



# Zellbiologie

## Zell

Vijayalaxmi

Plenarsitzung 1

### Ultrakurze elektrische Pulse öffnen ein neues Tor ins Zellinnere

**Schoenbach, K.H., USA**

Experimentelle Studien, in denen menschliche Zellen gegenüber ultrakurzen elektrischen Pulsen mit hoher Leistung bis zu 30 MV/m Amplitude und einer Pulsdauer von nur 10 ns exponiert wurden, berichten von einer Beeinflussung intrazellulärer Strukturen und von „**Elektropermeabilisierung**“, die wiederum zu einem Anstieg der Werte für intrazelluläres freies Kalzium sowie beschleunigter Genexpression führt. Bei einer Verstärkung der elektrischen Felder zeigte sich, dass Pulse unter einer Mikrosekunde in biologischen Zellen **Apoptose** induzieren. Diese auf Pulsen unter einer Mikrosekunde basierende Technik wurde angewendet, um das Tumorwachstum zu reduzieren bzw. zu hemmen und die Wirksamkeit von Gentherapien zu erhöhen.

Dr. Schoenbach fügte hinzu, es sei möglich, intrazelluläre **Organellen** zu **‘elektroporieren’**, ohne Poren in den äußeren Zellmembranen zu öffnen. So könne die Anwendung von 180 kV/cm Pulsen für 10 ns zum Beispiel die subzellulären Strukturen von **Eosinophilen** erschließen, ohne dass eine Beschädigung der äußeren Membranen zu befürchten sei.

Session 1

### Forschung zu und Anwendung von gepulsten hohen Leistungen

Session 1.1. **Intrazelluläre Wirkungen extrem starker elektrischer Feldimpulse (Pulsdauer unter einer Mikrosekunde): Theorie und Modellbildung**

**Weaver, J.C., USA**

Mehrere Gruppen haben Experimente beschrieben, in denen nicht-thermische elektrische Feldimpulse mit



# und biophysik

einer Pulslänge von 10 bis 300 ns und Größenordnungen von 1 bis 150 kV/cm zu Wirkungen auf subzelluläre Strukturen führen. Der auffallendste Effekt ist die von elektrischen Feldimpulsen induzierte Apoptose. Zielsetzung der Studien war die Schaffung realistischer zweidimensionaler (2D) Modelle von Säugerzellen, die nicht nur die äußere Plasmamembran (PM) aufweisen, sondern auch subzelluläre Strukturen, sowie den Zellkern, das **endoplasmatische Retikulum** und mehrere Mitochondrien. Auf diese Weise wird nicht nur die mikrodosimetrische Messung auf der zellulären und subzellulären Ebene ermöglicht, sondern es können auch Vorhersagen zum molekularen und Ionen-transport innerhalb eines Zellmodells getroffen werden. Ein planarer Membranpatch (3  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ ) mit einem auf der Smoluchowski-Gleichung basierenden Modell wurde zur Untersuchung des Verhaltens bei lokaler Elektroporation unter Einwirkung von Pulsen ganz unterschiedlicher Länge und Amplitude benutzt. All diesen Modellen ist gemeinsam, dass die Supraelektroporation in der PM beträchtlich ist, gegenüber einer nicht-signifikanten Elektroporation in den Membranen des Zellkerns, des endoplasmatischen Retikulums und in den inneren wie äußeren mitochondrialen Membranen. Die kleinen verbleibenden Poren haben eine Lebensdauer in der Größenordnung von Sekunden – ein Mechanismus der Translation von Interaktionen unter einer Mikrosekunde in die physiologische Zeitskala von 0.1 Millisekunde zu Sekunden. Von einer **Translokation** von Membrankomponenten ist sowohl in der konventionellen (Pulse mit einer Dauer von >100 Mikrosekunden und in einer Größenordnung von  $\sim 1$  kV/cm) als auch in der Supraelektroporation auszugehen. Die Anwesenheit translozierter Phospholipide oder Proteine erzeugt Signale, die sogar noch länger andauern können. So-

wohl der molekulare und der Ionen-transport verbleibender Poren als auch die Signalgebung translozierter Membranmoleküle können zur Entstehung verschiedener und potentiell spezifischer intrazellulärer Effekte beitragen, deren Ursache in der Exposition von Zellen und Gewebe gegenüber extrem starken elektrischen Feldimpulsen unter einer Mikrosekunde zu suchen ist.

## Session 1.2. **Genexpression beim Menschen als Reaktion auf gepulste elektrische Felder im Nanosekundenbereich**

**Tseng, C.C.**, USA

Die Reaktionen menschlicher Zellen auf gepulste elektrische Felder im Nanosekundenbereich (nsPEF) sind abhängig von den Expositionsbedingungen (Feldintensität, Pulsdauer und Anzahl der Pulse). Die Wirkungen reichen von Veränderungen der Genexpression (ohne direkte Apoptose) bis zur **Nekrose**. Die vorliegende Studie legt den Schwerpunkt auf die Genexpression; die Expositionsbedingungen unterschreiten daher die Schwellenwerte für Apoptose und Membranelektroporation. Menschliche HL-60 Zellen wurden in RPMI + 10 % FBS (Zellkulturmedium, fötales Kälberserum) angezüchtet. Ein **Aliquot** von 130  $\mu\text{l}$  Zellsuspension ( $10 \times 10^6$  Zellen/ml) wurde in eine 1 mm Küvette gefüllt und drei aufeinander folgenden 60 nsPEF, 15 kV/cm, ausgesetzt. Exponierte Zellen aus 5 Küvetten wurden gepoolt (650  $\mu\text{l}$ ), mit RPMI + 10 % FBS um das Zehnfache verdünnt und 6 Stunden lang in einer T-75 Flasche exponiert. Unter diesen nsPEF-Expositionsbedingungen gab es keine an der Aufnahme von Ethidium-Homodimer erkennbare Membranelektroporation; am Ausbleiben der **Caspase-Aktivierung** und der Annexin-V-FITC-Bindung war abzulesen, dass es nicht zu direkter Apoptose kam, und es trat

kein Zelltod ein (eine Überlebensrate von annähernd 100 %). Nach nsPEF-Exposition und Inkubation wurde die RNA extrahiert und die Genexpression im gesamten Genom bestimmt.

Dieses Verfahren beinhaltete die Präparation der gesamten RNA (first strand cDNA-Synthese, strand cDNA-Synthese, cDNA-Reinigung, *in vitro*-Transkription, Biotin-Labeling der cRNA, cRNA-Reinigung, Fragmentierung der cRNA, Hybridisierung der cRNA mittels Sonden auf das Mikroarray, Waschung, Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, Scannen und Datenanalyse). Basierend auf einem Minimalwert der zweifachen Standardabweichung, konnte festgestellt werden, dass 603 von insgesamt 20.489 analysierten Genen hoch- oder herunterreguliert wurden. Von den beeinflussten Genen waren 1/3 herunterreguliert und 2/3 hochreguliert. Viele der in Mitleidenschaft gezogenen Gene sind an wichtigen biologischen Aktivitäten beteiligt, wie z. B. Signaltransduktion, Zelladhäsion, Apoptose, Zellschutz, Immunität, Entzündungs- und Stressreaktionen, Transkriptionskontrolle, DNA Bindung, Ionen-transport, Proteinfaltung, Phosphorylierung und Modifikation sowie Zelltod. Sowohl nach längeren als auch nach kürzeren Inkubationszeiten wurden Veränderungen der Genexpression beobachtet (2 h, 12 h, 24 h). Diese Beobachtungen sind ein eindeutiger Hinweis, dass die nsPEF-Exposition eine signifikante Wirkung auf die Genexpression hat, auch wenn direkte zelluläre und subzelluläre Veränderungen, die zu Apoptose führen, nicht erkennbar sind. Dr. Tseng hielt fest, dass nsPEF-Expositionen hilfreich sein können, um a) das aktuelle Verständnis 'klassischer' molekularer Wege der Signaltransduktionsmechanismen, Apoptose, Zelltod usw., zu erweitern sowie b) neue molekulare Wege zu identifizieren.

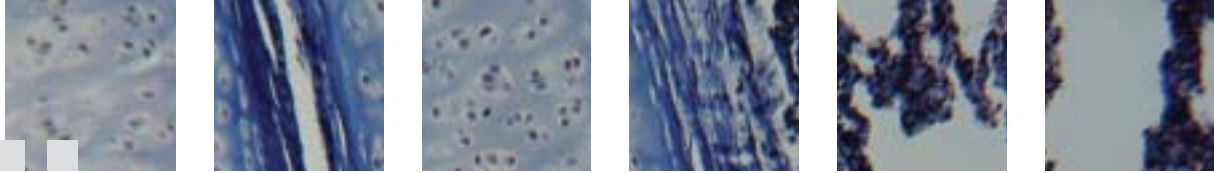
### Session 1.3. **Dynamische Effekte von gepulsten elektrischen Feldern im Nanosekundenbereich auf die menschliche Zellsignaltransduktion und Zellfunktionen**

**Beebe, S.J.**, USA

Ziel der Studie war die Untersuchung der Marker für Apoptose – intrazelluläres Kalzium, gemessen mittels Fura-2 und Fluorometrie, Grün-Fluoreszenz der

**Proteinexpression**, mit Hilfe der Flusszytometrie bestimmt, und Genexpression durch Mikroarray-Analyse in mehreren kultivierten Säugetierzellkulturen unter Einwirkung von nsPEF mit einer Dauer zwischen 10, 60 und 300 Nanosekunden und elektrischen Feldern von 4 bis 300 kV/cm. Zusätzlich wurden mittels Nadelelektroden Fibrosarkomzellen der Maus *in vivo* gegenüber nsPEF exponiert und auf Apoptose-Marker, Tumorgroße und Tumorgewicht untersucht. Die aus HL-60 Zellen gewonnenen Resultate ergaben: a) waren die elektrischen Feldstärken hoch genug, so wurden die Signalwege der Apoptose aktiviert – dies wurde anhand von externalisiertem Phosphatidylserin, Caspase-Aktivierung, DNA Fragmentierung und dem Austritt Cytochrom-A in das Cytoplasma bestimmt; b) bei einer Dauer der nsPEF-Exposition von 60 ns, 15 kV/cm (unter dem Schwellenwert der Apoptose-Induktion und der klassischen Elektroporation der Plasmamembran), wurde die molekulare Signalgebung durch die Ausschüttung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum und dem anschließenden Eintritt durch die „porierten“ Kanäle in die Plasmamembran initiiert; c) bei insgesamt 20.500 analysierten Genen mit dem Minimalwert der zweifachen Standardabweichung wurde die Expression von 603 Genen (~3 %) hochreguliert (~67 %) oder herunterreguliert (~33 %). Die Expression von ~60 Genen wurde um mehr als das Vierfache beeinflusst. Die beeinflussten Gene waren u.a. beteiligt an Signaltransduktion, Ionen-transport, DNA Bindung und Transkriptionssteuerung. In adhärennten HCT116 Darmkarzinomzellen kam es zwar zu Phosphatidylserin-Externalisation und Caspase-Aktivierung, doch starben die Zellen nicht ab, ein Hinweis darauf, dass diese beiden Marker in den Zellen nicht-apoptotische Funktionen erfüllen. Fibrosarkom-tumore der Maus, *in vivo* gegenüber nsPEF exponiert, zeigten DNA Fragmentierung und eine erhöhte Caspase-Aktivität und wiesen im Vergleich zu kontralateralen, scheinexponierten Kontrolltumoren eine Reduktion von Größe und Gewicht auf.

Diese Daten belegen, dass nsPEF-Exposition zu einer umfassenden Modulation von Zellsignalmechanismen führt, darunter **'second messenger'-Aktivitäten**, Ionen-transport und Transkription/Translation, die Über-



lebens- oder Sterbefunktionen bestimmen. Insofern können nsPEF-Expositionen neue Instrumente für die Grundlagenforschung und/oder therapeutische Kliniken bereitstellen.

Dr. Beebe wies darauf hin, dass die Bedingungen der nsPEF-Exposition zur Untersuchung von zellzyklischen Effekten angepasst werden müssen; so könne die Abtötung von Zellen in der **S-Phase** z.B. höhere Pulse erforderlich machen. Für die Anwendung der nsPEF-Technologie in therapeutischen Kliniken ist die Entwicklung neuer 'Leistungssysteme' Voraussetzung.

#### Session 1.4. **Die Regeln zellulären Überlebens nach Einwirkung ultrakurzer elektrischer Pulsen hoher Leistung**

**Pakhomov, A., USA**

Ziel der Untersuchung war: a) die Analyse zytotoxischer Effekte verschiedener Leistungen (87, 125 und 174 kV/m) und Wiederholungsraten von 10 ns elektrischen Pulsen (EP); b) Merkmalsbestimmung der zeitlichen Dynamiken und allgemeinen Mechanismen des Zelltodes; c) die Entwicklung quantitativer Kriterien zur Abschätzung unterschiedlicher Zellsensibilitäten. Es wurden Experimente mit kultivierten U937-Zellen (menschliche histiozytische Lymphome) und Jurkat-Zellen (menschliche Leukämie T-Zellen) in einem RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum durchgeführt. Aliquoten aus Zellen ( $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden 10 ns in Küvetten für den Gentransfer hochintensiven nsEP ausgesetzt. Pulsdauer und Amplituden wurden mit einem Digitaloszilloskop in einer eigens angefertigten Hochleistungs-sonde gemessen. Die Expositionen fanden bei einer Temperatur von 24 bis 25° Celsius statt, und die Temperatur der exponierten Proben durfte 37° Celsius nicht überschreiten. Die Dichte lebender und toter Zellen wurde in Intervallen von 0,5 h bis zu 72 h Stunden nach Exposition durch die Zählung der Zellen in einem Hämocytometer durch Ausschluss mittels Trypan-Blaufärbung bestimmt.

Die Apoptose-Induktion wurde anhand des spezifischen Ausschnitts der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) mittels des Westernblotting-Verfahrens ausgewertet, sowie durch internukleosomale DNA Frag-

mentierung mittels **Agarose-Gelelektrophorese**. Die Exposition von U937-Zellen gegenüber kurzen Pulsen (z. B. 100 Pulse, 100 kV/cm oder 200 Pulse, 75 kV/cm) tötete, wenn überhaupt, nur wenige Zellen ab. Exposition gegenüber längeren Pulsen und/oder höherer Leistung führte sowohl zu direktem (nekrotischen) und verzögertem (wenigstens zum Teil apoptotischen) Zelltod. Die Dichte lebender Zellen sank 8 bis 16 h nach der Exposition auf ein Minimum; danach proliferierten die überlebenden Zellen wieder regulär. Die Exposition von Jurkat-Zellen gegenüber nsEP zeigte die gleichen Hinweise auf direkten und verzögerten Zelltod, allerdings waren die Zellen weit empfindlicher gegenüber der EP-Behandlung als U937-Zellen. Den überlebenden Jurkat-Zellen gelang es nicht, innerhalb des 72-stündigen Beobachtungszeitraums nach Exposition die normale Proliferationsrate wiederherzustellen. Die Analyse der zytotoxischen Effektivität variierte bei unterschiedlichen E-Feldstärken, unterschiedlicher Pulszahl und Pulswiederholungsraten. Damit zeigten die Daten, dass die Indizes der 'D<sub>0</sub>'- und 'n'-Werte für einen quantitativen Vergleich der EP-Sensibilität verschiedener Zelllinien genutzt werden können. Die entsprechenden Werte in unserer Studie betragen 108 J/g and 1,5 für Jurkat-Zellen, 266 J/g und 1,63 für U937-Zellen. Die für die unterschiedliche Sensibilität dieser Zelllinien gegenüber nsEP verantwortlichen zellulären Mechanismen müssen noch entschlüsselt werden.

Dr. Pakhomov unterstrich, dass Dosis-Reaktion-Kurven zur nsEP-Exposition denen zu Expositionen gegenüber ionisierender Strahlung ähneln. Dies kann ein Hinweis auf gemeinsame Prinzipien der Interaktion und/oder Mechanismen der Abtötung von Zellen sein. Die Möglichkeit selektiver Abtötung bestimmter Zelltypen mit wenig Wirkung auf andere Zellen könnte in Biotechnologie und Medizin angewendet werden.

#### Session 1.5. **Einwirkung von Ultrabreitbandelektromagnetischer Strahlung (UWB EMR) und Aktivierung von Signaltransduktionswegen** **Natarajan, M., USA**

Die Signaltransduktion ist ein wesentlicher Prozess in der Reaktion der Zellen und Organismen auf exter-

ne Reize und tragen so zur Aufrechterhaltung normaler Funktionen und der Homöostase bei. Es wurde versucht, mittels kultivierter Monozyten des Menschen die durch UWB EMR-Exposition angestoßene Aktivierung der Signalmechanismen zu identifizieren und zu verstehen. Die Zellen wurden intermittierend gegenüber UWB-Pulsen exponiert, über einen Zeitraum von insgesamt 90 Minuten (30 min an, 30 min aus; dreimal wiederholt). Die Pulsbreite lag bei 0,8 ns, die Pulsanstiegszeit betrug 258 bis 273 ps, das gepulste elektrische Feld maß 100 kV/m, die Pulswiederholungsrate betrug 250 pps. Sowohl in schein- als auch in den UWB EMR-exponierten Flaschen wurde die Temperatur des Mediums bei 37° C gehalten. Unmittelbar nach der Exposition wurden die Zellen bei 37° C transferiert und nach 10 min, 0,5 h, 4 h, 8 h, 24 h und 48 h geerntet.

Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges wurde mittels EMSA analysiert. Der Effekt in Strömungsrichtung des Signalweges wurde in wie oben exponierten Zellen untersucht (vorübergehend entweder mit dem NF- $\kappa$ B-Luciferase-Reportervektor oder Kontrollvektor transfiziert), die dann nach 16 h geerntet wurden. Die unterschiedliche Expression von NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen wurde 8 und 24 h nach Exposition mittels des NF- $\kappa$ B Superarrays überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass die UWB EMR-exponierten Zellen im Vergleich zu scheinexponierten Zellen einen deutlichen Anstieg der NF- $\kappa$ B/DNA Bindungsaktivität verzeichneten. Der Effekt scheint sich bis 24 h nach der Exposition zu verzögern. Veränderungen der Genexpression wurden in UWB EMR-exponierten Zellen nicht gefunden. Dr. Natarajan erwähnte, dass die Reaktion der Zellen auf UWB EMR-Exposition transitorisch ist; ein Effekt auf die Genexpression ist nicht festzustellen.

#### Session 1.6. **Die Abtötung von Tumorzellen bei 10 ns, 80-300 kV/cm elektrischen Pulsen**

**Whitehead, T., USA** (diese Präsentation ersetzte den Beitrag von Roti Roti, J.L.)

Ziel der Studie war es herauszufinden, ob 10 ns hochintensive elektrische Pulse (EP) zur therapeutischen Abtötung von Zellen nutzbar zu machen sind. Kultivierte HeLa-Zellen (adhärente und Suspensionszel-

len) wurden 10 ns, 80-300 kV/cm elektrischen Pulsen ausgesetzt und die Zellüberlebensrate mittels des Klonogenen Assay ermittelt. Die Daten indizierten eine sehr schnelle Induktion von Apoptose, ermittelt durch Annexin-V and Flusszytometrie. Zellen in Suspension scheinen jedoch ein wenig widerstandsfähiger zu sein als **adhärente Zellen** – ein Hinweis darauf, dass die hochintensiven EP durchaus klinischtherapeutische Relevanz haben könnten. Bezüglich der Daten, die ursprünglich von Roti Roti vorgestellt werden sollten, bemerkte Dr. Whitehead, dass die Exposition von Zellen gegenüber 95 GHz, gefolgt von einer Behandlung mit 43° C, offenbar DNA Reparaturgene und DNA Reparaturproteine beeinflussen.

#### Tutoriumssitzung 1

### Methoden des 'High-Throughput Screening' in der EMF-Forschung

#### Tutoriumssitzung 1.1. **Proteomics and**

#### **Massenspektrometrie: Instrumente einer Biologie der Genom-Ära**

**Griffin, T., USA**

Die systematische und quantitative Analyse von Genen und Proteinen (Genprodukten) im Rahmen des Human Genome Project hat die moderne biologische Forschung revolutioniert. Die Massenspektrometrie (MS) ist eines der effizientesten Instrumente zu einer schnellen Erkennung, Ortung, Quantifizierung und Bestimmung funktioneller Aktivitäten von Proteinen, die in komplexen Mischungen exprimiert werden.

Dies war die Grundlage für die Entwicklung der **PROTEOMICS-Forschung**. Diese Methode basiert im Kern auf der Möglichkeit, mittels stabiler Isotopen Proteine und Peptide zu kennzeichnen, gefolgt von automatisierten massenspektrometrischen Messungen. Eine breite Palette von biologischen Problemen der Biochemie, der Molekular- und Zellbiologie und der klinischen Forschung lassen sich mittels der MS-Messung bearbeiten. Das Laborverfahren beinhaltet die Extrahierung von Proteinen (die Aufspaltung von Proteinen in Peptide, die multidimensionale Trennung der Peptide (Gradientenchromatographie), die Isolierung von Peptiden, die Fragmentierung von Peptiden (massenspektrometrische Analyse, Tausende von



Peptiden binnen weniger Stunden), die Suche in der Datenbank (Tandem-Massenspektrum) und die Identifizierung der Proteine. Mit Hilfe der ICAT-Technologie (isotope-coded affinity tags) werden die Proteine und Peptide gekennzeichnet, dann folgen die multidimensionale Trennung und die Analyse mittels des Kationenaustauschs HPLC und der quantitativen Proteomics.

In der ausführlichen Schilderung weiterer Techniken ging es um das experimentelle Design, die Präparation von Proben, die Anwendung von MS-basierten Proteomics zur groß angelegten Analyse der Genexpression, die Merkmalsbestimmung in makromolekularen Komplexen, Interaktionen und Analyse subzellulärer Proteinlokalisierungen sowie künftige Forschung im Bereich EMF. Die Daten aus den Proteinmodifizierungen nach der Exposition von Zellen gegenüber oxidativem Stress wurden vorgestellt. Dr. Griffin merkte an, dass mittels des ICAT-Verfahrens ein Maximum von 2000 Proteinen identifiziert werden kann. Fragen zu den spezifischen Modifizierungen, die in EMF-exponierten Zellen untersucht werden, wurden nicht beantwortet.

## Tutoriumssitzung 1.2. **Analyse der Genexpression in der EMF-Forschung**

**Maercker, C.**, Deutschland

Die Bedeutung eines Ansatzes zur Analyse des gesamten Genoms ist essentiell, da Gene nicht nur zusammenwirken, sondern auch interagieren. Techniken zur Analyse des gesamten Genoms auf der Basis von Mikroarrays (high-throughput, HTPT) sind vor ungefähr sechs Jahren eingeführt worden. Seit damals haben sich diese Methoden zu vielversprechenden Standardverfahren weiterentwickelt und werden in vielen Labors weltweit genutzt.

Ein Vorteil der HTPT Methoden ist, dass ein einziger Assay ausreicht, um die Vernetzung aller Gene im gesamten Genom einer beliebigen Zelle sichtbar zu machen, ohne dass eine Vorauswahl getroffen werden muss. Dies ist wichtig, da z.B. Hitzeschockgene viele verschiedene Funktionen haben können und solche Funktionen mittels nur eines auf der RT-PCR Methode basierenden Gen-Assays schwer zu unter-

scheiden sind. Das HTPT-Basisverfahren umfasst die Extrahierung der gesamten RNA (die Präparation von cDNA (umgekehrte Transkription), Biotin-Labeling der cRNA (in vitro Transkription), die Fragmentisierung der mit Biotin gekennzeichneten cRNA, Kontroll- und Testproben werden mittels zwei verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe gekennzeichnet, die Rot und Grün ergeben, Hybridisierung mit Genchips, Waschung und Färbung, Scanning und Quantifizierung. Rotfärbungen bedeuten hochregulierte Gene, Grünfärbungen herunterregulierte Gene und Gelbfärbungen Gene, die gleichermaßen in Kontroll- und Testproben exprimiert werden. Insgesamt bis zu 30.000 Gene können in nur einem Gen-Array auf einem Mikroskopträger analysiert werden.

Es war eines der Ziele des von der Europäischen Union finanzierten REFLEX Projekts herauszufinden, ob die Technologie zur Genexpression den Anforderungen der EMF-Forschung genügt. Dazu wurden Experimente mit primären Fibroblasten (ES1 Zellen) durchgeführt. Die Zellen wurden 24 Stunden intermittierenden 50 Hz EMF ausgesetzt (5 min an, 10 min aus).

Die statistische Analyse der Daten zeigte eine signifikante Herunterregulierung der am NF- $\kappa$ B- und Ras/MAPK-Weg beteiligten Gene. Ähnlich sah es aus, wenn die Zellen eine Stunde lang 1800 MHz (GSM) ausgesetzt wurden, mit einer SAR von 20 W/kg. Darüber hinaus trat eine erhöhte Expression von Lektinen auf und es gab Hinweise auf Veränderungen der Kalzium-Signalwege nach Exposition der Zellen gegenüber EMF/HF. Die Ergebnisse anderer Experimente zeigten eine erhöhte **Ribosom-Biogenese** in HL-60 Leukämiezellen nach EMF/HF Exposition, die von einer Überexpression mehrerer Hitzeschockproteine begleitet war. Daher könnten Hitzeschockgene beteiligt sein, wenn die Reaktion auf EMF/HF sich auch deutlich von der Hitzeschockreaktion unterschied. Die Analyse der Genexpression von mit EMF/HF behandelten Endothelzellen zeigte eine veränderte Regulierung von Zytoskelettgenen, und diese Resulte konnten durch die Proteindaten bestätigt werden.

Aber die **Gen-Array-Technologie** hat auch ihre Grenzen. Die Expression von Genen ist abhängig vom Zell-

typ, dem Entwicklungsstadium, Umwelteinflüssen, dem genetischen Hintergrund usw. Daher ist eine Wiederholung der Experimente dringend geboten, um statistisch signifikante Daten für alle Gene erhalten. Außerdem können die RNA-Stabilität und posttranslationale Modifizierungen wie die Phosphorylierung der Proteine nicht auf der Ebene der Transcriptomics untersucht werden. Pilotexperimente mit Antikörperchips sind notwendig, um die Beobachtungen zu bestätigen. Antikörperchip-Arrays sind in der Lage, sich spezifisch an die verschiedenen zellulären Proteine zu binden und sind so ein flexibles Instrument für Studien zu Genexpression und Phosphorylierung. Insgesamt eröffnet die Gen-Array-Technologie eine detailliertere Sicht auf das Genom/Proteom der Zelle und ist damit ein vielsprechender Schritt in Richtung einer funktionellen Genomanalyse von EMF/HF-exponierten Zellen.

Dr. Maercker wies darauf hin, dass die Reproduzierbarkeit von Genexpression in Mikroarrays für hochregulierte Gene annähernd 80% beträgt. Alterung könne eine Wirkung auf die Expression und Interaktion von Genen haben.

### Tutoriumssitzung 1.3. **Protein-Mikroarray-Technologie – Prinzipien und Anwendungen der Proteomics**

**Stoll, D.**, Deutschland

Methoden zur Bestimmung von Veränderungen der zeitabhängigen oder reizabhängigen Expression von Proteinen sind ein wertvolles Instrument zur Untersuchung von biologischen Wirkungen auf der Molekularebene. Inzwischen gibt es Protein-Mikroarrays zur Untersuchung ganzer Genome auf Proteine, die als Substrate proteinmodifizierender Enzyme und/oder Angriffspunkte von Immunreaktionen interagieren/agieren. Diese Mikroarrays sind ein nützliches Instrument der Proteomanalyse und ergänzen andere Technologien wie z. B. 2D-PAGE (zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese), Flüssigkeitschromatographie oder MS-Techniken.

Das Laborverfahren umfasst a) Flusszytometrie mit verschiedenfarbigen Kügelchen (Bildanalyse ist hier nicht notwendig) zur Analyse von Tausenden von Proben pro Tag und b) den Planare-Oberflächen-Mikroar-

ray-Assay (Bildanalyse) mit einer hohen Empfindlichkeit, die es erlaubt, bis zu 300 Fluoreszenzen zu bestimmen und pro Tag bis zu 20.000 Proben zu analysieren. Theoretische Vorteile, Erwartungen und Grenzen des miniaturisierten Multiple-Ligandenbindung-Assay wurden ebenso diskutiert, u.a. sein großes Potential für die Proteomics-Forschung und diagnostische Zwecke.

Dr. Stoll hielt fest, dass die Anzahl der Proteinflecke, die bestimmt werden können, allgemein bei ~1500 liegt; allerdings hänge die Anzahl der Proteine, die analysiert werden können, von der gegenseitigen Reaktivität der Antikörper ab. Die Proteinflecke sollten nicht zu klein sein (~80 bis 150 Mikronen) und wenigstens ein Molekül umfassen können.

### Tutoriumssitzung 1.4. **2-DE/MS Proteomics-Studien – praktische Aspekte der Analyse**

**Nylund, R.**, Finnland

Im Laufe der letzten Jahre sind HTPT-Screenings in den verschiedenen Forschungsgebieten in breitem Maßstab zur Anwendung gelangt. Screenings zur Proteinexpression werden als Proteomics bezeichnet. Es handelt sich dabei um unterschiedliche Methoden zur Erfassung von Proteinexpression. Eine der am häufigsten benutzten Techniken ist eine Kombination aus zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-E) (zur Bestimmung der Molekulargewichts durch isoelektrische Fokussierung) und Massenspektrometrie (MS). Für den 2D-E-Ansatz ist Wiederholbarkeit entscheidend: Mehrere Reproduktionen, die kombiniert und miteinander verglichen werden, sind notwendig, um verlässliche Resultate zu erzielen.

Die Präparation der Proben ist ein Schlüsselement der erfolgreichen 2D-E-Trennung von Proteinen, und die benutzte Methode variiert je nach der Beschaffenheit der Probe. Gewöhnlich werden die Proben durch Homogenisierung lysiert (aufgebrochen), wobei Detergenzien, Glaskügelchen, Sonikation, Gefrier- und Auftaughtechniken zum Einsatz kommen. Ein Protease-Hemmer muss angewendet werden, um die Proteolyse zu verhindern. Anschließend werden die Proteine mit Trichloressigsäure ausgefällt, denaturiert und ultrazentrifugiert. Ein angemessener Prozentsatz von SDS-



oder PAGE-Gel (10 bis 12,5 %, je nach Größe der zu untersuchenden Proteine) muss enthalten sein. Die Aufnahmekapazität der Proben in den Gels muss so justiert sein, dass eine optimale Auflösung erreicht wird (100 bis 500 Mikrogramm Gesamtprotein).

Die Proteinmenge scheint die Methode und die Verlässlichkeit der Resultate zu beeinflussen. Für die isoelektrische Fokussierung können handelsübliche Streifen (7 bis 24 cm) oder Röhren verwendet werden. Die Proteinflecke sollten getrennt, mittels Trypsin aufgespalten und für den Peptid-Fingerabdruck durch MS-Analyse sichtbar gemacht werden (Autoradiographie, in der radioaktive Materialien benutzt werden, Silberfärbung, die nicht-radioaktiv ist, aber eine schlechte Linearität aufweist, Fluoreszenzfarbstoffe mit guter Linearität und schnelle oder Coomassie-Blaufärbung, die leicht zu handhaben, aber durch schwache Sensibilität gekennzeichnet ist). Die typische Färbungsmethode stößt entweder in der Erfassungsempfindlichkeit oder in der Linearität der Erfassung an ihre Grenzen. Ein Gel-Scanner mit Densitometer und ein Computer zur Bildspeicherung sollten vorhanden sein.

Dr. Nylund merkte an, eines der am häufigsten zu beobachtenden Probleme von MS-Studien seien in der Probe enthaltene Kontaminationen. Außerdem könne die Analyse auch durch einige nicht-natürliche Proteinmodifizierungen aufgrund der Färbung behindert werden. Die Optimierung der Technologie brauche Zeit – von einigen Wochen bis Monaten. Ein optimiertes System ist allerdings in der Lage, mehrere Proteine zugleich zu screenen, und wird einen guten Überblick über die allgemeine Proteom-Landschaft liefern, in der noch unbekannte Wirkungen effizient untersucht werden können.

#### Tutoriumssitzung 1.5. **Die Anwendung des 'High-Throughput Screening' in der EMF-Forschung** **Leszczynski, D.,** Finnland

Mit der Entwicklung neuer Telekommunikationssysteme in unserer Gesellschaft werden fortwährend neue EMF/HF-Frequenzen und Modulationen nutzbar gemacht. Trotz langjähriger Forschung besteht immer noch Unklarheit in der Frage, ob niederenergetische

EMF/HF biologische Wirkungen induzieren können und ob solche Wirkungen ein Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen. Die Ergebnisse zu den am häufigsten untersuchten 'offensichtlichen' Wirkungen von EMF/HF-Exposition auf Kanzerogenese, Blut-Hirnschranke, Entwicklung und Wirkungen hypersensibler Reaktionen konnten in unabhängigen Studien nicht reproduziert werden. Die bislang berichteten biologischen Wirkungen sind unklar, da die zugrundeliegenden biophysischen Mechanismen unbekannt sind.

Gegenstand der Untersuchung war nun, ob EMF-Exposition bestimmte schwache Wirkungen induzieren kann (ohne dass es zu einer Erkrankung kommt), die der Lebensqualität abträglich sind – Schlafstörungen, Kopfschmerzen usw.. Erforderlich zur Klärung dieser Frage sind relativ einfach zu handhabende und schnelle Testverfahren, die bestimmen können, ob neue EMF-Frequenzen oder Modulationen unvorhergesehene/unerwartete biologische Effekte hervorrufen. Die in Proteomics und Transcriptomics eingesetzten HTPT-Verfahren sind als ein nützlicher Ansatz vorgeschlagen worden, um potentielle Angriffspunkte von EMF-Exposition auf der Zellularebene zu definieren. Die HTPT-Verfahren weisen Vorteile auf, haben aber auch deutliche Grenzen und weisen Unschärfen auf. Doch bei sorgfältiger Anwendung bietet HTPT die Möglichkeit zu einer einzigartig schnellen Erfassung der auf EMF-Exposition reagierenden Gene und Proteine. Die durch HTPT gewonnenen Daten können nicht nur hilfreich sein, um biologische Wirkungen von EMF dingfest zu machen, sondern auch zum Verständnis der biologischen Wirkungen zugrundeliegenden biophysikalischen Mechanismen beitragen. Forschungsbemühungen und Ressourcen können dann auf diese bekannten Angriffspunkte der EMF-Strahlung konzentriert werden.

Ein Hinweis von Dr. Leszczynski an die Teilnehmer war, „wenn wir die Anwendung von HTPT-Verfahren in Betracht ziehen, müssen zunächst die potentiell zu untersuchenden Gene/Proteine identifiziert werden. Es sollten nicht zu viele bzw. zu wenige dieser Gene/Proteine in die Tests einbezogen werden. Außerdem müsste ein Netzwerk von Laboratorien etabliert werden, wo diese standardisierten Tests durchgeführt werden sollen.“

Tutoriumssitzung 8

## Biophysikalische und biologische Dosimetrie I

### Sitzung 8.1. Genotoxizität in Mäusen bei Exposition zu Millimeterwellen

Vijayalaxmi, USA

In der Literatur ist eine Vielzahl nützlicher Anwendungen von Millimeterwellen (MMW) in der Medizin beschrieben. MMW-Technologien werden auch zunehmend im Verkehr und für militärische Radarsysteme genutzt, in der drahtlosen Kommunikation usw. Es erschien uns relevant, im Tierexperiment das genotoxische Potenzial von MMW-Exposition zu untersuchen, da entsprechende Schäden oft in einen Zusammenhang mit der Kanzerogenese gestellt werden. Ziel der Untersuchung war es festzustellen, ob a) MMW-Exposition Genotoxizität induziert und b) MMW-Exposition die genotoxischen Effekte von Zyklophosphamid (CP), einem Chemotherapeutikum zur Behandlung verschiedener maligner Tumore, modifizieren kann. MMW-Strahlung wurde mittels eines russischen YAV-1 Generators erzeugt und bei 42,2+/-0,2 GHz (7,1 mm) übertragen. Die Spitzen-SAR und Spitzenleistungsdichte wurden mit 622+/-100 W/kg bzw. 31+/-5 mW/cm<sup>2</sup> bestimmt.

Insgesamt 48 männliche BALB/C Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip in 6 Gruppen à 8 Tiere aufgeteilt: 1) unbehandelte Kontrollen, 2) 30 min/Tag MMW-exponiert, an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, 3) scheinexponiert wie in Gruppe 2, 4) am zweiten Tag des Experiments mit CP behandelt (15 mg/kg Körpergewicht), 5) 30 min MMW-Exposition am ersten Tag, CP-Injektion (15 mg/kg Körpergewicht) unmittelbar nach 30 min Exposition am zweiten Tag, und 30 min MMW-Exposition am dritten Tag, und 6) Scheinexpositionen und CP-Behandlung wie in Gruppe 5. Alle Mäuse wurden 24 Stunden nach der letzten Behandlung getötet. Peripheres Blut und Knochenmarkabstriche wurden untersucht, um das Ausmaß der Genotoxizität festzustellen, das auf der Basis der **Mikronukleusrate (MN)** in polychromatischen Erythrozyten (PCEs) geschätzt wurde.

Die durchschnittliche Inzidenz von MN/2000 PCEs war 0,6+/-1,6 in unbehandelten Mäusen, 5,1+/-1,5 in MMW-exponierten und 5,1+/-1,3 in scheinexponierten Mäusen. Die Werte im Knochenmark lagen bei 9,1+/-1,1 in unbehandelten Mäusen, 9,3+/-1,6 in MMW-exponierten und 9,1+/-1,6 in scheinexponierten Mäusen. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, denen CP injiziert wurde, einen signifikanten Anstieg der MN/2000 PCEs, 14,6+/-2,7 in peripherem Blut und 21,3+/-3,9 in Knochenmarkszellen ( $p < 0,0001$ ). Allerdings wichen die Werte in Mäusen, die zusätzlich MMW ausgesetzt wurden (14,3+/-2,8 in peripherem Blut und 23,5+/-2,3 im Knochenmark), oder in scheinexponierten Mäusen (15,4+/-3 in peripherem Blut und 22,1+/-2,5 in Knochenmarkszellen) nicht signifikant ab. Insofern gab es keinen Beleg dafür, dass MMW-Exposition Genotoxizität in peripherem Blut oder Knochenmarkszellen induziert. Ebenso wenig beeinflusste MMW-Exposition die Zyklophosphamid-induzierten MN in beiden Gewebsarten.

Dr. Vijayalaxmi berichtete, dass MMW in Russland und in den osteuropäischen Ländern extensiv in der klinischen Medizin angewendet wird. Patienten werden am Unterarm oder an der Stirn MMW ausgesetzt, um starke Schmerzen im Bauchbereich zu lindern oder um gastrointestinale Störungen zu behandeln. Die geltende Hypothese zur Erklärung solcher Effekte besagt, dass MMW Zytokine induziert, die sich (systemisch) im ganzen Körper verteilen und so einen schmerzlindernden Einfluss auf entfernte Organe ausüben. Eine ähnliche Hypothese wurde in unserer Studie zugrundegelegt. Die Mäuse wurden nur im Nasenbereich MMW ausgesetzt, und der potentielle positive Effekt (Reduktion des Auftretens von CP-induzierten MN) sollte in entfernten Bereichen, z.B. im Knochenmark und in peripheren Blutzellen untersucht werden. Die Daten enthielten keinen Hinweis auf positive Wirkungen von MMW-Exposition auf CP-induzierte MN. Allerdings war MMW-Exposition andererseits auch nicht per se genotoxisch und induzierte keine MN.

### Tutoriumssitzung 3

## Forschung im Zusammenhang mit Effekten von Hochfrequenzstrahlung auf die Mikronukleusbildung

Diese Tutoriumssitzung wurde vom Center for Devices and Radiological Health (CDRH – Zentrum für Strahlenschutz) der amerikanischen Food and Drugs Administration (FDA – Behörde für Lebensmittelkontrolle und die Zulassung von Arzneimitteln) ausgerichtet. Vor wenigen Jahren hat die FDA eine Vereinbarung über Zusammenarbeit in Forschung und Entwicklung (Kürzel: CRADA) mit der Cellular Telecommunications and Internet Association (CTIA – Verband Mobiltelekommunikation und Internet) geschlossen, deren Ziel es ist, auf die Ängste in der Öffentlichkeit zu reagieren und offene Fragen bezüglich der Sicherheit von Nutzern drahtloser Telefone zu klären. Unter dem Dach des CRADA hat die FDA drei Forschungslabore beauftragt, die Effekte der Hochfrequenzstrahlung (HF) von Geräten der drahtlosen Kommunikation auf die Mikronukleusbildung (MN) zu untersuchen.

Die vorliegenden Befunde wurden diskutiert von Dr. Bernd **Gorlitz**, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin, Hannover, Dr. Raymond **Tice**, Integrated Laboratory Systems, Triangle Park, NC, USA, und Dr. Maria Rosaria **Scarfi**, Interuniversitäres Zentrum zur Untersuchung der Interaktion zwischen elektromagnetischen Feldern und Biosystemen, Neapel, Italien. Drei geladene Vorstandsmitglieder – Dr. James **McGregor** (FDA), Dr. Greg **Lotz** (NIOSH) und Dr. Russel **Owen** (EPA) nahmen an der Diskussion teil.

### Tutoriumssitzung 3.1. Effekte von 1-wöchiger und 6-wöchiger Hochfrequenz(HF)-Exposition auf die Mikronukleusbildung in B6C3F1 Mäusen

**Gorlitz, B.**, Deutschland

Ziel der Studie war die Untersuchung potentieller Induktion von MN in nicht frei beweglichen Mäusen durch (Ganzkörper)Exposition gegenüber HF, 2 h/Tag, für eine Woche oder 6 Wochen. Die für die 1-wöchige Exposition benutzten SARs waren 0, 0,44, 1,33 und 4 W/kg. Die SARs für 6-wöchige Exposition lagen bei 0, 0,33, 1 und 3 W/kg. Insgesamt 80 Mäuse, 10 Männchen und 10 Weibchen in jeder 902 MHz und

1747 MHz HF-Gruppe und den entsprechenden scheinexponierten Gruppen, wurden in den Experimenten benutzt. Nach Ende der HF-Expositionen wurden sämtliche Mäuse durch eine Überdosis CO<sub>2</sub> getötet. Präpariert wurden Mikroskopträger mit Knochenmark (1-wöchige Exposition), peripherem Blut (6-wöchige Exposition) und Hautkeratinozyten von der Schwanzwurzel sowie kultivierten Lymphozyten der Milz (1- und 6-wöchige Exposition). Für jede Maus wurden 1000 Lymphozyten der Milz und 2000 Zellen aus dem Knochenmark, aus peripherem Blut und Keratinozyten auf die Inzidenz von MN in den kodierten Präparaten untersucht. Die Ergebnisse wurden nach Abschluss der Analyse dekodiert.

Die Daten zeigten, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen HF-exponierten und scheinexponierten Mäusen nach mittlerem Körpergewicht, Prozentsatz der polychromatischen Erythrozyten und der Inzidenz von MN gab. Insofern hatte die HF-Exposition unter den geschilderten experimentellen Bedingungen keine Wirkung auf die MN-Bildung in Mäusen.

Dr. Gorlitz spezifizierte noch einmal: 1) Die Expositionen sollten kurzzeitige und langzeitige menschliche Nutzung simulieren. 2) Käfigkontrollen gab es nicht. 3) Als Positivkontrolle dienten Mäuse, denen Zyklophosphamid injiziert wurde. Allerdings waren keine positiven Reaktionen in Hautkeratinozyten zu beobachten. 4) es wurden paarweise Vergleiche der MN-Inzidenz zwischen HF-exponierten und scheinexponierten Mäusen angestellt und die Fehlerraten (alpha) in Mehrfachvergleichen kontrolliert. 5) Aufgrund der unzureichenden Anzahl der für die Analyse verfügbaren Zellen konnten in manchen Fällen nur 1000 Zellen untersucht werden.

### Tutoriumssitzung 3.2. Effekt der Hochfrequenzstrahlung (837 MHz HF) eines TDMA Handy auf die Inzidenz von Mikronuklei in kultivierten Lymphozyten aus menschlichem Blut

**Tice, R.**, USA

Die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie (Tice et al., Bioelectromagnetics 23, 113-126, 2002) demonstrierten einen signifikanten Anstieg der MN in Lymphozyten aus dem menschlichem Blut eines ein-

zelen Spenders, das 24 Stunden in transversal-elektromagnetischen Zellen (TEM) in Kulturröhrchen HF-Signalen ausgesetzt worden war (bei  $\geq 5$  W/kg SAR). Das vorliegende Forschungsprojekt hatte drei primäre Zielsetzungen:

- 1) Vergleich der MN in Lymphozyten aus menschlichem Blut nach 24 h Exposition gegenüber 837 MHz (SAR: 2,5, 5 und 10 W/kg) in TEM-Zellen und in einem radialen Transmission-Line System (RTL). Die Blutproben von 3 männlichen und 3 weiblichen Spendern wurden entweder in Petrischalen in den TEM-Zellen oder in Kulturflaschen in der RTL-Vorrichtung exponiert. Dies diente der Abschätzung des Einflusses der Expositionsbedingungen (Petrischalen versus Kulturflaschen) und der Spender-Spender-Variabilität.
- 2) Auswertung der MN in Lymphozyten aus menschlichem Blut nach 24 h Exposition in Petrischalen bei 35° C, 39° C und 42° C (vor der Zellkultur) in TEM-Zellen, ohne HF-Exposition.
- 3) Auswertung der MN in Lymphozyten aus menschlichem Blut nach 24 h Exposition bei 39° C und 42° C (vor der Zellkultur) in TEM-Zellen, mit HF-Exposition bei SARs von 5 und 10 W/kg.

Die Ergebnisse ließen Folgendes erkennen:


- 1) Die Exposition von Zellen (von 3 Männern und 3 Frauen) gegenüber 837 MHz HF in TEM-Zellen oder im RTL-System ergaben keinen Anstieg der MN; dies galt für alle untersuchten SARs (mit Ausnahme einer weiblichen Spenderin bei 10 W/kg SAR). Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den in Petrischalen und Kulturflaschen HF-exponierten Zellen auf. Ebenso gab es auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spendern.
- 2) Die Exposition der Zellen (1 männlicher, 1 weibliche Spender) in Petrischalen über 24 h bei verschiedenen Temperaturen – 35° C, 39° C und 42° C – in TEM-Zellen, ohne HF-Exposition, ergab einen sporadischen, nicht-konsistenten Anstieg der MN.
- 3) Die Exposition von Zellen (1 männlicher, 1 weibliche Spender) in Petrischalen über 24 h bei 39° C und 42° C in TEM-Zellen, mit 837 MHz HF Exposition (SAR: 10 W/kg) induzierte keine MN. Damit zeigten die gewonnenen Daten keine Erhöhung der MN in Lymphozyten aus menschlichem Blut bei verschiedenen Ex-

positionsbedingungen nach Exposition zu 837 MHz HF in TEM-Zellen und im RTL-System.

Diese Daten widersprechen den Beobachtungen der vorangegangenen Studie (Tice et al. 2002). Der wichtigste Unterschied war die Verwendung von Petrischalen in der vorliegenden Untersuchung, während in der Vorläuferstudie Kulturröhrchen benutzt wurden. Außerdem lässt das Ausbleiben eines Anstiegs der MN in den Zellen bei 39° C und 42° C mit oder ohne HF-Signal darauf schließen, dass die erhöhten Temperaturen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht der Grund für den in der vorangegangenen Studie festgestellten Anstieg der MN sind (Tice et al. 2002).

Der Kommentar von Dr. Tice: Positivkontrollen wurden nicht in die Studie aufgenommen. Wasser zirkulierte in den Proben, um die Temperatur im vorgesehenen Rahmen zu halten: über den gesamten Expositionszeitraum regulierten Ingenieure die fluktuierenden Temperaturen. Die Präsentation der Daten nach individuellem Spender war vorzuziehen, da bei einem Teil der Spender ein deutlicher Anstieg der MN in HF-exponierten Zellen zu erkennen war: Der signifikante Unterschied zwischen HF-exponierten und scheinexponierten Zellen solcher Spender wäre nicht erkannt worden, hätte man die Daten aller Spender gepoolt. Dr. Tice betonte, dass die Daten aus seiner vorangegangenen Studie (Tice et al. 2002) immer noch gültig seien. Aber auf der Basis der neuen Daten könnten die Temperaturerhöhungen nicht als Erklärung für den zuvor beobachteten Anstieg der MN herangezogen werden. Er schlug vor, berufene Gremien (er nannte sie: „Regulierer“) sollten die Unterschiede zwischen mit Kulturröhrchen (Anstieg der MN) und Petrischalen (kein solcher Anstieg in MN) durchgeführten HF-Expositionen sorgfältig überprüfen.

Dr. Tice gab keine erschöpfenden Antworten auf die Fragen zu: a) Dosimetrie – ob die SAR auf einer homogenen Verteilung der Blutprobe basiere und, wenn ja, wie der Einfluss des zum Boden der Kulturröhrchen, Petrischalen und Kulturflaschen abgesunkenen Bluts sei? b) Die Interpretation der Daten, die als Standardabweichungen zwischen HF-exponierten und scheinexponierten Zellen dargestellt wurden, sei schwer nachzuvollziehen, da man nicht wissen kön-



ne, ob ein bestimmter scheinexponierter Wert nun um 50% gegenüber dem Wert anderer scheinexponierter Zellen gesunken sei oder ob die HF im Vergleich zu allen Scheinexpositionstypen einen 50%igen Anstieg der MN verursacht habe.

### Tutoriumssitzung 3.3. **Induktion von Mikronuklei in Lymphozyten aus menschlichem Blut durch in vitro Exposition gegenüber einem Signal der Mobilfunkfrequenzen**

**Scarfi, R.**, Italien

In zwei kooperierenden separaten Labors in Rom und Neapel wurden Experimente durchgeführt, die zwei Ziele verfolgten:

1) Vergleich der MN in Lymphozyten aus dem peripheren Blut des Menschen (10 Spender – 5 Spender pro Labor) nach 24 h Exposition zu 900 MHz (GSM-Signal) mit Spitzen-SARs von 0, 1, 5 und 10 W/kg; die Temperatur wurde während der Exposition bei 37° C gehalten.

2) Auswertung der MN in Lymphozyten aus menschlichem Blut (4 Spender – 2 Spender pro Labor) nach 24 h konventioneller Erwärmung (35° bis 42° C) mit gleichzeitiger Exposition zu 900 MHz bei Spitzen-SARs von 1,5 W/kg.

In alle Experimente waren scheinexponierte und Positivkontrollen (0,33 mg/ml Mitomycin-C, MMC) einbezogen. Von allen 100 Blutspendern, die zwischen 20 und 30 Jahre alt waren, wurde zuvor eine schriftliche Zustimmung eingeholt. Außerdem wurden Informationen bezüglich der derzeitigen Arbeitsumgebung, Rauchen, Alkoholkonsum, Exposition zu Chemikalien, Virusinfektionen in der jüngsten Vergangenheit, Impfungen und Röntgenbestrahlung zur Diagnostik gesammelt.

Das experimentelle Protokoll sah auch die HF-Exposition von Aliquotduplikaten aus 3 ml verdünntem Blut (1 ml Blut + 2 ml Medium) vor, gefolgt von der Stimulierung der Zellen mit Phytohämagglutinin und einer Inkubation bei 37+/-1° C. 44 h nach Beginn der Inkubation wurde Cytochalasin-B (6 µg/ml) den Zellkulturen beigemischt. Alle Zellen wurden nach einer Gesamtkulturdauer von 72 Stunden geerntet, mit hypotonischer Lösung behandelt, fixiert und Giemsa gefärbt.

Kodierte Träger wurden zwischen den beiden Labors ausgetauscht, um ein unabhängiges Scoring zu ermöglichen. Das Scoring basierte auf der Voraussetzung, dass die Inzidenz von binuklearen Zellen (BCI) bei 30 bis 60 % liegen und die spontane MN-Rate 12 pro 1000 BCI nicht überschreiten solle.

Zur Exposition der Zellen bei 900 MHz (in 35 mm Petrischalen) wurde ein 'Wire-Patch'-System benutzt. Zur Bestimmung der Verteilung von SARs in den Petrischalen wurde auf numerische und experimentelle Dosimetrie zurückgegriffen. Ein Vier-Kanal-System wurde errichtet, um die gleichzeitige Exposition mit vier verschiedenen Leistungen zu gewährleisten. Leistung und Temperatur während der Experimente wurden aufgezeichnet und in einer computerisierten Datenbank festgehalten.

Die bislang in beiden Labors gesammelten Daten enthalten keinen Hinweis auf signifikante Unterschiede zwischen HF-exponierten und scheinexponierten Zellen bezüglich der Inzidenz von BCI (40-48%), dem Proliferationsindex für Lymphozyten (>1,5 und <2) und der MN-Rate (<5/1000 BCI). Mit MMC behandelte Zellen der Positivkontrolle zeigten ein Absinken der BCI (<40%), einen reduzierten Proliferationsindex für Lymphozyten (<1,5) und eine erhöhte Inzidenz von MN (25-30/1000 BCI). Insofern gab es keinen Hinweis auf Genotoxizität in Lymphozyten aus menschlichem Blut nach Exposition zu 900 MHz HF bei SARs bis zu 10 W/kg. Die Experimente zu Zielvorgabe #2, d.h. dem Einfluss der Temperatur, sind noch nicht beendet.

Dr. Scarfi merkte an, die in Rom und Neapel gesammelten Dateien bestätigten nicht die von Tice et al. im Jahre 2002 veröffentlichten Befunde. Es wurden auch mehrere 'peer-reviewed' Veröffentlichungen unabhängiger Forscher angesprochen, denen es nicht gelang, die von Tice et al. präsentierten Daten zu bestätigen (dort wurde eine adäquate Temperaturkontrolle während der HF-Exposition durchgeführt). Mehrere Teilnehmer dieser Sitzung gewannen den Eindruck, dass Dr. Scarfis Experimente nicht nur durch die adäquate Durchführung überzeugten, sondern auch bezüglich der Datensammlung und der Präsentation.

*Vijayalaxmi, Ph. D., Department of Radiation Oncology  
University of Texas Health Science Center*

# Fachbegriffe

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Elektropor-meabilisierung   | Hierunter versteht man den Durchbruch der Zellmembran durch einen elektrischen Feldpuls hoher Intensität und kurzer Dauer.   |
| Apoptose                    | Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der von einer biologischen Zelle im Gegensatz zur Nekrose selbst durchgeführt wird.  |
| Organellen                  | In der Biologie ist ein Organell („Orgänchen“) eine subzelluläre, von einer Membran umschlossene, funktionelle Untereinheit einer Zelle.   |
| elektroporieren             | So nennt man die Methode zur Erzeugung von Löchern in biologischen Membranen, um z. B. DNA in lebende Zellen einzuschleusen.   |
| Eosinophil                  | Typus Weißer Blutzellen aus der Gruppe der Phagocyten (Fresszellen), die auf Allergene und Parasiten reagieren und diese aufnehmen.  |
| endoplasmatisches Retikulum | Das Endoplasmatische Retikulum (endoplasmatisch=“im Cytosol“; retikulum bzw. reticulum=“kleines Netz“; abgekürzt ER) ist ein wichtiges Zellorganell in allen Eukaryonten. Zu seinen Funktionen gehören die Proteinsynthese und Signaltransduktion.   |
| Translokation               | In der Genetik bedeutet Translokation die Ortsveränderung von Chromosomen- oder Chromatidstücken innerhalb eines Chromosomenbestandes, hier wohl jedoch einfach nur die Verschiebung von Membrankomponenten.   |
| Nekrose                     | Unter einer Nekrose versteht man in der Biologie und Medizin ein Gebiet, in dem Gewebe abstirbt. Der restliche Organismus bleibt am Leben, aber ein Teil geht zu Grunde.   |
| Aliquot                     | [lat.: aliquot = einige, ein paar] Eine Teilprobe (z.B. in der Mikrobiologie), wenn die ganze Probe nicht komplett untersucht werden kann/soll.  |
| Caspase                     | Caspasen sind eine Familie von proteinspaltenden Enzymen. Sie sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose.  |
| Protein-expression          | Die Produktion eines Proteins entsprechend der auf einem Gen gespeicherten Information.  |
| ‘second messenger’          | ‘Second messenger’ sind Bindeglieder im Signalsystem hydrophiler Hormone und Neurotransmitter. Die Einschaltung eines ‘second messenger’ ermöglicht eine Verstärkung oder auch Differenzierung des Signals.  |
| S-Phase                     | Ein Zeitabschnitt während der Zellteilung. S steht für Synthese, es wird die Erbinformation der Zelle verdoppelt.  |
| Agarose-Gelelektrophorese   | Gelelektrophorese ist eine analytische Methode der Chemie und Molekularbiologie, um verschiedene Arten von Molekülen zu trennen. Dabei wandert eine Mischung aus zu trennenden Molekülen unter Einfluss eines elektrischen Felds (siehe unten: Elektrophorese) durch ein Gel, in diesem Fall ein Agarose-Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. |

|   |   |
|---|---|
| Elektrophorese                          | Darunter versteht man die Wanderung elektrisch geladener Teilchen durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff in einem elektrischen Feld.  |
| adhärente Zellen                        | Hierbei handelt es sich um an Oberflächen befestigte Zellen.  |
| Proteomics                              | Die Proteomik (englisch: proteomics) umfasst die Erforschung des Proteoms, d.h. der Gesamtheit aller in einer Zelle oder einem Lebewesen exprimierten Proteine.   |
| Ribosom                                 | Ribosomen sind Protein/RNA Komplexe, die in großer Zahl im Cytoplasma jeder Zelle vorkommen. Ihre Aufgabe ist es, aus der Sequenzinformation der mRNA das Protein herzustellen. Dieser Prozess wird Proteinbiosynthese oder Translation genannt.  |
| Biogenese                               | Biogenese (griech.), die Entstehung der Lebewesen; umfaßt die individuelle Entwicklung eines Organismus (Ontogenese) wie auch die geschichtl. Entwicklung der Art (Phylogenese). Hier ist wohl eher entweder die Synthese von Ribosomen selbst, oder die Synthesetätigkeit der Ribosomen gemeint.   |
| Gen-Array-Technologie (DNA-Microarrays) | Methode zur Analyse der Genexpression, also zur Bestimmung der Aktivität der Gene einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus. Hierbei werden zahlreiche Proben bekannter kleiner, einsträngiger DNA-Stücke („Oligonukleotide“) auf kleinstem Raum auf einen Glasträger („DNA-Chip“) punktgenau in einem festen Raster von Testfeldern („Array“) aufgetragen („Spotting“). Bringt man dann die zu untersuchenden DNA-Fragmente, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, mit dem Chip in Verbindung, dann verbinden sich Chip-DNA und Test-DNA in dem Maße zu mehr oder weniger messbar fluoreszierenden Doppelstrang-Stücken („Hybridisierung“), wie die DNA-Basenpaare zueinander passen. Anhand des „Hybridisierungsgrads“ für jedes bekannte DNA-Stück erhält man Aufschluss über die Genexpression in der unbekanntenen Probe. Wird zunehmend auch durch Bestimmung der Proteinmenge durchgeführt. |
| Mikronukleus                            | Bei der Zellteilung wird die Kernmembran während der Mitose aufgelöst. Der Wiederaufbau der Kernhülle erfolgt gegen Ende der Mitose. Wenn jedoch die Chromosomen nicht alle nahe beieinander liegen, können sich Chromosomengruppen oder auch einzelne Chromosomen mit einer eigenen Kernmembran umgeben. Ähnliche Erscheinungen treten aber auch nach Mutagenbelastung auf. Da in diesen Nebenkernen meist nur einzelne Chromosomen oder chromosomale Bruchstücke enthalten sind, werden sie Mikrokerne bzw. Mikronuklei (MN) genannt.   |

Bei weiteren Fragen zu Fachbegriffen empfiehlt sich unter [www.femu.de](http://www.femu.de) oder [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de) oder bei [www.google.de](http://www.google.de) (im Suchfeld zuerst „define:“ und dann den Suchbegriff eingeben (leider nur in Englisch)) nachzusehen.