

# Stressproteine unter d

Bericht vom COST 281/FGF/STUK/WHO-Workshop in Helsinki

Christoph Bächtle

**Unter physiologisch kritischen Bedingungen aktivieren Zellen ein Notfallprogramm um ihre Überlebenschancen zu verbessern. Dabei setzen sie Stressproteine frei, die man auch als Hitzeschockproteine bezeichnet. 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 niederenergetische elektromagnetische Felder im Frequenzbereich des Mobilfunks derartige Stressproteine aktivieren könnten. „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 publizierte Daten scheinen Hinweise darauf zu geben, dass hochfrequente elektromagnetische Felder eine Stressantwort in verschiedenen Zelllinien auslösen könnten, ohne dass dies thermisch bedingt sei. Dies betrifft besonders die kleinen Stressproteine mit den biochemischen Bezeichnungen: HSP16 und HSP27. Im Gegensatz dazu stehen jedoch die Ergebnisse von Cleary et al. (1997), Goswami et al. (1999) und Li et al. (1999), die keine derartigen Effekte nachweisen konnten.

Bei diesem, gemeinsam von COST 281, FGF, STUK und WHO organisierten Workshop diskutierten etwa 40 Wissenschaftler aus Europa, Japan und Amerika Interessantes und Neues zu diesem Thema. Wie bereits in vorausgegangenen Workshops zu anderen Themen möglicher hochfrequenter Feld-Wirkungen, so wurden auch diesmal zusätzlich zu den unmittelbar auf diesem Gebiet arbeitenden Wissenschaftlern solche Kollegen eingeladen, die zwar nicht über Feldwirkungen arbeiteten, wohl aber als Experten auf dem Gebiet der Hitzeschock-Proteine gelten. Diese leiteten durch Übersichtsvorträge die Tagung ein und informierten die Teilnehmer über den neuesten Stand der Forschung auf diesem Spezialgebiet. Im Verlaufe der Veranstaltung griffen sie als Experten auf dem Gebiet der Biochemie und Molekularbiologie in die Diskussion kritisch ein.

## Hitzeschockproteine – ein universelles System

Matthias Gaestel von der Medizinischen Hochschule Hannover stellte in seinem Einführungsvortrag: „Hitzeschockantwort und Stresssignalwege“ das faszinie-



■ ■ ■ ■ ■

# er Lupe

rende System der Stressproteine und die Mechanismen vor, die zu deren Expression führen. Unter Protein-Expression versteht man die Anregung des Genoms, d. h. des genetischen Speichers einer Zelle, die Information für ein spezielles Protein auszulesen und an ein Ribosom weiterzugeben, wo dieses schließlich produziert wird. Dieses kurze Wort schließt folglich schon selbst einen außerordentlich komplizierten Prozess ein, der auf diesem Workshop nicht unmittelbar zur Diskussion stand.

Gaestel stellte dar, dass es sich bei dieser Antwort auf einen physiologischen Stress von außen um einen in der Evolution hochkonservierten Schutzmechanismus handelt, der auf allen Ebenen biologischer Organisation, von Bakterien, über Pflanzen und Tiere bis zum Mensch vorkommt. Dies liefert der Wissenschaft eine Vielzahl an Modellorganismen für weitreichende vergleichende Untersuchungen. Gaestel zeigte Parallelen zwischen den Systemen der Stress-Mechanismen bei Bakterien und Organismen mit kernhaltigen Zellen, beschrieb die einzelnen Familien der Hitzeschockproteine, ging auf die Struktur und Aktivierung der Gene ein, welche diese exprimieren und auf die komplexen intrazellulären Signalwege, die durch einen Stress ausgelöst werden.

Die meisten Hitzeschockproteine sind so genannte Chaperone. („Chaperon – ältliche, ehrbare Person zur Beaufsichtigung junger Frauenzimmer“ – ist in einem älteren Fremdwörterlexikon zu lesen!) Man hat eine Klasse von Proteinen so genannt, weil sie dafür sorgen, dass sich die langen Ketten von Aminosäuren ordnungsgemäß zu funktionsfähigen Proteinen falten und nicht sinnlos verklumpen. Des Weiteren unterstützen sie die korrekte Rückfaltung dieser Proteine, sollten sie durch ihre eigene Funktion oder eben durch Einwirkungen von außen in ihrer Struktur verändert werden. Die so genannten kleinen Hitzeschockproteine („small Heat-Shock-Proteins“ = sHSP) können zwar keinen unmittelbaren Einfluss auf die Proteinfaltung nehmen,

halten aber fehlgefaltete und teilweise denaturierte Proteine ohne Energie-Verbrauch fest, bis andere Hitzeschockproteine unter Verbrauch von Stoffwechsel-Energie die Rückfaltung wieder bewerkstelligen.

Die Übertragung chemischer Energie von einem Molekül zu einem anderen erfolgt durch Phosphorylierung, d. h. durch Übertragung einer Phosphatgruppe. Diese stammt zumeist aus dem „Brennstoff“ der Zelle, dem Adenosin-tri-Phosphat (ATP), dass dadurch zum Adenosin-di-Phosphat (ADP) abgebaut wird. Diese Phosphorylierung spielt nicht nur bei der Reparatur gestörter Proteine eine Rolle, die Hitzeschock-Proteine selbst müssen erst einmal phosphoryliert, d.h. funktionsfähig gemacht werden. Dafür sind wieder andere Proteine verantwortlich, die Proteinkinasen. Die Endung „-ase“ in ihrem Namen weist sie als Enzyme aus, die diese Reaktionen katalytisch beschleunigen. Eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung der HSP spielen die so genannten stressaktivierten Proteinkinasen (SAPK). Wie jedoch diese selbst aktiviert werden ist zurzeit noch unklar.

Diese grobe Übersicht zeigt bereits, wie komplex der Mechanismus ist, den ein Stress in der Zelle auslösen kann. Dabei laufen zum Teil Reaktionen parallel ab, die mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten zum gleichen Ziel führen können. Manche Stressantwort wird bereits Minuten nach erfolgtem Stress ausgelöst, andere erreichen erst nach Stunden ihre volle Wirksamkeit. Nicht jede schädigende Einwirkung auf die Zelle kann durch die Stressproteine repariert werden. Mitunter kennzeichnen Apoptose oder Nekrose das Ende einer Zelle. Im Gegensatz zur Nekrose, der unkontrollierten Auflösung zellulärer Strukturen, bedeutet Apoptose ein organisiertes „Auseinandernehmen“ derselben, bei welcher hochorganisierte Bauteile an anderer Stelle wieder Verwendung finden können. Diese beiden Arten des Zelltods lassen sich mikroskopisch deutlich voneinander unterscheiden.

## Molekulare Mechanismen zellulärer Temperaturfühler

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 vor. Dieses DnaK-System bei den kernlosen Bakterien, den so genannten Prokaryoten, entspricht den HSP70 Proteinen in kernhaltigen Zellen höherer Organismen (Eukaryoten). Auch hier führt erst die Phosphorylierung des Proteins, d.h. die Wechselwirkung mit dem energiereichen ATP zu einer Aktivierung. Dieser Prozess wiederum wird durch eine Proteinkinase mit der Bezeichnung „GrpE“ katalysiert.

Nun ist es dieser Arbeitsgruppe erstmals gelungen, die molekulare Struktur dieses GrpE-Moleküls aufzuklären. Es handelt sich dabei um ein Dimer, d.h. ein Doppel-Molekül, welches jeweils eine lange spiralförmige Alpha-Helix enthält. Diese Helix ist offenbar das eigentliche Thermometer der Zelle. In einem engen Temperaturbereich über 40° C formt sich diese Spirale nämlich reversibel um und steuert damit die Funktionsfähigkeit des ganzen Moleküls. Mit dieser temperaturempfindlichen Anpassung des DnaK-Zyklus werden die im Zyklus reparierten Proteine 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 Vortrag. Dies war ein mehr methodisch orientierter Beitrag zum Thema des Workshops. Das Enzym Luciferase, bekannt durch die Bakterien, welche als Symbionten die Glühwürmchen zum Leuchten bringt, ist selbst temperaturempfindlich und diente in den Experimenten dieser Gruppe als Indikator für Wärme-Reaktionen. Diese wurden durch starke Gleichstrom-Pulse an einem Moos ausgelöst. Thermisch induzierte Hitzeschockproteine


konnten die Luciferase in einem gewissen Grad vor Schaden schützen. Nach Auffassung von Goloubinoff sind besonders verschiedene temperaturabhängige Veränderungen in der Zellmembran an der Wärmedetektion beteiligt.

## Detaillierter Literaturvergleich

Martin L. Meltz von der Abteilung für Strahlenonkologie der Universität Texas in San Antonio legte eine differenzierte Bestandsaufnahme vor über bereits abgeschlossene und publizierte Untersuchungen zu Hitzeschockproteinen, Apoptose, Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen oder bestimmten Proteinkinasen als Folge des Einflusses hochfrequenter elektromagnetischer Felder.

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 Arbeiten, davon drei *in vivo* und zwei *in vitro*, hatten Einflüsse hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf Stressproteine zum Gegenstand: Cleary et al (1997), Fritze et al (1997), Daniells et. al. (1998), De Pomerai et. al. (2000), Leszczynski et al (2002). Lediglich die Untersuchungen von De Pomerai und Leszczynski zeigten eine deutliche Aktivierung von Stressproteinen bei geringen Feldstärken. Meltz warf einige kritische Fragen und Anmerkungen zu den Experimenten und Ergebnisinterpretationen in diesen beiden Studien auf.

Andere stressinduzierte Signalwege wurden untersucht durch: Li et al. (1999), Walters et al. (1995), Natarajan et al. (2002), Goswami et al (1999) sowie Nayak et al. (2004 a, b). Die Studien von Li und Walters zeigten keinen Einfluss des Feldes auf die untersuchten Parameter. 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 ist von Einflüssen auf die Genregulation die Rede.



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, in denen sie eine Induktion von Hitzeschockproteinen auch durch extrem niederfrequente 50 Hertz-Magnetfelder zu finden glaubt. Bei ihren Studien aus dem Jahr 2001 setzte sie Amnion-Zellen einem 960 MHz-Feld des GSM-Standard aus (20 Minuten, 2,1 mW/kg). Dabei wurden Hitzeschockproteine gebildet und der Zellzyklus beeinflusst. Asynchron wachsende Kulturen werden synchronisiert, dies wiederum führt zu verstärkter Proliferation.

Da die Referentin keine genauen Angaben über ihre Expositionsrichtung und die Feldbeschaffenheit in den Experimenten machen sowie zu den Methoden der Dosimetrie geben konnte, wurde die Diskussion zu den Ergebnissen abgebrochen.

### Feldsensitives DNA-Element soll Genaktivierung auslösen

Reba Goodman in Kooperation mit Martin Blank von der Columbia University, New York (Weisbrot et al. 2003) schilderte ihre Ergebnisse aus Experimenten mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (gesponsert durch die „Goodman-Foundation“). Das Feld wurde durch ein auf die Petrischale gelegtes Mobiltelefon mit GSM-Signal erzeugt, das während der Expositionszeit Musik spielte. Den maximalen SAR-Wert gab Goodman mit 1,4 W/kg an, die Umgebungstemperatur betrug 25° C. 100 Fliegen wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen zweimal pro Tag dem Feld aus-

gesetzt; 80 Fliegen dienten als Kontrolle. Gemessen wurden: Anzahl der Nachkommen, HSP70-Konzentration in den Speichelzellen, sowie zwei Transkriptionsfaktoren, die für das Wachstum und die Entwicklung der Tiere Bedeutung haben. Alle vier der untersuchten Parameter zeigten signifikant ( $p=0,01$ ) veränderte Werte. Goodman forderte derartige Stressantworten in den Sicherheitsrichtlinien zu berücksichtigen. Sie verwies ferner auf eigene frühere Arbeiten, zum Teil mit niederfrequenten Feldern, in welchen sie ein spezielles feldempfindliches Gen gefunden zu haben glauben (Goodman und Blank 2002). Werden Mutationen in den feldsensitiven Abschnitt der DNA eingefügt, so gehe die Empfindlichkeit gegenüber elektromagnetischen Feldern verloren.

In der Diskussion wurden mehrfach die von dieser Gruppe gewählten Befeldungsbedingungen kritisiert. Da die Ausgangsleistung des Mobiltelefons von der Basisstation maßgeblich beeinflusst wird und die Basisstation sich an wechselnde Sende- und Empfangsbedingungen anpasst, kann in diesen Experimenten 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 eingespielte Musik die beschriebenen Effekte ausgelöst haben könnte.

### Leszczynskis Szenarien – welche Konsequenzen haben Protein-Phosphorylierungen?

Dariusz Leszczynski von der nationalen finnischen Strahlenschutzbehörde (STUK) präsentierte seine bislang veröffentlichten beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereichten umfangreichen Ergebnisse. Er untersuchte die Wirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf das Proteinmuster von Endothelzellen, d.h. Zellen der Innenhaut. Die Ergebnisse wurde bereits auf der BEMS-Tagung 2003 in Maui und auf der EBFA-Konferenz 2004 in Budapest vorgestellt. Auf die Beschreibung der umfangreichen experimentellen Strategien soll daher an dieser Stelle verzichtet werden. In Kooperation mit anderen Instituten setzt die Arbeitsgruppe moderne Methoden der Protein-Ana-

lyse (Proteomics, Genomics) 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 Phosphorylierungs-Muster einiger hundert Proteine, darunter auch des 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. Nach den Ergebnissen der Arbeitsgruppe steigt durch hochfrequente Befeldung die Konzentration an phosphoryliertem HSP27 gemittelt über alle Befeldungsexperimente um 28% an.

Weiterführende Analysen zeigten, dass eine ganze Reihe speziell solcher Proteine beeinflusst werden, welche die mechanischen Eigenschaften der Zelle bestimmen (Zytoskelett). Einige der untersuchten Gene wurden nach Befeldung stärker, andere schwächer und wieder andere unverändert exprimiert.

Leszczynski entwickelte aus seinen Beobachtungen weitreichende Hypothesen über Wirkungen dieser Effekte auf zellulärer Ebene. Er entwarf Wirkungsszenarien und spekulierte über mögliche Konsequenzen. Jedoch leitete er im Gegensatz zu früheren Vorträgen aus diesen Gedankenspielen trotz allem keine Gesundheitsgefährdung für Organe oder den gesamten Organismus ab.

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

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Leszczynski konnten durch Untersuchungen von Florence Poulletier de Gannes aus der Universität Bordeaux, Frankreich, nicht bestätigt werden. Für ihre Experimente wählten die Forscher Zellen aus Geweben, die beim mobilen Telefonat besonders in elektromagnetischen Feldern exponiert sind, nämlich an Zellen aus Gehirn und Haut. Neben Einzelzellen verwendeten sie auch Zellschichten, die einer künstlich wiederhergestell-



ten Haut (Epidermis) glichen, als Modell für einen Zellverbund sowie als Tiermodell haarlose Ratten. Darüber hinaus replizierten sie die Untersuchungen von Dariusz Leszczynski mit der gleichen von ihm verwendeten Endothelzelllinie EA-hy926.

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 20-minütigen Hitzeschock bei 43° oder 45° C induziert, in den Hautzellen mit UV-B Licht aktiviert. Der qualitative und quantitative Nachweis der Stressproteine HSP27, HSP70 und HSC70 erfolgte mit immuno-histochemischen Methoden (ELISA).

Bei keiner der getesteten Gehirn-Zelllinien gelang es mit dem elektromagnetischen Feld Hitzeschockproteine zu induzieren. Auch auf die Hitzeschockproteine HP27 und HSP70 in unterschiedlichen Hautzelltypen hatte das GSM-Feld keinen Einfluss. Das Protein HSC70 wurde in menschlichen Bindegewebszellen (Fibroblasten) unter Befeldung schwächer exprimiert als in den Kontrollen. In dem wiederhergestellten Haut-Modell konnten durch das elektromagnetische Feld keine Wirkungen auf die untersuchten Proteine ausgelöst werden.

Die haarlosen Ratten wurden sowohl akuter als auch chronischer Befeldung unterzogen, wobei jeweils eine Körperseite exponiert, die andere als Kontrolle herangezogen wurde (GSM 900, GSM 1800, 4 W/kg, 2 Stunden/Tag, 5 Tage/Woche, 12 Wochen). Diese *in vivo* Versuche bestätigen nicht den rückläufigen Grad der Aktivierung der HSC70 Proteine, wie in den *in vitro* Versuchen festgestellt wurde. Die Experimente werden fortgeführt.

Bei der Replikation der Leszczynski-Studie mit der Endothel-Zelllinie EA-hy926 konnten keine Effekte gemessen werden. 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 % 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 (siehe: Tian et al. 2002 und Miyakoshi et al. 2000). Zunächst berichtete Miyakoshi über Doppel-Blind-Versuche zur Expression von HSP27 und HSP70, sowie Wachstum von Kulturen aus menschlichen Hirntumoren (Glioma-Zellen) (MO54) durch 1950 MHz Felder (10-120 Minuten, 1, 2 oder 10 W/kg). Die Versuche zeigten selbst bei maximaler Exposition weder Veränderungen der Wachstumsraten noch der Verteilung von HSP27 oder HSP70. Jedoch sank bei Befeldung über mindestens eine Stunde bei 10 W/kg die konstitutive Phosphorylierung von HSP27 an Serin 78. Nachteilige Wirkungen auf die Zellkultur hält Miyakoshi jedoch dadurch für wenig wahrscheinlich, schließlich konnten keinerlei morphologische Veränderungen an den Zellen festgestellt werden. Zellen, die einem Hitzeschock bei 43° C unterworfen wurden, nahmen hingegen 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.

Die zweite Arbeit von Miyakoshi betrifft die Wirkung starker 2,45 GHz Felder auf die Expression von HSP70 Proteinen in den gleichen Zellen. In diesen Untersuchungen wurden Petrischalen mit drei konzentrischen Kompartimenten eingesetzt. Auf diese Weise konnten 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 wurde die Sterberate der Zellen gemessen und die Änderung der HSP70-Konzentration.

Temperaturen von 39° C über einen Zeitraum von 16 Stunden hatten keinen Einfluss auf die Sterberate

scheinexponierter Zellen. Hingegen nahm die Überlebensrate in den bei 100 W/kg exponierten Zellen um 30 % ab. Je länger die Exposition dauerte, desto stärker wurde 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 die Situation beim mobilen Telefonieren ohne Bedeutung.

### De Pomerai revidiert Ergebnisse

David de Pomerai publizierte Ergebnisse von Untersuchungen am Wurm *Caenorhabditis elegans*, wonach durch hochfrequente elektromagnetische Felder eine Aktivierung kleiner Hitzeschockproteine erfolgt (de Pomerai et al. 2000, 2003). Dieser viel untersuchte Fadenwurm exprimiert Hitzeschock-Proteine, wenn er Temperaturen von über 25° C ausgesetzt wird. Niedrigere Temperaturen haben keine Wirkung. In seinen Publikationen hatte de Pomerai gezeigt, dass spezielle hsp16-Gene, welche die Expression des Hitzeschockproteins induzieren, 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 anschließende Überprüfung der verwendeten TEM-Zelle zeigte, dass ein Leistungsverlust in der Zelle auftrat, der für lokale Temperatur-Erhöhungen verantwortlich sein 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. Automatisierte Verfahren 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. 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 (1,3 W/kg, 24 Stunden). Es konnte eine Beeinflussung einzelner Gene und eine leicht erhöhte Ribosomen-Synthese festgestellt werden. 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, so-

mit kann über potenzielle verzögerte Effekte keine Aussage getroffen werden.

## Kein Einfluss auf HSP27-Phosphorylierung

Mays Swicord von Motorola, USA, informierte über Versuchsreihen, die Joseph L. R. Roti an der Washington University durchgeführt hat. Roti wollte zumindest teilweise die Resultate von Dariusz Leszczynski reproduzieren. Statt Endothelzellen setzte er HeLa-S3-Zellkulturen (Zellen aus Brustkrebs) ein und wählte ein elektromagnetisches Feld nach dem nordamerikanischen 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.

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 eine exakte Dosimetrie für die Qualität der Messergebnisse ist. Werden zum Beispiel SAR und Temperatur unzureichend erfasst oder wird 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 den Zellen zu erfassen. Er formulierte Mindestanforderungen, die an eine moderne Expositionseinheit zu stellen sind.

Jokela stellte horizontale und vertikale Befeldungseinrichtungen vor, die am STUK entwickelt wurden und zur Befeldung von Petrischalen 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.

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 die Technik von *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 es, 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.

Schuderer unterstrich die von Kari Jokela präsentierten Mindestansprüche an die experimentellen Rahmenbedingungen, forderte jedoch zusätzlich, bei einer SAR von 2 W/kg einen maximalen Temperaturanstieg von 0,1° C einzuhalten. Umfangreiche Möglichkeiten müssen ferner die Signalsender bieten. Außer kontinuierlichen Feldern mit frei wählbaren Frequenzen sollten Modulationen möglich sein sowie Signalmuster nach den GSM-, TDMA- und anderen Normen, wie zum Beispiel GPRS und DECT. 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, 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 müssen dokumentiert sein.

Des Weiteren ging er auf Kopplungsmechanismen ein. Anhand einer Reihe von Parametern, welche die Feld-

absorption beeinflussen, machte er deutlich, dass biologische Kopplungsvorgänge in Zellkulturen möglich sind, die sich von denen im ganzen Organismus unterscheiden. 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  $50\text{ W/kg}$  pro Watt Leistungseintrag die höchste Effizienz.

Keine der untersuchten Befeldungsanordnungen erfüllte für Zellsuspensionen die Mindestanforderung an die SAR-Verteilung. Der beste Wert war 46 Prozent, der in einer TEM-Zelle erzielt wurde. Der Temperaturanstieg betrug  $0,05^{\circ}\text{C}$  je  $\text{W/kg}$ . 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 die Wärme durch das Medium ausreichend abgeführt wird.

## Fazit: Knackpunkt Dosimetrie

Der Workshop verdichtete die Zweifel daran, dass schwache hochfrequente elektromagnetische Felder durch nicht-thermischen Einfluss zur Ausbildung von Hitzeschockproteinen führen können. Gut dokumentierte Versuchsreihen, wie die von Miyakoshi, geben

keine Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks und Hitzeschockproteinen oder deren Genen. Untersuchungen, 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 entsprechend 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 in den Experimenten thermische Effekte mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Bei den Studien von Kwee und Goodman können, neben anderen experimentellen Mängeln, Temperatureinflüsse aufgrund mangelhafter Expositionseinrichtung und unzureichender Dosimetrie nicht ausgeschlossen werden. Die Resultate von Leszczynski ließen sich von unabhängiger Seite weder an der gleichen Zelllinie noch an anderen *in vitro* Modellen reproduzieren. So bleibt in Sachen Verifikation einiger Handlungsbedarf.

Die vorgetragenen Versuche zu Hitzeschockproteinen zielen prinzipiell in zwei Richtungen: einmal wird die Genaktivierung, zum anderen die Phosphorylierung vorhandener Proteine untersucht. Phosphorylierungen sind Signale, die weitere Prozesse in Gang setzen können und eine eigene Dynamik besitzen. 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, ist zur Zeit schwer einschätzbar. Die Zeitkonstanten dieser Prozesse können sehr unterschiedlich sein.

Die technisch orientierten Präsentationen machten deutlich, dass in den Expositionseinrichtungen Parameter wie Temperatur und SAR in den befeldeten Proben schwer zu beherrschen sind. Das verkompliziert die Arbeit mit temperatursensitiven physiologisch wirksamen Molekülen wie eben den Stressproteinen. David de Pomerai konnte zum Beispiel seine Vorstellung von einem nicht-thermischen Effekt beim Ein-

fluss schwacher Felder auf den Fadenwurm *Caenorhabditis* nicht aufrecht erhalten, weil die Temperatur in seiner Expositionseinrichtung stärker abwich als erwartet. So muss besonders die Dosimetrie sorgfältig bearbeitet und dokumentiert werden, denn hier finden sich Fehlerquellen und Angriffspunkte. Die Untersuchungen von Kari Jokela und Jürgen Schuderer gaben entscheidende Hinweise darauf, wie Expositionen an Qualität gewinnen können.

Die Präsentationen und die anschließenden Diskussionen führten zu einigen Empfehlungen. Es herrschte Einigkeit darüber, dass Bedarf an weiteren Untersuchungen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, besteht und Ergebnisse neuer Studien frühzeitig überprüft 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 die methodische 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 Christoph Bächtle, Wissenschaftsjournalist*

## Literatur

- Carmody, S., Wu, X. L., Lin, H., Blank, M., Skopicki, H., and Goodman, R.: Cytoprotection by electromagnetic field-induced hsp70: A model for clinical application. *Journal of Cellular Biochemistry* 79 (2000) 453-459.
- Cleary SF, Cao GH, Liu LM, et al: Stress proteins are not induced in mammalian cells exposed to radiofrequency or microwave radiation. *Bioelectromagnetics* 18 (1997) 499-505.
- Daniells C, Duce I, Thomas D, et al: Transgenic nematodes as biomonitors of microwave-induced stress. *Mutat. Res.* 399 (1998) 55-64.
- de Pomerai D, C. Daniells, H. David, et al: Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature* 405 (2000) 417-418.
- de Pomerai, D. I., Smith, B., Dawe, A., North, K., Smith, T., Archer, D. B., Duce, I. R., Jones, D., and Candido, P. M.: Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Letters* 543 (2003) 93-97.
- Fritze K, Wiessner C, Kuster N, et al: Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain. *Neuroscience* 81 (1997a) 627-639.
- Gaestel M: sHsp-phosphorylation: enzymes, signaling pathways and functional implications. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 28 (2002) 151-169.
- Goodman, R. and Blank, M.: Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *J. Cell. Physiol.* 192 (2002) 16-22.
- Goswami PC, Albee LD, Parsian AJ, et al: Proto-oncogene mRNA levels and activities of multiple transcription factors in C3H 10T1/2 murine embryonic fibroblasts exposed to 835.62 and 847.74 MHz cellular phone communication frequency radiation. *Radiat. Res.* 151 (1999) 300-309.
- Grimshaw, J. P. A., Jelesarov, I., Siegenthaler, R. K., and Christen, P.: Thermosensor action of GrpE - The DnaK chaperone system at heat shock temperatures. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 19048-19053.
- Koyama, S., Nakahara, T., Wake, K., Taki, M., Isozumi, Y., and Miyakoshi, J.: Effects of high frequency electromagnetic fields on micronucleus formation in CHO-K1 cells. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 541 (2003) 81-89.
- Kwee, S., Raskmark, P., and Velizarov, S.: Changes in cellular proteins due to environmental non-ionizing radiation. I. Heat-shock proteins. *Electro and Magnetobiology* 20 (2001) 141-152.
- Leszczynski, D., Joenvaara, S., Reivinen, J., and Kuokka, R.: Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70 (2002) 120-129.
- Li JR, Chou CK, McDougall JA, et al: TP53 tumor suppressor protein in normal human fibroblasts does not respond to 837 MHz microwave exposure. *Radiat. Res.* 151 (1999) 710-716.
- Miyakoshi, J., Mori, Y., Yaguchi, H., Ding, G. R., and Fujimori, A.: Suppression of heat-induced hsp-70 by simultaneous exposure to 50 mT magnetic field. *Life Sciences* 66 (2000) 1187-1196.
- Natarajan, M., Vijayalaxmi, Szilagy, M., Roldan, F. N., and Meltz, M. L.: NF-kappa B DNA-binding activity after high peak power pulsed microwave (8.2 GHz) exposure of normal human monocytes. *Bioelectromagnetics* 23 (2002) 271-277.
- Nayak et al.: Determination of p53 stabilization and transactivation of its target genes in response to ultrawideband electromagnetic radiation exposure in human hematopoietic cells. *Bioelectromagnetics (to be submitted May 5, 2004)* (2004)
- Nayak et al.: Effect of Ultrawideband electromagnetic radiation on cell cycle progression in human hematopoietic cells. *Bioelectromagnetics (revised and resubmitted)* (2004)
- Tian, F., Nakahara, T., Wake, K., Taki, M., and Miyakoshi, J.: Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields induces hsp70 at a high SAR of more than 20 W/kg but not at 5 W/kg in human glioma MO54 cells. *Intern. J. Radiat. Biol.* 78 (2002) 433-440.
- Walters TJ, Mason PA, Sherry CJ, et al: No detectable bioeffects following acute exposure to high peak power ultra-wide band electromagnetic radiation in rats. *Aviat. Space Environm. Med.* 66 (1995) 562-567.
- Weisbrot, D., Lin, H., Ye, L., Blank, M., and Goodman, R.: Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biochem.* 89 (2003) 48-55.