

Strahlenschutzkommission

Geschäftsstelle der
Strahlenschutzkommission
Postfach 12 06 29
D-53048 Bonn

<http://www.ssk.de>

Wirkung hochfrequenter Felder auf das Genom: Genotoxizität und Genregulation

Stellungnahme der Strahlenschutzkommission
und wissenschaftliche Begründung

Verabschiedet in der 213. Sitzung der Strahlenschutzkommission am 05./ 06. Dezember 2006

Inhaltsverzeichnis

Stellungnahme

Ausgangslage und Vorgehensweise	5
Expositionseinrichtungen.....	6
Genotoxizität.....	6
Genregulation	6
Zusammenfassung.....	7
Literatur	7

Wissenschaftliche Begründung

1 Fragestellung	9
1.1 Charakterisierung der Ziele und die zugehörigen Definitionen	9
1.2 Vorgehensweise und Auswahlkriterien.....	9
1.3 Wirkungskette und Interaktionsmechanismen	9
2 Einschätzung verwendeter Methoden und Modellsysteme	11
2.1 Expositionseinrichtungen und Dosimetrie.....	11
2.2 Zellen und Kulturbedingungen.....	14
2.2.1 Primäre Zellen	14
2.2.2 Zelllinien	15
2.2.3 Stammzellen.....	16
2.2.4 Kulturbedingungen.....	16
3 Biologische Endpunkte und Methoden	16
3.1 Genotoxizität.....	16
3.1.1 „Comet-Assay“	16
3.1.2 Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche und Mikrokerne.....	17
3.1.3 Mutationstests	19
3.1.4 Nekrose und Apoptose	20
3.2 Genexpression (mRNA- und Proteinanalyse).....	21
3.2.1 RT-PCR	21
3.2.2 Mikroarray	22

3.2.3	SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)	22
3.2.4	2D-Gelelektrophorese	23
3.2.5	„Western-Blotting“	23
3.2.6	Immunzytochemie und Immunhistochemie	23
3.2.7	Reporter-Gen Nachweis und „Heat Shock“-Proteine	24
3.3	Zellzyklusveränderungen	25
3.3.1	Proliferationsindex	25
3.3.2	Durchflusszytometrie	25
4	Auswertung und Statistik	25
5	Genotoxizität	26
5.1	Bewertung der Literatur bis 2003.....	26
5.2	Bewertung neuerer Literatur	27
5.2.1	Mikrobielle Systeme	27
5.2.2	<i>In-vitro</i>-Exposition: Blutzellen	27
5.2.3	<i>In-vitro</i>-Exposition: Fibroblasten und Zelllinien	30
5.2.4	<i>In-vitro</i>-Exposition: Stammzellen	31
5.2.5	<i>In-vivo</i>-Exposition	32
5.3	Zusammenfassung und Diskussion	33
6	Genexpression	35
6.1	<i>In-vitro</i>-Exposition	36
6.1.1	Genspezifische Untersuchungen	36
6.1.2	Genomweite Untersuchungen	42
6.2	<i>In-vivo</i>-Exposition	45
6.3	Zusammenfassung und Diskussion	48
7	Zusammenfassende Schlussfolgerungen	50
8	Literaturverzeichnis	61

**Wirkung hochfrequenter Felder auf das Genom:
Genotoxizität und Genregulation**

Stellungnahme der Strahlenschutzkommission

Ausgangslage und Vorgehensweise

Die Möglichkeit einer gesundheitsgefährdenden Wirkung hochfrequenter elektromagnetischer Felder (HF-Felder) wird kontrovers diskutiert. Durch die zunehmende Verbreitung von Technologien, die auf HF-Feldern beruhen, wie dem Mobilfunk, gewinnt diese Frage besondere Bedeutung. Von internationalen Gremien vorgeschlagene Expositionsgrenzwerte und darauf basierende nationale Bestimmungen dienen dem Zweck, wissenschaftlich nachgewiesene gesundheitliche Beeinträchtigungen auszuschließen. Diese Grenzwerte gründen auf wissenschaftlichen Untersuchungen der Wechselwirkungen biologischer Systeme mit HF-Feldern und werden regelmäßig überprüft. Die Strahlenschutzkommission (SSK) hat im Jahre 2001 eine ausführliche Bewertung der in diesem Zusammenhang relevanten wissenschaftlichen Literatur vorgenommen und eine Empfehlung zu „Grenzwerten und Vorsorgemaßnahmen zum Schutz der Bevölkerung vor elektromagnetischen Feldern“ veröffentlicht [SSK, 2001]. Gestützt auf die Unterscheidung zwischen „wissenschaftlichem Nachweis“¹, „wissenschaftlich begründetem Verdacht“² und „wissenschaftlichem Hinweis“³ kam die SSK 2001 zu dem Schluss, „dass auch nach Bewertung der neueren wissenschaftlichen Literatur keine neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse im Hinblick auf nachgewiesene Gesundheitsbeeinträchtigungen vorliegen, die Zweifel an der wissenschaftlichen Bewertung aufkommen lassen, die den Schutzkonzepten der ICNIRP bzw. der EU-Ratsempfehlung zugrunde liegt“.

Seit 2001 ist eine Vielzahl von Publikationen erschienen, die eine neuerliche Bewertung durch die SSK notwendig gemacht hat. In einigen der Arbeiten wird über Beeinflussungen der genetischen Information durch HF-Felder auch unterhalb der geltenden Grenzwerte berichtet. Diese Publikationen haben starkes Medieninteresse gefunden und zur Beunruhigung in der Bevölkerung geführt. In der hier vorliegenden Stellungnahme wird der gegenwärtige Stand der Wissenschaft auf dem angesprochenen Gebiet erneut bewertet. Die Wertungen beruhen weitgehend auf einer kritischen Beurteilung der Literatur in wissenschaftlichen Fachzeitschriften mit Gutachterverfahren („Peer Reviewed“). In Einzelfällen wurde aus Gründen der Aktualität von diesem Prinzip abgewichen und auch auf andere dokumentierte Quellen eingegangen. Dies betrifft die Forschungsberichte der REFLEX- und der PERFORM B-Studie, die erst teilweise wissenschaftlich publiziert sind.

Die vorliegende Stellungnahme bezieht sich auf die Frage, ob hochfrequente elektromagnetische Felder von Funkanwendungen, wie Rundfunk oder Mobilfunk, bei Feldstärken unterhalb der Grenzwerte Veränderungen im Genom und/oder der Genexpression (Genregulation) induzieren können. Es wurde die vorliegende wissenschaftliche Literatur berücksichtigt, wobei zur Bewertung älterer Arbeiten sowohl auf zusammenfassende wissenschaftliche Arbeiten als auch auf die Empfehlung der SSK aus dem Jahr 2001 zurückgegriffen wurde, in der Arbeiten zur Genotoxizität und Genexpression bis 2000 behandelt worden sind. Die damalige Bewertung lautete: „Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Untersuchungen zu krebsrelevanten Proteinen, Krebsentstehung und Krebspromotion ein sehr uneinheitliches Bild liefern. Inwieweit die einzelnen und nicht reproduzierten Hinweise eine

¹ **Wissenschaftlich nachgewiesen** ist ein Zusammenhang zwischen einer Gesundheitsbeeinträchtigung und elektromagnetischen Feldern, wenn wissenschaftliche Studien voneinander unabhängiger Forschungsgruppen diesen Zusammenhang reproduzierbar zeigen und das wissenschaftliche Gesamtbild das Vorliegen eines kausalen Zusammenhangs stützt.

² Ein **wissenschaftlich begründeter Verdacht** auf einen Zusammenhang zwischen einer Gesundheitsbeeinträchtigung und elektromagnetischen Feldern liegt vor, wenn die Ergebnisse bestätigter wissenschaftlicher Untersuchungen einen Zusammenhang zeigen, aber die Gesamtheit der wissenschaftlichen Untersuchungen das Vorliegen eines kausalen Zusammenhangs nicht ausreichend stützt. Das Ausmaß des wissenschaftlichen Verdachts richtet sich nach der Anzahl und der Konsistenz der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeiten.

³ **Wissenschaftliche Hinweise** liegen vor, wenn einzelne Untersuchungen, die auf einen Zusammenhang zwischen einer Gesundheitsbeeinträchtigung und elektromagnetischen Feldern hinweisen, nicht durch voneinander unabhängige Untersuchungen bestätigt sind und durch das wissenschaftliche Gesamtbild nicht gestützt werden.

Bedeutung für gesundheitliche Beeinflussungen haben, muss durch weitere Forschungen geklärt werden.“ Neuere Arbeiten zu diesem Fragenkomplex sind in der hier anhängenden wissenschaftlichen Begründung referiert und in den folgenden Themenblöcken zusammengefasst.

Expositionseinrichtungen

Die technische Weiterentwicklung von Expositionseinrichtungen und dosimetrischen Verfahren hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Die verbesserte dosimetrische Versuchsplanung hat im Vergleich zu früheren Experimenten zu besser definierten und homogeneren Expositionen im Präparat geführt. Die derzeit gebräuchlichen Expositionseinrichtungen für Versuche an Zellen sind meist Wellenleiter. Wellenleiter mit stehenden Wellen erlauben die Erzeugung von Feldstärken im Bereich der Grenzwerte mit geringem technischem Aufwand. Die Verbesserungen haben das Artefaktrisiko verringert, so dass die meisten neueren Untersuchungen unter besser kontrollierten und reproduzierbareren Feldverhältnissen ausgeführt wurden.

Genotoxizität

Für die Untersuchung biologischer Effekte auf zellulärer Ebene wird neben den klassischen zytogenetischen Techniken, wie Bestimmungen der Chromosomenaberrationen und von Mikrokernen, zunehmend auch das Verfahren des „Comet-Assays“ eingesetzt, das allerdings wesentlich empfindlicher für Artefakte ist. Einige Mutationstests, die in der Toxikologie etabliert sind, werden jedoch zur Testung der Wirkung von HF-Feldern kaum eingesetzt. Generell ist auch bei neueren Arbeiten die fehlende Stringenz bei der Versuchsplanung zu beanstanden, bei keinem Untersuchungsobjekt sind alle in der Toxikologie üblichen (und dort auch vorgeschriebenen) Verfahren eingesetzt worden.

Eine Gesamtbewertung der Arbeiten zur Induktion von DNA-Schäden durch HF-Felder ist wegen der Vielzahl der verwendeten Untersuchungsobjekte und -methoden erschwert. In den meisten Studien wurden keine genotoxischen Effekte gefunden. Die wenigen positiven Befunde sind zum Teil widersprüchlich und fügen sich nicht zu einem systematischen Gesamtbild. Auf Grund dieser unklaren wissenschaftlichen Hinweise kommt unabhängigen Replikationsversuchen eine besondere Bedeutung zu. Diese sind allerdings nur in wenigen Fällen durchgeführt worden. Wo dies geschah, konnten die ursprünglichen positiven Befunde nicht bestätigt werden. Es kann somit festgestellt werden, dass ein wissenschaftlich begründeter Verdacht für eine DNA-Schädigung durch HF-Felder nicht vorliegt.

Eine weitere Klärung und Absicherung ist nur durch sorgfältig geplante Programme möglich, bei denen verschiedene Zellarten und parallel mehrere Versuchsparameter systematisch in mehreren kompetenten Labors untersucht werden. Die bisherige Praxis erfüllt diese Anforderungen in der Regel nicht.

Genregulation

Die Zahl der Untersuchungen zur Genregulation hat in dem Zeitraum nach dem Jahr 2000 deutlich zugenommen. Positive Befunde aus der Literatur vor 2000 zur Aktivierung der Ornithindecarboxylase, einem Marker der Zellvermehrung, wurden kürzlich widerlegt. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren Aspekte untersucht, die vorher nicht so sehr im Mittelpunkt des Interesses standen. Hier sind besonders die Nachweise von „Heat Shock“-

Proteinen und des programmierten Zelltods (Apoptose) zu nennen. Bei der Auswertung der vorliegenden Literatur zeigte sich, dass bezüglich einer Induktion von „Heat Shock“-Proteinen die überwiegende Mehrheit der Ergebnisse negativ war. Erste Replikationen der wenigen positiven Befunde haben zu keiner Bestätigung geführt. Auch die Untersuchungen zur Apoptose waren fast ausnahmslos ohne positiven Befund. Die wenigen positiven Ergebnisse waren in sich nicht konsistent. Daher ergibt sich kein wissenschaftlich begründeter Verdacht auf eine Induktion von „Heat Shock“-Proteinen oder eine Beeinflussung der Apoptose durch HF-Felder.

Bei den Studien zur Genregulation wurden meist die etablierten Standardtechniken benutzt, die nur die Untersuchung einzelner Gene erlauben. Die moderneren Methoden zur Untersuchung der RNA wie Mikroarrays oder zur Untersuchung des Proteoms wurden nur selten verwendet. Die Technik ist noch neu und die Durchführung sowie die statistische Analyse zum Teil mit methodischen Mängeln behaftet, so dass die Ergebnisse noch keine klaren Aussagen zulassen und daher bei der weiteren Bewertung nur eine untergeordnete Rolle spielen. Obwohl in der Anwendung dieser Verfahren ein großes Potential liegt, den Einfluss von HF-Feldern auf die Genexpression zu untersuchen, muss darauf hingewiesen werden, dass die Möglichkeit von falsch positiven Ergebnissen hier aufgrund der großen Zahl von Variablen besonders hoch ist und daher zusätzlicher Aufwand zur Bestätigung mit anderen Methoden erforderlich ist.

Zusammenfassung

Aufgrund der Auswertung der wissenschaftlichen Literatur bis Oktober 2006 stellt die SSK fest:

- Auch aus der neueren Literatur ergibt sich kein wissenschaftlich begründeter Verdacht auf eine genotoxische Wirkung von HF-Feldern.
- Auch aus der neueren Literatur ergibt sich kein wissenschaftlich begründeter Verdacht auf einen Einfluss von HF-Feldern auf die Genregulation.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien geben daher insgesamt keinen Anlass, von einer gesundheitsgefährdenden Wirkung hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf das Genom auszugehen und die geltenden Grenzwerte in Frage zu stellen.

Literatur

Strahlenschutzkommission: Grenzwerte und Vorsorgemaßnahmen zum Schutz der Bevölkerung vor elektromagnetischen Feldern, Empfehlung der Strahlenschutzkommission mit wissenschaftlicher Begründung, Berichte der SSK, Heft 29, Urban & Fischer, München, Jena 2001

**Wirkung hochfrequenter Felder auf das Genom:
Genotoxizität und Genregulation**

Wissenschaftliche Begründung
zur Stellungnahme der Strahlenschutzkommission

1 Fragestellung

1.1 Charakterisierung der Ziele und die zugehörigen Definitionen

Ziel der vorliegenden wissenschaftlichen Begründung ist die Beurteilung der möglichen Interaktion von Hochfrequenz (HF) -Feldern mit dem Genom. Dies könnte indirekt über eine Regulation der Genexpression (Genregulation) oder direkt über strukturelle Veränderungen am Genom (Genotoxizität) erfolgen. Veränderungen der Genregulation führen zu einer Verschiebung der quantitativen Zusammensetzung zellulärer Proteine und damit zu einem veränderten Phänotyp der betroffenen Zellen. Auf diesem Wege könnten HF-Felder Zellen sowohl physiologisch beeinflussen als auch pathologische Prozesse auslösen. Interaktionen von HF-Feldern mit der DNA könnten diese schädigen und somit zu genotoxischen Effekten führen. DNA-Schäden werden von zellulären Reparaturmechanismen weitgehend behoben. Einwirkungen auf Reparaturverläufe können daher die Ausprägung von dauerhaften DNA-Veränderungen begünstigen. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung des Genoms ist die Störung der Verteilung der Chromosomen bei der Zellteilung (Aneuploidie).

Die hier kurz beschriebenen zellulären Veränderungen können direkt (genotoxische Effekte, mutationsbedingte Veränderungen der Genexpression) oder indirekt (über nicht mutationsbedingte Beeinflussung der Genexpression) zur Kanzerogenese beitragen. Deshalb werden in der vorliegenden Studie sowohl direkte als auch indirekte Wirkungen von HF-Feldern auf das Genom betrachtet.

1.2 Vorgehensweise und Auswahlkriterien

Die vorliegende Stellungnahme der Strahlenschutzkommission baut auf der Empfehlung der SSK aus dem Jahr 2001 auf und aktualisiert sie auf dem Gebiet der Genotoxizität und Genregulation durch die Einbeziehung seither erschienener wissenschaftlicher Arbeiten. In den letzten Jahren haben sechs sehr ausführliche Übersichtsartikel die Literatur zur genotoxischen Wirkung von HF-Feldern zusammengefasst [Heynick et al., 2003; Meltz, 2003; Vijayalaxmi und Obe, 2004; Dasenbrock, 2005; Moulder et al., 2005; Verschaeve, 2005], daher wird hier nur die Literatur ab 2004 einzeln dargestellt.

Im Prinzip wurden nur Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften mit einem Gutachterverfahren (Peer Review), die bis zum Herbst 2006 erschienen sind, berücksichtigt. Zwei innerhalb des fünften Rahmenforschungsprogramms der Europäischen Union erstellte Forschungsvorhaben, nämlich REFLEX (Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards From Low Frequency Electromagnetic Field Exposure) und PERFORM B, die die Fragestellungen dieser Empfehlung direkt betreffen, wurden aus Gründen der Aktualität mit aufgenommen, obwohl sie noch nicht vollständig in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert worden sind. Die Strahlenschutzkommission hat zusätzlich die Mitglieder des REFLEX-Konsortiums zu einer Tagung nach Bonn vom 20.-21.09.2005 eingeladen. Die im Verlauf dieser Tagung diskutierten Befunde des REFLEX-Konsortiums sind mit in die Stellungnahme eingeflossen. Während die REFLEX-Studie z. T. neue Fragestellungen bearbeitet hat, war es Ziel von PERFORM B, positive Befunde aus der Literatur, die auf mögliche Gesundheitsrisiken durch HF-Felder hinweisen könnten, zu reproduzieren.

1.3 Wirkungskette und Interaktionsmechanismen

Das Interesse an genotoxischen Wirkungen hat einen grundlagenwissenschaftlichen und einen angewandten Aspekt. Letzterer ist primär durch die möglichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit begründet. Mutationen in der Keimbahn können zu erblich bedingten

Krankheiten bei den Nachkommen führen, in somatischen Zellen können sie Ausgangspunkt für die Entstehung von Tumoren sein.

Krebs ist eine Krankheit, die darauf zurückgeführt werden kann, dass es in einzelnen Körperzellen über einen Zeitraum von Jahren zu einer Akkumulation verschiedenster Mutationstypen kommt. Genmutationen, Aneuploidie und strukturelle Chromosomenaberrationen wie Translokationen können dazu führen, dass die betroffene Zelle keiner Zellzykluskontrolle und keiner Kontaktinhibition mehr unterliegt. Primär für die Entstehung von Tumoren ist somit die Induktion von Mutationen.

Die meisten karzinogenen Agenzien haben sich in entsprechenden Testsystemen als mutagen erwiesen, das gilt sowohl für Gen- als auch für Chromosomenmutationen. Zytogenetische Tests werden weltweit zum Nachweis mutagener Wirkungen verwendet. Hierbei wird unter Einsatz entsprechender Zellsysteme untersucht, ob ein Agens zu genotoxischen Effekten wie Veränderungen im „Comet-Assay“, Chromosomenaberrationen (CA⁴), Schwesterchromatid-austauschen (SCE⁵) oder Mikrokernen (MN⁶) führt.

Die Karzinogenese erstreckt sich über einen langen Zeitraum und kann durch verschiedene Phasen charakterisiert werden. Am Beginn steht die Initiation oder (neoplastische) Transformation. Auslöser dieses Prozesses ist entweder eine Veränderung der genetischen Information oder eine dauerhafte Veränderung ihrer Expression (z. B. Aktivierung von normalerweise supprimierten Genen). Hierdurch verliert die Zelle die Eigenschaft, auf die Gewebsregulation zu reagieren (z. B. Kontaktinhibition) und erhält die Fähigkeit zu unkontrollierter Proliferation. Der Transformationsprozess kann durch genotoxische Einflüsse ausgelöst werden, jedoch führen durch sie hervorgerufene Schäden an der DNA nicht unmittelbar zur Tumorinitiation. Alle Zellen können nur überleben, wenn sie über ein intaktes System der intrazellulären Informationsverarbeitung verfügen. In der Regel führen DNA-Läsionen in unmodifizierter Form zum Zelltod, wenn nicht durch ein Reparatursystem die funktionelle DNA-Struktur wiederhergestellt wird. Dabei auftretende Fehler („Misrepair“) können zu Mutationen führen und Ausgangspunkt für eine neoplastische Transformation sein.

Änderungen der Genregulation, die nicht auf Mutationen beruhen, werden als „epigenetisch“ bezeichnet. Die zugrundeliegenden Vorgänge sind nicht mit denen von „Co-Karzinogenen“ zu verwechseln. Als solche werden Stoffe oder Einwirkungen bezeichnet, welche die Wirkung transformierender Einflüsse verstärken oder sie erst ermöglichen, z. B. durch Inhibierung von Reparaturprozessen.

Transformierte Zellen besitzen zwar das Potential zu unkontrollierter Proliferation, aber erst weitere mutationsbedingte Schritte führen zu lokalem verdrängendem Wachstum (Promotion). Den Übergang zu einer metastasierenden Ausbreitung bei soliden Tumoren bezeichnet man als Progression.

Welche externen Einflüsse bei den verschiedenen Stadien eine Rolle spielen, ist nur teilweise bekannt: UV-Strahlen, ionisierende Strahlen und eine große Zahl von Chemikalien können die Initiation bewirken. In Bezug auf die Promotion ist eine Wirkung nur bei wenigen Chemikalien nachgewiesen, ein Einfluss ionisierender Strahlen ist umstritten. Im Hinblick auf die Progression gibt es dagegen kaum gesicherte Erkenntnisse über den Einfluss exogener Faktoren.

⁴ CA: Chromosome Aberration

⁵ SCE: Sister Chromatid Exchange

⁶ MN: Mikronuclei

2 Einschätzung verwendeter Methoden und Modellsysteme

Untersuchungen zu genotoxischen Wirkungen von HF-Feldern wie auch Experimente zur Interaktion von HF-Feldern mit Mechanismen der Genregulation sind mit verschiedenen Methoden an unterschiedlichsten Modellsystemen durchgeführt worden. Kritische Beurteilungen der publizierten Ergebnisse sind nur bei Kenntnis der Aussagekraft der eingesetzten Methoden und Modellsysteme möglich. Diese werden deshalb im Folgenden kurz beschrieben.

2.1 Expositionseinrichtungen und Dosimetrie

Verlässliche Expositionseinrichtungen sind für die Durchführung von biologischen Experimenten an Zellen, Pflanzen, Tieren oder Menschen im Rahmen von Untersuchungen zu möglichen Wirkungen von HF-Feldern unabdingbare Voraussetzung. In einer Expositionseinrichtung wird das Testobjekt unter möglichst kontrollierten Bedingungen einem HF-Feld ausgesetzt. Zuverlässige Einrichtungen zur kontrollierten Exposition sind zur Durchführung qualitativ hochwertiger Experimente von entscheidender Bedeutung, erfordern jedoch einen erheblichen Entwicklungsaufwand. Sogar höchstrangig publizierte Ergebnisse mussten schon wegen fehlerhafter Exposition widerrufen werden ([de Pomerai et al., 2000], widerrufen in [Dawe et al., 2006]; vgl. Kap. 6.2).

Eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung einer Expositionseinrichtung spielt die Dosimetrie, d. h. eine exakte Bestimmung der in das Untersuchungsobjekt eingekoppelten elektromagnetischen Felder. Im Hochfrequenzbereich wird als dosimetrische Größe vorrangig die spezifische Absorptionsrate (SAR) verwendet. Diese beschreibt die absorbierte Leistung pro Körpermasse in W/kg.

Folgende Richtlinien sind bei der Konzipierung von Expositionseinrichtungen nach dem aktuellen Stand der Technik zu beachten:

- Das Testvolumen muss ausreichend groß sein. Hier spielt einerseits die Größe der Untersuchungsobjekte, im Fall von Tieren auch deren freie Beweglichkeit, eine Rolle. Andererseits erfordert die Ausbildung der gewünschten elektromagnetischen Feldeigenschaften, also beispielsweise eines definierten Wellen- oder Resonanztyps, die Einhaltung von Vorgaben bezüglich geometrischer Mindest- oder Maximalabmessungen.
- Die Einrichtung muss gegenüber äußeren elektromagnetischen Feldern ausreichend abgeschirmt sein. Anderenfalls kann nicht beurteilt werden, ob eine beobachtete Wirkung tatsächlich durch die beabsichtigte Exposition oder durch äußere Feldeinflüsse hervorgerufen wurde.
- Die Verteilung der Expositionsfelder am und im Präparat muss eindeutig definierbar sein. Nur bei einer exakten dosimetrischen Charakterisierung ist eine Interpretation der Untersuchungsergebnisse möglich. Hierzu werden meist sehr aufwändige numerische Feldberechnungen durchgeführt, die durch Messungen unterstützt werden können. In den Simulationen müssen auch Präparathalterungen und ähnliches berücksichtigt werden.
- Zu einer definierten Exposition gehört ferner, dass im Bereich des Untersuchungsobjektes eine möglichst homogene Feldverteilung vorliegt. Bei zu großen örtlichen Variationen ist die Exposition nicht mehr eindeutig bestimmbar und die Aussagekraft des Versuchs stark eingeschränkt. Ein gewisser Grad an Inhomogenität ist jedoch unvermeidbar; er beträgt beispielsweise bei derzeit verfügbaren *in-vitro*-Expositionseinrichtungen nach dem

Resonatorprinzip immer noch 30-40% (bezogen auf die SAR, Frequenz 1800 MHz). Bei bestimmten Anwendungen kann aber auch eine zielgerichtete Inhomogenität gewünscht sein, um nur ein bestimmtes Körperteil, z. B. den Kopf eines Tieres, zu exponieren.

- In einem global inhomogenen Expositionsfeld lässt sich die Homogenität über das Präparat verbessern, wenn man es im Bereich einer lokalen Homogenität reproduzierbar mit geeigneten Halteinrichtungen fixiert.
- Für die Exposition von Tieren oder Menschen, aber auch von Zellen ist es wichtig, optimale Umweltbedingungen zu gewährleisten. Das betrifft Faktoren wie Licht/Dunkelheit, O₂/CO₂, Ernährung und Temperatur. Konstante Temperaturverhältnisse während der Exposition sind besonders wichtig. Kühleinrichtungen wie Ventilatoren oder ähnliches können hier eingesetzt werden, wobei Zügeffekte unbedingt zu vermeiden sind. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass aktive Kühlung im Testobjekt vorhandene Temperaturgradienten unter Umständen noch vergrößern kann.
- Wichtige physikalische Parameter, wie Temperatur oder Feldstärke, müssen während der Exposition kontinuierlich überwacht werden, um den Zustand des Testobjekts einschätzen zu können.

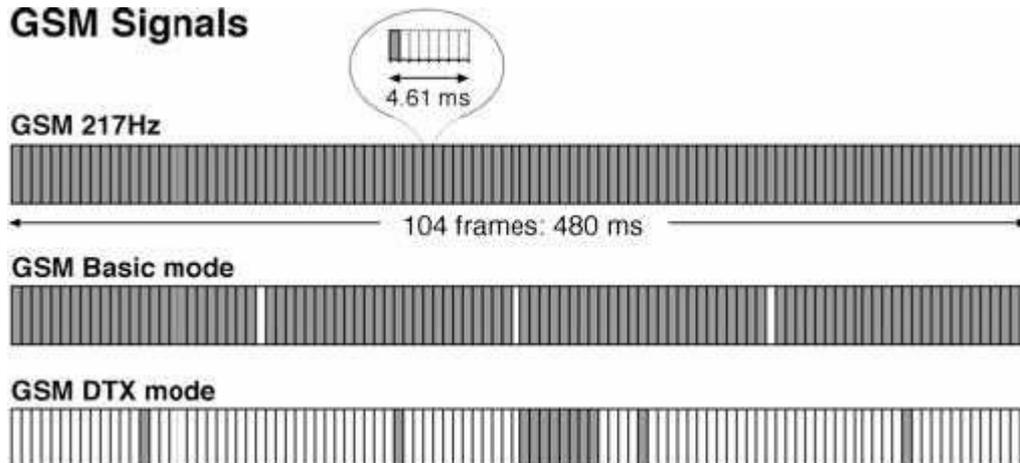
Zu einer optimalen Versuchsdurchführung gehört weiterhin, dass die Experimente eine scheinexponierte Kontrollgruppe enthalten und verblindet durchgeführt werden, d. h., dass zwei identische Expositionseinrichtungen mit Testobjekten beschickt werden, von denen aber nur in einer tatsächlich ein HF-Feld erzeugt wird. Beide Expositionseinrichtungen müssen, abgesehen vom HF-Feld, identische Umweltbedingungen aufweisen; dies ist oftmals nur durch räumliche Nähe zu gewährleisten. Vor und während der Anwendung des HF-Feldes und der Auswertung darf das Untersuchungspersonal nicht wissen, welche Proben exponiert und welche scheinexponiert wurden, da dies die Gefahr einer subjektiven Einflussnahme auf das Untersuchungsergebnis birgt.

Die Expositionseinrichtung ist mit einer Signalquelle zu verbinden, die Signale genau desselben Typs oder generische Signale der Art erzeugt, wie sie für die zu untersuchende Feldquelle typisch sind (Signalform, Bandbreite usw.).

In den letzten Jahren wurden häufig Signalformen eingesetzt, die auf dem GSM-Mobilfunkstandard aufbauen und „Handy-Signale“ nachbilden. Daher sollen hier diese Signale etwas genauer besprochen werden.

- Beim GSM-217 Hz-Signal ist eine Sekunde in 217 gleichlange Zeitabschnitte (Zeitraumen) von 4,61 ms aufgeteilt. Innerhalb eines jeden Zeitrahmens wird für 0,576 ms (also 1/8 der Zeit) das hochfrequente Sendesignal angeschaltet, dies entspricht einem „Duty Cycle“ von 1:8. Somit ergibt sich ein mit 217 Hz (niedrigfrequent) gepulstes Hochfrequenzsignal. Das Verhältnis zwischen SAR im Sendepuls zur zeitlich gemittelten SAR beträgt 8 (Crestfaktor).
- Beim GSM-Basic-Signal ist jeder 26. Zeitrahmen des GSM-217 Hz-Signals inaktiv. Dies repräsentiert die Signalstruktur beim Sprechen. Der Crestfaktor beträgt 8,3.
- Der GSM-DTX-Mode (Discontinuous Transmission) ist während Sprechpausen aktiv. Um die Batterie des Mobiltelefons zu schonen, werden nur sehr wenige Rahmen gesendet. Der Crestfaktor ist hier 69,3.
- GSM-Talk ist eine Mischung aus GSM-Basic (Sprechbetrieb) und GSM-DTX (Sprechpause) und bildet ein typisches Telefonat nach. Für das Beispiel eines Telefonats mit 11 s Sprechen und 5 s Zuhören ist der Crestfaktor 11,9.

GSM Signals



Quelle: Perform B Final Report, November 2004, Part 5

Bei der Interpretation der Untersuchungsergebnisse ist zu beachten, dass sich die Angabe der Exposition (z. B. als SAR-Wert) oft auf einen zeitlichen Mittelwert bezieht. Bei Signalen, die einen großen Unterschied zwischen Maximalwert und zeitlichem Mittelwert aufweisen, können kurzzeitig auch wesentlich höhere SAR-Werte im Untersuchungsobjekt vorliegen. Beispiele für solche Signalformen sind Radar- und UMTS-Signale, aber auch GSM-Mobilfunksignale. Beim GSM-DTX-Mode ist, wie oben beschrieben, das Verhältnis zwischen SAR im Zeitschlitz und mittlerer SAR 69,3. Unter experimentellen Bedingungen würde daher die Applikation einer mittleren SAR von 1 W/kg bedeuten, dass während des kurzen Zeitschlitzes eine SAR von 69,3 W/kg vorläge, die bei weitem über der SAR liegt, die ein Mobiltelefon bei höchster Leistungsstufe in den Kopf des Telefonierenden einbringen kann.

Je nach technischen und biologischen Anforderungen an eine Exposition, also z. B. Frequenzbereich, Feldart, Feldverteilung oder auch Größe der zu exponierenden Testobjekte, werden unterschiedliche Expositionseinrichtungen eingesetzt. Die derzeit gebräuchlichen Expositionseinrichtungen können in offene und geschlossene Systeme untergliedert werden, in denen die zur Exposition benötigte elektromagnetische Feldenergie über eine Antenne in den Raum abgestrahlt oder in einem Wellenleitersystem geführt wird.

Offene Expositionseinrichtungen, bei denen die Energie in den Raum abgestrahlt wird, dienen zur Exposition vergleichsweise großer Testobjekte im Fernfeld einer Strahlungsquelle. Im Fernfeld stehen elektrisches und magnetisches Feld senkrecht aufeinander und sind senkrecht zur Ausbreitungsrichtung orientiert. Man spricht von einer transversal-elektromagnetischen (TEM) Welle. Das Untersuchungsobjekt befindet sich meistens im Abstand von einigen Metern Entfernung zur Antenne. Definierte Fernfelder sind unter Laborbedingungen nur sehr eingeschränkt erzeugbar, weswegen die Mehrzahl der derzeit verwendeten Expositionseinrichtungen auf Wellenleitersystemen beruht.

Hierbei wird die elektromagnetische Energie in Röhren mit rechteckigem oder rundem Querschnitt, so genannten Wellenleitern, zum Präparat geführt. Bei komplett metallisch umrandeten Wellenleitern wird automatisch eine Abschirmung gegenüber äußeren elektromagnetischen Feldern sowie eine Vermeidung der Abstrahlung des im Wellenleiter geführten Feldes nach außen erreicht.

Bei Wellenleitern unterscheidet man solche mit und ohne Innenleiter. In Wellenleitern mit einem Innenleiter breiten sich TEM-Wellen aus. Ein Beispiel hierfür sind TEM-Zellen, in

denen eine Fernfeldexposition (also z. B. Exposition der Allgemeinbevölkerung durch Basisstationen) nachgebildet werden kann.

Gegenüber TEM-Wellenleitern sind in Wellenleitern ohne Innenleiter, so genannten Hohlleitern, nur TE- (transversal-elektrische) oder TM- (transversal-magnetische) Wellentypen ausbreitungsfähig. Hierbei besitzt entweder die magnetische Feldstärke (TE-Wellentyp) oder die elektrische Feldstärke (TM-Wellentyp) eine Komponente in Ausbreitungsrichtung. Es handelt sich um inhomogene Feldstrukturen, deren Feldmuster wesentlich von der Frequenz abhängen.

Wird die Energie an einem Ende des Hohlleiters eingespeist und das andere Ende mit einem passenden Wellenwiderstand oder einem Absorber abgeschlossen, so breitet sich in seinem Inneren eine fortschreitende Welle aus. Ist der Wellenleiter jedoch am Ende mit einer Metallplatte „kurzgeschlossen“, wird die elektromagnetische Welle reflektiert, läuft wieder zum Eingang des Wellenleiters zurück und überlagert sich mit der hinlaufenden Welle zu einer stehenden Welle.

Die Überhöhungen der elektrischen oder magnetischen Feldstärken in den Wellenbäuchen der stehenden Welle werden bei aktuell eingesetzten Expositionseinrichtungen zielgerichtet verwendet, um mit vergleichsweise geringen Signaleingangsleistungen in den am Ort der Maxima platzierten Präparaten vergleichsweise hohe SAR-Werte erreichen zu können. Ein Beispiel hierfür sind die im REFLEX-Projekt verwendeten Expositionseinrichtungen. Zur möglichst effizienten Einkopplung der eingespeisten Leistung werden Zellsuspensionen in die Maxima der elektrischen Feldstärke und Zellmonolayer in die Maxima der magnetischen Feldstärke platziert [Schönborn et al., 2000; Schuderer et al., 2004a; 2004b].

Die Maxima sind, sofern elektrische bzw. dielektrische Verluste im Hohlleiter minimal sind, in der Regel scharf örtlich abgegrenzt und erfordern eine sehr sorgsame und reproduzierbare Platzierung der Präparate. Geringe Positionsänderungen der Präparate, aber auch deren mengenmäßige Variationen durch unterschiedliche Befüllung oder Verdunstung des Kulturmediums verändern die Lage der Feldmaxima und der dort herrschenden Amplituden und damit auch die Größe und Homogenität der erzielbaren SAR im Bereich des Präparates. Noch kritischer bezüglich Platzierung und Belastung sind Wellenleitungen, die auf beiden Seiten kurzgeschlossen sind und deswegen als Resonatoren betrieben werden.

Wellenleiter mit durchlaufenden Wellen hingegen sind gegenüber Fehlpositionierungen oder Befüllungsvariationen wesentlich weniger empfindlich, benötigen allerdings zum Erreichen von SAR-Werten in der Größenordnung der Grenzwerte erheblich höhere Leistungen, die sehr teure Verstärker notwendig machen.

Eine weitere häufig eingesetzte Expositionsapparatur ist die radiale Wellenleitung, die aus zwei kreisförmigen, parallel angeordneten Metallplatten besteht. Die im Zentrum platzierte Antenne regt Wellen an, die sich in radialer Richtung ausbreiten. Je nach Abstand zwischen den Metallplatten eignet sich eine radiale Wellenleitung für *in-vitro*- oder *in-vivo*-Expositionen.

2.2 Zellen und Kulturbedingungen

2.2.1 Primäre Zellen

Kulturen teilungsfähiger primärer Zellen werden durch die Isolation von Zellen aus Geweben gewonnen. Diese Zellen sind in der Regel differenziert, frei von genetischen Veränderungen und zeigen *in vitro* eine begrenzte Teilungsfähigkeit.

Hierher gehören z. B. periphere menschliche Lymphozyten, die *in vitro* zur Teilung angeregt werden können und deshalb häufig für zytogenetische Studien eingesetzt werden. Allerdings sterben menschliche Lymphozyten *in vitro* schon nach wenigen Zellteilungen ab.

Primäre Zellen etwa aus Hautstanzen (Fibroblasten) oder Operationsmaterial können deutlich länger kultiviert werden als Lymphozyten. Sie sterben nach etwa 40 Zellteilungen ab. Allerdings können einige Zellen diese Krise überleben und zu permanenten immortalisierten Zellen führen (vgl. Kap. 2.2.2 Zelllinien).

2.2.2 Zelllinien

Zelllinien bestehen entweder aus immortalisierten primären Zellen oder aus transformierten Zellen, beide sind nahezu unbegrenzt teilungsfähig.

Immortalisierte Zellen verhalten sich in mancher Hinsicht wie primäre Zellen, sie benötigen Serum, wachsen wie Fibroblasten am Boden der Kulturschalen und stellen das Wachstum ein, wenn sie Nachbarzellen berühren. Diese Kontaktinhibition führt dazu, dass die Zellen einen Zellrasen ausbilden (Monolayer). Es gibt eine Vielzahl derartiger Zelllinien. Immortalisierte Zellen sind keine Krebszellen, sie führen nicht zu Tumoren, wenn sie entsprechenden Versuchstieren injiziert werden, sie sind jedoch im Vergleich zu den Zellen, aus denen sie entstanden sind, genetisch verändert.

Transformierte Zellen sind Zellen aus Tumoren, die eine permanente Teilungsfähigkeit besitzen und darüber hinaus nicht mehr kontaktinhibiert sind. Transformierte Zellen wachsen nicht nur wie Fibroblasten am Boden der Kulturschale, sondern bilden mehrschichtige Aggregate aus abgerundeten Zellen. Hierzu gehören z. B. HeLa-Zellen, die aus einem menschlichen Tumor stammen. Transformierte Zellen können zu Tumoren führen, wenn sie geeigneten Versuchstieren injiziert werden.

Zelllinien werden weltweit für die verschiedensten Untersuchungen eingesetzt und stellen das Hauptpräparat für toxikologische und zytogenetische *in-vitro*-Untersuchungen dar, einige werden hier beispielhaft erwähnt.

Transformierte Linien:

Immunzellen: Humane Leukämien HL-60-Zellen [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Tauber; Lee et al., 2005a], Molt-4-Zellen [Hook et al., 2004a, b], Mono Mac 6 Monocyten [Lantow et al., 2006; Simko et al., 2006], Monozyten U937 [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Lagroye], Erythroid-Zellen [Lantow et al., 2006; Simko et al., 2006]; Maus Makrophagen J774,16 [Hook et al., 2004a].

Fibroblasten: Humane, nicht entartete fetale Lungenfibroblasten IMR-90 [Sakuma et al., 2006]; humane Fibroblasten der Line ES1 [Diem et al., 2005; Speit et al., 2007]; L929 aus C3H Mäusen [European Union, 2004b; Penafiel et al., 1997]; C3H 10T $\frac{1}{2}$ aus C3H-Mäusen [Lagroye et al., 2004b, Whitehead et al., 2006]; V79-Zellen aus chinesischen Hamstern [Speit et al., 2007].

Neuronale Zellen: Humane Neuroblastoma Zellen NB69 [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Trillo], SH-SY5Y [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Lagroye]; humane Gliazelllinien U87 [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Lagroye], MO54 [Tian et al., 2002; Miyakoshi et al., 2005], A172 [Sakuma et al., 2006; Gliazellline der Ratte C6 [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Lagroye].

Endothelzellen: Humane Zelllinie EA.hy929 [European Union, 2004, Arbeitsgruppe Leszczynski, Arbeitsgruppe Lagroye; Leszczynski et al., 2002, 2004; Nylund und Leszczynski, 2004].

2.2.3 Stammzellen

Embryonale und adulte Stammzellen weisen im Gegensatz zu den Zellen aus Linien geringere genetische Veränderungen auf, obwohl sie über eine nahezu unbegrenzte Teilungsfähigkeit verfügen. Darüber hinaus besitzen sie ein uneingeschränktes (totipotente Zellen) oder ein eingeschränktes (pluripotente Zellen) Differenzierungspotential. Embryonale Stammzellen der Maus wurden bei Czyz et al. (2004) und Nikolova et al. (2005) und solche von der Ratte bei der Arbeitsgruppe Trillo im REFLEX-Report [European Union, 2004a] eingesetzt.

2.2.4 Kulturbedingungen

Zellen werden in Gegenwart von Serum in synthetischen Medien in einer kontrollierten Umgebung kultiviert. Unter diesen Bedingungen teilen sich Zellen asynchron. Die Wachstumsrate lässt sich durch Serumkonzentration, Wachstumsfaktoren und die Umgebungsbedingungen beeinflussen. Die Kontrolle des Zellzyklus ist bei experimentellen Analysen an sich teilenden Zellen wünschenswert, jedoch sehr schwierig. Synchronisation gelingt stets nur partiell.

3 Biologische Endpunkte und Methoden

3.1 Genotoxizität

3.1.1 „Comet-Assay“

Der „Comet-Assay“ stellt ein im Prinzip einfaches Verfahren zur Untersuchung von DNA-Veränderungen auf Einzelzellebene dar. Die Zellen werden hierbei nach der Einwirkung der zu untersuchenden Agenzien auf Objektträgern in Agar fixiert und danach lysiert, wobei es zu einer Lockerung der DNA-Protein-Struktur im Chromatin kommt. Anschließend wird nach spezifischer Anfärbung der DNA das Verhalten des verbleibenden Komplexes im elektrischen Feld untersucht und mikroskopisch beobachtet. Dabei zeigen sich kometenartige Formationen, welche dem Verfahren den Namen gegeben haben. Je nach der Stärke der Schädigung ist dabei der „Schweif“ mehr oder weniger ausgeprägt. Die Quantifizierung erfolgt heute meist mit Hilfe der computergesteuerten Bildanalyse, wobei verschiedene Kenngrößen ermittelt werden. Dazu gehören:

- „Tail Factor“: Hierbei werden die Kometen in Gruppen verschiedener Länge eingeteilt, aus denen ein gewichteter Durchschnitt gebildet wird. Diese Methode kann ohne Bildanalyse-Systeme nach visueller Inspektion eingesetzt werden. Die Abgrenzung der verschiedenen Gruppen enthält notwendigerweise ein stark subjektives Element. Aus diesem Grund wird heute meist einem computergestützten Verfahren der Vorzug gegeben.
- „Tail Length“: Entweder wird hier die Schweiflänge in μm oder aber auch das Verhältnis der Schweiflänge zum Durchmesser des Kometenkopfes angegeben.
- „Tail Moment“: Leider ist diese Größe nicht einheitlich und eindeutig definiert, Grundsätzlich basiert sie auf der Bestimmung des DNA-Gehalts im Schweif. Nach einem Vorschlag von Olive et al. (1990) wird die Schweiflänge mit dem DNA-Gehalt im Schweif multipliziert, aber auch andere Definitionen sind gebräuchlich

(weitere Einzelheiten s. [Lee et al., 2004], auch unter <http://www.cometassayindia.org/definitions.htm>).

Eine allgemein akzeptierte Auswertemethodik gibt es noch nicht, so dass ein Vergleich der Arbeiten verschiedener Autoren nicht unmittelbar möglich ist.

Die Ergebnisse eines „Comet-Assays“ hängen von der Behandlung vor der Elektrophorese ab. Unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 13$) wird die Doppelstrangstruktur der DNA aufgelöst, so dass auch Schäden am Einzelstrang eine Rolle spielen. In neutralem Milieu führen vor allem Doppelstrangbrüche zur Kometenausbildung. Aus diesen Gründen wird sehr häufig der „Comet-Assay“ als spezifische Nachweismethode für Einzel- (bei alkalischen Bedingungen) bzw. Doppelstrangbrüche angesehen. Diese Interpretation ist jedoch so nicht zutreffend: Zwar führen Strangbrüche zur Kometenbildung, jedoch ist über den Einfluss anderer primärer Läsionen nur wenig bekannt. Das gesamte Verfahren ist rein empirisch und bedarf deshalb sowohl der Standardisierung als auch (in jedem einzelnen Experiment) der Mitführung von Positivkontrollen (z. B. mit ionisierender Strahlung).

Eine umfassende und kritische Übersicht findet man bei Tice et al. (2000). Methodische Analysen zur Anwendbarkeit des „Comet-Assays“ zum Nachweis strahlungsinduzierter DNA-Schäden wurden von Müller et al. (2004) veröffentlicht.

3.1.2 Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche und Mikrokerne

Chromosomen sind komplexe Strukturen, die hauptsächlich aus DNA und Proteinen (Histone und Nichthiston-Proteine) bestehen. In der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus, also vor Beginn der DNA-Synthesephase (S-Phase), enthalten die Chromosomen jeweils ein durchgehendes DNA-Molekül, das eine wesentliche Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Chromosomenstruktur ist. Während der S-Phase wird die DNA repliziert, und es entsteht ein Chromosom aus zwei Chromatiden, die jeweils ein strukturgleiches DNA-Molekül enthalten. Die beiden Chromatiden werden bis zum Beginn der Anaphase in der Zentromerregion zusammengehalten, bevor sie auf die Zellpole verteilt werden, um als einsträngige Gebilde in die entsprechenden Tochterkerne einzugehen.

Chromosomenaberrationen (CA) sind Veränderungen in der Struktur der Chromosomen, die im Lichtmikroskop analysiert werden. CA entstehen infolge chemischer Veränderungen in der chromosomalen DNA. Die Analyse von CA ist eine weltweit anerkannte Methode, um festzustellen, ob ein Agens mutagen und somit auch karzinogen ist.

Die nach Einwirkung eines Mutagens auftretenden CA-Typen hängen von der molekularen Struktur der DNA-Läsionen und vom Zellzyklusstadium ab, in dem sie induziert wurden. CA entstehen stets als Ergebnis der Fehlreparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB⁷), bei denen beide DNA-Stränge gebrochen sind, wobei die Einzelstrangbrüche (SSB⁸) in den beiden DNA-Strängen wenige Basen voneinander entfernt sein können. „Fehlreparatur“ bedeutet, dass „falsche“ Enden verknüpft werden, die molekularen Mechanismen sind die gleichen wie bei der „richtigen“ Reparatur. DSB werden nur von wenigen Agenzien direkt induziert, hierzu gehören ionisierende Strahlen, Endonucleasen und einige Antibiotika wie Bleomycin. Diese Agenzien induzieren DSB in jedem Stadium des Zellzyklus und führen direkt zu CA. DSB in der G₁-Phase führen zu CA vom Chromosomentyp (etwa dizentrische Chromosomen, Translokationen und Chromosomenbrüche). DSB in der S-Phase ergeben, wenn sie in unreplizierten Bereichen des Chromosoms auftreten, CA vom Chromosomentyp. Werden DSB in bereits replizierten Abschnitten des Chromosoms induziert, entstehen CA vom Chromatidentyp (etwa Chromatidentranslokationen und Chromatidenbrüche). Werden DSB in der G₂-Phase induziert, entstehen ausschließlich CA vom Chromatidentyp. Agenzien dieses Typs induzieren somit in dem Zellzyklusstadium CA, in dem sie eingewirkt haben. Die entstehenden Aberrationsmuster erlauben eine Aussage darüber, in welchem Zellzyklusstadium die Behandlung erfolgte.

⁷ DSB: Double Strand Breaks

⁸ SSB: Single Strand Breaks

Die weitaus meisten chemischen Mutagene, aber auch UV-Strahlen, induzieren keine DSB, wohl aber andere Läsionen in den einzelnen Strängen der DNA (Single Strand Lesions; SSL). SSL können in der S-Phase dann zu DSB führen, wenn sie die DNA-Replikation in den Replikationsgabeln behindern. Die so entstehenden DSB betreffen einen der replizierenden DNA-Stränge und somit eine Chromatide. Es kommt daher zu CA vom Chromatidentyp, auch wenn die Exposition mit dem Mutagen in der G1-Phase erfolgte. Expositionen in der G2-Phase, also nach der DNA-Synthese, führen in der folgenden Mitose nicht zu CA. Agenzien dieses Typs induzieren CA in Abhängigkeit von der S-Phase. Behandlung von Zellen mit einem CA-induzierenden Mutagen in der G1-Phase und Analyse des Aberrationsmusters in der ersten Mitose nach Exposition erlaubt somit eine Aussage über den Wirkungsmechanismus des getesteten Mutagens. In seltenen Fällen können auch SSL in G1 dann zu CA führen, wenn während der Reparatur DSB entstehen, die zu CA „fehlrepariert“ werden. Dieser Effekt kann besonders dann auftreten, wenn die G1-Phase künstlich verlängert wird (Liquid Holding Experimente), oder wenn unter *in-vivo*-Bedingungen beim Menschen periphere Lymphozyten chronisch exponiert werden. CA dieses Typs sind stets mit CA vom Chromatidentyp assoziiert. CA vom Chromosomentyp können nach Induktion von SSL auch dann auftreten, wenn keine Zellzykluskontrolle erfolgt und bereits zweite oder gar dritte Mitosen nach CA-Induktion untersucht werden. Unter derartigen Bedingungen entstehen CA vom Chromosomentyp aus CA vom Chromatidentyp, allerdings sind meist auch CA vom Chromatidentyp vorhanden.

Die hier beschriebenen Zusammenhänge machen deutlich, dass CA-Analysen unter stringenteren experimentellen Bedingungen durchgeführt werden müssen, anderenfalls ist keine sinnvolle Aussage über die erhobenen Ergebnisse möglich. CA müssen in der ersten Mitose nach der Behandlung mit einem Testagens analysiert werden. Die Zellzykluskontrolle kann über den Proliferationsindex nach Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) erfolgen, das, wenn im Überschuss vorhanden, vorwiegend statt Thymidin (T) in die replizierende DNA eingebaut wird. Nach einem Zellzyklus in Gegenwart von BrdU haben alle Chromosomen die Konstitution TB-TB (M1), nach zwei Zellzyklen TB-BB (M2), nach drei Zellzyklen gibt es in einer Mitose zu gleichen Teilen Chromosomen mit der Konstitution TB-BB und BB-BB (M3). Nach einer speziellen Färbung nach Giemsa können die Chromosomen substitutions-typisch angefärbt werden, wobei in M1-Zellen alle Chromosomen dunkel, in M2-Zellen in allen Chromosomen eine Chromatide dunkel und eine hell (differentielle Färbung) und in M3-Zellen 50% der Chromosomen differentiell und 50% durchgehend hell gefärbt sind. CA müssen in M1-Zellen ausgewertet werden, in differentiell gefärbten M2-Zellen können Schwesterchromatidenaustausche (SCE) analysiert werden, die im Mikroskop als Austausch zwischen dunklen und hellen Schwesterchromatidenabschnitten der einzelnen Chromosomen sichtbar sind. SCE entstehen in der S-Phase als Ergebnis eines auf Rekombination beruhenden Reparaturvorgangs.

Soll vermieden werden, dass alle zu untersuchenden Zellen mit BrdU markiert sind, wird jeweils nur eine Kultur mit BrdU exponiert. Wenn nach einer entsprechenden Fixierungszeit nicht mehr als 10% M2-Zellen vorhanden sind, kann man davon ausgehen, dass die in den nicht mit BrdU exponierten Zellen erhobenen Ergebnisse nicht durch Zellzyklusprobleme verfälscht sind. Die Häufigkeiten von M1, M2 und M3 können auch zur Kalkulation eines Proliferations- oder Replikations-Indexes verwendet werden.

Bei der Bestimmung des Mitoseindex (MI) wird die Anzahl mitotisch aktiver Zellen in einer Zellpopulation gezählt und zu der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen in Beziehung gesetzt.

Wenn sich Zellen mit CA teilen, können zentromerlose Fragmente nicht aktiv in die Tochterkerne gelangen und bleiben im Zytoplasma zwischen den entstehenden Kernen liegen. Derartige Fragmente umgeben sich wie die Hauptkerne mit einer Membran und sind als

kleine Kerne sichtbar, die Mikrokerne (MN⁹) genannt werden. Auch Verteilungsstörungen intakter Chromosomen können dazu führen, dass diese nicht in die Tochterkerne gelangen und sich ebenfalls mit einer eigenen Kernmembran umgeben. MN mit Chromosomenfragmenten können von solchen mit ganzen Chromosomen nur dann unterschieden werden, wenn die Zentromeren angefärbt werden. Zentromer positive MN enthalten mit hoher Wahrscheinlichkeit ganze Chromosomen, es könnte sich aber auch um zentromerhaltige Fragmente handeln. MN sind ein unspezifischer Hinweis darauf, dass CA vorgelegen haben. Bei Tests auf MN muss sichergestellt werden, dass zweite Interphasen nach Induktion der CA erfasst werden (CA entstehen in der ersten Interphase nach Behandlung, MN bilden sich in der darauf folgenden Anaphase und werden in der folgenden Interphase sichtbar). Damit auch tatsächlich das richtige Stadium untersucht wird, werden die Zellen nach dem ersten Zellzyklus nach CA-Induktion mit Cytochalasin B behandelt, das die Zellteilung, nicht aber die Kernteilung, blockiert. Es resultieren zweikernige Zellen, in denen MN leicht analysiert werden können. In Kulturen, die nach diesem Vorgehen präpariert wurden, finden sich ein-, zwei-, drei- und vierkernige Zellen. MN werden nur in zweikernigen Zellen analysiert. Drei- und vierkernige Zellen resultieren aus mitotischen Teilungen zweikerniger Zellen, wobei sich manchmal nur ein Kern teilt. Aus den Häufigkeiten mehrkerniger Zellen wird der „Cytokinesis-Block-Proliferationsindex“ bestimmt.

Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche (SCE) und Mikrokerne sind auch nach Expositionen des Menschen *in vivo* nachweisbar. Hierzu werden in Blutkulturen exponierter Personen die Lymphozyten zur Zellteilung angeregt (meist mit Phytohämagglutinin). Die mitotischen Chromosomen werden dann im Hinblick auf CA und SCE analysiert, MN werden in zweikernigen Zellen erfasst. Bei Labornagetieren wie Mäusen und Ratten können CA, SCE und MN in mitotisch aktiven Zellen des Knochenmarks analysiert werden. Eine weit verbreitete Methode zum Nachweis von MN bei Kleinsäugetieren beruht auf der Analyse von polychromatischen Erythrozyten (PCE) im Knochenmark. PCE sind Vorstufen roter Blutzellen, die ihren Zellkern bereits verloren haben. Wenn während der mitotischen Teilung der Vorläuferzellen der Erythrozyten (Erythroblasten) MN aufgetreten sind, werden sie nicht wie der Hauptkern aus den Zellen entfernt. Sie sind im Mikroskop als kleine Kerne in den sonst kernlosen PCE erkennbar. Neben Giemsa-basierten Färbungen, können auch fluoreszierende Farbstoffe zum Nachweis dieser MN eingesetzt werden. Eine ausführliche Beschreibung der Methoden zum Nachweis von MN findet sich bei Müller und Streffer (1994).

3.1.3 Mutationstests

Ein weit verbreiteter Test auf Mutagenität wurde schon vor vielen Jahren von Bruce Ames entwickelt. Wegen seiner relativen Einfachheit und Zuverlässigkeit erfreut er sich auch heute noch großer Beliebtheit und ist Bestandteil der meisten vorgeschriebenen Programme zur Untersuchung von genotoxischen Einflüssen [Mortelmans und Zeiger, 2000]. Es werden hierbei eine Reihe von Histidin-abhängigen Stämmen des Bakteriums *Salmonella typhimurium* eingesetzt, welche verschiedene Mutationen in unterschiedlichen Genen des Histidin-Operons aufweisen. In Kulturmedien mit geringem Histidingehalt sind nur solche Zellen in der Lage, Kolonien zu bilden, die auf Grund einer Mutation zur Histidin-Unabhängigkeit revertiert sind. Auf diese Weise können Punktmutationen relativ einfach ermittelt und das mutagene Potential von Substanzen oder physikalischen Einflüssen quantitativ bestimmt werden. Ein vor allem in Bezug auf die Übertragbarkeit auf menschliche Systeme schwerwiegender Nachteil besteht darin, dass dieser Test sich in der beschriebenen Form nur mit Bakterien, modifiziert höchstens mit einfachen Eukaryonten, durchführen lässt, nicht aber mit Säugerzellen.

⁹ MN: Mikronuclei

Für sie stehen allerdings andere Verfahren zur Verfügung. Das wichtigste ist der „HPRT-Mutationstest“. Hier werden Mutationen an dem Enzym „Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)“ untersucht. Es katalysiert den Einbau von Purinbasen in die DNA, ist jedoch nicht essentiell, da die Biosynthese normalerweise über andere Stoffwechselwege erfolgt. Im Medium angebotene Bausteine werden bei funktionell intakter HPRT allerdings benutzt. Modifizierte Basen, z. B. 6-Thio-Guanin (6-TG), die ebenfalls inkorporiert werden, führen zum Zelltod, d. h. normalerweise ist 6-TG ein sehr wirkungsvolles Zellgift. Wird die Funktion von HPRT durch eine Mutation ausgeschaltet, so sind die resultierenden Zellen resistent gegen 6-TG. Hierauf lässt sich ein relativ einfacher Test aufbauen, der heute vielfältig eingesetzt wird. Ein Nachteil liegt allerdings darin, dass sowohl größere Deletionen als auch Basenmutationen zu dem beschriebenen Effekt führen können, der Test ist also im Hinblick auf die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen relativ unspezifisch.

Ein anderes Verfahren basiert auf der Giftwirkung von Ouabain (ostafrikanisches Pfeilgift). Es bindet und blockiert in Säugerzellen an die Na-K-ATPase in der Zellmembran, welche für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials und damit für das Leben essentiell ist. Durch eine Mutation kann die Bindungsstelle für Ouabain so modifiziert werden, dass eine Bindung nicht mehr stattfindet und das Gift daher wirkungslos bleibt. Wichtig ist natürlich, dass hierbei die enzymatische Aktivität erhalten bleibt. Dies ist bei größeren Deletionen nicht mehr gewährleistet. Der Test spricht also vor allem auf Punktmutationen an.

Mutationstests spielen in der Toxikologie und der Umweltmedizin eine wichtige Rolle. Schon vor längerer Zeit sind daher allgemeine Kriterien für die Anwendbarkeit und die sach- und fachgerecht Durchführung entwickelt worden [Aaron et al., 1994], die auch heute noch als gültig anzusehen sind.

3.1.4 Nekrose und Apoptose

In einem intakten Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod. Man unterscheidet zwei Arten von Zelltod, Apoptose und Nekrose. Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologischen und kontrollierten, Energie verbrauchenden Prozess, unter Nekrose versteht man einen pathologischen, passiven, nicht kontrollierten Prozess.

Morphologisch läuft Apoptose in einer bestimmten Abfolge von Reaktionsschritten ab. Dabei wird zunächst die DNA der Chromosomen in Fragmente gespalten. Der Zellkern und die Zelle schnüren sich ein, so dass mehrere membranumschlossene Zellfragmente entstehen, die schließlich von phagozytotisch aktiven Zellen aufgenommen werden. Bei der Nekrose kommt es dagegen zur Zerstörung der Zellmembran und dann zum unkontrollierten Austritt von Zellbestandteilen. Im Gegensatz zur Apoptose wird die DNA nicht kontrolliert fragmentiert.

Apoptose kann sowohl durch äußere wie auch durch zytoplasmatische Signale ausgelöst werden. Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für Moleküle wie Fas-Liganden oder Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), die eine Apoptose auslösen können. Viele Zellen zeigen bereits ohne diese Signale eine hohe Bereitschaft zur Apoptose, sie sind für ihr Überleben auf Wachstumsfaktoren angewiesen. Die ersten Schritte einer rezeptorabhängigen Apoptose führen zur Aktivierung von bestimmten Proteasen (Caspasen). Sie spalten Strukturproteine, DNA-Reparaturenzyme und andere essentielle Zellbestandteile. Erst nach diesen Schritten kommt es zur Fragmentierung der DNA.

Wichtig bei der Apoptose sind auch die Proteine der Bcl-2-Familie, von denen manche anti-apoptotisch und andere pro-apoptotisch wirken. Anti-apoptotische Bcl-2-Proteine stabilisieren die äußere Membran der Mitochondrien. Werden durch die Caspasen pro-apoptotische Bcl-2-Proteine aktiviert, so können diese die Mitochondrienmembran zerstören. Das Membranpotential der Mitochondrien bricht dabei zusammen. Daher wird ein Abfall des mitochondria-

len Membranpotentials als Indikator für Apoptose angesehen, der mit Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden kann.

Eine wichtige Rolle bei der Auslösung von Apoptose spielt der Tumorsuppressor p53, ein Transkriptionsfaktor. Bei DNA-Schädigung und zellulärem Stress steigt seine Konzentration. Das p53-Protein arretiert den Zellzyklus und erlaubt so die Reparatur von DNA-Schäden. Zusätzlich wird die Expression pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine (Bax) erhöht. Dadurch kann die Apoptose bei ungenügender DNA-Reparatur eingeleitet werden. Die zentrale Rolle des p53-Proteins zeigt sich auch darin, dass bei nahezu der Hälfte menschlicher Tumoren Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen vorliegen.

Standardverfahren zum Nachweis von Apoptose beruhen auf dem Nachweis der fragmentierten DNA. Kommt es in vielen Zellen eines Gewebes zur Apoptose, dann lässt sich dies mit Hilfe der „DNA-Leiter“ nachweisen. Die fragmentierte DNA wird isoliert und auf ein Gel aufgetragen (Kap. 3.2.4 Gelelektrophorese). Die DNA-Fragmente werden nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA wird bei der Fragmentierung an vorgegebenen Stellen zerschnitten („Linker“ zwischen Nukleosomen), so entstehen Teilstücke definierter Länge aus einem, zwei oder mehr Nukleosomen, entsprechend ergibt sich ein charakteristisches Muster, die sogenannte „DNA-Leiter“.

Gehen nur wenige Zellen einer Kultur oder eines Gewebes in Apoptose, so verwendet man die TUNEL-Färbung. Hierbei werden in situ an die freien 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente markierte Nucleotide angehängt. Die Methode ähnelt den in Kap. 3.2.6 beschriebenen anderen mikroskopischen Nachweisverfahren.

Ein häufig eingesetztes Verfahren ist der Nachweis von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran; denn dieses wird in apoptotischen Zellen von der Membraninnenseite auf die Außenseite verlagert. Annexin V bindet an Phosphatidylserin. Mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V kann man apoptotische Zellen mit Durchflusszytometrie nachweisen.

Neben diesen Standardverfahren lassen sich die verschiedenen an der Apoptose beteiligten Proteine mit Hilfe der in Kap. 3.2 beschriebenen Verfahren nachweisen. Besonders wenn diese Proteine stärker exprimiert werden, sind die Verfahren geeignet, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Apoptose nachzuweisen. Die Apoptose selbst wird dadurch nicht bewiesen, dazu ist der Nachweis fragmentierter DNA erforderlich.

3.2 Genexpression (mRNA- und Proteinanalyse)

3.2.1 RT-PCR

Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode, die zum Nachweis und zur Quantifizierung von ausgewählten Boten-RNAs (mRNA) eingesetzt wird. Aus Gewebeproben oder Zellen extrahierte Gesamt-RNA wird durch reverse Transkription mit Hilfe von Oligonukleotidprimern in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA dient dann als Vorlage in Polymerase Kettenreaktionen (PCR), in denen kurze Fragmente interessierender mRNA-Spezies mittels zweier genspezifischer Oligonukleotid-Primer in einem PCR-Gerät amplifiziert (vermehrt) werden. In Parallelansätzen wird in der Regel ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen mit analysiert, von dem angenommen wird, dass seine Expression in allen untersuchten Proben konstant ist, und das zur Normalisierung der Daten verwendet wird. Bei der ursprünglichen RT-PCR-Technik basiert die Quantifizierung auf einer Endpunkt-Bestimmung nach einer bestimmten Anzahl an PCR-Zyklen, nach der die resultierenden PCR-Fragmente in Agarosegelen aufgetrennt, angefärbt und durch Densitometrie vermessen werden. In Vorexperimenten muss für jedes nachzuweisende Transkript die optimale Zykluszahl sorgfältig bestimmt werden, da eine korrekte Quantifizierung nur in der

exponentiellen Amplifikationsphase der PCR gelingen kann. Der verlässliche Nachweis geringerer Expressionsunterschiede (1,2- bis 2fach) hat sich als schwierig erwiesen, deshalb wird diese Methode meist als semiquantitativ bezeichnet. Bei der neueren „Realtime-PCR“-Technik wird die Akkumulierung des PCR-Produktes in jedem PCR-Zyklus mittels einer fluoreszierenden Sonde gemessen, und daher wird die Bestimmung der optimalen Zykluszahl überflüssig. Mittels „Realtime-PCR“ lassen sich geringe Expressionsunterschiede sehr zuverlässig nachweisen; sie gilt daher gegenwärtig als Methode der Wahl. Als Nachteile sind die relativ hohen Kosten der „Realtime-PCR“ und des notwendigen Gerätes anzusehen. Der Einsatz von partiell degradiertem RNA kann sowohl bei der semiquantitativen als auch bei der „Realtime-PCR“-Analyse zu grob fehlerhaften Messungen führen.

3.2.2 Mikroarray

DNA-Mikroarrays enthalten cDNA-Fragmente oder Oligonukleotide, die auf Nylonfiltern, Glas- oder Plastik-Substraten immobilisiert sind. Mikroarrays ermöglichen die parallele Analyse von bis zu 50.000 verschiedenen Transkripten in einer Probe und erlauben daher genomweite Einblicke in die Mechanismen der Genregulation und in pathologische Prozesse. Bei cDNA-Arrays werden in der Regel durch PCR amplifizierte, längere cDNA-Fragmente als Sonden verwendet, die von Robotern an definierten Stellen auf das Substrat aufgebracht werden. Mit diesem Verfahren können nur relativ geringe Stückzahlen mit gleichbleibender Qualität hergestellt werden. Es ist daher empfehlenswert, die vorgesehenen Experimente eines Projektes mit ein und derselben Charge durchzuführen. Für eine Array-Analyse wird die aus den zu untersuchenden Zellen extrahierte RNA meist mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und dann markiert, z. B. durch Einbau eines radioaktiven oder fluoreszenzmarkierten Nukleotids, und auf die Arrays aufgebracht. Die markierten Sequenzen in der Probe können hier an komplementäre Sequenzen auf der Array-Oberfläche binden (Hybridisierung), nicht-hybridisierende Sequenzen werden durch Waschen entfernt. Gebundene RNAs können detektiert werden, wobei die Menge an gebundener Radioaktivität bzw. die emittierte Fluoreszenz ein relatives Maß für die Häufigkeit des Transkripts ist. Variable RNA-Qualität und kleine Abweichungen bei den verschiedenen Schritten von der Herstellung der Arrays bis zur Visualisierung können für unerwünschte Variabilität der Daten sorgen; eine strenge Qualitätskontrolle der isolierten RNA und eine Standardisierung des Versuchsaufbaues ist daher eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung von Mikroarray-Projekten. Array-Analysen stellen wegen der enormen Anzahl der gemessenen Variablen (Transkripte) besondere Anforderungen an die Statistik. So sind etwa bei der Analyse eines Arrays mit 50.000 verschiedenen Sonden und einer Signifikanzgrenze von $p=0,05$ im T-Test 2500 falsch positive Transkripte (Type I error) zu erwarten. Eine ausreichend hohe Zahl unabhängiger biologischer Replikate und besondere Verfahren zur Fehlerkorrektur können das Risiko des Auftretens falsch positiver Kandidatengene reduzieren. In jedem Fall ist es ratsam, die in Mikroarray-Experimenten identifizierten, differentiell exprimierten Transkripte mittels einer weiteren Nachweismethode, wie der „Realtime-PCR“, in weiteren unabhängigen Proben zu bestätigen.

3.2.3 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

Bei dieser Methode werden sehr kurze Fragmente (sequence tags) von möglichst vielen cDNAs mit Hilfe spezieller Restriktionsenzyme erzeugt und sequenziert. Die Identität der kurzen, meist 9-14 Basenpaare langen cDNA-Fragmente kann dann durch Vergleich mit Sequenz-Datenbanken meist eindeutig geklärt werden. Werden genügend Tags sequenziert, so reflektiert die Anzahl der zu einem Transkript gehörenden „Tags“ zuverlässig die Häufigkeit der mRNA im Ausgangsmaterial. Da der Sequenzieraufwand erheblich ist, werden unabhängige Replikatanalysen, die bei Mikroarray-Analysen in der Regel gefordert werden, nur selten durchgeführt, so dass eine Validierung der Ergebnisse stets geboten ist. Für die Identi-

fizierung von differentiell exprimierten Genen in zwei Proben sollten SAGE-Bibliotheken generiert werden, die einen möglichst ähnlichen und großen Umfang haben. Für die Analyse von differentiell exprimierten Transkripten in SAGE-Bibliotheken sind spezifische statistische Verfahren entwickelt worden, da die Analyse von Tags, die nur in geringer Anzahl gefunden werden, ein besonders schwieriges Problem darstellt. Gegenüber der Mikroarray-Analyse hat SAGE den Vorteil, dass auch Transkripte, die noch nicht in öffentlichen Datenbanken erfasst sind, identifiziert und quantifiziert werden können.

3.2.4 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Proteomanalyse, bei dem die extrahierten Proteine einer Probe zunächst in der 1. Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und danach in der 2. Dimension nach ihrer/m Größe/Molekulargewicht aufgetrennt werden. Mit dieser Methode können bis zu 10.000 verschiedene Proteinspezies voneinander getrennt werden, die nach Anfärbung dann densitometrisch mit Hilfe von Laserscannern identifiziert werden können. Einzelne Proteinspots können manuell oder durch Roboter ausgestanzt und die enthaltene Proteinspezies mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Als Färbemethoden zur Quantifizierung werden die Färbung mit Coomassie Blue (blau; Linearitätsbereich 50-1000 ng), die empfindlichere Silberfärbung (Linearitätsbereich 0,5-20 ng) und zunehmend auch Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Zahlreiche Quellen für Variabilität und der begrenzte dynamische Bereich der Färbemethoden erschweren eine präzise Quantifizierung ganz enorm und machen etliche Wiederholungsexperimente und eine rigorose statistische Analyse erforderlich. Eine Validierung gefundener Expressionsunterschiede mittels einer unabhängigen Methode, wie „Western-Blotting“, ist dringend geboten.

3.2.5 „Western-Blotting“

„Western-“ oder „Immuno-Blotting“ ist eine Methode, die es erlaubt, mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers die relative Menge eines bestimmten Proteins in komplexen Proben zu bestimmen. Dazu werden die präparierten Zellen oder Gewebe in einem Probenpuffer mit Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert und die Proteine denaturiert. Das Proteingemisch wird dann auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach Molekulargewicht aufgetrennt und danach elektrophoretisch auf eine Membran transferiert. Nach Absättigung der freien Bindestellen auf der Membran, z. B. mit Milchproteinen, wird die Membran mit einem Antikörper inkubiert, der gegen das interessierende Protein gerichtet ist. Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der mit einem Enzym konjugiert ist, können dann durch eine geeignete enzymatische Reaktion die Stellen (Banden) sichtbar gemacht werden, wo der primäre Antikörper auf der Membran gebunden hat. Durch Nachweis eines geeigneten, nicht regulierten Kontrollproteins unterschiedlicher Größe kann die gleichmäßige Beladung des Gels mit den verschiedenen Proben nachgewiesen werden. Die ursprünglich mehr für den qualitativen Nachweis eingesetzte Methode wird mittlerweile auch sehr häufig für den sehr sensitiven quantitativen Nachweis verwendet. In Verdünnungsreihen muss sichergestellt werden, dass die Menge des interessierenden Proteins und der Beladungskontrolle im linearen Bereich des Nachweisverfahrens liegen, da ansonsten Sättigungseffekte dazu führen, dass bestehende Unterschiede nicht detektiert werden.

3.2.6 Immunzytochemie und Immunhistochemie

Bei der Immunzyto- und Immunhistochemie handelt es sich um mikroskopische Verfahren zum Nachweis von Proteinen in mikroskopischen Präparaten. Mit Hilfe dieser Technik ist die Lokalisation von Proteinen in Zellen oder Geweben möglich. Genau wie beim „Western-Blotting“ werden die Proteine durch spezifische Antikörper detektiert, allerdings erfolgt dies hierbei in mikroskopischen Präparaten. Handelt es sich um Gewebsschnitte, spricht man von

Immunhistochemie, während man bei Präparaten aus isolierten Zellen oder Zellkulturen von Immunzytochemie spricht. Bei den Präparaten handelt es sich teils um Gefrierschnitte oder Gefrierpräparate von Zellen, häufig werden auch chemisch fixierte Präparate eingesetzt. Die Präparate werden ganz ähnlich wie beim „Western-Blotting“ nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einem primären Antikörper inkubiert. Dieser ist entweder selbst mit einem Farbstoff oder einem Enzym konjugiert, so dass er im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden kann, oder er wird durch einen markierten sekundären Antikörper, der an den ersten Antikörper bindet, sichtbar gemacht. Die Methode dient also der Lokalisierung von Proteinen in Zellen und Geweben, wobei sich geringe Proteinmengen sehr genau lokalisieren lassen ($< 1 \mu\text{m}$). Die Spezifität der Methode hängt von der Qualität der eingesetzten Antikörper ab. Diese Qualität sollte durch entsprechende Kontrollen nachgewiesen werden. Zur Proteinquantifizierung ist die Methode nicht geeignet.

Immunofluoreszenzverfahren werden seit wenigen Jahren auch zum empfindlichen Nachweis von DNA-Veränderungen eingesetzt. Von besonderer Bedeutung ist die Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) auf Grund einer Modifizierung des Histons H2A (γ -H2AX) oder die Bindung von „p53-binding protein“. Bei sorgfältiger Durchführung lassen sich weniger als 10 DSB pro Zelle detektieren [Rothkamm und Löbrich, 2003].

3.2.7 Reporter-Gen Nachweis und „Heat Shock“-Proteine

Genexpression wird durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen der betreffenden Gene eingeleitet. Häufig ist das auf dem Gen codierte Protein schwer nachzuweisen, dann bietet es sich an, ein Genkonstrukt herzustellen, welches aus der Promotorregion des zu untersuchenden Gens (Ziel-Gen) und einem Gen (Reporter-Gen), das ein leicht nachweisbares Protein codiert, zusammengesetzt ist. Die leicht nachweisbaren Proteine wie β -Galactosidase oder „Green Fluorescent Protein“ stehen dabei unter der Kontrolle des Promotors aus dem Ziel-Gen. Das Genkonstrukt wird in die gewünschten Zellen hineingebracht (Transfektion). Wenn nun in den transfizierten Zellen Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die das Ziel-Gen einschalten, dann kommt es auch zur Expression des Reporter-Gens, und das leicht nachweisbare Protein wird synthetisiert. Diese Methode, die häufig in Zellkulturen angewendet wird, kann jedoch auch in ganzen Organismen Proteinexpression nachweisen. So wurde *Caenorhabditis elegans* (Nematode) genetisch so verändert, dass bei Induktion eines „Heat Shock“-Proteins das Enzym beta-Galactosidase synthetisiert wird [Daniells et al., 1998].

Die erwähnten „Heat Shock“-Proteine (hsp) werden von Zellen unter Wärmeeinwirkung oder anderem Stress exprimiert. Zellen reagieren normalerweise auf Wärmeeinwirkung, indem sie Transkription und Translation der meisten Gene einstellen. Es werden jedoch Hitzeschockgene angeschaltet und „Heat Shock“-Proteine synthetisiert. Die „Heat Shock“-Proteine verbessern die Überlebenschancen bei erhöhter Temperatur. Eine der Hauptfunktionen der „Heat Shock“-Proteine ist die Verhinderung unerwünschter Wechselwirkungen innerhalb und zwischen Proteinen, die zur Proteinaggregation und fehlerhafter Faltung führen könnten. „Heat Shock“-Proteine erleichtern die korrekte Faltung von Proteinen. In den letzten Jahren wird zunehmend der potentielle Einfluss von HF-Feldern auf „Heat Shock“-Proteine verfolgt. Neben dem beschriebenen Reporter-Gen-Nachweis lassen sich die „Heat Shock“-Proteine, wie andere Proteine auch, mittels „Western-Blotting“ oder in mikroskopischen Präparaten mittels Immunhisto- und Immunzytochemie nachweisen.

3.3 Zellzyklusveränderungen

3.3.1 Proliferationsindex

Die Untersuchung von Zellzyklusveränderungen mittels des Proliferationsindexes ist im Kap. 3.1.2 bereits beschrieben.

3.3.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, den Gehalt von bestimmten Zellinhaltsstoffen in einer sehr großen Zahl von Zellen zu untersuchen. Voraussetzung für die Anwendbarkeit ist, dass die zu untersuchenden Substanzen quantitativ mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden können. Ein wichtiges Anwendungsgebiet bildet die Untersuchung des Zellzyklus und etwaiger Veränderungen durch äußere Einflüsse. Hier wird die DNA mit Propidiumjodid markiert, dessen Fluoreszenzsignal der DNA-Menge proportional ist. Auf diese Weise kann der Anteil von Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt werden. Eine selektive Bestimmung von S-Phase-Zellen gelingt nach Einbau des Thymidinanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU) mit Hilfe fluoreszierender Antikörper gegen diese Substanz.

Auch Mikrokerne können mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die Anfärbung erfolgt auch hier in der Regel mit Propidiumjodid. Mikrokerne lassen sich wegen ihres niedrigen DNA-Gehalts von Kernen der Zellen in der G1-Phase unterscheiden. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Empfindlichkeit bei kleinen Signalen deutlich geringer ist, so dass hohe Anforderungen an die Apparatur und die technische Durchführung zu stellen sind. Weiterhin ist hier die Gefahr von Fehlmessungen auf Grund von Verunreinigungen besonders hoch.

Die Durchflusszytometrie ist eine Einzelzellmessung, bei der die Zellen in Suspension in einer Glaskapillare an dem Objektiv eines Mikroskops vorbeigeführt werden. Durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge werden die inkorporierten Farbstoffe angeregt. Die hierdurch ausgelösten Fluoreszenzsignale werden gespeichert, und ihre Größenverteilung wird mit Hilfe geeigneter Computer ermittelt.

Weiterentwicklungen der Technik erlauben auch die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Zellinhaltsstoffe sowie die Auftrennung vitaler Zellen nach unterschiedlichen intrazellulären Stoffkonzentrationen.

4 Auswertung und Statistik

Geeignete statistische Methoden zur Beurteilung zytogenetischer Befunde werden in den „IPSC guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans“ [Albertini et al., 2000] diskutiert und sollen hier nicht näher beschrieben werden. Die Besonderheiten bei der statistischen Auswertung von SAGE und Mikroarray-Experimenten sind in Kap. 3.2.2 und 3.2.3 behandelt.

5 Genotoxizität

5.1 Bewertung der Literatur bis 2003

Die umfangreiche Literatur zur genotoxischen Wirkung von HF-Feldern ist in den letzten Jahren in mehreren Übersichtsartikeln und einer Empfehlung der SSK [SSK, 2001] zusammengefasst worden, daher wird die dort behandelte Originalliteratur hier nicht mehr im Einzelnen besprochen, sondern es werden nur die Schlussfolgerungen referiert. Bei einigen Übersichtsartikeln steht die Frage der Kanzerogenität der HF-Felder im Vordergrund [Dasenbrock 2005; Moulder et al., 2005], andere behandeln ausschließlich die Frage der Genotoxizität [Vijayalaxmi und Obe, 2004; Verschaeve, 2005], während Heynick et al. (2003) und Meltz (2003) beide Aspekte besprechen. Die Studien kommen übereinstimmend zu dem Schluss, dass schwache HF-Felder weder karzinogen sind, noch die Wirkung von karzinogenen Substanzen verstärken [Heynick et al., 2003; Meltz, 2003; Dasenbrock 2005; Moulder et al., 2005]. Die einzige Originalarbeit, die nach Interpretation der Autoren auf eine co-karzinogene Wirkung hindeutet, ist eine tierexperimentelle Studie von Repacholi et al. (1997), in der die Wirkung von HF-Feldern auf einen genetisch veränderten Mausstamm, der spontan häufig Leukämie entwickelt, getestet wurde. Die Tiere, die für 18 Monate täglich zweimal 30 Minuten lang dem Feld eines Mobiltelefons ausgesetzt waren, zeigten eine doppelt so hohe Leukämiehäufigkeit wie die Tiere, die keinem Feld ausgesetzt waren. Utteridge et al. (2002) konnten diese Ergebnisse mit größeren Tierzahlen desselben Stammes sowie zusätzlich mit Wildtyp-Mäusen nicht bestätigen. Um besser definierte Expositionsbedingungen zu erzielen, wurden die Tiere bei Utteridge im Gegensatz zur Studie von Repacholi in ihrer Bewegung eingeschränkt. Auch Sommer et al. (2004) konnten an einem anderen genetisch veränderten Mausstamm AKR/J, der ebenfalls spontan Leukämien entwickelt, nicht die Ergebnisse von Repacholi et al. (1997) bestätigen. Allerdings bestanden zwischen der Studie von Sommer et al. (2004) und der von Repacholi et al. (1997) neben den Unterschieden im Mausstamm auch Unterschiede in der Exposition (vgl. Kap. 6.2).

Bezüglich genotoxischer Wirkungen kommt Meltz (2003) zu dem Schluss, dass die überwiegende Mehrheit der Studien keine Hinweise dafür liefert, dass HF-Felder DNA-Strangbrüche, CA, SCE oder Veränderungen der DNA-Reparatur induzieren. Auch wenn einige wenige Arbeiten eine mögliche Induktion von MN durch HF-Felder vermuten lassen, bestätigt die überwiegende Mehrheit der Studien dies nicht. Verschaeve (2005) schätzt die Situation ähnlich ein. Die Hypothese, dass HF-Felder die Wirkung karzinogener Chemikalien verstärken, wird seiner Meinung nach in der Mehrheit der Studien ebenfalls nicht bestätigt. Trotzdem ist Verschaeve (2005) der Meinung, dass die Literatur noch kontrovers ist, und nur groß angelegte Studien unter gut kontrollierten Bedingungen mit hoher statistischer „Power“ zu einer besseren Risikoabschätzung führen können.

Vijayalaxmi und Obe (2004) versuchen, die zytogenetischen Studien in einer tabellarischen Gesamtschau zu bewerten und kommen zu dem Schluss, dass 58% der Studien keinen Hinweis für erhöhte Häufigkeit von Schäden im Genom durch die Einwirkung von HF-Feldern zeigen konnten. 19% der Untersuchungen waren nicht schlüssig und 23% zeigten eine erhöhte Häufigkeit von Schäden an der DNA nach der Einwirkung von HF-Feldern. Die widersprüchlichen Ergebnisse, die sich in einer derartigen vergleichenden Analyse zeigen, sind nach Meinung der Autoren im Wesentlichen durch Unterschiede in den HF-Feldern und den Versuchsdurchführungen bedingt. Allein diese Unterschiede machen einen direkten Vergleich nahezu unmöglich. Hinzu kommen mögliche Unterschiede bezüglich der Temperatur-Kontrolle sowie Veränderungen in der Osmolarität und im pH-Wert während der Experimente. Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse werden häufig ungeeignete

Methoden eingesetzt, auch dies kann zu den widersprüchlichen Ergebnissen beitragen. Bemerkenswert ist, dass in keinem der Übersichtsartikel von einem Nachweis einer genotoxischen Wirkung der HF-Felder ausgegangen wird.

5.2 Bewertung neuerer Literatur

Die ausgewerteten Arbeiten wurden nach den eingesetzten Zelltypen geordnet, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

5.2.1 Mikrobielle Systeme

Obwohl Mutationsstudien mit Einzellern zum Standardrepertoire bei der Untersuchung auf mögliche genotoxische Wirkungen gehören und sich durch relativ geringen experimentellen Aufwand auszeichnen, gibt es nur zwei Arbeiten aus diesem Forschungsbereich, welche sich mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern beschäftigen. Chang et al. (2005) benutzten den klassischen „Ames-Test“, um die mutagene Wirkung von 835 MHz-HF-Feldern zu ermitteln. Die Exposition (CW-Modus) erfolgte über 48 Stunden mit einem SAR-Wert von 4 W/kg. Eine mutagene Wirkung konnte nicht festgestellt werden.

Gos et al. (2000) benutzten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*), um Einflüsse von 900 MHz-Feldern (GSM-Modus) bei SAR-Werten von 0,13 und 1,3 W/kg auf Vorwärtsmutationen und Rekombinationsvorgänge zu erfassen. Auch in Bezug auf diese experimentellen Parameter konnte keine Wirkung der Hochfrequenzfelder festgestellt werden.

5.2.2 *In-vitro*-Exposition: Blutzellen

5.2.2.1 Primäre Lymphozyten

In der Studie von Baohong et al. (2005) wurden isolierte, periphere menschliche Lymphozyten eines männlichen Spenders auf synergistische Wirkungen von genotoxischen Chemikalien und HF-Feldern untersucht. Exponiert wurde in einem Wellenleiter-Resonator, der von Kuster und Mitarbeitern entwickelt worden ist, bei 1,8 GHz und einer SAR von 3 W/kg bei 37 °C für 2 Stunden [Schuderer et al., 2004b]. Genotoxische Effekte wurden mit dem alkalischen „Comet-Assay“ untersucht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe computergesteuerter Bilderfassung in Form von „Tail Moments“ sowie der „Tail Length“. Die HF-Felder allein führten nicht zu Veränderungen. Als genotoxische Substanzen wurden eingesetzt: Bleomycin (BLM), Mitomycin C (MMC), Methylmethansulfonat (MMS) sowie 4-Nitrochinolin-1-oxid (4NQO), denen die Zellen für drei Stunden bei 37 °C ausgesetzt waren. Diese Substanzen wurden in vier Konzentrationen allein und in Kombination mit den HF-Feldern getestet. Dabei wurden die Mutagene alternativ vor, während oder nach der HF-Feld-Exposition angewendet. Alle Mutagene allein verursachten im „Comet-Assay“ konzentrationsabhängige Veränderungen. Die mutagene Wirkung von MMC und 4NQO wurde durch die Feldeinwirkung signifikant erhöht, unabhängig davon, ob das Mutagen vor, nach oder während der HF-Exposition gegeben wurde.

In zwei Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Harms-Ringdahl wurden isolierte Lymphozyten von gesunden Spendern und von solchen, die sich als hypersensitiv bezeichnen, verglichen [Belyaev et al., 2005; Markova et al., 2005]. Die Lymphozyten wurden alternativ einem HF-Feld oder einem 50 Hz-Magnetfeld ausgesetzt. Als HF-Feld wurde das Feld eines normalen Mobiltelefons in einer TEM-Zelle (GSM-Basic) bei einer SAR von 0,037 W/kg für eine und zwei Stunden angewendet, allerdings ergaben sich vergleichsweise hohe Inhomogenitäten in der SAR-Verteilung. Als ein biologischer Endpunkt wurde die Chromatinstruktur mit Hilfe von Viskositätsmessungen untersucht, zusätzlich wurde „p53-binding protein (53BP1)“ als Indikator für Doppelstrangbrüche in immunocytochemischen Untersuchungen mikroskopisch

dargestellt. Auch Apoptose wurde mikroskopisch und anhand von DNA-Fragmentierungsmessungen verfolgt (vgl. Kap. 3.1.4). Als Positivkontrollen dienten eine Temperaturerhöhung auf 41 °C und eine Röntgenstrahlendosis von 3 Gy. Die Autoren fanden nach der Anwendung der HF-Felder Veränderungen in der Chromatinstruktur. Die Häufigkeit von γ -H2AX und 53BP1 „Foci“ war nach Exposition im Vergleich zu scheinexponierten Kontrollen vermindert. Auch wenn die Interpretation der Ergebnisse in ihrer Gesamtheit schwierig ist, zeigen sie jedoch klar, dass keine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen gemessen werden konnte. Apoptose ließ sich ebenfalls nicht nachweisen, ebenso wenig wie Unterschiede zwischen gesunden und hypersensitiven Personen. Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse als einem „Heat Shock“ vergleichbar.

Die Arbeitsgruppe um Scarfi hat in mehreren Studien unter dem Einsatz klassischer zytogenetischer Techniken isolierte menschliche Lymphozyten untersucht [Scarfi et al., 2006; Zeni et al., 2003; Zeni et al., 2005]. In der Studie von 2003 wurden CW und GSM-Felder (900 MHz) in einer TEM-Zelle bei einer SAR von 1,6 W/kg in einem Expositionsschema von 6 min Feld/ 3 Std. Pause für bis zu 44 Stunden angewendet. Zusätzlich wurden Zellen 1 Stunde täglich bei 0,2 W/kg für drei Tage einem Feld ausgesetzt. Der „Cytokinesis-Block Proliferationsindex“ (vgl. Kap. 3.1.2) wurde bestimmt und unter diesen Bedingungen wurden auch die MN ausgewertet. In keinem Fall konnte ein signifikanter Unterschied zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse werden durch einen Interlaborvergleich bekräftigt [Scarfi et al., 2006]. Nach Exposition des Blutes von 10 Spendern (900 MHz, 0-10 W/kg, 24 Stunden) wurden Mikronuklei in zwei italienischen Labors zunächst unabhängig ausgewertet, und anschließend wurden außerdem die Proben des jeweiligen Partners evaluiert. In keiner der genannten Auswertungen ergaben sich Anzeichen für einen genotoxischen Effekt.

In einer weiteren Studie [Zeni et al., 2005] hat die Gruppe als Expositionseinrichtung einen rechteckigen Wellenleiter eingesetzt, in dem die Zellen bei 900 MHz und SARs von 0,3 oder 1 W/kg für 2 Stunden exponiert wurden. Die Endpunkte waren CA (48 Std.-Kultur), SCE (72 Std.-Kultur), Proliferations- (48 Std.-Kultur) und Mitoseindex (72 Std.-Kultur) sowie alkalischer „Comet-Assay“. Als Positivkontrollen dienten Mitomycin C für CA und Methylmethansulfonat für die Kometen. Die Ergebnisse dieser Studie waren negativ.

Zotti-Martelli et al. (2005) widmeten sich vor allem der Frage der Variabilität der gemessenen Effekte. Sie exponierten Lymphozyten von neun Spendern (1800 MHz, 5-20 mW/cm², 1, 2, und 3 Stunden) und wiederholten den Versuch drei Monate später. In jedem Fall wurden Mikrokerne bestimmt. Es zeigte sich eine beträchtliche Variabilität sowohl zwischen den Spendern als auch zwischen den Wiederholungsexperimenten bei identischen Spendern. Dies relativiert auch die im Ganzen festgestellte leichte Erhöhung der Mikrokernhäufigkeit nach Exposition.

In einer Studie an stimulierten Lymphozyten wurde die Verteilung von Chromosom 17 mit Hilfe von spezifischen FISH-Sonden für die Zentromere verfolgt [Mashevich et al., 2003]. Die Zellen wurden für 72 h in einem Parallelplattenresonator bei 830 MHz CW bei 1,6-8,8 W/kg exponiert. Es wurde eine deutliche Zunahme der Aneuploidiehäufigkeit für Chromosom 17 gefunden. Extrapoliert man diese Ergebnisse auf das Gesamtgenom, würde eine erhebliche Zunahme der Häufigkeit von Aneuploidien und in deren Folge der von Mikrokernen zu erwarten sein, die nie gezeigt wurde.

Der Frage der „Co-Karzinogenität“ von HF-Feldern wurde schon vor dem Jahr 2000 durch die Gruppe von Verschaeve nachgegangen. In einer ersten Arbeit [Maes et al., 1996] zeigten die Autoren, dass die Zahl der von Mitomycin C ausgelösten DNA-Strangbrüche und Chromosomenaberrationen durch eine Exposition in HF-Feldern signifikant erhöht wurde, das HF-Feld allein hatte keine signifikanten Wirkungen. In weiteren Arbeiten derselben

Arbeitsgruppe zeigte sich im Folgenden eine kontinuierliche Verringerung des zunächst beobachteten Effekts: Maes et al. (1997) beschrieben eine nur noch schwach signifikante Wechselwirkung, Maes et al. (2000) Inkonsistenz und schließlich Maes et al. (2001) das Fehlen einer Interaktion zwischen den beiden Agenzien. Im Rahmen des PERFORM B-Projekts initiierte die EU eine Wiederholungsstudie, an der eine britische und eine italienische Arbeitsgruppe beteiligt waren [European Union, 2004b]. Die Ergebnisse liegen nun vor [Stronati et al. 2006]. In der äußerst genau beschriebenen und sorgfältig durchgeführten Arbeit wurden in den beiden Labors unabhängig voneinander menschliche Lymphozyten GSM-Basis-Signalen mit 935 MHz bei einem SAR-Wert von 1 und 2 W/kg 24 Stunden lang ausgesetzt. Unmittelbar vorher oder nachher erfolgte außerdem eine Bestrahlung mit 1 Gy durch eine 250 kV-Röntgenröhre, um mögliche Synergismen zu testen. Beide Labors untersuchten die Entstehung von Mikrokernen und Chromosomenaberrationen, in jeweils einem wurden auch Schwesterchromatidaustausche (SCE) bestimmt bzw. DNA-Veränderungen mit Hilfe des alkalischen Comet Assays gemessen. Die umfangreich dokumentierten Ergebnisse stellen klar, dass eine Exposition durch RF-Felder allein keine genotoxischen Wirkungen auszulösen in der Lage ist, ebenfalls konnte keine synergistische Interaktion mit Röntgenstrahlen festgestellt werden. Proben, welche nur mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurden, dienten gleichzeitig als Positivkontrollen.

In einer Studie von Vijayalaxmi (2006) wurden unstimulierte und stimulierte Lymphozyten verglichen. Exponiert wurden unstimulierte Lymphozyten mittels einer Hornantenne in einer Absorberkammer bei 2,45 GHz gepulst und einer SAR von 2 W/kg für 2 h. In einer zweiten Serie wurden unstimulierte und stimulierte Lymphozyten in gleicher Weise mit 8,2 GHz bei 21 W/kg unter kontrollierten Temperaturbedingungen exponiert. Untersucht wurden der Mitoseindex, Chromosomenaberrationen und Mikrokern. Alle Ergebnisse mit Ausnahme der Positivkontrollen waren negativ.

5.2.2.2 Transformierte Blutzellen

In einer Studie [Hook et al., 2004b] wurden exponentiell wachsende Molt-4-Zellen einer menschlichen Leukämiezelllinie für 2, 3 und 21 Stunden HF-Feldern unterschiedlicher Pulsung und Frequenz (CDMA (847,74 MHz; 3,2 W/kg), FDMA (835,62 MHz; 3,2 W/kg), iDEN (813,56 MHz; 2,4 oder 24 mW/kg) und TDMA (836,55 MHz; 2,6 oder 26 mW/kg)) in einer radialen Wellenleitung ausgesetzt. Als Positivkontrollen wurden die Zellen Gamma-Strahlen (1 Gy) oder einer Erwärmung (44 °C für 20 min) ausgesetzt. Als Endpunkte wurden die Kometen mit dem alkalischen „Comet-Assay“ sowie die Apoptosehäufigkeit über Annexinbindung mit Cytofluorimetrie untersucht (vgl. Kap. 3.3.2). Es ergaben sich unabhängig von Befeldungsmodalität, Modulationsformen und SAR-Werten keine Unterschiede zwischen exponierten und scheinexponierten Proben.

Im Rahmen der REFLEX-Studie [European Union, 2004a] wurde ein Teilprojekt (Participant 2, Arbeitsgruppe Tauber) an exponentiell wachsenden Zellen einer menschlichen Leukämiezelllinie (HL-60) durchgeführt, dessen Ergebnisse bisher nicht publiziert wurden. Als biologische Endpunkte wurden MN, Kometen, Zellzyklus, Apoptose und Sauerstoffradikale (ROS) untersucht. Die Exposition fand in dem in Kap. 2.1 beschriebenen Wellenleiter-Resonator statt [Schuderer et al., 2004b]. Die Zellen wurden bei 1800 MHz mit unterschiedlichen Modulationen (CW, GSM 217 Hz und GSM-Talk) für Zeiten zwischen zwei und 72 Stunden bei SAR-Werten von 0,2 bis 3 W/kg exponiert. Das wesentliche Resultat dieser Studie ist ein SAR-abhängiger Anstieg der MN und des „Comet Tail Moments“. Es handelt sich jedoch nicht um eine einfache Abhängigkeit, sondern es kommt nur bei mittleren SAR-Werten 1,3, 1,6 und 2 W/kg zu einer Erhöhung, nicht jedoch bei niedrigeren oder höheren SAR-Werten, was als eine Art „Fenstereffekt“ interpretiert wird. Apoptose, Zellzyklus und die Überlebensfähigkeit der Zellen waren dagegen nicht beein-

flusst. Die Autoren beschreiben eine Steigerung der ROS und eine Reduktion der Effekte durch Zugabe von Ascorbinsäure als Radikalfänger bei Exposition über 24 h.

Zwei weitere Studien [Lantow et al., 2006; Simko et al., 2006] haben die Produktion von freien Radikalen in Zellen des menschlichen Immunsystems, einer Monozyten-Zelllinie (Mono Mac 6) und einer Leukämie-Zelllinie von Erythroid-Zellen (K562) unter dem Einfluss von 1800 MHz-Feldern untersucht und keine erhöhte Produktion von Radikalen nachweisen können. Die Arbeiten sind im Einzelnen im Kapitel 6.1 behandelt, da diese Arbeiten sich auch mit der Frage der Expression von „Heat Shock“-Proteinen beschäftigen. Diese Frage spielt im Kapitel 6 eine wichtige Rolle.

5.2.3 *In-vitro*-Exposition: Fibroblasten und Zelllinien

Die Arbeitsgruppe Rüdiger untersuchte im Rahmen des REFLEX-Projekts u. a. genotoxische Wirkungen in menschlichen Fibroblasten sowie Ratten-Granulosa-Zellen [European Union, 2004a]. Die Expositionsapparatur war – wie in den meisten REFLEX-Studien – der von Schuderer et al. (2004b) entwickelte Wellenleiter-Resonator. Bei einer Frequenz von 1800 MHz wurden SAR-Werte von 1,2 und 2 W/kg in verschiedenen Modulationen und zeitlichen Expositionsmustern bis zu 24 Stunden eingesetzt. Als Testverfahren dienten alkalischer und neutraler „Comet-Assay“, außerdem wurden Mikrokerne sowie Chromosomenaberrationen bestimmt. Die Autoren geben bei allen untersuchten Parametern signifikante Steigerungen im Vergleich zu „Sham“-Kontrollen nach 4- und 24-stündiger Exposition an. Ein Teil der im REFLEX-Report berichteten Ergebnisse ist veröffentlicht [Diem et al., 2005], ihre Gültigkeit ist von Vijayalaxmi et al. (2006) aus methodischen Gründen in Zweifel gezogen worden. Speit et al. (2007) haben in Zusammenarbeit mit dem REFLEX-Konsortium die Experimente mit gleichem Zellmaterial und einer identischen Expositionsapparatur repliziert. Dabei konnten die ursprünglichen Ergebnisse nicht bestätigt werden. In derselben Arbeit wurden zum Vergleich auch V79-Zellen des chinesischen Hamsters untersucht, die ein „Standardobjekt“ zytologischer Forschung in Säugerzellen darstellen. Auch bei ihnen gab es bei den untersuchten Parametern in keinem Fall eine Änderung durch den Einfluss von HF-Feldern.

Eine vergleichbare Studie wurde von Sakuma et al. (2006) durchgeführt. Sie exponierten sowohl Humanfibroblasten aus fetalen Lungen (Linie IMR90) als auch menschliche Gliomzellen (A172) in verschiedenen modulierten Signalen der Grundfrequenz 2142,5 MHz bei SAR-Werten von bis zu 0,8 W/kg. DNA-Schäden wurden mit Hilfe des alkalischen „Comet-Assays“ quantifiziert. In keinem Fall zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten Proben. Allerdings muss auf die relativ geringe SAR in diesen Experimenten hingewiesen werden.

In einer Arbeit von Zhang et al. (2006), die nur als Zusammenfassung vorliegt, wurden Hamsterlungenfibroblasten 1 bzw. 24 Stunden mit 1800 MHz-Signalen bei 3 W/kg exponiert und in Bezug auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen untersucht, wobei die empfindliche Methode des Immunnachweises von γ -H2AX benutzt wurde. Eine gerade signifikante Erhöhung ergab sich lediglich bei der längeren Expositionsdauer.

Lagroye et al. (2004b) untersuchten in der Maus-Fibroblastenzelllinie 10T1/2 die Ausbeute an alkali-labilen DNA-Schäden und DNA-Protein-Vernetzungen. Als Positivkontrolle wurden Cisplatin und Gammastrahlen benutzt. Die Exposition mit 2450 MHz erfolgte über 2 Stunden bei einer SAR von 1,9 W/kg. Die ausführlich belegten Ergebnisse geben keinen Hinweis auf die Induktion von alkali-labilen Läsionen oder DNA-Protein-Vernetzungen durch HF-Exposition.

An CHO-K1 und an MO54-Zellen untersuchten Takashima et al. (2006) Zellwachstum, -überleben und -zyklus über ein sehr breites SAR-Spektrum (0,05-1500 W/kg Pulswerte bzw.

CW bis 200 W/kg) bei 2,45 GHz. Die Kulturen wurden auf einen geschlitzten Hohlleiter-Resonator aufgesetzt. Ab 100 W/kg kam es zu einer deutlichen Erwärmung des Kulturmediums. Bei 200 W/kg CW mit 7 °C Temperaturerhöhung kam es zu einem verringerten Überleben beider Zelltypen. Ein solcher Effekt ließ sich auch durch Aufheizen auf die entsprechende Temperatur erreichen, was zeigt, dass die ermittelten Veränderungen lediglich auf thermische Effekte zurückzuführen waren.

In einer weiteren Studie wurden sehr hohe SAR (5-100 W/kg; 2,45 GHz CW und gepulst; 2 h) angewendet, hier auf embryonale Hautfibroblasten der Maus (m5S) [Komatsubara et al., 2005]. Es traten Temperaturerhöhungen bis zu 4 °C auf. Die Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen waren nicht erhöht.

In einer Studie von [Hook et al. 2004a] an einer Zelllinie von Maus-Makrophagen, J774,16, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Exposition in HF-Feldern und oxidativem Stress untersucht. Da die unter diesen Bedingungen produzierten „freien Radikale“ zu genotoxischer Wirkung führen können, wurde die Untersuchung diesem Kapitel zugeordnet. Vier Aspekte wurden verfolgt: 1. Die Produktion „freier Radikale“, 2. die Begünstigung „freier Radikale“, 3. der Schaden durch freie Radikale sowie 4. die Auslösung einer Antwort auf oxidativen Stress. Zu diesem Zweck wurden die Makrophagen vor einer Exposition durch γ -Interferon und bakterielles Lipopolysaccharid stimuliert. Hierdurch kommt es u. a. zur Ausschüttung von Sauerstoff-Radikalen. Die Feldexposition erfolgte in einer radialen Wellenleitung mit CDMA-Muster bei 847,7 MHz und FMCW mit 836,5 MHz bei einer SAR von 0,8 W/kg für 20-22 Stunden. Zur Charakterisierung wurden das Niveau von Oxidantien, Antioxidantien sowie die Aktivität verschiedener detoxifizierender Enzyme (Katalase, Superoxid-Dismutase) bestimmt. Eine signifikante Veränderung im Gehalt an oxidativen Substanzen, Antioxidantien oder der Aktivität detoxifizierender Enzyme wurde unabhängig von Frequenz oder Modulationsform nicht festgestellt.

Diese Ergebnisse stimmen mit den oben erwähnten Arbeiten von Lantow et al. (2006) und Simko et al. (2006) überein.

5.2.4 *In-vitro*-Exposition: Stammzellen

Im Rahmen der REFLEX-Studie [European Union, 2004a] wurden Untersuchungen an embryonalen R1-Maus-Stammzellen vom Wildtyp und an p53-defizienten Zellen sowie an Herzvorläuferzellen vorgenommen (Participant 4, Arbeitsgruppe Wobus). Die Ergebnisse bezüglich der Wirkung von HF-Feldern wurden von Czyn et al. (2004) und Nikolova et al. (2005) zusammengefasst. Untersucht wurden CA, SCE, Kometen mit Standardmethoden sowie der Zellzyklus mit Durchflusszytometrie, außerdem Differenzierungsprozesse und Genaktivierung mit quantitativer RT-PCR. Die Feldexposition bei 1,71 GHz erfolgte in der Expositionsapparatur nach Schuderer et al. (2004b), die schon vor dem REFLEX-Projekt an die Kultur der embryonalen Stammzellen im hängenden Tropfen angepasst wurde [Schönborn et al., 2000]. Die Exposition erfolgte in einem 5-min-an-30-min-aus-Muster entweder für 6 oder für 48 Stunden bei einer SAR von 1,5 W/kg GSM 217 Hz, 0,4 W/kg GSM-Talk und 0,11 W/kg GSM-DTX. Die meisten untersuchten Parameter wie CA, SCE, Proliferation und Differenzierung wurden nicht durch die HF-Felder beeinflusst. Im neutralen, aber nicht im alkalischen „Comet-Assay“ zeigte sich in den Wildtyp-Zellen nach 6 Stunden, aber nicht nach 48 Stunden, GSM 217 Hz bei SAR 1,5 W/kg ein leicht erhöhter „Comet Tail Factor“. Diese Diskrepanz zwischen den beiden Modifikationen des „Comet-Assays“ ist nicht nachvollziehbar, da sich die unter neutralen Bedingungen nachgewiesenen Doppelstrangbrüche auch unter alkalischen Bedingungen als Einzelstrangbrüche manifestieren sollten. Die in diesen Arbeiten enthaltenen umfangreichen Ergebnisse zur Genexpression sind in Kap. 6.1 beschrieben.

5.2.5 *In-vivo-Exposition*

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das ganze Tier dem HF-Feld auszusetzen und nach einer vorgegebenen Zeit Zellen zu isolieren und zu untersuchen. Derartige Versuche werden in diesem Kapitel beschrieben.

Die Publikationen von Lai und Singh (1995; 1996; 1997) markieren den Beginn einer Vielzahl von ähnlichen Untersuchungen. Sie sind ausführlich in den älteren Zusammenfassungen, z. B. von Vijayalaxmi und Obe (2004) kommentiert worden, sollen daher hier nicht mehr im Einzelnen besprochen werden. Lai und Singh exponierten Ratten und isolierten Hirnzellen, in denen sie mit Hilfe des „Comet-Assays“ DNA-Strangbrüche nachwiesen. Lagroye et al. (2004a) wandten ein weitgehend analoges Verfahren an und kamen zu dem Schluss, dass keine DNA-Schäden durch die Einwirkung von Mikrowellen der Frequenz 2450 MHz bei einer SAR von 1,2 W/kg mit Hilfe des alkalischen „Comet-Assays“ beobachtet werden können.

Paulraj und Beharil (2006) kamen zu einem gegensätzlichen Schluss: Sie exponierten Ratten über 35 Tage mit 2450 oder 16500 MHz bei SAR-Werten von 1 und 2 W/kg und bestimmten DNA-Veränderungen mit Hilfe des alkalischen „Comet-Assays“. Die statistische Analyse erwies danach hochsignifikante Steigerungen nach der Langzeitexposition im Vergleich zu nicht exponierten Kontrollen.

Die Studie von Görlitz et al. (2005) ist mit den genannten Schlussfolgerungen nicht kompatibel. Sie haben B6C3F1-Mäuse in einem einwöchigen und in einem sechswöchigen Versuch HF-Feldern von 902 und 1747 MHz ausgesetzt. Die Tiere wurden 2 Stunden täglich in einem radialen Wellenleitungsresonator mit sternförmig um die Antenne angeordneten Röhren exponiert, in denen sich jeweils eine Maus befand. Die Exposition erfolgte im einwöchigen Versuch über fünf Tage bei 0, 3,7, 11 und 33,2 W/kg, im sechswöchigen Versuch fünf Tage pro Woche bei 0, 2,8, 8,3 und 24,9 W/kg. MN wurden in Lymphozyten aus der Milz, in polychromatischen Erythrozyten und Keratinozyten analysiert. Weder nach einer noch nach sechs Wochen zeigte sich ein Einfluss des Feldes. Der Proliferationsindex der Lymphozyten war nicht beeinflusst. Körpergewicht und Gesundheitszustand der Tiere waren nicht beeinflusst.

In mehreren Versuchsserien folgten Trosic und Busljeta [Trosic et al., 2004; Trosic und Busljeta, 2006] einem ähnlichen Ansatz wie Görlitz et al. (2005). Sie konzentrierten sich allerdings auf das blutbildende System. Sie bestimmten polychromatische Erythrozyten im Knochenmark sowie Mikrokerne im peripheren Blut von Ratten nach Exposition mit 2450 MHz bei einem SAR-Wert von 1,25 W/kg. Weder die Expositionsapparatur noch die Art der Bestimmung des SAR sind ausreichend beschrieben, um methodische Fehler ausschließen zu können. Anscheinend wurden die SAR ausgehend von einer Leistungsflussdichtemessung im Käfig berechnet. Am Ende des Expositionszyklus wurden aus dem Oberschenkelknochen Zellen gewonnen, mit Acridinorange gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Die Ergebnisse weisen einen uneinheitlichen Verlauf auf: Es kommt am 8. und 15. Tag zu Anstiegen der erfassten Parameter, bei längeren Zeiten sinken sie jedoch wieder auf Kontrollniveau ab. Die Autoren deuten dieses Verhalten als eine initiale Störung der Blutbildung und diskutieren die Möglichkeit einer späteren Adaptation. In Bezug auf eine mögliche Genotoxizität lässt sich kein klarer Schluss ziehen.

In einer Studie mit verschiedenen Endpunkten wurden von Belyaev et al. (2006) Ratten bei 915 MHz-GSM-Basic-Mode in einer TEM-Zelle mit 0,4 W/kg 2 h exponiert. Nach der Exposition wurden aus der weißen und grauen Masse des Gehirns und aus dem Thymus sowie der Milz Zellsuspensionen präpariert. Aus den Zellkernen wurden DNA und Nicht-Histonproteine isoliert. Die Viskosität der resultierenden Lösung wurde gemessen. Die HF-

Exposition hatte keinen Einfluss auf diesen Parameter. Mit der Pulsfeldelektrophorese ließen sich keine Doppelstrangbrüche detektieren.

In einer Studie von Vijayalaxmi et al. (2003) wurden Ratten für 2 Jahre bei einem 1,6 GHz-Iridium-Signal exponiert bei 0,16 und 1,6 W/kg (SAR lokal im Gehirn) 2 h täglich 5 Tage pro Woche. Es wurden ca. 130 Tiere pro Gruppe untersucht. Bestimmt wurden Mikrokerne in polychromatischen Kernen des Knochenmarks. Mit Ausnahme der Positivkontrollen waren alle Ergebnisse negativ.

Aitken et al. (2005) exponierten Mäuse bei 900 MHz CW in einem Rechteckhohlleiter bei einer SAR von 90 mW/kg über 7 Tage täglich 12 h. Sie untersuchten Veränderungen in männlichen Keimzellen. Untersuchungen mit Hilfe der Gelelektrophorese ergaben keine signifikanten Erhöhungen von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen, jedoch zeigten sich mit Hilfe der quantitativen PCR Schäden sowohl im mitochondrialen Genom als auch am Genlocus für das β -Globin. Allerdings wurden die Vergleiche lediglich mit einer Käfigkontrolle und nicht mit scheinexponierten Tieren durchgeführt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um Stresseffekte gehandelt haben könnte.

Im Rahmen eines lang angelegten Versuchs, mögliche Kombinationswirkungen mit chemischen Noxen zu finden, exponierten Verschaeve et al. (2006) Ratten über insgesamt zwei Jahre (2 Stunden/Tag, 5 Tage/Woche, 900 MHz GSM-Basic, SAR 0,3 oder 0,9 W/kg). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Tiere getötet und DNA-Schäden in Hirn- und Leberzellen mit Hilfe des alkalischen „Comet-Assays“ bestimmt. Außerdem wurde in Blutproben das Auftreten polychromatischer Erythrozyten untersucht. In keinem Fall ergab sich eine durch HF hervorgerufene Genotoxizität.

In einer tierexperimentellen Untersuchung an gentechnisch veränderten Mäusen sind Ono et al. (2004) der Frage nachgegangen, ob HF-Felder mutagen wirken. In das Genom der Testtiere ist das lacZ-Gen stabil integriert, das nach Exposition auf Mutationen überprüft werden kann. Die Tiere wurden in utero von Tag 0-15 täglich 16 Stunden in 2.450 MHz CW mit einer „mittleren“ SAR von 1,4 W/kg (errechnet aus: 20 s an 4,3 W/kg anschließend 40 s aus) oder 0,71 W/kg (errechnet aus: 10 s an 4,3 W/kg, 50 s aus) mit Hilfe einer Hornantenne exponiert. Die neonatalen Mäuse wurden noch 10 Tage im Käfig gehalten und untersucht. Aus DNA von Leber, Milz, Gehirn und Testis wurde das lacZ-Gen isoliert und in Lambdaphagen eingebaut, um die Mutantenhäufigkeit zu bestimmen. Bei isolierten Mutanten wurde außerdem eine Sequenzanalyse durchgeführt. Weder in Bezug auf die Mutantenhäufigkeit noch auf Sequenzänderungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen exponierten und nicht exponierten Tieren festgestellt werden. Die angewandte Methode erlaubt nur die Detektion kleinerer Veränderungen im Genom, größere Deletionen werden nicht erfasst.

5.3 Zusammenfassung und Diskussion

Bei einer Sichtung der Literatur fällt der erstaunliche Mangel an systematischer Stringenz bei den meisten Arbeiten auf. Obwohl internationale Leitlinien für die Prüfung auf genotoxische Wirkungen mit einer Beschreibung des Vorgehens und der Durchführung von Tests existieren [Albertini et al., 2000], wird auf sie nur in den seltensten Fällen Bezug genommen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sich ein uneinheitliches Bild ergibt.

Übersichtsarbeiten der letzten Jahre zur genotoxischen Wirkung hochfrequenter Felder kommen übereinstimmend zu dem Schluss, dass diese keine direkten Schäden in der zellulären DNA induzieren (vgl. Kap. 5.1). Eine direkte Wirkung ist auch physikalisch nicht zu erwarten. Dennoch finden sich in der Literatur auch positive zytogenetische Befunde, die nicht auf offensichtlich inadäquate Versuchsbedingungen zurückgeführt werden können, dabei handelt es sich um 23% aller bis 2003 betrachteten Studien [Vijayalaxmi und Obe,

2004]. Auch die neuere Literatur zur Genotoxizität liefert ein uneinheitliches Bild, obwohl leistungsfähigere Expositionsapparaturen mit verbesserter Dosimetrie einheitlich von vielen Arbeitsgruppen eingesetzt wurden. Eine Übersicht über die hier behandelten Arbeiten liefert Tab. 1.

Vijayalaxmi und Obe (2004) forderten zur Auflösung der widersprüchlichen Ergebnisse eine Multicenter-Studie mit ausreichender statistischer Absicherung im SAR-Bereich von 1-5 W/kg, mit genauer Temperaturkontrolle und überprüfter Dosimetrie. Es sollten mehrere Zelltypen wie Lymphozyten, Fibroblasten und auch Tumorzellen berücksichtigt werden. Die von der EU geförderte REFLEX-Studie wäre im Prinzip geeignet gewesen, diese Postulate zu erfüllen [European Union, 2004a]. Zwar wurden weitgehend einheitliche Expositionseinrichtungen mit verbesserter Dosimetrie benutzt, zeitliche Expositionen, Zellsysteme, Testverfahren und biologische Endpunkte waren jedoch unterschiedlich, so dass eine Vergleichbarkeit untereinander kaum gegeben war.

Allgemein kann festgestellt werden, dass zur Untersuchung genotoxischer Wirkungen der „Comet-Assay“ und der Mikrokerntest am häufigsten benutzt wurden. Die beiden Techniken sind in der Durchführung relativ einfach, erfordern jedoch die sorgfältige Beachtung von Qualitätskriterien, um Fehler zu vermeiden. In einer Serie von Validierungsstudien wurde der Mikrokerntest bezüglich seiner Aussagekraft untersucht und als *in-vitro*-Test empfohlen [Lorge et al., 2006].

Zur Einordnung und Bewertung positiver Befunde dürfen einige Aspekte nicht unbeachtet bleiben. In diesem Zusammenhang sind Wiederholungsstudien besonders wichtig, die unter äußerst stringenten experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden. Generell bedeutet eine nicht bestätigende Reproduktion nicht, dass die Ursprungsstudie falsch ist; denn auch die Reproduktionsstudie kann fehlerhaft sein. Eine bestätigende Reproduktion erhärtet jedoch die Befunde der ursprünglichen Arbeit. Die wenigen bisher vorgelegten Wiederholungsstudien waren stets negativ [Speit et al., 2007; Stronati et al., 2006]. Da eine direkte Schädigung der DNA durch HF-Felder bei den verwendeten Intensitäten aus physikalischen Gründen nicht zu erwarten ist, bleibt die Möglichkeit indirekter Wirkungen über Erwärmung exponierter Zellen oder über die Bildung von Radikalen, besonders von Sauerstoffradikalen (ROS). In sorgfältig durchgeführten Studien, bei denen die Temperaturerhöhung unter 0,2 Grad Celsius bleibt, können Effekte infolge von Erwärmung ausgeschlossen werden. In einer Studie [European Union, 2004a; Arbeitsgruppe Tauber] wurde über die Bildung von ROS berichtet, in anderen sehr ausführlichen Untersuchungen konnte dies nicht bestätigt werden [Lantow et al., 2006]. ROS-bedingte indirekte Schädigungen der DNA würden eher zu Chromatidenaberrationen und SCE führen, Erhöhungen der Häufigkeiten dieser Aberrationstypen wurden jedoch nicht gefunden. Chromosomenaberrationen, SCE und der auf Chromosomenaberrationen beruhende Anteil von MN sind das Ergebnis einer fehlerhaften Reparatur („Misrepair“) von direkten oder indirekten DNA-Schäden. Behinderungen der äußerst komplexen Reparaturvorgänge würden das Risiko von fehlerhaften Reparaturen verstärken und die Aberrationshäufigkeiten erhöhen. Entsprechende Analysen, bei denen Zellen mit typischen Mutagenen zusammen mit HF-Feldern behandelt wurden, führten in Kombination mit chemischen Mutagenen (vgl. [Baohong et al., 2005; Maes et al., 2001]) zu uneinheitlichen und in Kombination mit ionisierenden Strahlen [Stronati et al., 2006] zu eindeutig negativen Ergebnissen. Direkte und indirekte Schäden in der zellulären DNA bedingen in den meisten Fällen eine Verzögerung des Zellzyklus und lösen Nekrose oder Apoptose aus. Diese Effekte wurden nach Einwirkung von HF-Feldern auch bei positiven zytogenetischen Befunden häufig nicht gefunden, was auf methodische Probleme bei den entsprechenden Arbeiten hinweist.

In zytogenetischen Tests zur Wirkung von HF-Feldern wurden unterschiedlichste Zelltypen eingesetzt, wie menschliche Lymphozyten aus dem peripheren Blut, primäre menschliche Fibroblasten sowie transformierte menschliche und tierische Zellen. Die verschiedenen

Zelltypen könnten unterschiedlich auf Testagenzien reagieren. Direkt wirkende Agenzien, wie ionisierende Strahlen, führen bei allen Zellen zu DNA-Schäden und in deren Folge zu chromosomalen Veränderungen, deren quantitative Ausprägung zellspezifisch unterschiedlich sein kann. Allerdings ist nicht bekannt, dass direkt wirkende Agenzien bei bestimmten Zelltypen unwirksam sind. Bei indirekten Wirkungen könnten größere Unterschiede auftreten. Die Entstehung von ROS unter Einwirkung von Feldern könnte zelltypspezifisch verschieden sein. ROS könnten eventuell nur in stimulierten (in der Zellkultur unter dem Einfluss mitogener Stimulation), nicht aber in unstimulierten Lymphozyten (Zustand der Zellen im peripheren Blut) induziert werden. Negative zytogenetische Befunde nach Exposition sowohl von stimulierten als auch von unstimulierten Lymphozyten [Vijayalaxmi, 2006; Zeni et al., 2003] sprechen allerdings dagegen, dass der Zustand der Lymphozyten einen Einfluss auf die Bildung von ROS haben könnte; es sei denn, man würde die nicht eben plausible Annahme machen, in Lymphozyten könnten grundsätzlich keine ROS gebildet werden. HL60-Zellen, in denen die Induktion von ROS nach Einwirkung von Feldern vermutet wurde, sind Leukämiezellen, die Lymphozyten ähnlich sind. Zur möglichen Induktion von Gen- oder Punktmutationen unter der Einwirkung von Feldern wurden nur wenige Studien durchgeführt [Chang et al., 2005; Gos et al., 2000], die jedoch die negativen Studien zur Induktion chromosomaler Veränderungen bestätigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich auch aus der neueren Literatur kein wissenschaftlich begründeter Verdacht auf eine genotoxische Wirkung von HF-Feldern ergibt.

Die Ergebnisse der wenigen systematisch geplanten Replikationsversuche ursprünglich positiver Befunde waren ausnahmslos negativ.

6 Genexpression

Um der Frage nachzugehen, ob HF-Felder die Genexpression beeinflussen können, wurde die neuere Literatur ab 2001 ausgewertet. Auch die Ergebnisse zur Genexpression, die im REFLEX-Abschlussbericht erwähnt sind, wurden berücksichtigt. Die in der Empfehlung der Strahlenschutzkommission aus dem Jahr 2001 [SSK, 2001] gezogenen Schlussfolgerungen (Kapitel „Untersuchungen zu krebsrelevanten Proteinen, Krebsentstehung und -promotion“) zur Genexpression sind weiterhin aktuell. Hier wurden sowohl Genexpressionsstudien wie auch Arbeiten zur Genotoxizität bis 2000 behandelt. Die SSK hatte folgende Schlussfolgerung gezogen: „Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Untersuchungen zu krebsrelevanten Proteinen, Krebsentstehung und Krebspromotion ein sehr uneinheitliches Bild liefern. Inwieweit die einzelnen und nicht reproduzierten Hinweise eine Bedeutung für gesundheitliche Beeinflussungen haben, muss durch weitere Forschungen geklärt werden.“ In der Zeit bis heute sind eine Reihe neuerer Erkenntnisse auf dem Gebiet der Genexpression gewonnen worden, die hier dargestellt werden.

Zur Verbesserung der Übersicht wurden die Publikationen zur Genexpression in zwei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe werden Arbeiten vorgestellt, in denen Zellen direkt exponiert wurden (*in-vitro*-Exposition). In der zweiten Gruppe werden Arbeiten zusammengefasst, bei denen Zellen untersucht wurden, die aus zuvor exponierten Tieren (*in-vivo*-Exposition) isoliert wurden.

6.1 *In-vitro*-Exposition

6.1.1 Genspezifische Untersuchungen

Zahlreiche Arbeiten im Bereich Genregulation beschäftigen sich mit dem Einfluss von HF-Feldern auf „Heat Shock“-Proteine. Diese Arbeiten werden größtenteils in diesem Kapitel vorgestellt.

Die an der REFLEX-Studie beteiligte Gruppe von Leszczynski untersuchte in drei publizierten Arbeiten [Leszczynski et al., 2002, Leszczynski et al., 2004, Nylund und Leszczynski, 2004] die Effekte von GSM 900 MHz bei einer SAR zwischen 2-5 W/kg auf EA.hy929 humane Endothelzellen. In diesen Arbeiten wurden die Zellen stets für nur 1 Std. in einem wassergekühlten Resonator exponiert (in An- oder Abwesenheit von ³²P-markiertem Phosphat). Danach wurden die zellulären Proteine auf 2-D-Gelen aufgetrennt und die Proteinmengen nach einer sensitiven Silberfärbung sowie die Phosphorylierung nach Autoradiographie densitometrisch vermessen. In der ersten Arbeit [Leszczynski et al., 2002] wurde berichtet, dass 67 Phosphoproteine offenbar durch Exposition dephosphoryliert und 324 de novo phosphoryliert wurden. Wenngleich in dieser Studie nicht klar wird, wie reproduzierbar diese Effekte sind, und die Proteine mit veränderter Phosphorylierung nicht identifiziert wurden, so konnte in zusätzlichen Experimenten belegt werden, dass die Expression und Phosphorylierung des hsp27 durch 1-stündige Exposition erhöht werden. Dieser Anstieg trat nur direkt nach der Exposition auf, bereits eine Stunde später war das hsp27 auf die Kontrollkonzentration zurückgegangen. Die Expression wurde einmal mit Immunfluoreszenz an ganzen Zellen gezeigt und zum anderen an Proteinextrakten der Zellen mit „Western-Blot“-Analyse. Auch die Phosphorylierung von hsp27 wurde in „Western-Blots“ demonstriert. Da in der verwendeten Expositionseinrichtung nur geringe Temperaturschwankungen um $\pm 0,3$ °C gemessen wurden, wurde ein reiner Temperatur-Effekt (Hitzeschock) ausgeschlossen. Ein Inhibitor der p38MAP-Kinase verhinderte die Phosphorylierung, was auf eine Beteiligung des MAP-Kinase-Signalwegs, der durch verschiedene Stress-Signale aktiviert wird, hinweist.

In der zweiten Studie [Nylund und Leszczynski, 2004] konnten bei weitgehend identischer Versuchsanordnung nach Auswertung von je 10 unabhängigen Proben aus exponierten und scheinexponierten Proben 38 Proteinspots identifiziert werden, deren Expression auf Proteinebene durch die Exposition statistisch signifikant verändert war. Vier regulierte Proteine – 2 verschiedene Vimentinvarianten, Isocitratdehydrogenase-3 α und „Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H1“ – konnten durch Massenspektroskopie identifiziert und ihre Regulation durch Immunocytochemie bzw. „Western-Blot“-Analyse bestätigt werden. Durch Immunfluoreszenz-Analyse und FACS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass eine ein-stündige Exposition eine Assoziation des ursprünglich diffus verteilten Zytoskelettproteins Vimentin mit F-Actin Stressfasern induziert. Ob es sich nur um eine transiente oder eine persistierende Veränderung des Zytoskeletts handelt, bleibt unklar. In einer weiteren von Leszczynski et al. (2004) publizierten Studie wurden diese Befunde noch einmal bestätigt.

Im Rahmen der REFLEX-Studie wurde von der Arbeitsgruppe Lagroye versucht, die Ergebnisse von Leszczynski und Mitarbeitern zu hsp27 an EA.hy929-Zellen [Leszczynski et al., 2002, Leszczynski et al., 2004, Nylund und Leszczynski, 2004] zu reproduzieren [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Lagroye]. Allerdings hat die Arbeitsgruppe Lagroye ihre Messungen weder in dem Wellenleiter-Resonator von Schuderer et al. (2004b), noch in dem von Leszczynski verwendeten Resonator vorgenommen, sondern in einer „wire-patch cell“. Die Zellen wurden für 1 h bei 900 MHz und 2 W/kg SAR dem Feld ausgesetzt und hsp27 sofort im Anschluss an die HF-Feld Exposition immunhistochemisch bestimmt. Die quantitative Bildanalyse zeigte keinen Einfluss des HF-Feldes. Es gelang also nicht, die Ergebnisse von Leszczynski und Mitarbeitern zu reproduzieren. Zusätzlich wurde hsp70 in

der menschlichen neuronalen Zelllinie SH-SY5Y und in zwei Glia-Zelllinien human (U87) und Ratte (C6) nach 24 h Feldexposition bei 900 MHz und 2 W/kg mit den gleichen Methoden untersucht. Auch hier ließ sich kein Einfluss des Feldes nachweisen. In allen drei Zelllinien führte Erwärmung als Positivkontrolle zu der erwarteten hsp-Erhöhung. Zusätzlich hat die Arbeitsgruppe an den neuronalen Zelllinien, SH-SY5Y und U87, sowie an einer Immunzelllinie aus menschlichen Monozyten (U937) und außerdem an Primärkulturen von Neuronen und Gliazellen aus dem Rattenkleinhirn Apoptose untersucht. Dabei wurde in allen Fällen die in Kap. 3.1.4 beschriebene Methode der Annexin V-Bindung angewendet. Die zwei neuronalen Zelllinien, SH-SY5Y und U87, wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen dem Feld ausgesetzt. Die Exposition im HF-Feld hatte keinen Einfluss auf die Annexin-Bindung. Die Primärzellkulturen wurden entweder für eine Stunde oder 24 h dem 900 MHz Feld von 2 W/kg ausgesetzt. Die Annexin V-Bindung wurde 4, 8 oder 24 h nach dem Beginn der Exposition bestimmt. Alle Befunde waren negativ. Die U937-Monozyten wurden entweder für 1 h oder für 48 h einem 900 MHz Feld von 0,7 W/kg ausgesetzt. Zusätzlich wurde eine Kombination eines Apoptose auslösenden Agens (Camptothecin) und Feld-Exposition getestet. Die entsprechenden Zellen wurden für 1 h einem 0,7 W/kg oder einem 2 W/kg Feld ausgesetzt und dann mit Camptothecin behandelt. Auch in diesen Experimenten ließ sich kein Einfluss des Feldes feststellen. In einer weiteren Serie von Experimenten hat die Arbeitsgruppe die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und die Aktivität dieses Enzyms in den C6-Zellen getestet. Die iNOS-Expression wurde im „Western-Blot“ nachgewiesen und NO wurde als Nitrit (Griess-Reaktion) gemessen. Mit Hilfe von Lipopolysaccharid (LPS) wurde die iNOS in einer Positivkontrolle induziert. Die C6-Zellen wurden für 48 h einem 900 MHz Feld von entweder 0,2 oder 2 W/kg ausgesetzt und anschließend die iNOS und NO bestimmt. Die Positivkontrolle wurde auch noch in eine schein- und eine HF-exponierte (2 W/kg, 48 h) Gruppe aufgeteilt. In den Gruppen ohne LPS-Stimulation konnte keine Veränderung in der iNOS-Expression oder der NO-Produktion durch die Feldexposition nachgewiesen werden. Die LPS-Stimulation selbst führte zu einem 20fachen Anstieg der NO-Produktion. Das zusätzlich angewendete Feld hatte keinen weiteren Einfluss darauf. Insgesamt erzielte die Arbeitsgruppe nur negative Ergebnisse. Die umfangreichen Untersuchungen sind an vielen Stellen nur wenig ausreichend erklärt, z. B. fehlt in der Regel eine Begründung für die eingesetzten Expositionszeiten oder SAR-Werte.

Wesentlich stärkere HF-Felder wurden in einer Studie von Tian et al. (2002) in ihrem Einfluss auf „Heat Shock“-Proteine getestet. Es wurde die Expression von hsp70 nach einer Exposition im unmodulierten 2450 MHz-Feld bei SAR-Werten von 5, 20, 50, 100 W/kg verfolgt. Als Untersuchungsobjekt dienten Zellen einer Linie eines menschlichen Tumors des Nervensystems, nämlich von Gliazellen, MO54. Nur bei SAR-Werten von mehr als 20 W/kg kam es zu einem zeitabhängigen Anstieg der Expression von hsp70. Ein SAR-Wert von mehr als 20 W/kg ist jedoch weit oberhalb der Grenzwerte.

Die Induktion von hsp27 und hsp70 wurde in einer zweiten Arbeit an MO54-Zellen von derselben japanischen Arbeitsgruppe untersucht [Miyakoshi et al., 2005]. Die Arbeitsgruppe verwendete dieselbe Expositionsapparatur wie die meisten im REFLEX-Konsortium [Schuderer et al., 2004b], hier wurden CW-Felder von 1950 MHz für 10 und 30 min sowie für 1 und 2 h verwendet. Die SAR-Werte lagen bei 1, 2 und 10 W/kg. Untersucht wurden die Zellproliferation mit Hilfe eines automatischen Zählverfahrens bis zu vier Tage nach der Exposition und die Expression von hsp27 und hsp70 sowie die hsp27-Phosphorylierung mit „Western-Blot“. Zusätzlich wurde die Lokalisation von hsp27 mit Immunocytochemie verfolgt. Als Positivkontrolle diente eine Erwärmung der Kulturen auf 43 °C. Weder die Lokalisation von hsp27 noch die Expression von hsp27 und hsp70 wurden durch die unterschiedlichen Expositionsmuster beeinflusst. Allerdings war die Phosphorylierung von hsp27 nach 1 und 2 h bei 10 W/kg erniedrigt, also deutlich über dem Grenzwert. Die Positivkontrollen

zeigten eine klare Steigerung der Expression beider „Heat Shock“-Proteine und auch die Translokation von hsp27 in den Zellkern. Die Bedeutung dieses Befundes bleibt unklar, insbesondere da Leszczynski et al. (2002) eine zusätzliche Phosphorylierung unter 900 MHz-Feld bei 2 W/kg gezeigt haben.

In einer Studie von Simko et al. (2006) wurde hsp70 an einer Monozyten Leukämie-Zelllinie (Mono Mac 6) untersucht. Die Zellen wurden in der von Schuderer et al. (2004a, b) entwickelten Apparatur bei 1800 MHz, einer SAR von 2 W/kg im CW-, GSM-Basic- (hier als GSM-nonDTX bezeichnet) oder GSM-217 Hz-Modus für 1 h exponiert. Als Positiv-Kontrolle diente eine Erwärmung auf 42-43 °C. Als weiterer Einflussparameter dienten ultrafeine Partikel (Feinstaub; Durchmesser 12-14 nm, 100 µg/ml). Die Expression von hsp70 wurde mit Antikörpern im Durchflusszytometer und im „Western-Blot“ nachgewiesen. Neben hsp70 wurden Superoxid-Radikale als biologischer Endpunkt gemessen. Superoxid-Radikale reduzieren Cytochrom³⁺ zu Cytochrom²⁺, welches über seine spezifische Lichtabsorption nachgewiesen wurde. Sowohl der Hitzereiz als auch die ultrafeinen Partikel erhöhten die Superoxid-Radikal-Konzentration, nicht jedoch die HF-Felder allein, auch in Kombination mit den Feinstaubpartikeln hatten die HF-Felder keinen zusätzlichen Einfluss. In Bezug auf die Expression von hsp70 erwiesen sich sowohl die Feinstaubpartikel wie die HF-Felder als unwirksam, lediglich die Temperaturerhöhung zeigte eine positive Wirkung.

In einer zweiten Studie hat die Arbeitsgruppe von Simko wieder an Mono Mac 6-Zellen und auch an einer weiteren Linie (K562) freie Radikale und hsp70 untersucht [Lantow et al., 2006]. Phorbolster (PMA), Lipopolysaccharide (LPS) und Erwärmung auf 40 °C dienten als Positivkontrollen. Die HF-Felder von 1800 MHz wurden als GSM-Basic, GSM-DTX und GSM-Talk bei 0,5, 1,0, 1,5 und 2 W/kg angewendet. Auch bei dieser Studie konnte mit den HF-Feldern weder die hsp70-Expression noch die Konzentration von freien Radikalen erhöht werden. PMA und Wärme steigerten die Produktion von freien Radikalen allein und in Kombination mit HF-Feld, jedoch hatte dabei das HF-Feld keinen zusätzlichen Einfluss.

Lee et al. (2006) haben eine Studie speziell zur Analyse des Einflusses von HF-Feldern auf die Expression von Genen, die durch zellulären Stress induziert werden, durchgeführt. Dabei haben sie die Expression von hsp27, hsp70 und hsp90 ebenso verfolgt wie Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs). Es dienten T-Lymphozyten der Linie Jurkat und Zellen einer Primärkultur aus dem Gehirn der Ratte (Astroglia) als Präparate. Die Zellen wurden in CDMA-Feldern von 1762,5 MHz in einem Hohlleiterresonator bei SARs von 2 oder 20 W/kg für 30 oder 60 min exponiert. Bei den Experimenten wurde die Wärme durch eine effiziente Kühlung abgeführt. Um die MAPKs zu induzieren, wurden zusätzlich Versuche mit Phorbolster-Stimulation durchgeführt. Weder Phorbolster noch HF-Felder führten zu einer Induktion der hsp-Expression. Auch die MAPKs ließen sich durch die HF-Felder nicht induzieren. Bei der kombinierten Anwendung von HF-Feld und Phorbolster wurde durch das Feld keine zusätzliche Stimulation erreicht.

Die in Kap. 5.2.4 bereits unter dem Aspekt genotoxischer Wirkungen besprochenen Arbeiten aus der REFLEX-Studie aus der Arbeitsgruppe Wobus [Czyz et al., 2004; Nikolova et al., 2005] werden hier nochmals erwähnt, da sie neben den zytogenetischen Untersuchungen auch umfangreiche Experimente zur Genexpression enthalten. Die Expositionseinrichtung wurde schon in Kap. 5.2.4 vorgestellt. Die pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES) der Maus wurden HF-Feldern bei einer mittleren SAR von 0,11-2 W/kg und 1,71 GHz und drei verschiedenen Modulationsformen (GSM 217 Hz, GSM-Basic, GSM-DTX) ausgesetzt. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die Expression von Stress-, Proliferations- und Apoptose-assoziierten Genen (hsp70 vgl. Kap. 3.2.7, egr-1, c-myc, c-jun, p21 und bcl-2 vgl. Kap. 3.1.4) in 3-6 unabhängigen Experimenten mit 1-2 Replikaten analysiert. Dabei wurden Proben entweder nach 6 oder 48 h Exposition direkt untersucht oder nach anschließender Suspensionskultur (5 Tage) und erneutem Plattieren *in vitro* zur Differenzierung in Herz-

muskelzellen angeregt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung untersucht. Exposition mit GSM-Basic und GSM-DTX für 6 oder 48 h bewirkte zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der Expression der gemessenen mRNAs in R1, Wildtyp ES-Zellen (vgl. Kap. 3.1.4) sowie P19 EC-Zellen. Dagegen induzierte 48-stündige GSM-217 Hz-Exposition in den p53-defizienten ES-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante, bis zu 2,5fache Erhöhung der hsp70 mRNA, während in den Wildtyp-Zellen keinerlei Veränderung beobachtet wurde. C-jun, c-myc und p21 waren ebenfalls spezifisch in den p53-defizienten Zellen jeweils nur zu einem der untersuchten Zeitpunkte leicht erhöht. Der Zellzyklus von P19-Zellen und die Differenzierung von R1-Zellen in Herzmuskelzellen waren durch die Exposition nicht verändert, so dass eine nachhaltige Veränderung der biologischen Eigenschaften dieser exponierten Zellen in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Ob dies auch für die p53-defizienten ES-Zellen gilt, die transiente und persistierende Expressionsänderungen einzelner Gene gezeigt hatten, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

In der zweiten Studie [Nikolova et al., 2005] wurde der Einfluss von HF-EMF (1,71 GHz) auf neural differenzierende ES-Zellen der Maus untersucht. In diesem Ansatz wurden die Zellen während der Differenzierungsphase für 6 oder 48 h bei einer SAR von 1,5 W/kg mit GSM 217 Hz exponiert und dann zu verschiedenen Zeitpunkten nach Exposition mittels semi-quantitativer oder quantitativer RT-PCR analysiert. Nach Auswertung von je 5 unabhängigen biologischen Replikaten mit je zwei RT-PCR-Ansätzen wurde zu jeweils einem der 3-4 untersuchten Zeitpunkte nach Exposition eine 10-20% erhöhte mRNA-Menge für die Apoptose-assoziierten Gene bax und GADD45 sowie eine ca. 50%ige Reduktion der Nurr1 mRNA ermittelt. Für die ebenfalls untersuchten bcl-2, p53, Nestin und Tyrosinhydroxylase wurden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen scheinexponierten und exponierten Zellen gefunden. Ein Einfluss der Exposition auf die Proliferation (BrdU-Inkorporation) oder eine Veränderung des Anteils apoptotischer Zellen (FACS nach Propidiumjodid-Färbung) konnte nicht nachgewiesen werden, so dass unklar bleibt, ob die transienten Veränderungen der Expression einzelner mRNAs irgendwelche relevanten Auswirkungen haben.

In einer weiteren Publikation, die aus dem REFLEX-Konsortium (Arbeitsgruppe Bersani) hervorgegangen ist, wurde die Apoptose und die Expression von hsp70 in Lymphozyten aus dem peripheren Blut junger (27 ± 5 Jahre) und alter (88 ± 1 Jahr) Spender untersucht [Capri et al., 2004a]. Die Exposition erfolgte in dem von Kuster und Mitarbeitern entwickelten Wellenleiter-Resonator [Schuderer et al., 2004b] bei 1800 MHz für 44 h entsprechend einem Muster 10 min an und 20 min aus bei einer SAR von 2 W/kg GSM-217 Hz-Basic, 2 W/kg GSM-Talk und 1,4 W/kg GSM-DTX. Es wurden die Parameter Apoptose anhand der Annexin-Bindung an die Zelloberfläche und des mitochondrialen Membranpotentials sowie die Expression von hsp70 mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Apoptose wurde zusätzlich durch 2-desoxy-D-Ribose ausgelöst, dies diente einerseits als Positivkontrolle, andererseits wurden auch die behandelten Zellen den Feldern ausgesetzt, um ihre Wirkung auf eine bereits eingeleitete Apoptose zu verfolgen. Bei keiner der Gruppen und keinem der untersuchten Parameter ließ sich ein Einfluss der HF-Felder nachweisen. Besonders hervorzuheben ist hier der negative Befund zu hsp70.

In der Original REFLEX-Studie hat die Arbeitsgruppe noch weitere Parameter an den peripheren Lymphozyten untersucht und zwar die Expression des Zytokins IL-1 β und des Immunmarkers CD95. Die CD95-Expression war in Zellen aus den alten Spendern nach der Exposition im GSM-Talk-Modus geringfügig, aber signifikant reduziert, während die IL-1 β -Expression ebenfalls in Zellen aus alten Spendern nur nach der DTX-Exposition in ähnlicher Weise reduziert war [European Union, 2004a]. Beide Befunde bedürfen nach Meinung der Autoren aber einer weiteren Untersuchung. Bezüglich der CD95-Expression hat die gleiche Arbeitsgruppe einen Vergleich der Expression von CD25, CD95 und CD28 in stimulierten

und unstimulierten CD4⁺ und CD8⁺ positiven Zellen junger und alter Spender veröffentlicht [Capri et al., 2006]. Die Altersverteilung der Spender war ähnlich der in der Studie aus 2004 [Capri et al., 2004b]. Es wurde in derselben Apparatur wie in der REFLEX-Studie bei 1800 MHz, GSM-Talk, einer SAR von 2 W/kg für 44 h (10 min an, 20 min aus) exponiert. Die Expression der Oberflächenmarker CD4, CD8, CD25, CD28 und CD95 wurde mit fluoreszierenden Antikörpern in der Durchflusszytometrie vorgenommen. Es wurden bei dieser Studie bei zwei Altersgruppen zwei Zelltypen auf jeweils drei Antigene, sowohl exponiert als auch scheinexponiert, untersucht. Durch die Stimulation wurden, wie erwartet, die CD25-Moleküle auf CD4⁺- und CD8⁺-Zellen heraufreguliert, aber in dem Blut der alten Spender fanden sich signifikant weniger CD4⁺-Zellen als in dem der jungen Spender. Dies führt bei den alten Spendern zu einem Verhältnis CD4/CD8 <1, was als Zeichen für ein geschwächtes Immunsystem angesehen wird. In der Gruppe der alten Spender zeigte sich nach Exposition eine leicht verringerte CD95-Expression in CD4⁺-Zellen. Bei CD95 handelt es sich um einen Aktivator der Apoptose. Die Autoren schreiben, dass noch offen ist, ob dieser Befund, wenn er sich bestätigen sollte, positiv oder negativ ist.

In der REFLEX-Studie hat die Arbeitsgruppe Bersani außerdem an Thymuszellen neugeborener Kinder Untersuchungen vorgenommen. Thymusabschnitte wurden einem 1800 MHz GSM-DTX (1,4 W/kg) Feld von 10 min an, 20 min aus für 24 h ausgesetzt. 24 bzw. 48 h nach der Exposition wurde die Expression von CD4-, CD8-, CD16-, T-Zell- und Transferrinrezeptor untersucht. Der Transferrinrezeptor diente als Hinweis auf proliferierende Zellen, zusätzlich wurde der Proliferationsindex bestimmt. Keiner der Endpunkte wurde durch die Exposition beeinflusst.

In einer weiteren Studie hat wieder die Arbeitsgruppe um Bersani [Capri et al., 2004b] Lymphozyten aus dem Blut junger Spender (27 ± 5 Jahre) untersucht. Im Unterschied zur vorhergehenden Studie wurde hier eine TEM-Zelle als Expositionsapparatur eingesetzt. In dieser Zelle wurden zwei Feldformen 900 MHz, CW und 900 MHz, GSM, welches von einem Mobiltelefon erzeugt wurde, also nicht als synthetisches Signal wie in der REFLEX-Studie, angewendet. Die SAR-Werte waren im Vergleich zur REFLEX-Studie mit ca. 0,07 W/kg niedrig. Die Lymphozyten wurden drei Tage für jeweils eine 1 h dem Feld ausgesetzt. Als Endpunkte dienten die Mitogen-induzierte Zellproliferation, die Apoptose und das Membranpotential der Mitochondrien. Die Methodik bei der Apoptose und dem Membranpotential der Mitochondrien war dieselbe wie bei Capri et al. (2004a). Das CW-Feld beeinflusste keinen der gemessenen Parameter, im Gegensatz dazu zeigte sich unter dem GSM-Feld bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von Mitogen eine geringe, aber signifikante Verzögerung der Zellproliferation und eine geringe Erhöhung der Annexin-Bindung als frühen Parameter der Apoptose. Die beiden anderen Endpunkte wurden auch durch das GSM-Feld nicht beeinflusst. Die Erhöhung der Annexin-Bindung als sehr früher Apoptose-Marker wird von den Autoren in ihrer Diskussion als nicht so aussagekräftig qualifiziert, da ein Nachweis eines weiteren Fortschreitens der Zellen in die Apoptose nicht gelungen ist. Die Verringerung der Zellvermehrung könnte nach Meinung der Autoren auf eine verminderte Bindung des Mitogens Phytohämagglutinin an die Zellen unter dem Feld zurückzuführen sein, da sie nur bei der geringsten Konzentration auftrat.

Ein bisher in wissenschaftlichen Zeitschriften unveröffentlichtes Teilprojekt der PERFORM B-Studie (vgl. Kap. 1.2) beschäftigt sich mit der Frage, ob sich die Expression von Ornithin-decarboxylase durch HF-Felder beeinflussen lässt [European Union, 2004b]. ODC gilt als Markerenzym für die Zellvermehrung, eine Heraufregulation wird als ein früher Indikator für eine Zellproliferation angesehen. Die Überexpression von ODC kann zur neoplastischen Transformation von Zellen führen [Auvinen et al., 1992]. In einer Arbeit an L929-Fibroblasten hat die Arbeitsgruppe um Litovitz einen Anstieg der ODC-Aktivität nach Exposition in HF-Feldern von amerikanischen Mobiltelefonen (Digital Advanced Mobile Phone System,

DAMPS-835 MHz), nicht jedoch in CW-Feldern der gleichen Frequenz festgestellt [Penafiel et al., 1997]. In der Studie von Penafiel et al. (1997) wurde die Aktivität der ODC gemessen, wobei eine Steigerung der Aktivität auf einer erhöhten Expression beruhen kann. Daher wurde das Projekt in die vorliegende Auswertung aufgenommen. Zur Reproduktion der Penafiel-Experimente wurde die Original-TEM-Zelle nachgebaut, optimiert und neu vermessen [Nikoloski et al., 2005]. Dabei stellte sich heraus, dass die Effizienz des Aufbaus deutlich höher war als ursprünglich bei Penafiel, angegeben war ein SAR von 2,5 W/kg bei 0,96 W Eingangsleistung. Bei der Reevaluation zeigte sich ein SAR 5,8 W/kg bei 0,96 W Eingangsleistung, außerdem wurde eine Temperaturerhöhung von ca. 0,8 °C gemessen. Entsprechend sind die bei Penafiel et al. (1997) angegebenen SAR-Werte vermutlich um den Faktor 2,3 zu niedrig. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Reproduktionsversuche sowohl mit 2,5 als auch mit 6 W/kg durchgeführt. Die Versuche wurden, wie die in Kapitel 5.2.2 beschriebenen aus der PERFORM B-Studie, von zwei Institutionen parallel vorgenommen: Laboratoire de Physique des Interactions Ondes-Matière, PIOM, Frankreich und University of Kuopio, Department of Environmental Sciences, UKU, Finnland. Es wurden drei verschiedene Unterlinien der L929-Fibroblasten eingesetzt, da die Originallinie aus der Arbeitsgruppe von Litovitz nicht mehr verfügbar war. Die Zellen wurden für 2, 8 und 24 h den Feldern ausgesetzt. Unter keiner der unterschiedlichen Bedingungen kam es zu einer Erhöhung der ODC-Aktivität. Damit war die eigentliche Reproduktion gescheitert.

Über den eigentlichen Reproduktionsversuch hinaus haben die Untersucher noch weitere Experimente vorgenommen. Sie haben den auch in vielen anderen Untersuchungen eingesetzten Wellenleiter-Resonator nach Schuderer et al. (2004a) verwendet und darin die DAMPS-835 MHz-Signale zur Exposition der L929-Fibroblasten für 8 h bei 0,5, 1 und 2,5 W/kg vorgenommen. Zusätzlich wurde ein wassergekühlter Hohlraumresonator zur Exposition der Fibroblasten für 8 h bei 2,5 W/kg eingesetzt. Auch in diesen Versuchen ließ sich keine Aktivierung der ODC erzielen. In einer weiteren Versuchsserie wurden HF-Felder mit GSM-Modulationen getestet, also mit 217 Hz Pulsung, und alternativ CW. Dabei verblieben die Fibroblasten für zwischen 2 und 24 h in den HF-Feldern von 872, 900 und 1800 MHz bei SAR-Werten bis 5 W/kg. In keinem der Versuche ließ sich eine erhöhte ODC-Aktivität feststellen. Insgesamt wurden in allen Versuchen 5 verschiedene Expositionssysteme und Trägerfrequenzen von 835, 872, 900 und 1800 MHz mit zahlreichen Pulsungsmustern eingesetzt. Neben den L929-Zellen wurden menschliche Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y und C6-Ratten-Glioblastomzellen für 8 h bei einer SAR von 2 W/kg in GSM- und in DAMPS-Feldern exponiert. Auch hier zeigte sich kein Einfluss auf die ODC-Aktivität. Dieses ist eine sehr umfangreiche Studie, die die früheren Befunde von Penafiel et al. (1997) nicht bestätigen und auch bei erweiterten Experimenten keinen signifikanten Einfluss von HF-Feldern auf die ODC zeigen konnte. Eine weitere Arbeit zu ODC findet sich in Kap.6.2 [Heikkinen et al., 2003].

Weitere bisher unveröffentlichte Untersuchungen zur Genexpression im Rahmen der REFLEX-Studie [European Union, 2004a] wurden von der Arbeitsgruppe Trillo durchgeführt. Menschliche Neuroblastoma-Zellen der Linie NB69 und neuronale Stammzellen der Ratte wurden in dem Wellenleiter-Resonator [Schuderer et al., 2004b] bei 1800 MHz einer SAR von 1-2 W/kg im CW-, Talk-, Basic- oder DTX-Modus in „5 Minuten an“, „10 Minuten aus“-Zyklen exponiert. Die NB69-Zellen verblieben 24 h, die neuronalen Stammzellen 21 h im Feld. Die NB69-Zellen wurden nach der Exposition für 24 h weiter kultiviert, dann wurde die Lebensfähigkeit („viability“) und Vermehrung der Zellen bestimmt. Die neuronalen Stammzellen wurden nach der Feldanwendung 48 h kultiviert und wie die NB69-Zellen untersucht. Das HF-Feld nahm keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit und Zellvermehrung. Zur Bestimmung ihrer Differenzierungsfähigkeit auf Retinol wurden die Zellen sechs Tage nach der Exposition kultiviert, anschließend wurde immuncytochemisch die

Differenzierung in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neurone anhand von spezifisch exprimierten Proteinen nachgewiesen. Die Differenzierung der NB69-Zellen blieb vom Feld unbeeinflusst, die neuronalen Stammzellen dagegen differenzierten sich nach Exposition bevorzugt zu Oligodendrozyten und Astrozyten. Als Positivkontrolle diente bFGF (basic fibroblast growth factor), welches die Differenzierung zu Neuronen bewirkt. Zusätzlich zu den Differenzierungsmarkern wurde auch die Expression der drei verschiedenen FGF-Rezeptoren immunocytochemisch überprüft. In Anwesenheit von FGF wird die Expression der FGF-Rezeptoren herunterreguliert. Eine Herunterregulation des FGF-Rezeptors 1 in NB69-Zellen ergab sich auch unter dem GSM-Basic- und CW-Signal, nicht jedoch unter GSM-Talk oder -DTX. Die Veränderung des FGF-Rezeptors war jedoch nicht von einem Einfluss auf das Differenzierungsverhalten zu Neuronen begleitet, eigentlich ein Widerspruch zu dem Ergebnis der FGF-Rezeptorexpression. Eine Unterdrückung der FGF1-Rezeptorexpression zeigte sich in den neuronalen Stammzellen nicht. Die Ergebnisse bedürfen nach der Meinung der Autoren weiterer Überprüfung.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch zellulären Stress aktiviert und ist daher im Zusammenhang mit der Wirkung von gepulsten HF-Feldern untersucht worden [Natarajan et al., 2002]. Bei der Arbeit kam es darauf an, möglichst intensive Pulse zu erzeugen, da die Wirkung der Pulsung getestet werden sollte. Als Expositionsapparatur diente eine Hornantenne in einer Absorberkammer. Die Trägerfrequenz von 8,2 GHz wurde ausgewählt, da hier eine Strahlungsquelle verfügbar war, die eine entsprechende Pulsung zuließ. Die Pulsdauer war 2,2 μ s bei einer Wiederholungsfrequenz von 1000 Hz („duty cycle“ 1:455). Es wurden menschliche Monozyten dem Feld für 90 min ausgesetzt, wobei der SAR-Wert am Boden der Kulturflasche $10,8 \pm 7,1$ W/kg betrug. Über der Höhe der Kulturflasche zeigte sich eine große Inhomogenität des Feldes (52 dB), zudem ergaben sich an vielen Stellen der Kulturflasche SAR-Werte deutlich im thermischen Bereich. Immerhin 10% der Zellen waren mindestens 22,05 W/kg ausgesetzt. Insofern könnte die beobachtete Steigerung der NF- κ B-Bindung an die DNA (3,6fach) auf Erwärmung zurückzuführen sein.

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von HF-Feldern auf NF- κ B und Interleukin 6 in Primärkulturen von Gliazellen aus dem Rattengehirn untersucht [Thorlin et al., 2006]. Die Exposition der Kulturen erfolgte in einem Wellenleiterresonator mit Wasserkühlung bei 900 MHz-GSM (Mobiltelefon) bei einer SAR von 3 W/kg für 4, 8, 24 h oder bei 900 MHz-CW bei 27 oder 54 W/kg für 4 oder 24 h. Die Wasserkühlung hielt die Temperatur in engem Rahmen $\pm 0,2$ °C konstant. NF- κ B und Interleukin 6-Protein wurden mit der ELISA-Technik gemessen. Die Exposition bewirkte bei keiner der Proben eine Veränderung der gemessenen Parameter.

Whitehead et al. (2005) exponierten Maus-Fibroblasten (C3H 10T1/2) mit einer SAR von 5-10 W/kg bei etwa 840 MHz und drei verschiedenen Modulationsformen in einer radialen Wellenleitung. In je drei unabhängigen Replikaten wurde die c-fos mRNA mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Im Vergleich zu scheinexponierten Zellen wiesen die exponierten Zellen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Dagegen konnte gezeigt werden, dass Serum-Stimulation, wie erwartet, zu einer transienten Erhöhung der c-fos mRNA führte. Die Autoren beobachteten, dass die c-fos-Expression bei exponierten und scheinexponierten Zellen bei zunehmender Zelldichte in vergleichbarer Weise zunahm, dagegen hatten während der Exposition beobachtete Temperatur-Schwankungen von bis zu ± 1 °C offensichtlich keinen Einfluss.

6.1.2 Genomweite Untersuchungen

Lee et al. (2005a) exponierten humane HL-60-Zellen mit einem gepulsten 2,45 GHz-Signal (Puls-Pausen-Verhältnis 1:13,3) bei einer SAR von 10 W/kg und für 2 oder 6 h in einem Rechteckhohlleiter und führten eine genomweite mRNA-Analyse mittels „Serial Analysis of

Gene Expression“ (SAGE) durch. Im Vergleich zu einer scheinexponierten Probe identifizierten die Autoren nach zwei- und sechsständiger Exposition 221 und 759 Transkripte, die eine mehr als 4fache Expressionsänderung zeigten. Die regulierten Gene konnten diversen funktionellen Kategorien, wie Apoptose, Metabolismus, Transport, RNA-Prozessierung, Zellzyklus, Translation zugeordnet werden; es bleibt aber unklar, ob irgendeine der erwähnten funktionellen Kategorien statistisch signifikant überrepräsentiert ist. Da nur je ein Replikat untersucht wurde und auch keinerlei Validierung an zusätzlichen Proben mit einer alternativen Methode durchgeführt wurde, ist die Zuverlässigkeit der Daten fraglich.

In einer von Leszczynski et al. (2004) publizierten Studie wurden erstmals Ergebnisse von vergleichenden Mikroarray-Analysen mit schein- und EMF-exponierten EA.hy929-Zellen berichtet. Unter einer nicht näher spezifizierten Anzahl von Genen, deren mRNAs reguliert wurden, gehören nach dieser Publikation zahlreiche regulierte Gene zu einem Apoptose-Signalweg. Die Mikroarray-Daten werden allerdings nicht im Detail gezeigt, und die Anzahl der untersuchten Replikate bleibt unklar. Da auch zusätzliche Validierungsexperimente mit alternativen Methoden, z. B. quantitativer RT-PCR, gänzlich fehlen, sind die dargestellten Mikroarray-Daten nur mit großem Vorbehalt zu betrachten. Ergänzend muss bemerkt werden, dass Leszczynski auf der in Kap. 1.2 erwähnten Tagung vergleichbare Befunde zu hsp27 und der Beeinflussung des Zytoskeletts gezeigt hat, die durch Felder von 1800 MHz unter ansonsten gleichen Bedingungen wie bei 900 MHz hervorgerufen wurden. Für diese Experimente wurde der häufig verwendete Wellenleiter-Resonator nach Schuderer et al. (2004b) eingesetzt.

In einer weiteren Versuchsserie aus dem gleichen Labor [Nylund und Leszczynski, 2006] wurde der Einfluss von 900 MHz GSM auf die Genexpression der humanen Endothel-Zelllinie EA.hy926 sowie in einer nah verwandten Zelllinie EA.hy926v1, die durch Subklonierung in einem anderen Labor erzeugt worden war, untersucht. Die Zellen wurden bei einer SAR von 2,8 W/kg für eine Stunde exponiert, dabei traten nur minimale Temperaturschwankungen von $\pm 0,2$ °C auf. Unmittelbar nach Beendigung der Exposition wurde die RNA aus exponierten und scheinexponierten Zellen (je drei Replikate) isoliert und zur Analyse auf einem Array eingesetzt, der Sonden für 1167 Gene enthielt. Nur die Gene, deren Signale einen vom Array-Hersteller vorgegebenen Schwellenwert überschritten, wurden ausgewertet. In der EA.hy926-Zelllinie wurden nach der einstündigen Exposition fünf von 109 ausgewerteten Genen im Mittel mehr als zweifach induziert, während 89 mehr als zweifach reduziert wurden. Bedingt durch die erhebliche Streuung der individuellen Messungen wies allerdings nur ein einziges Gen im T-Test einen signifikanten p-Wert auf. In dem EA.hy926vs-Subklon wurden von 80 ausgewerteten Genen 61 im Mittel mehr als zweifach induziert und zwei mehr als zweifach reprimiert. Im T-Test wiesen aber nur 12 dieser Kandidatengene einen p-Wert $\leq 0,05$ auf, da erneut in vielen Fällen sehr hohe Standardabweichungen zu verzeichnen waren. Die angesichts der beobachteten starken Streuung der Messwerte und der geringen Fallzahl unbedingt erforderliche unabhängige Validierung der regulierten Gene mittels einer robusteren Methode, wie z. B. der quantitativen PCR, erfolgte nicht. Ebenso wurde bei der Auswertung der Arraydaten eine angemessene Fehler-Korrektur oder Abschätzung der „False Discovery Rate“ unterlassen, so dass keineswegs ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei den wenigen „signifikanten“ Genen um „falsch Positive“ handelt.

In der Publikation von Remondini et al. (2006) wurde eine Auswertung aller Arrayexperimente vorgestellt, die im Rahmen der REFLEX-Studie mit Arrays durchgeführt wurden, die insgesamt etwa 75000 cDNS-Sonden enthielten. Laut Übersichtstabelle wurden insgesamt 6 verschiedenen Zelltypen, darunter primäre T-Lymphozyten, HL-60-Zellen, U937 (humane Monozyten) und die von der Leszczynski-Gruppe vielfach untersuchte humane Endothelzelllinie EA.hy926, bei zwei verschiedenen Frequenzen (900 bzw. 1800 MHz), fünf

verschiedenen SARs zwischen 1,0-2,5 W/kg, 5 verschiedenen Modulationsformen in zwei verschiedenen Expositionsgeräten ausgesetzt, was eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten ergibt. Nach welchen Kriterien oder Überlegungen Zelltyp, Frequenz, SAR, Modulation und Gerät in den publizierten 10 verschiedenen Ansätzen ausgewählt wurden, bleibt allerdings weitgehend unklar. Die Anzahl der unabhängigen Expositionsexperimente variierte zwischen 2 und 5, wobei offenbar je zwei Wiederholungshybridisierungen – also technische Replikate – durchgeführt und als unabhängige Beobachtungen in die Auswertung einbezogen wurden. Allerdings finden sich in der Übersicht der experimentellen Ansätze, die insgesamt 33 unabhängige Expositionsexperimente ausweist, und im Ergebnisteil (nur 22 durchgeführte Arrayhybridisierungen) höchst widersprüchliche Angaben. Welche der beiden im Methodenteil beschriebenen statistischen Verfahren in den einzelnen Experimenten zur Anwendung kamen, ist nicht zweifelsfrei nachvollziehbar. Die Autoren berichten, dass in drei der zehn verschiedenen Ansätze nach Exposition regulierte Kandidatengene gefunden werden konnten: 12 in HL-60-Zellen (3 Replikate), 32 in EA.hy926-Zellen (2 Replikate) und 34 in U937 (5 Replikate). Zwei signifikante Zielgene, die in einer unabhängigen Array-Analyse von Nylund und Leszczynski (2006) mit einem wesentlich weniger umfangreichen Array an identisch exponierten EA.hy926-Zellen gefunden wurden, werden durch die Studie von Remondini et al. (2006) nicht bestätigt. Eine Validierung einzelner Kandidatengene mittels einer unabhängigen Methode, wie z. B. der quantitativen RT-PCR (3.2.1), erfolgte nicht. Angesichts der vielen Unklarheiten bei Durchführung, Auswertung und Beschreibung der Daten kann diese Studie eine Regulation der Genexpression durch EMF daher keinesfalls überzeugend belegen.

In einer weiteren Mikroarray-Studie untersuchten Qutob et al. (2006) den Einfluss von pulsmodulierten 1,9 GHz-HF-Feldern (50 Hz, 1/3 duty cycle) auf die Transkription an einer humanen Glioblastom-Zelllinie (U87MG). Die Zellen wurden für 4 h einer SAR von 0,1, 1 oder 10,0 W/kg in einen Wellenleiter ausgesetzt und nach einer weiteren 6-stündigen Inkubation analysiert. Neben den HF-exponierten Zellen wurden Negativ-Kontrollen untersucht sowie Zellen, die für eine Stunde einem Hitzeschock bei 43 °C ausgesetzt wurden (Positiv-Kontrollen). Die Temperaturüberwachung zeigte, dass die Temperatur während der HF-Exposition innerhalb von $37,0 \pm 0,5$ °C gehalten werden konnte. Für alle experimentellen Ansätze wurden je 5 unabhängige Replikate an verschiedenen Tagen durchgeführt und auf einem Array mit Sonden für über 18000 Gene analysiert. Die Auswertung der Daten mittels zweier verschiedener statistischer Methoden für die Analyse von Mikroarray-Daten (MAANOVA und SAM) zeigte übereinstimmend, dass HF-Exposition zwischen 0,1 und 10 W/kg im Vergleich zu den scheinexponierten Kontrollen keine signifikanten Genexpressionsunterschiede bewirkte. Dagegen wiesen die Hitzeschock-behandelten Proben 66 induzierte und 33 reprimierte Gene auf, darunter wie erwartet eine Reihe von „Heat Shock“-Genen. Mittels quantitativer RT-PCR bestätigten die Autoren, dass die Expression von hsp27, hsp40, hsp70A, hsp70B, hsp86 und hsp105 durch Hitzeschock induziert wurde, während bei den gewählten HF-Expositionen keine signifikanten Änderungen auftraten.

Whitehead et al. (2006) untersuchten den Einfluss von CDMA (847,74 MHz)- und FDMA (835,62 MHz)-Feldern für 24 h bei einer SAR von jeweils ca. 5 W/kg auf die Genexpression in C3H 10T1/2-Zellen mit Hilfe einer Arraytechnologie, die die parallele Analyse von ca. 9200 Genen ermöglichte. In dieser Studie wurden für beide Modulationsformen je drei schein- bzw. EMF-exponierte Replikatanalysen durchgeführt und mittels t-Test ausgewertet. Wegen des „Type I error“-Problems (3.2.2) bestimmten die Autoren an den insgesamt sechs scheinexponierten Kontrollen des CDMA- und FDMA-Experimentes, die ja prinzipiell alle identisch sein sollten, in insgesamt 20 Permutationsdatensätzen die bei diesem experimentellen Ansatz zu erwartende Anzahl an falsch Positiven. Die Autoren berücksichtigten bei ihrer Analyse nur die Transkripte, die entweder in allen Kontrollen, exponierten Proben oder

beiden Gruppen als verlässlich gemessen eingeschätzt wurden, was zu einer Verminderung des experimentelles Rauschens führen sollte. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Transkripte mit mehr als 1,3-fachen Genexpressionsänderungen bei CDMA- und FDMA-Exposition etwa gleich groß oder sogar geringfügig kleiner als die zu erwartende Anzahl der falsch Positiven war. Konsequenterweise folgern die Autoren, dass ihre Array-Analysen keine Hinweise auf signifikante Genexpressionsänderungen liefern. In einem ganz analog durchgeführten Kontrollexperiment an mit Röntgenstrahlen (0,68 Gy) behandelten Zellen wurden dagegen deutlich mehr regulierte Kandidatengene gefunden als falsch Positive, darunter war etwa ein Drittel bereits in der Literatur als regulierbar durch Röntgenstrahlen berichtet worden.

6.2 *In-vivo*-Exposition

Belyaev et al. (2006) untersuchten mit Hilfe eine Arrays, der Sonden für ca. 8800 Gene enthielt, Cerebellumgewebe aus Ratten, die mit 915 MHz-GSM-Basic-HF-Feldern in einer TEM-Zelle einmalig für 2 h bei einer SAR von 0,4 W/kg exponiert wurden. Jeweils drei unabhängige Replikatproben von exponierten und scheinexponierten Tieren konnten erfolgreich analysiert werden. Zur Auswertung wurden die Array-Analysen der exponierten Proben kreuzweise mit den Kontrollen verglichen. Für insgesamt elf Gene zeigte sich in allen neun Kreuzvergleichen übereinstimmend eine Erhöhung der Expression in den exponierten Geweben, während für ein Gen konsistent eine Erniedrigung gemessen wurde. Nur bei zwei Kandidaten war die aus den neun Vergleichen gemittelte Expressionsänderung größer als zweifach. Ob die Zahl der mit dieser Auswertestrategie ermittelten Kandidatengene deutlich über der zu erwartenden Anzahl von falsch Positiven liegt, die man bei Kreuzvergleichen von drei und drei Kontrollproben finden würde, wurde nicht ermittelt. Auch in dieser Studie wurde kein Versuch unternommen, die Regulation der Kandidatengene mit Hilfe der quantitativen PCR an weiteren Proben oder auf der Proteinebene zu validieren, so dass sich auch aus dieser Studie keine verlässlichen Hinweise auf GSM-induzierte Genexpressionsänderungen ableiten lassen.

Die erste Arbeit aus dieser Serie wurde mit Hilfe des in Kap. 3.2.7 beschriebenen Reporter-Gen-Nachweises an *Caenorhabditis elegans* durchgeführt [de Pomerai et al., 2000]. Als Expositionseinrichtung diente eine TEM-Zelle, in der der Einfluss eines unmodulierten 750 MHz-Feldes mit einer SAR von 0,001 W/kg bei verschiedenen Temperaturen auf die Expression des hsp16 getestet wurde. Ohne Anwesenheit des Feldes zeigte sich ein deutlicher Anstieg des hsp16 ab 25 °C, wobei ein drastischer Anstieg erst ab 27 °C eintrat. Nach 18 Stunden Exposition im 750 MHz-Feld zeigte sich schon bei 24,5 °C ein drastischer Anstieg des hsp16, der sich bei 25 °C und 25,5 °C noch weiter steigerte. Nach Exposition im Feld stieg die hsp16-Expression so stark an, dass sie bei 25,5 °C deutlich höhere Werte erreichte als bei 28 °C ohne Feld. Mittels Temperaturmessungen wurde eine Erwärmung der Proben durch das Feld ausgeschlossen. Die Autoren interpretieren den Anstieg der hsp16-Expression als einen athermischen Einfluss des HF-Feldes.

In einer Nachfolgestudie hat die gleiche Arbeitsgruppe versucht, eine Erklärung für die Beobachtung einer Temperatur-unabhängigen Induktion von hsp16 zu finden [de Pomerai et al., 2003]. Sie sind dabei von der Hypothese ausgegangen, dass HF-Felder die Aggregation von Proteinen begünstigen. Dabei haben sie die Aggregation von Rinder-Serum Albumin (BSA) nach bis zu 48 h Exposition in einem 1 GHz Feld von 0,5 W (SAR nicht angegeben) bei 37 °C untersucht. Sie haben dieselbe Versuchsanordnung eingesetzt wie bei den Versuchen mit den Nematoden. Sie beschreiben eine erhöhte Aggregation, hervorgerufen durch die Exposition. Diese erhöhte Proteinaggregation könnte die verstärkte Expression von hsp16 auslösen. In einer weiteren Studie hat die Arbeitsgruppe ihre TEM-Zelle genau überprüfen lassen [Dawe et al., 2006], dabei wurde festgestellt, dass unter den Versuchsbedingungen, die

bei den *Caenorhabditis elegans*-Experimenten zugrunde lagen [de Pomerai et al., 2000] während der Exposition eine Temperaturerhöhung von 0,2 °C eintritt. Durch konstruktive Veränderungen an der TEM-Zelle konnte die Temperaturerhöhung während der Exposition auf 0,1 °C reduziert werden. Unter diesen Bedingungen war weder eine Beeinflussung der hsp16-Expression in den Nematoden noch eine veränderte Proteinaggregation von BSA zu beobachten. Die Autoren folgern, dass die ursprüngliche Interpretation eines „nicht-thermischen“ Einflusses der HF-Felder nicht aufrechterhalten werden kann. Man sieht an diesem Beispiel, wie viel Sorgfalt besonders beim Design der Versuchsaapparaturen notwendig ist, um abgesicherte Ergebnisse zu erhalten.

Die Arbeitsgruppe um Litovitz hat an Hühnerembryonen eine Arbeit zur Wirkung von 915 MHz-Feldern auf hsp70 publiziert [Shallom et al., 2002]. Die Embryonen wurden in einer TEM-Zelle bei 37,8 °C in 915 MHz-CW-Feldern für 30 min bei einer geschätzten SAR von 1,75 oder 2,5 W/kg exponiert. Bei der höheren SAR ergab sich eine Erwärmung von ca. 1,5 °C. Eine Steigerung der Expression von hsp70 trat nach zwei Stunden im Feld ein. Nach der Exposition im Feld waren die Embryonen resistenter gegen Hitzestress (nachgewiesen durch höhere Überlebensraten). Ein bemerkenswertes Ergebnis, da es eine Schutzwirkung des Mobiltelefonierens zeigen könnte.

Lee et al. (2005b) untersuchten, wie sich HF-Felder auf Wildtyp und hsp70-defiziente Mäuse (hsp70.1-/-) auswirken. Die Idee zu dieser Studie beruht auf der Hypothese, dass die Induktion von hsp70 protektiv wirkt, entsprechend sollten in seiner Abwesenheit HF-Felder stärker schädigend wirken. Die Tiere wurden in einer Modenverwirbelungskammer 4, 8 und 10 Wochen lang 5 Tage in der Woche für jeweils 2x45 min einem Feld von 849 oder 1763 MHz bei einer SAR von 0,4 W/kg ausgesetzt. Die HF-Felder wurden nach der CDMA-Norm moduliert. Im Anschluss wurden Gehirn, Leber, Nebenniere, Niere, Milz, Magen, Blase, Lunge, Thymus, Hoden oder Ovarien histologisch untersucht. Außerdem wurden an den Schnitten die Zellvermehrung und die Apoptose (mit TUNEL-Test) untersucht. Im Western blot wurden hsp90, hsp70 und hsp25 und Mitogen-aktivierte Kinasen ERK, JNK, und p38 nachgewiesen. Zusätzlich wurden zahlreiche Positivkontrollen durchgeführt. In keiner der Gruppen ließ sich weder histopathologisch noch bei der Zellproliferation oder im TUNEL-Test ein Einfluss des HF-Feldes nachweisen. Auch der Nachweis der „Heat Shock“-Proteine hsp90, hsp70 und hsp25 ließ keinen Einfluss des HF-Feldes erkennen. Die hsp70.1-/- Tiere zeigten weder eine kompensatorische Hochregulation der anderen hsps noch eine Veränderung unter der Einwirkung des Feldes. Zusätzlich zu den chronisch exponierten Gruppen wurden im Fall der hsps auch akut exponierte Tiere 2 h, 12 h und 24 h nach der Exposition untersucht. Auch hier zeigte sich kein Einfluss des Feldes. Die MAPK wurden in keiner der Gruppen durch Exposition verändert. In dieser umfangreichen Studie zeigte sich also in keiner Gruppe eine Empfindlichkeit gegenüber HF-Feldern.

In einer zweiten Studie hat die gleiche Arbeitsgruppe wieder eine Langzeitstudie (19 Wochen) an Mäusen vorgenommen [Huang et al., 2005]. Hier stand die Frage im Vordergrund, ob HF-Felder Tumor-promovierend wirken können. Die Expositionseinrichtung und auch das Muster und die SAR-Werte sind dieselben wie im vorstehenden Absatz. Untersucht wurde in 80 Mäusen die Entwicklung von Hauttumoren, die in allen Tieren mit 7,12-Dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) initiiert wurden. Die Tiere wurden in vier Gruppen zu je 20 eingeteilt. Eine Gruppe diente als Positivkontrolle, bei der zusätzlich ein Tumor promovierender Phorbol-ester (TPA) verabreicht wurde, der die Expression des Protoonkogens c-Fos induziert. Zwei Gruppen wurden exponiert bei 845,5 oder 1763 MHz jeweils mit CDMA-Modulation. Eine Gruppe diente als Kontrolle. Während des Beobachtungszeitraumes entwickelten 95% der Tiere in der Positivkontrollgruppe Hauttumore, in den anderen drei Gruppen traten keine Tumore auf. Die Tiere blieben noch bis ein Jahr nach dem Versuch unter Beobachtung und auch in diesem Zeitraum entwickelten die Tiere keine Tumore.

In einer ähnlichen Langzeitstudie zur Entwicklung von Hautkrebs wurde der Einfluss von UV-Strahlung und HF-Feldern nach der amerikanischen Norm DAMPS (Digital Advanced Mobile Phone System) sowie der GSM-Norm in Wildtyp-Mäusen und solchen, die Ornithindecaboxylase (ODC) überexprimieren, getestet [Heikkinen et al., 2003]. Die Tiere wurden drei Mal wöchentlich 52 Wochen lang einer UV-Bestrahlung (240 J/m^2 , $1,2 \times$ der menschlichen Erythemschwelle) ausgesetzt. 12% der Wildtyp-Tiere und 37% der ODC-überexprimierenden Tiere entwickelten Tumore der Haut. Zusätzlich wurden Tiere entsprechend lange in den HF-Feldern exponiert, täglich 1,5 h bei einer SAR von $0,5 \text{ W/kg}$. Bei gemeinsamer Applikation mit der UV-Strahlung hatten die HF-Felder keinen co-karzinogenen Einfluss auf die Tumorentwicklung. Zwischen den Käfigkontrollen und den nur mit HF-Feldern behandelten Tieren ergaben sich quantitativ kleine, aber signifikante Unterschiede in der Tumorentwicklung. Bei den Wildtyp-Tieren kam es zu einer geringfügigen Steigerung in der Tumorentwicklung durch die HF-Felder. Die später durchgeführte Studie von Huang et al. (2005) ergab keinen derartigen Hinweis.

In einer weiteren Tierstudie wurde wieder die promovierende Wirkung von HF-Feldern getestet [Yu et al., 2006]. Zur Initiation von Mammatumoren wurden Ratten mit DMBA behandelt. Anschließend wurden fünf Gruppen zu je 100 Tieren gebildet, eine Käfigkontrolle, eine scheinexponierte und drei exponierte Gruppen (SAR $0,44$; $1,33$; $4,0 \text{ W/kg}$). Die Ratten wurden fünf Mal wöchentlich 4 h 26 Wochen lang in GSM 900-Feldern exponiert. Es wurde eine Apparatur verwendet, bei der die Tiere kreisförmig um eine Antenne in Röhren angeordnet waren. In allen Gruppen entwickelten sich Tumore, wobei die Tiere der Käfigkontrollgruppe eine signifikant höhere Tumorzinzidenz zeigten als die scheinexponierten und die exponierten Tiere. Allerdings zeigte sich kein Unterschied zwischen den scheinexponierten und den exponierten Tieren unabhängig von den eingesetzten SAR-Werten. Somit ergibt sich kein Hinweis für eine promovierende Wirkung der HF-Felder.

Zur promovierenden Wirkung von HF-Feldern wurde eine weitere Studie von einer anderen Arbeitsgruppe durchgeführt [Sommer et al., 2004]. Es wurden Mäuse des Stammes AKR/J, die einen AK-Virus tragen und daher spontan im Thymus ein lymphoblastisches Lymphom entwickeln, untersucht. Es wurden zwei Gruppen à 160 Tiere gebildet, die beide in Käfigen in einer radialen Wellenleitung untergebracht waren. Im Zentrum der Wellenleitung befand sich eine Antenne, über die das Feld eingekoppelt wurde. Die exponierten Tiere waren 24 h täglich, sieben Tage in der Woche, für 46 Wochen einem 900 MHz-Feld bei einer Ganzkörper-SAR von $0,4 \text{ W/kg}$ ausgesetzt. Bemerkenswert ist die sehr ausführliche Dokumentation der SAR innerhalb des Körpers der Tiere. Die exponierten Tiere zeigten während der Dauer des Experimentes eine signifikant höhere Gewichtszunahme als die scheinexponierten. Weitere Unterschiede in den untersuchten biologischen Endpunkten wie Überlebensrate oder Lymphominzidenz wurden nicht detektiert. Obwohl diese Studie keine genaue Replikation der Studie von Repacholi et al. (1997) ist, beschäftigt sie sich doch mit derselben Frage und unterstützt die dort dokumentierten Ergebnisse bezüglich einer Tumorpromovierenden Wirkung von HF-Feldern auf Lymphome nicht.

In einer Untersuchung von La Regina et al. (2003) wurden je 80 männliche und weibliche Ratten FDMA-Signalen bei $835,62 \text{ MHz}$ oder CDMA-Signalen bei $847,74 \text{ MHz}$ ausgesetzt. Die nominale zeitgemittelte SAR im Gehirn der Tiere wird mit $1,3 \text{ W/kg}$ angegeben. Die Ratten wurden an 5 Tagen pro Woche 4 h über einen Zeitraum von 2 Jahren exponiert. Es ergaben sich in Bezug auf das Körpergewicht und die Überlebenszeit keine Unterschiede zwischen den exponierten und scheinexponierten Gruppen. Histologische Untersuchungen in einer Vielzahl von Organen ergaben in Bezug auf das Auftreten von Tumoren keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Aus dieser Studie ergibt sich kein Hinweis auf eine initiiierende oder promovierende Wirkung der HF-Felder.

Pyrpasopoulou et al. (2004) exponierten trächtige Ratten in 9,4 GHz GSM-ähnlich modulierten Feldern in einer Fernfeldexpositionseinrichtung (Parabolreflektorantenne in 5 m Abstand vor den Käfigen), wobei die entsprechende Wellenlänge in etwa im gleichen Verhältnis zur Körpergröße der Ratte steht wie die Wellenlänge eines GSM 900-Signals zur Körpergröße eines Menschen. Eine thermische Belastung schließen die Autoren bei der maximal verwendeten SAR von 0,5 mW/kg aus. Es wurden drei Gruppen von Tieren gebildet: 1. Scheinexponierte, 2. Exposition 1-3 Tage nach der Paarung (Prä-Implantationsphase), 3. 4-7 Tage nach der Paarung (Organogenese). Aus jeder Gruppe wurden jeweils mindestens 20 Neugeborenen die Nieren entnommen, die mit immunhistochemischen Methoden oder semiquantitativer RT-PCR untersucht wurden. Die Autoren erfassten Gene, die eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNAs für „Bone Morphogenetic Protein 4“ (BMP4) und eine der Untereinheiten des Rezeptors für BMP (BMPR-IA) in beiden bestrahlten Gruppen signifikant erhöht waren. BMPR-II war nur in den an Tag 1-3 bestrahlten Tieren signifikant erniedrigt. BMP-7 sowie BMPR-IB zeigten in keiner Gruppe Veränderungen. Immunhistochemische Untersuchungen und der *in-situ*-Nachweis der RNAs bestätigten den Einfluss der Exposition auf BMP4. Diese Daten, die bislang nicht von unabhängigen Arbeitsgruppen bestätigt wurden, zeigen, dass Exposition mit HF-Feldern während der frühen Embryonalentwicklung zu einer veränderten Expression von BMP4 und seinem Rezeptor bei Neugeborenen führen kann. Da die Nieren von exponierten Nachkommen keine makroskopischen oder histologischen Veränderungen aufwiesen, könnten diese Befunde nach Ansicht der Autoren möglicherweise eine Verzögerung in der Organogenese der Niere widerspiegeln. Diese Interpretation wurde aber bislang nicht durch weitergehende Untersuchungen an verschiedenen Entwicklungsstadien bestätigt. Außerdem gibt es hier einige Kritikpunkte bezüglich der Exposition; beispielsweise wurden keine Vorkehrungen gegen Feldinhomogenitäten durch stehende Wellen getroffen.

Finnie (2005) exponierte in einer weiteren *in-vivo*-Studie Mäuse für eine Stunde bei 900 MHz und einer Pulswiederholungsfrequenz von 217 Hz bei einer SAR von 4 W/kg in einer radialen Wellenleitung. Da schein- und HF-exponierte Mäuse während der Exposition immobilisiert und dadurch möglicherweise gestresst wurden, wurde noch eine weitere Kontroll-Gruppe von Mäusen untersucht, die sich frei im Käfig bewegen konnte. Die *c-fos*-Proteinexpression wurde in verschiedenen Hirnregionen immunhistochemisch untersucht. Zwischen schein- und HF-exponierten Mäusen ergab sich kein signifikanter Unterschied in der *c-fos*-Expression. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die sich frei im Käfig bewegen konnte, wiesen beide immobilisierte Gruppen einen signifikant erhöhten Anteil *c-fos* positiver Zellen auf. Daher stellt dieser Effekt offensichtlich eine Stressantwort dar, die durch die Immobilisierung hervorgerufen wurde. Diese Untersuchung von Finnie (2005) zeigt, dass die starke Fokussierung auf „immediate early“ oder „stress response“ Gene, die man bei der Untersuchung der Effekte von HF-Feldern häufig findet, die Gefahr in sich birgt, dass ungewollte und unentdeckt gebliebene Stressbelastungen zu falsch positiven Studienergebnissen führen können.

6.3 Zusammenfassung und Diskussion

Als ein möglicher Endpunkt einer durch HF-Felder veränderten Genregulation sind seit einigen Jahren die „Heat Shock“-Proteine in der Diskussion. Die verstärkte Expression von „Heat Shock“-Proteinen stellt eine biologische Antwort auf verschiedene Belastungen wie Erwärmung oder oxidativen Stress dar [Cotgreave, 2005]. Eine Reihe von Arbeiten und Arbeitsgruppen haben sich mit dieser Thematik beschäftigt, und zunächst sah es so aus, als ob die Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen einander unterstützten, denn sowohl die Arbeitsgruppe um Leszczynski als auch die um de Pomeraï haben im Zeitraum zwischen

2000 und 2004 von einer Induktion von hsp70 durch HF-Felder berichtet [Leszczynski et al., 2002; de Pomerai et al., 2000]. Dies wurde auch noch durch die Ergebnisse von Shallom im gleichen Zeitraum unterstützt [Shallom et al., 2002]. Allerdings sind dann in weiteren Untersuchungen ganz andere Ergebnisse erzielt worden. So hat die Arbeitsgruppe um de Pomerai ihre eigenen in „Nature“ publizierten Ergebnisse als Artefakt-überlagert zurückgezogen [Dawe et al., 2006]. Die von Leszczynski et al. in mehreren Publikationen berichtete Induktion von hsp70 konnten im Rahmen der REFLEX-Studie von der Arbeitsgruppe Lagroye nicht reproduziert werden; allerdings wurde eine andere Expositionseinrichtung verwendet [European Union, 2004a]. Eine weitere Studie von Miyakoshi et al. (2005) an einer Glia-Zelllinie zeigte einen Einfluss von HF-Feldern auf hsp27 erst bei 10 W/kg, also weit oberhalb des Grenzwertes. Ganz ähnliche Ergebnisse erzielte diese Arbeitsgruppe auch für hsp70. Besonders erwähnt werden muss die Studie von Lee et al. (2005b), in der sowohl akute als auch Langzeiteffekte von HF-Feldern verfolgt wurden. Weder in den Wildtyp-Mäusen noch in hsp70-defizienten Tieren ließ sich eine Induktion der „Heat Shock“-Proteine nachweisen. Insgesamt ergibt sich im Bereich der Induktion von „Heat Shock“-Proteinen weder ein Bild von sich gegenseitig unterstützenden Studien noch wurden die Ergebnisse durch unabhängige Reproduktionen bestätigt. Daher ergibt sich aus der vorliegenden Literatur kein wissenschaftlich begründeter Verdacht für eine Induktion der Expression von „Heat Shock“-Proteinen durch HF-Felder. Diese Bewertung wird in einem Übersichtsartikel von Cotgreave (2005), der sich ausschließlich mit der Interaktion zwischen HF-Feldern und „Heat Shock“-Proteinen auseinandersetzt, unterstützt.

Die Arbeitsgruppe Wobus aus dem REFLEX-Konsortium hat in p53-defizienten ES-Zellen nach 48-stündiger GSM-217 Hz-Exposition zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante, bis zu 2,5fache Erhöhung der hsp70 mRNA gefunden, GSM-Basic und GSM-DTX hatten diese Wirkung nicht. Viele andere Gruppen haben hsp70 ebenfalls untersucht jedoch nie an Stammzellen, sondern an MO54-Gliazellen [Tian et al., 2002; Miyakoshi et al., 2005], an Glioblastoma-Zellen und SH-SY5Y Neuroblastomazellen [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Lagroye], an Mono Mac 6 Monozyten [Lantow et al., 2006; Simko et al., 2006] und an peripheren Lymphozyten [European Union, 2004a, Arbeitsgruppe Bersani]. In all diesen Studien zeigte sich kein Einfluss der HF-Felder auf die hsp70-Expression. Offenbar zeigen hsp70 keine generelle Empfindlichkeit für HF-Felder, nur in einzelnen Arbeiten, die nicht reproduziert werden konnten oder wurden, ist eine solche Empfindlichkeit berichtet worden. Es besteht nach heutigem Wissen kein Nachweis für eine Beeinflussbarkeit von „Heat Shock“-Proteinen durch HF-Felder.

Neben den „Heat Shock“-Proteinen ist auch die Frage einer veränderten Apoptose (vgl. Kap. 3.1.4) in den letzten Jahren in den Fokus der Experimentatoren gekommen. Eine verminderte Apoptose könnte das Überleben von entarteten Zellen begünstigen, wohingegen eine verstärkte Apoptose möglicherweise das Immunsystem schwächen könnte. Obwohl zahlreiche Arbeiten sich in den letzten Jahren mit der Frage einer Interaktion von HF-Feldern mit der Apoptose beschäftigt haben, sind bisher keine überzeugenden Daten für einen Einfluss von HF-Feldern auf die Apoptose vorgelegt worden. Bisher ist die bei weitem überwiegende Mehrheit negativ. Es hat sich kein Trend in Richtung einer Interaktion von HF-Feldern mit den Signalwegen der Apoptose gezeigt.

Eine andere Frage, die in den letzten Jahren behandelt wurde, ist der Einfluss von HF-Feldern auf die ODC. Diese Frage ist in der Gruppe von Litovitz behandelt worden. Im Rahmen der PERFORM B-Studie ist diese Frage abschließend beantwortet worden. Die sehr sorgfältigen und umfangreichen Versuche konnten die Ergebnisse nicht nachvollziehen, darüber hinaus zeigten sich Fehler in der Berechnung der SAR-Werte in der ursprünglichen Studie. Daher ist nicht von einer Interaktion zwischen HF-Feldern unterhalb der Grenzwerte mit der ODC auszugehen.

Besonders erwähnenswert sind einige Arbeiten, die sich der Arraytechnik zum Nachweis der Genexpression bedienen. Vom Prinzip her ist die Arraytechnik eigentlich ideal geeignet in einem Arbeitsgebiet, in dem keine Wirkungshypothesen bestehen, Interaktionen nachzuweisen; denn es werden tausende von Genen in einem Experiment überprüft. Die bisher vorliegenden wenigen Studien sind jedoch entweder negativ [Whitehead et al., 2006] oder noch methodisch unsicher [Nylund und Leszczynski, 2004; Remondini et al., 2006]. Trotzdem liegt hier eine Möglichkeit, in Zukunft die Frage nach dem Einfluss von HF-Feldern auf die Genexpression ohne eine überzeugende Wirkhypothese erfolgreich zu bearbeiten.

Bei den Studien zur Genregulation wurden meist die etablierten Standardtechniken benutzt, die nur die Untersuchung einzelner Gene erlauben. Die moderneren Methoden zur Untersuchung der RNA wie Mikroarrays oder zur Untersuchung des Proteoms wurden nur selten verwendet. Die Technik ist noch neu und die Durchführung sowie die statistische Analyse zum Teil mit methodischen Mängeln behaftet, so dass die Ergebnisse noch keine klaren Aussagen zulassen und daher bei der weiteren Bewertung nur eine untergeordnete Rolle spielen. Obwohl in der Anwendung dieser Verfahren ein großes Potential liegt, den Einfluss von HF-Feldern auf die Genexpression zu untersuchen, muss darauf hingewiesen werden, dass die Möglichkeit von falsch positiven Ergebnissen hier aufgrund der großen Zahl von Variablen besonders hoch ist und daher zusätzlicher Aufwand zur Bestätigung mit anderen Methoden erforderlich ist.

7 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Seit der letzten Empfehlung der Strahlenschutzkommission von 2001 [SSK, 2001] ist eine Vielzahl von Publikationen bezüglich der Wechselwirkung von HF-Feldern mit dem Genom erschienen. Im Hinblick auf genotoxische Wirkungen haben die neueren Arbeiten eine gesundheitsschädigende Wirkung nicht wahrscheinlicher gemacht. Die wenigen positiven Befunde ließen sich selbst in gut entworfenen Wiederholungsstudien nicht bestätigen. Auf der Grundlage des heutigen Erkenntnisstandes sind Einzelarbeiten zur Frage der Interaktion von HF-Feldern mit dem Genom daher kaum noch gerechtfertigt. Für weitere Untersuchungen sind vielmehr Multicenter-Studien mit einem gemeinsamen Studiendesign unbedingt erforderlich.

Ein Einfluss von HF-Feldern auf die Apoptose ist aufgrund der Bewertung der bisherigen Arbeiten nicht zu erwarten.

Die Untersuchung der Expression und Aktivierung von „Heat Shock“-Proteinen durch HF-Felder hat unter Berücksichtigung der aktuellen Arbeiten deutlich an Bedeutung verloren. Auch wenn noch einige Fragen offen sind, muss man darauf hinweisen, dass bisher die überwiegende Mehrheit der Untersuchungen negativ war und dass Reproduktionen positiver Befunde gescheitert sind. Insgesamt hat sich in den Experimenten zur Expression einzelner Gene kein Trend gezeigt, der direkt weiterverfolgt werden müsste. Genomweite Methoden zur Expressionsanalyse, wie Mikroarrays, wurden nur in wenigen Arbeiten angewendet. Die dabei erzielten Ergebnisse lassen jedoch ebenfalls keine klaren Aussagen zu.

Bezüglich der Dosimetrie und des Designs von Expositionseinrichtungen wurden deutliche Verbesserungen erzielt, die u. a. eine kontinuierliche Überwachung der experimentellen Parameter sowie Blindversuche erlauben. Es ist zu hoffen, dass in Zukunft die Zahl der Studien, die die HF-Exposition unter unkontrollierten Bedingungen durchführen, deutlich kleiner wird. Damit wäre eine bedeutende Quelle für experimentelle Unsicherheiten beseitigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Bewertung der vorliegenden Studien insgesamt keinen Anlass gibt, von einer gesundheitsgefährdenden Wirkung hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf das Genom auszugehen und die geltenden Grenzwerte in Frage zu stellen.

Tab. 1: Übersicht über Experimente zur Genotoxizität

Abkürzungen: CA: Chromosomenaberrationen, MN: Mikrokerne, SCE: Schwesterchromatidaustausche, γ -H2AX: Doppelstrangbruchnachweis durch Immunofluoreszenzmarkierung von phosphoryliertem Histone H2A, 53BP1: p53 Binding Protein, EryMN: Mikrokerne in Erythrozyten

Mikrobielle Systeme

Zelltyp	Expositions-einrichtung	Signalformen	Dosimetrie	Test	Ergebnis	Referenz	Jahr
Salmonella	TEM-Zelle	835 MHz CDMA	4 W/kg; 48 h	Ames	negativ	Chang et al.	2005
Salmonella	TEM-Zelle	835 MHz CDMA	4 W/kg; 48 h	Ames	negativ	Chang et al.	2005
E. coli	TEM-Zelle	835 MHz CDMA	4 W/kg; 48 h	Reversionen	negativ	Chang et al.	2005
Plasmid	TEM-Zelle	835 MHz CDMA	4 W/kg; 48 h	Strangbrüche	negativ	Chang et al.	2005
S. cerevisiae	2 kleine Absorberkammern	900 MHz GSM	0,13 und 1,3 W/kg	Mutationen, Rekombinationen	negativ	Gos et al.	2000

Humanzellen in vitro

Zelltyp	Expositions- einrichtung	Signalformen	Dosimetrie	Test	Ergebnis	Referenz	Jahr
stimulierte Lymphozyten	Parallelplat- tenresonator	830 MHz CW	1,6-8,8 W/kg; 72 h	Aneuploidie (Chromosom 17)	positiv	Mashevich et al.	2003
Glioblastom- zellen, Lungen- fibroblasten	Absorber- kammer mit Hornantenne	2,1425 GHz CW und W-CDMA	0,08-0,8 W/kg; 2 und 24 h	alk. Comet	negativ	Sakuma et al.	2006
HL-60 (transf. Lymphozyten)	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1800 MHz CW, GSM basic, GSM talk	0,2-3 W/kg; bis 72 h	alk. Comet, MN	positiv, aber unplausible Dosisab- hängigkeit	European Union 2004a REFLEX Participant 2 (Tauber, Berlin)	2004
Lymphozyten	Absorber- kammer, mit Rechteck- hornantenne	2,45 GHz gepulst mit PRF 10 kHz; 8,2 GHz	2,13 W/kg 2 h; 20,71 W/kg 2 h	MN, CA	negativ, sowohl in unstimulierten als auch stimulierten Lymphozyten	Vijayalaxmi	2006
Molt-4-Zellen	radiale Wellenleitung	847,7 MHz CDMA 835,6 MHz FDMA 813,6 MHz iDEN 836,6 MHz TDMA	3,2 W/kg 3,2 W/kg 2,4 W/kg+24 mW/kg 2,6 W/kg+26 mW/kg je nach Standard 2, 3, 21 h	alk. Comet	negativ	Hook et al.	2004b

Zelltyp	Expositions- einrichtung	Signalformen	Dosimetrie	Test	Ergebnis	Referenz	Jahr
Fibroblasten	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1800 MHz CW, GSM basic, GSM talk	1,2 und 2 W/kg; 4 / 6 / 24 h, 5 min an, 10 min aus	alk. und neutraler Comet	positiv	European Union 2004a REFLEX Participant 3 (Rüdiger, Wien)	2005
Fibroblasten	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1800 MHz CW, GSM basic, GSM talk	1,2 und 2 W/kg; 4 / 6 / 24 h, 5 min an, 10 min aus	MN, CA	positiv	Diem et al.	2005
Lymphozyten	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1,8 GHz	3 W/kg; 2 h	alk. Comet	uneinheitlich	Baohong et al.	2005
Lymphozyten	GSM900 Test- Handy mit TEM- Zelle	915 MHz GSM basic	37 mW/kg; 2h	γ -H2AX, 53BP1	negativ	Belyaev et al.	2005
Lymphozyten	TEM-Zelle mit Mobiltelefon	905 und 915 MHz GSM basic	37 mW/kg; 1 Stunde	γ -H2AX, 53BP1	negativ	Markova et al.	2005
Lymphozyten	abgeschlos- sener Wellen- leiter im Wasserbad	900 MHz GSM Signal	0,3 und 1 W/kg; 2h	alk. Comet	negativ	Zeni et al.	2005
Lymphozyten	abgeschlos- sener Wellen- leiter im Wasserbad	900 MHz GSM Signal	0,3 und 1 W/kg; 2h	CA, SCE	negativ	Zeni et al.	2005

Zelltyp	Expositions- einrichtung	Signalformen	Dosimetrie	Test	Ergebnis	Referenz	Jahr
Lymphozyten	Wirepatch-Zelle	900 MHz 1:8 Pulsung	0, 1, 5 und 10 W/kg peak (!)	MN	negativ	Scarfi et al.	2006
Lymphozyten	Wellenleiter mit stehenden Wellen	935 MHz GSM basic	1 und 2 W/kg; 24 h	alk. Comet, CA, SCE, MN	negativ	Stronati et al.	2006
Lymphozyten	unklar	1800 MHz, CW	0, 5, 10, 20 mW/cm ² ; 1, 2 und 3 h	MN	positiv, aber sehr große Variabilität zwischen verschiedenen Spendern	Zotti-Martelli et al.	2005
Fibroblasten	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1800 MHz CW und GSM basic	2 W/kg; 1 bis 24 h, 5 min an, 10 min aus	MN, alk. Comet	negativ	Speit et al.	2006

Nagerzellen in vitro

Zelltyp	Expositions-einrichtung	Signalformen	Dosimetrie	Test	Ergebnis	Referenz	Jahr
Maus m5S	Wellenleiter-Resonator	2,45 GHz CW und PM 1/9 + 1/18	5-100 W/kg CW und 50-100 W/kg PM; 2 h	CA	negativ	Komatsubara et al.	2005
R1-Stammzellen (Ratte)	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1,71 GHz, GSM 217 und talk	0,4 W/kg talk, 0,11 W/kg DTX, 1,5-2 W/kg GSM 217	alk. Comet	negativ	Czyz et al. Nikolova et al.	2004 2005
R1-Stammzellen (Ratte)	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1,71 GHz, GSM 217 und talk	0,4 W/kg talk, 0,11 W/kg DTX, 1,5-2 W/kg GSM 217	CA, SCE	negativ	Czyz et al. Nikolova et al.	2004 2005
R1-Stammzellen (Ratte)	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1,71 GHz, GSM 217 und talk	0,4 W/kg talk, 0,11 W/kg DTX, 1,5-2 W/kg GSM 217	neutr. Comet	positiv, aber unplausibel, da alk. Comet negativ	Czyz et al. Nikolova et al.	2004 2005
C3H10T1/2 (Maus)	radiale Wellenleitung	2450 MHz CW	1,9 W/kg; 2h	alkaliabile DNA-Schäden, DNA-Protein-Vernetzung	negativ	Lagroye et al.	2004b
Ratten Granulosa	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1800 MHz CW, GSM basic, GSM talk	1,2 und 2 W/kg; 4 / 6 / 24 h, 5 min an, 10 min aus	alk. und neutraler Comet	positiv	Diem et al.	2005
V79 chines. Hamsterzellen	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1800 MHz CW und GSM basic	2 W/kg; 1 bis 24 h, 5 min an, 10 min aus	MN, alk. Comet	negativ	Speit et al.	2006
Hamster-Lungen-fibroblasten		1800 MHz	3,0 W/kg; 1 oder 24 h, 5 min an, 10 min aus	γ -H2AX	positiv, aber nur bei 24h, schwach signifikant	Zhang DY	2006

In-vivo Experimente (Nagetiere)

Zelltyp	Expositions- einrichtung	Signalformen	Dosimetrie	Test	Ergebnis	Referenz	Jahr
Rattenhirn	Zylinder- Wellenleiter	2450 MHz gepulst: 2 µs Puls, Pulsperiode 2 ms	1,2 W/kg; 2h	alk. Comet	negativ	Lagroye et al.	2004a
Mäuse	Hornartige Expokammer	2,45 GHz CW	Ganzkörper-SAR 4,3 W/kg, 1,4 W/kg oder 0,71 W/kg; 16 h per Tag, 15 Tage, 20 s an, 40 s aus/ 10 s an, 50 s aus	lacZ-Muta- tionen	negativ	Ono et al.	2004
Lymphoz., Erythroz., Keratinoz (Maus)	radialer Wellenleitungs- resonator, Mäuse fixiert	902 und 1747 MHz GSM basic, DTX, handover, power control	Ganzkörper-Peak SAR 0-33,2 W/kg (1 Woche), 0-24,9 W/kg (6 Wochen) 2 h pro Tag, 5 Tage pro Woche 1 bzw. 6 Wochen	MN	negativ	Görlitz et al.	2005
männliche Keimzellen (Mäuse)	TE10 Wellenleiter mit durchlaufender Welle	900 MHz CW	90 mW/kg; 12 h pro Tag, 7 Tage	DNA-Strang- brüche mit Gelelektro- phorese/ Genverän- derungen mit quantitativer PCR	negativ positiv	Aitken et al.	2005
Ratten- Erythrozyten	Fernfeldexpo- sition 1,4 m	2,45 GHz CW	1,25 W/kg; 2 h pro Tag, 7 Tage pro Woche	MN	uneinheitlich	Trosic et al.	2004

Zelltyp	Expositions- einrichtung	Signalformen	Dosimetrie	Test	Ergebnis	Referenz	Jahr
Ratten- Knochenmark	Fernfeldexpo- sition 1,4 m	2,45 GHz CW	1,25 W/kg; 2 h pro Tag, 7 Tage pro Woche	MN	positiv, aber nur transient	Trosic et al.	2006
Hirn-, Thymus und Milzzellen der Ratte	GSM900 Test- Handy mit TEM- Zelle	915 MHz GSM basic	0,4 mW/g; 2h	Strang- brüche durch Gelelektro- phorese	negativ	Belyaev et al.	2006
Ratte: Hirn, Leber, Blut	radiale Wellen- leitung mit Absorberab- schluss, Tiere ohne Restraint	900 MHz GSM basic	Ganzkörper-SAR 0,3 und 0,9 W/kg; 2 h pro Tag, 5 Tage pro Woche, 2 Jahre	alk. Comet, EryMN	negativ	Verschaeve et al.	2006
Rattenhirn	Absorber- kammer	2,45 GHz, 16,5 GHz	1,0 und 2,01 W/kg; 2 h pro Tag, 35 Tage außer Wochenende	alk. Comet	positiv	Paulraj et al.	2006

Kombinationsexperimente

Zelltyp	Expositions-einrichtung	Signalformen	Dosimetrie	Test	Ergebnis	Referenz	Jahr
Salmonella	TEM-Zelle	835 MHz CDMA	4 W/kg; 48 h	Ames	negativ, keine Comutagenität	Chang et al.	2005
Kombination mit verschiedenen Mutagenen: 4NQO (4-Nitrochinolin-1-oxid), Natriumazid, Cumenhydroperoxid, 9-Aminoacridin							
Human-Lymphozyten	Wellenleiter mit stehenden Wellen	1,8 GHz	3 W/kg; 2 h	alk. Comet	uneinheitlich	Baohong et al.	2005
Kombination mit BLM, MMC, MMS, 4NQO							
Human-Lymphozyten	Wellenleiter mit stehenden Wellen	935 MHz GSM basic	1 und 2 W/kg; 24 h	alk. Comet, CA, SCE, MN	negativ, keine Comutagenität	Stronati et al.	2006
Kombination mit 1 Gy Röntgenstrahlen							
Ratte: Hirn, Leber, Blut	radiale Wellenleitung mit Absorberabschluss, Tiere ohne Restrainer	900 MHz GSM basic	Ganzkörper-SAR 0,3 und 0,9 W/kg; 2 h pro Tag, 5 Tage pro Woche, 2 Jahre	alk. Comet, EryMN	negativ, keine Comutagenität	Verschaeve et al.	2006
Kombination mit MX (3-Chlor-4-dichlormethyl-5-hydroxy-2(5H)-Furanon) im Trinkwasser							

Abkürzungsverzeichnis:

53BP1	p53-binding protein
BLM	Bleomycin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	Bromdesoxyuridin
CA	Chromosomenaberration
CW	Continuous Waves
CDMA	Code Division Multiple Access
DNA, cDNA	Desoxyribonucleinsäure (Desoxiribonucleic Acid)
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche (Double Strand Breaks)
ES	embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDMA	Frequency Division Multiple Access
GSM	Global System for Mobile Communications
GSM-DTX	GSM- Discontinuous Transmission
HF	Hochfrequenz
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
hsp	„Heat Shock“-Proteine
iDEN	Integrated Digital Enhanced Network
IPSC-Guidelines	Institute for the Protection and Security of the Citizen-Guidelines
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
MN	Mikronuclei
MAP	Mitogen activated protein
PCE	polychromatische Erythrozyten
PCR	Polymerase Ketten Reaktionen
RNA, mRNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Ketten Reaktion
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SAR	spezifische Absorptionsrate
SCE	Sister Chromatid Exchange
SSB	Single Strand Break
SSL	Single Strand Lesions
T	Thymidin
TDMA	Time Division Multiple Access
TE	transversal-elektrisch
TEM	transversal-elektromagnetisch
TM	transversal- magnetisch
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
UMTS	Universal Mobile Telecommunications System

8 Literaturverzeichnis

- Aaron CS, Bolesfoldi G, Glatt HR, Moore M, Nishi Y, Stankoski L, Theiss J, Thompson E (1994): Mammalian cell gene mutation assays working group report. *Mutat Res* 31, 235-239.
- Aitken RJ, Bennets LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV (2005): Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl* 28, 171-179.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A (2000): IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res* 463, 111-172.
- Auvinen M, Paasinen A, Andersson LC, Holtta E (1992): Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360, 355-358.
- Baohong W, Jiliang H, Lifen J, Deqiang L, Wei Z, Jianlin L, Hongping D (2005): Studying the synergistic damage effects induced by 1.8GHz radiofrequency field radiation (RFR) with four chemical mutagens on human lymphocyte DNA using comet assay in vitro. *Mutat Res* 578, 149-157.
- Belyaev IY, Hillert L, Protopopova M, Tamm C, Malmgren LO, Persson BR, Selivanova G, Harms-Ringdahl M (2005): 915 MHz microwaves and 50 Hz magnetic field affect chromatin conformation and 53BP1 foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Bioelectromagnetics* 26, 173-184.
- Belyaev IY, Koch CB, Terenius O, Roxström-Lindquist K, Malmgren LOG, Sommer WH, Salford LG, Persson BR (2006): Exposure of rat brain to 915 MHz GSM microwaves induces changes in gene expression but not double stranded DNA breaks or effects on chromatin conformation. *Bioelectromagnetics* 27, 295-306.
- Capri M, Scarcella E, Bianchi E, Fumelli C, Mesirca P, Agostini C, Remondini D, Schuderer J, Kuster N, Franceschi C, Bersani F (2004a): 1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different Global System for Mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors. *Int J Radiat Biol* 80, 389-397.
- Capri M, Scarcella E, Fumelli C, Bianchi E, Salvioli S, Mesirca P, Agostini C, Antolini A, Schiavoni A, Castellani G, Bersani F, Franceschi C (2004b): In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential. *Radiat Res* 162, 211-218.
- Capri M, Salvioli S, Altilia S, Sevini F, Remondini D, Mesirca P, Bersani F, Monti D, Franceschi C (2006): Age-dependent effects of *in vitro* radiofrequency exposure (mobile phone) on CD95+ T helper human lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1067, 493-499.
- Chang S-K, Choi J-S, Gil H-W, Yang J-O, Lee E-Y, Jeon Y-S, Lee Z-W, Lee Z-W, Lee M, Hong M-Y, Ho Son T, Hong S-Y (2005): Genotoxicity evaluation of electromagnetic fields generated by 835-MHz mobile phone frequency band. *Europ J Cancer Prev* 14, 175-179.
- Cotgreave IA (2005): Biological stress responses to radio frequency electromagnetic radiation: are mobile phones really o (heat) shocking? *Arch Biochem Biophys* 435, 227-240.
- Czyz J, Guan K, Zeng Q, Nikolova T, Meister A, Schönborn F, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM (2004): High frequency electromagnetic fields affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. *Bioelectromagnetics* 25, 296-307.

- Daniells C, Duce I, Thomas D, Sewell P, Tattersall J, de Pomerei D (1998): Transgenic nematodes as biomonitors of microwave induced stress. *Mutat Res* 399, 55-64.
- Dasenbrock C (2005): Animal carcinogenicity studies on radiofrequency fields related to mobile phones and base stations. *Toxicol Appl Pharmacol* 207 (2 Suppl), 342-346.
- Dawe AS, Smith B, Thomas DWP, Greedy S, Vasic N, Gregory A, Loader B, de Pomerai DI (2006): A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bioelectromagnetics* 27, 88-97.
- de Pomerai D, Daniells C, David H, Allan J, Duce I, Mutwakil M, Thomas D, Sewell P, Tattersall J, Jones D, Candido P (2000): Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature* 405, 417-418.
- de Pomerai DI, Smith B, Dawe A, North K, Smith T, Archer DB, Duce IR, Jones D, Candido EPM (2003): Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Lett* 543, 93-97.
- Diem E, Jahn O, Rüdiger HW (2005): Non-thermal DNA breakage by mobile phone radiation in human fibroblasts and transformed GFSH-R17 (rat granulosa) cells in vitro. *Mutation Res* 583, 178-183.
- European Union (2004a): Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards From Low Frequency Electromagnetic Field Exposure (REFLEX). 5th Framework: Quality of Life and Management of Living Resources.
- European Union (2004b): *In-vivo* and *in-vitro* replication studies related to mobile telephones and base stations (PERFORM B). 5th Framework: Quality of Life and Management of Living Resources.
- Finnie JW (2005): Expression of the immediate early gene, c-fos, in mouse brain after acute global system for mobile communication microwave exposure. *Pathology* 37, 231-233.
- Görlitz BD, Müller M, Ebert S, Hecker H, Kuster N, Dasenbrock C (2005): Effects of 1-week and 6-week exposure to GSM/DCS radiofrequency radiation on micronucleus formation in B6C3F1 mice. *Radiat Res.* 164, 431-439.
- Gos P, Eicher B, Kohli J, Jeyaraj WD (2000): No mutagenic or recombinogenic effects of mobile phone fields at 900 MHz detected in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectromagnetics* 21, 515-523.
- Heikkinen P, Kosma VM, Alhonen L, Huuskonen H, Komulainen H, Kumlin T, Laitinen JT, Lang S, Puranen L, Juutilainen J (2003): Effects of mobile phone radiation on UV-induced skin tumorigenesis in ornithine decarboxylase transgenic and non-transgenic mice. *Int J Radiat Biol* 79, 221-233.
- Heynick LN, Johnston SA, Mason PA (2003): Radio frequency electromagnetic fields: cancer, mutagenesis, and genotoxicity. *Bioelectromagnetics Suppl* 6, 74-100.
- Hook GJ, Spitz DR, Sim JE, Higashikubo R, Baty JD, Moros EG, Roti Roti JL (2004a): Evaluation of parameters of oxidative stress after in vitro exposure to FMCW- and CDMA-modulated radiofrequency radiation fields. *Rad Res* 162, 497-504.
- Hook GJ, Zhang P, Lagroye I, Li L, Higashikubo R, Moros EG, Straube WL, Pickard WF, Baty JD, Roti Roti JL (2004b): Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after in vitro exposure to radiofrequency radiation. *Rad Res* 161, 193-200.

- Huang T-Q, Lee J-S, Kim T-H, Pack J-K, Jang J-J, Seo J-S (2005): Effect of radiofrequency radiation exposure on mouse skin tumorigenesis initiated by 7,12-dimethylbenz[α]anthracene. *Int J Radiat Biol* 81, 861-867.
- Komatsubara Y, Hirose H, Sakurai T, Koyama S, Suzuki Y, Taki M, Miyakoshi J (2005): Effect of high-frequency electromagnetic fields with wide range of SARs on chromosomal aberrations in murine m5S cells. *Mutat Res* 587, 114-119.
- Lagroye I, Ananae R, Wettring BA, Moros EG, Straube WL, Laregina M, Niehoff M, Pickard WF, Baty J, Roti Roti JL (2004a): Measurement of DNA damage after acute exposure to pulsed-wave 2450 MHz microwaves in rat brain cells by two alkaline comet assay methods. *Int J Radiat Biol* 80, 11-20.
- Lagroye I, Hook GJ, Wettring BA, Baty JD, Moros EG, Straube WL, Roti Roti JL (2004b): Measurement of alkali-labile DNA damage and protein-DNA crosslinks after 2450 MHz microwave and low dose gamma irradiation *in vitro*. *Rad Res* 161, 201-214.
- Lai H, Singh NP (1995): Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 16, 207-210.
- Lai H, Singh NP (1996): Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int J Radiat Biol* 69, 513-521.
- Lai H, Singh NP (1997): Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 18, 446-454.
- Lantow M, Schuderer J, Hartwig C, Simko M (2006): Free radical release and hsp70 expression in two human immune-relevant cell lines after exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation. *Radiat Res* 165, 88-94.
- La Regina M, Moros EG, Pickard WF, Straube WL, Baty J, Roti Roti JL (2003): The effect of chronic exposure to 835.62 MHz FDMA or 847.74 MHz CDMA radiofrequency radiation on the incidence of spontaneous tumors in rats. *Rad Res* 160, 143-151.
- Lee E, Oh E, Lee J, Sul D, Lee J (2004): Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci* 81, 121-132.
- Lee S, Johnson D, Dunbar K, Dong H, Ge X, Kim YC, Wing C, Jayathilaka N, Emmanuel N, Zhou CQ, Gerber HL, Tseng CC, Wang SM (2005a): 2.45 GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. *FEBS Lett* 579, 4829-4836.
- Lee J-S, Huang T-Q, Lee J-J, Pack J-K, Jang J-J, Seo J-S (2005b): Subchronic exposure of *hsp70.1*-deficient mice to radiofrequency radiation. *Int J Radiat Biol* 81, 781-792.
- Lee J-S, Huang T-Q, Kim T-H, Kim JY, Kim HJ, Pack J-K, Seo J-S (2006): Radiofrequency radiation does not induce stress response in human T-lymphocytes and rat primary astrocytes. *Bioelectromagnetics* 27, 578-588.
- Leszczynski D, Joenväärä S, Reivinen R, Kuokka R (2002): Non-thermal activation of hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70, 120-129.
- Leszczynski D, Nylund R, Joenväärä S, Reivinen J (2004): Applicability of discovery science-approach to determine biological effects of mobile phone radiation. *Proteomics* 4, 426-431.

- Lorge E, Thybaud V, Aardema MJ, Oliver J, Wakata A, Lorenzon G, Marzin D (2006): SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutat Res* 607, 13-36.
- Maes A, Collier M, Slaets D, Verschaeve L (1996): 954 MHz microwaves enhance the mutagenic properties of mitomycin C. *Environ Mol Mutagen* 28, 26-30.
- Maes A, Collier M, Van Gorp U, Vandoninck S, Verschaeve L (1997): Cytogenetic effects of 935.2-MHz (GSM) microwaves alone and in combination with mitomycin C. *Mutat Res* 393, 151-156.
- Maes A, Collier M, Verschaeve L (2000): Cytogenetic investigations on microwaves emitted by a 455.7 MHz car phone. *Folia Biol (Praha)* 46, 175-180.
- Maes A, Collier M, Verschaeve L (2001): Cytogenetic effects of 900 MHz (GSM) microwaves on human lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 22, 91-96.
- Markova E, Hillert L, Malmgren L, Persson BR, Belyaev IY (2005): Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and gamma-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Environ Health Perspect* 113, 1172-1177.
- Mashevich M, Folkman D, Kesar A, Barbul A, Korenstein R, Jerby E, Avivi L (2003): Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability. *Bioelectromagnetics* 24, 82-90.
- Meltz ML (2003): Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation. *Bioelectromagnetics* 24, Suppl 6, 196-S213.
- Miyakoshi J, Takemasa K, Takashima Y, Ding GR, Hirose H, Koyama S (2005): Effects of exposure to a 1950 MHz radio frequency field on expression of Hsp70 and Hsp27 in human glioma cells. *Bioelectromagnetics* 26, 251-257.
- Mortelmans K, Zeiger E (2000): The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 455, 29-60.
- Moulder JE, Foster KR, Erdreich LS, McNamee JP (2005): Mobile phones, mobile phone base stations and cancer: a review. *Int J Radiat Biol*. 81, 189-203.
- Müller W-U, Streffer C (1994): Micronucleus assays. In: Obe G (Hrsgb.) *Advances in mutagenesis research*, Vol 5, Springer Verlag, Berlin, 1-134.
- Müller W-U, Ciborovius J, Bauch T, Johannes C, Schunck C, Mallek U, Böcker W, Obe G, Streffer C (2004): Analysis of the action of the restriction endonuclease AluI using three different comet assay protocols. *Strahlenther Onkol*. 180, 655-664.
- Natarajan M, Vijayalaxmi, Szilagy M, Roldan FN, Meltz ML (2002): NF- κ B DNA-Binding Activity after high peak power pulsed microwave (8.2 GHz) exposure of normal human monocytes. *Bioelectromagnetics* 23, 271-277.
- Nikoloski N, Fröhlich J, Samaras T, Schuderer J, Kuster N (2005): Reevaluation and improved design of the TEM cell in vitro exposure unit for replication studies. *Bioelectromagnetics* 26, 215-224.
- Nikolova T, Czyz J, Rolletschek A, Blyszczuk P, Fuchs J, Jovtchev G, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM (2005): Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *FASEB J* 19, 1686-1688.

Nylund R, Leszczynski D (2004): Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926 after exposure to GSM 900 radiation. *Proteomics* 4, 1359-1365.

Nylund R, Leszczynski D (2006): Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seems to be genome- and proteome-dependent. *Proteomics* 6, 4769-4780.

Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Rad Res* 122, 86-94.

Ono T, Saito Y, Komura J, Ikehata H, Tarusawa Y, Nojima T, Goukon K, Ohba Y, Wang J, Fujiwara O, Sato R (2004): Absence of mutagenic effects of 2.45 GHz radiofrequency exposure in spleen, liver, brain, and testis of lacZ-transgenic mouse exposed in utero. *Tohoku J Exp Med.* 202, 93-103.

Paulraj R, Behari J (2006): Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation. *Mutat Res* 11, 596, 76-80.

Penafiel LM, Litovitz T, Krause D, Desta A, Mullins JM (1997): Role of modulation on the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity in L929 cells. *Bioelectromagnetics* 18, 132-141.

Pyrpasopoulou A, Kotoula V, Cheva A, Hytiroglou P, Nikolakaki E, Magras IN, Xenos TD, Tsiboukis TD, Karkavelas G (2004): Bone morphogenetic protein expression in newborn rat kidneys after prenatal exposure to radiofrequency radiation. *Bioelectromagnetics.* 25, 216-227.

Qutob SS, Chauhan V, Bellier PV, Yauk CL, Douglas GR, Berndt L, Williams A, Gajda GB, Lemay E, Thansndote A, McNamee JP (2006): Microarray gene expression profiling of a human glioblastoma cell line exposed *in vitro* to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Rad Res* 165, 636-644.

Remondini D, Nylund R, Reivinen J, Poullietier de Gannes F, Veyret B, Lagroye I, Haro E, Trillo MA, Capri M, Franceschi C, Schlatterer K, Gminski R, Fitzner R, Tauber R, Schuderer J, Kuster N, Leszczynski D, Bersani F, Maercker C (2006): Gene expression changes in human cells after exposure to mobile phone microwaves. *Proteomics* 6, 4745-4754.

Repacholi MH, Basten A, Gebiski V, Noonan D, Finnie J, Harris AW (1997): Lymphomas in E μ -Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHz electromagnetic fields. *Radiat Res* 147, 631-640

Rothkamm K, Loebrich M (2003): Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5057-5062.

Sakuma N, Komatsubara Y, Takeda H, Hirose H, Sekijima M, Nojima T, Miyakoshi J (2006): DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations. *Bioelectromagnetics* 27, 51-57.

Scarfi MR, Fresegna AM, Villani P, Pinto R, Marino C, Sarti M, Altavista P, Sannino A, Lovisolo GA (2006): Exposure to radiofrequency radiation (900 MHz, GSM signal) does not affect micronucleus frequency and cell proliferation in human peripheral blood lymphocytes: an interlaboratory study. *Rad Res* 165, 655-635.

Schönborn F, Pokovic K, Wobus AM, Kuster N (2000): Design, optimization, realization, and analysis of an *in vitro* system for the exposure of embryonic stem cells at 1.71 GHz. *Bioelectromagnetics.* 21, 372-384.

- Schuderer J, Spät D, Samaras T, Oesch W, Kuster N (2004a): In Vitro Exposure Systems for RF Exposures at 900 MHz. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 52, 2067-2075.
- Schuderer J, Samaras T, Oesch W, Spät D, Kuster N (2004b): High peak SAR exposure unit with tight exposure and environmental control for in vitro experiments at 1800 MHz. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 52, 2057-2066.
- Shallom JM, Di Carlo AL, Ko D, Penafiel LM, Nakai A, Litovitz TA (2002): Microwave exposure induces Hsp70 and confers protection against hypoxia in chick embryos. *J Cell Biochem* 86, 490-496.
- Simko M, Hartwig C, Lantow M, Lupke M, Mattsson MO, Rahman Q, Rollwitz J (2006): Hsp70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac6 cells. *Toxicol Lett* 161, 73-82.
- Sommer AM, Streckert J, Bitz AK, Hansen VW, Lerchl A (2004): No effects of GSM-modulated 900 MHz electromagnetic fields on survival rate and spontaneous development of lymphoma in female AKR/J mice. *BMC Cancer* 4, 77 (doi: 10.1186/1471-2407-4-77).
- Speit G, Schütz P, Hoffmann H (2007): Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic field exposure (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutat Res* 626, 42-47.
- Strahlenschutzkommission (2001): Grenzwerte und Vorsorgemaßnahmen zum Schutz der Bevölkerung vor elektromagnetischen Feldern, Empfehlung der Strahlenschutzkommission mit wissenschaftlicher Begründung, Berichte der SSK, Heft 29, Urban & Fischer, München, Jena.
- Stronati L, Testa A, Moquet J, Edwards A, Cordelli E, Villani P, Marino C, Fresegna AM, Appolloni M, Lloyd D (2006): 935 MHz cellular phone radiation. An *in vitro* study of genotoxicity in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 82, 339-346.
- Takashima Y, Hirose H, Koyama S, Suzuki Y, Taki M, Miyakoshi J (2006): Effects of continuous and intermittent exposure to RF fields with a wide range of SARs on cell growth, survival, and cell cycle distribution. *Bioelectromagnetics* 27, 392-400.
- Thorlin T, Rouquette J-M, Hamnerius Y, Hansson E, Person M, Björklund U, Rosengren L, Rönnbäck L, Persson M (2006): Exposure of cultured astroglial and microglial brain cells to 900 MHz microwave radiation. *Rad Res* 166, 409-421.
- Tian F, Nakahara T, Wake K, Taki M, Miyakoshi J (2002): Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields induces hsp70 at a high SAR of more than 20 W/kg but not at 5W/kg in human glioma MO54 cells. *Int J Radiat Biol* 78, 433-440.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Trosic I, Busljeta I, Modlic B (2004): Investigation of the genotoxic effect of microwave irradiation in rat bone marrow cells: in vivo exposure. *Mutagenesis* 19, 361-364.
- Trosic I, Busljeta I. (2006): Erythropoietic dynamic equilibrium in rats maintained after microwave irradiation. *Exp Toxicol Pathol* 57, 247-251.
- Utteridge TD, Gebiski V, Finnie JW, Vernon-Roberts B, Kuchel TR (2002): Long-term exposure of E-mu-Pim1 transgenic mice to 898.4 MHz microwaves does not increase lymphoma incidence. *Radiat Res* 158, 357-364.

- Verschaeve L (2005): Genetic effects of radiofrequency radiation (RFR). *Toxicol Appl Pharmacol* 207 (2 Suppl), 336-341.
- Verschaeve L, Heikkinen P, Verheyen G, Van Gorp U, Boonen F, Vander Plaetse F, Maes A, Kumlin T, Maki-Paakkanen J, Puranen L, Juutilainen J (2006): Investigation of co-genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields *in vivo*. *Radiat Res* 165, 598-607.
- Vijayalaxmi, Sasser LB, Morris JE, Wilson BW, Anderson LE (2003): Genotoxic potential of 1.6 GHz wireless communication signal: *in vivo* two-year bioassay. *Rad Res* 159, 558-564.
- Vijayalaxmi, Obe G (2004): Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation. *Radiat Res* 162, 481-496.
- Vijayalaxmi (2006): Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed *in vitro* to 2.45 GHz or 8.2 GHz radiofrequency radiation. *Rad Res* 166, 532-538.
- Vijayalaxmi, McNamee JP, Scarfi MR (2006): Letter to the editor: Comments on DNA strand breaks by Diem et al. and Ivancsits et al. *Mutation Res* 603 104-106.
- Whitehead TD, Brownstein BH, Parry JJ, Thompson D, Cha BA, Moros EG, Rogers BE, Roti Roti, JL (2005): Expression of the proto-oncogene Fos after exposure to radiofrequency radiation relevant to wireless communications. *Rad Res* 164, 420-430.
- Whitehead TD, Moros EG, Brownstein BH, Roti Roti JL (2006): Gene expression does not change significantly in C3H 10T $\frac{1}{2}$ cells after exposure to 847.74 CDMA or 835.62 FDMA radiofrequency radiation. *Rad Res* 165, 626-635.
- Yu D, Shen Y, Kuster N, Fu Y, Chiang H (2006): Effects of 900 MHz GSM wireless communication signals on DMBA-induced mammary tumors in rats. *Rad Res* 165, 174-180.
- Zeni O, Chiavoni AS, Sannino A, Antolini A, Forigo D, Bersani F, Scarfi MR (2003): Lack of genotoxic effects (micronucleus induction) in human lymphocytes exposed *in vitro* to 900 MHz electromagnetic fields. *Radiat Res* 160, 152-158.
- Zeni O, Romano M, Perrotta A, Lioi MB, Barbieri R, d'Ambrosio G, Massa R, Scarfi MR (2005): Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute *in vitro* exposure to 900 MHz radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics* 26, 258-265.
- Zhang DY, Xu ZP, Chiang H, Lu DQ, Zeng QL (2006): Effects of GSM 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields on DNA damage in Chinese hamster lung cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 40, 149-152.
- Zotti-Martelli L, Peccatori M, Maggini V, Ballardini M, Barale R (2005): Individual responsiveness to induction of micronuclei in human lymphocytes after exposure *in vitro* to 1800-MHz microwave radiation. *Mutat Res* 582, 42-52.