

Kaum Stress durch hochfrequente Felder

FGF-Workshop in Helsinki nahm Stressproteine unter die Lupe

Werden Zellen unter physiologisch kritischen Bedingungen kultiviert, aktivieren sie ein Notfallprogramm, um ihre Überlebenschancen zu verbessern. Im Mittelpunkt dieses Notfallprogramms stehen die so genannten Hitzeschockproteine, die Wissenschaftler allgemein als Stressproteine bezeichnen. Sie stabilisieren zelluläre Proteine und schaffen so die Grundvoraussetzung, dass eine Zelle eine Zeit lang unter massivem Einfluss von Stressfaktoren bestehen kann. Beim internationalen Workshop „Einfluss von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Expression von Stressproteinen“ am 28. und 29. April in Helsinki, Finnland, diskutierten Experten, ob auch elektromagnetische Felder des Mobilfunks Zellen unter Stress setzen und Stressproteine aktivieren können. „Eher nicht“, lautet das Fazit.

Sowohl die Arbeiten von David de Pomerai aus den Jahren 2000 und 2002 als auch die von Dariusz Leszczynski 2002 publizierten Daten geben Hinweise, dass hochfrequente elektromagnetische Felder als nicht-thermischen Effekt eine Stressantwort in verschiedenen Zelllinien auslösen könnten. Besonders die kleinen Stressproteine HSP16 und HSP27 deuten demnach auf Wechselwirkungen hin, da sich ihre Expression und ihr Phosphorylierungsmuster unter Feldeinfluss angeblich ändern. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Cleary et al. (1997), Goswami et al. (1999) und Li et al. (1999), die keine derartigen Effekte von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Expression von Stressproteinen nahelegen.

Beim Workshop „Einfluss von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Expression von Stressproteinen“ stellten David de Pomerai und Dariusz Leszczynski ihre aktuellen Forschungsergebnisse vor – und besonders de Pomerai erzählte überraschende Neuigkeiten. Aber auch andere Experten meldeten sich zu Wort – und auch sie wussten den etwa 40 Wissenschaftlern aus Europa, Japan und Amerika Interessantes und Neues zu berichten.

Hitzeschockproteine – ein universelles System

Bereits im ersten Vortrag der Veranstaltung wurde deutlich, dass Stressproteine faszinierende biochemische Verbindungen sind, die vielfältige Ansatzpunkte für die Forschung liefern, da sie nahezu überall in der belebten Natur vorkommen. Matthias Gaestel von der Universität

Hannover verwies in seiner Einführungspräsentation „Hitzeschockantwort und Stresssignalwege“ auf die Tatsache, dass diese besonderen Proteine einen in der Evolution hochkonservierten Schutzmechanismus darstellen. Wohl alle Lebewesen, von Bakterien, über Pflanzen und Tiere bis zum Mensch können auf Stressproteine zurückgreifen. Diese enorme Verbreitung der zellulären Stressantwort liefert der Wissenschaft eine Vielzahl an Modellorganismen für weitreichende vergleichende Untersuchungen an ein- und vielzelligen Lebewesen. Gaestel zeigte an Beispielen Parallelen zwischen eu- und prokaryontischen Hitzeschockproteinmechanismen, beschrieb die einzelnen Hitzeschockproteinfamilien und deren Aufgaben, ging auf die Struktur und Aktivierung der Hitzeschockgene und die komplexen intrazellulären Signalwege ein, die mit einer Stressantwort eng verknüpft sind.

Faltungshelfer und Stabilisatoren

Die meisten Hitzeschockproteine haben so genannte Chaperoneigenschaften. Das bedeutet, dass sie Proteine, die teilweise ungefalted oder gänzlich falsch gefaltet sind, stabilisieren können und somit die Bildung von Proteinaggregaten verhindern. Des Weiteren unterstützen sie die korrekte Rückfaltung dieser Proteine in deren funktionelle Konformation. Eine wichtige Rolle spielen die so genannten kleinen Hitzeschockproteine (small Heat-Shock-Proteins, sHSP). Sie können zwar keinen unmittelbaren Einfluss auf die Proteinfaltung nehmen, aber sie halten fehlgefaltete und teilweise denaturierte Proteine ohne ATP-Verbrauch stabil, bis andere, ATP-abhängige Hitzeschockproteine, die Rückfaltung initiieren und begleiten. Gaestels eigene Untersuchungen zeigten, dass das kleine Hitzeschockprotein HSP25 unter Stresseinfluss nicht nur stark exprimiert, sondern zudem innerhalb von Minuten phosphoryliert wird. Zwei Phosphorylierungsstellen weist das HSP25 der Maus auf, das dazu ähnliche HSP27 des Menschen besitzt drei.

An den intrazellulären Kommunikationswegen, die die Stressreaktion einer Zelle auslösen, sind viele Phosphorylierungsreaktionen beteiligt. Eine Schlüsselrolle nimmt die Kaskade der Mitogen-aktivierten- Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) ein, die weitere wichtige Schaltstellen, nämlich die p38-MAP-Kinase und die Kinase MK2, steuert. Die Phosphorylierung der kleinen Hitzeschockproteine ist ein Endpunkt dieser Kaskade. Experimente, bei denen der Signalweg über die p38-MAP-Kinase an bestimmten Stellen blockiert wurde, zeigten, dass auch Entzündungsreaktionen über diesen Signalweg ausgelöst werden. Eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung der sHSP spielen die so genannten stressaktivierten Proteinkinasen (SAPK). Wie jedoch diese aktiviert werden ist zurzeit noch unklar. Zusammenfassend erklärte Gaestel, dass zumindest in Säugerzellen zwei verschiedene stressinduzierte Reaktionswege

bei den kleinen Hitzeschockproteinen zusammenlaufen - nämlich die Aktivierung von Hitzeschockgenen und der Pfad über die p38 MAPK-Kinase. Welche Rolle die Phosphorylierung der sHSP spielt, ist noch nicht bekannt. Deutlich verschieden sind die zeitlichen Abläufe der beiden Reaktionen. Die Hitzeschockantwort erreicht erst nach Stunden ihren Höhepunkt, die Phosphorylierungskaskade, die zur Phosphorylierung der kleinen Hitzeschockproteine führt, aber auch den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen kann, läuft bereits nach wenigen Minuten auf Hochtouren. Vor diesem Hintergrund warf Matthias Gaestel die Frage auf, ob hochfrequente elektromagnetische Felder nicht auch Apoptose oder Nekrose zur Folge haben könnten.

DnaK-Zyklus ist wärmerreguliert

John Grimshaw vom Biochemischen Institut der Universität Zürich stellte in seinem Vortrag „Den Hitzeschock fühlen: Strukturelle und funktionelle Untersuchung von GrpE, dem Nukleotid-Austauschfaktor des DnaK Chaperon-Systems“ einen Reaktionszyklus der bakteriellen Hitzeschockantwort detailliert vor. Er untersuchte die Abläufe im DnaK-Zyklus im Bakterium *Escherichia coli* unter Hitzeschockbedingungen, denn das Zusammenspiel der drei beteiligten Proteine DnaK, DnaJ und GrpE war in *E. coli* bislang lediglich für physiologische Temperaturen genau beschrieben. Seine neue Erkenntnis: im DnaK-Zyklus gibt es einen molekularen Temperaturfühler.

Das Hitzeschockprotein DnaK ist das bakterielle Pendant des eukaryontischen HSP70. DnaK kann fehlgefalteten Proteinen zur richtigen, funktionellen Struktur verhelfen, braucht jedoch zwei Helfer – die Proteine DnaJ und GrpE. Das Substrat des Hitzeschockproteins DnaK sind missgefaltete Proteine, jedoch hat es unterschiedliche Affinitäten zu seinem Substrat. Im Komplex mit ATP ist die Affinität von DnaK zu fehlgefalteten Proteinen gering, nach Hydrolyse von ATP zu ADP ist seine Affinität hoch. Erhöht ist die Affinität auch, wenn DnaK ohne ADP und ATP vorliegt.

Im Ruhezustand liegt das Gleichgewicht auf der Seite des DnaK-ATP-Komplexes. DnaK hat eine ATPase und kann ATP zu ADP hydrolysieren und die Änderung in der Substrataffinität selbst herbeiführen. Die ATP-Hydrolyse wird vom Helferprotein DnaJ stark gefördert. Die Substratbindung, Proteinfaltung und Substratfreisetzung verläuft zyklisch, daher wird die Reaktionsfolge DnaK-Zyklus genannt. Ohne die gezielte ATP-abhängige Änderung der Substrataffinität könnte der Kreisprozess des DnaK-Proteins nicht ablaufen, denn der erforderliche Substrataustausch würde bei konstanter Affinität nicht im erforderlichen Maß funktionieren.

DnaJ unterstützt den DnaK-Zyklus indem es die ATP-Hydrolyse durch DnaK um den Faktor 200 beschleunigt und so die Affinität von DnaK zum Substrat erheblich beeinflusst. Diskutiert wird, dass es auch das Substrat bindet und es mit DnaK in Kontakt bringt.

Das Protein GrpE ist ein Nukleotidaustauschfaktor und hilft beim Ablösen des ADP-Moleküls, das durch die Hydrolyse von ATP entsteht. Erst nachdem das ADP die Bindestelle verlassen hat, kann DnaK wieder ATP binden. Dadurch sinkt die Affinität von DnaK zum Substrat und das Substrat wird nach erfolgter Faltungskorrektur wieder freigesetzt.

Protein GrpE - ein molekularer Temperaturfühler

Grimshaw konnte zeigen, dass sich der DnaK-Zyklus an höhere Temperaturen anpasst und sich das Gleichgewicht der Reaktion zum ADP-DnaK-Komplex hin verschiebt.

Verantwortlich dafür ist das Protein GrpE. Es besitzt zwei lange Helices, die als Temperatursensor wirken. Während DnaK und DnaJ bei 45° C noch stabil sind, verändert sich die Struktur von GrpE bereits ab 40° C reversibel im Bereich der beiden Helices. Die temperaturabhängige Strukturänderung von GrpE verschiebt das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite des substrataffinen DnaK-ADP-Komplexes. Bei sinkenden Temperaturen wird das Gleichgewicht durch die reversible Strukturänderung im GrpE wieder in den ursprünglichen Zustand korrigiert. Mit dieser temperatursensitiven Anpassung des DnaK-Zyklus werden die im Zyklus reparierten Proteine von DnaK solange zurückgehalten bis die Umgebungstemperatur wieder proteinverträgliche Werte angenommen hat.

Thermolabile Luciferase als Testsystem

Mit „Proteine und Membranen als empfindliche Thermometer: Die Rolle der Hitzeschockproteine beim Empfinden und Reparieren von Stressschäden in Bakterien und Pflanzen“ überschrieb Pierre Goloubinoff von der Universität Lausanne seinen Beitrag. Er entwickelte ein Testsystem auf Basis von thermolabiler Luciferase, das ihm erlaubt, Hitzeschockreaktionen zu detektieren. Als Modellorganismus dient Goloubinoff die Moospflanze *Physcomitrella patens*. Das Enzym Luciferase ist bei Temperaturen höher als 28° C instabil und verliert dann seine katalytische Aktivität. Eine wichtige Eigenschaft des Enzyms wurde von Forrieter 1997 aufgeklärt: Eine vorsichtige Wärmeverbehandlung macht das Enzym weniger anfällig gegen Denaturierung. Das vorbehandelte Enzym hält bei Temperaturerhöhung seine volle Aktivität einige Minuten länger aufrecht als unbehandelte Luciferase. Goloubinoff und seine Mitarbeiter gingen nun von der Hypothese aus, dass elektromagnetische Felder den selben schützenden Effekt auf Luciferase haben wie die Vorbehandlung mit Wärme.

Für ihre Experimente übertrugen die Forscher das Luciferase-Gen in *Physcomitrella patens*. Um thermische von nicht thermischen Effekten zu unterscheiden, setzten Goloubinoff und sein Team gepulste und nicht-gepulste Signale ein. Die Wissenschaftler nahmen an, dass die gepulsten Signale im Vergleich zu den kontinuierlichen Signalen nur minimale thermische Effekte haben würden.

Die durchschnittliche Feldstärke betrug bei beiden Signaltypen 353 V/m, die Pulsdauer war 20 Sekunden, die Pulse folgten im Abstand von 40 Sekunden. Jede Exposition mit gepulsten Signalen umfasste 1200 Pulse. Die Dauer der kontinuierlichen Exposition sowie weitere für die Dosimetrie relevante Parameter wurden nicht genannt.

Die Experimente ergaben, dass kontinuierliche Felder mit hohen mittleren Feldstärken von 353 V/m und 707 V/m Luciferase schützen konnten. Die Aktivität des Enzyms war bei 41° C in den ersten zehn Minuten nach Beginn des Hitzeschocks deutlich höher, wenn die Pflanzen vorab kontinuierlich befeldet wurden. Die Exposition in einem Feld mit 353V/m hatte den gleichen Effekt, wie eine Wärmeverbehandlung bei 27° C, also 2° C über der normalen Umgebungstemperatur der Pflanzen. Betrug die mittlere Feldstärke des kontinuierlichen Feldes lediglich 176 V/m konnte kein schützender Effekt festgestellt werden. Gepulste Felder mit gleicher mittlerer Feldstärke wie die kontinuierlichen Felder, hatten keinen Effekt auf die Thermostabilität der Luciferase. Goloubinoff erklärt dies damit, dass die Wärme bei gepulsten Feldern abfließt und so keinen thermischen Effekt auslösen kann.

Als Zwischenergebnis hielt Goloubinoff fest, dass der Schutz der Luciferase ein thermischer Effekt sei und dieser Effekt in Abhängigkeit von der Feldstärke des eingesetzten elektromagnetischen Feldes ausgelöst wird. Wenn elektromagnetische Felder eine Hitzeschockantwort induzierten, so liege dieser Reaktion nach Goloubinoffs Ansicht ein thermischer Effekt zugrunde. Er entwickelte die Hypothese, dass kleine Hitzeschockproteine in die protektiven Prozesse eingebunden sein könnten.

Derzeit experimentieren Goloubinoff und Mitarbeiter mit dem wärmeinduzierbaren Promoter Gmhsp 17.3, kombiniert mit dem Reporter gen uidA, das für hitzestabile β -Glucuronidase codiert. Sie wollen untersuchen, wie stark der Promoter durch elektromagnetische Felder und andere Stressoren wie Kälte, hohe Salzkonzentration oder Trockenheit aktiviert wird. In Vorversuchen wurde bereits ermittelt, wie der Promoter auf Temperaturerhöhungen reagiert. Temperaturschritte von 2 bis 3 ° C können demnach durch die Unterschiede der Promoteraktivität differenziert werden.

Können Membranen Wärme detektieren?

Goloubinoff stellte die Frage, wie Organismen Hitze wahrnehmen können? Nach seiner Auffassung sind temperaturabhängige Veränderung in der Zellmembran an der Wärmedetektion beteiligt. Er verwies auf Untersuchungen von Lazlo Vigh, die zeigten, dass *E. coli* Bakterien bereits bei 25° C mit Hitzeschockantwort reagieren, wenn der Membraninducer Bimoclolmol zugegeben wird. Werden die Membranlipide bei 25° C abgesättigt und wird anschließend die Temperatur auf 42° C erhöht, bleibt die Hitzeschockantwort aus. Erhöht man hingegen die Temperatur von 25° C auf 42° C ohne zuvor die Membranlipide zu behandeln, folgt die Hitzeschockantwort nach kurzer Zeit. Diese Befunde sind für Goloubinoff wichtige Hinweise für die Rolle der Membranen bei der Induktion der Hitzeschockantwort.

Detaillierter Literaturvergleich

Martin L. Meltz von der Abteilung für Strahlenonkologie der Universität Texas in San Antonio nahm eine differenzierte Bestandsaufnahme über bereits abgeschlossene und publizierte Studien vor. Die angesprochenen Untersuchungen befassten sich alle mit dem Aspekt der Gesundheitsschädigung, ausgelöst durch Effekte hochfrequenter elektromagnetischer Felder. Meltz ging dabei besonders auf Studien ein, die eine Stressantwort als Reaktion auf Befeldung untersuchten. Er nannte mehrere Beispiele, wie Zellen auf toxische Einflüsse reagieren: Bildung von Hitzeschockproteinen, Apoptose, Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen oder bestimmten Proteinkinasen und zeigte, welche Ergebnisse zu diesen Reaktionsmustern in der wissenschaftlichen Literatur vorliegen.

Da der Workshop sich besonders mit Stressproteinen beschäftigen sollte, grenzte Meltz in seinem Vortrag Studien, die die Aktivierung von Hitzeschockproteinen behandelten, von Studien ab, die andere stressinduzierte Reaktionswege untersucht hatten. Fünf Studien, davon drei *in vivo* und zwei *in vitro*, hatten Einflüsse hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf Stressproteine zum Gegenstand:

- **Cleary et al (1997):** Stress proteins are not induced in mammalian cells exposed to radiofrequency or microwave radiation. *Bioelectromagnetics* 18: 499-505.
- **Fritze et al (1997):** Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain. *Neuroscience* 81: 627-639
- **Daniells et. al. (1998):** Transgenic nematodes as biomonitors of microwave-induced stress. *Mutation Research* 399: 55-64

- **De Pomerai et. al. (2000):** Microwave radiation induces a heat-shock response and enhances growth in the nematode *caenorhabditisELegans*. IEEE Trans. On Microwave Theory and Techniques 48: 2076-2081
- **Leszczinski et al (2002):** Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer-and blood-brain barrier-related effects. Differentiation 70: 120 –129

De Pomerai und Leszczinski zeigten in ihren Untersuchungen, dass elektromagnetische Felder auf die Aktivierung von Stressproteinen Einfluss nehmen können, denn die Proteine HSP16 beziehungsweise HSP27 waren nach Befeldung stärker phosphoryliert. Meltz warf einige kritische Fragen und Anmerkungen zu den Experimenten und Ergebnisinterpretationen in diesen beiden Studien auf.

Meltz ging auch auf Studien ein, die andere stressinduzierte Signalwege untersucht hatten:

- **Li et al (1999):** TP53 tumor suppressor protein in normal human fibroblasts does not respond to 837 MHz microwave exposure. Radiat. Res. 151: 710-716
- **Walters et. al. (1995):** No detectable bioeffects following acute exposure to high peak power ultra-wide band electromagnetic radiation in rats. Aviation, Space and Environmental Medicine 66: 562-567
- **Natarajan et al (2002):** NF-*κ*B-DNA-binding activity after high peak power pulsed microwave (8.2 GHz) exposure of normal human monocytes. Bioelectromagnetics 23: 271 –277
- **Goswami et al (1999):** Proto-oncogene mRNA levels and activities of multiple transcription factors in C3H 10T murineembryonic fibroblasts exposed to 835.62 and 847.74 MHz Cellular Phone Communication Frequency radiation. Radiat. Res. 151: 300-309
- **Nayak et al (2004):** Effect of Ultrawideband electromagnetic radiation on cell cycle progression in human hematopoietic cells (Revised and Resubmitted to Bioelectromagnetics)
- **Nayak et. al. (2004):** Determination of p53 stabilization and transactivation of its target genes in response to ultrawideband electromagnetic radiation exposure in human hematopoietic cells. To be submitted May 5, 2004

Die Studien von Li und Walters zeigten keinen Einfluss des Feldes auf die untersuchten Parameter. Die Experimente von Natarajan ergaben eine vierfache Bindungskapazität von NF-*κ*B nach Befeldung, Goswami zog aus seinen Untersuchungen den Schluss, es gäbe eine spezifische Reaktion der Zellen auf die applizierten elektromagnetischen Signale, aber keine generelle Stressreaktion. Die Resultate von Nayak erbrachten in der erstgenannten Studie keine Effekte, in der anderen schreibt der Wissenschaftler von Einflüssen auf die Genregulation.

Martin Meltz machte angesichts der heterogenen Ergebnisse deutlich, dass eine biologische Reaktion, die zwar Merkmale einer Stressantwort offenbart, nicht zwingend eine

Stressantwort sein muss: „Dies ist möglich, wenn die Stressantwort in nicht-spezifischer Weise erfolgt und lediglich eine von mehreren Veränderungen ist, die ebenfalls auftreten.“

Dünne Basis: Fehlende Dosimetrie erschwert Ergebnisbewertung

Sianette Kwee von der Universität Aarhus, Dänemark, stellte Ergebnisse vor, nach denen Hitzeschockproteingene mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern aktiviert werden können. Sie verwies zudem auf eigene Forschungen aus dem Jahr 1999, die eine Induktion von Hitzeschockproteinen auch durch extrem niederfrequente 50 Hertz-Magnetfelder belegten. Bei ihren Studien aus dem Jahr 2001 setzte sie Amnion-Zellen einem 960 MHz-Feld des GSM-Standard aus. Die spezifische Absorptionsrate (SAR) betrug 2,1 mW/kg, die Exposition dauerte 20 Minuten. Die Zellen wurden auf gläsernen Objektträgern kultiviert und exponiert. Im Anschluss an die Befeldung suchte die Forscherin nach Veränderungen im Proteinmuster der Zellen.

Folgt man Kwees Ergebnissen, so haben hochfrequente elektromagnetische Felder mehrere Auswirkungen auf die Amnion Zellen. Es werden Hitzeschockproteine gebildet und der Zellzyklus stoppt an zwei Positionen. In synchron wachsenden Zellkulturen wird der Zellzyklus somit verzögert, asynchron wachsende Kulturen werden synchronisiert, dies wiederum führt zu verstärkter Proliferation. Befeldete Zellkulturen hatten über einen Zeitraum von zwei Stunden einen größeren Anteil an Zellen, die das Protein Cyclin enthielten, als die Kulturen aus den Kontrollen.

Nachdem die Hitzeschockproteine ihre Wirkung in den Zellen entfaltet und beschädigte Zellen repariert haben, sank ihre Konzentration wieder und der Zellzyklus wurde fortgesetzt. Die Stressantwort war nach 20 Minuten Befeldung am stärksten ausgeprägt, nach zwei bis drei Stunden ging die Konzentration der HSP70-Proteine wieder auf den Wert der Kontrollen zurück. Anhand der eingesetzten immuno-histochemischen Methoden verfolgte Kwee den Weg der Stressproteine in der Zelle. HSP70 machte sich vom Zellkern aus auf den Weg zum endoplasmatischen Retikulum und zum Golgi-Komplex, HSP 90 sammelte sich im Kern und im endoplasmatischen Retikulum.

Leider konnte die Referentin keine genauen Angaben über Expositionsapparatur und Dosimetrie machen.

Feldsensitives DNA-Element soll Genaktivierung auslösen

Reba Goodman von der Columbia University, New York schilderte ihre Ergebnisse aus Experimenten mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern an *Drosophila* Fliegen. Den von ihr gewählte Modellorganismus *Drosophila melanogaster* setzte bereits F. Ritossa 1962 bei den ersten Experimenten zur Stressproteinforschung überhaupt ein. Goodman befeldete *Drosophila*-Fliegen mit einem GSM-Signal eines Mobiltelefons. Das Mobiltelefon spielte während der Expositionszeit Musik, der maximale SAR-Wert wurde von Goodman mit 1,4 W/kg angegeben, die Umgebungstemperatur betrug 25° C. 100 Fliegen wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen zweimal pro Tag dem Feld ausgesetzt, 80 Fliegen dienten als Kontrolle. Goodman untersuchte folgende Parameter:

- Anzahl der Nachkommen
- HSP70-Konzentration in den Speichelzellen
- ELK1-Kinase und Serum Respond Element (zwei Transkriptionsfaktoren, die in Wachstum und Entwicklung eingebunden sind)

Bei allen vier untersuchten Parametern konnten Goodman und Mitarbeiter signifikant ($p=0,01$) erhöhte Werte verzeichnen. Sie interpretierte diese Veränderungen als nicht-thermische Effekte der Befeldung und forderte, dass Stressantworten in den Sicherheitsrichtlinien berücksichtigt werden. Schließlich seien Stressproteine ein wesentlicher Schutzmechanismus der Zelle und die aktivierten zellulären Signalmoleküle könnten als Biomarker für Sicherheitsempfehlungen herangezogen werden.

Goodman stellte in ihrem Vortrag ferner ein für elektromagnetische Felder sensibles Regulatorelement im HSP70-Promoter vor, das für die Veränderungen der HSP-70 Konzentrationen unter Feldeinfluss verantwortlich sei. Die CTCT-reiche, etwa 70 Basenpaare lange Region oberhalb des HSP70-Promoters reagiere spezifisch auf elektromagnetische Felder, jedoch nicht auf steigende Temperaturen, führte sie aus. Werden Mutationen in das feldsensitive Element eingefügt, so gehe die Empfindlichkeit gegenüber elektromagnetischen Feldern verloren, erklärte Reba Goodman. Wird das Element Reporter-genen vorgeschaltet, könnten diese durch elektromagnetische Felder induziert werden, folgerte sie aus ihren Experimenten mit dem Luciferase-Gen.

In der Diskussion wurden mehrfach die von ihr gewählten Befeldungsbedingungen kritisiert. Da die Ausgangsleistung des Mobiltelefon von der Basisstation maßgeblich beeinflusst wird und die Basisstation sich an wechselnde Sende- und Empfangsbedingungen anpasst, kann keine Aussage über Feldverteilung, SAR und andere wichtige dosimetrische Werte getroffen

werden. Dieser nachlässige Umgang mit der Dosimetrie verführte einen der Anwesenden zu der Bemerkung, ob nicht vielleicht die Musik die beschriebenen Effekte ausgelöst haben könnte.

Leszczynskis Szenarien - welche Konsequenzen haben Protein-Phosphorylierungen?

Dariusz Leszczynski von der nationalen finnischen Strahlenschutzbehörde präsentierte seine bislang veröffentlichten beziehungsweise zur Veröffentlichung vorgelegten umfangreichen Ergebnisse. Er untersucht Wirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf das Proteinmuster von Endothelzellen. Der Vortrag wurde bereits anlässlich der BEMS Tagung 2003 in Maui und bei der EBEA-Konferenz 2004 in Budapest vorgestellt. Auf die Beschreibung der umfangreichen experimentellen Strategien soll daher an dieser Stelle verzichtet werden. Die Arbeitsgruppe setzt Proteomics- und Genomics-Techniken ein, um schnell einen Überblick über potenzielle Veränderungen in einigen tausend Genen und Proteinen zu erhalten.

Nach Leszczynskis derzeitigen Resultaten verändert sich durch Befeldung das Phosphorylierungsmuster einiger hundert Proteine, darunter auch HSP27. Befeldet wurden die von seiner Arbeitsgruppe eingesetzten Endothelzellen EA.hy926 in einem GSM 900 oder GSM 1800 Feld. Die durchschnittliche SAR betrug 2,4 W/kg, den Temperaturanstieg während der Befeldungen gab Leszczynski mit 0,1 bis 0,3° C an. Die experimentellen Bedingungen und Feldverteilungen wurden ausführlich erklärt, ebenso die Vorgehensweise bei der Analyse der Proteine.

Im Mittelpunkt von Leszczynskis Darstellungen standen das kleine Hitzeschockprotein HSP27 und das Enzym p38 MAP-Kinase, das in die Phosphorylierungskaskade von HSP27 eingebunden ist. Nach den Ergebnissen der Arbeitsgruppe steigt durch hochfrequente Befeldung die Konzentration an phosphoryliertem HSP27 gemittelt über alle Befeldungsexperimente um 28 Prozent an, die Aktivität der p38 MAP-Kinase nahm ebenfalls zu, jedoch um weniger als den Faktor zwei.

Phosphoryliertes HSP27 beeinflusst Zytoskelett

Zellen mit hoher Konzentration an phosphoryliertem HSP27 zeigten Veränderungen im Zytoskelett. Sie bildeten mehr so genannte F-Actin Stress-Fasern. Weiterführende Analysen aus den Proteomicsdaten zeigten, dass eine ganze Reihe von Zytoskelett-Proteinen durch Exposition in hochfrequenten elektromagnetischen Feldern beeinflusst werden.

- Vimentin
- Filamin A
- F-Actin
- Actinlike Protein 2
- Tubulin
- Fascin
- die leichte Kette des Myosins
- Cofilin

Die Analyse der Genexpressionen ergab, dass einige der untersuchten Gene nach Befeldung stärker, andere schwächer und wieder andere unverändert exprimiert werden.

Stärker exprimiert werden die Gene hsp90 (Faktor 1,7) und hsp 40 (Faktor 1,6), vermindert exprimiert werden hsp-Protein-6 und hsp70-Protein-2, keine Veränderungen waren bei hsp60, hsp27 und hsc70 festzustellen.

Leszczynski entwickelte aus seinen Beobachtungen Wirkungshypothesen für die Zellebene. Die geschilderten Veränderungen differenzierte er nach folgenden vier Ansatzpunkten für weiterführende Effekte:

- Proteinfaltungseffekte
- Effekte auf das Zytoskelett
- Apoptosiseffekte
- Genexpressionseffekte

Er entwarf umfangreiche zellbiologische Wirkungsszenarien und spekulierte über mögliche Konsequenzen. Jedoch leitete er aus diesen Gedankenspielen keine Gesundheitsgefährdung für Organe oder den gesamten Organismus ab.

Genaktivierung durch GSM-Felder bleibt *in vitro* und *in vivo* aus

Florence Poullétier de Gannes stellte *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss von 900 MHz-Feldern des GSM Standards auf Hitzeschockproteine vor. Die Studien wurden an der Universität Bordeaux, Frankreich, durchgeführt. Für ihre Experiment wählten die Forscher Zellen aus Geweben, die beim mobilen Telefonat besonders in elektromagnetischen Feldern exponiert sind: Gehirnzellen und Hautzellen. Ziel ihrer Untersuchungen war, zu

erfassen, ob die Hitzeschockproteine HSP27, HSP70 und das konstitutiv exprimierte HSC70 durch GSM-900 Felder aktiviert werden. Neben Einzelzellen verwendeten sie auch wiederhergestellte Epidermis als Modell für einen Zellverbund sowie haarlose Ratten. Die rekonstruierte Epidermis setzte sich zu 90 Prozent aus Keratinozyten und zu 10 Prozent aus Melanozyten zusammen. Darüber hinaus replizierten sie die Untersuchungen von Dariusz Leszczynski mit der gleichen Endothelzelllinie EA-hy926. Die Zellen bezogen sie zum einen aus Leszczynskis Labor, zum anderen von einer Arbeitsgruppe der Universität North Carolina.

Gehirn-Zellen reagieren nicht auf GSM-Feld

Die Versuchszellen wurden mit einer SAR von 2W/kg in einem 900 MHz GSM-Feld exponiert. Bei Scheinexpositionen war die Antenne abgeschaltet. Die Temperaturdifferenz zwischen exponierten Zellen und scheinexponierten Kontrollen betrug höchstens 0,1° C. Gehirnzellen wurden entweder 1 Stunde oder 24 Stunden befeldet, auf Hautzellen wirkte das elektromagnetische Feld 48 Stunden ein. Für die Positivkontrolle wurden die Stressproteine in den Gehirnzellen durch einen 20minütigen Hitzeschock bei 43° oder 45° C induziert, in den Hautzellen mit UV-B Licht aktiviert. Den qualitativen und quantitativen Nachweis der Stressproteine HSP27, HSP70 und HSC70 führten die Wissenschaftler mit immunohistochemischen Methoden und anschließender computergestützter Bildanalyse.

Bei keiner der getesteten Gehirn-Zelllinien konnte das elektromagnetische Feld Hitzeschockproteine induzieren. Auch auf die Hitzeschockproteine HP27 und HSP70 in unterschiedlichen Hautzelltypen hatte das GSM-Feld keinen Einfluss. Das Protein HSC70 wurde in menschlichen Fibroblasten unter Befeldung schwächer exprimiert. In der wiederhergestellte Epidermis konnten durch das elektromagnetische Feld keine Wirkungen auf die untersuchten Proteine ausgelöst werden.

Die haarlosen Ratten wurden akuter und chronischer Befeldung unterzogen, wobei jeweils eine Körperseite exponiert, die andere als Kontrolle herangezogen wurde. Die akuten Befeldungen wurden in einem GSM 900 oder GSM 1800-Feld für zwei Stunden bei einer SAR von 4 W/kg durchgeführt.

Die akuten Befeldungen hatten die selben technischen Größen, als zusätzliche SAR wurde 2 W/kg gewählt. Die Tiere wurden für zwei Stunden pro Tag an fünf Tagen in der Woche über zwölf Wochen hinweg im Feld exponiert. Die Auswertungen der *in vivo* Versuche bestätigen

nicht die rückläufige Aktivierung der HSC70 Proteine, die in den *in vitro* Versuchen festgestellt wurde. Die Experimente werden fortgeführt.

Leszczynski-Studie nicht bestätigt

Bei der Replikation der Leszczynski-Studie mit der Endothelzelllinie EA-hy926 verwendete die Arbeitsgruppe aus Bordeaux Fluoreszenzanalysen und für den quantitativen HSP27-Nachweis ELISA als immuno-histochemisches Testverfahren.

Die Analysen bestätigten Leszczynskis Ergebnisse nicht – weder die Zellen aus Leszczynskis Labor noch die aus dem Labor der Universität von North Carolina zeigten eine signifikante Aktivierung von HSP27. Lediglich ein nicht-signifikanter Anstieg von HSP27 um 26 Prozent nach einstündiger Befeldung konnte registriert werden. Zusätzliche Experimente mit weiteren Positivkontrollen sollen folgen.

Wachstum, Expression und Phosphorylierung untersucht

Zwei bemerkenswert gut dokumentierte Studien stellte der Japaner Junji Miyakoshi von der Hirosaki Universität vor. Die erste Arbeit befasste sich mit Effekten von 1950 MHz Feldern auf die Expression von HSP27 und HSP70 in menschlichen Gliomazellen der Linie MO54. Die Zellen wurden in einem kontinuierlichen Signal mit einer Frequenz von 1950 MHz exponiert oder scheinexponiert. Die Experimentatoren hatten keine Kenntnis über die Befeldungssituation, da diese von Computern zufällig bestimmt wurde. Die Exposition dauerte zwischen zehn und 120 Minuten, die spezifischen Absorptionsraten waren 1, 2 oder 10 W/kg. Analysiert wurden die Konzentrationen von HSP27 und HSP70, der Grad der Phosphorylierung an Serin 78 des HSP27, die Verteilung von HSP27 in den Zellen, die Wachstumsraten der Zellkulturen und die Morphologie der Zellen.

Kein Effekt bei mobilfunkrelevanten SAR-Werten

Die Ergebnisse zeigten keine Veränderungen der Wachstumsraten bei SAR-Werten von 2 und 10 W/kg. Ein- und zweistündige Befeldung bei allen gewählten SAR-Stufen hatte weder Einfluss auf Expression noch auf die Verteilung von HSP27 in den MO54 Zellen. Auch die Expression von HSP70 wurde vom applizierten Feld nicht verändert. Jedoch sank bei Befeldung über mindestens eine Stunde mit einer SAR von 10W/kg die Konzentration an Serin-78-phosphoryliertem HSP27. Miyakoshi geht davon aus, dass die konstitutive Phosphorylierung von HSP 27 an Serin 78 bei dieser hohen SAR blockiert wird. Nachteilige Wirkungen auf die Zellkultur hält Miyakoshi jedoch für wenig wahrscheinlich, schließlich

konnten keinerlei morphologische Veränderungen an den Zellen festgestellt werden. Zellen, die einem Hitzeschock bei 43° C unterworfen wurden, nahmen eine deutlich rundere Form an, in einigen Zellen veränderte sich zusätzlich die Gestalt der Zellkerne. Miyakoshis Ergebnisse stehen in einigem Widerspruch zu Leszczynskis Arbeiten und ergänzen die von Florence Poullétier de Gannes vorgestellten Resultate.

Auch bei 2,45 GHz: Effekte verlangen sehr hohe SAR-Werte

Die zweite Arbeit, die von Miyakoshi präsentiert wurde, untersuchte die Wirkung starker 2,45 GHz Felder auf die Expression von HSP70 Proteinen in MO45 Zellen. In diesen Untersuchungen wurden Petrischalen mit drei konzentrischen Kompartimenten eingesetzt. Die SAR wurde während einer 24-stündigen Befeldung für jedes Kompartiment separat erfasst, abhängig von einem bestimmten Leistungseintrag zwischen 0,8 und 13 W. Zudem wurden die zugehörigen Temperaturänderungen gemessen. Auf diese Weise konnte ein SAR- und ein Temperatur-Profil für jedes der drei ringförmigen Abteile erstellt werden. Die durchschnittlichen SAR-Werte lagen zwischen 1.3 und 100 W/kg. Die Temperatur stieg maximal um 5° C an. In der Studie wurden die Sterberaten der Zellen gemessen und die Änderung der HSP70-Konzentration per Western-Blotting detektiert.

Temperaturen von 39° C über einen Zeitraum von 16 Stunden hatten keinen Einfluss auf die Sterberate scheinexponierten Zellen. Hingegen nahm die Überlebensrate in den bei 100 W/kg exponierten Zellen um 30 Prozent ab. Je länger die Exposition dauert, desto stärker wird HSP70 exprimiert. Lediglich bei einer SAR von 5 W/kg trat dieser Effekt nicht auf. Aber auch die Zellen, die als Temperaturkontrolle bei 39° C kultiviert wurden, bildeten mit zunehmender Zeit mehr HSP70. Jedoch exprimierten Zellen bei einer SAR von 50 W/kg mehr HSP70, als die Temperaturkontrollen bei 39° C. Nach Miyakoshis Resultaten exprimieren MO54 Zellen ab einer SAR von 20 W/kg vermehrt HSP70 nur aufgrund der Befeldung, selbst wenn die Wirkung der Temperaturerhöhung berücksichtigt wird. Jedoch sind derart hohe SAR-Werte für das mobile Telefonieren ohne Bedeutung.

De Pomerai revidiert Ergebnisse

David de Pomerai untersuchte am Wurm *Caenorhabditis elegans*, ob die Aktivierung kleiner Hitzeschockproteine durch hochfrequente elektromagnetische Felder auf einen thermischen oder nicht-thermischen Effekt zurückzuführen ist. Ab 25° C kann in diesen Fadenwürmern ein leichter Hitzeschock ausgelöst werden, niedrigere Temperaturen haben keine Wirkung. De

Pomerai befeldete transgene Würmer, die ein mit dem hsp16 Promoter kombiniertes Reporter-gen tragen, das bei 25 bis 27° C schwach und bei Erwärmung über 27° C stark induziert wird. Im Jahr 2000 hatte er im Magazin „Nature“ publiziert, dass die hsp16-Gene in *C. elegans* durch kontinuierliche Hochfrequenzfelder mit 750 bis 1000 MHz bei einer mittleren SAR von 5 bis 40 mW/kg aktiviert werden können. Die Befeldungen dauerten zwischen zwei und 24 Stunden.

Damals ging er bei der Genaktivierung von einem nicht-thermischen Effekt aus. Doch die anschließenden Untersuchungen an der TEM-Zelle, in der die Befeldungen durchgeführt wurden zeigten, dass ein Leistungsverlust in der Zelle auftrat, der Temperaturanstiege bewirken kann. Inzwischen wurde die TEM-Einheit verbessert, der Temperaturanstieg ist nun kleiner als 0,1° C. De Pomerai wiederholte seine Experimente und stellte fest, dass er seine Ergebnisse nicht reproduzieren konnte. Diese Untersuchungen zeigen, dass Befeldungseinrichtungen exakt justiert und bereits geringe Temperaturänderungen immer in Betracht gezogen werden müssen.

Genomics-Methoden - schnelle und umfassende Genanalyse

Christian Maercker vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung in Heidelberg stellte einen Ansatz auf der Basis von kleinen Analyseplatten, so genannten Microarrays, vor. Microarrays erlauben in kurzer Zeit Aktivitätsänderungen in einigen tausend Genen zu überprüfen. Dieses systembiologische Verfahren ähnelt dem Proteomics-Weg, den Leszczynski eingeschlagen hat. Jedoch werden in den von Maercker eingesetzten Microarrays nicht Proteine, sondern DNA-Abschnitte, also letztlich Gene analysiert.

Aus den zu untersuchenden Zellen wird zunächst die RNA isoliert und mit einem geeigneten Enzym in so genannte komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. In diese cDNA werden Fluoreszenzfarbstoffe eingebaut – sie machen später das Aufspüren bestimmter cDNA-Moleküle auf der Analyseplatte möglich. Dieser Mix aus unzähligen cDNA-Molekülen enthält die Gene, die bis kurz vor dem Zellaufschluss aktiv waren. Maercker favorisiert diese Strategie, da die Expression identischer Gene nicht in allen Zelltypen und -linien gleich reguliert wird. Die Expressionsregulation hängt von der Zelllinie ab, vom Entwicklungsstadium eines Individuums und von vielen äußeren Faktoren. Mit dem Microarray-Verfahren kann eine breite Veränderung unabhängig vom Regulationsmuster direkt erfasst und mit Kontrollen verglichen werden.

75000 Gene im Visier

Auf der Microarray-Platte sind 75000 cDNA-Moleküle mit definierten Sequenzen fixiert, sie repräsentieren einen großen Teil bekannter Gene. An diese fixierten Moleküle können die cDNA-Abschnitte aus Probe und Kontrolle binden, sofern sie die jeweils passende komplementäre Sequenz haben. Anhand des Fluoreszenzsignals kann ermittelt werden, welche der fixierten cDNA-Moleküle auf der Platte einen Partner gefunden haben. Da die cDNA-Moleküle aus der Probe und aus der Kontrolle mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben markiert sind, ist es leicht möglich zu unterscheiden, ob ein Fluoreszenzsignal von einem cDNA-Molekül aus der Probe, aus der Kontrolle oder von beiden stammt. Entweder tritt ein reinfarbiges oder ein mischfarbiges Signal auf. Auf diesem Weg kann unterschieden werden, ob ein Gen aus der Probe verstärkt, vermindert oder unverändert exprimiert wird.

Maercker befeldete HL-60 Zellen mit einem kontinuierlichen 1800 MHz-Signal für 24 Stunden. Die SAR betrug 1,3 W/kg. Die Auswertung des Microarray-Ansatzes erbrachte, dass einzelne Gene in den untersuchten Zellen durch die Befeldung beeinflusst wurden. Des Weiteren stellte er eine leicht erhöhte Ribosomen-Synthese fest. In zusätzlich untersuchten Endothelzellen wurden einige Gene, die für Proteine des Zytoskeletts codieren, schwächer exprimiert. Interessant für das Thema des Workshops: Die Expression der Hitzeschockgene änderte sich durch die Befeldung nicht. Maercker gab allerdings zu bedenken, dass bei allen Experimenten die Zeit zwischen Befeldung und Analyse gleich war, somit kann über potenzielle verzögerte Effekte keine Aussage getroffen werden. Im Wesentlichen sind die Einflüsse des Feldes auf die Genregulation aber abhängig vom Zelltyp, von Feldparametern und der Befeldungsdauer. Jedoch müssten weitere Untersuchungen, zum Beispiel über Protein-Phosphorylierung und Proteinbindungsverhalten, angestellt werden.

Kein Einfluss auf HSP27-Phosphorylierung

Mays Swicord von Motorola, USA, informierte über Versuchsreihen, die Joseph L. Roti Roti an der Washington University durchgeführt hat. Rot Roti wollte zumindest teilweise die Resultate von Dariusz Leszczynski reproduzieren. Statt Endothelzellen setzte er HeLA-S3-Zellkulturen ein und wählte ein elektromagnetisches Feld nach dem Nord-Amerikanischen TDMA-Standard (800 MHz) mit einer SAR von 5 W/kg. Die Exposition dauerte zwei oder 24 Stunden. Das experimentelle Ziel war jedoch identisch: Untersucht wurde, ob sich die Phosphorylierung an HSP27 unter Feldeinfluss verändert. Um die Feldwirkung mit bekannten

Stressoren vergleichen zu können, wurden Zellen als Positivkontrolle bei 41° C einem leichten, oder bei 45° C einem intensiven Hitzeschock ausgesetzt.

Roti Rotis Ergebnisse bestätigten Leszczynskis Arbeiten nicht. Das elektromagnetische Feld veränderte die Phosphorylierung von HSP27 nicht. Die Hitzeschockexperimente zeigten, dass sich der Phosphorylierungsgrad proportional zur Inkubationstemperatur des Hitzeschocks ändert. Bei 45° C konnten HSP27-Formen detektiert werden, die mehrfach phosphoryliert waren, bei 41° C war die Konzentration der phosphorylierten HSP27 deutlich höher als in den Kontrollen und den befeldeten Proben.

Die Tücken der SAR-Analyse

Kari Jokela und Jürgen Schuderer setzten sich in ihren Ausführungen mit Befeldungseinrichtungen auseinander und zeigten, wie relevante Parameter erfasst und beurteilt werden können. Sie stellten deutlich heraus, wie allein die Auswahl der Expositionseinrichtung das Ergebnis beeinflussen kann und wie wichtig die exakte und analytische Auseinandersetzung mit dosimetrischen Größen für die Qualität der Messergebnisse ist. Werden zum Beispiel SAR und Temperatur unzureichend erfasst oder auf numerische Analysen der SAR-Werte im Vorfeld der Experimente verzichtet, so kann dies den Wert und die Aussagekraft der späteren Messungen erheblich beeinträchtigen. Sollen aussagekräftige Resultate erzielt und Datenmüll vermieden werden, so ist Sorgfalt in der Dosimetrie unabdingbar.

Kari Jokela befasste sich mit der Entwicklung einer Befeldungskammer für *in vitro* Untersuchungen in 900 MHz-Feldern. Jokela arbeitet an der finnischen Strahlenschutzbehörde STUK und sucht nach Möglichkeiten, SAR-Werte und Temperaturen während einer Befeldung möglichst nah an Zellen zu erfassen. Die Mindestanforderungen an eine moderne Expositionseinheit formulierte er wie folgt:

- möglichst gleichmäßige Verteilung der SAR
- Unsicherheit hinsichtlich der absoluten SAR ist kleiner als 30 Prozent
- der Temperaturanstieg während Befeldung darf höchstens 0,2° C betragen
- biologisch relevante Parameter wie CO₂-Gehalt, Luftfeuchtigkeit oder Temperatur müssen kontrolliert und geregelt werden

Des Weiteren müssen auch signaltypische Eigenschaften, Modulationsverfahren und die zur Mehrfachnutzung eingesetzte Technologie (TDMA, CDMA) berücksichtigt werden.

Jokela stellte horizontale und vertikale Befeldungseinrichtungen vor, die am STUK entwickelt wurden und zur Befeldung von Petri-Schalen eingesetzt werden können. Seine Daten und Diagramme aus den Versuchen mit horizontaler Befeldung zeigten eindrucksvoll, wie stark zum Beispiel SAR-Werte in einer Petrischale auf einer Radialstrecke von nur 25 Millimetern abweichen. Besonders an einer Stelle der Kulturschale sind die SAR-Werte erheblich größer: an der Oberfläche des Mediums, genau an der Grenze zwischen Medium und Gefäßwand, also am so genannten Meniskus. Betrag der SAR-Wert in der Mitte der Kulturschale 1 W/kg, ergaben die Messungen an der oben beschriebenen Stelle am Meniskus 73W/kg. Bei vertikaler Befeldung stellt dieser Meniskuseffekt kein Problem dar.

Auch auf Temperaturänderungen ging Jokela ein. Für die Teile der Petrischale, in denen das Medium keinen Kontakt zur Gefäßwand hat, entsprach die gemessene zeitabhängige Erwärmung bei vertikaler Befeldung den Ergebnissen der mathematischen Simulation. An den Flächen, an denen Medium und Gefäßwand in Kontakt stehen, fällt die Erwärmung jedoch geringer aus - etwa $0,25^{\circ}\text{C}$ nach einer Stunde Befeldung, im Vergleich zu $0,4^{\circ}\text{C}$ an anderen Stellen im Medium. An weiteren Diagrammen zeigte er, dass die Temperaturanstiege in der Gefäßmitte stets am stärksten sind und zum Rand hin abnehmen - egal ob 15, 30, 45 oder 60 Minuten befeldet wird.

Kari Jokela fasste seine Versuchsergebnisse in drei Schlussfolgerungen zusammen:

- es ist sehr schwierig, die SAR bei *in vitro*-Versuchen exakt zu bestimmen
- SAR muss mit weiteren Methoden erfasst werden
- das Problem der Erwärmung darf bei *in vitro*-Experimenten mit einer SAR größer als 1 W/kg nicht vernachlässigt werden

Gezielte Auswahl der Expositionseinrichtung verbessert Ergebnisqualität

Jürgen Schuderer von der Stiftung für die Erforschung von Informationstechnologien, Zürich, Schweiz, informierte in seinem Vortrag über *in vitro* Expositionen von Zellen in 900 und 1800 MHz-Feldern. Nicht jede Expositionseinrichtung ist für jede Art der Zellkultur geeignet, so haben Zell-Monolayer ganz andere Eigenschaften als Zellsuspensionen und diese Unterschiede beeinflussen SAR-Verteilung oder Temperaturanstieg erheblich. Ziel seiner Arbeit war, Expositionseinrichtungen zu beschreiben und zu bewerten, um Zellen in elektromagnetischen Feldern nach standardisierten und genau definierten Bedingungen exponieren zu können. Er richtete sein Augenmerk auf die technischen Anforderungen, die

Expositionseinrichtungen erfüllen müssen, stellte die Bedingungen für eine sinnvolle Dosimetrie dar und verglich die Leistungsmerkmale verschiedener Systeme. Auf Basis seiner Daten erarbeitete Schuderer Empfehlungen für die Befeldung von Monolayer-Kulturen und Zellsuspensionen:

Hohe Anforderungen an Rahmenbedingungen

Die von Kari Jokela präsentierten Mindestansprüche an die experimentellen Rahmenbedingungen unterstrich Schuderer, forderte jedoch zusätzlich, bei einer SAR von 2 W/kg einen maximalen Temperaturanstieg von $0,1^{\circ}\text{C}$ einzuhalten.

Umfangreiche Möglichkeiten müssen die Signalsender bieten. Unterschiedliche Modulationen mit frei wählbaren Frequenzen sollten möglich sein, GSM- und andere TDMA-Signalmuster, wie zum Beispiel DAMPS und DETC, müssen sie generieren und zudem auch kontinuierliche Felder erzeugen können. Alle Signalkomponenten sollten die Alltagssituation simulieren und exakt erfasst und ausgewertet werden können.

Um eine zuverlässige Kontrolle der experimentellen Expositionen durchführen zu können, müssen die Umgebungsparameter der Kontrolleinrichtungen absolut identisch zur Versuchsanlage sein. Diese potenziellen Einflussfaktoren sowie weitere biologische und technische Parameter müssen möglichst genau gemessen werden können. Externe Feldeinflüsse müssen ausgeschlossen werden können und die Anlage muss Doppelblindanordnung zulassen.

Auch an die Dosimetrie richtete Schuderer strenge Vorgaben. SAR-Werte müssen sowohl numerisch als auch messtechnisch ermittelt werden und sich bestätigen. Die Abweichungen der SAR-Werte, die SAR-Verteilung und die Änderung der Temperatur während der Befeldung muss dokumentiert sein.

Des Weiteren ging er auf Kopplungsmechanismen ein. Anhand einer Reihe von Parametern, die die Feldabsorption beeinflussen, machte er deutlich, dass Kopplungsvorgänge in Zellkulturen von denen im ganzen Organismus gänzlich verschieden sind. Am Beispiel des Flüssigkeitsmeniskus, der an der Wand einer Petrischale aufgrund von Adhäsion entsteht, zeigte er, wie sehr die SAR Werte abhängig voneinander abweichen, je nachdem, ob der Meniskus in die Kalkulation einfließt, oder nicht. Wird der Meniskus nicht berücksichtigt, fällt der errechnete SAR-Wert zu gering aus.

Schuderer untersuchte folgende drei Expositionsanordnungen und verglich ihre Tauglichkeit für die Befeldung von Zell-Monolayern und Zellsuspensionen: **Waveguide Systeme sXc900**

und sXc1800, eine TEM-Einheit, bei der sich die Petrischalen in K-Polarisation befanden sowie ein Wire-Patch-System.

Nach seinen Ergebnissen sind für die Befeldung von Monolayern die Wave-Guide-Systeme am besten geeignet. Die Petrischalen müssen aber im Maximum des H-Feldes angeordnet sein, nur dann fällt die Ungleichmäßigkeit der SAR-Verteilung unter 30 Prozent und genügt den Anforderungen. Der Temperaturanstieg ist bei diesen Systemen mit $0,03^{\circ}\text{C}$ am geringsten und die SAR hat mit 50 W/kg pro Watt Leistungseintrag die höchste Effizienz.

Sollen Zellsuspensionen befeldet werden, muss der gleichmäßigen SAR-Verteilung höchste Priorität eingeräumt werden. Keine der untersuchten Befeldungsanordnungen erfüllte für Zellsuspensionen die Mindestanforderung an die SAR-Verteilung. Der beste Wert war 46 Prozent, ihn erzielten die Wissenschaftler in einer TEM-Zelle. Der Temperaturanstieg betrug $0,05^{\circ}\text{C je W/kg}$. Die TEM-Zelle lieferte bei der Befeldung von Zellsuspensionen zuverlässige Ergebnisse, wenn Petrischalen in der k-Polarisationsebene angeordnet wurden. SAR-Gradienten, die bei der Befeldung von Zellsuspensionen auftreten, bewirken keine lokalen Temperaturspitzen, da das Medium Wärme ausreichend abführt.

Fazit: Knackpunkt Dosimetrie

Der Workshop verdichtete die Hinweise, dass hochfrequente elektromagnetische Felder keinen nicht-thermischen Einfluss auf Hitzeschockproteine haben. Gut dokumentierte Versuchsreihen, wie die von Miyakoshi, geben keine Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks und Hitzeschockproteinen oder deren Gene. Andere Studien, in denen derartige Wechselwirkungen beobachtet wurden, konnten bislang nicht reproduziert werden oder sie wiesen in Dosimetrie oder Exposition erhebliche Mängel auf, die von den Teilnehmern auch scharf kritisiert wurden. Exakter Umgang mit der Dosimetrie ist jedoch unabdingbar, denn bei der Analyse von Hitzeschockproteinen bewegt sich die Wissenschaft auf einem schmalen Grad. Da die experimentellen Zielmoleküle temperatursensitiv sind, müssen thermische Effekte ausgeschlossen werden. Bei den Studien von Kwee und Goodman können Temperatureinflüsse aufgrund der unzureichenden Dosimetrie nicht verneint werden, die Resultate von Leszczynski konnten noch nicht reproduziert werden. Nicht an der gleichen Zelllinie und auch nicht an anderen *in vitro* Modellen. So bleibt in Sachen Verifikation einiger Handlungsbedarf. Die vorgestellten *in vivo* Versuche geben derzeit keinen Grund zur Annahme, dass Stressproteine durch Felder des Mobilfunks beeinflusst werden.

Eines muss jedoch betont werden: Die vorgetragenen Versuche zu Hitzeschockproteinen zielen in zwei Richtungen - Genaktivierung und Phosphorylierung heißen zurzeit die Endpunkte. Diese Prozesse sind zwar einerseits verknüpft, stellen andererseits aber auch Wege mit verschiedenen physiologischen Konsequenzen dar. Phosphorylierungen sind Signale, die weitere Prozesse in Gang setzen und eine eigene Dynamik entwickeln können. Dies ging aus den Darstellungen von Dariusz Leszczynski und Matthias Gaestel hervor. Welche Kaskade wie aktiviert wird, welche Nebenwege davon betroffen sind und was daraus für eine Zelle oder einen Organismus folgt, kann nicht gesagt werden. Bedeutungslos sind diese komplexen Zusammenhänge deshalb aber nicht.

Ob eine unmittelbare Aktivierung der Stressproteingene durch hochfrequente elektromagnetische Felder möglich ist, müssen Reproduktionsuntersuchungen zeigen. Derzeit ist die Informationsbasis noch zu dünn, die Rahmenbedingungen in Reba Goodmans Experimenten fanden nicht die Zustimmung des Plenums. Die Amerikanerin stellte zwar ein temperatursensitives DNA-Element im hsp70-Promoter vor, doch die Kritik an ihrem Vorgehen war pointiert.

Die technisch orientierten Präsentationen machten deutlich, dass Parameter wie Temperatur und SAR schwierig zu beherrschen sind. Das erschwert die Arbeit mit temperatursensitiven physiologisch wirksamen Molekülen wie Stressproteinen. David de Pomerai konnte zum Beispiel seine Hypothesen nicht aufrecht erhalten, weil die Temperatur in seiner Expositionseinrichtung stärker abwich als erwartet. Für Hitzeschockproteine sind Temperaturanstiege ein idealer Nährboden, um in Aktivität zu verfallen und den Experimentator zu täuschen. So muss besonders die Dosimetrie sorgfältig bearbeitet und dokumentiert werden, denn hier finden sich Fehlerquellen und Angriffspunkte. Doch die Untersuchungen von Kari Jokela und Jürgen Schuderer geben entscheidende Hinweise, wie Expositionen an Qualität gewinnen können.

Die Präsentationen und die anschließenden Diskussionen führten zu einigen Empfehlungen. Es herrschte Einigkeit darüber, dass Bedarf an weiteren Studien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, besteht und neue Studien frühzeitig umgesetzt werden sollten. Besonders wurde die Wiederholung der Versuche von Kwee, Goodman und Leszczynski gefordert. Auf die modernen systembiologischen Genomics- und Proteomics-Techniken, die von Maercker und

Leszczynski in deren Forschungen bereits eingesetzt werden, soll in Zukunft stärker zurückgegriffen werden. Jedoch müssen dabei die biologische und statistische Signifikanz der Ergebnisse zuverlässig beurteilt werden können. Für die Untersuchung und die Beurteilung von mikrothermischen Effekten müssen neue Wege erschlossen werden. Diese schwer fassbaren Einflüsse können *in vitro* und *in vivo* Experimente empfindlich stören und Fehlinterpretationen provozieren.

Dipl. Biologe (t.o.) Christoph Bächtle, Stuttgart, Freier Journalist