

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Toxikologie  
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Helga Stopper

**Analysen zur potentiellen Gentoxizität  
von Terahertzstrahlung in vitro**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Thorsten Riese  
aus Schweinfurt

Würzburg, November 2014

**Referentin:** Prof. Dr. Helga Stopper

**Korreferentin:** Prof. Dr. Anna Tcholpon Djuzenova

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 15. Juli 2015

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Terahertzexpositionen</i> .....	1
1.1.1. Anwendungsgebiete von Terahertzstrahlung.....	1
1.1.2. Eigenschaften von Terahertzstrahlung.....	1
1.1.3. Wirkungen auf biologische Systeme.....	2
1.1.3.1. Aufbau und Struktur von Keratinozyten.....	2
1.1.3.2. Physikalische Grundlagen der Terahertz-Gewebe-Interaktion....	3
1.1.3.3. Thermische und nicht-thermische Effekte.....	4
1.1.3.3.1. Thermische Effekte.....	4
1.1.3.3.2. Nicht-thermische Effekte.....	4
1.1.4. Nachweis von Genotoxizität.....	5
1.1.4.1. Voraussetzungen des Mikrokerntests.....	5
1.1.4.2. Ergebnisse des CBMN-Mikrokerntests.....	6
1.1.4.3. Mikrokerne.....	6
1.1.4.4. Nukleäre „Buds“ (NBUDs).....	7
1.1.4.5. Nukleoplasmatische Brücken (NPB).....	7
1.2. <i>Temperaturexpositionen</i> .....	8
1.2.1. Einfluss von Temperaturerhöhung.....	8
1.2.2. Quantifizierung temperaturabhängiger Hitzeschockproteine.....	9
1.2.2.1. Aufgabe und Funktion der Chaperone.....	9
1.2.2.2. Die Entdeckung der Hitzeschockproteine.....	10
1.2.2.3. Die Hsp70-Familie.....	11
1.2.2.3.1. Konstitutiv exprimierte Proteine.....	12
1.2.2.3.2. Stress-induziert exprimierte Proteine.....	12
1.2.2.3.3. Strukturelle Eigenschaften der Hsp70-Proteine.....	14
1.2.2.4. Stresstoleranz von Zellen.....	14
1.3. <i>Bisherige Untersuchungen</i> .....	15
1.3.1. Auswirkungen von Terahertzstrahlung.....	15
1.3.2. Auswirkungen von Temperaturerhöhung.....	16
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>18</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1. <i>Material</i> .....	19
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	19
3.1.2. HaCaT-Zelllinie.....	19
3.2. <i>Methoden</i> .....	19
3.2.1. Zellkultur und Subkultivierung.....	19
3.2.2. Terahertzexpositionen.....	20
3.2.2.1. Versuchsaufbau.....	21

3.2.2.2. Sonstige Behandlungen.....	22
3.2.2.3. Auflistung der durchgeführten Versuche.....	22
3.2.3. Temperaturexpositionen.....	23
3.2.3.1. Herstellung der Proben für den Mikrokerntest.....	23
3.2.3.2. Herstellung der Proben für die Proteinbestimmung.....	23
3.2.4. Mikrokerntest.....	24
3.2.4.1. SafeGreen-Färbung.....	24
3.2.4.2. Mikroskopie.....	24
3.2.4.3. Mikroskopiekriterien.....	24
3.2.4.3.1. Ein-, doppel- und mehrkernige Zellen.....	24
3.2.4.3.2. Apoptotische Zellen.....	25
3.2.4.3.3. Mitotische Zellen.....	25
3.2.4.3.4. Sonstige Zellen.....	25
3.2.4.3.5. Kriterien für Mikrokerne, NBUDs und NPB.....	25
3.2.4.3.6. Mikrokerne.....	26
3.2.4.3.7. Nukleäre „Buds“ (NBUDs).....	26
3.2.4.3.8. Nukleoplasmatische Brücken (NPB).....	26
3.2.5. Western Blot.....	27
3.2.5.1. SDS-PAGE (Gelelektrophorese).....	27
3.2.5.1.1. Herstellung und Vorbereitung des Elektrophoresegels.....	27
3.2.5.1.2. Proteinisolierung aus den Temperaturexpositionen.....	27
3.2.5.1.3. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.....	27
3.2.5.1.4. Vorbereitung der Proben, des Gels und Elektrophorese.....	28
3.2.5.2. Blotting und Immunfärbung.....	28
3.2.5.2.1. Blotting.....	28
3.2.5.2.2. Immunfärbung.....	28
3.2.5.3. Entwicklung und Auswertung.....	29
3.2.6. Statistik.....	29
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
4.1. Terahertzexpositionen.....	30
4.1.1. Mikrokerne.....	31
4.1.1.1. Versuchsreihe 1.....	31
4.1.1.2. Versuchsreihe 2.....	32
4.1.1.3. Versuchsreihe 3.....	33
4.1.1.4. Zusammenfassung Mikrokerne.....	34
4.1.2. Nukleäre „Buds“.....	35
4.1.2.1. Versuchsreihe 1.....	35
4.1.2.2. Versuchsreihe 2.....	36
4.1.2.3. Versuchsreihe 3.....	37
4.1.2.4. Zusammenfassung Nukleäre „Buds“.....	38
4.1.3. Nukleoplasmatische Brücken.....	39
4.1.3.1. Versuchsreihe 1.....	39
4.1.3.2. Versuchsreihe 2.....	40
4.1.3.3. Versuchsreihe 3.....	41
4.1.3.4. Zusammenfassung Nukleoplasmatische Brücken.....	42

4.1.4. Apoptosen.....	43
4.1.4.1. Versuchsreihe 1.....	43
4.1.4.2. Versuchsreihe 2.....	44
4.1.4.3. Versuchsreihe 3.....	45
4.1.4.4. Zusammenfassung Apoptosen.....	46
4.1.5. Mitosen.....	47
4.1.5.1. Versuchsreihe 1.....	47
4.1.5.2. Versuchsreihe 2.....	48
4.1.5.3. Versuchsreihe 3.....	49
4.1.5.4. Zusammenfassung Mitosen.....	50
4.1.6. Cytochalasin-B-Proliferationsindex.....	51
4.1.6.1. Versuchsreihe 1.....	51
4.1.6.2. Versuchsreihe 2.....	52
4.1.6.3. Versuchsreihe 3.....	53
4.1.6.4. Zusammenfassung Cytochalasin-B-Proliferationsindex.....	54
4.2. <i>Temperaturexpositionen</i> .....	55
4.2.1. Mikrokerne.....	56
4.2.2. Nukleäre „Buds“.....	57
4.2.3. Nukleoplasmatische Brücken.....	58
4.2.4. Apoptosen.....	59
4.2.5. Mitosen.....	60
4.2.6. Cytochalasin-B-Proliferationsindex.....	61
4.3. <i>Western Blot: Hitzeschockproteinexpression</i> .....	63
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>66</b>
5.1. <i>Terahertzexpositionen</i> .....	66
5.2. <i>Temperaturexpositionen</i> .....	71
5.3. <i>Western Blot</i> .....	74
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>76</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>77</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>84</b>
9.1. <i>Ergebnisse der Terahertzexpositionen</i> .....	84
9.2. <i>Ergebnisse der Temperaturexpositionen</i> .....	86

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CBMN	„cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay“
CBPI	Cytochalasin-B-Proliferationsindex
CHL	„chinese hamster lung“
CHO	„chinese hamster ovary“
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cyt-B	Cytochalasin-B
d.h.	das heißt
DK	doppelkernig
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GHz	Gigahertz
Gy	Gray
h	Stunde
HDF	humane dermale Fibroblasten
HRP	„horseradish peroxidase“
HSE	„heat shock sequence elements“
HSF	„heat shock factor“
l	Liter
min	Minute
MK	Mikrokern
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMC	Mitomycin-C
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	„messenger RNA“ (Boten-Ribonukleinsäure)
mW	Milliwatt
NBUD	nukleärer „Bud“
nm	Nanometer
NPB	nukleoplasmatische Brücke
PBS	„phosphate buffered saline“
PVDF	Polyvinylidenfluorid

SDS-PAGE	„sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“
TBS-T	„Tris(-hydroxymethyl-aminomethan)-buffered saline“ + „Tween 20“ (Polysorbat 20)
THz	Terahertz
U	Umdrehung
U	Unit
UV	Ultraviolett
VIN	Vinblastin

## Formelzeichen

$c$	Lichtgeschwindigkeit
$E$	Energie
$h$	Plancksches Wirkungsquantum
$\lambda$	Wellenlänge
$\nu$	Frequenz

## **1. Einleitung**

### **1.1. Terahertzexpositionen**

#### **1.1.1. Anwendungsgebiete von Terahertzstrahlung**

Für Sicherheitszwecke, etwa zum Auffinden verbotener Gegenstände an Flughäfen, werden Geräte benutzt, die mit elektromagnetischer Strahlung im Terahertzbereich arbeiten.

Am 27. September 2010 begann der bundesweit erste Praxistest von sogenannten „Ganzkörperscannern“ unter dem damaligen Bundesinnenminister Thomas de Maizière auf dem Hamburger Flughafen Fuhlsbüttel in der Hoffnung, die Flugsicherheit zu erhöhen (Lutz 2010).

Neben diesem von der Öffentlichkeit breit wahrgenommenen Anwendungsgebiet findet Terahertzstrahlung zunehmende Verwendung in Bereichen der Medizin (Pickwell / Wallace 2006) und dort insbesondere in der Onkologie. So kann Terahertzstrahlung zum Beispiel bei der histologischen Diagnostik von Tumorerkrankungen einen zusätzlichen Informationsgewinn zur Unterscheidung von gesundem und Tumorgewebe liefern (Brun et al. 2010, Woodward et al. 2002).

#### **1.1.2. Eigenschaften von Terahertzstrahlung**

Im Konsens mit vielen anderen Autoren beinhaltet elektromagnetische Strahlung im Terahertzbereich im Allgemeinen Frequenzen zwischen 0,1 und 10 THz, was umgerechnet  $10^{11}$  bis  $10^{13}$  Schwingungen pro Sekunde entspricht. Die zugehörigen Wellenlängen betragen, entsprechend der Beziehung  $\lambda = c / \nu$ , 30 - 3000  $\mu\text{m}$ ; die zugehörigen Photonen besitzen eine Energie von 0,4 - 41,0 meV ( $E = h \cdot \nu$ ).



## 1. Einleitung

Im gesamten Spektrum elektromagnetischer Strahlung liegt Terahertzstrahlung damit in einem Frequenzbereich, der von Infrarotstrahlung auf der einen und Mikrowellenstrahlung auf der anderen Seite begrenzt wird:

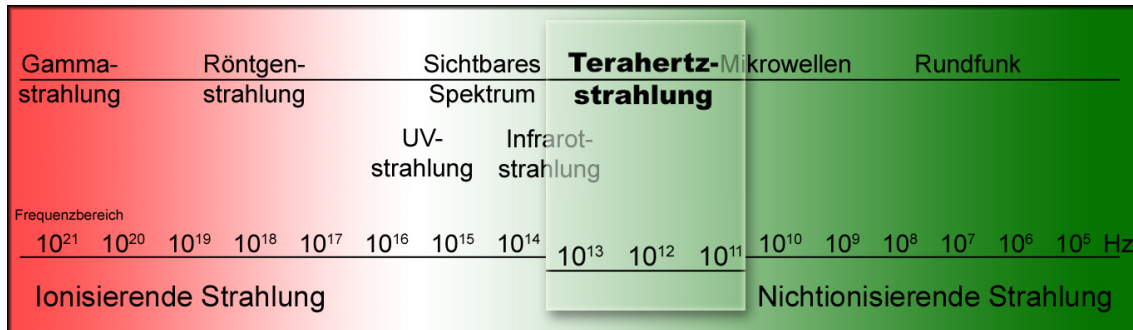


Abbildung 1.1: Übersicht über das Frequenzspektrum elektromagnetischer Strahlung

### 1.1.3. Wirkungen auf biologische Systeme

Die Energie von Terahertzstrahlung ist um ungefähr das Tausendfache geringer als zur Ionisation nötig wäre und damit, im Gegensatz zu Röntgen- oder Gammastrahlung, nicht ausreichend, um Elektronen aus einem Atom oder Molekül herauszulösen. Durch nichtionisierende Strahlung entstehen zwar keine hochreaktiven freien Radikale, dennoch reicht die Energie dieser Strahlen aus, um Temperaturerhöhungen zu induzieren, die ihrerseits wiederum schädigende Einflüsse auf biologische Systeme haben können. Die Wirkung hängt von der Art der auftretenden Strahlung und den Eigenschaften des Gewebes, auf das sie trifft, ab. Einfluss seitens der Strahlung haben die Frequenz, die Strahlungsintensität, die Zeitdauer, während der das Gewebe der Strahlung ausgesetzt ist, und die Größe des Strahls bzw. die Fläche, die von ihm erfasst wird. Seitens des Gewebes wird die Wirkung der Strahlung durch physikalische Größen wie Streuung, Absorption und Reflexion bestimmt, die abhängig vom Material, auf das die Strahlung auftrifft, sind (Wilmink / Grundt 2011: 1075 ff.).

#### 1.1.3.1. Aufbau und Struktur von Keratinozyten

Keratinozyten, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, bilden mit einem Anteil von mehr als 90 % den größten Teil der Epidermis, der

obersten Schicht der menschlichen Haut. Ihre Hauptfunktion besteht darin, durch das Bilden einer Barriere die darunterliegenden Hautschichten zu schützen. Keratinozyten entstehen aus Stammzellen im Stratum basale und differenzieren über das Stratum spinosum und Stratum granulosum weiter bis sie schließlich, nach Abbau sämtlicher Zellorganellen sowie der Synthese verschiedener Proteine und Lipide, als tote Korneozyten im Stratum corneum das verhornte Plattenepithel der Haut bilden (Fritsch 2009: 7 ff.).

Die im Stratum basale liegenden Ursprungszellen nehmen nur zu 40 % am Zellzyklus teil, während der übrige Anteil als Reserve dient und bis dahin in der G<sub>0</sub>-Phase verbleibt. Die Mitoseaktivität wird von zwei verschiedenen Zellarten, den langsam proliferierenden Stammzellen und deren Tochterzellen, den sogenannten Übergangs- oder Amplifikationszellen, übernommen. Letztere sind in der Lage vor ihrer endgültigen Differenzierung 3 - 4 Zellteilungen zu durchlaufen und übernehmen damit den größten Teil der Mitoseaktivität, so dass sich Fehler in und während der Replikation lediglich in ausdifferenzierten Zellen, nicht aber im undifferenzierten Stammzellpool verankern können (Fritsch 2009: 10).

### **1.1.3.2. Physikalische Grundlagen der Terahertz-Gewebe-Interaktion**

Die mit der Probe interagierende Strahlung wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Zu den wesentlichsten gehören Reflexion, Absorption und Streuung. An der Probenoberfläche werden die eintreffenden Strahlen mit dem Winkel ihres Auftreffens in den Raum zurück reflektiert sowie abhängig von der Brechungszahl des Probenmaterials und dem Auftreffwinkel der Strahlung in der Probe zum Einfallslot hin gebrochen. Der nicht-reflektierte Anteil der Strahlung wird entsprechend des Lambert-Beerschen-Gesetzes mit zunehmender Schichtdicke des Probenmaterials abgeschwächt. Auf diesen Effekt scheint Wasser einen größeren Einfluss zu haben als andere Makromoleküle wie DNA oder Kohlenhydrate. Eine eher untergeordnete Rolle bei der Terahertz-Gewebe-Interaktion spielt hingegen die Streuung der Strahlung, die besonders dann stark auftritt, wenn die Größe der Strukturen, auf die die Strahlung trifft, im Bereich der eintreffenden Wellenlängen liegt. Da die

Wellenlängen des Terahertzbereiches (anders als Wellenlängen des sichtbaren Lichts) jedoch deutlich größer sind als die meisten biologischen Strukturen, kann man davon ausgehen, dass das Eindringverhalten von Terahertzstrahlung überwiegend durch Absorption bestimmt wird (Wilmink / Grundt 2011: 1080 f.).

### **1.1.3.3. Thermische und nicht-thermische Effekte**

#### **1.1.3.3.1. Thermische Effekte**

Bekannt ist, dass es durch Bestrahlung, entsprechende Leistungsflussdichten vorausgesetzt, zu einem messbaren Anstieg der Temperatur kommt. Bei Leistungsflussdichten von  $2 \text{ mW/cm}^2$ , wie sie im Rahmen dieser Versuche verwendet wurden, ließen sich zwar keine signifikanten Temperaturerhöhungen nachweisen, dennoch kann wohl davon ausgegangen werden, dass eine gewisse Temperaturerhöhung, wenn auch nicht direkt quantifizierbar, durch die Strahlung im Gewebe induziert wird (Hintzsche 2011: 21).

Eine Temperatur von mindestens  $56 \text{ °C}$  über einen Zeitraum von 30 Minuten scheint nötig zu sein, um die Kernhülle an sich zu durchlöchern. Die Kernmatrix bzw. das Kernskelett ist allerdings deutlich temperaturanfälliger und durch seine vielfältigen Funktionen im Rahmen von DNA-Replikation, DNA-Reparatur und weiteren intranukleären Schritten wohl eines der thermosensibelsten Bestandteile der Zelle (Wilmink / Grundt 2011: 1087).

Dies spricht dafür, dass es auch bei weit geringeren Temperaturen zu messbaren Auswirkungen auf Kerne und Zellen kommen kann.

#### **1.1.3.3.2. Nicht-thermische Effekte**

Daneben werden von einigen Forschergruppen Anstrengungen unternommen zu zeigen, dass sogenannte mikrothermische oder nicht-thermische Effekte ebenfalls eine schädigende Rolle spielen können. Die Grundlage dieser Annahme bildet die Tatsache, dass die Frequenz von Terahertzstrahlung in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die Resonanzfrequenz biologischer Moleküle. Es wird unter anderem davon ausgegangen, dass zwischen den DNA-Doppelsträngen unter dem Einfluss von Terahertzstrahlung kleine Lücken

entstehen können, die den Transkriptionsprozess negativ beeinflussen (Wilmink / Grundt 2011: 1088).

So zeigte sich beispielsweise, dass es nach einer Bestrahlung von Mäusestammzellen, die nur eine minimale Erwärmung verursachte, zwar zu keiner gesteigerten Synthese von Hitzeschockproteinen kam, dennoch aber die Expression bestimmter anderer Gene beeinflusst wurde (Alexandrov et al. 2011).

### **1.1.4. Nachweis von Gentoxizität**

Um die Frage nach Gentoxizität von Terahertzstrahlung zu beantworten, wurde im Rahmen dieser Arbeit der von Schmid (1975) und Heddle (1973) beschriebene Mikrokerntest zum Nachweis von Chromosomenschäden verwendet (Fenech 1996: 25). Die Verlässlichkeit und Eignung des Mikrokerntests in vitro für derartige Fragestellungen beweist eine institutionenübergreifende Ringstudie (Reifferscheid et al. 2008).

#### **1.1.4.1. Voraussetzungen des Mikrokerntests**

Aus der Art wie Mikrokerne entstehen folgt zwangsläufig, dass diese nur in Zellen auftreten können, die sich bereits geteilt haben. Eine Miteinbeziehung von noch nicht geteilten Zellen in die Mikrokernelauswertung würde folglich zu falsch negativen Ergebnissen führen. Darüber hinaus ist für diese Methode wichtig, dass sich alle Zellen genau ein einziges Mal geteilt haben, da der Verbleib der entstandenen Mikrokerne während und nach weiteren Zellteilungen ungewiss ist. Diese Voraussetzungen erfüllt als Methode der sogenannte „cytokinesis-block micronucleus cytome assay“ (kurz: CBMN) (Fenech 1996: 26).

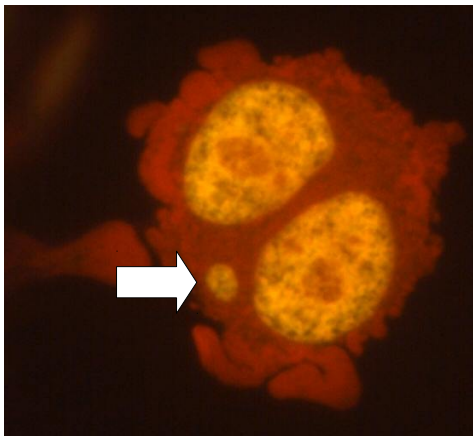
Betrachtet werden dabei Zellen, die durch Zugabe des Spindelgiftes Cytochalasin-B (Cyt-B) an ihrer vollständigen Teilung gehindert wurden und nach exakt einer Zellteilung als doppelkernige Zellen erscheinen. Cytochalasin-B greift dabei in die Zytokinese ein, indem es die Aktinpolymerisation hemmt und damit die Ausbildung eines kontraktilen Rings zur Zytoplasmateilung verhindert. Dadurch entsteht ein Kollektiv doppelkerniger Zellen aus allen sich teilenden Vorgängern, aus dem anschließend die

Auswertung bezüglich der Frage nach auftretenden Genschäden erfolgt (Fenech 1996: 26).

### 1.1.4.2. Ergebnisse des CBMN-Mikrokerntests

Der CBMN liefert gleichzeitig mehrere Informationen über den Zustand der behandelten Zellen und des Genoms: Schäden an den Chromosomen zeigen sich in Form von Mikrokernen, nukleären „Buds“ und dem Auftreten von nukleoplasmatischen Brücken. Aus dem Verhältnis der ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ergeben sich Aussagen über die zytostatischen Effekte bestimmter Expositionsbedingungen. Der Anteil der nekrotischen und apoptotischen Zellen drückt die direkte Zelltoxizität der Behandlung aus (Fenech 2007: 1084).

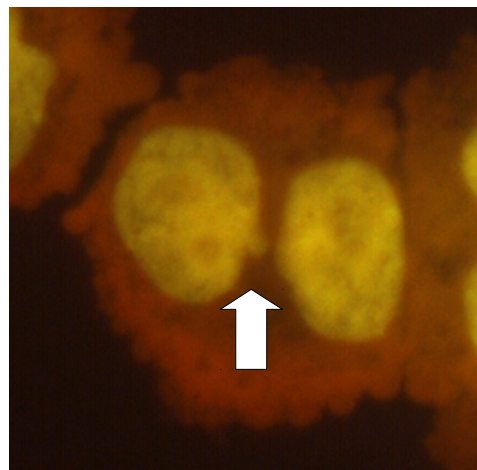
### 1.1.4.3. Mikrokerne



**Abbildung 1.2:** Eine doppelkernige Zelle mit Mikrokern (siehe Pfeil).

Mikrokerne entstehen während der Zellteilung nach Chromosomenbruch oder aus ganzen Chromosomen, die während der Anaphase der Mitose nicht mit den von Mikrotubuli gebildeten Spindelfasern zu den Spindelpolen wandern können. In der darauf folgenden Telophase bildet sich wieder eine Kernhülle um die beiden entstandenen Chromatidensätze. Im Fall von anfallenden Fragmenten oder vom Verband abgetrennten Chromosomen entsteht auch um diese eine eigene Hülle. Nachdem schließlich die Chromosomen wieder dekondensiert sind, erscheinen diese separierten Teile mit gleicher Morphologie wie die Zellkerne, jedoch abweichender Größe. Mikrokerne sind also ein Marker für Chromosomenbrüche oder -verluste (Fenech 1996: 25 f.).

Mikrokerne entstehen während der Zellteilung nach Chromosomenbruch oder aus ganzen Chromosomen, die während der Anaphase der Mitose nicht mit den von Mikrotubuli gebildeten Spindelfasern zu den Spindelpolen wandern können. In der darauf folgenden Telophase bildet sich wieder eine Kernhülle um die beiden entstandenen Chromatidensätze. Im Fall von anfallenden Fragmenten oder vom Verband abge-

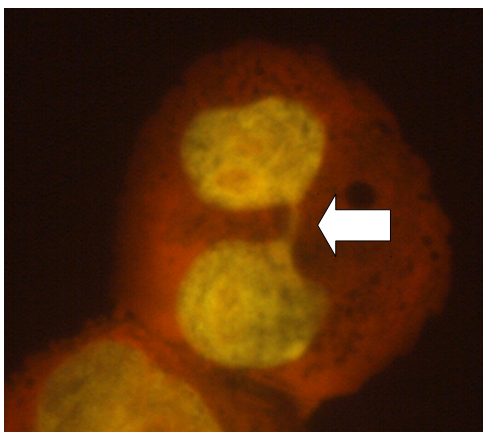


**Abbildung 1.3:** Eine doppelkernige Zelle mit NBUD (siehe Pfeil).

### 1.1.4.4. Nukleäre „Buds“ (NBUDs)

Morphologisch entsprechen nukleäre „Buds“ den Mikrokernen, sind aber über mehr oder weniger breite Ausläufer mit dem Kern verbunden und lassen sich neben den Mikrokernen und den nukleoplasmatischen Brücken als eigenständige Gruppe von Kernauffälligkeiten erfassen. Anhand von Untersuchungen an einer Onkogene tragenden Darmkrebszelllinie wurde gezeigt, dass replizierte DNA im peripheren Bereich der Zellkerne lokalisiert wird, um im zweiten Schritt aus dem Zellkern, durch Ausbildung von Knospen während der S-Phase des Zellzyklus, entfernt zu werden (Shimizu et al. 1998). Nukleäre „Buds“ sind also ein Hinweis auf die Eliminierung von vervielfältigter DNA (zum Beispiel induziert durch äußere Einflüsse) oder von DNA-Reparaturkomplexen (Fenech 2007: 1085).

### 1.1.4.5. Nukleoplasmatische Brücken (NPB)



**Abbildung 1.4:** Eine doppelkernige Zelle mit einer nukleoplasmatischen Brücke (siehe Pfeil).

Als dritter Indikator für chromosomale Schäden wird das Auftreten von nukleoplasmatischen Brücken dokumentiert, die sich als schmale, der Binnenstruktur des Kerns ähnelnde Verbindungen zwischen zwei Zellkernen darstellen. Sie entstehen während der Zellteilung zum Zeitpunkt der Anaphase, indem die Zentromere von dizentrischen Chromosomen zu zwei gegenseitigen Polen gezogen werden. Im

Normalfall werden die Brücken durch die sich ausbildenden Zellmembranen geteilt und damit zerstört, woran die Zellen allerdings beim CBMN durch das hinzugegebene Cytochalasin-B gehindert werden und sich dadurch Kernmembranen um sie bilden. Nukleoplasmatische Brücken sind vor allem Folge einer Defektreparatur von Strangbrüchen der DNA. Hierbei kann ein dizentrisches und ein azentrisches Chromosom entstehen, wobei entweder aus dem dizentrischen Chromosom eine Kernbrücke und aus dem azentrischen ein Mikrokern hervorgeht oder ein Ringchromosom entsteht, aus dem sich

ebenfalls eine Kernbrücke entwickeln kann. Ein anderer Entstehungsmechanismus ist die Fusion der Enden der Telomere, was zum Beispiel durch Verkürzung der Telomere oder den Verlust der Cap-Proteine begünstigt werden kann. In diesem Fall kann das azentrische, zum Mikrokern führende Chromosomenstück fehlen. Zusammengefasst enthält die Anzahl der ermittelten Kernbrücken entscheidende Informationen über das Ausmaß der Genomschäden durch ihre Entstehung bei fehlerhaft reparierten DNA-Brüchen oder Telomer-Fusion. Denkbar ist auch, dass einige ehemalige Kernbrücken in der späten Anaphase auseinanderbrechen und aus den Bruchstücken letztendlich Mikrokerne hervorgehen (Fenech 2007: 1084 f.).

### **1.2. Temperaturexpositionen**

#### **1.2.1. Einfluss von Temperaturerhöhung**

Das Ausmaß thermischer Auswirkungen auf biologische Strukturen hängt von verschiedenen Faktoren ab: Eine wichtige Rolle spielt die Höhe der Temperatur und die Dauer der Einwirkung. Daneben hängen die Effekte mit der Beschaffenheit des erwärmten Materials bzw. Gewebes zusammen. Hierbei spielen neben der Art des Materials auch dessen Aufbau sowie metabolische Eigenschaften wie der pH-Wert, die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration und der Glucoselevel eine Rolle. Durch Temperaturerhöhung sind Strukturdefekte der Proteine, eine Aktivierung der intrazellulären Stressreaktion, Funktionsveränderungen bis hin zum Funktionsverlust zelleigener Organellen oder gar Zelltod durch Apoptose oder Nekrose möglich (Wilmink / Grundt 2011: 1083).

Die durch Wärme auf die biologischen Strukturen übertragene Energie übersteigt ab einem gewissen Grad die intramolekularen Bindungskräfte, was zu einer Konformationsänderung bis hin zur Denaturierung führt. Sehr hohe Temperaturen jenseits von 80 °C führen in Sekunden zum nekrotischen Zelltod. Bei Temperaturen zwischen 50-70 °C führt eine längere Einwirkung über einige Minuten zu irreversiblen Strukturdefekten an Proteinen und zu einer Alles-oder-nichts-Situation bezogen auf das Überleben einzelner Zellen und schließlich

eines ganzen Organismus. Demgegenüber induzieren moderat erhöhte Temperaturen bis etwa 48 °C einen reversiblen Schaden, der nicht zuletzt dank der Hitzeschockproteine im günstigsten Fall repariert werden kann, weshalb sich dieser Bereich besonders gut zur Untersuchung bleibender und potentiell vererbbarer Zellschäden eignet (Wilmink / Grundt 2011: 1085 ff.).

Bezogen auf Genomschäden gibt es im Bereich moderat erhöhter Temperatur nur wenige Untersuchungen, die die Möglichkeiten des Mikrokerntests nutzen. Für einen systematischen Überblick auftretender Veränderungen durch länger andauernde Temperaturerhöhung wurden humane Keratinozyten nach 24-stündiger Behandlung im Bereich von 37 °C bis 42 °C mittels Mikrokerntest untersucht.

### **1.2.2. Quantifizierung temperaturabhängiger Hitzeschockproteine**

Die Untersuchung der im Rahmen einer Hitzeschockreaktion stattfindenden gesteigerten Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Hierbei ließen sich die 70 kDa Hitzeschockproteine anhand ihres Molekulargewichtes identifizieren und anschließend temperaturabhängig quantifizieren. Nachfolgend soll beginnend mit der Funktion der Chaperone im Allgemeinen über die 70 kDa Hitzeschockproteine im Speziellen auf die wichtigsten Grundlagen der Hitzeschockreaktion eingegangen werden. Die dazugehörige Methodik wird an entsprechender Stelle beschrieben.

#### **1.2.2.1. Aufgabe und Funktion der Chaperone**

Proteine, das heißt Enzyme, Rezeptoren, Kanäle und viele andere Bestandteile der Zelle, bestehen aus Aminosäuren und haben oft eine komplexe räumliche Struktur, die essentiell mit deren Funktionsweise verknüpft ist. Die Struktur eines Proteins ist abhängig von dessen Primärstruktur, also der Abfolge der einzelnen Aminosäuren im Protein und insbesondere der entsprechenden Seitenketten, die aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen miteinander auf molekularer Ebene die dreidimensionale Konformation des Proteins bestimmen (Cooper / Hausman 2009: 54 f.).



Die Gruppe der Chaperone, die ihren Namen dem französischen Wort für Anstandsdame - im Sinne von Beschützer und Begleiter - verdanken, umfasst Proteine mit der Funktion, noch ungefaltete Aminosäureketten bei der Ausbildung ihrer endgültigen räumlichen Struktur, das heißt ihrer korrekten Faltung, zu unterstützen. Die endgültige Konformation hängt auch weiterhin nur von der Primärstruktur des Proteins ab. Die Chaperone verhindern jedoch durch Bindung an noch ungefaltete Bereiche, die sich bis zur endgültigen Faltung in einem instabilen Zustand befinden, Fehlfaltungen oder die Ausbildung von funktionsunfähigen Komplexen (Cooper / Hausman 2009: 330).

Neben dieser Aufgabe tragen Chaperone auch dazu bei, noch ungefaltete Bereiche der Aminosäurekette während ihres Transports durch Zellorganellen zu stabilisieren und Proteine, die aus mehreren Teilketten bestehen, sowie andere makromolekulare Strukturen zusammenzuführen (Cooper / Hausman 2009: 330 f.).

Ein Beispiel hierfür ist das Protein Nucleoplasmin, das sich in einem in-vitro-Experiment für die Zusammenführung von DNA und Histonen zum Nukleosom verantwortlich zeigte, dabei aber weder an die DNA noch an Nucleohistone band, wohl aber mit ihnen interagierte (Earnshaw / Honda / Laskey 1980, Cooper / Hausman 2009).

Viele Autoren unterscheiden innerhalb der Gruppe der Chaperone die „molekularen Chaperone“, die konstitutiv exprimiert werden und einen eher generellen Einfluss auf die Proteinsynthese haben, von den Hitzeschockproteinen, die ganz speziell bei verschiedenen, für die Zelle potentiell schädlichen Einflüssen hochreguliert werden (De Maio 1999: 1). Insbesondere die Beobachtung dieser „eigentlichen“ Hitzeschockproteine erlaubt Aussagen über das Ausmaß von potentiell schädlichen Einwirkungen zu treffen.

### **1.2.2.2. Die Entdeckung der Hitzeschockproteine**

Zum heutigen Wissen über die Existenz einer Hitzeschockreaktion und damit der Einflussnahme von Temperatur auf die Transkriptionsaktivität in Zellen führte eine Entdeckung von Ferruccio Ritossa vor mehr als 50 Jahren, der

aufgrund eines zufällig falsch eingestellten Inkubators erstmals ein verändertes Puffmuster als Hinweis auf eine erhöhte RNA-Syntheserate nach Einwirkung von erhöhter Temperatur bei Untersuchungen an Speicheldrüsen von *Drosophila melanogaster* beschrieb (Ritossa 1962). Zwölf Jahre später wurden Versuche mit verschiedenen Geweben von *Drosophila melanogaster*, insbesondere auch den Speicheldrüsen, durchgeführt. Bei diesen wurden die SDS-PAGE-Bandenmuster von Proben, die erhöhter Temperatur ausgesetzt waren, mit Negativkontrollen verglichen. Es kam unter Hitzeeinwirkung zum Auftreten zahlreicher neuer Banden bzw. zur Intensitätssteigerung bestehender Banden, wohingegen bei anderen Banden die Intensität abnahm, was die temperaturabhängige Synthese bestimmter Proteine zeigte (Tissières et al 1974, De Maio et al. 2012).

Andere Untersuchungen ergaben, dass auch diverse weitere Faktoren zu einer Aktivierung der Hitzeschockreaktion führen. Dazu gehören Alkohol (Li 1983), Bakterien und andere pathogene Erreger (Kantengwa / Polla 1993), ein Mangel an Glucose (Pelham 1986) oder klinische Umstände wie Ischämie und nachfolgende Reperfusion von Geweben (Gingalewski et al. 1996, De Maio 1999).

### 1.2.2.3. Die Hsp70-Familie

Die Familie der 70 kDa Hitzeschockproteine enthält eine stetig wachsende Zahl an identifizierten Mitgliedern mit abweichender Aminosäuresequenz, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorkommen, teils unterschiedliche Funktionen haben und in unterschiedlichen Situationen exprimiert oder vermehrt exprimiert werden. Die Gene der Hsp70 Proteine sitzen auf verschiedenen Chromosomen. Im Folgenden werden einige der wichtigsten näher erläutert:

Protein	Alternative Bezeichnungen	Gencode	Lokalisation
Hsp70-1A	Hsp70-1; Hsp72; Hspa1	HSPA1A	6p21.3
Hsp70-1B		HSPA1B	6p21.3
Hsp70-1L	Hsp70-hom; hum70t; Hsp70t	HSPA1L	6p21.3
Hsp70-2	HspA2; Hsp70-3	HSPA2	14q24.1
Hsp70-5	Bip; Grp78; Mif2	HSPA5	9q33-q34.1

Protein	Alternative Bezeichnungen	Genname	Lokalisation
Hsp70-6	Hsp70B'	HSPA6	1cen-qter
Hsp70-8	Hsc70; Hsp71; Hsp73	HSPA8	11q23.3-q25
Hsp70-9	Grp75; mtHsp75; Mortalin	HSPA9	5q31.1

**Tabelle 1.1: Auswahl von Vertretern der 70 kDa Hitzeschockproteine (modifiziert und ergänzt nach Daugaard / Rohde / Jäättela 2007: 3703, Kampinga et al. 2009: 106)**

### **1.2.2.3.1. Konstitutiv exprimierte Proteine**

Das Hitzeschockprotein Hsp70-5 spielt eine Rolle bei der Translokation, Faltung und Vereinigung von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum, wo es konstitutiv exprimiert wird. Bei Glucosemangel (nicht aber bei Temperaturerhöhung) kommt es zu einer gesteigerten Expression (De Maio 1999: 2).

Hsp70-8 nimmt im Zytosol und Zellkern zahlreiche Funktionen wahr, wie die Faltung und membranübergreifende Translokation von entstehenden Proteinen, die Verhinderung von Aggregatbildung zwischen Proteinen oder die Chaperonvermittelte Autophagozytose, die teilweise für die Zellen von so entscheidender Bedeutung sind, dass beispielsweise Hsp70-8-knockout-Mäuse nicht lebensfähig sind (Daugaard / Rohde / Jäättela 2007: 3706).

Ebenfalls in Zytosol und Zellkern lokalisiert ist das Hitzeschockprotein Hsp70-2. Es kommt in einer geringen Grundkonzentration in zahlreichen Geweben vor, wird aber insbesondere in Gehirn und Hoden in großen Mengen gebildet. Ein Mangel wirkt sich auf die Spermatogenese bis hin zur Sterilität aus. Darüber hinaus spielt das Protein eine gewisse Rolle beim Wachstum von diversen menschlichen Tumorzellen (Daugaard / Rohde / Jäättela 2007: 3705 f.).

### **1.2.2.3.2. Stress-induziert exprimierte Proteine**

Die Gene der Hitzeschockproteine Hsp70-1a und Hsp70-1b, die nicht nur im Zytoplasma und Zellkern, sondern auch in Membranen von Lysosomen vorkommen und die Zelle vor der Zerstörung zelleigener Proteine schützen, enthalten keine Introns, so dass das posttranskriptionelle Splicing entfällt. Hsp70-1a und Hsp70-1b werden zwar stress- bzw. temperaturabhängig vermehrt, allerdings auch in einer gewissen Konzentration ständig exprimiert.

Ein Mangel führte bei Mäusen unter anderem zu erhöhter UV-Licht- und Ischämieempfindlichkeit. Auch Hsp70-6, das in verschiedenen Blutzellen (dendritische Zellen, Monozyten, natürliche Killerzellen) nachgewiesen werden konnte, trägt wohl im Fall von zellschädlichen Einflüssen zur generellen Hitzeschockreaktion bei (Daugaard / Rohde / Jäätela 2007: 3703 ff.).

Es existieren diverse Mechanismen zur raschen Heraufregulation der Hitzeschockproteine, um drohende Zellschäden zu verhindern oder zumindest abzumildern. Eine gewisse Selektivität der entsprechenden mRNA sorgt für eine gesteigerte Transkriptionsrate und eine effizientere Translation. Daneben befindet sich die ruhende RNA Polymerase II in ständiger Startbereitschaft am Beginn des entsprechenden Hsp70 Gens (De Maio 1999: 5).

In der Upstream Region der zu den Hitzeschockproteinen gehörenden Gene befinden sich mehrere nGAAn Elemente, die sogenannten „heat shock sequence elements“ (HSE), von denen mindestens zwei für die Expression der Hitzeschockproteine bei Stress verantwortlich sind. Aktiviert werden die Gene, wenn ein sogenannter „heat shock factor“ (HSF) an die HSE bindet. Er liegt im Ausgangszustand in DNA-ungebundener Form vor und bildet bei Stress durch Phosphorylierung Homooligomere, die die Bindung an DNA ermöglichen (Daugaard / Rohde / Jäätela 2007: 3703, De Maio 1999: 5).

### 1.2.2.3.3. Strukturelle Eigenschaften der Hsp70-Proteine

Die Struktur der 70 kDa Hitzeschockproteine besteht aus einer ATP-bindenden Region am N-terminalen Ende der Aminosäurenkette mit geringer ATPase-Aktivität sowie aus einer peptidbindenden Region am C-terminalen Ende. Die Interaktion mit anderen Proteinen beginnt mit der Bindung von ATP (2, Abb. 1.5) und einem hydrophoben Bereich des anderen Proteins (1). Die starke Affinität zu hydrophoben Peptiden wird durch die Hydrolyse von ATP zu ADP noch erhöht. Die dazu notwendige ATPase Aktivität wird durch weitere Hitzeschockproteine, wie Hsp40, gesteigert (3). Nachdem ADP gegen ATP ausgetauscht wurde, was durch GrpE, ein weiteres molekulares Chaperon, unterstützt wird (4), trennt sich die Polypeptidkette vom Hitzeschockprotein (5 + 6) und der Vorgang beginnt erneut (De Maio 1999: 2).

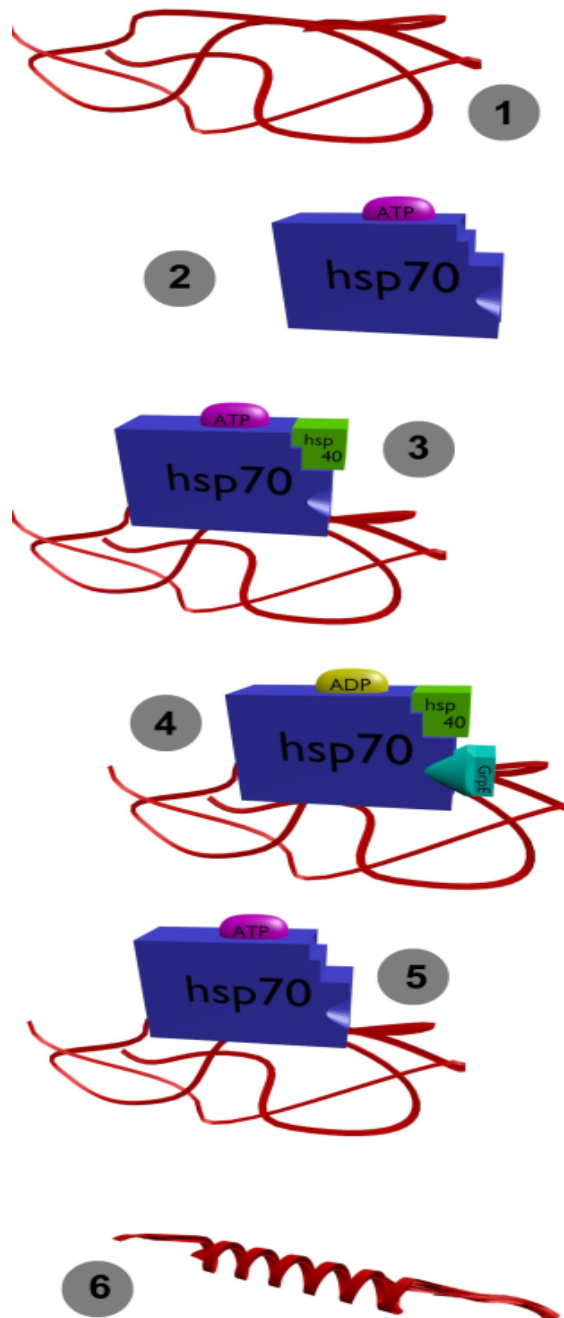


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Interaktion von Hsp70 und ungefalteten Polypeptiden (Details siehe Text, modifiziert nach De Maio 1999: 3)

### 1.2.2.4. Stresstoleranz von Zellen

Die Hitzeschockproteine sind an Schutzmechanismen gegenüber unmittelbar auftretenden Einflüssen beteiligt, indem sie zum Beispiel denaturierte Polypeptidketten zurückfalten (Freeman / Morimoto 1996), entstandene Proteinaggregate auflösen (Parsell et al. 1994) oder Mikrofilamente stabilisieren (Lavoie et al. 1993, De Maio 1999: 7).

Darüber hinaus ist an zahlreichen Beispielen belegt, dass ein milder, noch nicht tödlicher Stress im Vorfeld eine gewisse Toleranz, das heißt eine Art Stressgedächtnis, gegenüber einem nachfolgenden potentiell tödlichen Stress zu bewirken scheint. Eine besondere Rolle bei dieser Toleranzentwicklung scheinen die Hitzeschockproteine zu spielen, allen voran die der Hsp70-Familie (Li / Calderwood 2009); aber auch andere, wie zum Beispiel Hsp25, Hsp40, Hsp90 und Hsp110, tragen in Kombination mit Hsp70 oder alleine dazu bei, die Zellen vor wiederkehrendem Stress zu schützen (Beckham et al. 2008: 1f.).

So lagen beispielsweise die Überlebensraten von CHO-Zellen nach Temperaturbehandlung mit 45,5 °C, die sechs bis zehn Stunden zuvor bereits schon einmal einer Hyperthermie ausgesetzt waren, signifikant über denjenigen von Zellen, die zuvor nicht mit Hitze behandelt wurden (Sapareto et al. 1978: 395f.). Die durch erhöhte Temperatur induzierte Hitzeschockreaktion korrelierte bei Mäusen mit der Resistenz gegenüber einer nachfolgenden potentiell tödlichen Dosis von Endotoxinen (Hotchkiss et al. 1993), Ratten, in denen die Syntheserate von Hitzeschockproteinen erhöht war, überstanden eine Lungenschädigung besser (Villar et al. 1993) und das Myokard von transgenen Mäusen mit erhöhter Hsp70 Expression zeigte nach einer Ischämie gegenüber Kontrollen funktionell bessere Resultate (Plumier et al. 1995, De Maio 1999: 7).

### **1.3. Bisherige Untersuchungen**

#### **1.3.1. Auswirkungen von Terahertzstrahlung**

Einem Mangel an entsprechend notwendigem Instrumentarium für Experimente mit Terahertzstrahlung ist der Umstand geschuldet, dass in diesem Bereich weit weniger Untersuchungen existieren als in vielen Bereichen anderer Frequenzen. In den letzten Jahren ist der Terahertzfrequenzbereich vermehrt Gegenstand der Forschung geworden. Übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Schädlichkeit dieser Strahlung fehlen dennoch. Die Auswertung von 37 relevanten Studien zeigte weitgehend widersprüchliche Ergebnisse: Gepulste Expositionsversuche an PTK2 Zellen des Rattenkängurus brachten keine Veränderung der Zellmorphologie mit sich. Ein Teil der Proben zeigte

allerdings eine verminderte DNA-Synthese (Berns / Bewley 1987). Humane Keratinozyten, die für 24 Stunden mit Strahlung der Frequenz 0,140 THz bei einer Leistungsflussdichte von 0,1 – 0,25 mW/cm<sup>2</sup> gepulst bestrahlt wurden, zeigten sich in Differenzierung, Vitalität, Morphologie und Hitzeschockproteinsynthese unauffällig (Bourne et al. 2008). Auch aus weiteren Untersuchungen an Blutzellen, Mikroorganismen oder einzelnen Molekülen bzw. Molekülsystemen ließ sich kein klares Ergebnis bezüglich der Schädlichkeit von Terahertzstrahlung ableiten (Hintzsche / Stopper 2012).

Eine Übersicht über weitere durchgeführte in-vitro-Studien unterschiedlicher Zellarten, Frequenzen (0,1 – 3,68 THz), Bestrahlungszeiten (1 – 1440 Minuten) und Leistungsflussdichten (0,05 – 227,0 mW/cm<sup>2</sup>) zeigte im Bereich Wachstum und Morphologie der Zellen ein geteiltes Spektrum zwischen Ergebnissen mit gesteigerter Proliferation und solchen, bei denen keine signifikanten Veränderungen nachweisbar waren. Studien, in denen die Lipidmembran der Zellen untersucht wurde, beschrieben zwar in einigen Fällen eine Zerstörung derselben, in der Mehrzahl waren allerdings keine signifikanten Veränderungen festzustellen. Auch im Bezug auf die DNA ließ sich aus den Ergebnissen kein Trend hinsichtlich Genotoxizität ableiten (Wilmink / Grundt 2011: 1105f.).

Humane Keratinozyten (HaCaT-Zellen), zu deren Bestrahlung mit 0,106 THz der in dieser Arbeit vorgestellte Versuchsaufbau verwendet wurde, zeigten nach Expositionszeiten von bis zu acht Stunden und Leistungsflussdichten bis 0,9 mW/cm<sup>2</sup> gegenüber den Kontrollen keine signifikante Erhöhung der Mikrokernraten (Hintzsche et al. 2012).

### **1.3.2. Auswirkungen von Temperaturerhöhung**

Die Auswirkungen einer Temperaturerhöhung auf die Stabilität des Genoms, damit verbundene Chromosomenschäden und die Erhöhung der Mikrokernraten wurden an CHL-Zellen („chinese hamster lung cells“) für ausgewählte Temperaturen untersucht: Eine Exposition bei 40 °C, 41 °C und 42 °C über 24 Stunden führte zu einem signifikanten Anstieg an chromosomalen Aberrationen. Ferner zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Mikrokernraten für

die Temperaturen 40 °C und 42 °C (Inkubationszeit ebenfalls 24 Stunden) (Asanami / Shimono / Kaneda 2001).

Die Auswirkungen auf den Zellzyklus und das Überleben von CHO-Zellen unter dem Einfluss erhöhter Temperatur wurden zwischen 42,5 °C und 46 °C untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Überlebensrate bei einer bestimmten Temperaturstufe exponentiell mit der Dauer der Hyperthermie abnahm und die Anzahl der in einer bestimmten Zeitspanne untergegangenen Zellen mit zunehmender Temperatur stetig stieg. Im Bereich von 41,5 °C bis 43 °C entsprach eine Verdopplung bzw. Halbierung der Zeit im Hinblick auf das Überleben der Zellen einer Temperaturveränderung von 0,5 °C (Sapareto et al. 1978).



## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, potentiell genschädigende Effekte von nicht-ionisierender elektromagnetischer Strahlung im Terahertzbereich in vitro aufzuzeigen und die Auswirkungen von induzierter Temperaturerhöhung auf Zellen darzustellen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Gentoxizität von Terahertzstrahlung nach Langzeitexposition von kultivierten humanen Keratinozyten über 24 Stunden bei einer durchschnittlichen Leistungsflussdichte von  $2 \text{ mW/cm}^2$  mit Hilfe des Mikrokerntests untersucht werden.

Im zweiten Teil sollte vor dem Hintergrund einer durch Strahlung im Gewebe induzierten Temperaturerhöhung bestimmt werden, ob und gegebenenfalls wie sich die Rate an Mikrokernen und anderen Markern für Genschäden durch erhöhte Temperatur ändert. Hierzu wurden humane Keratinozyten nach 24-stündiger Temperaturexposition im Bereich von  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  bis  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  untersucht.

Im dritten Teil wurden schließlich die daraus gewonnenen Ergebnisse mit dem Ausmaß der Expression von  $70 \text{ kDa}$  Hitzeschockproteinen bei diesen Temperaturstufen verglichen.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Material**

#### **3.1.1. Chemikalien und Reagenzien**

Die Chemikalien und Reagenzien der dargestellten Versuche stammen – soweit nicht anders angegeben – von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), der PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) und der Invitrogen Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland).

#### **3.1.2. HaCaT-Zelllinie**

Bei den humanen Keratinozyten, mit denen die folgenden Versuche durchgeführt worden sind, handelt es sich ursprünglich um Zellen aus der Haut eines 62-jährigen Patienten, die im Rahmen einer Zweitexzision aus der Peripherie eines Melanoms gewonnen wurden, histologisch jedoch keine Auffälligkeiten zeigten und im Rahmen ihrer Kultivierung spontan immortalisierten (Boukamp et al. 1988). Die Zellen für die Experimente stammen von der CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland).

### **3.2. Methoden**

#### **3.2.1. Zellkultur und Subkultivierung**

Die als adhärente Zellen in DMEM-Medium (supplementiert mit 4,5 g/l Glucose, 10 % Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) kultivierten HaCaT-Zellen wurden in Abständen von zwei bis drei Tagen subkultiviert. Ausgehend von einer zu ca. 80 % konfluent bewachsenen 25 ml Kulturflasche erfolgte nach Entfernen des alten Nährmediums das Waschen der Zellen mit 2 ml PBS-Pufferlösung (bestehend aus 8g NaCl, 0,2 g KCl, 0,56 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gelöst in 1 Liter demineralisiertem Wasser). Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS-EDTA (0,05 % EDTA) bedeckt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen dieser Lösung wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin-EDTA (bestehend aus 0,1 % Trypsin-PBS-Lösung und PBS-EDTA, Verhältnis 1:1) für 5 bis 10 Minuten bei

37 °C bis zu deren Ablösung behandelt. Durch Zugabe von 3 ml Nährmedium wurde dieser Prozess beendet. Im Anschluss erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1000 U/min, nach der der Überstand verworfen wurde. Aus dem abgesetzten Zellpellet konnte nach dem Auflösen in neuem Nährmedium mittels Casy-Zellzähler die Zellzahl ermittelt, eine entsprechende Anzahl in Kulturflaschen ausgesät und mit Nährmedium überdeckt bei 37 °C weiter kultiviert werden.

#### **3.2.2. Terahertzexpositionen**

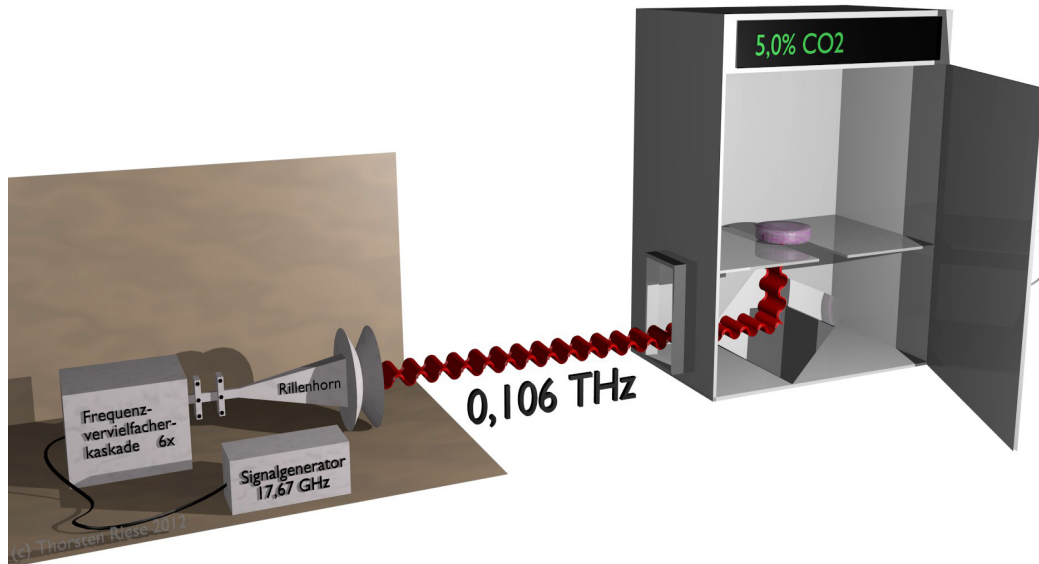
Zur Herstellung eines Präparates für jedes Experiment wurde eine Teilportion an HaCaT-Zellen aufgetaut und kultiviert. Einen Tag vor der Exposition erfolgte das Aussähen von je ca. 40.000 Zellen in  $\mu$ -Dishes (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) auf einer kreisförmigen Fläche von 1,13 cm<sup>2</sup>. Zur Zentrierung wurden spezielle Einsätze verwendet (Flexiperm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) (Hintzsche et al. 2012).

Die Auswahl der Bestrahlungsfrequenz von 0,106 THz aus dem Frequenzspektrum zwischen 0,1 und 10 THz, das von vielen Autoren als Terahertzbereich bezeichnet wird, wurde vor dem Hintergrund bisheriger Studien getroffen, in denen bei Verwendung dieser Frequenz unter anderem das Auftreten von Mitosestörungen und Aneuploidien beobachtet wurde (Hintzsche et al. 2011, Korenstein-Ilan et al. 2008).

Im Anschluss an die Terahertzexpositionen sowie die Behandlungen zur Erstellung der Positiv- und Negativkontrollen wurden die Präparate verblindet, entsprechend des Mikrokerntests (siehe Kapitel 3.2.4) aufbereitet und ausgewertet. Insgesamt erfolgten drei Versuchsreihen.

Die Terahertzexpositionen sowie die Erstellung der dazugehörigen Kontrollen wurden extern in der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig durchgeführt. Die anschließende Aufbereitung und Auswertung der Präparate erfolgte vom Autor im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg.

#### 3.2.2.1. Versuchsaufbau



**Abbildung 3.1:** Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus der Terahertzexposition von HaCaT-Zellen durch einen Gauß-Strahl der Frequenz 0,106 THz (modifiziert nach Hintzsche 2011, detaillierte Beschreibung siehe Text)

Ein nicht moduliertes Signal der Frequenz 17,67 GHz (Frequenzsynthesizer Agilent E8257D, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) wurde versechsfacht und anschließend über ein variables Dämpfungsglied in eine Hornantenne geführt. In dieser war eine variable Leistungsanpassung zwischen 0 und 155 mW möglich. Der auf 2 cm kollimierte Strahl der Frequenz 0,106 THz exponierte die mit DMEM-Medium bedeckten Zellen von unten in einem speziell modifizierten, gefensterten Brutschrank (NuAire NU-5100). Sowohl das Fenster des Inkubators als auch der Boden des  $\mu$ -Dishes wiesen eine Transmissionsrate von 95 % für die eingesetzte Strahlung auf. Zusätzlich waren die Wände des Inkubators mit absorbierender Folie verkleidet, um Streustrahlung innerhalb des Gehäuses zu minimieren. Die Expositionsdauer betrug 24 Stunden bei einer kontrollierten Leistungsflussdichte von durchschnittlich 2 mW/cm<sup>2</sup>. Während der Bestrahlung wurden die Zellen unter konstanten Bedingungen bei 36 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt sowie kontrollierter Luftfeuchte gehalten (Hintzsche 2011: 20 f., Hintzsche et al. 2012).

#### 3.2.2.2. Sonstige Behandlungen

Neben den eigentlichen Terahertzexpositionen (Leistungsflussdichte 2 mW/cm<sup>2</sup>) und den entsprechenden Sham-Expositionen (Leistungsflussdichte 0 mW/cm<sup>2</sup>) wurden Präparate für Positivkontrollen mit den Substanzen Mitomycin C und Vinblastin inkubiert sowie mit UV-Licht bestrahlt. Mitomycin C findet als alkylierendes Chemotherapeutikum medizinische Verwendung bei der palliativen Kombinationstherapie verschiedener Tumoren und führt neben der Alkylierung der DNA zu Inter- und Intrastrang-Quervernetzungen (Aktories et al. 2009: 939 ff.). Vinblastin aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide bindet spezifisch an das Cytoskelettprotein Tubulin und verhindert damit die Ausbildung des Spindelapparates, was aufgrund fehlender Chromosomentrennung wahrscheinlich zum Zelltod durch Apoptose führt (Aktories et al. 2009: 954). Daneben wurden auch Negativkontrollen in Form unbehandelter Zellen ausgewertet.

#### 3.2.2.3. Auflistung der durchgeführten Versuche

Folgende Experimente wurden durchgeführt und verblindet ausgewertet:

Behandlung	Versuchsreihe	Anzahl Proben
<b>Exposition</b> (0,106 THz, 2 mW/cm <sup>2</sup> , 24 h)	1	3
	2	4
	3	4
<b>Sham-Exposition</b> (0,106 THz, 0 mW/cm <sup>2</sup> , 24 h)	1	3
	2	4
	3	4
<b>Substanzinkubation mit Mitomycin C</b> (Positivkontrolle)	1	2
	2	3
	3	3
<b>Substanzinkubation mit Vinblastin</b> (Positivkontrolle)	1	2
	2	3
	3	3
<b>Bestrahlung mit UV-Licht</b> (Positivkontrolle)	2	3
	3	3
<b>Unbehandelte Zellen</b> (Negativkontrolle)	2	3
	3	3

#### **3.2.3. Temperaturexpositionen**

##### **3.2.3.1. Herstellung der Proben für den Mikrokerntest**

Ausgehend von kultivierten HaCaT-Zellen wurde im ersten Arbeitsschritt eine definierte Menge (Quantitätsbestimmung mittels Casy-Zellzähler) in  $\mu$ -Dishes (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) ausgesät, mit DMEM-Medium bedeckt und anschließend bei 37 °C bis zum darauf folgenden Tag inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen zu erreichen.

Am nächsten Tag wurde das gebrauchte Nährmedium entfernt, die Zellen mit 2 ml PBS-Pufferlösung gewaschen und frisches DMEM-Medium hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit 30  $\mu$ l Cytochalasin-B behandelt und für 24 Stunden bei der jeweiligen Temperatur im vorgeheizten Expositionsinubator belassen. Die Versuchsreihen fanden bei Temperaturen zwischen 37 °C und 42 °C in Abständen von einem Grad statt. Der Gehalt an CO<sub>2</sub> betrug hierbei konstant 5,0 %. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium entfernt und die Zellen durch Zugabe von Methanol bei -20 °C mindestens eine Stunde lang fixiert.

Die Exposition einer jeden Temperaturstufe wurde dreimal getrennt voneinander wiederholt, so dass pro Temperatur 6.000 doppelkernige Zellen ausgewertet wurden.

##### **3.2.3.2. Herstellung der Proben für die Proteinbestimmung**

Ausgehend von kultivierten HaCaT-Zellen wurde für jede Temperaturstufe eine Probe zur Bestimmung der Proteinkonzentration angefertigt. Hierzu wurde eine Kulturflasche entsprechender Zelldichte mit frischem DMEM-Medium bestückt und ohne Cytochalasin-B-Zugabe im vorgeheizten Inkubator für 24 Stunden bei entsprechender Temperatur behandelt. Der CO<sub>2</sub>-Gehalt betrug auch hierbei 5,0 %. Nach Ablauf der Zeit wurde durch Abtrypsinieren, anschließender Zentrifugation (5 Minuten bei 1000 U/min) und Abpipettieren des Mediums ein Zellpellet hergestellt und für die spätere Proteinisolierung bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.4. Mikrokerntest

##### 3.2.4.1. SafeGreen-Färbung

Zur Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden die in Methanol fixierten Zellen vor dem Mikroskopieren mit 10 µl SafeGreen-Lösung (Originallösung des Herstellers, Konzentration nicht angegeben) gefärbt und nach dem Waschen mit PBS-Pufferlösung mit Dabco (Mischung aus 250 mg Dabco in 10 ml PBS und 90 ml Glycerin) unter einem 18 mm Deckglass eingedeckt. Die Einwirkzeit der Safe-Green-Lösung betrug drei Minuten.

##### 3.2.4.2. Mikroskopie

Die mikroskopische Auswertung wurde an einem Nikon TE-2000-E Mikroskop mit FITC-Filter bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Präparate wurden mäanderförmig mikroskopiert, wobei zuerst anhand von 1.000 Zellen das Verhältnis von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen sowie die Anzahl an Apoptosen, Mitosen (sämtlicher Phasen) und sonstigen Zellen ausgezählt wurde. Anschließend wurden je 2.000 bzw. 3.000 doppelkernige Zellen auf das Vorhandensein von Mikrokernen, nukleären „Buds“ und nukleoplasmatischen Brücken entsprechend nachfolgender Kriterien überprüft.

##### 3.2.4.3. Mikroskopiekriterien

###### 3.2.4.3.1. *Ein-, doppel- und mehrkernige Zellen*

Zur Gruppe der ein-, doppel- und mehrkernigen ( $n > 2$ ) Zellen zählen solche mit regulärem Zytoplasma und normal geformten Zellkernen, die keine Anzeichen für Mitosen oder Apoptosen zeigen (Fenech 2007: 1092).

Ausgehend von der ermittelten Verteilung berechnet sich der Cytochalasin-B-Proliferationsindex entsprechend folgender Gleichung:

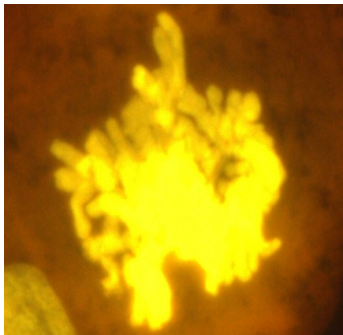
$$CBPI = \frac{\text{Anzahl Einkernige} + 2 * \text{Anzahl Doppelkernige} + 3 * \text{Anzahl Mehrkernige}}{\text{Gesamtzahl einkerniger, doppelkerniger und mehrkerniger Zellen}}$$

Der Cytochalasin-B-Proliferationsindex wird in den nachfolgenden Diagrammen mit CBPI abgekürzt angegeben.

#### **3.2.4.3.2. Apoptotische Zellen**

In der Frühphase der Apoptose kommt es zu einer Chromatinverdichtung bei noch intaktem Zytoplasma und intakter Kernmembran. In der Spätphase ist die Fragmentierung des Kerns in kleinere Kernkörperchen in noch intaktem Zytoplasma zu beobachten. Apoptotische Zellen zeigen ferner oft stärker angefärbte Kerne und Kernfragmente (Fenech 2007: 1092).

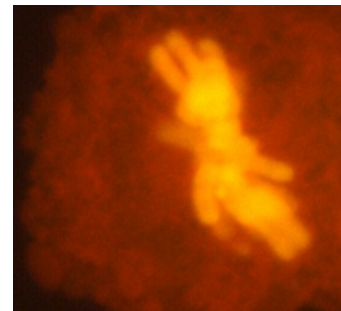
#### **3.2.4.3.3. Mitotische Zellen**



**Abbildung 3.2:** Kondensierte Chromosomen der mitotischen Prophase

In dieser Kategorie wurden die Zellen aller Mitosephasen gemeinsam erfasst. Entsprechend dem Auftreten sind dies im Einzelnen die Prophase, in der die Chromosomen kondensieren und als solche sichtbar werden (siehe Abbildung 3.2), die

Metaphase, in der sich die Chromosomen in der Äquatorialebene anordnen, nachdem zuvor die Kernmembran zusammengebrochen ist (siehe Abbildung 3.3), die Anaphase, in der die Chromosomen vom Spindelapparat zu den Zellpolen gezogen werden, wo sie sich anordnen, und zuletzt die Telophase, in der es zur Dekondensierung der Chromosomen kommt, woraufhin sich eine neue Kernhülle formiert (Koecke / Emschermann / Härle 2000).



**Abbildung 3.3:** Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene

#### **3.2.4.3.4. Sonstige Zellen**

Zellen, die keiner der oben genannten Kategorien zugeordnet werden konnten, wurden als sonstige Zellen klassifiziert.

#### **3.2.4.3.5. Kriterien für Mikrokerne, NBUDs und NPB**

Die Auswertung hinsichtlich des Auftretens von Mikrokerne, nukleären „Buds“ und nukleoplasmatischen Brücken erfolgte ausschließlich in doppelkernigen Zellen mit vorhandener und intakter Kernmembran. Ferner sollten sich die beiden Kerne nicht wesentlich in Größe und Färbung unterscheiden und sich



eindeutig als zwei getrennte Kerne differenzieren lassen. Die Zytoplasmamembran sollte intakt und die Zelle klar von umgebenden weiteren Zellen abgrenzbar sein. Auch Kombinationen, wie zum Beispiel eine Kernbrücke mit einem oder mehreren Mikrokernen, wurden gewertet (Fenech 2007: 1092f.).

#### **3.2.4.3.6. Mikrokerne**

Morphologisch sollten sich Mikrokerne, mit Ausnahme der Größe, nicht oder nicht wesentlich von normalen Zellkernen unterscheiden, sie können allerdings etwas stärker angefärbt erscheinen als der eigentliche Zellkern. Ihre Größe beträgt zwischen 1/256 und 1/9 der Größe von einem normalen Zellkern. Um Mikrokerne eindeutig unterscheiden zu können, sollten sie idealerweise weder mit dem Kern verbunden sein noch ihn überlappen (Fenech 2007: 1092).

#### **3.2.4.3.7. Nukleäre „Buds“ (NBUDs)**

Nukleäre „Buds“ entsprechen den Kriterien eines Mikrokerns (einschließlich Färbeverhalten) mit dem Unterschied, dass diese über einen Steg variabler Breite mit dem Zellkern verbunden sind (Fenech 2007: 1093).

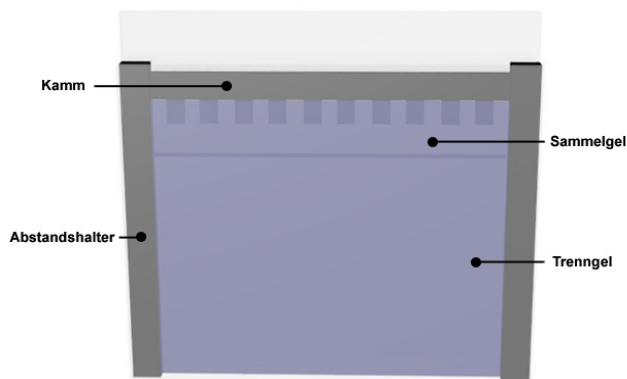
#### **3.2.4.3.8. Nukleoplasmatische Brücken (NPB)**

Bei einer nukleoplasmatischen Brücke handelt es sich um eine DNA-haltige Struktur einer doppelkernigen Zelle, die beide Zellkerne miteinander verbindet. Der Durchmesser dieser, in der Färbung den Kernen gleichenden Kernbrücke beträgt in der Regel nicht mehr als ein Viertel der Kerndurchmesser. In Ausnahmefällen können auch mehrere Kernbrücken in einer Zelle vorkommen (Fenech 2007: 1092f.).

#### 3.2.5. Western Blot

##### 3.2.5.1. SDS-PAGE (Gelelektrophorese)

###### 3.2.5.1.1. *Herstellung und Vorbereitung des Elektrophoresegels*



**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung eines Elektrophoresegels

Das Polyacrylamidgel für die elektrophoretische Proteinauftrennung besteht aus einem Sammelgel mit Ausbuchtungen, den sogenannten Probentaschen, und aus einem Trenngel, in dem nach Anlage von Strom die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse stattfindet. Die Lösungen

für das Tren- und Sammelgel werden noch flüssig zwischen zwei auf Abstand gehaltene Glasplatten pipettiert und polymerisieren dort nacheinander aus. Durch das Einsetzen eines Kamms entstehen die benötigten Probentaschen.

###### 3.2.5.1.2. *Proteinisolierung aus den Temperaturexpositionen*

Zur Isolierung der Proteine aus der Zellsuspension wurde die jeweilige Probe einer bestimmten Temperaturstufe (Herstellung siehe Kapitel 3.2.3.2) nach Zugabe von 40  $\mu$ l Homogenisierungspuffer durch Aufziehen in einer entsprechenden Kanüle homogenisiert und anschließend bei 4 °C und 14.000 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Der von den restlichen Zellbestandteilen abgesetzte, die Proteine beinhaltende Überstand wurde abpipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

###### 3.2.5.1.3. *Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration*

Die Bestimmung der in den Proben enthaltenen Proteinkonzentration wurde photometrisch mittels Bradford-Test durchgeführt. Die Extinktion bei 595 nm der zu bestimmenden Proteinproben wurde in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen (1:800 und 1:1600) jeweils dreifach photometrisch gemessen, die erhaltenen Messwerte anschließend gemittelt und mit Hilfe zweier

Standardreihen bekannter Konzentration der Proteingehalt der Proben bestimmt.

#### **3.2.5.1.4. Vorbereitung der Proben, des Gels und Elektrophorese**

Für jede Temperaturstufe wurde eine Probe mit einem Volumen von 18  $\mu\text{l}$  (13,5  $\mu\text{l}$  bestehend aus Proteinprobe / Homogenisierungspuffer, 4,5  $\mu\text{l}$  Probenpuffer) und einer Proteinmenge von 30  $\mu\text{g}$  vorbereitet, für fünf Minuten im Wasserbad auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis wieder herabgekühlt.

Nachdem das vorbereitete Gel nach Entfernung des Platzhalters in der Laufkammer eingespannt und mit Lauffpuffer bedeckt war, wurden die vorbereiteten Proben der Reihe nach in die entsprechenden Probenaschen des Gels pipettiert und zur Bestimmung der Molekülmassen der entstehenden Banden in die äußeren Probenaschen je 5  $\mu\text{l}$  eines Größenmarkers („Fermentas Page Ruler prestained protein ladder“) eingesetzt.

Die Elektrophorese fand bis zum Übertritt der Proben aus dem Sammel- in das Trenngel bei einer Spannung von 100 Volt und anschließend bis zum vollständigen Durchwandern des Trenngels bei 200 Volt statt.

#### **3.2.5.2. Blotting und Immunfärbung**

##### **3.2.5.2.1. Blotting**

Das die Banden enthaltende Trenngel wurde nach Abschluss der Elektrophorese unter Vermeidung von Luft einschüssen auf eine zugeschnittene PVDF-Membran gelegt und von Blotting Papier umgeben. Gel, Membran und Papier wurden vorher in Blotting Puffer äquilibriert. Das anschließende Blotten fand bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>, das heißt 50 mA pro Gel, über eine Zeitdauer von 90 Minuten statt. Der erfolgreiche Blot wurde durch „Ponceau S“-Färbung überprüft und fotodokumentiert.

##### **3.2.5.2.2. Immunfärbung**

Der Hintergrund der Membran wurde mit 5 % Milchpulver/TBS-T Lösung über eine Dauer von zwei Stunden bei Raumtemperatur abgeblockt.

Nach Abschluss des Blockens wurde die Membran mit TBS-T Lösung gewaschen und mit den ersten Antikörpern („anti-hsp70“ und „ $\beta$ -actin“, 1:4000 in 5 % Milchpulver/TBS-T, Santa Cruz Biotechnology) über Nacht bei 4 °C in ständig bewegter Lösung behandelt.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Lösung verworfen, die Membran dreimal mit TBS-T Lösung gewaschen, mit dem Zweitantikörper („goat anti-mouse HRP-konjugiert“, 1:10000 in 5 % Milchpulver/TBS-T, Santa Cruz Biotechnology) für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt und abschließend erneut dreimal mit TBS-T Lösung gewaschen.

#### **3.2.5.3. Entwicklung und Auswertung**

Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde die HRP-katalysierte Chemolumineszenz des Luminols genutzt. Unter Verwendung von lichtempfindlichem Fotopapier, einer entsprechenden Belichtungszeit und anschließender Entwicklung (und Fixierung) wurden die entstandenen Banden schließlich sichtbar gemacht.

Die quantitative Auswertung der Banden bezüglich Größe und Intensität erfolgte nach der Digitalisierung mittels Software („Image J“). Zur Relativierung von Konzentrationsunterschieden der aufgetragenen Proteinproben wurden die Ergebnisse der gesuchten Hsp70-Proteine ins Verhältnis zum konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Aktin (Molekulargewicht ca. 42 kD) gesetzt und so bezüglich der Proteinmenge normalisiert.

#### **3.2.6. Statistik**

Die gewonnenen Daten der Terahertz- und Temperaturexpositionen wurden auf Veränderungen in den unterschiedlich behandelten Proben, wie erhöhte Mikrokernfrequenzen oder eine gesteigerte Apoptoserate, gegenüber den Kontrollen untersucht. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests (Software „IBM SPSS Statistics“, Version 21, 64-Bit) überprüft. Als statistisch signifikant wurden Werte mit  $p \leq 0,05$  angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Terahertzexpositionen

Die Ergebnisse der über 24 Stunden durchgeführten Langzeitexpositionen gliedern sich in den drei durchgeführten Expositionsreihen in vier Expositionsarten: in die eigentlichen Expositionen, die mit 0,106 THz bei einer Leistungsflussdichte von 2 mW/cm<sup>2</sup> bestrahlt wurden, die sogenannten Sham-Expositionen, die bei ansonsten identischen Bedingungen jedoch einer Leistungsflussdichte von 0 mW/cm<sup>2</sup> behandelt wurden, sowie in die Substanzinkubationen mit Mitomycin C und Vinblastin. In Versuchsreihe 2 und 3 wurden zusätzlich noch mit UV-Licht behandelte und unbehandelte Präparate ausgewertet. Die jeweiligen Proben wurden vor ihrer Auswertung verblindet.

Zur Analyse der Zellmorphologie wurden je Präparat 1.000 Zellen hinsichtlich ihrer Struktur beurteilt und in ein-, zwei- und mehrkernige Zellen sowie apoptotische, mitotische (alle Phasen) und sonstige Zellen unterteilt.

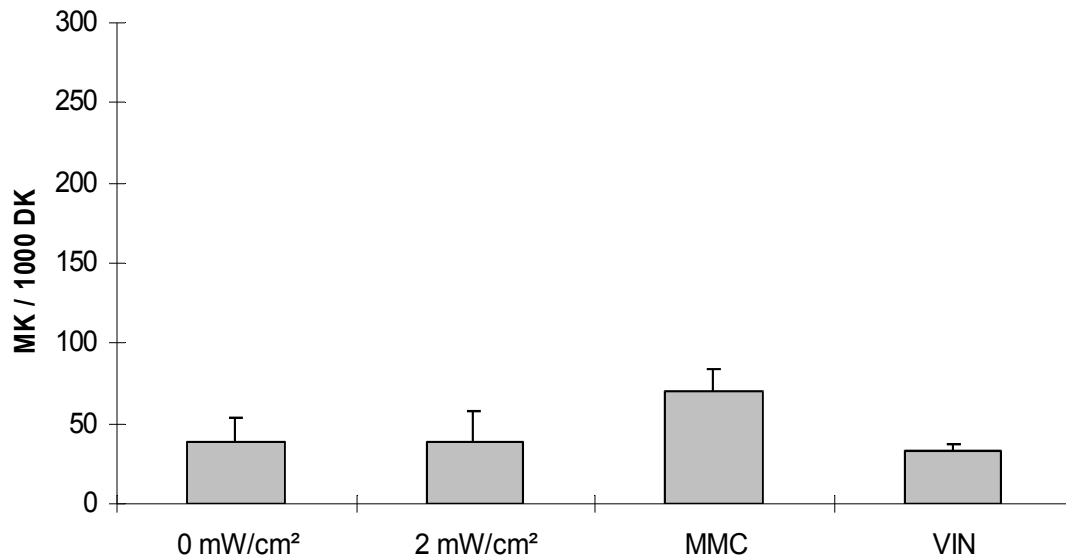
Hinsichtlich des Auftretens von Mikrokernen, nukleären „Buds“ und nukleoplasmatischen Brücken wurden ausschließlich doppelkernige Zellen untersucht und anschließend eine durchschnittliche Häufigkeit des Auftretens dieser Strukturen in 1.000 doppelkernigen Zellen angegeben. Die Anzahl der ausgewerteten doppelkernigen Zellen ist beim jeweiligen Ergebnisteil sowie bei der Ergebnisübersicht im Anhang mit aufgeführt.

Werte in Klammern geben die Standardabweichung an. Eine detaillierte Auflistung der jeweiligen Einzelwerte der Ergebnisse befindet sich im Anhang.

Daten, die bereits veröffentlicht wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

### 4.1.1. Mikrokerne

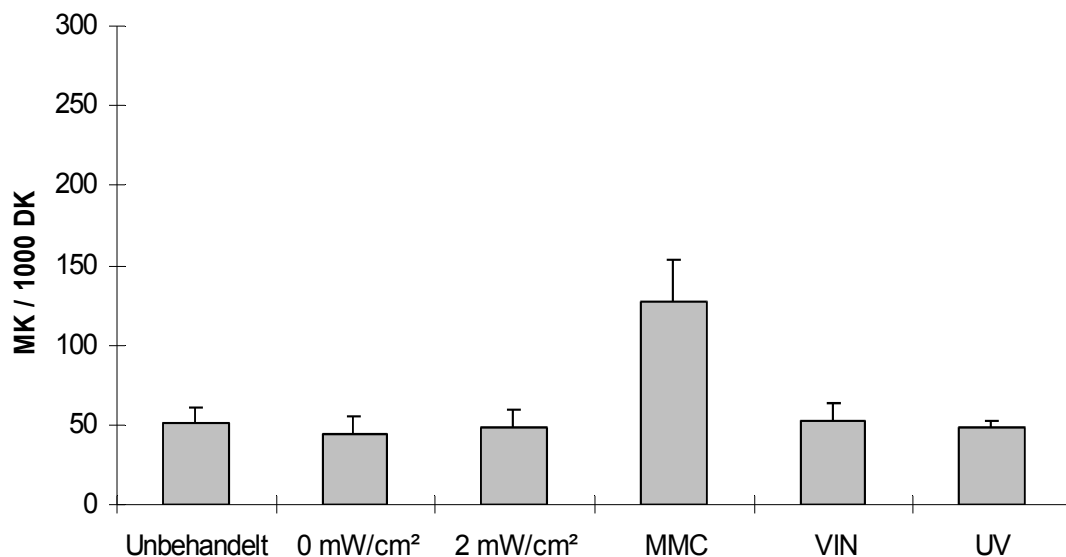
#### 4.1.1.1. Versuchsreihe 1



**Abbildung 4.1:** Durchschnittliche Anzahl mikrokernhaltiger Zellen in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Präparaten (à 2.000 ausgezählte doppelkernige Zellen) für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus zwei Präparaten (à 1.000 ausgezählte doppelkernige Zellen) für die mit MMC und Vinblastin behandelten Zellen.

In der ersten Versuchsreihe traten bei den als Negativkontrolle dienenden Sham-Expositionen in durchschnittlich 38,0 (+/- 15,5) von 1.000 doppelkernigen Zellen Mikrokerne auf. Der Wert der mit 0,106 THz bestrahlten Exponate (Leistungsflussdichte 2 mW/cm<sup>2</sup>) lag bei durchschnittlich 38,7 (+/- 19,0) mikrokernhaltigen Zellen und war damit nicht signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Auswertung der Substanzinkubationen ergab bei den mit Mitomycin C behandelten Proben einen deutlich erhöhten Durchschnittswert von 69,5 (+/- 14,8) Mikrokernzellen und einen leicht erniedrigten Wert von 33,0 (+/- 4,2) bei den mit Vinblastin behandelten Proben.

### 4.1.1.2. Versuchsreihe 2

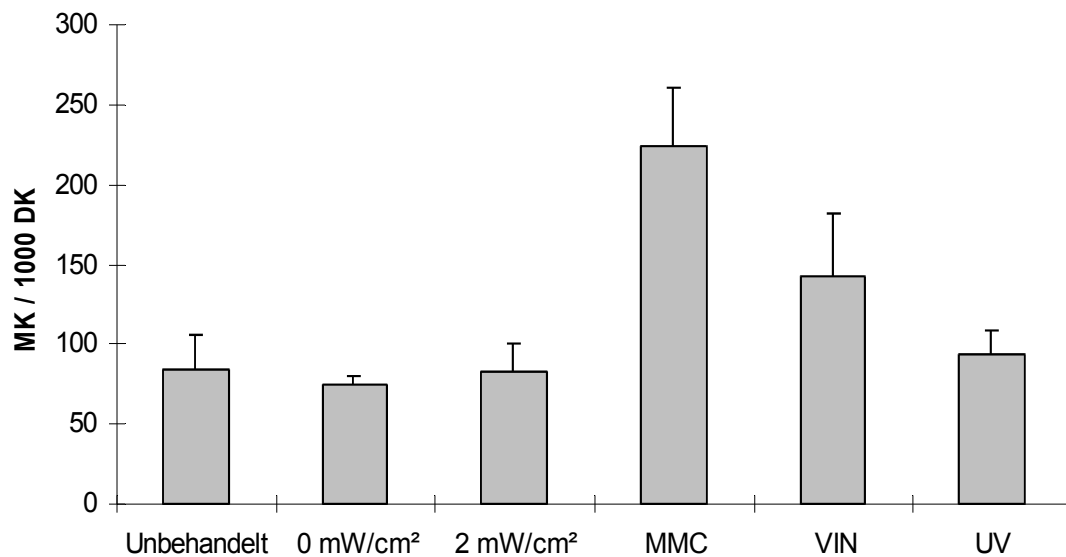


**Abbildung 4.2:** Durchschnittliche Anzahl mikrokernhaltiger Zellen in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus vier Präparaten für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus drei für die mit MMC, Vinblastin (n=7.171 siehe Text) und UV-Licht behandelten und die unbehandelt gebliebenen Zellen (3.000 ausgezählte doppelkernige Zellen je Präparat).

Die Ergebnisse von Versuchsreihe 2 und 3 der Exposition und der entsprechenden Sham-Exposition beruhen auf jeweils 12.000 ausgewerteten doppelkernigen Zellen, die Ergebnisse der restlichen Behandlungsmodalitäten auf jeweils 9.000 doppelkernigen Zellen, mit Ausnahme der Vinblastinpräparate in Versuchsreihe 2, in denen aufgrund einer zu geringen Anzahl doppelkerniger Zellen in Präparat 2 und 3 nur 2.000 bzw. 2.171 Zellen ausgewertet werden konnten.

Die durchschnittliche Anzahl mikrokernhaltiger Zellen in 1.000 Doppelkernigen lag bei den Sham-Expositionen mit 44,8 (+/- 10,5), den THz-Expositionen mit 48,7 (+/- 10,7), den Vinblastin-Inkubationen mit 52,3 (+/- 11,7), der UV-Licht-Behandlung mit 49,0 (+/- 3,8) sowie den unbehandelten Proben mit 51,0 (+/- 10,0) auf einem ähnlichen Niveau. Die Positivkontrolle mit MMC zeigte in 127,7 (+/- 26,0) von 1.000 doppelkernigen Zellen Mikrokerne und damit erneut deutlich erhöhte Werte.

### 4.1.1.3. Versuchsreihe 3

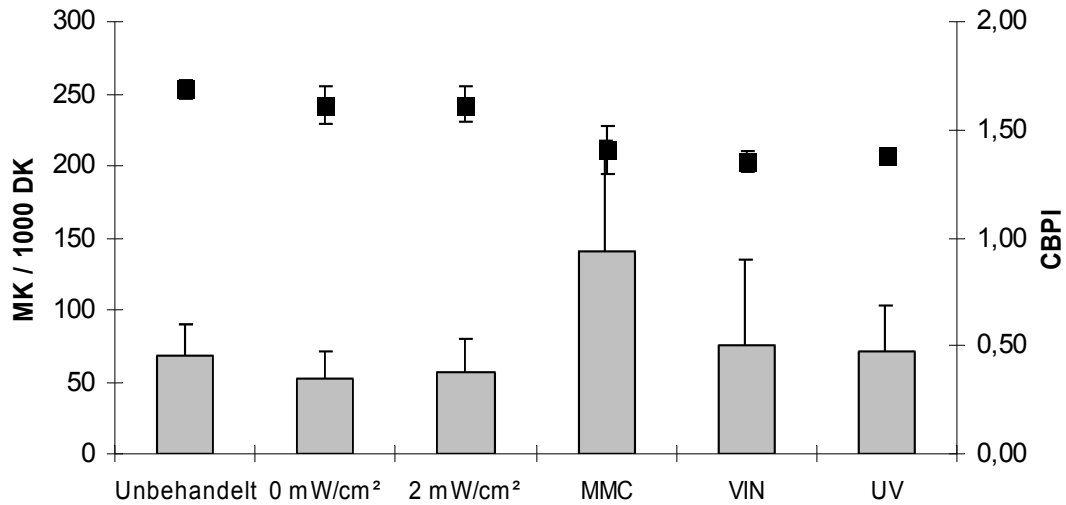


**Abbildung 4.3:** Durchschnittliche Anzahl mikrokernhaltiger Zellen in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus vier Präparaten für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus drei für die mit MMC, Vinblastin und UV-Licht behandelten und die unbehandelt gebliebenen Zellen (3.000 ausgezählte doppelkernige Zellen je Präparat).

In der dritten Versuchsreihe zeigte sich in den strahlenexponierten Proben in durchschnittlich 82,8 (+/- 18,1) von 1.000 DK-Zellen ein Mikrokernvorkommen. Die Negativkontrollen ergaben Werte von 74,2 (+/- 6,1) für die Sham-Exposition und 84,0 (+/- 22,1) für die unbehandelten Zellen. Erwartungsgemäß war in den MMC-Positivkontrollen die Anzahl mikrokernhaltiger Zellen erhöht (223,5 (+/- 37,1)). Dies galt auch für die Vinblastinproben (142,9 (+/- 39,5)). Die UV-Licht-Behandlung ergab einen Wert von 94,0 (+/- 15,0).



4.1.1.4. Zusammenfassung Mikrokerne

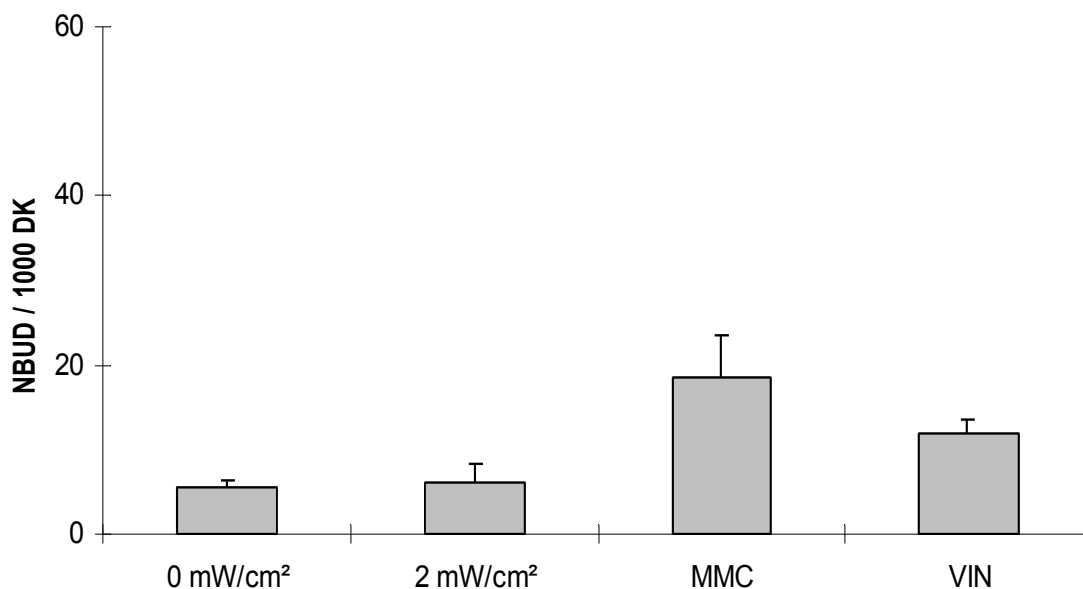


**Abbildung 4.4:** Durchschnittliche Anzahl mikrokernhaltiger Zellen in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung der drei einzelnen Versuchsreihen mit einer Gesamtzahl an ausgewerteten doppelkernigen Zellen von 30.000 für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie 20.000 für die mit MMC, 18.171 für die mit Vinblastin, 18.000 für die mit UV-Licht behandelten Zellen und 18.000 für die unbehandelten Zellen (modifiziert und ergänzt nach Hintzsche et al. 2012).

Als zusammenfassendes Ergebnis der drei Einzelversuche ergab sich aus insgesamt 30.000 ausgewerteten doppelkernigen Zellen für die Sham-Expositionen eine mittlere Anzahl mikrokernhaltiger je 1.000 doppelkerniger Zellen von 52,3 (+/- 19,2) verglichen mit 56,7 (+/- 23,2) für die mit Terahertz bestrahlten Exponate. Der Wert der unbehandelt gebliebenen Zellen lag bei 68,0 (+/- 23,0), begründet sich allerdings nur auf zwei Versuchsreihen. Die Mitomycin C-Inkubationen zeigten durchschnittlich 140,2 (+/- 77,7), die Vinblastin-Inkubationen 76,1 (+/- 58,7) und die mit UV-Licht behandelten Zellen 71,0 (+/- 31,5) mikrokernhaltige Zellen in 1.000 Doppelkernigen.

### 4.1.2. Nukleäre „Buds“

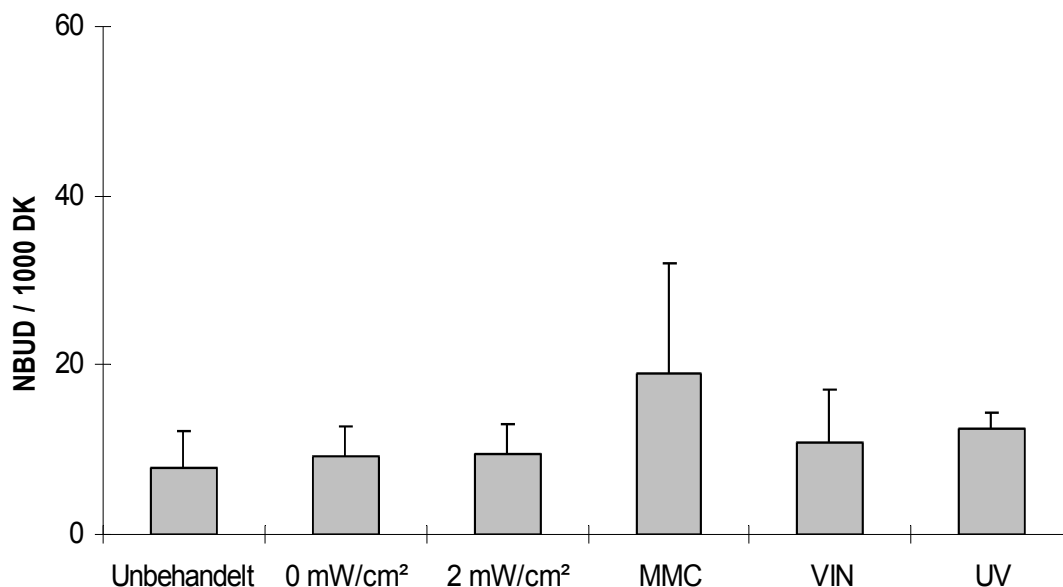
#### 4.1.2.1. Versuchsreihe 1



**Abbildung 4.5: Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleären „Buds“ in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Präparaten (à 2.000 ausgezählte doppelkernige Zellen) für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus zwei Präparaten (à 1.000 ausgezählte doppelkernige Zellen) für die mit MMC und Vinblastin behandelten Zellen.**

Die Auswertung der Sham-Exposition ergab eine durchschnittliche Anzahl an Zellen mit mindestens einem nukleären „Bud“ von 5,5 (+/- 0,9) je Tausend, das Ergebnis der Exposition betrug 6,2 (+/- 2,1). In den mit MMC bzw. Vinblastin behandelten Proben traten in durchschnittlich 18,5 (+/- 4,9) bzw. 12,0 (+/- 1,4) Zellen nukleäre „Buds“ auf.

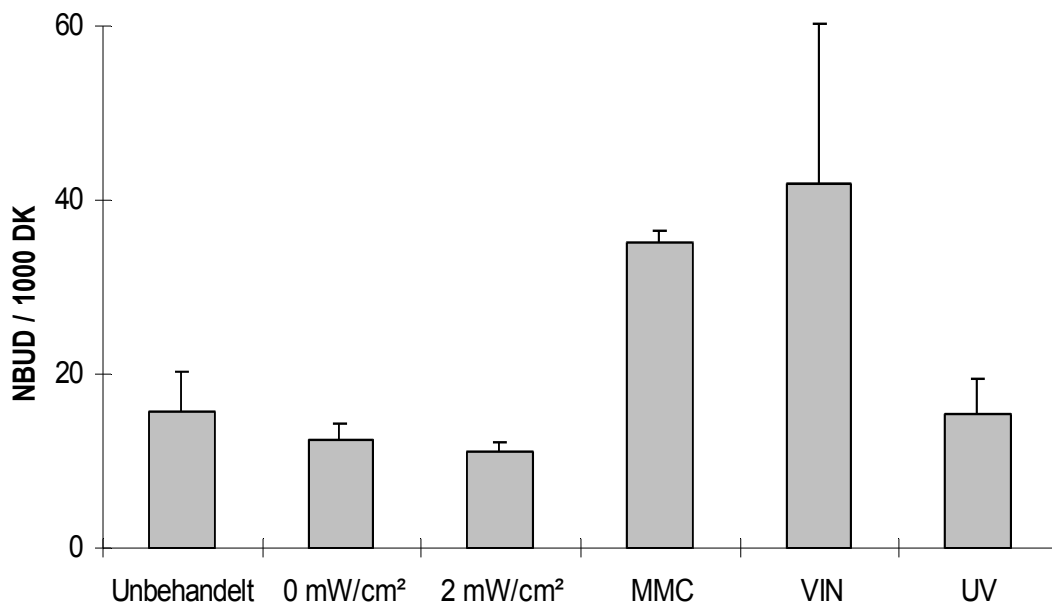
### 4.1.2.2. Versuchsreihe 2



**Abbildung 4.6:** Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleären „Buds“ in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus vier Präparaten für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus drei für die mit MMC, Vinblastin (n=7.171 siehe Text) und UV-Licht behandelten und die unbehandelt gebliebenen Zellen (3.000 ausgezählte doppelkernige Zellen je Präparat).

Bei den Zellen der Exposition enthielten in 1.000 doppelkernigen Zellen durchschnittlich 9,6 (+/- 3,4) Zellen einen oder mehrere nukleäre „Buds“. Die Anzahl in Zellen der Sham-Expositionsreihe lag bei 9,1 (+/- 3,7). Ein ähnlicher Wert ergab sich auch für die unbehandelten Zellen mit 8,0 (+/- 4,3). Bei den mit Mitomycin C behandelten Zellen zeigte sich eine durchschnittliche Erhöhung auf 19,1 (+/- 12,9), bei den mit Vinblastin ein Ergebnis von 10,8 (+/- 6,4) und bei den mit UV-Licht behandelten Zellen von 12,5 (+/- 2,0) Zellen mit mindestens einem nukleären „Bud“.

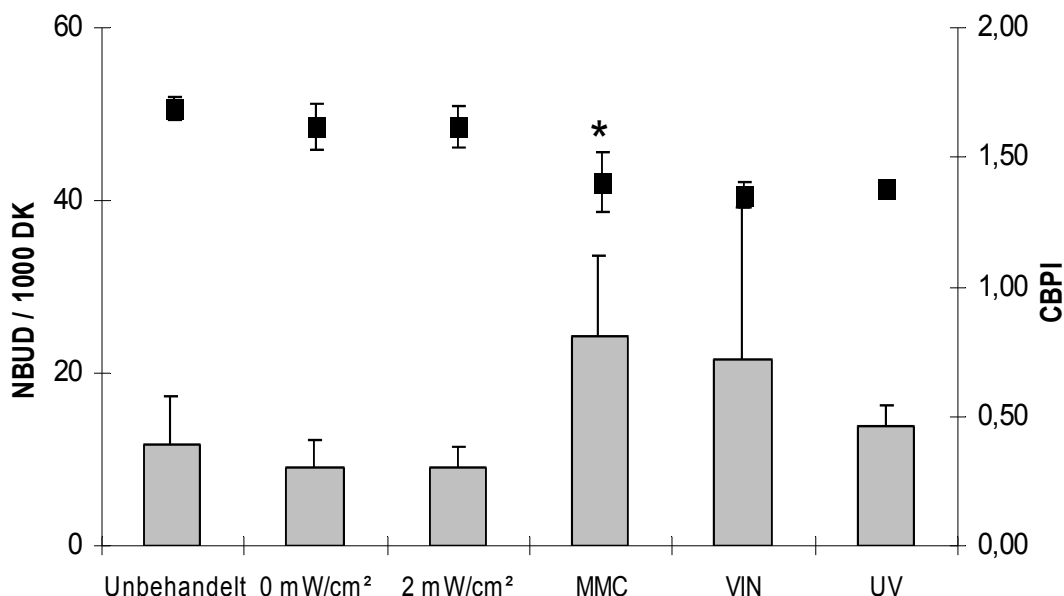
### 4.1.2.3. Versuchsreihe 3



**Abbildung 4.7: Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleären „Buds“ in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus vier Präparaten für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus drei für die mit MMC, Vinblastin und UV-Licht behandelten und die unbehandelt gebliebenen Zellen (3.000 ausgezählte doppelkernige Zellen je Präparat).**

Die durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleären „Buds“ in 1.000 doppelkernigen Zellen betrug 11,1 (+/- 1,0) bei der Exposition, 12,3 (+/- 2,0) bei der Sham-Exposition und 15,7 (+/- 4,7) bei den unbehandelten Zellen. Erhöhte Werte ergaben sich mit 35,1 (+/- 1,3) für die mit MMC und 42,0 (+/- 18,2) für die mit Vinblastin behandelten Zellen. Der Wert der UV-Licht Exponate betrug 15,5 (+/- 4,0).

4.1.2.4. Zusammenfassung Nukleäre „Buds“

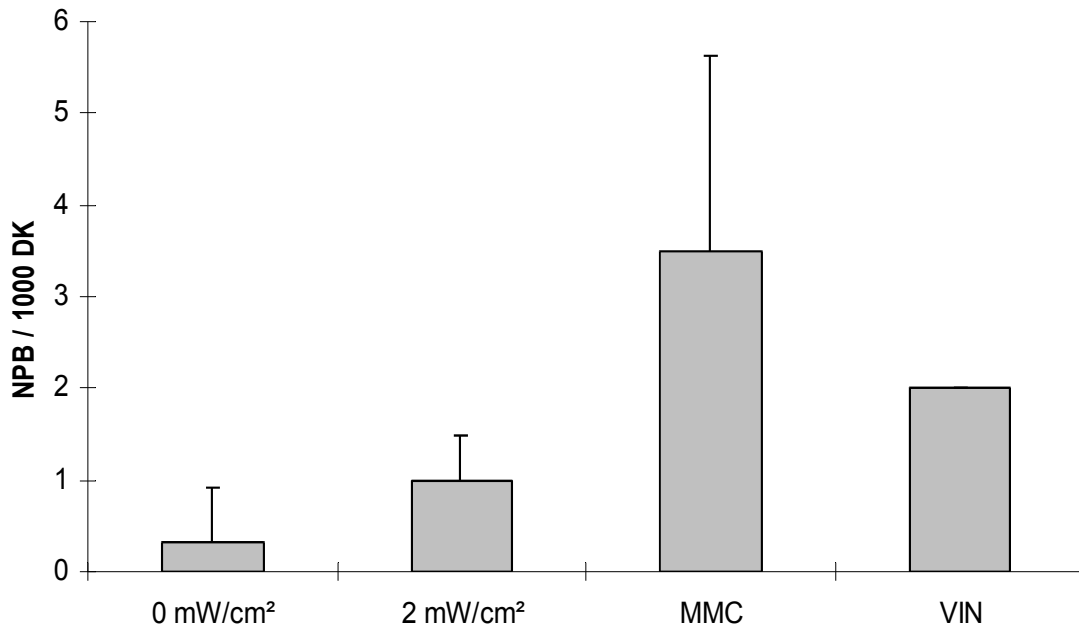


**Abbildung 4.8:** Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleären „Buds“ in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung der drei einzelnen Versuchsreihen mit einer Gesamtzahl an ausgewerteten doppelkernigen Zellen von 30.000 für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie 20.000 für die mit MMC, 18.171 für die mit Vinblastin, 18.000 für die mit UV-Licht behandelten Zellen sowie 18.000 für die unbehandelten Zellen (\*p≤0,05 gegenüber der Sham-Exposition).

Zusammengefasst zeigte sich bei den Sham-Expositionen eine mittlere Anzahl von 9,0 (+/- 3,4) mindestens einen nukleären „Bud“ beinhaltenden Zellen, für die Expositionen ergab sich ein annähernd identischer Wert von 8,9 (+/- 2,5). Bei den mit Mitomycin C inkubierten Proben enthielten durchschnittlich 24,3 (+/- 9,4) von Tausend einen oder mehrere NBUDs, was eine signifikante Erhöhung darstellte. Bei den Vinblastin-Inkubationen lag der Wert bei 21,6 (+/- 17,7). Die mit UV-Licht behandelten und die unbehandelt gebliebenen Zellen, die nur in Versuchsreihe 2 und 3 ausgewertet wurden, zeigten eine durchschnittliche Anzahl von 14,0 (+/- 2,2) Zellen mit nukleären „Buds“ bei den UV-Expositionen und von 11,8 (+/- 5,4) bei den unbehandelten Zellen.

### 4.1.3. Nukleoplasmatische Brücken

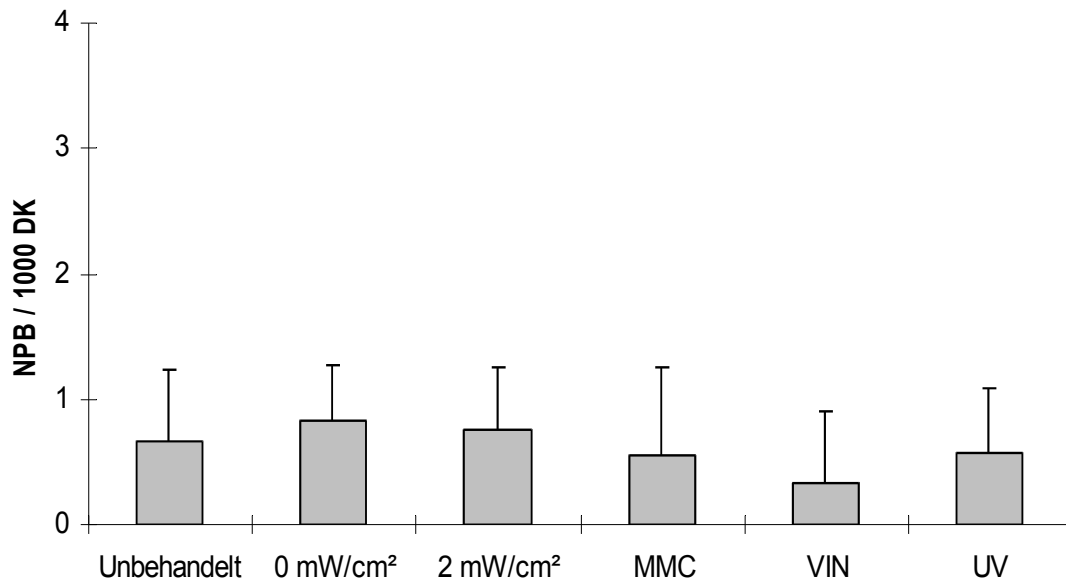
#### 4.1.3.1. Versuchsreihe 1



**Abbildung 4.9:** Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleoplasmatischen Brücken in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Präparaten (à 2.000 ausgezählte doppelkernige Zellen) für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus zwei Präparaten (à 1.000 ausgezählte doppelkernige Zellen) für die mit MMC und Vinblastin behandelten Zellen.

Die Ergebnisse zeigten eine durchschnittliche Anzahl doppelkerniger Zellen mit Vorhandensein von mindestens einer Kernbrücke von 0,3 (+/- 0,6) bei den Sham-Expositionen und 1,0 (+/- 0,5) bei den Expositionen. Die mit MMC behandelten Zellen enthielten Brückenstrukturen in durchschnittlich 3,5 (+/- 2,1) und die Vinblastinpräparate in 2,0 (+/- 0,0) von 1.000 Zellen.

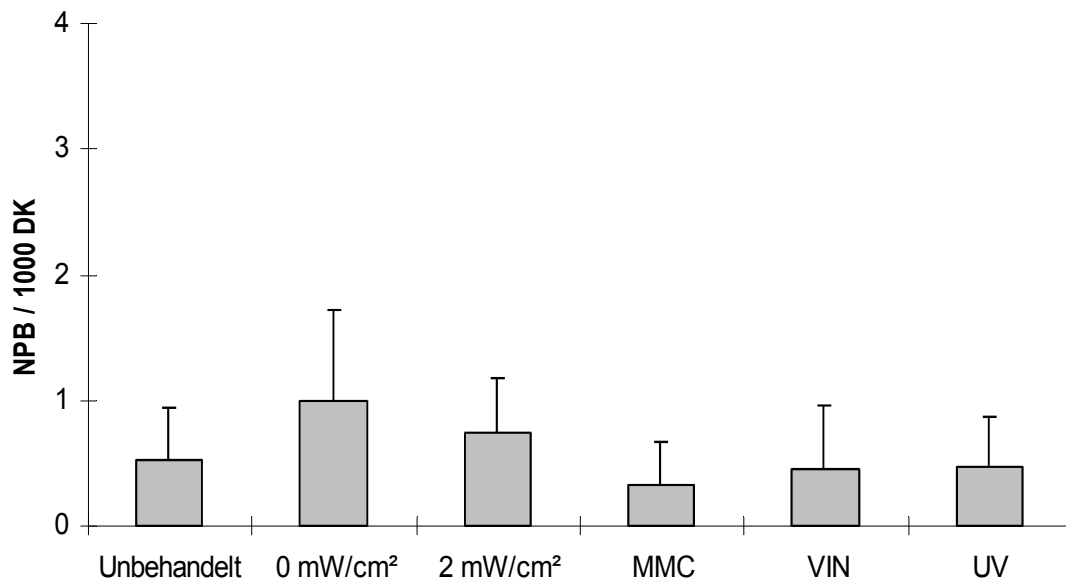
### 4.1.3.2. Versuchsreihe 2



**Abbildung 4.10: Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleoplasmatischen Brücken in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus vier Präparaten für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus drei für die mit MMC, Vinblastin (n=7.171 siehe Text) und UV-Licht behandelten und die unbehandelt gebliebenen Zellen (3.000 ausgezählte doppelkernige Zellen je Präparat).**

Bei der Sham-Exposition ergab sich eine durchschnittliche Anzahl an Zellen, die nukleoplasmatische Brücken enthielten, von 0,8 (+/- 0,4) und bei der Expositionsreihe von 0,7 (+/- 0,5) je 1.000 Doppelkernige. Die mit Substanzen behandelten Zellen zeigten in dieser Versuchsreihe keine erhöhten Werte bezüglich des Auftretens von Kernbrücken. Diese kamen im Einzelnen in 0,6 (+/- 0,7) der mit Mitomycin C, 0,3 (+/- 0,6) der mit Vinblastin und 0,6 (+/- 0,5) der mit UV-Licht behandelten Zellen vor. Bei den unbehandelten Zellen befanden sich in durchschnittlich 0,7 (+/- 0,6) von 1.000 doppelkernigen Zellen Brückenstrukturen.

### 4.1.3.3. Versuchsreihe 3

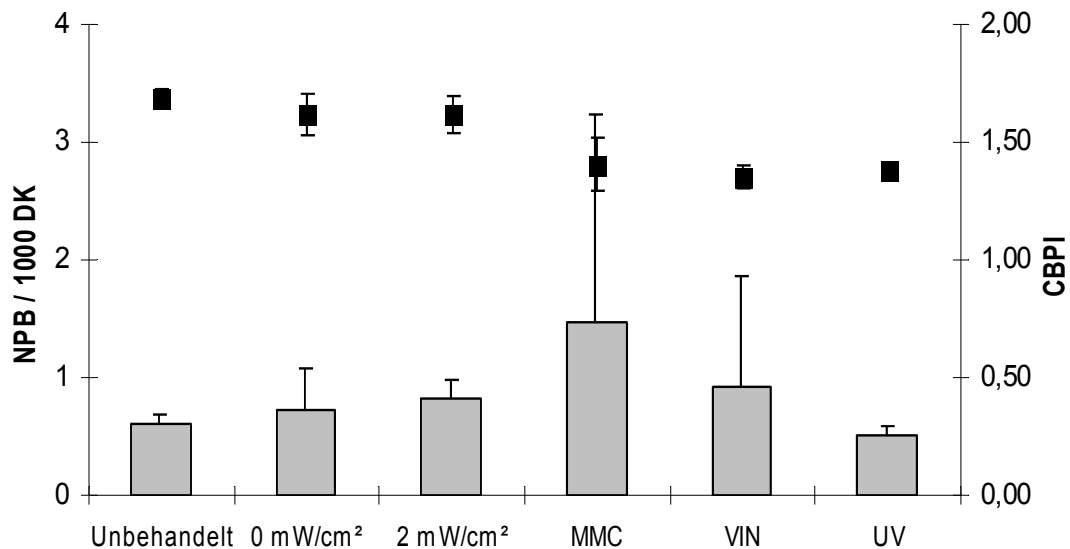


**Abbildung 4.11: Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleoplasmatischen Brücken in 1.000 doppelkernigen Zellen der HaCaT-Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung aus vier Präparaten für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie aus drei für die mit MMC, Vinblastin und UV-Licht behandelten und die unbehandelt gebliebenen Zellen (3.000 ausgezählte doppelkernige Zellen je Präparat).**

In der dritten Versuchsreihe ergab sich eine durchschnittliche Anzahl an kernbrückenhaltigen Zellen in 1.000 doppelkernigen Zellen von 1,0 (+/- 0,7) bei den Sham-Expositionen und 0,7 (+/- 0,4) bei den mit Terahertzstrahlung relevanter Leistungsflussdichte bestrahlten Zellen. Die mit Substanzen behandelten Zellen lagen bei Werten von 0,3 (+/- 0,3) für MMC, von 0,4 (+/- 0,5) für Vinblastin und von 0,5 (+/- 0,4) sowohl für die mit UV-Licht behandelten als auch für die unbehandelten Zellen.



4.1.3.4. Zusammenfassung Nukleoplasmatische Brücken

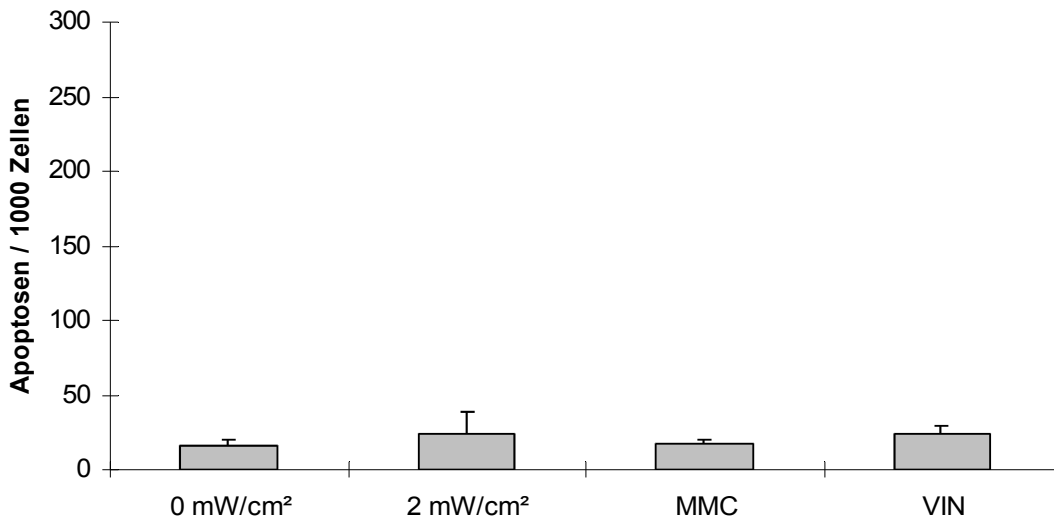


**Abbildung 4.12: Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleoplasmatischen Brücken in 1.000 doppelkernigen Zellen. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung der drei einzelnen Versuchsreihen mit einer Gesamtzahl an ausgewerteten doppelkernigen Zellen von 30.000 für Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie 20.000 für die mit MMC, 18.171 für die mit Vinblastin, 18.000 für die mit UV-Licht behandelten Zellen und 18.000 für die unbehandelten Zellen.**

Die recht stark schwankenden Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen ergaben zusammengefasst ein relativ homogenes Bild. Die Anzahl kernbrückenhaltiger Zellen in 1.000 Doppelkernigen lag im Mittel bei 0,7 (+/- 0,3) bei Zellen der Sham-Expositionsreihe und bei 0,8 (+/- 0,1) bei den mit 0,106 THz exponierten Proben. Die Werte der Vinblastingruppe (0,9 (+/- 0,9)), der UV-Licht Gruppe (0,5 (+/- 0,1)) und der unbehandelt gebliebenen Zellen (0,6 (+/- 0,1)) lagen ebenfalls in diesem Bereich. Lediglich in den mit Mitomycin C behandelten Zellen war mit 1,5 (+/- 1,8) von Tausend eine höhere, aber nicht signifikant erhöhte Rate kernbrückenhaltiger Zellen festzustellen.

### 4.1.4. Apoptosen

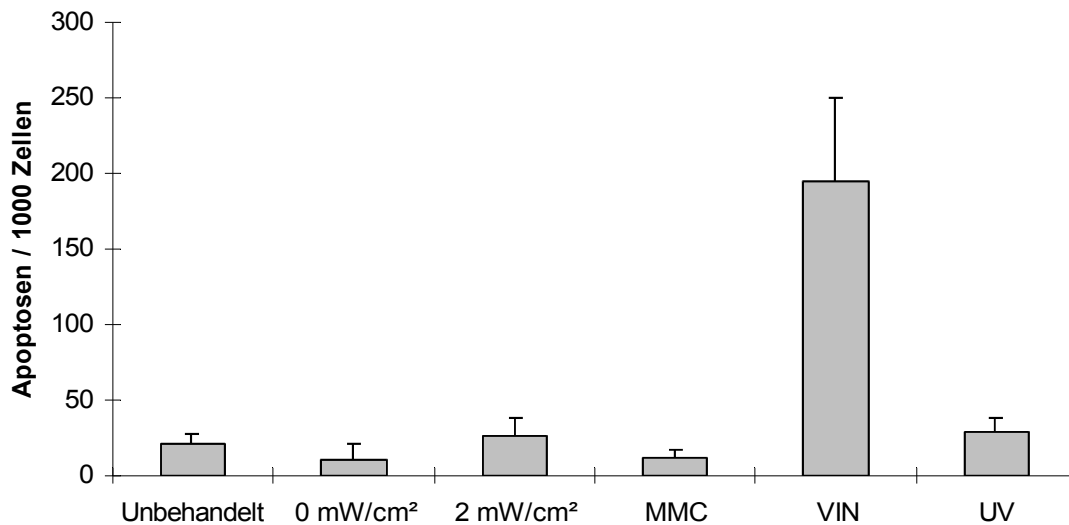
#### 4.1.4.1. Versuchsreihe 1



**Abbildung 4.13:** Durchschnittliche Anzahl apoptotischer Zellen in 1.000 ausgezählten HaCaT-Zellen mit Angabe der Standardabweichung gewonnen aus drei Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und der Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie zwei Präparaten der MMC- und Vinblastin-Substanzinkubation.

Zur Wiedergabe der Zellmorphologie wurden je Präparat 1.000 Zellen hinsichtlich ihrer Struktur ausgewertet und unterteilt in ein-, zwei- und mehrkernige Zellen sowie apoptotische, mitotische (alle Phasen) und sonstige Zellen. In Versuchsreihe 1 ergab sich eine Verteilung mit Angabe der Standardabweichung von durchschnittlich 24 (+/- 14) Apoptosen für Zellen der Terahertzexposition gegenüber 16 (+/- 4) für Zellen der Sham-Exposition. Bei den Substanzinkubationen befanden sich in den mit Mitomycin C behandelten Proben durchschnittlich 17 (+/- 3) und in den mit Vinblastin behandelten Präparaten 24 (+/- 6) von 1.000 Zellen in Apoptose.

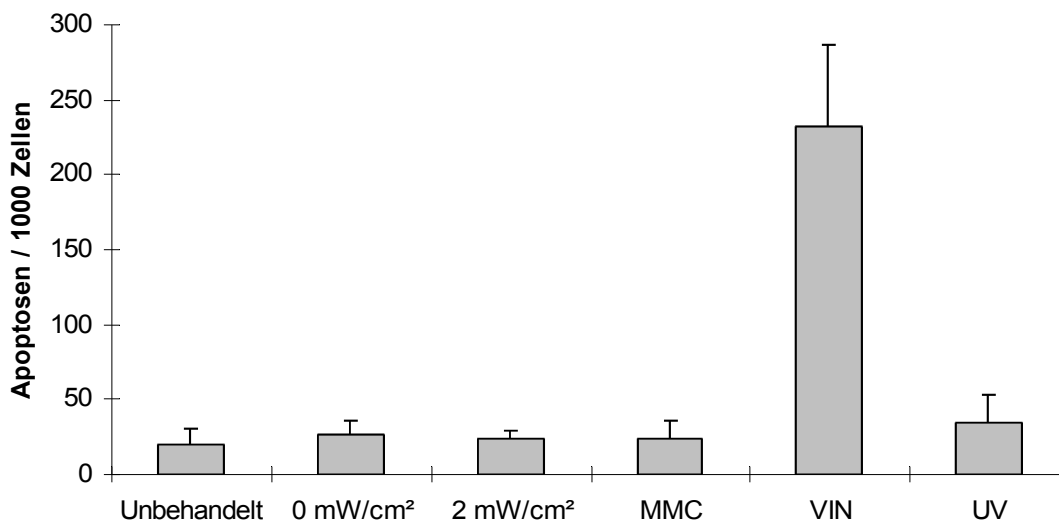
### 4.1.4.2. Versuchsreihe 2



**Abbildung 4.14:** Durchschnittliche Anzahl apoptotischer Zellen in 1.000 ausgezählten HaCaT-Zellen mit Angabe der Standardabweichung gewonnen aus vier Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und der Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie drei Präparaten der MMC- und Vinblastin-Substanzinkubation sowie der mit UV-Licht behandelten und der unbehandelten Zellen.

Das Ergebnis von Versuchsreihe 2 belief sich bei den mit 0,106 THz behandelten Zellen im Mittel auf 26 (+/- 12) und bei den Sham-Exponaten auf 10 (+/- 11) Apoptosen je 1.000 Zellen. Die mit MMC behandelten Zellen zeigten mit 11 (+/- 6) ebenso wie die mit UV-Licht bestrahlten Zellen mit 29 (+/- 10) und die unbehandelten Zellen mit 21 (+/- 6) ähnlich hohe Werte, wohingegen die mit Vinblastin behandelten Zellen mit 195 (+/- 55) erwartungsgemäß deutlich mehr Apoptosen enthielten.

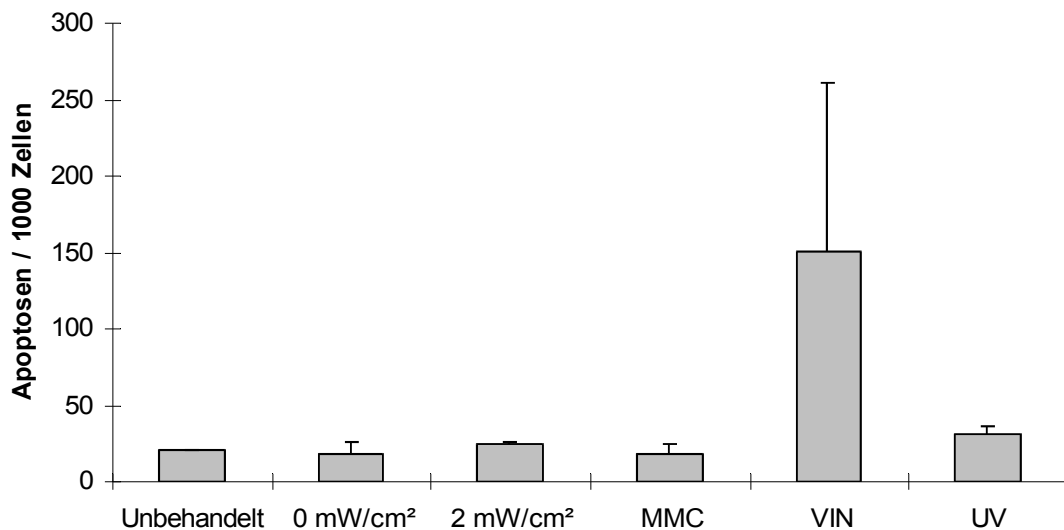
### 4.1.4.3. Versuchsreihe 3



**Abbildung 4.15:** Durchschnittliche Anzahl apoptotischer Zellen in 1.000 ausgezählten HaCaT-Zellen mit Angabe der Standardabweichung gewonnen aus vier Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und der Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie drei Präparaten der MMC- und Vinblastin-Substanzinkubation sowie der mit UV-Licht behandelten und der unbehandelten Zellen.

In der dritten Versuchsreihe ergaben sich aus den je Präparat ausgewerteten 1.000 Zellen folgende durchschnittliche Häufigkeiten an Apoptosen: 24 (+/- 4) für Zellen, die mit Terahertzstrahlung exponiert wurden, 27 (+/- 9) für Zellen der Sham-Exposition, 24 (+/- 11) für die Mitomycin C-Reihe, 232 (+/- 54) für die Substanzinkubationen mit Vinblastin, 35 (+/- 18) für die mit UV-Licht bestrahlten und 20 (+/- 10) für die unbehandelt gebliebenen Zellen. Somit zeigte sich auch hier, wie bereits in Versuchsreihe 2, eine Zunahme an Apoptosen beim Vinca-Alkaloid.

### 4.1.4.4. Zusammenfassung Apoptosen

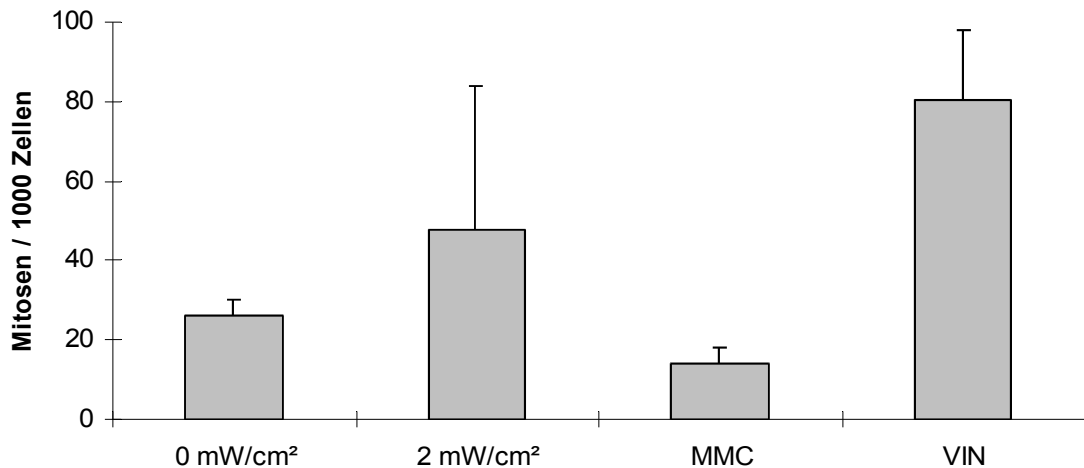


**Abbildung 4.16:** Durchschnittliche Anzahl apoptotischer Zellen in 1.000 ausgezählten HaCaT-Zellen mit Angabe der Standardabweichung gewonnen aus drei Versuchsreihen für Zellen, die mit Terahertzstrahlung (2 mW/cm<sup>2</sup>) behandelt wurden, der zugehörigen Sham-Exposition (0 mW/cm<sup>2</sup>), einer MMC- und Vinblastin-Substanzinkubation sowie, nur in Versuchsreihe 2 und 3 durchgeführt, mit UV-Licht behandelte und unbehandelte Zellen.

Die drei einzeln ausgewerteten Versuchsreihen ergaben bezüglich des Auftretens von Apoptosen folgendes Ergebnis: Die strahlenexponierten Zellen enthielten durchschnittlich 25 (+/- 1) Apoptosen in 1.000 Zellen. Das Ergebnis der Sham-Exposition war mit 18 (+/- 8) apoptotischen Zellen zwar niedriger, zeigte jedoch auch eine größere Varianz. Die Substanzinkubationen enthielten bei MMC 18 (+/- 7) und bei Vinblastin durchschnittlich 150 (+/- 111) Apoptosen in der Auswertung. In Versuchsreihe 2 und 3 zeigten die Zellen nach UV-Licht-Behandlung durchschnittlich 32 (+/- 4) und die unbehandelten Zellen durchschnittlich 21 (+/- 0) Apoptosen in 1.000 Zellen.

### 4.1.5. Mitosen

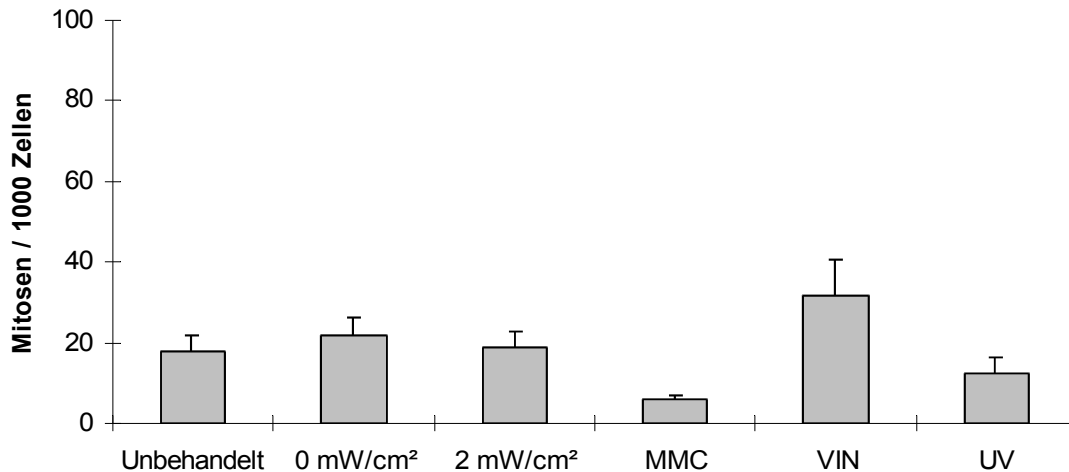
#### 4.1.5.1. Versuchsreihe 1



**Abbildung 4.17:** Durchschnittliche Anzahl mitotischer Zellen in 1.000 ausgezählten HaCaT-Zellen mit Angabe der Standardabweichung gewonnen aus drei Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und der Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie zwei Präparaten der MMC- und Vinblastin-Substanzinkubation.

Unter Berücksichtigung sämtlicher Mitosestadien fanden sich als Ergebnis der Versuchsreihe 1 in den drei unabhängigen Sham-Exponaten durchschnittlich 26 (+/- 4) und in den drei mit Terahertzstrahlung exponierten Präparaten durchschnittlich 48 (+/- 36) Mitosen je 1.000 Zellen, wobei hier ein Präparat mit 89 gezählten Mitosen (im Vergleich zu 22 und 32 Mitosen in den beiden anderen Präparaten dieser Versuchsreihe) für den erhöhten Mittelwert und die hohe Standardabweichung verantwortlich und wohl im Sinne eines „Ausreißers“ zu werten ist. Die Zellen, die mit Mitomycin C behandelt wurden, enthielten in den zwei Präparaten durchschnittlich 14 (+/- 4) und die mit Vinblastin behandelten Zellen im Mittel 81 (+/- 18) Mitosen.

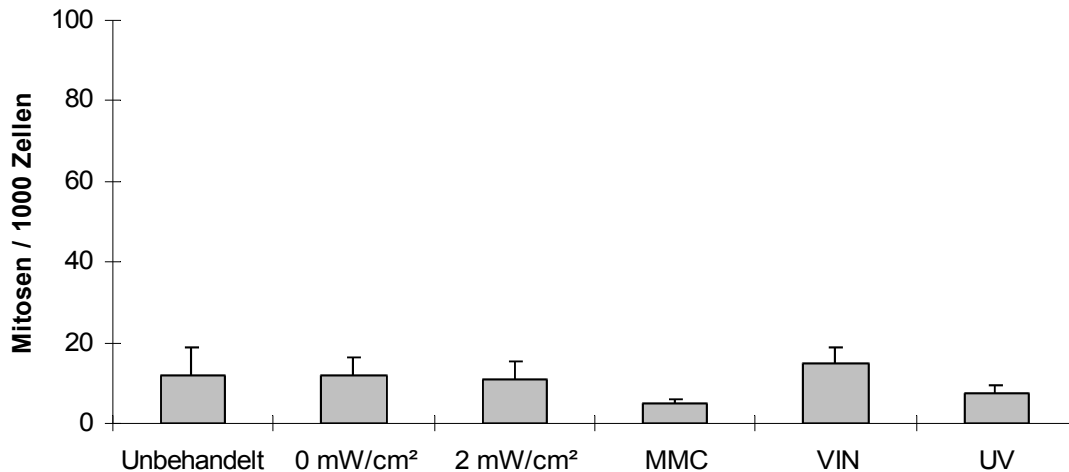
### 4.1.5.2. Versuchsreihe 2



**Abbildung 4.18:** Durchschnittliche Anzahl mitotischer Zellen in 1.000 ausgezählten HaCaT-Zellen mit Angabe der Standardabweichung gewonnen aus vier Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und der Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie drei Präparaten der MMC- und Vinblastin-Substanzinkubation sowie der mit UV-Licht behandelten und der unbehandelten Zellen.

In Versuchsreihe 2 ergab sich für die durchschnittliche Anzahl mitotischer in 1.000 ausgewerteten Zellen eines Präparates für die Sham-Exposition aus vier unabhängigen Proben ein Wert von 22 (+/- 5). Das Ergebnis der Expositionen betrug 19 (+/- 4). Die mittlere Anzahl an Mitosen in mit Mitomycin C behandelten Präparaten betrug 6 (+/- 1) und die Anzahl in mit Vinblastin behandelten Proben 32 (+/- 9). Zusätzlich zur ersten Versuchsreihe wurden auch hier mit UV-Licht bestrahlte und unbehandelte Zellen untersucht, wobei sich eine Mitoserate von 12 (+/- 4) für UV-Licht und 18 (+/- 4) für die unbehandelt gebliebenen Zellen ergab.

### 4.1.5.3. Versuchsreihe 3

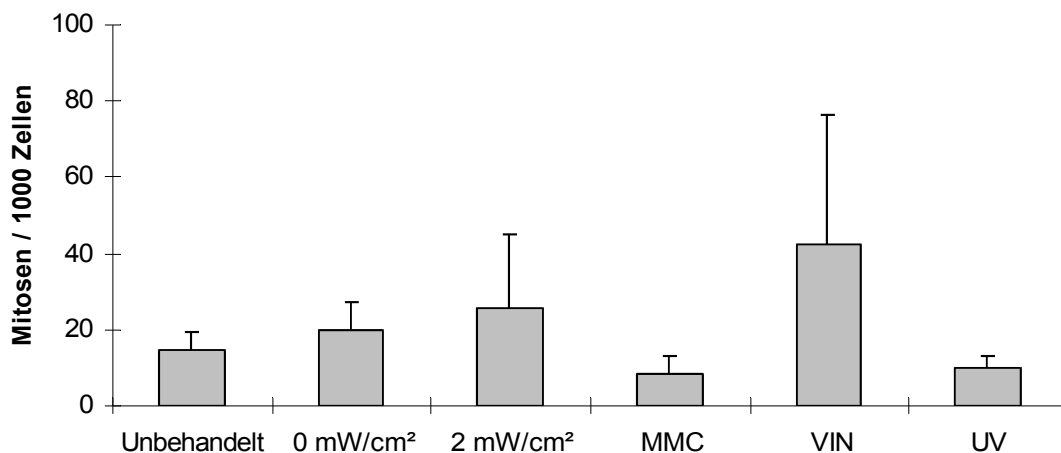


**Abbildung 4.19:** Durchschnittliche Anzahl mitotischer Zellen in 1.000 ausgezählten HaCaT-Zellen mit Angabe der Standardabweichung gewonnen aus vier Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und der Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>) sowie drei Präparaten der MMC- und Vinblastin-Substanzinkubation sowie der mit UV-Licht behandelten und der unbehandelten Zellen.

Versuchsreihe 3 zeigte, bezogen auf sich zum Zeitpunkt der Fixation in Mitose befindliche Zellen, folgende Verteilung: Die Präparate der Terahertzexposition enthielten durchschnittlich 11 (+/- 4), die der Sham-Exposition 12 (+/- 5) und die der unbehandelten Zellen 12 (+/- 7) mitotische Zellen. Die drei unabhängigen mit MMC inkubierten Präparate enthielten 5 (+/- 1) Mitosen in 1.000 ausgezählten Zellen und die mit Vinblastin inkubierten 15 (+/- 4). Die mit UV-Licht bestrahlten Zellen zeigten eine mittlere Anzahl an Mitosen von 8 (+/- 2).



### 4.1.5.4. Zusammenfassung Mitosen

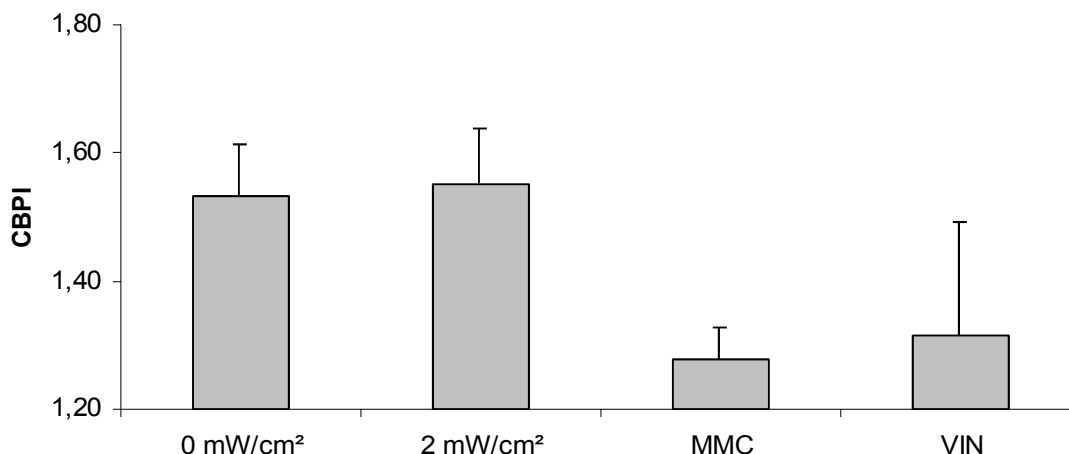


**Abbildung 4.20:** Durchschnittliche Anzahl mitotischer Zellen in 1.000 ausgezählten HaCaT-Zellen mit Angabe der Standardabweichung gewonnen aus drei Versuchsreihen für Zellen, die mit Terahertzstrahlung (2 mW/cm<sup>2</sup>) behandelt wurden, die zugehörigen Sham-Expositionen (0 mW/cm<sup>2</sup>), die MMC- und Vinblastin-Substanzinkubationen sowie, nur in Versuchsreihe 2 und 3 durchgeführt, mit UV-Licht behandelte und unbehandelte Zellen.

Zusammengefasst befanden sich in der THz-Expositionsreihe durchschnittlich 26 (+/- 19) von 1.000 Zellen in Mitose. In den Sham-Expositionen waren 20 (+/- 7) von 1.000 Zellen mitotisch. Die mit Mitomycin C inkubierten Zellen enthielten im Vergleich mit 8 (+/- 5) weniger, die mit Vinblastin behandelten Zellen mit 42 (+/- 34) mehr Mitosen. Die mit UV-Licht bestrahlten Zellen enthielten durchschnittlich 10 (+/- 3) und die unbehandelten Proben 15 (+/- 4) Mitosen in 1.000 Zellen.

### 4.1.6. Cytochalasin-B-Proliferationsindex

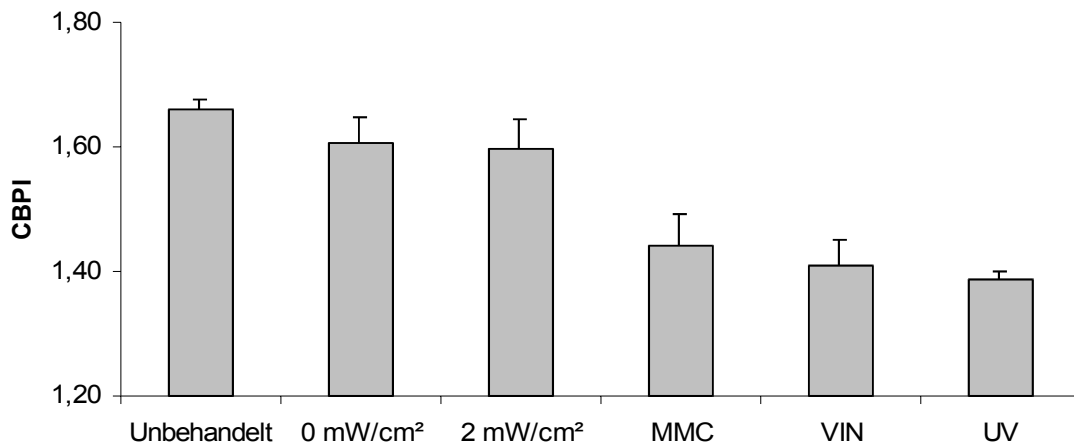
#### 4.1.6.1. Versuchsreihe 1



**Abbildung 4.21:** Dargestellt ist der durchschnittliche Cytochalasin-B-Proliferationsindex, der sich aus dem Verhältnis von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ergibt. Die Grundlage bilden jeweils 1.000 ausgezählte HaCaT-Zellen in drei bzw. zwei Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertzexpositionen (2 mW/cm<sup>2</sup>) bzw. der Substanzinkubationen (MMC, Vinblastin).

Ausgezählt wurden hierfür je 1.000 Zellen in drei unabhängigen Präparaten für Exposition und Sham-Exposition und zwei Präparaten für die Substanzinkubationen mit Mitomycin C und Vinblastin. Hierbei ergab sich für die Terahertzexpositionen ein durchschnittlicher CBPI von 1,53 (+/- 0,08), für die Sham-Expositionen von 1,55 (+/- 0,09) und von 1,28 (+/- 0,05) für die MMC- bzw. 1,31 (+/- 0,18) für die Vinblastin-Substanzinkubationen.

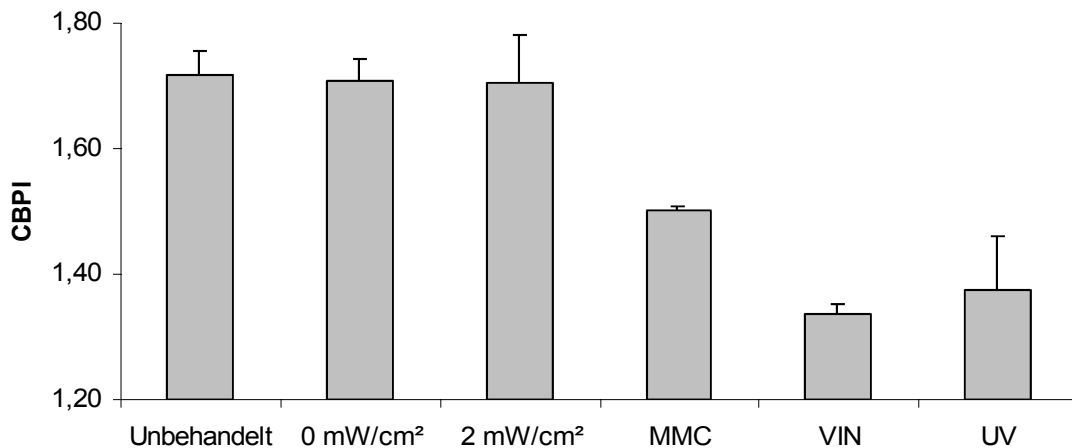
### 4.1.6.2. Versuchsreihe 2



**Abbildung 4.22:** Dargestellt ist der durchschnittliche Cytochalasin-B-Proliferationsindex, der sich aus dem Verhältnis von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ergibt. Die Grundlage bilden jeweils 1.000 ausgezählte HaCaT-Zellen in vier bzw. drei Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertz-Expositionen (2 mW/cm<sup>2</sup>) bzw. der Substanzinkubationen (MMC, Vinblastin, UV-Licht) und der unbehandelten Präparate.

In der zweiten Versuchsreihe betrug der Cytochalasin-B-Proliferationsindex bei den vier Präparaten, die mit 0,106 THz behandelt wurden, durchschnittlich 1,60 (+/- 0,05) und war damit nahezu identisch mit dem in den Präparaten der Sham-Exposition (1,61 (+/- 0,04)). Zum Vergleich lag der Proliferationsindex der unbehandelten Präparate bei 1,66 (+/- 0,02). Für die Substanzinkubationen und die UV-Licht Exposition, bei denen je drei Präparate à 1.000 Zellen ausgewertet wurden, ergab sich folgende Situation: Die mit MMC behandelten Präparate zeigten einen CBPI von durchschnittlich 1,44 (+/- 0,05), die mit Vinblastin behandelten von 1,41 (+/- 0,04) und die mit UV-Licht bestrahlten Zellen von 1,39 (+/- 0,01).

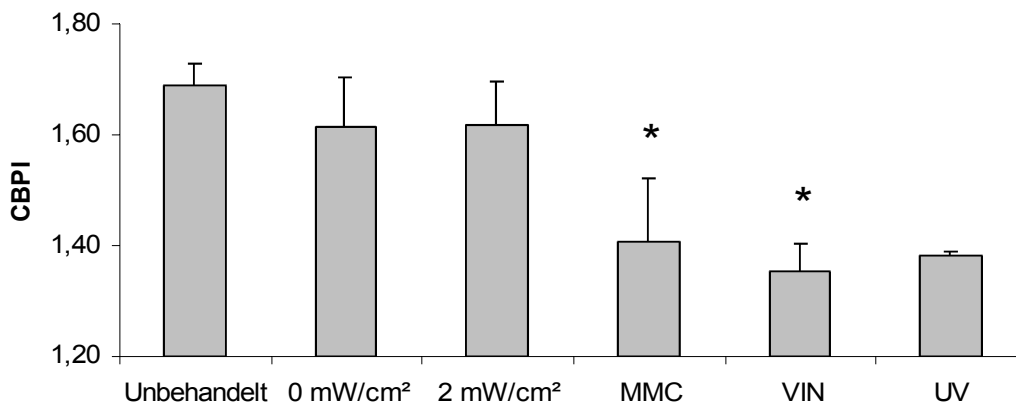
### 4.1.6.3. Versuchsreihe 3



**Abbildung 4.23:** Dargestellt ist der durchschnittliche Cytochalasin-B-Proliferationsindex, der sich aus dem Verhältnis von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ergibt. Die Grundlage bilden jeweils 1.000 ausgezählte HaCaT-Zellen in vier bzw. drei Präparaten der Sham- (0 mW/cm<sup>2</sup>) und Terahertz-Expositionen (2 mW/cm<sup>2</sup>) bzw. der Substanzinkubationen (MMC, Vinblastin, UV-Licht) und der unbehandelten Präparate.

Die Auswertung der Expositionspräparate ergab einen durchschnittlichen CBPI von 1,70 (+/- 0,08), die der Sham-Expositionen von 1,71 (+/- 0,04). Zellen ohne weitere Behandlung erreichten einen Wert von 1,72 (+/- 0,04). Bei den ausgewerteten Präparaten der übrigen Proben ergaben die Substanzinkubationen mit MMC einen durchschnittlichen Proliferationsindex von 1,50 (+/- 0,01) und die mit Vinblastin von 1,34 (+/- 0,02). Die mit UV-Licht bestrahlten Zellen erreichten einen CBPI von 1,38 (+/- 0,09).

### 4.1.6.4. Zusammenfassung Cytochalasin-B-Proliferationsindex



**Abbildung 4.24:** Durchschnittlicher Wert des Cytochalasin-B-Proliferationsindex, der sich aus dem Verhältnis der ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ergibt. Die Grafik zeigt die Durchschnittswerte ermittelt aus den drei einzelnen Versuchsreihen unter Angabe der Standardabweichung für HaCaT-Zellen der Terahertzexposition (2 mW/cm<sup>2</sup>), der Sham-Exposition (0 mW/cm<sup>2</sup>) und der zwei Substanzinkubationen (MMC, Vinblastin). Die Datengrundlage für die mit UV-Licht behandelten und die unbehandelten Zellen sind nur Versuchsreihe 2 und 3 (\*p≤0,05 gegenüber der Sham-Exposition, modifiziert und ergänzt nach Hintzsche et al. 2012).

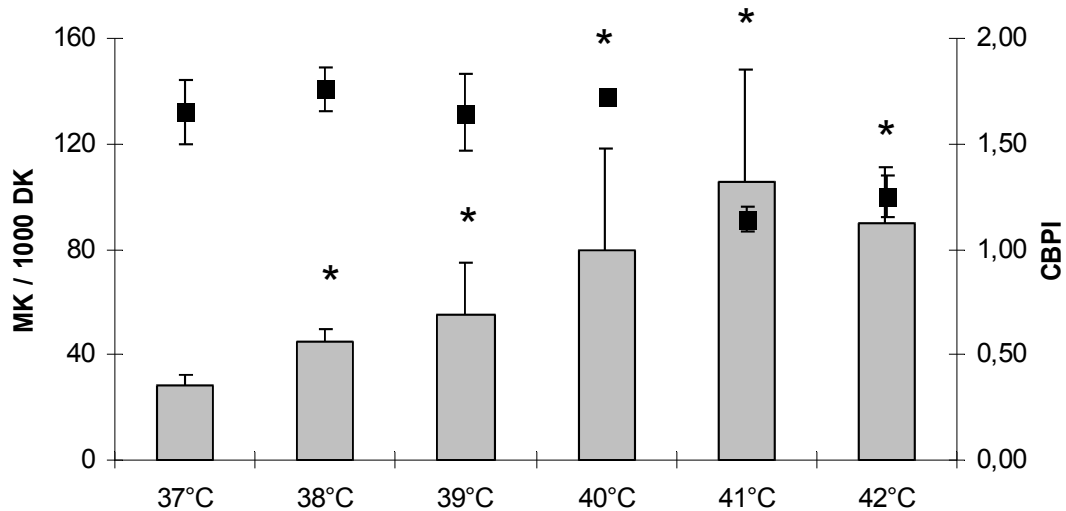
Zusammenfassend ergab sich bezogen auf den Proliferationsindex folgendes Bild: Der durchschnittliche Wert für die Zellen der Terahertzexposition betrug 1,62 (+/- 0,08) und entsprach damit dem der Sham-Exposition (1,62 (+/- 0,09)). Die Substanzinkubationen erreichten niedrigere mittlere Proliferationsindizes von 1,41 (+/- 0,12) für MMC und 1,35 (+/- 0,05) für Vinblastin, ein Wert von 1,38 (+/- 0,01) ergab sich für die mit UV-Licht behandelten Zellen. Der Proliferationsindex der unbehandelten Zellen lag leicht über dem der Expositionen und betrug 1,69 (+/- 0,04).

### **4.2. Temperaturexpositionen**

Die unabhängig von den Terahertzexpositionen durchgeführten Experimente zum Einfluss von Temperatur auf die Zellteilung wurden in einem Temperaturbereich von 37 °C bis 42 °C, mit Intervallen von je einem Grad Celsius, durchgeführt und anschließend analog zu den Terahertzexpositionen mittels Mikroerntest ausgewertet. Der Versuch zu jeder Temperaturstufe wurde dreimal wiederholt. Die Ergebnisse dieser drei getrennten Auswertungen sind im Folgenden dargestellt. Die Auswertung von Mikrokernen, nukleären „Buds“ und nukleoplasmatischen Brücken beruht je Probe auf 2.000 ausgewerteten doppelkernigen Zellen, die Angaben zur Apoptose- und Mitosehäufigkeit und der Verteilung von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen im Sinne des CBPI auf jeweils 1.000 Zellen.

Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht und ist entsprechend gekennzeichnet.

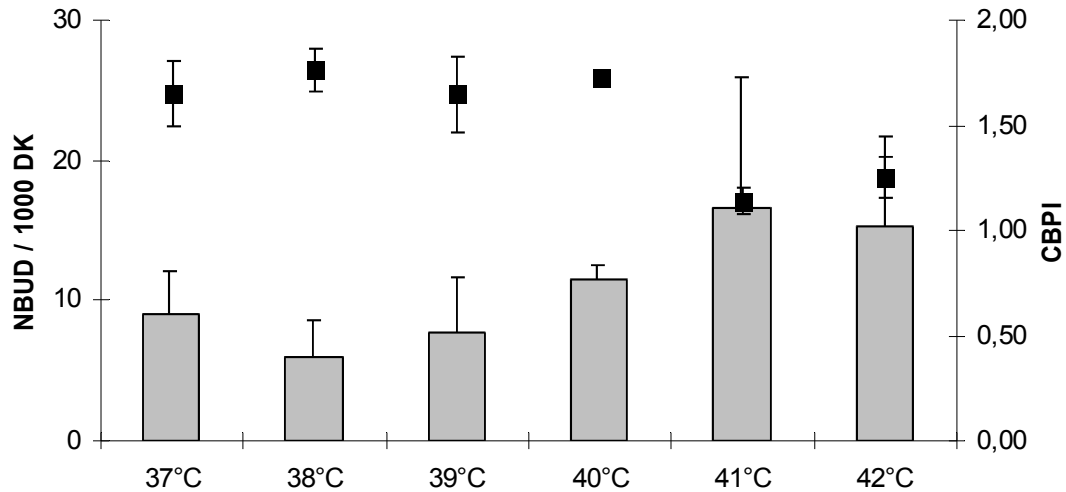
### 4.2.1. Mikrokerne



**Abbildung 4.25:** Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit Mikrokerneln mit Angabe der Standardabweichung in 1.000 doppelkernigen Zellen gewonnen aus je drei Präparaten nach 24-stündiger Exposition bei angegebener Temperaturstufe durch Auswertung von 2.000 doppelkernigen Zellen je Präparat. Zusätzlich angegeben ist der Proliferationsindex zur Beschreibung des Verhältnisses von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ermittelt aus drei Präparaten je Temperaturstufe mit je 1.000 Zellen pro Präparat (\* $p \leq 0,05$  gegenüber 37 °C, modifiziert nach Hintzsche / Riese / Stopper 2012).

Die durchschnittliche Häufigkeit mikrokernhaltiger Zellen zeigte im Verlauf betrachtet einen kontinuierlichen Anstieg des Auftretens. Ausgehend von einem Basalwert bei 37 °C von durchschnittlich 28,3 (+/- 3,7) mikrokernhaltigen Zellen je Tausend stieg die Häufigkeit über Werte von 44,7 (+/- 5,0) bei 38 °C, 55,0 (+/- 19,6) bei 39 °C und 79,7 (+/- 38,6) bei 40 °C an und erreichte ein Maximum bei 41 °C mit 106,0 (+/- 41,8) Mikrokernzellen je 1.000 DK-Zellen. Bei 42 °C fiel die Anzahl an Mikrokernzellen wieder ab und lag bei durchschnittlich 90,0 (+/- 20,8). Damit zeigte sich über sämtliche Temperaturstufen eine signifikante Erhöhung der Mikrokernraten gegenüber dem Basalwert bei 37 °C.

#### 4.2.2. Nukleäre „Buds“

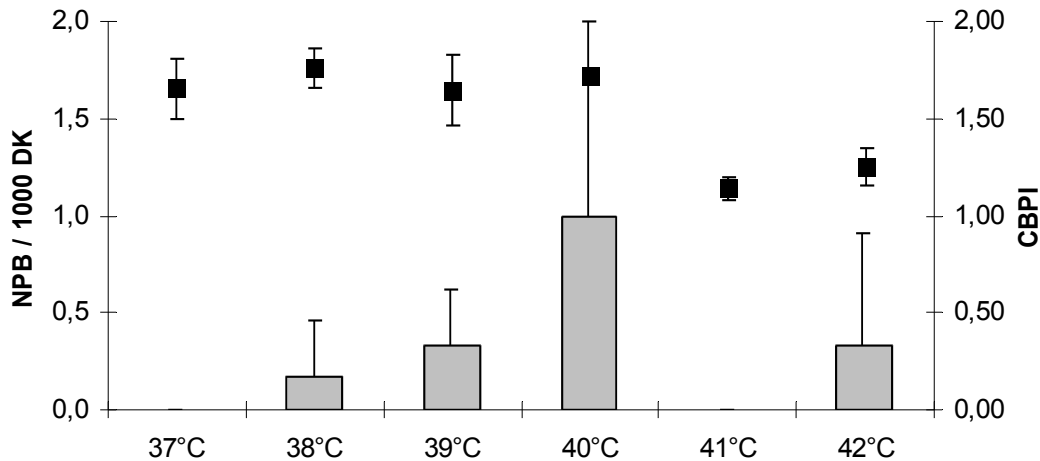


**Abbildung 4.26: Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleären „Buds“ mit Angabe der Standardabweichung in 1.000 doppelkernigen Zellen gewonnen aus je drei Präparaten nach 24-stündiger Exposition bei angegebener Temperaturstufe durch Auswertung von 2.000 doppelkernigen Zellen je Präparat. Zusätzlich angegeben ist der Proliferationsindex zur Beschreibung des Verhältnisses von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ermittelt aus drei Präparaten je Temperaturstufe mit je 1.000 Zellen pro Präparat.**

Die Darstellung der durchschnittlichen Anzahl von Zellen mit nukleären „Buds“ zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Häufigkeit mikrokernhaltiger Zellen. Ausgehend von einem Basalwert bei 37 °C mit einem Mittelwert von 9,0 (+/- 3,0) Zellen mit mindestens einem „Bud“ in 1.000 doppelkernigen Zellen sank die Anzahl zunächst auf 6,0 (+/- 2,6) bei 38 °C und stieg anschließend kontinuierlich über 7,7 (+/- 4,0) bei 39 °C und 11,5 (+/- 1,0) bei 40 °C bis zu einem Maximum von 16,7 (+/- 9,3) Zellen mit NBUDs bei 41 °C. Wie auch bei den Mikrokernen fiel bei 42 °C die Rate wieder ab und erreichte einen durchschnittlichen Wert von 15,3 (+/- 6,3) Zellen mit einem oder mehreren nukleären „Buds“ in 1.000 ausgezählten doppelkernigen Zellen.



### 4.2.3. Nukleoplasmatische Brücken



**Abbildung 4.27:** Durchschnittliche Anzahl an Zellen mit nukleoplasmatischen Brücken mit Angabe der Standardabweichung in 1.000 doppelkernigen Zellen gewonnen aus je drei Präparaten nach 24-stündiger Exposition bei angegebener Temperaturstufe durch Auswertung von 2.000 doppelkernigen Zellen je Präparat. Zusätzlich angegeben ist der Proliferationsindex zur Beschreibung des Verhältnisses von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ermittelt aus drei Präparaten je Temperaturstufe mit je 1.000 Zellen pro Präparat.

Die durchschnittliche Anzahl an Zellen mit Kernbrücken in 1.000 doppelkernigen Zellen zeigte zwar, wenn man von den Werten der 41 °C Präparate einmal absieht, einen ähnlichen Verlauf wie bei den Mikrokernen mit einem Anstieg bis 40 °C und anschließendem Abfall bei 42 °C, allerdings war die Zunahme an Kernbrücken aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Die genauen Zahlen sowie eine Zusammenfassung der Mikrokern- und NBUD-Daten zeigt folgende Tabelle:

## 4. Ergebnisse

Probe	Zellen mit					
	MK	+/- SD	NBUD	+/- SD	NPB	+/- SD
37 °C	28,3	3,7	9,0	3,0	0,0	0,0
38 °C	44,7	5,0	6,0	2,6	0,2	0,3
39 °C	55,0	19,6	7,7	4,0	0,3	0,3
40 °C	79,7	38,6	11,5	1,0	1,0	1,0
41 °C	106,0	41,8	16,7	9,3	0,0	0,0
42 °C	90,0	20,8	15,3	6,3	0,3	0,6

Tabelle 4.1: Grundlage für die Daten sind jeweils 2.000 ausgezählte doppelkernige Zellen einer Temperaturstufe, wobei jede Temperaturexposition dreimal durchgeführt wurde und die Ergebnisse den Mittelwerten (+/- Standardabweichung) entsprechen. Die Zahlen zeigen als Durchschnittswert in 1.000 doppelkernigen Zellen das Auftreten von Mikrokernen (MK), nukleären „Buds“ (NBUD) und nukleoplasmatischen Brücken (NPB).

### 4.2.4. Apoptosen

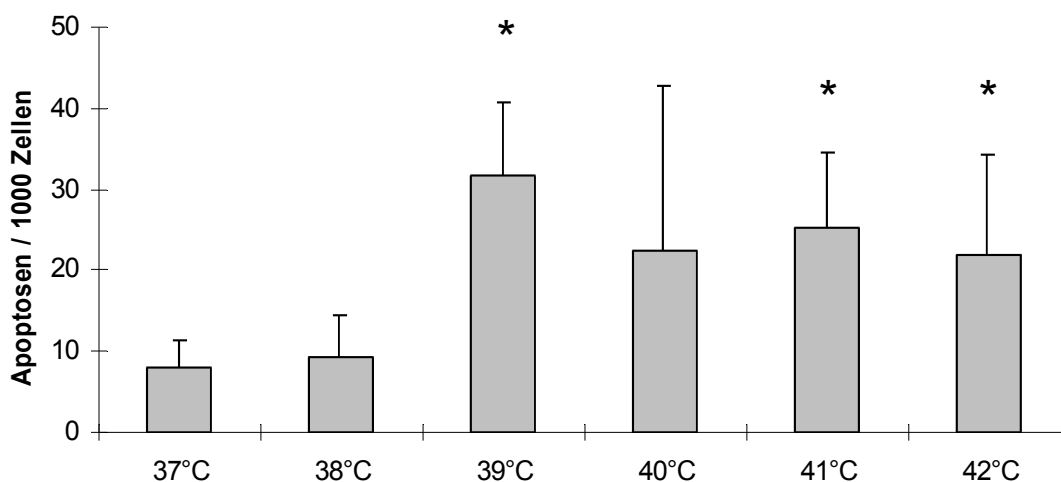


Abbildung 4.28: Durchschnittliche Anzahl apoptotischer Zellen mit Angabe der Standardabweichung in 1.000 Zellen gewonnen aus je drei Präparaten nach 24-stündiger Exposition bei angegebener Temperaturstufe (\* $p \leq 0,05$  gegenüber 37 °C, modifiziert nach Hintzsche / Riese / Stopper 2012).

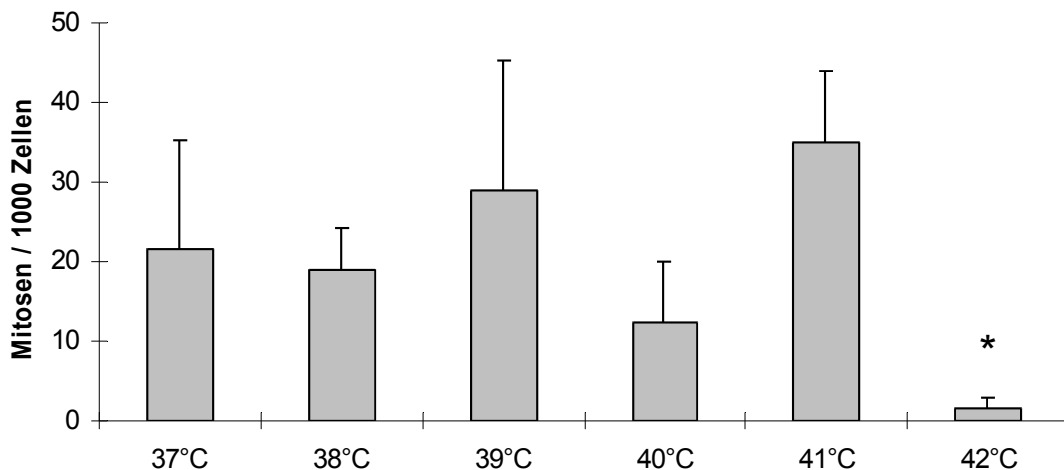
Die Auswertung bezüglich der Apoptosen brachte als Ergebnis bei 37 °C eine durchschnittliche Anzahl von 8 (+/- 3) und bei 38 °C von 9 (+/- 5) apoptotischen in 1.000 ausgewerteten Zellen. Alle höheren Temperaturen zeigten eine Zunahme der Apoptoseraten auf Werte von 32 (+/- 5) bei 39 °C, 22 (+/- 21) bei

## 4. Ergebnisse

---

40 °C, 25 (+/- 9) bei 41 °C und 22 (+/- 12) bei 42 °C. Die Werte waren alle, mit Ausnahme der 40 °C Temperaturstufe, die eine hohe Varianz aufwies, signifikant gegenüber dem Ausgangswert bei 37 °C erhöht.

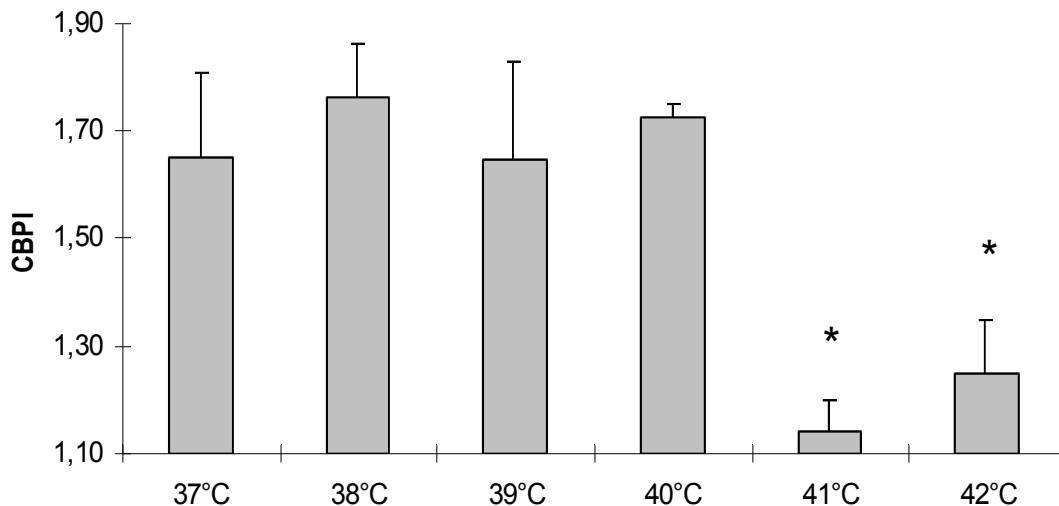
### 4.2.5. Mitosen



**Abbildung 4.29:** Durchschnittliche Anzahl mitotischer Zellen (alle Stadien) mit Angabe der Standardabweichung in 1.000 Zellen gewonnen aus je drei Präparaten nach 24-stündiger Exposition bei angegebener Temperaturstufe (\* $p \leq 0,05$  gegenüber 37 °C).

Die Auswertung bezüglich der sich in Mitose befindlichen Zellen erfolgte unter Berücksichtigung aller Mitosestadien. Bei 37 °C ergab sich eine durchschnittliche Anzahl in 1.000 ausgezählten Zellen von 21,7 (+/- 13,9), bei 38 °C von 19,0 (+/- 5,3), bei 39 °C von 29,0 (+/- 16,4), bei 40 °C von 12,3 (+/- 7,6), bei 41 °C von 35,0 (+/- 8,9) und bei 42 °C von 1,7 (+/- 1,2) mitotischen Zellen und damit bis auf den signifikanten Abfall der Mitoserate bei 42 °C eine temperaturunabhängig schwankende Verteilung.

### 4.2.6. Cytochalasin-B-Proliferationsindex



**Abbildung 4.30:** Durchschnittlicher Wert des Cytochalasin-B-Proliferationsindex mit Angabe der Standardabweichung in 1.000 Zellen gewonnen aus je drei Präparaten nach 24-stündiger Exposition bei angegebener Temperaturstufe (\* $p \leq 0,05$  gegenüber 37 °C, modifiziert nach Hintzsche / Riese / Stopper 2012).

Die Ergebnisse zeigten ausgehend von einem Basalwert des CBPI von 1,65 (+/- 0,15) bei 37 °C keine signifikant veränderten Werte bei 38 °C mit 1,76 (+/- 0,10), 39 °C mit 1,65 (+/- 0,18) und 40 °C mit 1,72 (+/- 0,03). Bei noch höheren Temperaturen war ein signifikanter Abfall der Proliferation festzustellen: Bei der Temperaturstufe 41 °C ergab sich ein CBPI von 1,14 (+/- 0,06) und bei 42 °C von 1,25 (+/- 0,10).

#### 4. Ergebnisse

---

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse apoptotischer und mitotischer Zellen sowie des Cytochalasin-B-Proliferationsindex zeigt folgende Tabelle:

Probe	Zellen mit					
	Apoptosen	+/- SD	Mitosen	+/- SD	CBPI	+/- SD
37 °C	8,0	3,5	21,7	13,6	1,65	0,15
38 °C	9,3	5,1	19,0	5,3	1,76	0,10
39 °C	31,7	9,1	29,0	16,4	1,65	0,18
40 °C	22,3	20,5	12,3	7,6	1,72	0,03
41 °C	25,3	9,3	35,0	8,9	1,14	0,06
42 °C	22,0	12,2	1,7	1,2	1,25	0,10

**Tabelle 4.2:** Grundlage für die Daten sind jeweils 1.000 ausgezählte Zellen einer Temperaturstufe, wobei jede Temperaturexposition dreimal durchgeführt wurde und die Ergebnisse den Mittelwerten (+/- Standardabweichung) entsprechen. Die Zahlen zeigen als Durchschnittswert in 1.000 Zellen den Anteil apoptotischer und mitotischer Zellen sowie den Cytochalasin-B-Proliferationsindex als Proliferationsmarker.

Eine detaillierte Auflistung der jeweiligen Einzelwerte der Ergebnisse befindet sich im Anhang.

### 4.3. Western Blot: Hitzeschockproteinexpression

Zur Untersuchung der Expressionsrate von Hitzeschockproteinen der 70 kDa Familie (Hsp70) wurden Proteinproben aus humanen Keratinozyten nach 24-stündiger Temperaturexposition zwischen 37 °C und 42 °C der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und nach spezifischer Antikörperbehandlung (Hsp70 und  $\beta$ -Aktin) das Bandenmuster ausgewertet.

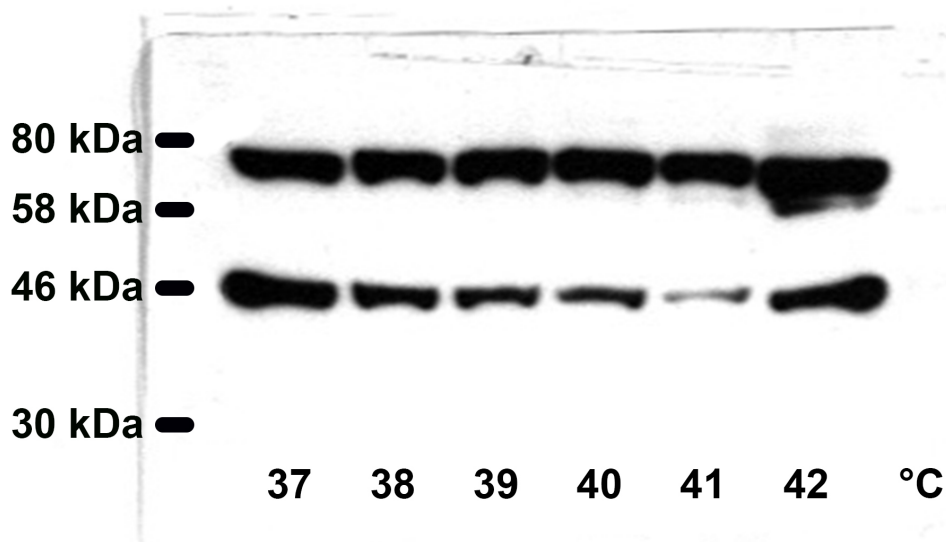
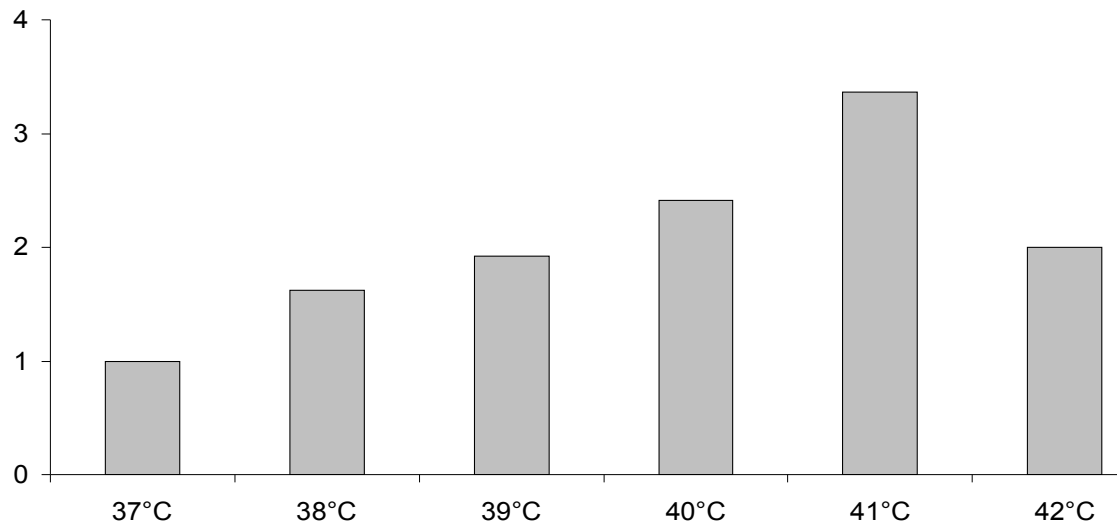


Abbildung 4.31: Dargestellt ist das durch Western Blot entstandene Bandenmuster von Proteinproben vitaler HaCaT-Zellen, die über 24 Stunden einer bestimmten Temperatur ausgesetzt waren (Angabe unterer Bildrand), nach Antikörperbehandlung gegen Hsp70 und  $\beta$ -Aktin. Am linken Bildrand dargestellt ist die Molekülgröße in der Einheit kDa, die der jeweiligen Bande entspricht.

In der Abbildung 4.31 zeigt sich eine erste Bande im erwarteten Molekülmassenbereich der 70 kDa Hitzeschockproteine und eine zweite im erwarteten Größenbereich des  $\beta$ -Aktins. Die Intensität der Banden wurde zuerst zueinander (Hsp70/ $\beta$ -Aktin) und anschließend zum Basalwert bei 37 °C ins Verhältnis gesetzt:

## 4. Ergebnisse

---



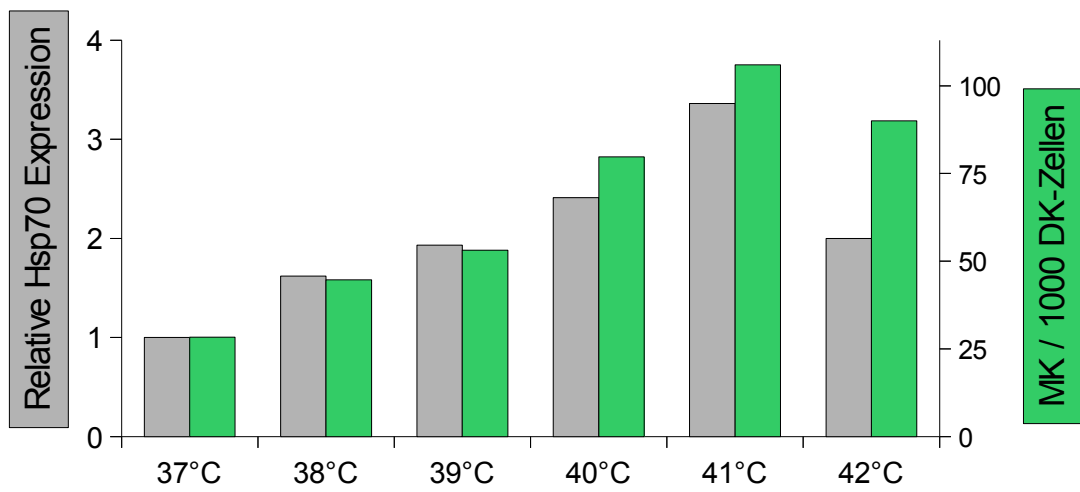
**Abbildung 4.32:** Dargestellt ist die relative Ausprägung der entstandenen Banden der 70 kDa Hitzeschockproteine in HaCaT-Zellen bei Auftrag gleicher Proteinmengen nach verschiedenen Temperaturexpositionen über jeweils 24 Stunden bezogen auf den Ausgangswert bei 37 °C.

Hierbei zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Expression der 70 kDa Hitzeschockproteine von 37 °C bis zu einem Maximum bei 41 °C, bei dem die 3,36-fache Menge des Ausgangswertes nachgewiesen werden konnte. Bei 42 °C nahm die Hsp70-Expression wieder auf das Doppelte des Ausgangswertes ab und zeigte damit einen ähnlichen Verlauf wie die Auswertung der Mikrokernhäufigkeiten.

Vergleicht man in einer gemeinsamen Grafik die relative Zunahme der Hsp70 Expression mit der relativen Zunahme mikrokernhaltiger Zellen in 1.000 Doppelkernigen, so wird dieser Umstand noch deutlicher:

## 4. Ergebnisse

---



**Abbildung 4.33:** Das Diagramm zeigt die relative Hsp70 Proteinmenge bezogen auf den Wert bei 37 °C und parallel die Anzahl mikrokernhaltiger Zellen in 1.000 doppelkernigen Zellen für den Temperaturbereich von 37 °C bis 42 °C im Vergleich.



## 5. Diskussion

### 5.1. Terahertzexpositionen

Im Rahmen der Terahertzexpositionsversuche wurde für diese Arbeit die humane Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT-Zellen) verwendet und nach unterschiedlicher Behandlung anhand der Kriterien des „cytokinesis-block micronucleus cytome assay“ hinsichtlich des Auftretens von Mikrokernen, nukleären „Buds“, nukleoplasmatischen Brücken, Apoptosen und Mitosen sowie des Verhältnisses von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ausgewertet. Hierbei wurden mit elektromagnetischer Strahlung der Frequenz 0,106 THz und einer Leistungsflussdichte von 2 mW/cm<sup>2</sup> über eine Dauer von 24 Stunden exponierte Präparate mit ansonsten identisch behandelten Kontrollen (Leistungsflussdichte 0 mW/cm<sup>2</sup>), den sogenannten Sham-Expositionen, und unbehandelten Präparaten verglichen. Ferner wurden zum Vergleich und als positive Kontrollen die Auswirkungen verschiedener Substanzinkubationen und die Folgen der Bestrahlung mit UV-Licht ausgewertet, um sicherzustellen, dass der verwendete Mikrokerntest die nötige Sensitivität besitzt, auftretende Veränderungen zu erfassen. Als alkylierende Substanz führt Mitomycin C mit seiner klastogenen Eigenschaft hierbei zu Chromosomenaberrationen, im Mikrokerntest also zu einer Zunahme der Mikrokernraten, und Vinblastin durch Hemmung des Spindelapparats und damit Chromosomenfehlverteilung unter anderem zu einer Zunahme der Apoptosen.

Auf die Ergebnisse weiterer, nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewerteter, aber im Zuge der Langzeitexposition mit Terahertzstrahlung parallel gewonnener Daten von Mensch-Hamster-Hybridzellen (A<sub>L</sub>-Zellen, CHO-Zellen mit menschlichem Chromosom 11) und humanen dermalen Fibroblasten (HDF) wird an entsprechender Stelle eingegangen (Hintzsche et al. 2012).

Die Auswertung der HaCaT-Zellen bezüglich des Auftretens von Mikrokernen, die partiell bereits publiziert wurde, zeigte beim Vergleich der mit 2 mW/cm<sup>2</sup>

exponierten Zellen mit denen der mit  $0 \text{ mW/cm}^2$  exponierten Zellen in allen drei Versuchsreihen keine signifikante Erhöhung. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit dem Auftreten von Mikrokernen in den unbehandelten Exponaten. Lediglich die als Positivkontrolle dienenden, mit Mitomycin C behandelten Präparate wiesen erwartungsgemäß eine deutliche Erhöhung der Mikrokernraten auf, die allerdings statistisch nicht signifikant ausfiel. Die Daten der  $A_L$ -Zellen sowie der Fibroblasten zeigten bei den mit Terahertzstrahlung exponierten Präparaten ebenfalls keinen strahlungsbedingten Anstieg der Mikrokernraten im Vergleich zu den Kontrollen (Hintzsche et al. 2012).

Die Anzahl der ausgewerteten nukleären „Buds“ und Kernbrücken unterschied sich praktisch nicht von denen der Kontrollgruppen. Allerdings zeigte sich eine Erhöhung bezüglich des Auftretens von nukleären „Buds“ in den mit Vinblastin und Mitomycin C behandelten Präparaten, wobei nur letztere statistische Signifikanz aufwies. Zusätzlich war auch ein erhöhtes Auftreten von nukleoplasmatischen Brücken in den mit Mitomycin C inkubierten Zellen zu beobachten. Die  $A_L$ -Zellauswertung zeigte keine Erhöhung der Rate an nukleären „Buds“ oder Kernbrücken. Bei den humanen dermalen Fibroblasten war lediglich eine geringe, allerdings nicht signifikante Erhöhung der Anzahl nukleärer „Buds“ in den exponierten Präparaten festzustellen.

Im Hinblick auf den kontrollierten Zelltod zeigten sich, außer in den mit Vinblastin behandelten Präparaten, keine erhöhten Apoptoseraten. Dort war die Rate apoptotischer Zellen zwar etwa sechsfach erhöht, allerdings ließ die breite Varianz der Ergebnisse, für die hauptsächlich die ausbleibende Apoptoseinduktion nach Vinblastinbehandlung in den Zellen der Versuchsreihe 1 verantwortlich war, hierzu keine Signifikanzaussage zu. Die HDF- und  $A_L$ -Zellen zeigten nach Vinblastinbehandlung ebenfalls einen deutlichen Anstieg an apoptotischen Zellen.

Die Auswertung der Mitoserate ergab gegenüber den Kontrollen einen Anstieg in den mit Vinblastin behandelten Präparaten sowie leicht reduzierte Mitoseraten nach Behandlung mit Mitomycin C und UV-Licht. Ähnlichkeiten ergaben sich bei den HDF-Zellen, bei denen ebenfalls eine Zunahme der

Mitoserate nach Vinblastinbehandlung zu beobachten war, sowie bei den A<sub>L</sub>-Zellen, die einen Abfall der Mitoserate nach UV-Licht-Bestrahlung zeigten.

Die Zellteilungsaktivität, essentiell für eine mögliche Mikrokerninduktion, wurde mit dem Cytochalasin-B-Proliferationsindex überprüft und blieb nach Terahertzbestrahlung gegenüber den Negativkontrollen unverändert. Bei den als Positivkontrollen dienenden Substanzinkubationen zeigte sich hingegen ein signifikant verminderter CBPI. Auch die Behandlung mit UV-Licht resultierte in einem reduzierten Proliferationsindex, der allerdings aufgrund des zu geringen Stichprobenumfangs (n=2) nicht signifikant ausfallen konnte.

Zusammenfassend betrachtet unterschieden sich die mit 0,106 THz bestrahlten Proben in keinem der ausgewerteten Kriterien signifikant von den Kontrollen, in den Positivkontrollen waren hingegen erwartungsgemäß Veränderungen nachweisbar. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Verwendung des Terahertzbereiches stellt sich die Frage, wie dieses Ergebnis im Hinblick auf die derzeitige Studienlage einzuordnen ist.

In der vorhandenen Literatur finden sich kaum Ergebnisse mit einem vergleichbaren Versuchsaufbau zu Mikrokernuntersuchungen von mit Terahertzstrahlung behandelten humanen Keratinozyten. Zwar nutzte die Mehrzahl der existierenden Studien einen vergleichbaren Frequenzbereich von 0,1 bis 1 THz, meist wurden aber andere Untersuchungsmethoden oder Zellarten verwendet.

Eine Studie, die Ergebnisse der Langzeitexpositionen sowie vom Aufbau her identische Untersuchungen an HaCaT-Zellen beinhaltet, die ebenfalls mit einer Frequenz von 0,106 THz bei jedoch geringeren Leistungsflussdichten von 0,04 mW/cm<sup>2</sup> bis 0,88 mW/cm<sup>2</sup> über 2 und 8 Stunden bestrahlt wurden, zeigte beim Vergleich mit Kontrollen auch in diesen keinen Anstieg der Mikrokernfrequenzen; in den untersuchten HDF-Zellen war gegenüber den Sham-Expositionen ebenfalls keine erhöhte Anzahl an Mikrokernen nachzuweisen (Hintzsche et al. 2012).

Die Entstehung von Mikrokernen als Zeichen chromosomaler Schäden durch Terahertzstrahlung sowie eine mögliche Veränderung des Zellzyklus wurde darüber hinaus von zwei Studien an Lymphozyten aus Blutproben untersucht. Die Bestrahlung erfolgte bei 0,12 THz und 0,13 THz über einen Zeitraum von 20 Minuten. In beiden Studien zeigte sich keine statistisch signifikante Erhöhung der Mikrokernraten gegenüber den Kontrollen. Auch der als Proliferationsmarker benutzte CBPI unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollen (Scarfi et al. 2003, Zeni et al. 2007). Eine Studie untersuchte die Proben zusätzlich auf das Auftreten von nukleoplasmatischen Brücken, die in den untersuchten doppelkernigen Zellen allerdings nicht nachgewiesen wurden (Zeni et al. 2007: 354).

Eine Untersuchung aus dem Jahr 2003 beschäftigte sich mit den Auswirkungen auf Differenzierung und Überleben humaner Keratinozyten. Diese wurden mit Strahlung der Frequenzen im Bereich von 0,2 – 3,0 THz und 0,1 – 2,7 THz für 10, 20 und 30 Minuten bei einer vergleichbaren Leistungsflussdichte von 2,5 mW/cm<sup>2</sup> behandelt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollen (Clothier / Bourne 2003). Bei einer späteren Studie aus dem Jahr 2008 wurde darüber hinaus auch die Zellmorphologie und Hitzeschockproteinsynthese beurteilt. Hierzu wurde gepulste Terahertzstrahlung der Frequenz 0,140 THz bei einer Leistungsflussdichte von 0,1 – 0,25 mW/cm<sup>2</sup> und einer Expositionsdauer von 24 Stunden gewählt. Die untersuchten Parameter blieben nach Bestrahlung unverändert (Bourne et al. 2008, Hintzsche 2011: 51).

Eine Bestimmung von Überleben und Ausmaß der zellulären Hitzeschockreaktion als Zeichen für zellulären Stress in humanen dermalen Fibroblasten zeigte, dass nach Bestrahlung mit 2,52 THz bei einer Strahlungsintensität von 84,8 mW/cm<sup>2</sup> über eine Dauer von 5 bis 80 Minuten, wenn man die durchschnittlich stattgefundenen Erwärmung von 3 °C beachtet, zum einen sowohl in den der Terahertzstrahlung ausgesetzten Proben als auch in den hyperthermisch behandelten Kontrollen mehr als 90 % der Zellen am Leben blieben und zum anderen, dass keine, über den mit Temperatur behandelten

Kontrollen liegende Steigerung der Hitzeschockreaktion festzustellen war, folglich also die Wirkung der Terahertzstrahlung rein photothermischer Natur zu sein schien (Wilmink et al. 2011).

Auch im Rahmen des THz-Bridge Projektes, eines europaweiten Verbundprojektes zur Untersuchung Terahertz-induzierter Zellschäden, konnten keine generellen biologischen Effekte von Terahertzstrahlung nachgewiesen werden, allerdings wurden eine Veränderung der Membranpermeabilität von Liposomen und mögliche genotoxische Effekte in Lymphozyten beschrieben (Gallerano 2004).

Der Beobachtung, dass Terahertzstrahlung in den meisten Untersuchungen keine nachweisbaren Effekte verursachte, stehen Mitosestörungen und Genominstabilitäten gegenüber, die durch deren Einfluss beschrieben wurden. Eine signifikant gesteigerte Rate an Mitosestörungen zeigte sich bei  $A_L$ -Zellen, die über eine Dauer von 30 Minuten Strahlung von 0,106 THz ausgesetzt waren, für Expositionen bei 0,43 mW/cm<sup>2</sup> und 4,3 mW/cm<sup>2</sup> in Ana- und Telophase der Zellteilung. Hierbei traten vor allem zwischen den Tochterzellkernen zurückgebliebene und fehlverteilte Chromosomen auf (Hintzsche et al. 2011). Da fehlverteilte Chromosomen oder Bruchstücke dieser zur Entstehung von Mikrokernen führen können, wäre in den mit 0,106 THz bestrahlten Präparaten ein nachweisbarer Genomschaden in Form einer Steigerung der Mikrokernfrequenzen, insbesondere in den  $A_L$ -Zellen, durchaus denkbar gewesen, der allerdings anscheinend durch die beschriebenen Mitosestörungen nicht auf Dauer verursacht wird. Genominstabilitäten zeigten sich in Lymphozyten nach Bestrahlung mit 0,1 THz über 1, 2 und 24 Stunden, in denen es bei 0,031 mW/cm<sup>2</sup> zu Aneuploidien kam (Korenstein-Ilan et al. 2008). Da solche numerischen Chromosomenaberrationen nicht als Mikrokern in Erscheinung treten, steht dieses Ergebnis zwar nicht im Widerspruch zu den dargestellten Ergebnissen, die Tatsache, dass zwischen Aneuploidien und Krebsentstehung eine Verbindung besteht (Pellman 2007), rechtfertigt allerdings vor dem Hintergrund zunehmender Verbreitung das große wissenschaftliche Interesse an der Klärung potentieller Risiken dieser Strahlung.

### **5.2. Temperaturexpositionen**

Die gentoxischen Auswirkungen einer über 24 Stunden anhaltenden Temperaturerhöhung wurden systematisch in einem Bereich von 37 °C bis 42 °C an humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen) untersucht. Hierbei wurde der Mikrokerntest benutzt, um das Ausmaß entstandener Genschäden zu beurteilen.

Verglichen mit den 37 °C Werten war über sämtliche Temperaturstufen eine signifikante Erhöhung der Mikrokernraten festzustellen. Das Maximum erreichten die Proben nach Exposition mit 41 °C, in denen beinahe viermal so viele Mikrokerne wie in den Kontrollen beobachtet wurden. Bei 42 °C war die Anzahl an Mikrokernen wieder leicht rückläufig (Hintzsche / Riese / Stopper 2012). Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich bei den nukleären „Buds“, deren Rate zwar bei 38 °C zuerst leicht sank, danach aber analog zu den Mikrokernen bis zu einem Maximum bei 41 °C kontinuierlich anstieg und bei einer Temperatur von 42 °C ebenfalls leicht abfiel. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es durch Temperaturerhöhung zu einer proportionalen Zunahme chromosomaler Schäden in den HaCaT-Zellen in vitro kommt. Diese entstehen wahrscheinlich insbesondere durch hitzebedingte Funktionseinbußen der für die Transkriptions- und Translationsprozesse benötigten Proteine, was letztendlich zu Genominstabilität und chromosomalen Aberrationen führt (Roti Roti 2008: 5-7).

Die Beeinflussung fundamentaler intrazelluläre Prozesse zeigte sich auch an der Zahl apoptotischer Zellen. Während bei 37 °C und 38 °C die Apoptoserate annähernd konstant blieb, war die Anzahl in Apoptose gegangener Zellen in den 39 °C-, 41 °C- und 42 °C-Präparaten signifikant, in den 40 °C-Präparaten zwar deutlich, aufgrund der großen Varianz der Ergebnisse aber nicht signifikant erhöht (Hintzsche / Riese / Stopper 2012).

Die Proliferationsraten, die in Form des Cytochalasin-B-Proliferationsindex ermittelt wurden, waren bis zu einer Temperatur von einschließlich 40 °C annähernd unverändert, bei 41 °C und 42 °C allerdings signifikant reduziert (Hintzsche / Riese / Stopper 2012).

Somit zeigte sich im Gegensatz zu der temperaturabhängig kontinuierlich steigenden Rate an Mikrokernen sowohl für die Apoptosen als auch für den CBPI ein Schwellenwert, ab dem es zu einer signifikanten Veränderung der ermittelten Werte kam. Auch die Mitoserate schien bei 42 °C signifikant abzufallen. Die breite Streuung der Ergebnisse und fehlende weitere Vergleichswerte bei noch höheren Temperaturen ließen darüber allerdings nur eingeschränkte Aussagen zu.

Insgesamt entsprachen damit die dargestellten Ergebnisse vielen anderen Untersuchungen zu diesem Thema: In CHL-Zellen („chinese hamster lung cells“) konnten ebenfalls vermehrte chromosomale Aberrationen nach Inkubation bei 40 °C, 41 °C und 42 °C sowie ein Anstieg der Mikrokerne für die Temperaturen 40 °C und 42 °C nachgewiesen werden (Asanami / Shimono / Kaneda 2001). Auch in Lymphozyten stieg durch eine Temperaturbehandlung mit 42 °C die Mikrokernzahl proportional mit der Zeit, während der diese stattfand, an (Komae / Hibino / Sugano 1999).

Darüber hinaus zeigte sich, dass sich durch die Kombination von Hyperthermie mit einer Noxe, wie zum Beispiel Radiotherapie, deren genschädigende Wirkung im Vergleich zur Einwirkung in normothermer Umgebung noch weiter steigert. Verglichen wurde die Mikrokernentstehung in Lymphozyten durch <sup>137</sup>Cs-Strahlung (0 - 4 Gy) bei 43,5 °C und 37 °C, wobei die Anzahl der Mikrokerne in den hyperthermisch behandelten Proben signifikant über der in bei 37 °C bestrahlten Kontrollen lag (Lee et al. 1998).

Eine durch Hyperthermie induzierte Entstehung von Mikrokernen war ferner in in-vivo-Experimenten, beispielsweise im Knochenmark von Mäusen, zu beobachten. Bei diesen führte eine Erhöhung der Körpertemperatur auf etwa 40,5 °C zu einem signifikanten Anstieg der Mikrokernfrequenzen gegenüber den Kontrollen (Asanami / Shimono 1997).

Ferner stört Hyperthermie den Zellzyklus, indem die DNA-Replikation beeinflusst wird. Es ist bekannt, dass Zellen während der entsprechenden Synthesephase ganz besonders anfällig für eine einwirkende Temperaturerhöhung

sind, die, wenn sie länger andauert, die Reparatur von bei ihrer Entstehung noch potentiell reversiblen Schäden verhindert (Roti Roti 2008: 7). So konnte gezeigt werden, dass es durch Einwirkung einer Temperatur von 41,5 °C zu einer Anhäufung der Zellen in der Synthesephase kam. Ein Kontrollpunkt verhinderte zunächst, dass Zellen, die durch Hyperthermie an ihrer vollständigen DNA-Replikation gehindert wurden, in die Mitose eintreten konnten. Bei Fortbestehen der Temperaturerhöhung wurde allerdings dieser Kontrollpunkt ab einer gewissen, sich mit der Zeit ansammelnden Konzentration Mitose-regulierender Proteine auch schon vor einer vollständigen DNA-Replikation überschritten, was in den entsprechenden Zellen zum Zelltod führt (Mackey et al. 1996, Roti Roti 2008: 7). Die Auswirkungen von Hyperthermie auf Zellzyklus und Überleben wurden auch an CHO-Zellen untersucht. Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Temperaturbehandlung in der G1-Phase des Zellzyklus befanden, zeigten höhere Überlebensraten als eine asynchrone Population, die auch Zellen der temperaturempfindlichen S-Phase beinhaltete. Darüber hinaus war neben einer zu erwartenden Proportionalität zwischen der Anzahl untergegangener Zellen und dem Ausmaß der Temperaturerhöhung sowie der Dauer der Temperatureinwirkung zu beobachten, dass zwischen 42 °C und 42,5 °C die Zellen besonders anfällig auf Temperaturveränderungen reagierten (Sapareto et al. 1978).

Im Gegensatz zu vielen anderen Studien, die eher gezielt und punktuell einzelne Temperaturen herausgriffen, betrachtet diese Arbeit unter Verwendung des „cytokinesis-block micronucleus cytome assay“ einen zusammenhängenden Temperaturbereich. Nicht hinreichend erklärbar bleibt allerdings die Tatsache, dass es nach vorangegangener kontinuierlicher Zunahme der Gentoxizitätsmarker bei 42 °C zu einer Abnahme der Mikrokernraten im Vergleich zu den mit 41 °C behandelten Proben kam. Da die Anzahl an Mikrokernen bei 42 °C nicht wesentlich erniedrigt war und innerhalb der einfachen Standardabweichung des durchschnittlichen 41 °C Wertes lag sowie die Temperaturempfindlichkeit von Zellen im Bereich um 42 °C stark variiert (Sapareto et al. 1978: 395, Takahashi et al. 2004: 8841), kommt eine statistische Ursache in Betracht. Andererseits zeigte sich dieser Verlauf zum



einen auch bei Betrachtung der nukleären „Buds“, zum anderen stieg bei 42 °C die Proliferation wieder leicht an und die Apoptoserate sank geringfügig, so dass auch eine gesteigerte Thermotoleranz in den Zellen zu diesen Ergebnissen geführt haben könnte. Letztlich bleibt die Ursache aber unklar.

### **5.3. Western Blot**

Zur Untersuchung des Ausmaßes der auftretenden Hitzeschockreaktion in den humanen Keratinozyten und für Vergleiche zwischen Hitzeschockproteinexpression und ermitteltem Genomschaden wurden kultivierte HaCaT-Zellen über 24 Stunden bei Temperaturen zwischen 37 °C und 42 °C inkubiert, die Proteine isoliert und mittels Western Blot quantifiziert. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert und in Relation zum Ausgangswert bei 37 °C gesetzt.

Die 70 kDa Hitzeschockproteine zeigten quantitativ eine Zunahme der Banden für sämtliche Temperaturen größer 37 °C mit einem kontinuierlichen Anstieg bis zu einem Maximum bei 41 °C, bei dem die nachgewiesene Proteinmenge dem 3,36-fachen des Ausgangswertes entsprach, und einen anschließenden Rückgang der Proteinexpression bei 42 °C.

Die Menge des konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Aktins nahm hingegen bei steigender Temperatur, mit Ausnahme des 42 °C Wertes, kontinuierlich ab. Da dieses „Housekeeping-Gen“ nicht den regulatorischen Einflüssen der Hitzeschockreaktion unterliegt, ist von einer generellen, temperaturbedingten Abnahme der Syntheseleistung der Zellen auszugehen. Bei 42 °C liegt möglicherweise ein Pipettier- oder Photometriefehler vor, der allerdings aufgrund der Normalisierung das dargestellte Ergebnis der Hsp70 Proteinsynthese nicht beeinflusst.

Der generelle Verlauf der zunehmenden Hitzeschockproteinsynthese entsprach der erwarteten Hitzeschockreaktion und korrelierte mit dem durch die Hyperthermie verursachten zellulären Stress. Dies zeigte sich beim Vergleich der 70 kDa Hitzeschockproteinexpression mit der durchschnittlich aufgetretenen Anzahl mikrokernhaltiger Zellen (siehe Abbildung 4.33, Seite 65, Korrelations-

koeffizient: 0,91), einem Marker für Gentoxizität. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich auch beim Vergleich mit den nukleäre „Buds“ beinhaltenden Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2, Seite 57, Korrelationskoeffizient: 0,71).

Erst bei 42 °C wurde ein Rückgang der Proteinexpression beobachtet, möglicherweise aufgrund einer temperaturinduzierten Störung der Hitzeschockreaktion.

### **6. Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immortalisierte humane Keratinozyten (HaCaT-Zelllinie) über eine Dauer von 24 Stunden mit Terahertzstrahlung der Frequenz 0,106 THz und einer Leistungsflussdichte von 2 mW/cm<sup>2</sup> behandelt und anschließend mittels „cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay“ ausgewertet. Ferner wurden Proben der gleichen Zelllinie über einen Zeitraum von 24 Stunden Temperaturen zwischen 37 °C und 42 °C ausgesetzt und zum einen auf Hinweise für Genotoxizität mit Hilfe des Mikrokerntests untersucht und zum anderen mittels Western Blot die Expressionsrate von Hitzeschockproteinen der 70 kDa Familie bestimmt.

Die der Terahertzstrahlung ausgesetzten Zellen zeigten gegenüber den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen der Marker für chromosomale Aberrationen oder der Zellteilung. Die der erhöhten Temperatur ausgesetzten Zellen zeigten einen signifikanten Anstieg der Mikrokernraten und weiterer Marker für Genotoxizität sowie eine damit korrelierende Zunahme der synthetisierten Proteinmenge der Hsp70 Proteine im Rahmen der Hitzeschockreaktion.

### **7. Summary**

In this dissertation HaCaT human keratinocytes were exposed to terahertz radiation (0.106 THz) and to different temperatures from 37 °C to 42 °C for 24 hours. Using the “cytokinesis-block micronucleus cytome assay” the appearance of different markers of genomic damage was analysed and compared to negative controls. Furthermore the heat-induced expression rate of the heat shock protein 70 was determined between 37 °C and 42 °C.

The cells exposed to terahertz radiation showed no statistically significant elevation of genomic damage markers or change of proliferation compared to the controls. The hyperthermia-treated cells showed significantly increased micronucleus frequencies and an elevated heat-shock protein expression for temperatures above 37 °C.

## 8. Literaturverzeichnis

**Aktories, Klaus et al. (2009):** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10., überarbeitete Auflage. München: Elsevier GmbH.

**Alberts, Bruce et al. (1994):** Molecular Biology of the Cell. 3. Auflage. New York: Garland Science.

**Alexandrov, Boian S. (2011):** Non-thermal effects of terahertz radiation on gene expression in mouse stem cells. In: Biomedical optics express, 2011, Vol. 2, No. 9, 2679-2689.

**Asanami, Shougo / Shimono, Kazuyuki (1997):** High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. In: Mutation research, 1997, Vol. 390, No. 1-2, 79-83.

**Asanami, Shougo / Shimono, Kazuyuki / Kaneda, Shinya (2001):** Effect of temperature on the frequency of chromosome aberrations and micronuclei in cultured chinese hamster cells. In: The Journal of Toxicological Sciences, 2001, Vol. 26, No. 5, 323-326.

**Beckham, Josh T. et al. (2008):** Role of HSP70 in cellular thermotolerance. In: Lasers in surgery and medicine, 2008, Vol. 40, No. 10, 704-715.

**Berns, Michael W. / Bewley, William (1987):** Inhibition of Nucleic-Acid Synthesis in Cells Exposed to 200 Micrometer Radiation from the Free-Electron Laser. In: Photochemistry and Photobiology, 1987, Vol. 46, No. 2, 165-167.

**Boukamp, Petra et al. (1988):** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: The Journal of Cell Biology, 1988, Band 106, 761-771.

**Bourne, Nicola et al. (2008):** The effects of terahertz radiation on human keratinocyte primary cultures and neural cell cultures. In: Alternatives Laboratory Animals, 2008, Vol. 36, No. 6, 667-684.

**Brun, Marc-Aurèle et al. (2010):** Terahertz imaging applied to cancer diagnosis. In: Physics in Medicine and Biology, 2010, Vol. 55, No. 16, 4615-4623.

**Cooper, Geoffrey M. / Hausmann, Robert E. (2009):** The Cell. A Molecular Approach. 5. Auflage. Washington D.C., USA: ASM Press.

**Clothier, Richard H. / Bourne, Nicola (2003):** Effects of THz exposure on human primary keratinocyte differentiation and viability. In: Journal of Biological Physics, 2003, Vol. 29, No. 2-3, 179-185.

**Daugaard, Mads / Rohde, Mikkel / Jäättelä, Marja (2007):** The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. In: FEBS Letters, 2007, Vol. 581, No. 19, 3702-3710.

**De Maio, Antonio (1999):** Heat Shock Proteins: Facts, Thoughts, and Dreams. In: Shock, 1999, Vol. 11, No. 1, 1-12.

**De Maio, Antonio et al. (2012):** Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. In: Cell Stress and Chaperones, 2012, Vol. 17, No. 2, 139-143.

**Doria, Andrea et al. (2004):** THz radiation studies on biological systems at the ENEA FEL facility. In: Infrared physics & technology, 2004, Vol. 45, No. 5, 339-347.

**Earnshaw, William C. / Honda, Barry M. / Laskey, Ronald A. (1980):** Assembly of Nucleosomes: the Reaction Involving X. laevis Nucleoplasmin. In: Cell, 1980, Volume 21, 373-383.

**Fenech, Michael (1996):** The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique. In: Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, edited by Gerd P. Pfeifer. 1. Auflage. New York, USA: Plenum Press.

**Fenech, Michael (2007):** Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. In: Nature Protocols, 2007, Vol. 2, No. 5, 1084-1104.

**Freeman, Brian C. / Morimoto, Richard I. (1996):** The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hsp71 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. In: The EMBO Journal, 1996, Vol. 15, No. 12, 2969-2979.

**Fritsch, Peter (2009):** Dermatologie und Venerologie für das Studium. 1. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

**Gallerano, Gian Piero (2004):** Tera-Hertz radiation in biological research, investigations on diagnostics and study on potential Genotoxic Effects. EU, 2004.

**Gingalewski, Cynthia et al. (1996):** Distinct expression of heat shock and acute phase genes during regional hepatic ischemia-reperfusion. In: The American Journal of Physiology, 1996, Vol. 271, No. 3, R634-R640.

**Hammer / Hammer (2003):** Physikalische Formeln und Tabellen. 8. Auflage, München: J. Lindauer Verlag (Schaefer).

**He, Haiying et al. (2003):** Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. In: The journal of biological chemistry, 2003, Vol. 278, No. 37, 35465-35475.

**Heddle, John A. (1973):** A rapid in vivo test for chromosomal damage. In: Mutation Research, 1973, Vol. 18, No. 2, 187-190.

**Hintzsche, Henning (2011):** Genotoxizität nichtionisierender Strahlung. Auswirkungen von Mobilfunk- und Terahertzstrahlung auf das Genom. Dissertation, Würzburg.

**Hintzsche, Henning et al. (2011):** Terahertz radiation induces spindle disturbances in human-hamster hybrid cells. In: Radiation Research, 2011, Vol. 175, No. 5, 569-574.

**Hintzsche, Henning / Stopper, Helga (2012):** Effects of terahertz radiation on biological systems. In: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2012, Vol. 42, No. 22, 2408-2434.

**Hintzsche, Henning / Riese, Thorsten / Stopper, Helga (2012):** Hyperthermia-induced micronucleus formation in a human keratinocyte cell line. In: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2012, Vol. 738, 71-74. Die Verwendung erfolgt mit Genehmigung des Verlages.

**Hintzsche, Henning et al. (2012):** Terahertz Electromagnetic Fields (0.106 THz) Do Not Induce Manifest Genomic Damage In Vitro. In: *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, No. 9, e46397.

**Hotchkiss, Richard et al. (1993):** Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. In: *The American journal of physiology*, 1993, Vol. 265, No. 6 Part 2, 1447-1457.

**Kampinga, Harm H. et al. (2009):** Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. In: *Cell Stress and Chaperones*, 2009, Vol. 14, No. 1, 105-111.

**Kantengwa, Salomé / Polla, Barbara S. (1993):** Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* induces a selective stress response in human monocytes-macrophages (M phi): modulation by M phi differentiation and by iron. In: *Infection and Immunity*, 1993, Vol. 61, No. 4, 1281-1287.

**Karp, Gerald (2005):** *Molekulare Zellbiologie*. 1. deutsche Auflage. Berlin / Heidelberg / New York: Springer-Verlag; 2005.

**Koecke, Hans U. / Emschermann, Peter / Härle, Eckhart (2000):** *Biologie. Lehrbuch der allgemeinen Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 4. Auflage. Stuttgart: Schattauer Verlag, S. 244-248.

**Komae, Norihisa / Hibino, Yasuhide / Sugano, Nobuhiko (1999):** Analysis of micronuclei induced under hyperthermic conditions in human lymphocyte culture by fluorescence in situ hybridization (FISH) and spectral karyotyping (SKY) methods. In: *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 1999, Vol. 119, No. 10, 763-772.

**Korenstein-Ilan, Avital et al. (2008):** Terahertz radiation increases genomic instability in human lymphocytes. In: *Radiation Research*, 2008, Vol. 170, No. 2, 224-234.

**Lavoie, Josée N. et al. (1993):** Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. In: *The journal of biological chemistry*, 1993, Vol. 268, No. 5, 3420-3429.

**Lee, Tung-Kwang et al. (1998):** Effect of ex vivo hyperthermia on radiation-induced micronuclei in lymphocytes of cancer patients before and during radiotherapy. In: *Mutation Research*, 1998, Vol. 417, No. 1, 1-8.

**Li, Gloria C. (1983):** Induction of Thermotolerance and Enhanced Heat Shock Protein Synthesis in Chinese Hamster Fibroblasts by Sodium Arsenite and by Ethanol. In: *Journal of Cellular Physiology*, 1983, Vol. 115, No. 2, 116-122.

- Li, Gloria C. / Calderwood, Stuart K. (2009):** Hyperthermia classic article commentary: 'Re-induction of hsp70 synthesis: An assay for thermotolerance' by Gloria C. Li and Johnson Y. Mak, *International Journal of Hyperthermia* 1989; 5: 389-403. In: *International Journal of Hyperthermia*, 2009, Vol. 25, No. 4, 258-261.
- Lindquist, Susan / Craig, Elizabeth A. (1988):** The Heat-Shock Proteins. In: *Annual review of genetics*, 1988, Vol. 22, 631-677.
- Lutz, Martin (2010):** Antreten zum Körperscannen – aber bitte freiwillig. URL: <http://www.welt.de/die-welt/politik/article9895219/Antreten-zum-Koerperscannen-aber-bitte-freiwillig.html>. Stand: 15.03.2011.
- Mackey, Michael A. et al. (1996):** Uncoupling of M-Phase Kinase Activation from the Completion of S-Phase by Heat Shock. In: *Cancer Research*, 1996, Vol. 56, No. 8, 1770-1774.
- Mayer, Matthias. P. / Bukau, Bernd (2005):** Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. In: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, Vol. 62, No. 6, 670-684.
- Mizzen, Lee A. / Welch, William J. (1988):** Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. In: *The Journal of cell biology*, 1988, Vol. 106, No. 4, 1105-1116.
- Nickoloff, Jac A. / Hoekstra, Merl F. (1998):** DNA Damage and Repair. Volume II: DNA Repair in Higher Eukaryotes. 1. Auflage. Humana Press.
- Ostrovskiy, N.V. et al. (2005):** Application of the terahertz waves in therapy of burn wounds. In: *Infrared and Millimeter Waves and 13th International Conference on Terahertz Electronics*, 2005. IRMMW-THz 2005. Vol. 1, 301-302.
- Parsell, Dawn A. et al. (1994):** Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. In: *Nature*, 1994, Vol. 372, 475-478.
- Parsian, Azemat J. et al. (2000):** The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, Vol. 1494, 201-205.
- Pelham, Hugh R. B. (1986):** Speculations on the Functions of the Major Heat Shock and Glucose-Regulated Proteins. In: *Cell*, 1986, Vol. 46, 959-961.
- Pellman, David (2007):** Cell biology: aneuploidy and cancer. In: *Nature*, 2007, Vol. 446, No. 7131, 38-39.
- Pickwell, Emma / Wallace, Vincent P. (2006):** Biomedical applications of terahertz technology. In: *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2006, Vol. 39, No. 17, R301-R310.
- Plumier, Jean C. et al. (1995):** Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. In: *The journal of clinical investigation*, April 1995, Vol. 95, No. 4, 1854-1860.



**Reifferscheid, Georg et al. (2008):** Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test: results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. In: Mutation Research, Januar 2008, Vol. 649, No. 1-2, 15-27.

**Ritossa, Ferruccio (1962):** A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. In: Cellular and Molecular Life Science (CMLS), 1962, Vol. 18, No. 12, 571-573.

**Ritossa, Ferruccio (1996):** Discovery of the heat shock response. In: Cell Stress & Chaperones, 1996, Vol. 1, No. 2, 97-98.

**Roti Roti, Joseph L. (2008):** Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. In: International Journal of Hyperthermia, 2008, Vol. 24, No. 1, 3-15.

**Sapareto, Stephen A. et al. (1978):** Effects of Hyperthermia on Survival and Progression of Chinese Hamster Ovary Cells. In: Cancer research, 1978, Vol. 38, No. 2, 393-400.

**Scarfi, Maria Rosaria et al. (2003):** THz exposure of whole blood for the study of biological effects on human lymphocytes. In: Journal of Biological Physics, 2003, Vol. 29, No. 2-3, 171-176.

**Schmid, W. (1975):** The micronucleus test. In: Mutation research, 1975, Vol. 31, No. 1, 9-15.

**Sela, Michael / White, Frederick H. Jr. / Anfinsen, Christian B. (1957):** Reductive Cleavage of Disulfide Bridges in Ribonuclease. In: Science, 1957, Vol. 125, 691-692.

**Shimizu, Noriaki et al. (1998):** Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. In: The journal of cell biology, 1998, Vol. 140, No. 6, 1307-1320.

**Sistonen, Lea et al. (1992):** Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. In: Molecular and cellular biology, 1992, Vol. 12, No. 9, 4104-4111.

**Takahashi, Akihisa et al. (2004):** Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing. In: Cancer research, 2004, Vol. 64, No. 24, 8839-8845.

**Tissières, Alfred / Mitchell, Herschel K. / Tracy, Ursula M. (1974):** Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. In: Journal of Molecular Biology, 1974, Vol. 84, No. 3, 389-392.

**Villar, Jesus et al. (1993):** Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. In: The American review of respiratory disease, 1993, Vol. 147, No. 1, 177-181.

**Wilmink, Gerald J. et al. (2011):** In vitro investigation of the biological effects associated with human dermal fibroblasts exposed to 2.52 THz radiation. In: Lasers in Surgery and Medicine, 2011, Vol. 43, No. 2, 152-163.

**Wilmink, Gerald J. / Grundt, Jessica E. (2011):** Invited Review Article: Current State of Research on Biological Effects of Terahertz Radiation. In: Journal of Infrared, Millimeter and Terahertz Waves, 2011, Vol. 32, No. 10, 1074-1122.

**Woodward, Ruth M. et al. (2002):** Terahertz pulse imaging in reflection geometry of human skin cancer and skin tissue. In: Physics in Medicine and Biology, 2002, Vol. 47, No. 21, 3853-3863.

**Zeni, Olga et al. (2007):** Cytogenetic observations in human peripheral blood leukocytes following in vitro exposure to THz radiation: a pilot study. In: Health physics, 2007, Vol. 92, No. 4, 349-357.

## 9. Anhang

### 9.1. Ergebnisse der Terahertzexpositionen

Behandlung	Expositionsreihe	Probe	Zellen mit			CBPI	ausgewertete DK-Zellen
			MK (MW)	NBUDs (MW)	NPB (MW)		
Sham-Exposition	R1	D1	55,5	6,0	0,0	1,50	2.000
		D2	32,5	4,5	0,0	1,47	2.000
		D3	26,0	6,0	1,0	1,62	2.000
	R2	D1	43,3	11,7	0,7	1,62	3.000
		D2	33,7	3,7	0,3	1,60	3.000
		D3	43,0	10,0	1,3	1,65	3.000
		D4	59,0	11,0	1,0	1,56	3.000
	R3	D1	79,0	13,7	0,7	1,67	3.000
		D2	65,3	11,3	0,3	1,72	3.000
		D3	77,0	10,0	2,0	1,75	3.000
		D4	75,3	14,3	1,0	1,70	3.000
	Terahertz Exposition	R1	D1	32,5	5,5	0,5	1,47
D2			60,0	8,5	1,0	1,64	2.000
D3			23,5	4,5	1,5	1,54	2.000
R2		D1	37,3	5,0	0,3	1,53	3.000
		D2	44,7	12,3	0,3	1,60	3.000
		D3	50,0	12,0	1,3	1,64	3.000
		D4	62,7	9,0	1,0	1,62	3.000
R3		D1	77,3	10,7	0,7	1,61	3.000
		D2	80,0	12,3	1,3	1,68	3.000
		D3	108,3	11,3	0,7	1,77	3.000
		D4	65,7	10,0	0,3	1,76	3.000
MMC		R1	D1	80,0	15,0	2,0	1,31
	D2		59,0	22,0	5,0	1,24	1.000
	R2	D1	103,3	14,7	0,0	1,40	3.000
		D2	155,0	33,7	1,3	1,50	3.000
		D3	124,7	9,0	0,3	1,42	3.000
	R3	D1	190,7	36,0	0,0	1,49	3.000
		D2	263,7	33,7	0,3	1,51	3.000
D3	216,0	35,7	0,7	1,50	3.000		
VIN	R1	D1	30,0	13,0	2,0	1,19	1.000
		D2	36,0	11,0	2,0	1,44	1.000
	R2	D1	49,0	17,3	0,0	1,45	3.000
		D2	42,7	4,5	0,0	1,41	2.000
		D3	65,3	10,7	1,0	1,37	2.171
	R3	D1	117,0	24,7	0,0	1,32	3.000
		D2	188,3	61,0	1,0	1,35	3.000
		D3	123,3	40,3	0,3	1,34	3.000

## 9. Anhang

UV	R2	D1	50,7	14,7	1,0	1,40	3.000
		D2	44,7	11,0	0,7	1,38	3.000
		D3	51,7	11,7	0,0	1,38	3.000
	R3	D1	89,0	14,3	0,0	1,35	3.000
		D2	81,3	12,3	0,7	1,30	3.000
		D3	110,3	20,0	0,7	1,47	3.000
Unbehandelt	R2	D1	39,7	5,7	0,0	1,68	3.000
		D2	57,0	13,0	1,0	1,65	3.000
		D3	57,0	5,3	1,0	1,64	3.000
	R3	D1	79,7	18,7	1,0	1,71	3.000
		D2	107,7	18,0	0,3	1,68	3.000
		D3	64,0	10,3	0,3	1,76	3.000

**Tabelle 9.1: Ergebnisse der Terahertzauswertung (Teil 1) mit Angabe der Präparate, der durchschnittlich vorkommenden Mikrokerne/NBUDs/NPB (jeweils bezogen auf 1.000 doppelkernige Zellen), des Cytochalsin-B-Proliferationsindexes sowie der Anzahl der hierfür ausgewerteten doppelkernigen Zellen.**

Behandlung	Expositionsreihe	Probe	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	Apoptose	Mitose	Sonstige
Sham-Exposition	R1	D1	487	474	5	11	22	1
		D2	518	408	18	19	29	8
		D3	366	577	8	18	28	3
	R2	D1	371	581	6	5	27	10
		D2	390	548	9	27	19	7
		D3	342	628	5	4	17	4
		D4	429	533	4	5	24	5
	R3	D1	350	598	27	14	10	1
		D2	288	652	17	34	7	2
		D3	242	688	9	32	18	11
		D4	303	642	12	27	12	4
	Terahertz Exposition	R1	D1	521	433	8	13	22
D2			343	603	3	18	32	1
D3			400	460	5	40	89	6
R2		D1	444	501	3	29	16	7
		D2	380	552	5	39	17	7
		D3	349	605	5	9	24	7
		D4	375	568	9	26	19	3
R3		D1	386	564	11	30	6	3
		D2	327	616	17	22	15	3
		D3	235	708	18	20	14	5
		D4	253	688	21	25	8	5
MMC		R1	D1	491	463	8	19	17
	D2		633	329	8	15	11	4
	R2	D1	592	391	2	5	7	3
		D2	492	484	2	12	5	5
		D3	574	390	9	17	6	4
	R3	D1	506	463	10	13	6	2
		D2	479	471	8	35	5	2
		D3	491	467	8	25	4	5

Vinblastin	R1	D1	588	319	5	19	68	1
		D2	498	375	6	28	93	0
	R2	D1	461	359	6	132	33	9
		D2	440	287	8	216	40	8
		D3	464	255	5	236	22	18
	R3	D1	546	249	3	182	11	9
		D2	436	227	4	290	19	24
		D3	503	232	10	225	14	16
	UV-Licht	R2	D1	590	363	12	21	8
D2			601	344	11	25	14	5
D3			594	333	12	40	15	6
R3		D1	620	297	14	50	8	11
		D2	684	285	6	15	6	4
		D3	507	432	7	39	9	6
Unbehandelt	R2	D1	319	625	12	18	22	4
		D2	347	606	13	16	14	4
		D3	349	591	10	28	18	4
	R3	D1	305	654	20	9	9	3
		D2	312	621	13	27	20	7
		D3	245	707	12	25	6	5

**Tabelle 9.2: Ergebnisse der Terahertzauswertung (Teil 2) mit Angabe der Präparate und der Häufigkeit der einkernigen, doppelkernigen und mehrkernigen Zellen sowie der apoptotischen, mitotischen (alle Phasen) und sonstigen Zellen bestimmt aus jeweils 1.000 ausgezählten Zellen des jeweiligen Präparates.**

## 9.2. Ergebnisse der Temperaturexpositionen

Temperatur	Probe	Zellen mit			CBPI
		MK (MW)	NBUDs (MW)	NPB (MW)	
37 °C	1	25,5	12,5	0,0	1,54
	2	27,0	7,5	0,0	1,83
	3	32,5	7,0	0,0	1,59
38 °C	1	39,0	8,0	0,0	1,88
	2	48,5	3,0	0,5	1,70
	3	46,5	7,0	0,0	1,71
39 °C	1	38,0	7,0	0,5	1,70
	2	50,5	4,0	0,0	1,80
	3	76,5	12,0	0,5	1,44
40 °C	1	72,0	11,5	0,0	1,72
	2	45,5	12,5	2,0	1,75
	3	121,5	10,5	1,0	1,70

## 9. Anhang

41 °C	1	108,5	14,0	0,0	1,20
	2	146,5	27,0	0,0	1,08
	3	63,0	9,0	0,0	1,13
42 °C	1	69,0	10,5	0,0	1,22
	2	90,5	22,5	0,0	1,17
	3	110,5	13,0	1,0	1,36

**Tabelle 9.3: Ergebnisse der Temperaturexpositionen (Teil 1) mit Angabe der Präparate, der ausgezählten Mikrokerne/NBUDs/NPB je 1.000 doppelkernige Zellen (gemittelt aus 2.000 ausgezählten doppelkernigen Zellen je Präparat) und des Cytochalasin-B-Proliferationsindexes.**

Temperatur	Probe	Einkernig	Zweikernig	Mehrkernig	Apoptose	Mitose	Sonstige
37 °C	1	402	559	7	4	17	11
	2	128	840	7	10	11	4
	3	316	631	4	10	37	2
38 °C	1	132	821	16	8	21	2
	2	255	706	10	5	23	1
	3	290	668	9	15	13	5
39 °C	1	280	630	7	40	33	10
	2	116	829	7	33	11	4
	3	422	501	6	22	43	6
40 °C	1	264	658	5	43	19	11
	2	191	748	22	22	14	3
	3	296	685	11	2	4	2
41 °C	1	603	294	4	33	45	21
	2	816	134	0	15	28	7
	3	744	185	6	28	32	5
42 °C	1	749	204	5	36	1	5
	2	790	186	2	16	3	3
	3	603	364	10	14	1	8

**Tabelle 9.4: Ergebnisse der Temperaturexpositionen (Teil 2) mit Angabe der Präparate und der Häufigkeit der einkernigen, doppelkernigen und mehrkernigen Zellen sowie der apoptotischen, mitotischen (alle Phasen) und sonstigen Zellen bestimmt aus jeweils 1.000 ausgezählten Zellen des jeweiligen Präparates.**

## **Danksagung**

Mit Abschluss dieser Dissertation möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei Frau Professor Dr. Stopper für die Vergabe des Themas, die fortwährende exzellente Betreuung während meiner Zeit als Doktorand sowie für das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Dr. Henning Hintzsche für die intensive Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit mit zahlreichen wertvollen und von mir sehr geschätzten Anregungen und Ratschlägen sowie für das vermittelte Gefühl, während meiner Zeit als Doktorand immer gut aufgehoben zu sein.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus insbesondere bei Frau Ingrid Richter und Frau Silvana Wunram, die mir mit ihrem großen Fachwissen, ihren technischen Fertigkeiten und ihrer Erfahrung beim Erlernen der Methoden behilflich waren und mich stets bei meiner dortigen Arbeit unterstützten.

Ferner gilt mein Dank dem gesamten Team der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Stopper sowie den vielen weiteren Mitarbeitern der Würzburger Toxikologie, die ich dort kennenlernen durfte, für die freundliche Aufnahme, die ständige Hilfsbereitschaft und die letztlich sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.