 antigen, angiogenesis regulation through interactions with TGF-b superfamily kinase receptors	+
	WT1	P19544	Wilms' tumor protein	+	Fatty Acid Synthase	P49327	Fatty acid biosynthesis, component of biological membranes	+
					g-Catenin	P14923	junction plakoglobin, influence the structure and function of submembranous plaques	+
					PMF-1	Q9UBQ3	Polyamine modulated factor-1, Nrf-2 binding transcriptions factor, regulate SSAT transcription	+
				SCAR-1	Q92558	Wiskott-Aldrich syndrome protein, transmission of signals from tyrosine kinase receptors to cytoskeleton	-	

4.7 Genexpression

Einige der Proteine die im Array nach RF-Exposition „stark“ reguliert waren, wurden weiterhin auf Genexpressionsebene untersucht. Quantitative real time RT-PCR wurde angewandt um die Expression der RNA von PI-3 Kinase (PIK3R1) und c-Raf 1 (Raf 1) Genen zu untersuchen, da diese Proteine in unterschiedlichen molekularen Wirkmechanismen und auch in Zelldifferenzierungsprozessen beteiligt sind. Weiterhin wurde das CCNC Gen (entspricht dem Cyclin C Protein) untersucht, da dieses Protein im Zellzyklus während der G₀/G₁ beteiligt ist und eine wichtige Rolle in Monozyten spielt. Als so genanntes „housekeeping gene“ wurde Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet (interne Kontrolle).

Wie die quantitativen Ergebnisse zeigen (Abb. 25), wurde das HPRT Gen bereits in den Kontrollen (t=0 min und t= 45 min) signifikant (p<0,001) runterreguliert, während die RF-Zellen einen signifikanten Anstieg des Transkriptes im Vergleich zur Kontrolle (t=45 min) aber nicht zu Sham zeigten.

Das gleiche Ergebnis wurde ermittelt bezüglich der Transkripte von PIK3R1, Raf-1 und CCNC. Diese Transkripte wurden ebenfalls in den Kontrollen nach 45 min Inkubationszeit im Brutschrank runterreguliert. Die Sham-Exposition induzierte die weitere Erniedrigung der Transkripte des PIK3R1 und CCNC während die RF-Exposition die Hochregulierung der Transkripte induzierte. Keine Regulierung durch Sham oder RF wurde am Raf-1 Gen festgestellt.

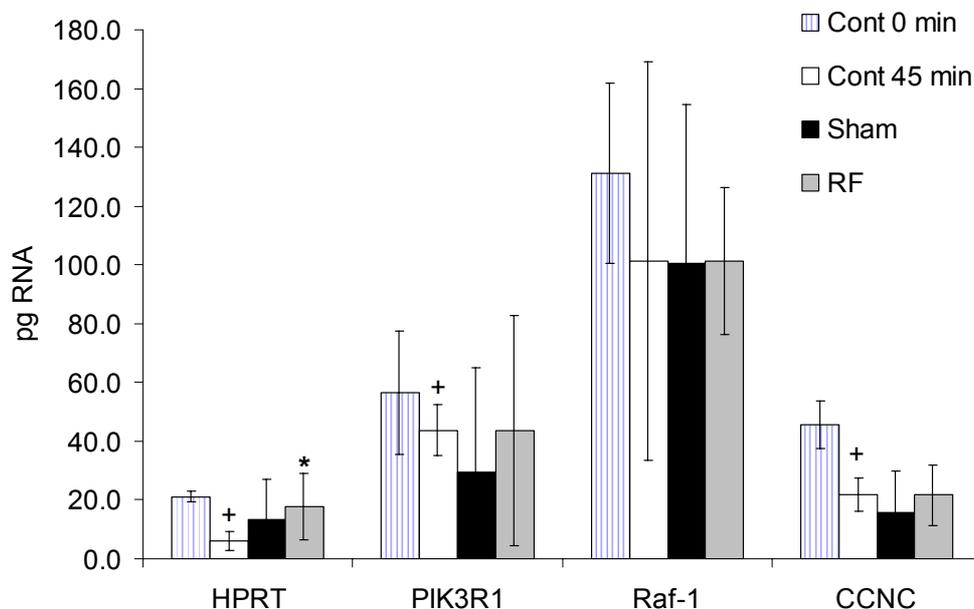


Abb. 25 Quantitative real time RT-PCR Analyse der HPRT, PIK3R1, cRaf 1 und CCNC mRNA Expression in humanen Monozyten von 20 gesunden Spendern. Die Zellen waren nicht exponiert (Con t₀ min) oder t=45 min (Con t₄₅) oder Sham-exponiert (45 min) oder GSM-DTX Signal exponiert (2 W/kg, 45 min). Die Säulen repräsentieren die arithmetische Mitte ± SD von pg mRNA der Gene (n = 6 of 3 unabhängigen Untersuchungen mit je zwei Messungen). * signifikante Unterschiede zur Kontrolle 45 min (Con_{t45}) und + zu Kontrolle 0 min (Con_{t0}). Student t -test (p < 0.05).

5 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

5.1 Einfluss auf die Redox-Homeostase nach RF-Exposition in immunologisch relevanten Zellen

Die besonders umfangreiche Untersuchungen an vier verschiedenen Zelltypen mit fünf unterschiedlichen Signalmodulationen des 1800 MHz RF-EMF und 6 SAR-Werten (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0; 10) haben gezeigt, dass unter den verwendeten Expositionsbedingungen nur nach der Signalmodulation mit DTX und 2 und 10 W/kg die Veränderung der Bildung von freien Radikalen induziert (Abb. 11). Diese Modulation wurde durch die Herabsenkung des ROS-Spiegels im Sham hervorgerufen, wodurch der Anstieg des Quotienten E/C für RF/Sham signifikant wird. Interessanterweise wurde dieses Phänomen nicht in allen untersuchten Zellen ermittelt, vielmehr wurde eine Zelltypabhängigkeit festgestellt. Die verwendeten humane Monozyten und die Mono Mac 6 Zellen zeigten diesen Effekt, während die primären Lymphozyten und die K562 Zellen auf den DTX Signal nicht reagierten (Lantow et al. 2006a, b).

Die Frage stellte sich ob die Feldstärke (SAR-Wert) oder ob die Frequenzmodulation einen Einfluss auf die Zellen im Sham induziert, welches eventuell durch die RF-Exposition wieder aufgehoben wird. In diesem Fall würde die RF-Exposition einen Effekt auf die Zellen ausüben. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, dass im Sham-Wave guide ein unbekannter physikalischer Parameter vorhanden, welcher im RF-Wave guide nicht vorhanden ist, der den Effekt induziert.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass offensichtlich die SAR-Werte eine kleinere Rolle bei dem induzierten Effekt spielen als die Frequenzmodulationen. Da keine Feldstärkenabhängigkeit in der ROS-Produktion ermittelt werden konnte, ist es eher davon auszugehen, dass die Frequenzmodulationen einen stärkeren Einfluss auf die Zellfunktionen ausüben. Wie die Ergebnisse zeigen (Abb. 12) ist der Effekt der nach 2 und 50 Hz-Modulation des 1800 MHz Feldes sowohl im Sham als auch im RF vorhanden, während die Effekte nach 8 und 217 Hz Modulationen nur im RF-Wave guide vorhanden sind. Bis auf die 2 Hz-Modulation induzieren alle Modulationen die Herabsenkung des ROS-Spiegels in den Zellen im Vergleich zur Kontrolle (RF/Cont). Auf der anderen Seite sollte kein Unterschied zwischen Sham und Kontrolle vorhanden sein, das hier nicht bestätigt werden kann. Da die Frequenzmodulationen im Sham in geringerem Ausmaß ausfallen als im RF, ist es wahrscheinlich, dass die RF-Exposition den Effekt triggert und zwar bei 8 und 217 Hz Modulation. Eindeutig kann die Frage jedoch nicht beantwortet werden ob das Phänomen, nämlich die Herabsenkung der ROS-Produktion im Sham und folglich der anstieg in die RF-Exposition allein durch die Bedingungen im Sham ausgelöst wurden oder durch die RF-Exposition. Fest steht, dass die Sham-Kammer der verwendeten Expositionsanlage bei dem DTX Signal nicht den Kontrollbedingungen entspricht. Die Ermittlung weiterer Einflüsse wie Temperaturabfall oder Anstieg, Mediemevaporation, Vibration und zur pH-Änderung führte ebenfalls nicht zum Erfolg, die genannten Parameter konstant waren (Manuskript in

Präparation).

Der Einfluss von RF-EMF auf die Phagozytose wurde in Mono Mac 6 Zellen mit 217, GSMnon-DTX und mit kontinuierlichen Feldern (CW) durchgeführt. Keine Veränderung konnte in allen Signalmodulation (2 W/kg) ermittelt werden, sodass weitere Untersuchungen nicht durchgeführt wurden (Simkó et al. 2006).

5.2 Stressantwort

Zur Stressantwort durch RF-EMF wurde das Hsp70 Protein in humanen Monozyten, K562 und in Mono Mac 6 Zellen mit zwei unterschiedlichen Methoden (Durchflußzytometrie und Westernblot) getestet. Verschiedene Signalmodulationen und SAR-Werte wurden für die Exposition der Zellen verwendet, aber keine der Expositionen führte zur Veränderung der Hsp70 Expression (Lantow et al. 2006a, b; Simkó et al. 2006).

5.3 Einfluss auf die Zellproliferation und Apoptose

Die Untersuchungen zur Zellproliferation und der Induktion von Apoptose wurden in erster Linie mit den humanen Monozyten und mit Mono Mac 6 Zellen durchgeführt, da diese Zellen auf das DTX Signal mit der Veränderung der ROS-Produktion reagierten. Die Analysen wurden mittels Zellzahlbestimmung, Durchflusszytometrie und BrdU-Inkorporation durchgeführt und bei allen Untersuchungen wurden keine Veränderungen auf die Zellzahl und/oder auf die Apoptoseinduktion durch die RF-Exposition ermittelt (Lantow et al. 2006c).

5.4 Molekulare Mechanismen

Die Untersuchungen zu den Wirkmechanismen die durch die RF-EMF (DTX-Signal, 2 W/kg) ausgelöst wurden widerspiegeln ein sehr interessantes Ergebnis (Tabelle II). In den Sham-Zellen wurden 15, in den RF-Zellen 27 Proteine reguliert. Bemerkenswert ist, dass keines der Proteine in beiden Expositionen reguliert wurde. In Sham wurden 10 hoch und 5 Proteine herunterreguliert, während in RF 23 Proteine hoch- und nur 4 herunterreguliert waren. Es scheint, als wenn die meisten der herunterregulierten Proteine in Sham zu den metabolischen Prozessen gehören, während die hochregulierten Proteine nach RF-Exposition zu den aktivierten metabolischen Prozessen gehören. Bei dieser Betrachtung könnte man von einem Kompensationseffekt im RF ausgehen. Der im Sham Wave guide vorhandene unbekannter Parameter induziert die Herabsenkung des ROS-Spiegels in den Zellen, welcher offensichtlich durch die RF-Exposition kompensiert wird. Hierdurch kommt es zur erhöhtem ROS-Produktion nach RF-Exposition. Bei GSM-DTX handelt es sich um ein Modulationsschema, das während der Phase des reinen Zuhörens aktiv ist. Dieses Signal ist frequenzmoduliert (2, 8 und 217 Hz). Dabei werden Zeitschlitze ausgelassen (DTX: discontinuous Transmission). Da hier experimentell vorgegebene durchschnittliche SAR-Werte, z.B. 2 W/kg erreicht werden müssen, treten sehr kurzfristig sehr hohe Peak-Werte auf

(nach Angaben des technischen Partners bis zu 140 W/kg). Es ist möglich, dass diese hohen Spitzenwerte für die ROS-Produktion verantwortlich sind (Lantow et al. eingereicht).

Die Analyse der Genexpression (PI-3 Kinase, cyclin C und cRaf-1) erbrachte leider keine eindeutigen Ergebnisse. Die Ursache liegt darin, dass die primären Zellen von 20 Spendern (andere als für die Proteinexpression) gesammelt wurden und die RNA von einer großen heterogenen Gruppe verwendet wurde. Daher entstanden auch die relativ großen Standardabweichungen (Abb. 25). Ein weiteres Problem liegt in der Herkunft der Zellen, da es sich um immunologisch relevante Zellen handelt. Der Immunstatus der Individuen variiert sehr stark, so dass ein Vergleich ihrer Genexpression zwischen den Individuen nicht möglich ist (Lantow et al. eingereicht).

6 SCHLUSSBEMERKUNG

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass unter den verwendeten RF-EMF Expositionsbedingungen (1800 MHz), nach unterschiedlichen Zeitregimes und SAR-Werten, keine Modulationen in physiologischen Funktionen in allen untersuchten Zelltypen hervorrufen. Eine Ausnahme bildete das GSM-DTX Signal, wobei die Sham-Bedingungen bereits Effekte induzierten (2, 5 und 10 W/kg). Die Aufklärung des unbekanntem physikalischen Parameters, welcher die Modulation der Bildung freier Radikale induziert, ist uns leider nicht gelungen. Durch die vorliegenden Daten der Proteinanalyse scheint es jedoch, dass die RF-Exposition die Aufhebung des durch Sham induzierten Effektes hervorruft, da das Proteinexpressionsmuster in der Kontrolle, Sham und in der RF unterschiedlich ausfallen. Die hier durchgeführten enorm umfangreichen Studien zeigen keine biologisch-funktionellen Effekte in immunrelevanten Zellen. Es sollte erwähnt werden, dass die Studien ausschließlich mit einer Expositionsanlage *in vitro* durchgeführt wurden. Unterschiedliche Zellen und Befeldungskonditionen durch andere Expositionsmodelle (unterschiedliche Hersteller aber auch echte Mobiltelefone) könnten unterschiedliche zelluläre Reaktionen hervorrufen. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2.Auflage, S.587-633, 2001
- Dawe AS, Smith B, Thomas DW, Greedy S, Vasic N, Gregory A, Loader B, de Pomerai DI. A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Bioelectromagnetics*. 2006; 27(2):88-97.
- de Pomerai D, Daniells C, David H, Allan J, Duce I, Mutwakil M, Thomas D, Sewell P, Tattersall J, Jones D, Candido P. Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature*. 2000; 25; 405(6785):417-8.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82(1):47-95.
- French PW, Penny R, Laurence JA, McKenzie DR. Mobile phones, heat shock proteins and cancer. *Differentiation*. 2001; 67(4-5):93-7.
- Hook GJ, Spitz DR, Sim JE, Higashikubo R, Baty JD, Moros EG, Roti Roti JL. Evaluation of parameters of oxidative stress after in vitro exposure to FMCW- and CDMA-modulated radiofrequency radiation fields. *Radiat Res*. 2004; 162(5):497-504.
- Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M, Akyol O, Ozen S. Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta*. 2004;340(1-2):153-62.
- Irmak MK, Fadillioglu E, Gulec M, Erdogan H, Yagmurca M, Akyol O. Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell Biochem Funct*. 2002; 20(4):279-83.
- J. Klein (1991) *Immunologie* (VCH, Weinheim), 1. Auflage, Kapitel 2/13, Seiten 27-28/330-343
- Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 4;92(19):1564-72.
- Leszczynski D, Joenvaara S, Reivinen J, 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*. 2002; 70(2-3):120-9.
- Miyakoshi J, Takemasa K, Takashima Y, Ding GR, Hirose H, Koyama S. Effects of exposure to a 1950 MHz radio frequency field on expression of Hsp70 and Hsp27 in human glioma cells. *Bioelectromagnetics*. 2005; 26(4):251-7.
- Nover L, Scharf KD. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci*. 1997; 53(1):80-103.

- Pacini S, Ruggiero M, Sardi I, Aterini S, Gulisano F, Gulisano M. Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts. *Oncol Res.* 2002; 13(1):19-24.
- Schoffl F, Prandl R, Reindl A. Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.* 1998; 117(4):1135-41.
- Schuderer J, Samaras T, Oesch W, Spät D, Kuster N. High Peak SAR Exposure Unit with Tight Exposure and Environmental Control for In Vitro Experiments at 1800 MHz. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 2004.
- Simko M, Droste S, Kriehuber R, Weiss DG. Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50 Hz electromagnetic fields. *Eur J Cell Biol.* 2001; 80(8):562-6.
- Velizarov S, Raskmark P, Kwee S. The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal. *Bioelectrochem Bioenerg.* 1999; 48(1):177-80.
- Vijayalaxmi, Bisht KS, Pickard WF, Meltz ML, Roti Roti JL, Moros EG. Chromosome damage and micronucleus formation in human blood lymphocytes exposed in vitro to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (847.74 MHz, CDMA). *Radiat Res.* 2001; 156(4):430-2.
- Yariktas M, Doner F, Ozguner F, Gokalp O, Dogru H, Delibas N. Nitric oxide level in the nasal and sinus mucosa after exposure to electromagnetic field. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 132(5):713-6.

8 EIGENE PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

Publikationen (Peer-reviewed)

- Lantow M, Lupke M, Frahm J, Mattsson MO, Kuster N, and Simkó M: ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes *Radiat. Environ. Biophys.* 45, 55-62 (2006)
- Lantow M, Viergutz T and Simkó M: Cell cycle analysis and apoptosis induction after exposure to radiofrequency radiation in human Mono Mac 6 cells, *Radiat Res.* 166, 539-43 (2006)
- Lantow M, Schuderer J, Hartwig C and Simkó M: Free radical release and Hsp70 expression in two human immune relevant cell lines after exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation *Radiat. Res.* 165, 88-94 (2006)
- Simkó M, Hartwig C, Lantow M, Lupke M, Mattsson MO, Rahman Q and Rollwitz J: Hsp70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency

electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells, *Toxicol. Lett.* 161, 73-82 (2006)

Lantow M., Maercker C., Mattsson M. O., Viergutz T. and Simkó M: Protein array and gene expression analysis after 1.8 GHz exposure to human monocytes. (submitted)

Vorträge, Posters

Functional and molecular investigations after 1.8 GHz radiofrequency electromagnetic fields exposure in different immune cells. Workshop "Proposed mechanisms for the interaction of RF-Signals with living Matter", 11-13th September 2006, Rostock, Germany.

Biological effectiveness of electromagnetic fields. University of Wageningen, 17th January 2005, Wageningen, Holland.

Simkó M and Lantow M: Functional and molecular investigations after 1.8 GHz radiofrequency electromagnetic fields exposure in different immune cells. Workshop "Proposed mechanisms for the interaction of RF-Signals with living Matter", Rostock, Germany Abstract Book, 15, (2006).

Lantow M, Hartwig C, Maercker C and Simkó M: Free radical Production, Hsp70 expression and protein profiling after 1800 MHz RF exposure in different immune relevant cells. 27 Annual Meeting of The BEMS, 2005, Dublin, Ireland Abstract Book (2005).

Lantow M and Simkó M: 1800 MHz RF-EMF do not induce free radical production in different immune relevant cells. 26 Annual Meeting of The BEMS, 2004, Washington DC, USA, Abstract Book, (2004).

9 ANLAGEN

Lantow M, Lupke M, Frahm J, Mattsson MO, Kuster N, and Simkó M:
ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1800 MHz radiofrequency
electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes
Radiat. Environ. Biophys. 45, 55-62 (2006)

Lantow M, Schuderer J, Hartwig C and Simkó M:
Free radical release and Hsp70 expression in two human immune relevant cell lines after
exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation
Radiat. Res. 165, 88-94 (2006)

Lantow M, Viergutz T and Simkó M:
Cell cycle analysis and apoptosis induction after exposure to radiofrequency radiation in
human Mono Mac 6 cells,
Radiat. Res. 166, 539-43 (2006)

Simkó M, Hartwig C, Lantow M, Lupke M, Mattsson MO, Rahman Q and Rollwitz J:
Hsp70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency
electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells
Toxicol. Lett. 161, 73-82 (2006)