

Einfluss hochfrequenter Felder des Mobilfunks auf das blutbildende System *in vitro*

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Katharina Gläser

geb. in Bugrowoje

Würzburg, 2017

Eingereicht am: -----

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: -----

1. Gutachter: Prof. Dr. Helga Stopper

2. Gutachter: PD Dr. Robert Hock

Tag des Promotionskolloquiums: -----

Doktorurkunde ausgehändigt am: -----

Inhalt

ZUSAMMENFASSUNG.....V

SUMMARY.....VII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... IX

1 EINLEITUNG..... 1

1.1 ELEKTROMAGNETISCHE FELDER 1

1.1.1 Elektromagnetisches Spektrum und Vorkommen 1

1.1.2 Mobilfunkstrahlung 3

1.2 DAS BLUTBILDENDE SYSTEM 6

1.2.1 Ontogenese – embryonale vs. adulte Hämatopoese 6

1.2.2 Hämatopoetische Stammzellen 8

1.3 WIRKUNG VON MOBILFUNKSTRAHLUNG 15

1.3.1 Epidemiologische Untersuchungen 15

1.3.2 Wirkung auf biologische Systeme..... 16

1.3.3 Wirkung auf das blutbildende System..... 17

2 ZIELSETZUNG.....20

3 MATERIAL.....22

3.1 VERBRAUCHSMATERIAL 22

3.2 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN 22

3.3 BIOLOGISCHES MATERIAL 22

3.3.1 Zelllinien..... 23

3.3.1.1 HL-60-Zellen 23

3.3.1.2 TK6-Zellen..... 23

3.3.2 Primäre Zellen (hämatopoetische Stammzellen) 23

3.4 MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR 24

4 METHODEN25

4.1	ZELLKULTURTECHNIKEN	25
4.1.1	Kultivierung und Subkultivierung der Zellen	25
4.1.1.1	HL-60-Zellen	25
4.1.1.2	TK6-Zellen.....	25
4.1.1.3	Hämatopoetische Stammzellen	25
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl	26
4.1.3	Bestimmung der Vitalität.....	26
4.1.3.1	Vitalitätstest mittels Trypanblau-Färbung	26
4.1.3.2	Vitalitätstest mittels FDA/GelRed-Färbung.....	27
4.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27
4.1.4.1	Einfrieren und Auftauen von HL-60-Zellen und TK6-Zellen	27
4.1.4.2	Auftauen von hämatopoetischen Stammzellen.....	28
4.1.5	Differenzierung der HL-60-Zellen	30
4.2	MOBILFUNKEXPOSITIONEN.....	30
4.2.1	Expositionssignale.....	31
4.2.2	Expositionsanlage	31
4.2.3	Dosimetrie	34
4.3	VORBEREITUNG, EXPOSITION UND AUFARBEITUNG DER PROBEN	36
4.4	BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	37
4.4.1	Apoptose.....	37
4.4.2	Oxidativer Stress	39
4.4.3	Zellzyklus-Analyse	41
4.4.4	DNA-Schaden	42
4.4.5	DNA-Reparatur	43
4.4.6	Differenzierung	45
4.4.7	Histonacetylierung.....	46
4.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	48
5	ERGEBNISSE.....	49
5.1	ETABLIERUNG DER POSITIVKONTROLLEN	49
5.1.1	Apoptose.....	49
5.1.2	Oxidativer Stress	51
5.1.3	Zellzyklus-Analyse	53

5.1.4	DNA-Schaden	55
5.1.5	DNA-Reparatur	57
5.1.6	Differenzierung	58
5.1.7	Histonacetylierung.....	63
5.1.8	Übersicht der Positivkontrollen	64
5.2	MOBILFUNKEXPOSITIONEN.....	65
5.2.1	Vitalität nach Mobilfunkexposition	65
5.2.2	Apoptose.....	67
5.2.3	Oxidativer Stress	70
5.2.4	Zellzyklus-Analyse	73
5.2.5	DNA-Schaden	76
5.2.6	DNA-Reparatur	80
5.2.7	Differenzierung	83
5.2.8	Histonacetylierung.....	86
5.3	HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN IM VERGLEICH ZU DIFFERENZIIERTEN ZELLEN.....	89
5.3.1	Oxidativer Stress	91
5.3.2	Zellzyklus-Analyse	92
5.3.3	DNA-Schaden	93
5.3.4	DNA-Reparatur	94
5.3.5	Histonacetylierung.....	96
6	DISKUSSION	97
6.1	MOBILFUNKEXPOSITIONEN.....	97
6.1.1	Apoptose.....	99
6.1.2	Oxidativer Stress	100
6.1.3	Zellzyklus-Analyse	101
6.1.4	DNA-Schaden	101
6.1.5	DNA-Reparatur	103
6.1.6	Differenzierung	105
6.1.7	Histonacetylierung.....	107
6.1.8	Mobilfunkstrahlung und Stammzellen – Stand der Forschung	108
6.2	HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN IM VERGLEICH ZU DIFFERENZIIERTEN ZELLEN.....	110
6.2.1	Oxidativer Stress	110

6.2.2	Zellzyklusanalyse.....	112
6.2.3	DNA-Schaden und DNA-Reparatur	113
6.2.4	Histonacetylierung.....	115
7	SCHLUSSFOLGERUNG	118
	REFERENZEN.....	119
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	132
	TABELLENVERZEICHNIS.....	136
	ANHANG.....	137
	DANKSAGUNG	141
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	142

ZUSAMMENFASSUNG

Elektromagnetische Felder (EMF) sind in der Umwelt des Menschen allgegenwärtig. Unter Verwendung unterschiedlicher Frequenzen bilden sie die Grundlage zahlreicher Technologien und begegnen uns im Alltag in einer Vielzahl von Anwendungen. Eine sehr wichtige Anwendung von EMF ist die mobile Kommunikation. Die hierfür verwendeten Frequenzen liegen im hochfrequenten Bereich und variieren mit dem Mobilfunkstandard. Weit verbreitet ist die GSM- und UMTS-Modulation der zweiten (2G) und dritten Generation (3G). Zum neuesten Mobilfunkstandard zählt LTE (4G).

Aus statistischen Daten geht hervor, dass derzeit weltweit mehr als sieben Milliarden Mobilfunk-Endgeräte existieren. Die weitverbreitete und stetig ansteigende Verwendung dieser Technologien verdeutlicht, dass viele Menschen, darunter auch zunehmend Kinder und Jugendliche, regelmäßig einer Exposition gegenüber EMF ausgesetzt sind. Die wichtigste Expositionsquelle stellt dabei das Mobiltelefon dar, da sich in diesem Szenario die Quelle sehr nah am menschlichen Körper befindet. In der Vergangenheit wurden zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen sowie epidemiologische Studien durchgeführt, um potentielle, nicht-thermische Effekte von Mobilfunkstrahlung auf biologische Systeme beurteilen zu können. Ein vollständiger Konsens konnte auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse jedoch nicht erzielt werden, sodass weiterhin Bedenken zum schädlichen Potential dieser nichtionisierenden Strahlung bestehen. Insbesondere wurden Fragestellungen zu Langzeiteffekten sowie zu Effekten, die speziell bei Kindern eine besondere Rolle spielen, bisher nicht ausreichend adressiert. Kinder können empfindlicher auf Umwelteinflüsse reagieren und sind im Vergleich zu Erwachsenen teilweise höher gegenüber EMF exponiert. Dies gilt vor allem für Kopfreionen, in denen sich das aktive, für die Hämatopoese verantwortliche Knochenmark befindet.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Mobilfunkstrahlung auf das humane blutbildende System zu untersuchen. Im Fokus standen dabei humane hämatopoetische Stammzellen, die mit Frequenzen der Mobilfunkstandards GSM (900 MHz), UMTS (1.950 MHz) und LTE (2.535 MHz) jeweils über einen kurzen (4 h) und einen langen (20 h) Zeitraum und mit unterschiedlichen Intensitäten (0 W/kg, 0,5 W/kg, 1 W/kg, 2 W/kg und 4 W/kg) exponiert wurden. Vergleichende Experimente erfolgten mit Zellen der Promyelozyten-Zelllinie HL-60. Mögliche Effekte wurden mit den Endpunkten

Apoptose, oxidativer Stress, Zellzyklus, DNA-Schaden und –Reparatur sowie Differenzierung und Epigenetik in Form von Histonacetylierung bewertet. In keinem der genannten Endpunkte konnten klare Effekte durch Mobilfunkstrahlung ausgemacht werden, weder für die hämatopoetischen Stammzellen, noch für die Zelllinie HL-60. Die einzige Veränderung wurde bei der Quantifizierung von DNA-Schäden beobachtet. Hier zeigte sich nach der Kurzzeitexposition der Stammzellen mit der Modulation GSM eine kleine, aber statistisch signifikante Abnahme der DNA-Schäden verglichen mit der Scheinexposition. Diese Beobachtung ließ sich in weiteren Replikaten jedoch nicht reproduzieren und wurde daher als nicht biologisch relevant eingestuft.

Insgesamt konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch Mobilfunkstrahlung mit Frequenzen der verbreiteten Modulationen GSM, UMTS und LTE sowie SAR-Werten, die unterhalb und oberhalb des empfohlenen Sicherheitsstandards liegen und typischerweise bei Handytelefonaten auftreten, keine Effekte in Zellen des blutbildenden Systems unter den gegebenen Versuchsbedingungen induziert wurden. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Weiterhin wurden zum ersten Mal humane hämatopoetische Stammzellen für derartige Untersuchungen eingesetzt. Dies hat insofern eine besondere Bedeutung, als hämatopoetische Stammzellen aufgrund ihrer multipotenten Eigenschaften eine breitere Analyse mit Hinblick auf die Kanzerogenese und auf das Immunsystem ermöglichen.

Um über die Mobilfunk-Untersuchungen hinaus die hämatopoetischen Stammzellen besser charakterisieren zu können, sowie die Sensitivität von Blutzellen mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus zu analysieren, wurden sie anderen Zellen des blutbildenden Systems (undifferenzierte und differenzierte HL-60-Zellen und TK6-Zellen) gegenübergestellt. Eine Behandlung der verschiedenen Zelltypen mit mutagenen Substanzen zeigte, dass sich die hämatopoetischen Stammzellen in den meisten der untersuchten Endpunkte von den Zelllinien unterscheiden. Deutliche Abweichungen zeigten sich beim oxidativen Stress, der DNA-Reparatur und der Histonacetylierung; kein Unterschied konnte dagegen bei den DNA-Schäden beobachtet werden. Eine erste Interpretation der erhaltenen Ergebnisse ist auf der Grundlage der unterschiedlichen Eigenschaften von Zellen mit abweichendem Differenzierungsstatus möglich. Um jedoch eine eindeutige Aussage treffen zu können, müssten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

SUMMARY

Electromagnetic fields (EMF) are ubiquitous in the human environment. By using different frequencies, they form a basis for numerous technologies and are present in multiple applications of our everyday life. One very important application of EMF is mobile communication, where the frequencies vary depending on the modulation standard. The most common standards are the second (2G) and the third (3G) generation standard GSM and UMTS, respectively. The latest modulation type is the fourth generation standard (4G) LTE.

Statistical data reveal that there are currently more than seven billion mobile phone subscriptions. With the widespread use of these technologies, many people, including an increasing number of children, are continuously exposed to EMF. Given its close proximity to the human body, the mobile phone is the main source of EMF exposure. A huge number of *in vitro*, *in vivo* and epidemiological studies have been performed in the past to investigate potential, non-thermal effects of mobile phone radiation on biological systems. However, no complete consensus has been reached, leading to ongoing concerns about the harmful potential of this type of non-ionizing radiation. Furthermore, two major concerns regarding long-term effects and children-specific effects were not thoroughly addressed so far. Children might react in a more sensitive way towards environmental influences and partially absorb more radiofrequency radiation than adults. This particularly applies to head regions where the active bone marrow, which is responsible for hematopoiesis, is located.

The aim of the present study was to investigate effects of radiofrequency fields emitted by mobile phones on cells of the human hematopoietic system. The focus was on human hematopoietic stem cells which were exposed to modulated GSM (900 MHz), UMTS (1,950 MHz) and LTE (2,535 MHz) radiofrequency fields with SAR values ranging from 0 to 4 W/kg for short (4 h) and long (20 h) time periods. Comparative investigations were performed with cells of the promyelocytic cell line HL-60. Studied endpoints included apoptosis, oxidative stress, cell cycle, DNA damage and DNA repair, differentiation and epigenetics in terms of histone acetylation. In all but one of these end points, no clear effect of mobile phone radiation could be detected, neither in hematopoietic stem cells nor in HL-60 cells. The only alteration was observed when quantifying DNA damage. Compared to the sham exposure, a small but statistically significant decrease in DNA damage was found after exposure of hematopoietic stem cells to the GSM modulation for short time period. This observation could not be

reproduced in subsequent replicate experiments, and was thus considered not biologically relevant.

Overall, these investigations demonstrate that mobile phone radiation at frequencies used in the major technologies GSM, UMTS and LTE and with SAR values below and above the recommended safety limits did not induce effects in cells of the human hematopoietic system under the prevailing conditions. A particular focus was on the reproducibility of the results. Furthermore, for the first time human hematopoietic stem cells were subject for such investigations. This is of particular importance, since hematopoietic stem cells enable a broader analysis with respect to cancerogenesis and the immune system based on their multipotent characteristics.

Moreover, in order to better characterize the hematopoietic stem cells as well as analyze the sensitivity of hematopoietic cells differing in their differentiation status, hematopoietic stem cells were compared to other cells of the hematopoietic system (i.e. undifferentiated and differentiated HL-60 cells and TK6 cells). Upon treatment with mutagenic substances, a clear distinction was observed between the stem cells and the other cell types for the majority of the investigated endpoints. Significant differences were revealed for oxidative stress, DNA repair and histone acetylation, whereas no difference was observed for DNA damage. A first interpretation of the results obtained can be made on the basis of the different characteristics of cells with a different differentiation status. However, in order to make a distinct statement, additional investigations need to be performed.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
3GPP	3rd Generation Partnership Project
AGM	Aorta-Gonad-Mesonephros
APH	Aphidicolin
CLP	Lymphatische Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor)
CMP	Myeloide Vorläuferzellen (common myeloid progenitor)
CR	Komplement-Rezeptor (complement receptor)
CST	Computer Simulation Technology
d	Tag(e)
DCF	Dichlorofluorescein
DCFH	Dichlorodihydrofluorescein
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
DDR	DNA-Schadensantwort (DNA damage response)
DE	Deutschland
dHL60	Differenzierte HL-60-Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zellen
ELF	Niederfrequent (extremely low-frequency)
EMF	Elektromagnetische Felder
ESZ	Embryonale Stammzellen
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FDA	Fluorescein-Diacetat
Flt3-Ligand	Fms-ähnlicher Tyrosinkinase-3-Ligand (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand)
GMP	Vorläuferzellen für Granulozyten/Makrophagen (granulocyte-macrophage progenitor)
GSM	Global System for Mobile Communications
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAC	Histonacetylierung
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämogenes Endothel (hemogenic endothelium)
HL-60	Permanente humane Leukämiezelle
HPZ	Hämatopoetische Progenitorzellen
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen

Abkürzung	Bedeutung
HU	Hydroxyharnstoff
Hz	Hertz
ICNIRP	International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
IL-3	Interleukin-3
IL-6	Interleukin-6
IR	Infrarot
ITU	Internationale Fernmeldeunion (International Telecommunication Union)
LTE	Long Term Evolution
LT-HSZ	Unreife multipotente hämatopoetische Stammzellen (long-term hematopoietic stem cells)
MEP	Vorläuferzellen für Megakaryozyten/Erythrozyten (megakaryocyte-erythrocyte progenitor)
MMS	Methylmethansulfonat
MPP	Multipotente Vorläuferzellen (multipotent progenitor)
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
NaAsO ₂	Natriumarsenit
Na-But	Natriumbuytrat
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Non-homologous end joining
NK	Negativkontrolle
NOC	Nocodazol
NQO	4-Nitrochinolin-1-Oxid
NSZ	Neuronale Stammzellen
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PI	Propidiumiodid
PK	Positivkontrolle
PM	Leistungsmesser (power meter)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PS	Phosphatidylserin
RA	Retinsäure (retinoic acid)
REFLEX	Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards From Low Frequency Electromagnetic Field Exposure Using Sensitive <i>in vitro</i> Methods
RF	Radiofrequenz (radiofrequency)

Abkürzung	Bedeutung
RK	Richtkoppler
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAR	Spezifische Absorptionsrate (specific absorption rate)
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SD	Standardabweichung
THz	Terahertz
TK	Thymidin-Kinase
TK6	Humane lymphoblastoide Zelllinie
TPO	Thrombopoietin
TSA	Trichostatin A
UMTS	Universal Mobile Telecommunications System
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbares Licht (visible)
WLAN	Wireless Local Area Network
γ -H2AX	Phosphorylierte Form des Histons H2AX
ϵ	Dielektrizitätskonstante
μ TEM-Zelle	modifizierte Version der TEM-Zelle (transversal electromagnetic field)

1 EINLEITUNG

1.1 Elektromagnetische Felder

Elektromagnetische Felder (EMF) entstehen, wenn elektrische Felder mit magnetischen Feldern direkt gekoppelt sind. Dieses physikalische Phänomen resultiert in einer Welle, bei der die Energie durch senkrecht aufeinander stehende elektrische und magnetische Felder transportiert wird. Elektromagnetische Felder sind heutzutage allgegenwärtig. Sie bilden die Grundlage zahlreicher Technologien, die jeweils unterschiedliche Frequenzen verwenden.

1.1.1 Elektromagnetisches Spektrum und Vorkommen

Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung erstreckt sich über eine sehr große Bandbreite natürlich vorkommender und künstlich erzeugter elektromagnetischer Wellen und wird nach ihrer Frequenz (Einheit: Hertz (Hz)) oder Wellenlänge (Einheit: m), wobei die Wellenlänge umgekehrt proportional zur Frequenz ist, in verschiedene Teilbereiche eingeteilt. Abbildung 1 veranschaulicht das elektromagnetische Spektrum unter Angabe der Frequenz, der Wellenlänge und eines gängigen Anwendungsbeispiels in Form eines Symbols. Die Abgrenzungen zwischen den einzelnen Bereichen sind teilweise aus historischen Gründen entstanden und daher nicht scharf, sondern als Größenordnung aufzufassen.

Das elektromagnetische Spektrum lässt sich grob untergliedern in nichtionisierende Strahlung und ionisierende Strahlung. Im Gegensatz zu ionisierender Strahlung reicht die Energie der nichtionisierenden Strahlung nicht aus, um Atome und Moleküle zu ionisieren und so chemische Bindungen zu spalten. Der Bereich der nichtionisierenden Strahlung umfasst statische Felder, niederfrequente und hochfrequente Felder sowie die optische Strahlung. Die Frequenz von statischen elektrischen und magnetischen Feldern liegt bei 0 Hz. Als Beispiele können hier das Erdmagnetfeld und die Anwendung der Magnetresonanztomografie angeführt werden. Niederfrequente elektrische und magnetische Felder erstrecken sich von 0 Hz bis 100 kHz und begegnen uns im Alltag in elektrischen Anwendungen, die über das Stromnetz betrieben werden, wie beispielsweise die Bahn oder elektrische Geräte im Haushalt. Zwischen 100 kHz und 300 GHz befindet sich der Bereich der hochfrequenten elektromagnetischen Felder. Klassische und weit verbreitete Anwendungen sind der Mobil-

und Rundfunk, Fernsehen, schnurlose Telefone sowie WLAN (Wireless Local Area Network) und Bluetooth.

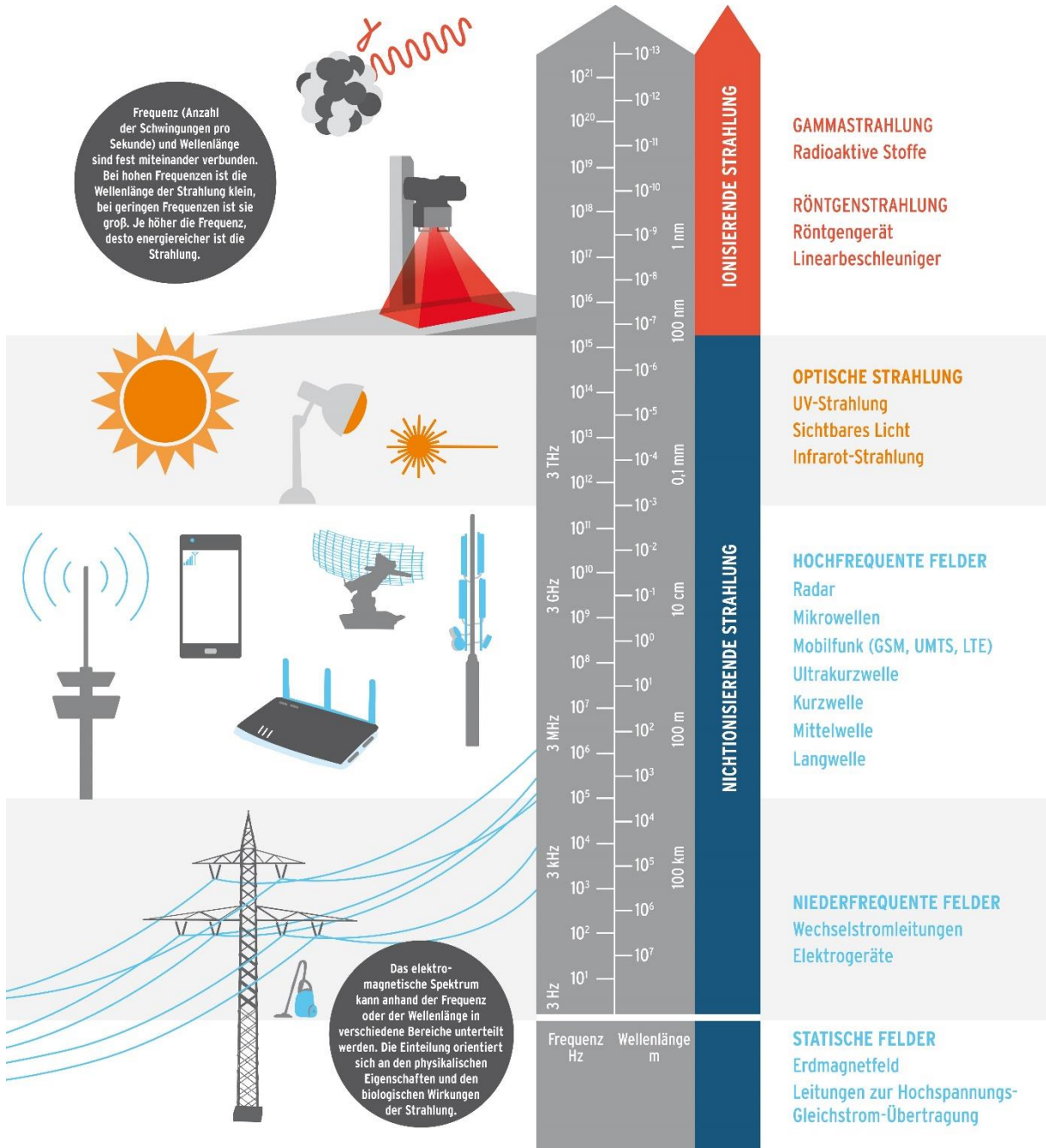


Abbildung 1: Elektromagnetisches Spektrum, unterteilt in verschiedene Teilbereiche der vorkommenden elektromagnetischen Wellen. Man unterscheidet zwischen der nichtionisierenden Strahlung, zu der statische (0 Hz), niederfrequente (0-100 kHz) und hochfrequente Felder (100 kHz-300 GHz) sowie die optische Strahlung (100 nm-1 mm) zählen. Der Teilbereich der ionisierenden Strahlung umfasst die Röntgen- und Gammastrahlung. Mit Genehmigung von: Bundesamt für Strahlenschutz [1].

Oberhalb von 300 GHz wird nicht mehr von Feldern, sondern von Strahlung gesprochen. Hier findet auch nicht mehr die Unterscheidung zwischen den beiden Komponenten, elektrische und magnetische Felder, statt. An die hochfrequenten elektromagnetischen Felder schließt sich der Teilbereich der optischen Strahlung mit Wellenlängen von 100 nm bis 1 mm an (Angabe der Einheit in Hz nicht üblich). Unterschieden wird hierbei zwischen der infraroten (IR) Strahlung mit 1 mm bis 780 nm, dem sichtbaren Licht (780 nm bis 400 nm) und der ultravioletten (UV) Strahlung mit 400 nm bis 100 nm. Alle drei Arten sind in der natürlich vorkommenden Sonnenstrahlung zu finden.

Bei noch geringeren Wellenlängen liegt die Röntgenstrahlung (1 nm bis 1 pm) und die Gammastrahlung (< 1 pm), die beide in den Bereich der ionisierenden Strahlung fallen.

1.1.2 Mobilfunkstrahlung

Eine sehr wichtige Anwendung von EMF ist die mobile Kommunikation. Die hierfür verwendeten Frequenzen variieren mit dem Mobilfunkstandard. Am meisten verbreitet ist die Modulation GSM (Global System for Mobile Communications), als Standard der zweiten Generation (2G) und mit Frequenzen zwischen 400 und 2.000 MHz, vorwiegend jedoch 900 MHz. Ebenfalls weit verbreitet ist der UMTS-Standard (Universal Mobile Telecommunications System), der zur dritten Generation (3G) gehört, und Frequenzen von 800 bis 2.200 MHz abdeckt, wobei 1.900 und 2.100 MHz gängig sind. Die neueste Modulation ist LTE (Long Term Evolution). Dabei handelt es sich um einen Standard der vierten Generation (4G) mit Frequenzen von 700 bis 2.600 MHz, meistens werden hier 1.800 und 2.500 MHz verwendet. Im Vergleich zu GSM und UMTS bietet LTE höhere Kapazitäten und Geschwindigkeiten. Die weltweit verwendeten Frequenzen und Modulationen sind nicht einheitlich, sondern unterscheiden sich abhängig von der Weltregion [2].

Seit der Einführung der ersten analogen Mobiltelefone in den 1980er Jahren ist die Anzahl der Personen, die ein Mobiltelefon besitzen, stark angestiegen. Aus Daten der Internationalen Fernmeldeunion (International Telecommunication Union, ITU) geht hervor, dass derzeit weltweit mehr als sieben Milliarden Mobilfunk-Endgeräte existieren. Abbildung 2 zeigt die Zunahme an Mobiltelefonen weltweit in den vergangenen 16 Jahren.

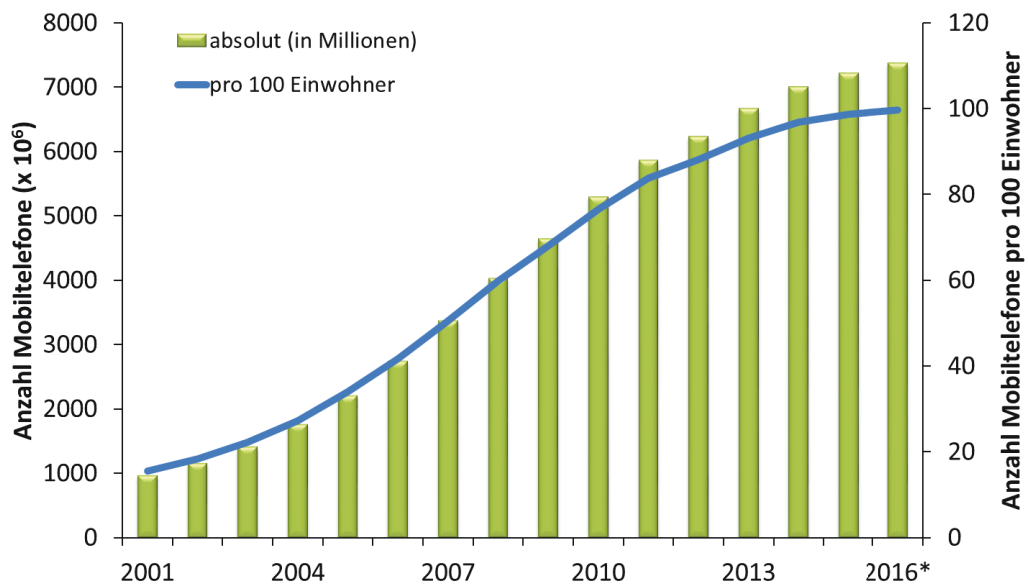


Abbildung 2: Anstieg global existierender Mobiltelefone in den Jahren 2001 bis 2016, dargestellt als absolute Anzahl und als Anzahl pro 100 Einwohner (* = geschätzter Wert). Verändert nach [3].

Global betrachtet bedeutet dies, dass jeder Einwohner durchschnittlich ein Gerät besitzt [3]. Ein starker Anstieg dieser Zahlen ist weiterhin zu verzeichnen, vor allem in den Entwicklungsländern der Erde. In Abbildung 3 ist die geschätzte Anzahl der Endgeräte in unterschiedlichen Weltregionen für das Jahr 2016 gegenübergestellt.

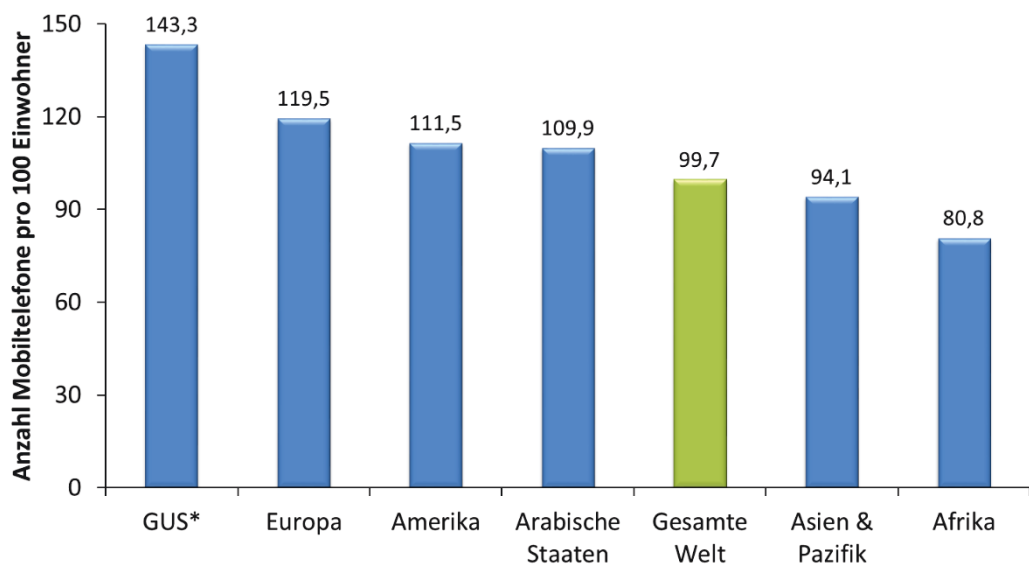


Abbildung 3: Geschätzte Anzahl der Mobiltelefone pro 100 Einwohner im Jahr 2016, aufgeschlüsselt nach unterschiedlichen Weltregionen (* = Gemeinschaft Unabhängiger Staaten). Verändert nach [3].

Während industrialisierte Länder weiterhin die höchste Anzahl an Mobiltelefonen pro 100 Einwohner aufweisen, war der prozentuale Anstieg der vergangenen Jahre in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen deutlich höher. Noch im Jahr 2000 galt die Anzahl der Endgeräte in Entwicklungsländern als vernachlässigbar. Weniger als 10 Jahre später betrug der Anteil im Vergleich zu Ländern mit hohem Einkommen jedoch bereits 25 %. In Ländern mit mittlerem Einkommen war sogar ein Anstieg von 50 % zu verzeichnen [2]. Neben der quantitativen Zunahme der Geräte, hat sich auch die Technologie dieser stark gewandelt. Während die ersten Mobiltelefone die analoge Technologie mit Frequenzen von 450 MHz bis 900 MHz nutzten, so sind dies heute fast ausschließlich digitale Geräte, meist in Form von sogenannten Smartphones, mit Frequenzen von bis zu 2.200 MHz und Funktionen, die weit über das Telefonieren hinaus reichen.

Mit Zunahme der Anzahl an Mobiltelefonen und der damit verbundenen vermehrten Nutzung, stieg auch die Nutzung durch Kinder und Jugendliche in den vergangenen Jahren. Eine durch das Bundesamt für Strahlenschutz im Jahr 2013 durchgeführte Befragung in der deutschen Bevölkerung [4] führte zu dem Ergebnis, dass 71 % der Kinder im Alter zwischen 6 und 13 Jahren ein Handy besitzen und es vorwiegend zum Spielen, SMS-Schreiben und Musik-Hören verwenden. Bei Jugendlichen zwischen 14 und 17 Jahren sind es sogar 86 %. Dabei besitzt ein Großteil (88 %) ein Smartphone und verwendet es daher häufiger für Funktionen, die nur über das Internet möglich sind (z. B. WhatsApp oder Surfen). Deutliche Parallelen sind auch im internationalen Vergleich zu finden [5, 6].

Die weitverbreitete Verwendung dieser Technologien verdeutlicht, dass viele Menschen regelmäßig einer Exposition mit EMF ausgesetzt sind. Die größte Expositionsquelle stellt das Mobiltelefon dar, da sich in diesem Szenario die Quelle sehr nah am menschlichen Körper befindet. Weitere Expositionsquellen sind Mobilfunkbasisstationen, die für eine niedrige, dafür aber kontinuierliche Exposition verantwortlich sind. Daher ist es wichtig, die Risiken zu charakterisieren, die mit EMF assoziiert sind.

1.2 Das blutbildende System

Unter dem Begriff der Hämatopoese versteht man den streng regulierten Prozess zur Bildung von Blutzellen. Reife Blutzellen, wie beispielsweise Erythrozyten oder Leukozyten, werden dabei permanent von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) über spezialisierte Vorläuferzellen neu gebildet. Durch diesen Prozess wird eine konstante Anzahl an Blutzellen im Körper aufrechterhalten, wobei pro Tag auf diese Weise insgesamt ungefähr 10^{12} neue Blutzellen entstehen [7]. Somit hat das blutbildende System im Vergleich zu anderen Organen eines der stärksten Regenerationspotentiale.

1.2.1 Ontogenese – embryonale vs. adulte Hämatopoese

Während der Embryonalentwicklung findet die Hämatopoese nicht nur an voneinander räumlich getrennten Orten, sondern auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Man unterscheidet zwischen der extraembryonalen und der intraembryonalen Hämatopoese. Diese beiden Wege sind in Abbildung 4 schematisch gegenübergestellt, wobei die extraembryonale Blutbildung im oberen Abschnitt (a) und die intraembryonale Blutbildung im unteren Bildabschnitt (b) zu sehen sind.

Die frühesten Blut- und Endothelzellen entstehen außerhalb des Embryos, nämlich im Dottersack (extraembryonal, Abbildung 4 a). Dieser setzt sich jeweils aus einer Zellschicht mesodermalen und endodermalen Ursprungs zusammen und bildet dadurch eine zweischichtige Struktur [8]. Aus der endodermalen Schicht entwickelt sich ein Epithel, das in der späteren Entwicklung als Leber und Darm fungiert. Dagegen entstehen aus der mesodermalen Zellschicht die ersten Blutzellen, die als große, kernhaltige primitive Erythrozyten [9] sowie als primitive Megakaryozyten und Makrophagen [10, 11] erscheinen. Bis heute ist unklar, ob diese kurzlebigen, embryonalen primitiven hämatopoetischen Zellen zur fetalen und adulten Hämatopoese beitragen [12-14]. Denn im Gegensatz zur adulten Hämatopoese, die mit der Differenzierung der HSZ beginnt, entwickeln sich primitive hämatopoetische Zellen mutmaßlich aus einer gemeinsamen bi-potenten Vorläuferzelle, dem sogenannten Hämangioblast, die auch für die Entstehung von Angioblasten und somit zur Ausbildung primitiver Vaskularisierung verantwortlich ist [15, 16].

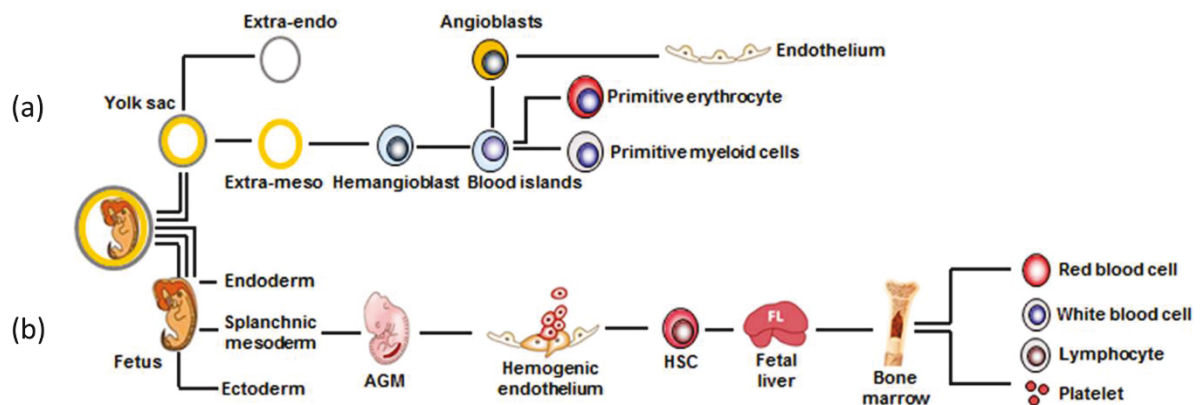


Abbildung 4: Schematische Darstellung der humanen embryonalen Hämatopoese. (a) Während der extraembryonalen Hämatopoese entstehen aus dem Mesoderm primitive Erythrozyten und myeloide Zellen. (b) Die intraembryonale Hämatopoese ist für die Entwicklung der multipotenten definitiven HSZ verantwortlich, aus denen sich nachfolgend alle reifen Blutzellen bilden können. Mit Genehmigung von: *John Wiley and Sons*, publiziert in Chen *et al.* [17].

Eine wesentlich wichtigere Rolle wird der intraembryonalen Hämatopoese zugeschrieben (Abbildung 4 b). Nach derzeitigem Wissensstand entstehen die ersten definitiven HSZ aus dem Endothel der AGM-Region (aorta-gonad-mesonephros region) [18-20], die sich während der Embryonalentwicklung aus einer mesodermalen Struktur namens Splanchnopleura bildet. Im weiteren Verlauf differenzieren sich spezialisierte Endothelzellen aus der dorsalen Aorta der AGM-Region (dem *hemogenic endothelium* (HE)) zu multipotenten definitiven HSZ [19, 21-26]. Dieser Prozess wird als „endothelial-to-hematopoietic transition“ definiert und findet nur in einem kurzen Zeitfenster während der Embryonalentwicklung statt [18, 27-29]. Anderes Endothel-Gewebe wird ebenfalls als Ursprung für HSZ beschrieben: Plazenta [30], Blutgefäße [31] und embryonales Herzendokard [32]. Aus HE-Zellen entstandene HSZ wandern in die fetale Leber und sind dort so lange für die Hämatopoese zuständig, bis diese wichtige Aufgabe final auf das Knochenmark übertragen wird, welches von da an lebenslang die adulte Hämatopoese übernimmt [12, 14, 33].

Viele der Erkenntnisse auf diesem Forschungsgebiet wurden anhand von *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen in anderen Spezies, wie Nagetieren, gewonnen. Vergleichbare Studien mit humanen Embryonen sind ebenfalls in der Literatur zu finden, jedoch fällt ihre Anzahl deutlich geringer aus. Nichtsdestotrotz zeigten die Untersuchungen am humanen System vergleichbare Ergebnisse zu anderen Vertebraten, sodass eine Übertragbarkeit auf die humane Hämatopoese durchaus gegeben ist [19].

1.2.2 Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen bilden den Ursprung aller Zellen des blutbildenden Systems. Entsprechend der Definition für alle Stammzellen, sind auch HSZ charakterisiert durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung zu spezialisierten Vorläuferzellen und damit zur Bildung aller hämatopoetischen Reihen des Blutes [34-36]. Der Prozess der Selbsterneuerung dient der Erhaltung des Stammzellpools und damit der Langzeit-Homöostase sowie der Regeneration von Geweben über die gesamte Lebensdauer [37]. Grundsätzlich werden zwei unterschiedliche Mechanismen bei der Selbsterneuerung unterschieden: die symmetrische und die asymmetrische Zellteilung [38]. Diese sind in Abbildung 5 gegenübergestellt.

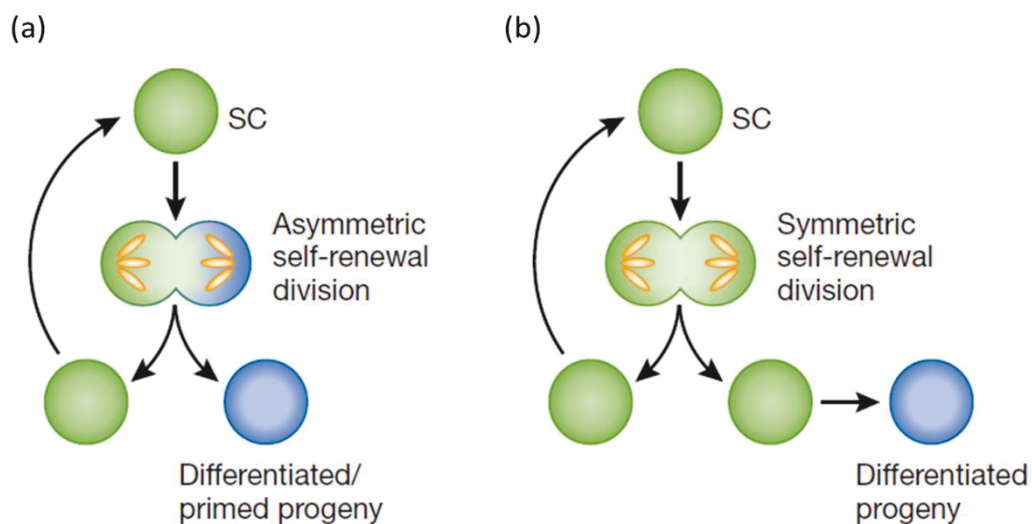


Abbildung 5: Mechanismen der Differenzierung und Selbsterneuerung. Bei dem Prozess der Selbsterneuerung wird zwischen (a) der asymmetrischen Teilung mit Bildung einer differenzierten und einer identischen Zelle und (b) der symmetrischen Teilung unterschieden, bei der zwei identische Tochterzellen entstehen. Mit Genehmigung von: *John Wiley and Sons*, publiziert in Fuchs & Chen [37].

Bei der asymmetrischen Selbsterneuerung entsteht eine identische, undifferenzierte Tochterzelle sowie eine Tochterzelle, die im weiteren Verlauf ein Programm der Differenzierung durchläuft (Abbildung 5 a). Dieser Prozess dient der Aufrechterhaltung einer bestimmten Anzahl an Stammzellen unter physiologischen Bedingungen. Bei der symmetrischen Selbsterneuerung werden durch Zellteilung zwei Tochterzellen gebildet, die sowohl in ihrer genetischen Information, einschließlich der epigenetischen Modifikationen,

als auch in ihrer Funktionalität vollkommen identisch zur Ursprungszelle sind (Abbildung 5 b). Im Gegensatz zur asymmetrischen Zellteilung entscheidet sich bei diesem Szenario das Schicksal der Zelle (wie z. B. Differenzierung) erst nach Abschluss der Zellteilung. Dadurch wird es zum einen ermöglicht, den Stammzellpool in bestimmten Situationen zu expandieren. Andererseits können durch Differenzierung zwei multipotente Vorläuferzellen gebildet werden, aus denen alle reifen Zellen der lymphatischen und myeloiden Reihe entstehen können. Beispiele hierfür sind Verletzungen von Geweben oder krankhafte Veränderungen, die einen Verlust von differenzierten Zellen zur Folge haben. Durch die in Abbildung 5 vorgestellten Mechanismen wird das Potential zur Selbsterneuerung sowie die gesamte Bandbreite des Differenzierungspotentials erhalten.

In Abbildung 6 ist der komplexe hierarchische Aufbau des hämatopoetischen Systems veranschaulicht. Die oberste Hierarchie-Ebene bilden die unreifen multipotenten Stammzellen (LT-HSZ, ST-HSZ), die durch ein extensives Selbsterneuerungspotential charakterisiert sind. Durch asymmetrische Teilung der HSZ werden die hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPZ) gebildet, die sich nur noch begrenzt selbst erneuern können, jedoch ein hohes Potential zur Proliferation besitzen. An oberster Position dieser Hierarchie-Ebene befinden sich die multipotenten Vorläuferzellen (MPP - multipotent progenitor), die sich zu myeloiden Vorläuferzellen (CMP - common myeloid progenitor) oder lymphatischen Vorläuferzellen (CLP - common lymphoid progenitor) entwickeln. Aus diesen myeloiden und lymphatischen Vorläuferzellen entstehen über weitere Differenzierungsschritte letztendlich die final ausgereiften hämatopoetischen Zellen, die, bis auf wenige Ausnahmen, kein Selbsterneuerungspotential mehr aufweisen und nur begrenzt proliferieren können.

Auch die Lokalisation der in den unterschiedlichen Hierarchie-Ebenen angesiedelten Zellen unterscheidet sich. Während die Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark vorzufinden sind, sind die ausgereiften hämatopoetischen Zellen vorwiegend im Blut und Gewebe angesiedelt.

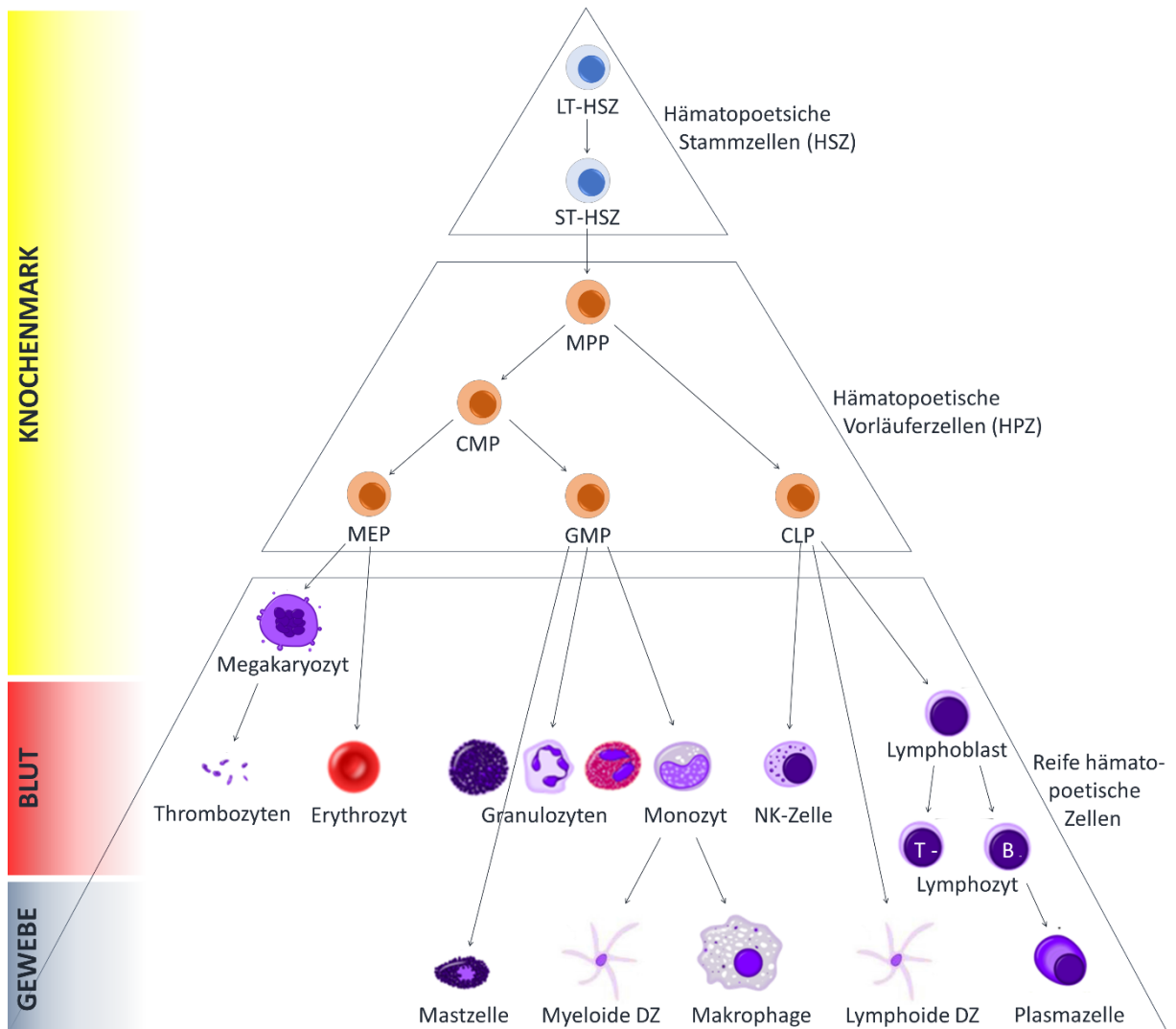


Abbildung 6: Hierarchie des blutbildenden Systems. Als Vorläufer aller Blutzellen stehen die HSZ (LT- und ST-HSZ) an oberster Stelle der Hierarchie-Ebene. Durch asymmetrische Teilung der HSZ entstehen multipotente Vorläuferzellen (MPP), die durch schrittweise Differenzierung über weitere Vorläuferzellen (CMP – common myeloid progenitor; CLP – common lymphoid progenitor; MEP - megakaryocyte–erythroid progenitor; GMP - granulocyte-macrophage progenitor) letztendlich die ausgereiften Blutzellen generieren. NK: natural killer; DZ: dendritische Zelle. Verändert nach [39, 40].

Die myeloide Linie (CMP) schließt Zellen der humoralen Immunantwort (Granulozyten, Monozyten, Mastzellen, dendritische Zellen (DZ)), die sich aus der gemeinsamen Vorläuferzelle GMP (granulocyte-macrophage progenitor) entwickeln, sowie Erythrozyten und Megakaryozyten ein. Erythrozyten und Megakaryozyten/Thrombozyten entstehen durch Differenzierung der gemeinsamen Vorläuferzelle MEP (megakaryocyte–erythroid progenitor). Dagegen zählen zu der lymphatischen Linie (CLP) alle Zellen der adaptiven Immunantwort (B- und T-Lymphozyten) und die NK-Zellen (Natural Killer). Manche dieser reifen Blutzellen

können noch weiter differenzieren. Makrophagen entwickeln sich beispielsweise aus Monozyten, die in das Gewebe penetrieren und dort eine phagozytäre Funktion übernehmen. Je nach Lokalisation werden sie dann unterschiedlich benannt, in der Leber handelt es sich beispielsweise um Kupffer-Zellen und in der Lunge um Alveolarzellen. Ein weiteres Beispiel sind die Plasmazellen, die eine hoch spezialisierte Form der B-Zellen darstellen.

Die Entwicklung aller Zellreihen des blutbildenden Systems erfolgt im roten Knochenmark spongioser Knochen. Erst wenn die entsprechenden Blutzellen vollständig ausgereift sind, verlassen sie das Knochenmark und zirkulieren im Blut, wo sie spezifische Aufgaben übernehmen können.

Die Mehrheit der HSZ ist im adulten Knochenmark in den sogenannten Stammzellnischen lokalisiert. Sie residieren dort unter homöostatischen Bedingungen vorwiegend als unreife LT-HSZ in einem Ruhezustand, der als Quieszenz bezeichnet und mit der G₀-Phase des Zellzyklus assoziiert wird [41, 42]. Basierend auf Studien in terminal ausdifferenzierten Zellen (z. B. Bestimmung der Telomerlänge oder der X-Chromosom-Inaktivierung), wird vermutet, dass sich ruhende HSZ alle 175-350 Tage teilen [7]. Der Status der Quieszenz kann die Zellen beispielsweise vor genotoxischen Schäden schützen, die zu bösartigen Veränderungen und zur Ausbildung von Krebszellen führen könnten. Die Deregulierung der Stammzellnische soll bei der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, die mit Gewebedegeneration, Alterung und Tumorentstehung assoziiert werden, eine Schlüsselfunktion haben [43, 44]. Entsprechend den Bedürfnissen oder der Situation können die HSZ zur Proliferation und/oder Differenzierung aktiviert werden. Das Schicksal und die weitere Entwicklung der HSZ, und somit die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Quieszenz, Selbsterneuerung und Differenzierung, wird reguliert durch die dynamische, streng kontrollierte, lokale Mikroumgebung der Stammzellnischen [45, 46], die sich zellulär aus perivaskulären Stroma- und Endothelzellen, Osteoblasten, sympathischen Neuronen, Makrophagen und Adipozyten zusammensetzen. Letztere sollen die HSZ-Aufrechterhaltung jedoch negativ beeinflussen [47]. Anatomisch lässt sich die Stammzellnische in einen endostalen Bereich, lokalisiert in nächster Nähe zur Oberfläche des Knochens, und einen vaskulären Bereich im perivaskulären Raum einteilen. Ruhende LT-HSZ sind dabei vorwiegend in der endostalen Nische, verbunden über N-Cadherin mit Osteoblasten, und stärker differenzierte Zellen in der vaskulären Nische verteilt [48-50]. Bei der Regulierung dieser spezialisierten Umgebung spielen neben der zellulären Zusammensetzung auch lösliche Faktoren, Zell-Zell-Kontakte und Kontakte mit der

extrazellulären Matrix, sowie intrinsische und extrinsische Mechanismen eine maßgebliche Rolle. Eine der wichtigsten Funktionen in der endostalen Nische nehmen die Osteoblasten ein. Sie regulieren die Zellzahl des Stammzellpools [51, 52], wirken bei der Erhaltung der Stammzell-Quieszenz über Oberflächen-gebundene Signal-Moleküle (Angiopoietin-1, Thrombopoietin oder CXCL12) mit [53, 54] und beeinflussen den Prozess der Selbsterneuerung über die Notch-Aktivierung [55]. Auf der anderen Seite regulieren Stroma und neuronale Elemente der vaskulären Nische die Differenzierung der HSZ und letztendlich ihre Mobilisierung in den peripheren Blutkreislauf [55, 56]. Selbsterneuerung und Differenzierung werden dabei reguliert über Kontakt-abhängige Signale wie VCAM-1 [57] oder lösliche Faktoren wie SCF, die von perivaskulären Stroma- und Endothelzellen freigesetzt werden [58]. Es gibt zahlreiche weitere Faktoren, die für eine ordnungsgemäße HSZ-Regulierung in der Stammzellnische wichtig sind. Beispielhaft sei an dieser Stelle die hohe extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der endostalen Nische zu nennen, die die Lokalisation der ruhenden HSZ in diesem Bereich der Nische ermöglicht [59]. Außerdem sind ruhende HSZ im Knochenmark vorwiegend in Bereichen mit den niedrigsten Sauerstoff-Konzentrationen angesiedelt, um weniger ROS und somit oxidativem Stress ausgesetzt zu sein [60].

Die LT-HSZ machen nur maximal 0,005 % der Zellen im Knochenmark aus [46, 61]. MPP sowie CMP und CLP umfassen dagegen bereits 0,1 % aller Knochenmarkszellen [61]. In geringen Konzentrationen sind auch undifferenzierte HSZ im peripheren Blut (0,06 % aller kernhaltigen Zellen) und im Nabelschnurblut (1,1 % aller kernhaltigen Zellen) zu finden [61]. Die Population der im Knochenmark vorliegenden HSZ ist sehr heterogen, bestehend aus unreifen Stammzellen und unterschiedlich stark ausgereiften Vorläuferzellen [62, 63]. Der Phänotyp wird über die Expression bestimmter Oberflächenantigene sowie über das Fehlen anderer linienspezifischer Strukturen definiert. So kann bei der Mehrheit der humanen Zellen der Marker CD34 und Thy1 positiv nachgewiesen werden, wohingegen nur wenig oder keine Expression von CD38, HLA-DR, CD45RA und CD71 vorgefunden wird [7]. Eine eindeutige Definition für den Phänotyp der humanen HSZ gibt es bis heute allerdings nicht. Durch Differenzierung verändert sich der Phänotyp abhängig von der eingeschlagenen Richtung der Zellreihen. Manche Zellreihen sind durch das Vorhandensein bestimmter Oberflächenantigene gekennzeichnet, beispielsweise CD3 auf T-Zellen oder CD19 auf B-Zellen. Andere Zellreihen, wie Erythrozyten und Granulozyten, weisen sich durch eine bestimmte

Kombination aus Oberflächenmarkern und Zelleigenschaften aus. Durch den Prozess der Differenzierung verliert die HSZ die Fähigkeit zur Selbsterneuerung.

Unter allen humanen Stammzellarten zählen die hämatopoetischen Stammzellen zu denjenigen, die bis heute am intensivsten erforscht wurden und darüber hinaus auch Anwendung in der Klinik finden [64]. Dabei steht die Stammzelltransplantation an vorderster Stelle im Hinblick auf die Therapie von hämatologischen und nicht-hämatologischen Erkrankung, von Autoimmun-Erkrankungen und von Immundefekten. Das Verständnis über molekulare Mechanismen, die die Selbsterneuerung, die Proliferation, das Überleben, die Festlegung der Linie und die Differenzierung von HSZ steuern, ist dabei unabdingbar. Da HSZ weiterhin *in vivo* nur in einer sehr geringen Anzahl vorkommen, stellt die *ex-vivo*-Expansion dieser Zellen für eine breitere therapeutische Anwendung eine der größten Herausforderungen dar [65]. Die erfolgreiche Umsetzung der *ex-vivo*-Expansion wird vor allem dadurch erschwert, dass während der Expansion die multipotente Eigenschaft der Zellen erhalten und eine Differenzierung verhindert wird, zeitgleich jedoch die Selbsterneuerung gewährleistet sein soll. Bisherige Arbeiten zur *ex-vivo*-Expansion von HSZ verfolgten verschiedene Strategien; einige Beispiele sind im Folgenden gelistet.

- Supplementierung des Zellkulturmediums mit Kombinationen aus rekombinanten Zytokinen wie SCF (stem cell factor), TPO (Thrombopoietin), Flt3-Ligand (Fms-related tyrosin kinase 3 ligand), IL-6 (Interleukin-6), IL-3 (Interleukin-3) [66, 67]
- Notch-vermittelte Expansion [68]
- Expansion über die Aktivierung des Wnt-Signalwegs [69]
- Stimulation der Expansion über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie SALL4 oder NF- κ B/HOXB4 [70-73]
- Regulation der Expansion durch Behandlung mit Pleiotropin [74, 75]
- Co-Kultur mit Stromazellen zur Simulation der hämatopoetischen Stammzellnische [76, 77]

Die neusten Arbeiten auf diesem Forschungsgebiet beschäftigen sich mit sogenannten „small-molecule compounds“, die zu einer deutlichen Verbesserung der HSZ-Expansion *ex vivo* führen sollen. Dabei beeinflussen die Substanzen die Hämatopoese insofern als sie entweder das Selbsterneuerungspotential der Zellen steigern, die Differenzierung und Apoptose

inhibieren oder die zielgerichtete Migration der Stammzellen *in vivo* („Homing“) fördern. Eine umfassende Zusammenfassung der bislang identifizierten Moleküle sowie die jeweils zugrundeliegenden Wirkmechanismen können der Publikation von Zhang *et al.* entnommen werden [64].

Neben der Optimierung der *ex-vivo*-Expansion für z. B. Stammzelltransplantationen hat auch die Auswirkung von Strahlung auf HSZ, insbesondere ionisierende Strahlung, eine therapeutische Bedeutung und steht daher ebenfalls im Fokus der Forschung.

Ebenso wie die Chemotherapie, wird ionisierende Strahlung für die Behandlung von zahlreichen Erkrankungen eingesetzt, darunter Erkrankungen des blutbildenden Systems wie beispielsweise Leukämie, maligne Lymphome oder das Multiple Myelom. In den meisten Fällen führt diese Art der Behandlung zu einer Beschädigung des Knochenmarks mit z. T. schwerwiegenden Auswirkungen auf die Bildung, Reifung und die Lebensdauer der betroffenen HSZ. Ein Vergleich mit anderen Geweben und Organen zeigt, dass das hämatopoetische System sehr sensitiv auf ionisierende Strahlung reagiert [78]. Der Schweregrad der Schädigung ist dabei abhängig von der Strahlendosis, beginnend ab einer Dosis von 1 Gy. Während moderate Dosen (< 3,5 Gy) zunächst schnell proliferierende Zellen wie Vorläuferzellen betreffen [79, 80], führen höhere Dosen (> 3,5 Gy) zu schweren Schädigungen in den HSZ und beeinflussen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung negativ, indem sie unterschiedliche Mechanismen aktivieren. Hierzu gehört vor allem die Induktion der Apoptose in HSZ über den intrinsischen Apoptose-Signalweg als Antwort auf DNA-Schäden (p53-PUMA-Signalweg). Außerdem soll ionisierende Strahlung bevorzugt die Differenzierung der HSZ zu Vorläuferzellen der lymphatischen Reihe (CLPs) durch Aktivierung des G-CSF/STAT/BATF-abhängigen Checkpoints fördern, was sich in einer Reduktion derjenigen HSZ äußert, die für die Ausreifung in Richtung der lymphatischen Reihe vorherbestimmt sind, und dadurch zu einer Gleichgewichtsverschiebung im HSZ-Pool führt. Weitere Mechanismen, wie die Induktion der HSZ-Seneszenz über den ROS-p38-Signalweg und die Schädigung der Stammzellnische über die Induktion von Seneszenz und Apoptose in Stromazellen, sinusoidalen Endothelzellen und Osteoblasten, werden ebenfalls beschrieben. Einen Überblick über die neusten Erkenntnisse zum schädigenden Potential von ionisierender Strahlung in HSZ durch Aktivierung der vier beschriebenen Mechanismen bietet die Veröffentlichung von Shao *et al.* [81].

1.3 Wirkung von Mobilfunkstrahlung

1.3.1 Epidemiologische Untersuchungen

Durch die weltweite Verbreitung des Mobilfunks sind neben *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen auch Ergebnisse aus epidemiologischen Studien von großer Bedeutung für die Einschätzung einer potentiellen Gefährdung durch Mobilfunkstrahlung. Aussagen oder Schlussfolgerungen aus solchen Untersuchungen sind jedoch zum einen dadurch limitiert, dass bis vor wenigen Jahren nur einzelne Langzeit-Anwender (bei Verwendung von mehr als 10 Jahren) in die Studien aufgenommen werden konnten, wodurch eine Aussage zu Langzeiteffekten von Mobilfunkstrahlung nur begrenzt möglich ist. Weiterhin ist eine Expositionsabschätzung durch dynamische Veränderungen in der Technologie, den Endgeräten, den exponierten Körperregionen und in der Art der Anwendung deutlich komplexer geworden. Hinzu kommt, dass ein Langzeit-Anwender im Laufe der Zeit häufig mehr als ein Geräte-Modell sowie unterschiedliche Systeme (analog und digital) verwendet. Eine Kombination von unterschiedlichen Geräten mit jeweils verschiedenen Ausgangsleistungen, Frequenzen und SAR-Werten gestaltet sich daher oftmals schwierig für eine exakte, detailgetreue Expositionsmessung.

Zahlreiche der bisher durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen legten ihren Fokus auf den Zusammenhang von Mobilfunkstrahlung und neoplastischen Erkrankungen, wobei insbesondere die Hirntumor-Arten Glioblastom und Meningeom näher betrachtet wurden. Drei unterschiedliche Studienarten, darunter Fall-Kontroll-Studien [82-86], Kohorten-Studien [87-89] und die Analyse von zeitlichen Trends zur Inzidenz von Hirntumoren [90-92], wurden dabei zugrunde gelegt.

Neben den neoplastischen Erkrankungen beleuchteten einige der genannten Studien auch das potentiell erhöhte Risiko des Akustikusneurinoms [82, 87]. Des Weiteren waren auch andere Tumore der Kopf- und Nackenregion [93] sowie Krebserkrankungen der Haut [83, 94] Gegenstand von epidemiologischen Untersuchungen.

Über die aufgeführten Studien konnte kein Zusammenhang zwischen RF-EMF und einem erhöhten Risiko von Hirntumoren, Krebsarten, die den Kopf und die Nackenregion betreffen, sowie anderen malignen Erkrankungen, einschließlich Krebserkrankungen bei Kindern [95], festgestellt werden.

Andere epidemiologische Untersuchungen mit Bezug zu neurologischen Erkrankungen, wie z. B. Multiple Sklerose, wiesen ebenfalls kein erhöhtes Risiko durch RF-EMF auf [96].

1.3.2 Wirkung auf biologische Systeme

Die Frage, welche Effekte auf biologische Systeme durch EMF induziert werden können, ist ebenso alt wie die Technologie selbst. In diesem Kontext muss zwischen ionisierender und nichtionisierender Strahlung unterschieden werden. Während für ionisierende Strahlung die Wechselwirkungen sowie die toxikologisch relevanten Konsequenzen sehr gut untersucht und verstanden sind, gilt dies nicht für die nichtionisierende Strahlung, die bei der Mobilfunk-Telekommunikation Verwendung findet. Mögliche biologische Effekte wurden bereits für das gesamte Frequenz-Spektrum der nichtionisierenden Strahlung untersucht. Sie reichen von niederfrequenter Strahlung (extremely low-frequency, ELF) über die Hochfrequenz-Strahlung (radiofrequency, RF) bis hin zur Terahertz-Strahlung (THz) [97-102]. So konnte gezeigt werden, dass nichtionisierende Strahlung im hochfrequenten Bereich eine Erwärmung des biologischen Systems bewirkt. Diese Interaktion ist seit langem bekannt und aus diesem Grund auch gut erforscht [103, 104]. Gegenwärtige Sicherheitsgrenzwerte beziehen sich daher auf diese Tatsache und beschränken die Strahlungsintensität insofern, dass es zu keiner relevanten Erwärmung kommt, die mit schädlichen Auswirkungen einhergehen könnte [105, 106]. Das Auftreten von sogenannten nicht-thermischen Effekten, die unterhalb der für eine Erwärmung verantwortlichen Intensitäten auftreten, wurde zwar postuliert, konnte bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden [103, 104].

Zahlreiche Studien wurden bereits zur Untersuchung möglicher Effekte, ausgelöst durch hochfrequente EMF, durchgeführt. Diese befassten sich mit verschiedenen Endpunkten wie der Enzymaktivität [107, 108], Zellproliferation [109, 110], der Induktion von DNA-Schäden [99, 111], Entstehung von Krebs [112, 113] und vielen weiteren biologischen Parametern. Obwohl es keine vollständige Übereinstimmung innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft gibt, ist die allgemeine Auffassung, dass eine Exposition mit RF-EMF unterhalb der Sicherheitsgrenzwerte nicht zu negativen Auswirkungen führt.

Zwei wichtige, noch ungeklärte Fragestellungen wurden bisher nicht ausreichend adressiert. Erstens: Gibt es Langzeit-Effekte, die sich beim Menschen erst nach langen, Symptom-freien Latenzzeiten äußern und möglicherweise aufgrund von Speziesunterschieden nicht vollständig durch Tierstudien abgedeckt werden können? Theoretisch wäre solch ein Szenario

für maligne Erkrankungen vorstellbar [114, 115]. Zweitens: Gibt es Effekte, die speziell bei Kindern eine besondere Rolle spielen [116-119]? Eine wichtige Erkenntnis wurde in diesem Zusammenhang von Christ *et al.* gewonnen. Im Rahmen dieser Studie beobachteten die Wissenschaftler, dass manche Kopfreionen bei Kindern mehr RF-EMF absorbieren als dies beim Erwachsenen der Fall ist [120]. In diesen Regionen befinden sich unter anderem Kortex, Hippocampus und Hypothalamus. Der Bereich, der jedoch die stärkste Absorption ausweist, ist das sich im Schädel befindende Knochenmark. Es übernimmt eine sehr wichtige Funktion - die Hämatopoese. Dies wirft wiederum die Frage auf, ob RF-EMF eine Auswirkung auf das humane hämatopoetische System hat.

1.3.3 Wirkung auf das blutbildende System

Zur Untersuchung von möglichen Veränderungen im hämatopoetischen System, hervorgerufen durch RF-EMF, sind in der Literatur zahlreiche Tierstudien zu finden. Diese weisen teilweise widersprüchliche Ergebnisse auf. So wurden in Studien mit Ratten Effekte nach RF-Exposition beobachtet, die mit einer Abnahme in der Lymphoblasten-Anzahl bei Bestrahlung mit 2.450 MHz [121] sowie einer Zunahme an Mikrokernen in polychromatischen Erythrozyten bei Exposition mit 910 MHz einhergingen [122]. Andere Autoren dagegen beschreiben, dass eine Exposition mit RF-EMF keine oder zumindest keine konsistenten Auswirkungen auf die Anzahl, die Proliferationsrate und die Fähigkeit zur Differenzierung von Blut- oder Knochenmarkszellen hat, sowie Immunfunktionen nicht beeinträchtigt werden [123-126]. Eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Studien-Designs aus den dargestellten *in-vivo*-Untersuchungen liefert eine mögliche Begründung für die teilweise kontroversen Ergebnisse. Bedingt durch unterschiedliche Zielsetzungen der jeweiligen Studien, weisen die Versuchsparameter und Rahmenbedingungen, wie beispielsweise die untersuchte Spezies, die Wellenlänge und Intensität, die Dauer der Exposition sowie die technische Ausführung zur Erzeugung von EMF und deren Applikation am Tier, aber auch die analysierten Parameter, sehr große Unterschiede auf und lassen so keinen direkten Vergleich zwischen den Studien oder gar eine Übertragbarkeit auf andere Studien zu.

Weiterhin gestaltet sich die Extrapolation auf den menschlichen Organismus schwierig, da zwischen den unterschiedlichen Spezies eine Variabilität im hämatopoetischen System besteht. Humane hämatopoetische Zellen waren bisher häufig Gegenstand der Untersuchungen. Jedoch waren diese Studien meistens limitiert durch die Verwendung von

final ausdifferenzierten Zellen wie Lymphozyten [109, 127-130]. Derartige Ansätze werden dennoch weiter verfolgt, da diese Zelltypen einerseits leicht gewonnen und andererseits sehr einfach in Kultur gehalten und vermehrt werden können. Ein großer Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass mit diesen Zellen nur eine kleine Subpopulation aller hämatopoetischen Zellen untersucht werden kann. Eine alternative Methode für die Untersuchung von potentiellen Effekten von RF-EMF stellt daher die Verwendung von hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen dar. Diese Zellen besitzen im Gegensatz zu ausdifferenzierten Zellen die Fähigkeit, alle möglichen Zelltypen des Blutes zu generieren [131]. Aus diesem Grund sind Effekte in HSZ für die Betrachtung des blutbildenden Systems von besonderem Interesse. Gentoxische Effekte können zur Bildung von schwerwiegenden Erkrankungen, beispielsweise zu unterschiedlichen Arten des Blutkrebses, führen [132, 133]. Insbesondere für derartige Untersuchungen eignen sich Zellen wie HSZ, die sich in einem undifferenzierten oder nur wenig ausgereiften Stadium befinden, besser als final ausdifferenzierte Zellen wie Lymphozyten. Sie ermöglichen aufgrund ihrer multipotenten Eigenschaften eine breitere Analyse. Als Leukozyten-Vorläuferzellen, sind HSZ weiterhin ein nützliches biologisches System, um Effekte auf das Immunsystem *in vitro* zu betrachten.

In den vergangenen Jahren haben die Untersuchungen zu Effekten von EMF in Stammzellen stark zugenommen. Ein Großteil der veröffentlichten Ergebnisse wurde allerdings an Tiermodellen gewonnen; diese Untersuchungen richteten ihren Fokus vorwiegend auf neuronale Stammzellen (NSZ), embryonale Stammzellen (ESZ) und mesenchymale Stammzellen (MSZ) [134-138]. Außerdem liegt die Gewichtung der Studien deutlich auf der Analyse von Effekten, die durch ELF-EMF hervorgerufen werden. Nur vereinzelt sind Publikationen zu finden, die sich mit Effekten von RF-EMF im Stammzellmodell beschäftigten [136]. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der veröffentlichten Literatur zu Untersuchungen in humanen Stammzellmodellen, wobei auch hier die Studien zu Effekten von ELF-EMF überwiegen. In diesen niederfrequenten Bereichen der elektromagnetischen Strahlung werden nach Exposition vermehrt Differenzierungsprozesse beobachtet. So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass ELF-EMF bei 50 Hz eine neuronale Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nach mehrtägiger Exposition (ca. 8-12 Tage) induzieren [139-142]. Neben der Erforschung des Potentials zur neuronalen Differenzierung von MSZ, sind ELF-EMF allgemein auch bekannt als potentielle Stimuli für die Förderung der Osteogenese und Knorpelbildung. Dies konnte sowohl an MSZ aus dem

Knochenmark als auch an MSZ aus dem Fettgewebe nachgewiesen werden [143-146]. Auch bei den Studien mit Fokus auf humane Stammzellen finden sich nur wenige Untersuchungen, die sich mit RF-EMF befassen. Ein Beispiel hierfür ist die Publikation von Markova *et al.*, die sich mit Effekten von RF-EMF der Mobilfunkstandards GSM und UMTS auf die DNA-Reparatur in MSZ beschäftigten [147]. Sie konnten zeigen, dass die Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen (Lymphozyten und Fibroblasten) sensitiver auf die Strahlung reagierten und eine stärkere Inhibierung der DNA-Reparatur aufwiesen. Als Konsequenz könnte dies zur Bildung von chromosomalen Aberrationen führen und in der Entstehung von Krebs resultieren.

Bislang gibt es aber noch keine veröffentlichte Studie, die sich mit der Fragestellung zu möglichen Effekten von EMF in humanen HSZ beschäftigt.

2 ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von elektromagnetischen Feldern im Bereich der Radiofrequenzstrahlung auf das humane blutbildende System zu untersuchen. Diese Art der Strahlung findet sich im elektromagnetischen Spektrum bei Frequenzen zwischen 100 kHz und 300 GHz und weist nichtionisierende Eigenschaften auf. Weit verbreitete Anwendungen sind unter anderem der Mobil- und Rundfunk.

Die Exposition gegenüber elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks ist allgegenwärtig, nicht zuletzt aufgrund der weltweiten Verwendung von Mobilfunkgeräten. Da sich weiterhin die Technologie stetig verbessert und immer erschwinglicher wird, steigt die Anzahl der verwendeten Mobilfunkendgeräte weiter an. Um potentielle Effekte von Mobilfunkstrahlung auf das biologische System beurteilen zu können, wurden in der Vergangenheit zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen sowie epidemiologische Studien durchgeführt. Dennoch konnte kein Konsens auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse erzielt werden. Insbesondere zwei Fragestellungen wurden bisher noch nicht ausreichend adressiert, nämlich ob es Langzeitwirkungen im Menschen gibt und ob es Effekte gibt, die speziell bei Kindern eine besondere Rolle spielen. Kinder sind deutlich länger und zum Teil auch höher exponiert. Dies gilt vor allem für Kopfreionen, in denen sich das aktive Knochenmark befindet und dort für die Hämatopoese verantwortlich ist. Im Fokus der Untersuchungen standen daher die hämatopoetischen Stammzellen, die sich in der Hierarchie-Ebene des blutbildenden System ganz oben befinden und alle unterschiedlichen Zellen des Blutes bilden können.

Die Zellen wurden mit Frequenzen der Mobilfunkstandards GSM (900 MHz), UMTS (1.950 MHz) und LTE (2.535 MHz) jeweils über einen kurzen (4 h) und einen langen (20 h) Zeitraum und mit unterschiedlichen Intensitäten (0 W/kg, 0,5 W/kg, 1 W/kg, 2 W/kg und 4 W/kg) exponiert. Die gleichen Experimente erfolgten mit Zellen der Promyelozyten-Zelllinie HL-60, sodass anschließend die Ergebnisse verglichen werden konnten. Die analysierten Endpunkte umfassten Apoptose, oxidativer Stress, Zellzyklusanalyse, DNA-Schaden und – Reparatur sowie die Differenzierung und epigenetische Effekte in Form von Histonacetylierung.

Um über die Mobilfunk-Untersuchungen hinaus die HSZ auch besser charakterisieren zu können, wurden sie anderen Zellen des blutbildenden Systems (undifferenzierte und differenzierte HL-60-Zellen, TK6-Zellen) gegenübergestellt. Durch die Behandlung mit mutagenen Substanzen sollte somit die Sensitivität von Blutzellen mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus analysiert werden.

3 MATERIAL

3.1 Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur (Zellkulturflaschen, Well-Platten, Kryoröhrchen) sowie für die Aufarbeitung der Proben (Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) wurden soweit nicht anders angegeben von der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE) oder Sarstedt (Nümbrecht, DE) bezogen. Für die durchflusszytometrischen Messungen kamen ausschließlich Materialien der Firma BD (Heidelberg, DE) zum Einsatz (Probenröhrchen, FACSTFlow Sheath Fluid, FACSClean Solution, FACSRinse Solution). Objektträger zur Durchführung des Comet Assays wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, DE) bezogen. Eine gesonderte Kennzeichnung dieser Materialien wird in den nachfolgenden Kapiteln daher nicht vorgenommen. Die Verwendung von Verbrauchsmaterial anderer Hersteller wird an entsprechender Stelle in den folgenden Kapiteln hervorgehoben.

3.2 Chemikalien und Lösungen

Soweit im Text nicht anders gekennzeichnet, wurden Chemikalien und Lösungen von Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) oder Carl Roth (Karlsruhe, DE) bezogen.

3.3 Biologisches Material

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden ausschließlich humane Zellen des blutbildenden Systems verwendet. Dabei handelt es sich um Suspensionszellen, die unter anderem dadurch gekennzeichnet sind, dass sie frei schwimmend im Zellkulturmedium wachsen und unter herkömmlichen Bedingungen nicht an der Zellkulturoberfläche adhären.

Die Untersuchungen fanden sowohl an Zelllinien (HL-60, TK6) als auch an primären Zellen (hämatopoetische Stammzellen) statt. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

3.3.1 Zelllinien

3.3.1.1 HL-60-Zellen

HL-60-Zellen wurden ursprünglich aus peripheren Leukozyten einer 36-jährigen Patientin mit akuter promyelozytischer Leukämie isoliert und als permanente Zelllinie etabliert. Morphologisch und histochemisch handelt es sich bei den in Suspension wachsenden Zellen vorwiegend um neutrophile Promyelozyten innerhalb der myeloiden Reihe, die durch Stimuli in Granulozyten oder Monozyten terminal differenzieren können. Bei bis zu 10 % der Zellen einer Kultur wird eine Spontandifferenzierung beobachtet. Diese kann durch bestimmte Chemikalien, wie z. B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Retinsäure, Butyrat (granulozytäre Ausreifung), Calcitriol (Differenzierung zu Monozyten) oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Differenzierung zu Makrophagen), *in vitro* induziert werden. Eine derartige Stimulation der Zellen bewirkt, dass diese Eigenschaften wie phagozytische Aktivität und Reaktion auf chemotaktische Reize aufweisen.

Die HL-60-Zellen wurden von ATCC/LGC Standards (Wesel, DE) bezogen.

3.3.1.2 TK6-Zellen

Bei den TK6-Zellen handelt es sich um eine humane B-Lymphoblasten-Zelllinie. Sie wurde aus einer spontan immortalisierten WIL2-Lymphoblasten-Kultur im Jahr 1968 gewonnen. Über verschiedene genetische Veränderungen sowie Selektionsprozesse wurde die Zelllinie zu einem Derivat der WIL2-Zelllinie weiterentwickelt, die eine Heterozygotie am Locus der Thymidin-Kinase (TK) aufweist. Aus dieser Eigenschaft leitet sich auch der Name der Zelllinie ab. Die Zellen wachsen ebenso wie die HL-60-Zellen in Suspension und wurden von ATCC/LGC Standards (Wesel, DE) bezogen.

3.3.2 Primäre Zellen (hämatopoetische Stammzellen)

Bei den primären hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen handelt es sich um CD34-positive Zellen, die aus mononukleären Zellen des Knochenmarks über magnetische Immunseparation gewonnen wurden. Laut Hersteller betrug die Reinheit der Zellen nach Selektion über 90 %.

Auch die Stammzellen wachsen vergleichbar zu den Zelllinien in Suspension. Die Zellen wurden von Lonza (Köln, DE) bezogen und in Aliquots zu je 100.000 Zellen bis zur Verwendung kryokonserviert.

3.4 Medien für die Zellkultur

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Zellkulturmedien für die unterschiedlichen Zelltypen. Angegeben sind jeweils die Basismedien sowie die Zusätze unter Angabe der jeweiligen Konzentration. Nach Ansetzen des Komplettmediums (Basismedium inklusive der Zusätze) wurden die Medien steril bei 4 °C gelagert und innerhalb von 6 Wochen aufgebraucht.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien unter Angabe des entsprechenden Zelltyps.

Zelltyp	Basismedium	Zusätze	Konzentration
<i>HL-60</i>	RPMI-1640	FCS	10 %
		L-Glutamin	2 mM
		Penicillin	50 U/ml
		Streptomycin	50 µg/ml
<i>TK6</i>	RPMI-1640	FCS	10 %
		L-Glutamin	2 mM
		Natrium-Pyruvat	1 mM
		Penicillin	50 U/ml
<i>HSZ</i>	HPGM	SCF	25 ng/ml
		TPO	50 ng/ml
		Flt3-Ligand	50 ng/ml

4 METHODEN

4.1 Zellkulturtechniken

4.1.1 Kultivierung und Subkultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien und der primären Zellen erfolgte in zellspezifischen Medien im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Luft.

4.1.1.1 HL-60-Zellen

Für die Kultur der HL-60-Zellen kam RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich; Steinheim, DE) mit einem Zusatz von FCS (fetal calf serum) (BioChrom; Berlin, DE), L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin zum Einsatz (Konzentrationen siehe Tabelle 1). Um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurde die Zellsuspension alle zwei bis drei Tage zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT) und durch Zugabe von frischem, auf 37 °C temperiertem Medium eine Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Durch diese regelmäßige Prozedur lag die Zelldichte während der Kultur stets bei $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml.

4.1.1.2 TK6-Zellen

Die Kultivierung der TK6-Zellen erfolgte in RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich; Steinheim, DE), supplementiert mit FCS (BioChrom; Berlin, DE), L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, Penicillin und Streptomycin (Konzentrationen siehe Tabelle 1). Eine Zellkonzentration von $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml wurde durch Zugabe von frischem Medium zur Kultur oder durch Ersetzen des verbrauchten Mediums nach Zentrifugation der Zellsuspension (1.000 rpm, 5 min, RT) aufrechterhalten werden. Die Subkultivierung erfolgte alle zwei bis drei Tage.

4.1.1.3 Hämatopoetische Stammzellen

Die Stammzellen wurden in Hematopoietic Growth Medium HPGM (Lonza; Köln, DE) kultiviert, supplementiert mit humanem SCF, TPO und Flt3-Ligand (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, DE). Die Konzentrationen der einzelnen Medium-Bestandteile sind in Tabelle 1 aufgeführt. Nach dem Auftauen konnten die HSZ insgesamt für sieben Tage in Kultur gehalten werden. Während dieser Zeit wurden alle Experimente und Expositionen durchgeführt.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde ein Aliquot entnommen und 1:2 (v/v) mit einer Trypanblau-Lösung (0,4 %) vermischt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 2-5 min, wurden 10 µl des Probengemischs in eine Neubauer-Zählkammer (Marienfeld; Lauda-Königshofen, DE), welche luftblasenfrei mit einem Deckgläschen fixiert war, gegeben und vier Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei erscheinen lebende Zellen leuchtend weiß und tote Zellen blau. Die Berechnung der Lebendzellzahl (L_{ZZ}) erfolgte mit der folgenden Formel.

$$L_{ZZ} = MW_{\text{lebende Zellen}} \times 10.000 \times 2 \times V_{\text{Zellsuspension}}$$

wobei:

$MW_{\text{lebende Zellen}}$ = Mittelwert der lebenden Zellen aus den vier ausgezählten Großquadraten

Faktor 10.000 = Volumen der Neubauer-Zählkammer [mm^3],

Faktor 2 = Verdünnungsfaktor Trypanblau,

$V_{\text{Zellsuspension}}$ = Volumen der gesamten Zellsuspension [ml]

4.1.3 Bestimmung der Vitalität

Zur Bestimmung der Vitalität kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz: der Vitalitätstest mittels Trypanblau-Färbung und der Vitalitätstest mittels FDA (Fluorescein-Diacetat)/GelRed-Färbung. Erstere Methode wurde vorwiegend für die Zellkulturtechniken eingesetzt (Subkultivierung, Aussaat der Zellen), wohingegen die zweite Methode im Anschluss an die Expositionen oder nach Ende einer Substanzinkubation Verwendung fand.

4.1.3.1 Vitalitätstest mittels Trypanblau-Färbung

Bei der Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Färbung wurde zunächst die Lebendzellzahl entsprechend der Zellzahlbestimmung aus dem vorangegangenen Kapitel bestimmt. Zusätzlich zu den lebenden Zellen ist für diese Methode auch die Bestimmung der toten Zellen notwendig; dies erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise wie zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Anstelle der weiß leuchtenden Zellen wurden die blauen Zellen in den vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die toten Zellen in der gesamten Zellsuspension berechnet. Durch Addition der lebenden und der toten Zellen ließ sich eine Gesamtzellzahl bestimmen.

Die Vitalität konnte anschließend mit folgender Formel kalkuliert werden.

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \cdot 100 \%$$

4.1.3.2 Vitalitätstest mittels FDA/GelRed-Färbung

Für die Bestimmung der Vitalität durch Färbung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen FDA und GelRed wurde ein Aliquot (35 µl) der Zellsuspension mit 15 µl der Färbelösung gemischt. Die Färbelösung setzte sich zusammen aus 12 µl FDA (5 mg/ml in Aceton) und 2 µl GelRed-Stocklösung (Biotrend; Köln, DE) in 2 ml PBS. 20 µl dieser Mischung (Zellsuspension und Färbelösung) wurden auf einen Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen (21x26 mm) fixiert und insgesamt 200 Zellen (rot- und grün-fluoreszierend) am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon; Düsseldorf, DE) bei 200-facher Vergrößerung und unter Verwendung eines FITC-Filters (Nikon; Düsseldorf, DE) gezählt. Die Berechnung der Vitalität erfolgte nach folgender Formel.

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Anzahl Zellen}_{\text{grün}}}{\text{Anzahl Zellen}_{\text{grün+rot}}} \cdot 100 \%$$

Das Prinzip dieser Färbung basiert darauf, dass in gesunden Zellen der Fluoreszenzfarbstoff FDA die Zellmembran passieren kann, durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert wird und als grün-fluoreszierendes Fluorescein akkumuliert. Somit erscheinen lebende Zellen in der Zellsuspension grün. GelRed weist gleiche Eigenschaften wie Ethidiumbromid auf. Es dringt in Zellen ohne intakte Zellmembran ein und bindet im Zellkern an die DNA. Dies äußert sich in einer kräftigen, rot-fluoreszierenden Färbung der Zellkerne, die spezifisch für tote Zellen ist.

4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

4.1.4.1 Einfrieren und Auftauen von HL-60-Zellen und TK6-Zellen

Zum Einfrieren der HL-60- und TK6-Zellen wurden die Zellen zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT), das Pellet in zellspezifischem Medium resuspendiert und die Zellzahl in der Zellsuspension mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Nach Einstellung einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml durch Zugabe des entsprechenden Mediums, wurde jeweils 1 ml dieser

Suspension anschließend in Einfrierröhrchen transferiert. Nach dem Zusatz von 10 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO folgte das Vorkühlen für 24 h bei -70 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter. Bei diesem Vorgang sinkt die Temperatur um ungefähr 1 °C pro Minute. Im Anschluss an die 24-stündige Vorkühlphase wurden die Einfrierröhrchen in einen Stickstofftank überführt und dort in der Dampfphase gelagert.

Zum Auftauen der HL-60- und TK6-Zellen wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, sofort im vortemperierten Wasserbad bei 37 °C fast vollständig aufgetaut und nach Desinfektion mit 70 % Ethanol in die Sicherheitswerkbank überführt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen. Die Zellsuspension wurde in 9 ml vortemperiertes, zellspezifisches Medium überführt und anschließend zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml zellspezifischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt. Die anschließende Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C.

4.1.4.2 Auftauen von hämatopoetischen Stammzellen

Da die Stammzellen insgesamt sensibler waren als die herkömmlichen Zelllinien, war eine zügige und vorsichtige Handhabung der Zellen während des Auftauens notwendig. Für den Auftau-Vorgang wurden drei unterschiedliche Ansätze des Zellkulturmediums vorbereitet und im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt:

- HPGM_{PUR}: HPGM ohne Zusätze
- HPGM_{NORMAL}: HPGM supplementiert entsprechend Tabelle 1
- HPGM_{KONZENTRIERT}: HPGM supplementiert mit der 1,1-fachen Menge an Zytokinen.

Die Zusammensetzung der jeweiligen Medien ist in Tabelle 2 gegenübergestellt. HPGM_{PUR} wurde dabei für die Waschschrte verwendet und HPGM_{NORMAL} für die Aussaat der Zellen nach dem Auftauen und die anschließende Kultivierung. Da die Resuspension der Zellen nach dem letzten Waschschrte in HPGM_{PUR} erfolgte (siehe unten), diente das HPGM_{KONZENTRIERT} zur Kompensation der Zytokin-Menge, sodass final eine Konzentration der Zytokine im Kulturmedium entsprechend derjenigen in Tabelle 1 vorlag.

Tabelle 2: Verwendete Medien für den Vorgang des Auftauens von hämatopoetischen Stammzellen, basierend auf dem HPGM-Medium.

Medium	Zusätze	Konzentration
<i>HPGM_{PUR}</i>	-	-
	SCF	25 ng/ml
<i>HPGM_{NORMAL}</i>	TPO	50 ng/ml
	Flt3-Ligand	50 ng/ml
	SCF	27,5 ng/ml
<i>HPGM_{KONZENTRIERT}</i>	TPO	55 ng/ml
	Flt3-Ligand	55 ng/ml

Zum Auftauen der HSZ wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank (Lagerung in der Gasphase) entnommen, sofort im vortemperierten Wasserbad bei 37 °C soweit aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskristall (ca. 5 mm Durchmesser) zu sehen war, und nach Desinfektion mit 70 % Ethanol in die Sicherheitswerkbank überführt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen. Die Zellsuspension wurde langsam in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt (tropfenweise, am Rand des Röhrchens), das Einfrierröhrchen 2-mal mit je 1 ml *HPGM_{PUR}* ausgespült und die Spülsuspension mit der Zellsuspension gepoolt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen tropfenweise auf 10 ml mit *HPGM_{PUR}* aufgefüllt und die Suspension durch langsames Kippen des Röhrchens vermischt. Es folgte die Zentrifugation der Zellen bei 1.300 rpm für 10 min bei RT. Der Überstand im Zentrifugenröhrchen wurde bis auf 2 ml abgenommen und das Zellpellet durch leichtes „Schnippen“ am unteren Ende des Röhrchens resuspendiert. Nach Zugabe (langsam) von weiteren 8 ml *HPGM_{PUR}* und erneutem Kippen des Röhrchens wiederholte sich der Waschschrift (1.300 rpm, 10 min, RT). Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen, das Zellpellet mit einer 10-ml-Glaspipette vorsichtig resuspendiert und die Zellzahl der vorliegenden Zellsuspension doppelt mittels Trypanblau-Färbung bestimmt (siehe Kapitel 4.1.2). Im Anschluss erfolgte die Aussaat der Zellen (Mittelwert aus der Doppelbestimmung) in eine 75-cm²-Zellkulturflasche in einer Konzentration von 10.000 Zellen/ml. Hierfür wurde zunächst das Volumen der Zellsuspension mit *HPGM_{KONZENTRIERT}* auf 10 ml aufgefüllt (Zugabe von 9 ml) und, im Fall von mehr als 100.000 Zellen gesamt, *HPGM_{NORMAL}* entsprechend hinzugefügt. Die anschließende Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C.

4.1.5 Differenzierung der HL-60-Zellen

Die Differenzierung der HL-60-Zellen erfolgte mit DMSO der Konzentration 1,25 % und Natrium-Butyrat (Na-But) der Konzentration 500 μM über eine Dauer von sieben Tagen. Hierfür wurden jeweils 1×10^5 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 3 ml des Zellkulturmedium (RPMI-1640, siehe auch Tabelle 1) in Zellkulturflaschen ausgesät und entweder mit DMSO oder mit Na-But behandelt. Die zu pipettierende Menge an DMSO betrug somit 37,5 μl ; Na-But wurde dagegen aus einer 50 mM Stocklösung 1:100 verdünnt, was einer eingesetzten Menge von 30 μl auf 3 ml Zellsuspension entsprach. Diese Ansätze wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen während der Differenzierungsphase zu gewährleisten, wurde am dritten Tag der Differenzierung das Gesamtvolumen durch Zugabe von 2 ml Medium, supplementiert mit der entsprechenden Menge an DMSO (25 μl DMSO) bzw. Na-But (20 μl der 50 mM Stocklösung), in jedem Ansatz auf 5 ml erhöht und für weitere zwei Tage inkubiert. Am fünften Tag der Differenzierung fand eine vollständige Substitution des Mediums statt. Hierfür wurden alle Ansätze zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT) und im Anschluss das verbrauchte Medium im Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 20 ml frischem Medium, zuvor supplementiert mit DMSO (250 μl) bzw. mit Na-But (200 μl der 50 mM Stocklösung), wurden die Zellen resuspendiert und für weitere zwei Tage zur Differenzierung im Brutschrank belassen. Im Anschluss an die 7-tägige Differenzierung wurden die Substanzen aus dem Zellkulturmedium durch Zentrifugation entfernt und die differenzierten HL-60-Zellen (dHL60) für die nachfolgenden Untersuchungen (Vergleich von differenzierten Zellen mit hämatopoetischen Stammzellen) verwendet.

4.2 Mobilfunkexpositionen

Die Arbeiten zum technischen Teil dieser Arbeit wurden durch die Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig übernommen. Diese umfassten die Auswahl der Expositionssignale, Aufbau und Inbetriebnahme der Expositionsanlage sowie die Experimente zur Dosimetrie.

4.2.1 Expositionssignale

Für die Expositionsexperimente wurden Testsignale der Mobilfunkstandards GSM, UMTS und LTE verwendet.

Die Expositionsbedingungen für die Befeldung mit GSM-Signalen bei 900 MHz wurden so gewählt, dass sie den Bedingungen bei einem regulären Anruf mit einem Mobiltelefon ähneln. Um beliebige Bit-Sequenzen übertragen zu können, wurden, den 3GPP-Spezifikationen (3rd Generation Partnership Project) entsprechend [148], Zeitschlitz verwendet. Das Signal wurde begrenzt durch die Uplink-Verbindung zur Basisstation mit Frequenzen zwischen 890 MHz und 915 MHz mit 124 Kanälen. Es umfasste die 217-Hz-Taktung des Zeitrahmens im TDMA (time division multiple access) sowie die 1,733-Hz-Taktung der einzelnen Zeitschlitz und die 270,8-kHz-Taktung der einzelnen Bits [149]. Alle acht möglichen Zeitschlitz wurden aktiviert.

Für die UMTS-Expositionen bei 1.950 MHz wurde ein realistisches, generisches Testsignal mit Pseudonoise-Sequenzen für die Datenübertragung und einer erhöhten Anzahl an niederfrequenten Signalanteilen gewählt [149]. Insbesondere handelte es sich dabei um ein Signal entsprechend der 3GPP-Spezifikation TS 25.141 [150] mit kontinuierlichem W-CDMA (wideband code division multiple access) Uplink inklusive eines Kontrollkanals (DPCCH) und eines Datenkanals (DPDCH) für ein einzelnes Gerät. Ein 60-kbps-Kanal diente zur Simulation eines einfachen reinen Sprachkanals und ein 12,2-kbps-Kanal zur Messung der Referenz (Uplink-Signal).

Bei LTE-Expositionen mit 2.535 MHz wird für ein typisches Lastszenario eine hohe Bandbreite mit einer hohen Payload benutzt. Dies entspricht einem schnellen Wechsel der Zustände im Konstellationsdiagramm. Daher wurde eine sogenannte PRBS (pseudo-random-bit-sequence) verwendet. Entsprechend der 3GPP-Spezifikation TS 36.141 [151, 152] wurde außerdem ein sogenannter „Reference Sensitivity Test Case of the Test Case Wizards“ für ein einzelnes Gerät eingesetzt. Ein 20 MHz breiter LTE-Kanal im Uplink wurde festgelegt und verwendete nur 5 der maximal 100 zur Verfügung stehenden LTE-Ressourceblöcken.

4.2.2 Expositionsanlage

Die Exposition der HL-60-Zellen und HSZ wurde in einer modifizierten Version der TEM-Zelle (transversal electromagnetic field), der sogenannten μ TEM-Zelle, realisiert. Dieser Feldgenerator erzeugt eine Wanderwelle mit Fernfeldcharakter, wobei in einer solchen Welle die elektrische und die magnetische Feldkomponente senkrecht aufeinander und senkrecht

auf der Ausbreitungsrichtung stehen. Mit diesem Feldgenerator ist es möglich, berechenbare Feldstärken für die Kalibrierung der Sonde zu generieren und diese auf das Internationale Einheitensystem (SI) rückzuführen. Das 3D-Modell aus Abbildung 7 veranschaulicht eine solche μ TEM-Zelle, in der vier Probencontainer (1-well Zellkulturkammer auf PCA-Objektträger (Sarstedt; Nümbrecht, DE)) auf dem Septum positioniert werden können. Die Exposition erfolgt unterhalb und oberhalb des Septums, das den Leiter innerhalb des Feldgenerators darstellt.

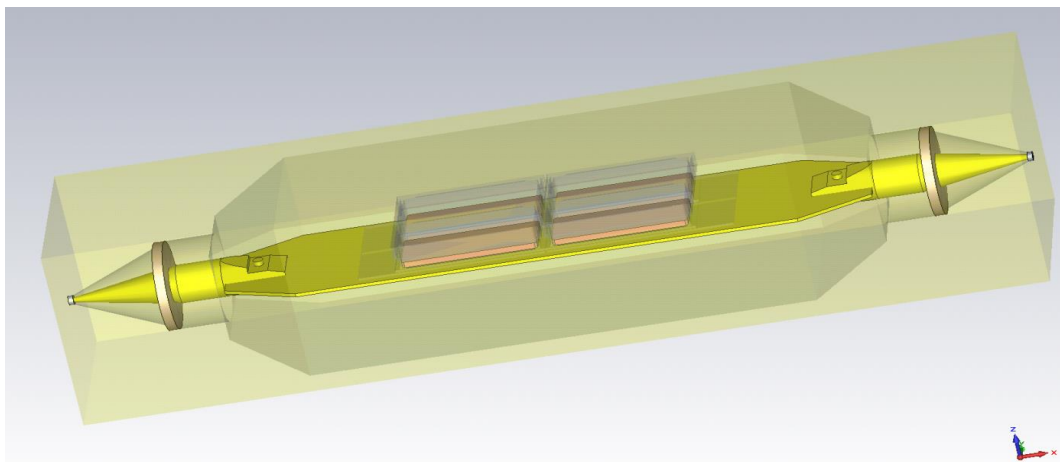


Abbildung 7: 3D-Modell der mit vier Probencontainern beladenen μ TEM-Zelle. Die mit 3 ml Zellsuspension befüllten Probencontainer werden auf dem Septum der μ TEM-Zelle platziert und können gleichzeitig exponiert werden. Mit Genehmigung von: *Radiation Research*, publiziert in Gläser *et al.* [153].

Für die Gewährleistung definierter Umgebungsbedingungen wurde die μ TEM-Zelle mit den darin enthaltenen Probengefäßen in einem Inkubator betrieben. Mit Hilfe einer Membranpumpe wurde die Luft aus dem im Inneren des Inkubators in die μ TEM-Zelle gesaugt und anschließend wieder in die Inkubatoratmosphäre abgegeben. Auf diese Weise wurde ein Luft- und Wärmeaustausch im Inneren der μ TEM-Zelle mit der geregelten Inkubatoratmosphäre sichergestellt. Abbildung 8 veranschaulicht schematisch die Anordnung der gesamten Expositionsanlage.

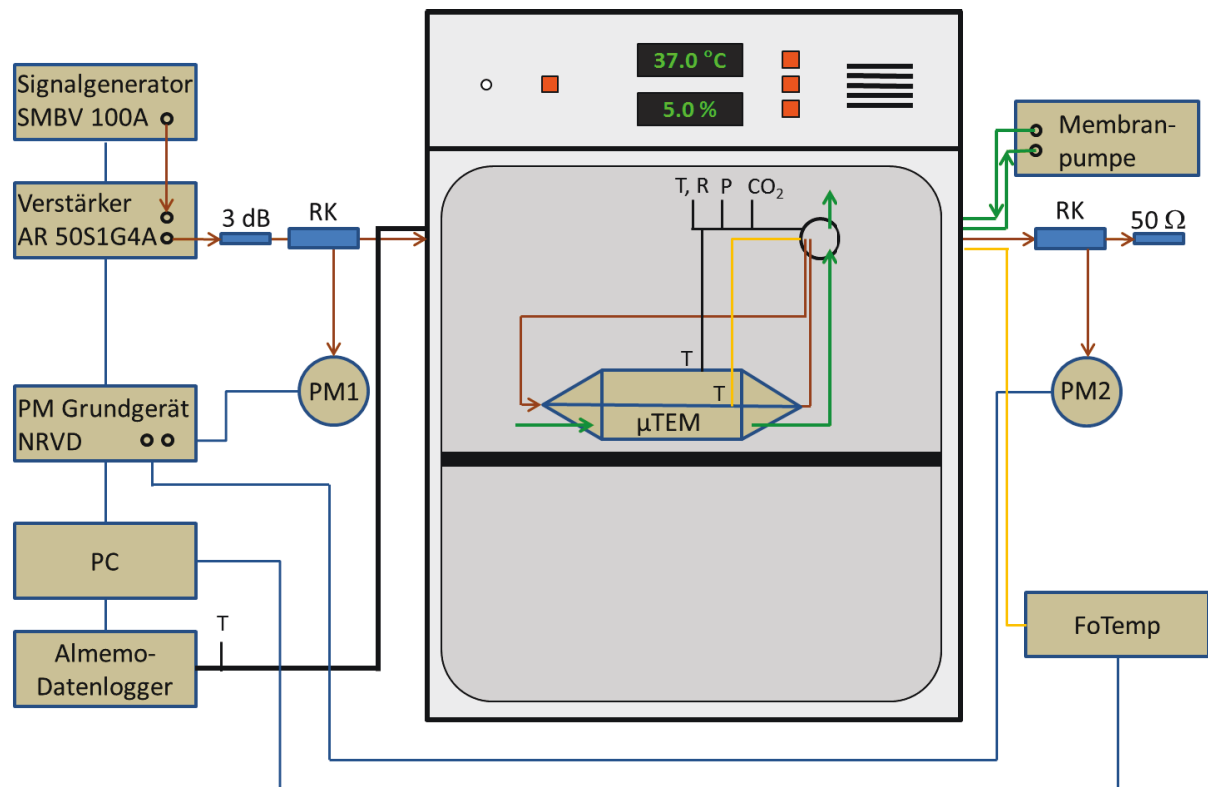


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Feldexpositionen. Das RF-Signal wird generiert (Signalgenerator), verstärkt (Verstärker) und in die μ TEM-Zelle eingespeist. Über Leistungsmesser (PM), angeschlossen vor (PM1) und nach (PM2) der μ TEM-Zelle, wird die Leistung erfasst. Die definierte Atmosphäre des Inkubators wird mit Hilfe einer Membranpumpe durch die μ TEM-Zelle geleitet. Die Umgebungsbedingungen werden während der Expositionen über Sensoren gemessen und mit Hilfe eines Datenloggers aufgezeichnet. Mit Genehmigung von: *Radiation Research*, publiziert in Gläser *et al.* [153].

Die Modulation der RF-Signale erfolgte mit einem Vektorsignalgenerator SMBV100ATM der Firma Rhode & Schwarz (München, DE), der über einen Rechner (PC) angesteuert wurde. Über ein Koaxialkabel wurde das generierte Signal zum Verstärker AR 50S1G4ATM (Amplifier Research; Souderton, US) transportiert und anschließend über ein 3-dB-Dämpfungsglied (zur Verbesserung der Anpassung) und einen Richtkoppler in die μ TEM-Zelle eingespeist. Nach der μ TEM-Zelle wurde das Signal über einen weiteren Richtkoppler auf einen 50- Ω -Lastwiderstand geleitet, in dem die Hochfrequenzleistung reflexionsfrei in Wärme umgesetzt wurde. Die Messung der Leistung erfolgte mit einem Leistungsmesser NRVD (Rhode & Schwarz; München, DE) am Eingang (PM1; PM: power meter) und am Ausgang (PM2) der Zelle. Mit Hilfe eines Datenloggers (AlmemoTM 2390-8; Ahlborn; Holzkirchen, DE) wurden die Umgebungsbedingungen während der Exposition minütlich aufgezeichnet. Daran angeschlossene Sensoren lieferten Daten zur Inkubatoratmosphäre (kombinierter

Temperatur- und Feuchtesensor (T, R), Drucksensor (P) und CO₂-Sensor (CO₂)) und zur Temperatur des Gehäuses der μ TEM-Zelle. Die Messung der Temperatur am Septum wurde mit einer 0,55 mm dünnen optischen, metallfreien Temperatursonde realisiert (FoTemp4™; Optocon; Dresden, DE). Diese faseroptische Temperaturmessung ermöglichte eine Messwertaufnahme in elektromagnetisch stark beeinflusster Umgebung, ohne wesentliche Beeinflussung des Feldes durch den Sensor selbst. Leistungsmesser, Datenlogger und FoTemp wurden vom Rechner aus ausgelesen.

Zur Automatisierung der Feldexpositionen wurde ein Steuerprogramm mit der Software LabView™ (National Instruments; Austin, US/TX) entwickelt. Dieses Programm ermöglichte es, eine kodierte Expositionsreihe durchzuführen, sodass der Experimentator über die Konditionen der exponierten Probe nicht im Bilde war. Das Programm wählte in zufälliger Reihenfolge aus einem Pool an durchzuführenden Expositionen aus und speicherte die Expositionsbedingungen zusammen mit den aufgezeichneten Daten des Datenloggers in einem verschlüsselten Datensatz ab, der für den Experimentator nicht zugänglich war. Erst nach Durchführung und Auswertung der biologischen Analysen aus einem Replikat wurden die Proben entblindet.

4.2.3 Dosimetrie

Zur Ermittlung der spezifischen Absorptionsraten (SAR, specific absorption rate) von 0,5, 1, 2 und 4 W/kg während einer GSM-, UMTS- und LTE-Exposition, wurde die Feldverteilung in den mit Medium befüllten und in der μ TEM-Zelle positionierten Probengefäßen (entsprechend Abbildung 7) simuliert. Ähnliche Berechnungen für Petri-Schalen wurden von Paffi *et al.* durchgeführt [154]. Grundlage für die numerischen Berechnungen bildete die Simulationssoftware Computer Simulation Technology (CST) Microwave Studio™ (CST AG; Darmstadt, DE) [155]. Basierend auf dem 3D-Modell aus Abbildung 7 und den Materialparametern ($\epsilon_{r, \text{Luft}}=1,00059$; $\epsilon_{r, \text{Medium}}=78,4$, $\epsilon_{r, \text{Slide}}=2,3$) wurden die Simulationen bei 900 MHz für GSM, bei 1.950 MHz für UMTS und bei 2.535 MHz für LTE durchgeführt. Beispielhaft für den Fall UMTS (1.950 MHz) mit einer Eingangsleistung von 1 W ist die SAR-Wert-Verteilung in Abbildung 9 dargestellt.

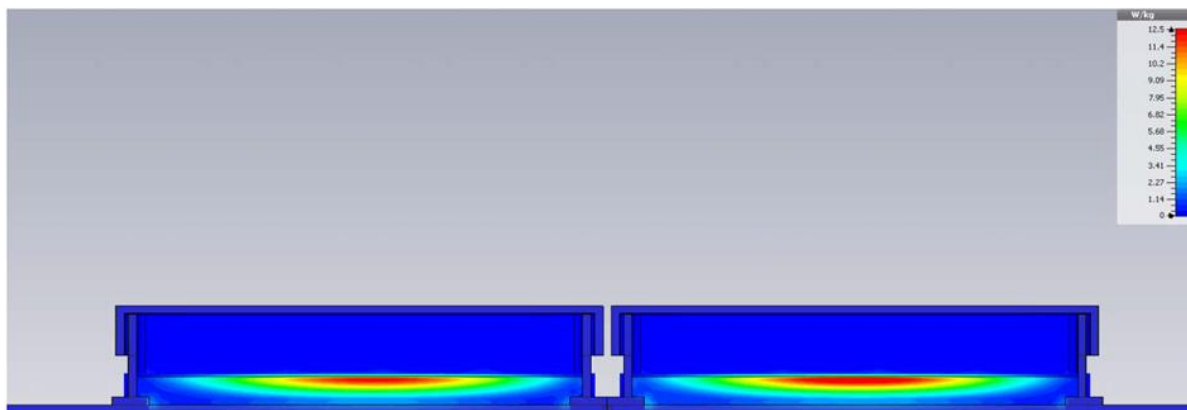


Abbildung 9: CST-Simulation mit vier Probenbehältern. Bei 1.950 MHz und einer effektiven Eingangsleistung von 1 W variieren die SAR-Werte im Zellmedium. Ein Anstieg des SAR-Wertes hin zur Mitte der Flüssigkeit ist zu verzeichnen. Dargestellt ist ein Schnitt durch zwei benachbarte Probengefäße in Richtung der Wellenausbreitung. Mit Genehmigung von: Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Braunschweig.

Anhand der berechneten SAR-Wert-Verteilungen ließen sich Histogramme nach Schönborn, Pokovic [156] extrahieren. Die Kenngrößen für die Expositionstärke ergaben sich dementsprechend aus dem Mittelwert und der Standardabweichung (SD) der Verteilung. Aufgrund der Annahme, dass die Zellen innerhalb der Suspension nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern sich mit der Zeit im unteren Millimeter der Flüssigkeit (3,5 mm Höhe bei einem Füllvolumen von 3 ml) konzentrieren, wurden für die Berechnungen nur SAR-Werte für diesen Bereich betrachtet. Abbildung 10 demonstriert die entsprechenden Histogramme, extrahiert aus den SAR-Wert-Verteilungen für 900 MHz, 1.950 MHz und 2.535 MHz.

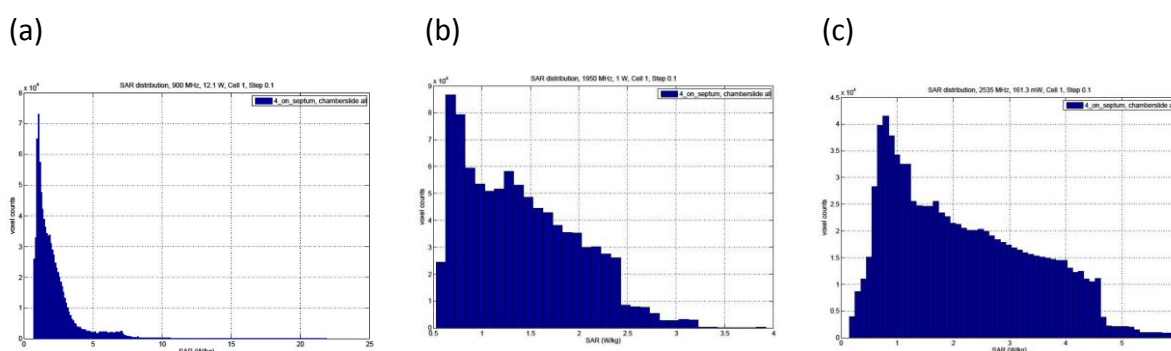


Abbildung 10: Histogramme der SAR-Werte im Zellkulturmedium für ein Volumen mit 1 mm Füllstand in Probencontainer 1 im Fall GSM (900 MHz) mit einer Eingangsleistung von 12,1 W (a), UMTS (1.950 MHz) mit einer Eingangsleistung von 1 W (b) und LTE (2.535 MHz) mit einer Eingangsleistung von 161,3 mW (c). Aus der Verteilung lässt sich ein Mittelwert von 2,243 W/kg und eine SD von 1,6329 W/kg berechnen. Mit Genehmigung von: Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Braunschweig.

Für ein Volumen mit 1 mm Höhe im Probencontainer wurde eine Voxelgröße von 0,1 mm x 0,1 mm x 0,1 mm verwendet. Dieses Volumen, in dem die Zellen lokalisiert waren, umfasste 918.000 SAR-Werte für einen einzelnen Probencontainer. Für alle vier Probencontainer waren dies 3.672.000 SAR-Werte, mit denen die Bestimmung eines Mittelwertes und einer SD für jede Frequenz erfolgte. Durch die gegebene Proportionalität zwischen der Eingangsleistung und dem SAR-Wert konnten die benötigten Eingangsleistungen für die SAR-Werte 0,5, 1, 2 und 4 W/kg mittels linearer Skalierung bestimmt werden. Die verwendeten Eingangsleistungen resultierten aus zuvor durchgeführten SAR-Wert-Berechnungen mittels CST Microwave Studio™.

4.3 Vorbereitung, Exposition und Aufarbeitung der Proben

Die Expositionen der HL-60-Zellen und HSZ mit RF-EMF erfolgte jeweils über einen kurzen Zeitraum mit 4 h und einen langen Zeitraum, der zwischen 20 h für HSZ und 66 h für HL-60 variierte. Vor Beginn der Expositionen wurden die Zellen in 1-well Zellkulturkammern auf PCA-Objektträger in einem Gesamtvolumen von 3 ml des entsprechenden Mediums ausgesät (Bestimmung der Zellzahl und Vitalität entsprechend Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.3) und in die μ TEM-Zelle transferiert. Die Aussaatdichte für die HL-60-Zellen lag bei 3×10^5 Zellen/ml für die Kurzzeitexposition und bei 1×10^5 Zellen/ml für die Langzeitexposition. Die HSZ wurden in einer Dichte von $1-1,5 \times 10^5$ Zellen/ml für die 4-h-Exposition und $5-7,5 \times 10^4$ Zellen/ml für die 20-h-Exposition ausgesät. Um eine ähnliche Passage der Zellen für alle durchgeführten Expositionen zu gewährleisten, wurden sowohl die HL-60-Zellen als auch die HSZ in regelmäßigen Abständen aufgetaut und nur für Expositionen einer Woche eingesetzt. Die Durchführung aller Expositionen erfolgte verblindet. Die Replikate wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Im Anschluss an jede Exposition fand zunächst eine Bestimmung der Vitalität in den Proben statt (Kapitel 4.1.3.2), dann wurden die exponierten Proben auf alle zu untersuchenden Endpunkte aufgeteilt und entsprechend der in den nachfolgenden Kapiteln erläuterten Anweisungen aufbereitet und analysiert.

Die Kontrollen zu jedem Endpunkt wurden 1-mal wöchentlich angesetzt und über den gesamten Expositionszeitraum gesammelt. Sie sind daher als historische Kontrollen zu betrachten.

4.4 Biologische Untersuchungen

4.4.1 Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, durch den geschädigte Zellen eliminiert werden. Ein spezifisches Charakteristikum dieses Prozesses ist, dass früh apoptotische Zellen negativ geladene Phospholipide, vor allem Phosphatidylserin (PS), außen auf ihrer Membran tragen, während die Membranintegrität erhalten bleibt. Dadurch können sie von Phagozyten erkannt werden. Intakte Zellen weisen diese Phospholipide dagegen nur auf der Innenseite der Membran auf. Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen besitzen nekrotische Zellen keine intakte Zellmembran mehr, sie wird permeabel für Farbstoffmoleküle.

Diese Merkmale wurden bei der Analyse und Quantifizierung ausgenutzt. Die Detektion des PS und damit apoptotischer Zellen erfolgte über das fluoreszenzmarkierte Protein Annexin-V (FITC), nekrotische Zellen wurden mit einem weiteren Farbstoff, dem rot fluoreszierenden Propidiumiodid (PI), identifiziert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zentrifugiert und 1-mal mit 1x HEPES-Puffer gewaschen. Dieser Puffer wurde als 10-fach konzentrierte Lösung angesetzt (10 mM HEPES, 140 mM NaCl sowie 5 mM CaCl₂, pH-Wert 7,4) und bei 4 °C gelagert. Direkt vor der Verwendung wurde er zu einer 1-fach konzentrierten Lösung mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Nach dem Waschschrift wurde jede Probe mit 100 µl Färbelösung für 20 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunklen inkubiert. Die Färbelösung setzte sich zusammen aus 96 µl 1x HEPES-Puffer, 2 µl PI-Lösung (50 µg/ml) und 2 µl Annexin-V-FLUOS-Lösung (Roche; Penzberg, DE). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µl 1x HEPES-Puffer gestoppt, die Proben in entsprechende Probengefäße überführt und sofort am Durchflusszytometer FACScan (BD; Heidelberg, DE) analysiert. Insgesamt wurden 20.000 Ereignisse gemessen und anschließend für die Quantifizierung entsprechend Abbildung 11 in drei Kategorien aufgeteilt.

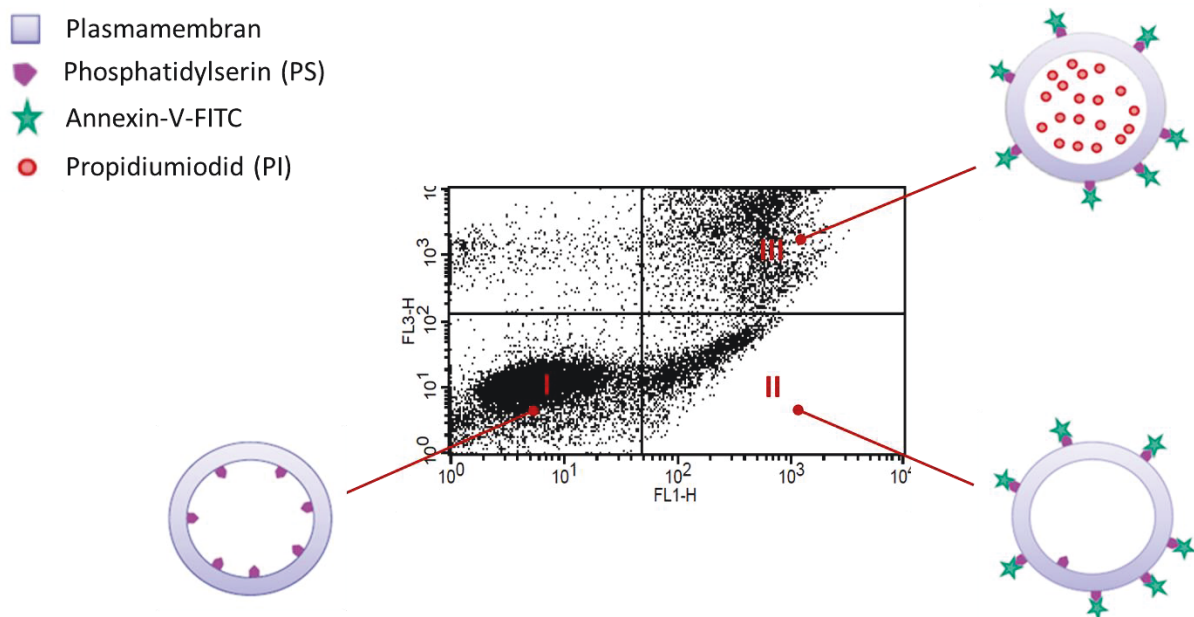


Abbildung 11: Schematische Darstellung zur Funktionsweise der Apoptose-Detektion mit der Annexin-V-Methode. Der nach durchflusszytometrischer Messung erhaltene Dot Plot für beide Fluoreszenzen, FL1 (Annexin-V-FLUOS) und FL3 (PI), (hier dargestellt für behandelte HL-60-Zellen) wird für die Quantifizierung in vier Quadranten aufgeteilt. Quadrant I beinhaltet gesunde Zellen mit einem Grundniveau an Annexin-V und PI. Im rechten unteren Quadranten (II) sind früh-apoptotische Zellen mit vermehrt gebundenem Annexin-V vorzufinden, wohingegen in Quadrant III spät-apoptotische und nekrotische Zellen liegen, in denen zusätzlich auch PI nachgewiesen werden kann.

Die Fluoreszenz-Eigenschaften der einzelnen Kategorien zur Quantifizierung der Proben sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Merkmale der Kategorien I-III zur Quantifizierung gesunder, apoptotischer und nekrotischer Zellen anhand der Fluoreszenzen für Annexin-V und PI.

Kategorie	Merkmal	Annexin-V-FLUOS	PI
I	lebende Zellen	-	-
II	frühe Apoptosen	+	-
III	späte Apoptosen und Nekrosen	+	+

Für die Auswertung wurden ausschließlich früh-apoptotische Zellen der Kategorie II (Annexin-V⁺/PI⁻) herangezogen.

4.4.2 Oxidativer Stress

Als Maß für oxidativen Stress wurde der Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies mit dem DCF-Test (Dichlorofluorescein-Test) bestimmt. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass die nicht fluoreszierende Verbindung Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) in die Zellen eingebracht, dort zu Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) deacetyliert und von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu einer fluoreszierenden Verbindung, dem Dichlorofluorescein (DCF), oxidiert wird (Abbildung 12). Die Fluoreszenz ist ein Maß für den oxidativen Stress in der Zelle und kann durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

Die Proben wurden für 20 min mit 10 μ M DCFH-DA (Life Technologies; Darmstadt, DE) bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation von der Substanz befreit, die Pellets 2-mal mit kaltem (4 °C) PBS/BSA-Puffer (1x PBS mit 1 % BSA) gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Induktion von oxidativem Stress wurde direkt im Anschluss an die Färbung am FACScan detektiert. 30.000 Ereignisse wurden aufgenommen und lebende Zellen für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität herangezogen.

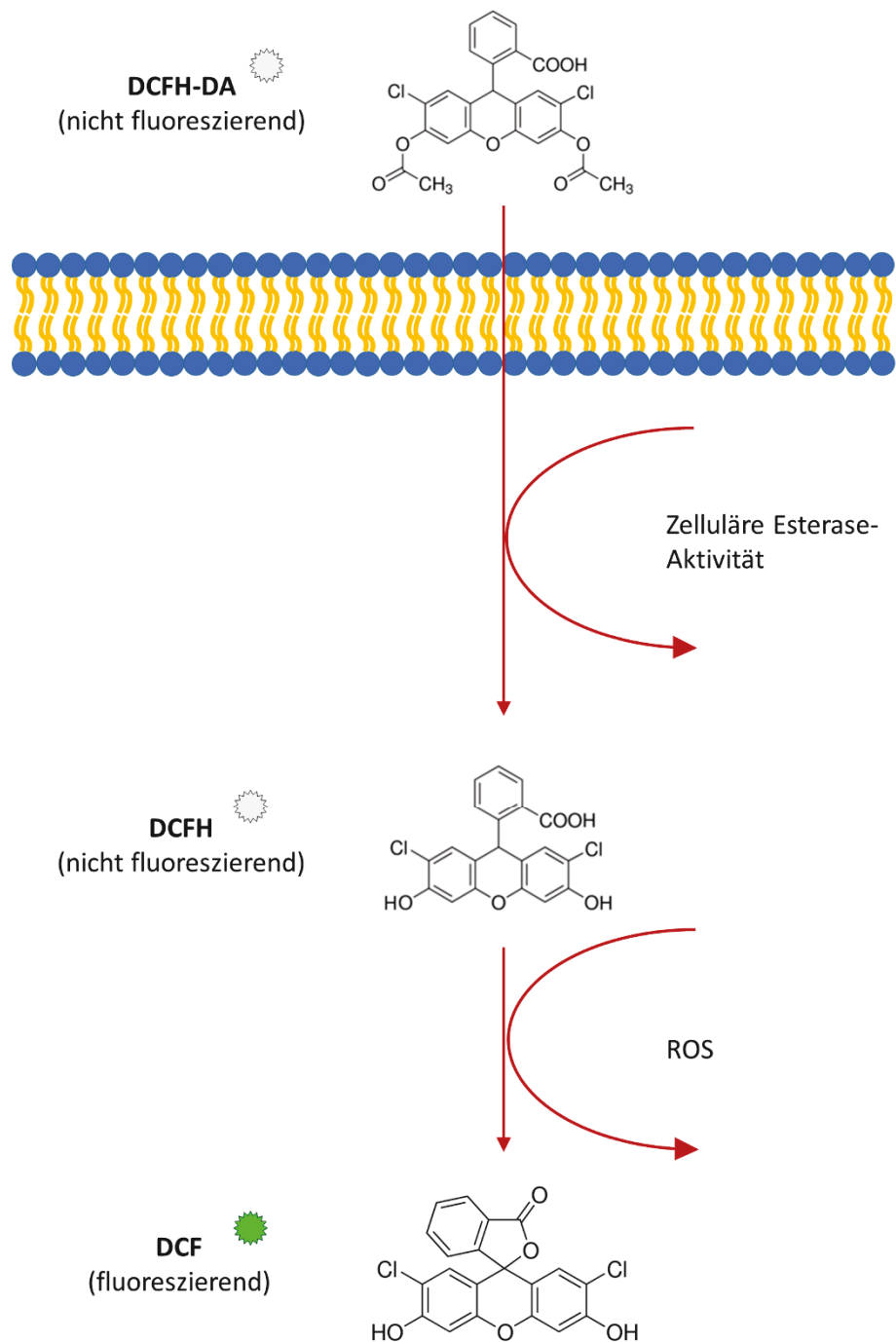


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Mechanismus der DCF-Methode zur Detektion von oxidativem Stress. Das nicht fluoreszierende DCFH-DA diffundiert durch die Zellmembran in die Zelle und wird dort von zellulären Esterasen zum ebenfalls nicht fluoreszierenden DCFH deacetyliert. Dieses kann von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zum fluoreszierenden DCF oxidiert werden und lässt sich durchflusszytometrisch nachweisen.

4.4.3 Zellzyklus-Analyse

Zur Bestimmung der Zellzyklus-Verteilung wurde der DNA-Gehalt in den Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Diese Methode beruht darauf, dass der DNA-Gehalt in der Zelle während der G2-Phase doppelt so hoch ist wie während der G1-Phase. Zellen, die sich in der S-Phase befinden, weisen einen DNA-Gehalt auf, der zwischen diesen beiden Bereichen liegt.

Die Zellen wurden zentrifugiert und 2-mal mit 1x PBS gewaschen. Die Fixierung und Permeabilisation erfolgte mit 300 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung (BD; Heidelberg, DE) für mindestens 30 min auf Eis, anschließend wurden die Proben 2-mal mit 1x Perm/Wash-Puffer (BD; Heidelberg, DE) gewaschen. Daran schloss sich die Färbung der DNA an, die mit 10 µM Hoechst 33342 für 15 min und bei 37 °C durchgeführt wurde. Nach Zentrifugation und Resuspendieren in PBS/BSA-Puffer (1x PBS mit 1 % BSA) erfolgte die durchflusszytometrische Messung am LSR (BD; Heidelberg, DE) direkt im Anschluss. Insgesamt wurden 20.000 Ereignisse gemessen und aus den resultierenden Histogrammen die Verteilung der Zellen in den Zellzyklus-Phasen G1, S und G2/M bestimmt. Abbildung 13 veranschaulicht beispielhaft das Prinzip der Auswertung dieses Endpunkts für unbehandelte Zellen (a) und für Zellen im Mitose-Arrest (b).

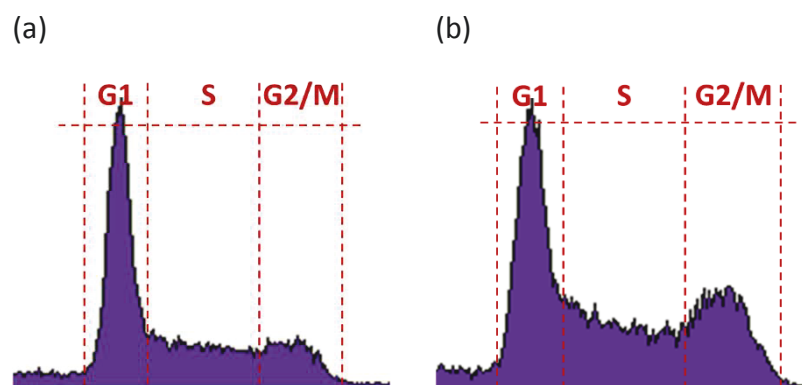


Abbildung 13: Quantifizierung der Zellverteilung in den Zellzyklus-Phasen G1, S und G2/M. In den durch durchflusszytometrische Messung erhaltenen Histogrammen, hier beispielhaft dargestellt für unbehandelte Zellen (a) und für Zellen im Mitose-Arrest (b), werden mittels der Software CellQuest Pro™ manuelle Grenzen zu den einzelnen Phasen festgelegt und so die Zellzahl der jeweiligen Phase bestimmt.

Unter Verwendung der Software CellQuest Pro™ (BD; Heidelberg, DE) wurden in den nach der Messung resultierenden Histogrammen für jede Probe manuell Grenzen für die drei Zellzyklus-

Phasen definiert. Dabei entspricht der erste Peak im Histogramm den Zellen in der G1-Phase, der zweite Peak den Zellen in der G2/M-Phase und das Plateau zwischen den beiden Peaks den Zellen in der S-Phase. Auf diese Weise ließ sich eine Zellzahl für jede der drei Phasen, sowie die relative Anzahl der Zellen einer Probe in den entsprechenden Phasen bestimmen. Die relative Anzahl der Zellen in der G1-Phase der jeweiligen Probe diente der grafischen Veranschaulichung der erhaltenen Ergebnisse.

4.4.4 DNA-Schaden

Zur Bestimmung der Genotoxizität wurden DNA-Schäden mit dem alkalischen Comet Assay, auch Einzelzellelektrophorese genannt, bestimmt. Mit dieser Methode lassen sich Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen detektieren. Bei dem Verfahren werden die Zellkerne einer Elektrophorese unterzogen, wobei geschädigte DNA im elektrischen Feld schneller wandert als intakte DNA. Die Quantifizierung erfolgt mittels Software-gestützter Mikroskopie. Abbildung 14 veranschaulicht schematisch die einzelnen Arbeitsschritte dieser Methode.

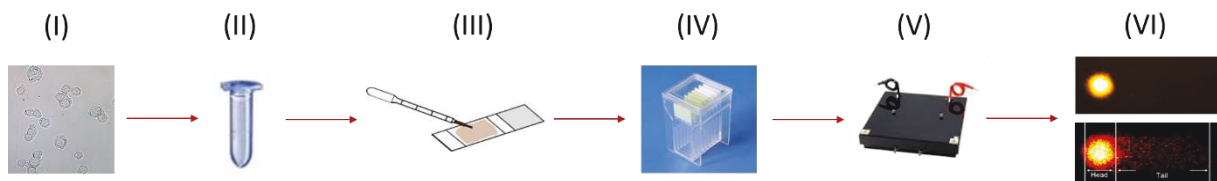


Abbildung 14: Arbeitsschritte der Comet-Assay-Methode zur Quantifizierung des DNA-Schadens. Die zu untersuchenden Zellen (I) werden in Agarose eingebettet, indem sie zunächst mit Agarose gemischt (II) und anschließend auf Agarose-beschichtete Objektträger transferiert werden (III). Nach Lyse der Zellmembran (IV) und der alkalischen DNA-Entwindung, werden die Zellkerne einer Elektrophorese unterzogen (V). Dabei wandert geschädigte DNA (abhängig von der Größe der Bruchstücke) im elektrischen Feld schneller als intakte und lässt sich unter dem Mikroskop als Kometen-Schweif darstellen (VI). Mittels Software-gestützter Mikroskopie können die DNA-Schäden im Schweif quantifiziert werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand fast vollständig entfernt und die verbleibende Zellsuspension in vorgewärmte LMP (low melting point)-Agarose (0,5 % in PBS) in einem Verhältnis von 1:9 (Zellsuspension:Agarose) eingebettet. 45 µl dieser Mischung wurden anschließend auf mit HMP (high melting point)-Agarose (1,5 % in PBS) beschichtete Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt, bis sich die

Zellsuspension leicht verfestigte. Je Probe wurden zwei Objektträger vorbereitet. Anschließend wurden die Deckgläser vorsichtig wieder entfernt und die Objektträger in vorgekühlte Lyse-Lösung für mindestens 1 h bei 4 °C gestellt. Die Lyse-Lösung setzte sich zusammen aus Lyse-Puffer (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris und 0,03 M Natrium-Lauroyl-Sarcosinat, pH 10,0), 10 % DMSO und 1 % Triton X-100 und wurde direkt vor Verwendung hergestellt. Zur DNA-Entwindung wurden die Objektträger im Anschluss an die Lyse für 20 min in kaltem (4 °C) Elektrophorese-Puffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) inkubiert. Es folgte eine 20-minütige Elektrophorese im gleichen Puffer bei 25 V und 0,3 A. Die Präparate wurden in 0,4 M Tris-Lösung neutralisiert (5 min), weitere 5 min in eiskaltem (-20 °C) Methanol fixiert, getrocknet und bis zur Auswertung gelagert.

Die DNA-Färbung erfolgte mit GelRed (Biotrend; Köln, DE), das zuvor 1:100 mit demineralisiertem Wasser verdünnt und mit DABCO-Lösung gemischt wurde (1:3). Zur Herstellung der DABCO-Lösung wurden 250 mg DABCO in 10 ml PBS gelöst und 90 ml Glycerol hinzugefügt.

Für die Auswertung wurden 50 Zellen pro Objektträger und zwei Objektträger pro Probe am Mikroskop Labophot-2 (Nikon; Düsseldorf, DE) bei 200-facher Vergrößerung analysiert. Der DNA-Schaden wurde dabei über die Messung der DNA im Schweif mit Hilfe der Analyse-Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE) quantifiziert und in Prozent dargestellt.

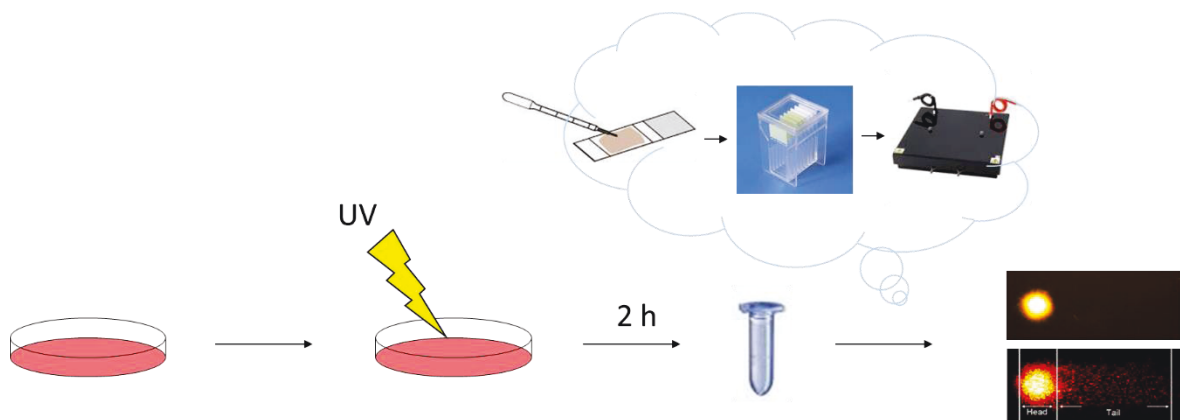
4.4.5 DNA-Reparatur

Zur Untersuchung der Reparaturkapazität kam ebenfalls die Methode des Comet Assays zum Einsatz, jedoch in einer modifizierten Form. Das Prinzip dieser veränderten Methode basiert darauf, dass Zellen initial einer UV-Strahlung ausgesetzt werden, die DNA-Schäden induziert. Durch die Reparatur dieser Schäden entstehen DNA-Strangbrüche, die durch Mechanismen der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behoben werden können. Teil dieser Reparaturprozesse ist die Neusynthese kurzer DNA-Stränge, die durch Reparaturinhibitoren gehemmt werden kann. Als Positivkontrolle für den Endpunkt DNA-Reparatur wurde daher der Reparaturinhibitor Aphidicolin (APH) eingesetzt. APH inhibiert dabei im Besonderen die DNA-Polymerase α während der Replikation, hemmt jedoch nicht die Synthese von RNA und Proteinen. Dadurch bleiben die induzierten DNA-Strangbrüche bestehen und können im Comet Assay quantifiziert werden.

Zur Induktion von DNA-Schäden wurden die Proben mit 15 J/m^2 bestrahlt und nachfolgend 2 h inkubiert, sodass eine potentielle Reparatur stattfinden konnte. Für die Mobilfunk-exponierten Proben bedeutete dies, dass die Exposition 2 h vor dem Ende unterbrochen und die Zellen mit UV bestrahlt wurden, bevor die Exposition fortgesetzt werden konnte. Der zeitliche Ablauf ist schematisch in Abbildung 15 dargestellt.

Die sich anschließende Aufarbeitung und Auswertung der Proben für den Comet Assay erfolgte auf die gleiche Weise wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben.

(a)



(b)

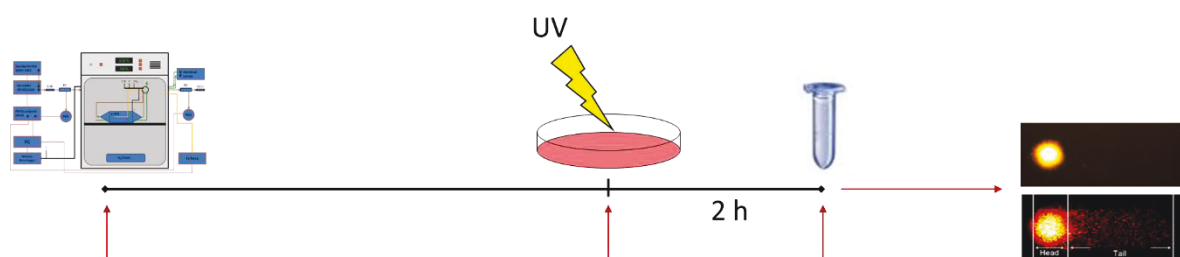


Abbildung 15: Arbeitsschritte der Methode zur Quantifizierung der Reparaturkapazität. (a) Für die Kontrollen werden Zellen ausgesät, mit UV-Strahlung der Intensität 15 J/m^2 bestrahlt und für 2 h im Brutschrank nachinkubiert. (b) Die Exposition von RF-EMF-exponierten Zellen wird 2 h vor Expositionsende unterbrochen, die Zellen mit UV-Strahlung der gleichen Intensität behandelt und die Exposition fortgesetzt. Nach Ablauf der 2-stündigen Inkubation (ohne/mit RF-EMF) erfolgt sowohl für die Kontroll-Zellen als auch für die exponierten Zellen die Aufarbeitung der Proben entsprechend den Arbeitsschritten für den Comet Assay (Einbetten der Zellen in Agarose, Transfer auf beschichtete Objektträger, Lyse, Elektrophorese). Mittels Software-gestützter Mikroskopie können die DNA-Schäden im Schweif quantifiziert werden; je mehr DNA-Schäden detektiert werden, desto schlechter ist die Reparaturkapazität in den entsprechenden Zellen.

4.4.6 Differenzierung

Der Differenzierungsstatus der untersuchten Zellen wurde über die durchflusszytometrische Messung des Oberflächenantigens CD11b bestimmt. Zellen, die in Richtung der granulozytären Linie während der Hämatopoese differenzieren, exprimieren auf ihren Oberflächen mehr CD11b-Protein als weniger ausgereifte Zellen. Diese Oberflächenantigene lassen sich mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper detektieren und im Anschluss durchflusszytometrisch nachweisen. Je mehr CD11b-Antigene vorhanden sind, desto höher ist die gemessene Fluoreszenz. Abbildung 16 veranschaulicht schematisch den Unterschied zwischen undifferenzierten und stärker differenzierten Zellen hinsichtlich der CD11b-Expression und wie sich dieser Zustand bei der Messung äußert.

Undifferenzierte Zellen zeigen im Histogramm einen relativ schmalen Peak (grüne Kurve). Mit zunehmender Fluoreszenz verbreitert sich dieser Peak jedoch und führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz (pinkfarbene Kurve).

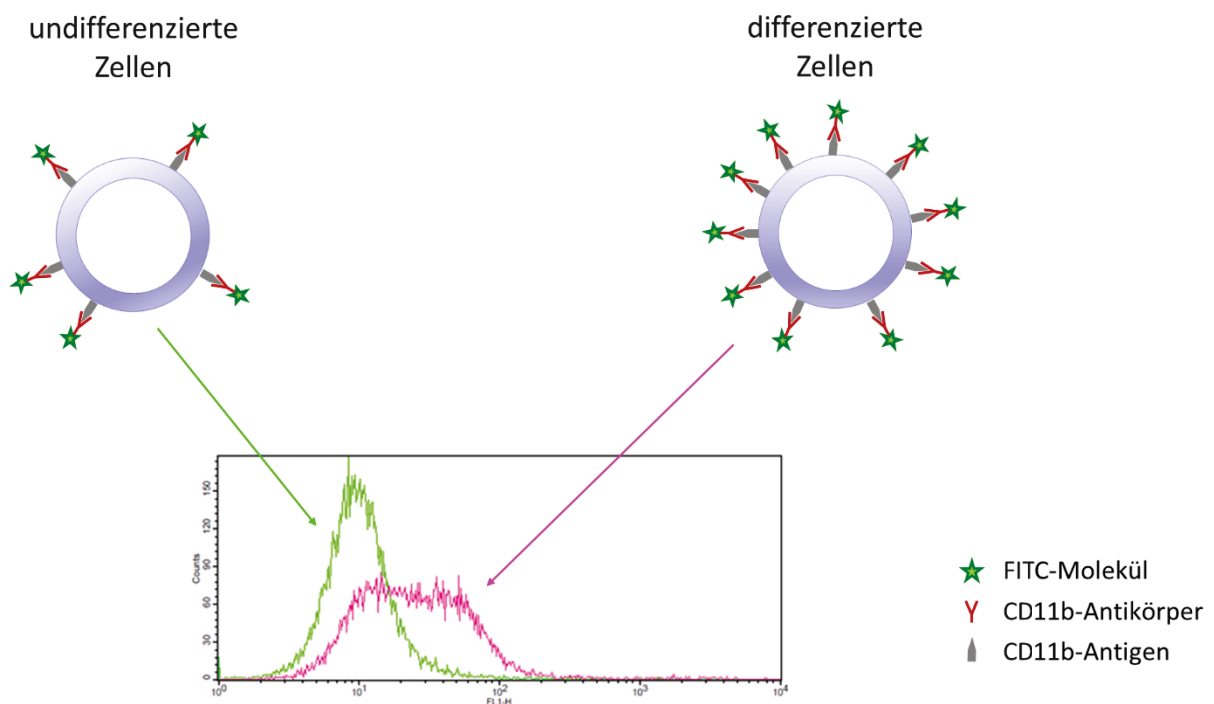


Abbildung 16: Schematische Darstellung zur Funktionsweise der CD11b-Detektion als Marker für den Differenzierungsstatus der Zellen. Mit zunehmender Differenzierung in Richtung der granulozytären Linie nimmt auch die Anzahl der CD11b-Oberflächenantigene auf den Zellen zu. Daher können bei stärker ausdifferenzierten Zellen mehr Antikörper auf der Zelloberfläche binden als bei undifferenzierten Zellen (grüne Kurve), was sich in einer höheren Fluoreszenz im Durchflusszytometer äußert (pinkfarbene Kurve).

Für die Markierung der Zellen mit dem CD11b-Antikörper wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl PBS/BSA-Puffer (1x PBS mit 1 % BSA) aufgenommen. Die Zugabe von 5 % Goat-Serum bewirkte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen; hierfür lag die Inkubationszeit bei einer Stunde (RT). Im Anschluss wurde 1 µl Antikörperlösung (Anti-human CD11b Clone ICRF44, 0,5 mg/ml; BioLegend; San Diego, US/CA) direkt zur Zellsuspension gegeben (entspricht einer Verdünnung von etwa 1:100) und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Proben wurden mit jeweils 500 µl PBS/BSA-Puffer 2-mal gewaschen und durch Zugabe des Sekundärantikörpers (Anti-mouse IgG Fab2; Cell Signaling Technology; Danvers, US/MA) eine erneute einstündige Inkubationsphase im Dunkeln (RT) eingeleitet. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte 1:1000 in PBS/BSA-Puffer. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben durch einen wiederholten Waschschriff mit jeweils 500 µl PBS/BSA-Puffer (Zentrifugation bei 4 °C) von den nicht-gebundenen Antikörpermolekülen befreit, in 500 µl PBS/BSA-Puffer resuspendiert und bis zur Messung auf Eis lichtgeschützt gelagert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am LSR (BD; Heidelberg, DE). Insgesamt wurden 20.000 Ereignisse aufgezeichnet und lebende Zellen für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität herangezogen.

4.4.7 Histonacetylierung

Bei epigenetischen Effekten handelt es sich um Veränderungen, die nicht auf einer Änderung der DNA-Sequenz beruhen, aber dennoch zu einer veränderten Aktivität unterschiedlicher Gene führen können. Neben der DNA-Methylierung spielt hier besonders die Veränderung der Histone eine Rolle, da diese direkt mit der Transkription korreliert [157]. Im Allgemeinen findet durch die Acetylierung von Histonproteinen eine Öffnung statt, so dass RNA-Polymerasen Zugang zu den Genen haben und die Transkription ermöglicht wird (Abbildung 17). Histon H3 ist eines der fünf Haupthistone und u. a. für die Struktur der Nukleosomen verantwortlich. Die Acetylierung von Lysin 9 ist oft mit erhöhter Transkription assoziiert.

Als Endpunkt für epigenetische Wirkungen sollten daher Histonmodifikationen untersucht werden. Eine geeignete Methode hierfür stellte die durchflusszytometrische Quantifizierung der Acetylierung von Histon H3 dar.

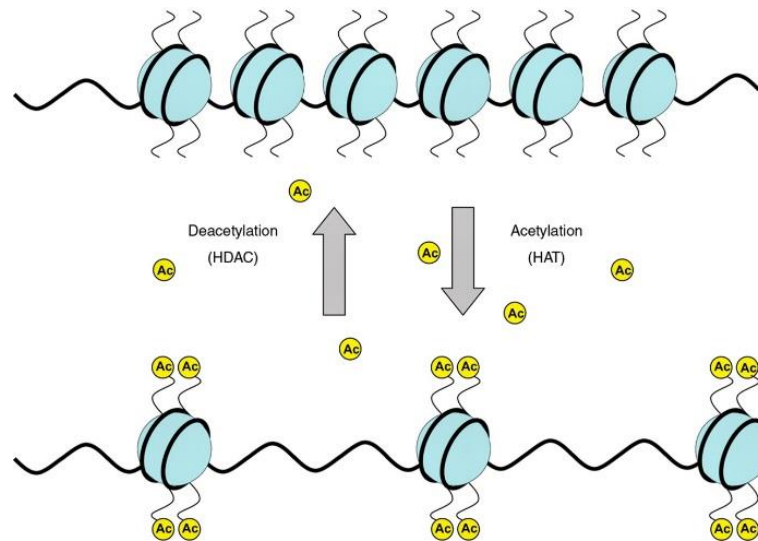


Abbildung 17: Mechanismus der Histonacetylierung als epigenetische Veränderung von Histonproteinen. Die Acetylierung der Histone an definierten Strukturen erfolgt durch Histon-Acetyltransferasen (HAT) und resultiert in einer offeneren Chromatinstruktur. Diese ist leichter zugänglich für Transkriptionsfaktoren und resultiert in einer transkriptionellen Aktivierung der Gene. Die Deacetylierung der Histonproteine durch Histon-Deacetylasen (HDAC) resultiert dagegen in einer dichter gepackten Chromatinstruktur, sodass weniger Gene abgelesen werden können. Mit Genehmigung von: *Oxford University Press*, publiziert in Pons *et al.* [158].

Für die Quantifizierung der Histonacetylierung wurden die zu untersuchenden Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zwei Waschschrritten mit 1x PBS folgte die Fixierung und Permeabilisierung der HSZ in 300 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung (BD; Heidelberg, DE) für 1 h auf Eis. Anschließend wurden die Zellpellets 2-mal mit 1x Perm/Wash-Puffer (BD; Heidelberg, DE) gewaschen und in 100 µl PBS/BSA-Puffer (1x PBS mit 1 % BSA) aufgenommen. Die Aufarbeitung der HL-60-Zellen startete direkt mit dem Resuspendieren des Zellpellets in 100 µl PBS/BSA-Puffer, eine Fixierung fand hier nicht statt. Die Zugabe von 5 % Goat-Serum für 1 h bei RT bewirkte die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen. Im Anschluss wurde 1 µl der Antikörperlösung (Acetyl-Histone H3 (Lys9) Rabbit mAB (Alexa Fluor 488 Conjugate), 2 mg/ml; Cell Signaling Technology; Danvers, US/MA) direkt zur Zellsuspension zugegeben und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Dies entsprach einer 1:100-Verdünnung der Antikörperlösung und damit einer finalen Konzentration von 20 µg/ml. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben 2-mal mit jeweils 500 µl PBS/BSA-Puffer gewaschen, in 500 µl des gleichen Puffers aufgenommen und bis zur Analyse am Durchflusszytometer FACScan (BD; Heidelberg, DE) lichtgeschützt auf Eis gelagert. Insgesamt wurden je Messung

20.000 Ereignisse aufgezeichnet und lebende Zellen für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität herangezogen.

4.5 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden unabhängig voneinander 3-mal für jede Modulation, Intensität und Expositionsdauer wiederholt ($n=3$). Die Durchführung der Kontrollen erfolgte 1-mal wöchentlich für jeden untersuchten Endpunkt, sodass die Anzahl der Kontrollen für die HL-60-Zellen $n \geq 28$ und für die HSZ $n \geq 8$ betrug. Die Voruntersuchungen zur Etablierung der Positivkontrollen wurden ebenfalls mindestens 3-mal durchgeführt.

Die statistische Analyse wurde mit der Software IBM SPSS Statistics 23 (IBM; Armonk, US/NY) realisiert. Aufgrund der niedrigen Anzahl an Replikaten, war ein Test auf Normalverteilung der Daten nicht möglich. Bei den Expositionsuntersuchungen diente zunächst der globale, nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test dazu, die fünf untersuchten Intensitäten (0, 0,5, 1, 2, 4 W/kg) jeder Modulation untereinander zu vergleichen. Im Fall von signifikanten Unterschieden, wurden anschließend die SAR-Werte 0,5, 1, 2 und 4 W/kg einzeln gegen die Sham-Exposition (0 W/kg) mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test getestet. Positivkontrollen wurden direkt über den Mann-Whitney-U-Test mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen verglichen. Die untersuchten Daten waren dann signifikant voneinander verschieden, wenn ein p-Wert $\leq 0,05$ vorlag.

5 ERGEBNISSE

5.1 Etablierung der Positivkontrollen

Bevor die Expositionsexperimente mit den drei unterschiedlichen Modulationen durchgeführt werden konnten, mussten entsprechende Substanzen für die Positivkontrollen der jeweiligen Endpunkte identifiziert werden. Diese Untersuchungen erfolgten zunächst mit HL-60-Zellen und wurden im Anschluss, soweit möglich, auf die Stammzellen übertragen. Für die meisten Endpunkte konnten bei den Stammzellen gleiche Substanzen und Methoden angewandt werden. Vereinzelt war eine andere Konzentration, Inkubationszeit oder sogar Substanz notwendig.

5.1.1 Apoptose

Die Quantifizierung von frühen Apoptosen (Annexin-V⁺ / PI⁻) erfolgte durchflusszytometrisch. Untersucht wurden Substanzen wie Mitomycin, Etoposid, Staurosporin und Natriumarsenit (NaAsO₂), mit verschiedenen Konzentrationen und Behandlungszeiten. Dabei stellte sich heraus, dass Behandlungen mit Mitomycin und Etoposid vorwiegend zu spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen führten, Zellen im frühen apoptotischen Stadium jedoch nicht detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Durch Behandlung mit Staurosporin konnte zwar eine Zunahme an frühen Apoptosen induziert werden, jedoch führten Untersuchungen mit NaAsO₂ zu konsistenteren Ergebnissen.

Um eine möglichst optimale Behandlung der Zellen mit dieser Substanz festlegen zu können, wurden zunächst die Zeitabhängigkeit und anschließend die Konzentrationsabhängigkeit von NaAsO₂ getestet. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit von NaAsO₂ in einer Konzentration von 100 µM sind in Abbildung 18 präsentiert. Analysiert wurden in drei voneinander unabhängigen Replikaten Behandlungszeiten von 4, 6 und 16 h.

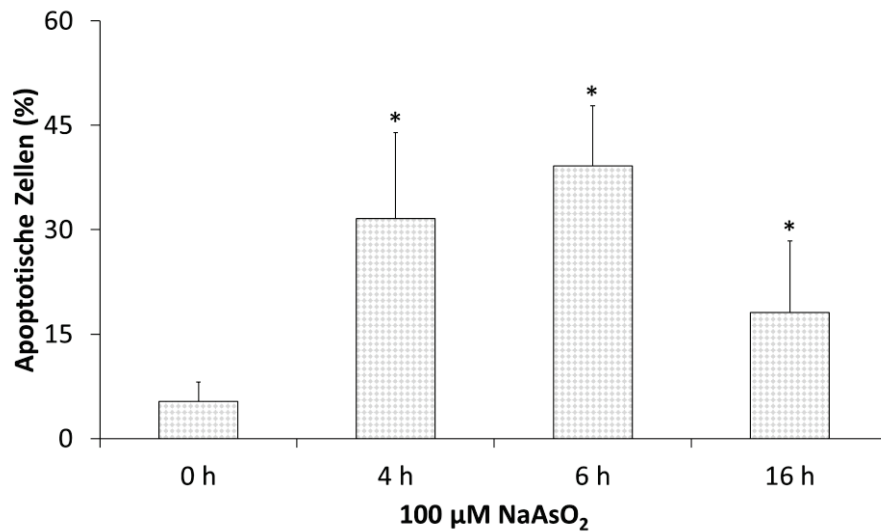


Abbildung 18: Quantifizierung früh auftretender Apoptosen in HL-60-Zellen nach einer Behandlung mit 100 µM NaAsO₂ für 4, 6 und 16 h aus drei unabhängigen Replikaten (*: p≤0,05 gegen 0 h).

Für alle drei Inkubationszeiten konnte eine gesteigerte Anzahl an früh-apoptotischen Zellen erzielt werden. Dabei führte die 4- und 6-stündige Behandlungszeit zu deutlich mehr Apoptosen als dies bei 16 h der Fall war. Die Abnahme bei t=16 h ließ sich durch die vermehrte Zunahme an nekrotischen Zellen erklären. Ein geeignetes Zeitfenster zur Bestimmung früh auftretender Apoptosen befand sich demnach zwischen 4 h und 6 h. Für folgende Untersuchungen mit HL-60-Zellen wurde daher eine Behandlungszeit von 6 h festgelegt. Die sich anschließende Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung lieferte folgendes Ergebnis (Abbildung 19).

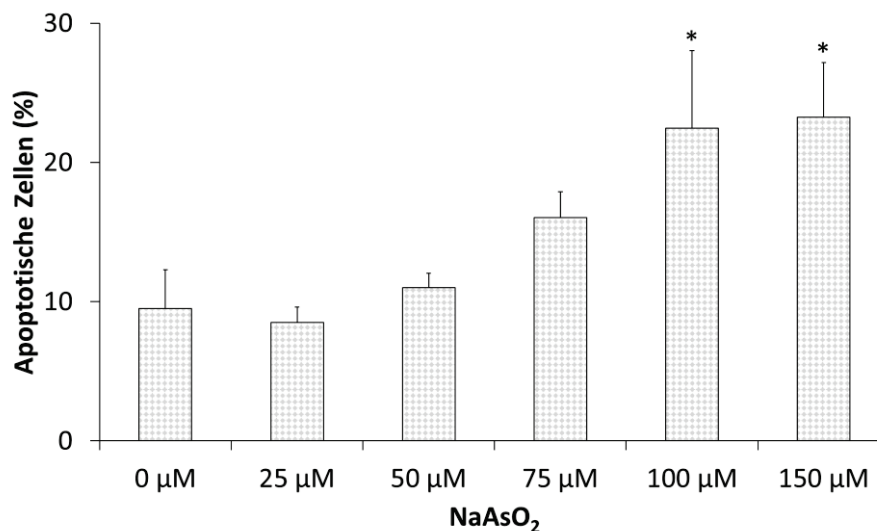


Abbildung 19: Quantifizierung früh auftretender Apoptosen in HL-60-Zellen nach einer Behandlungszeit von 6 h mit unterschiedlichen NaAsO₂-Konzentrationen aus drei unabhängigen Replikaten (*: p≤0,05 gegen 0 µM).

Aus Abbildung 19 wird ersichtlich, dass die Erhöhung der NaAsO₂-Konzentration eine Zunahme an apoptotischen Zellen im frühen Stadium bewirkte. Während bei der kleinsten gewählten Konzentration (25 µM) noch kein Effekt sichtbar war, lag der Anteil an apoptotischen Zellen für die beiden höchsten Konzentrationen (100 und 150 µM) bei annähernd 25 %.

Für die folgenden Untersuchungen wurde daher eine Konzentration von 100 µM mit einer 6-stündigen Behandlungszeit gewählt.

5.1.2 Oxidativer Stress

Als Maß für den oxidativen Stress wurde der Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies untersucht. Hierbei kam die in 4.4.2 beschriebene durchflusszytometrische Methode mit der indirekten ROS-Bestimmung über die Bildung von DCF zum Einsatz. Als potentielle Substanzen für die Positivkontrolle dienten Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO), die, eingesetzt in unterschiedlichen Konzentrationen, folgende Dosis-Wirkungs-Beziehungen in HL-60-Zellen zeigten (Abbildung 20 und Abbildung 21). Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Replikaten gewonnen.

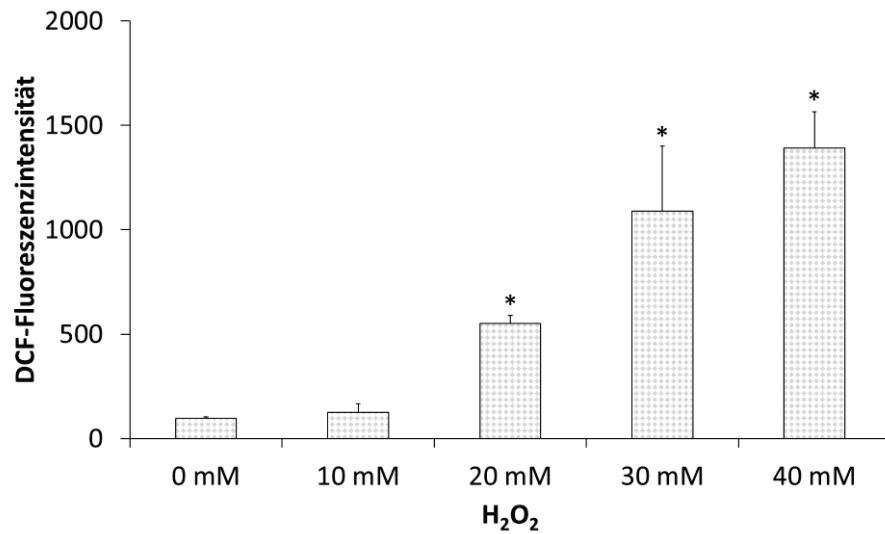


Abbildung 20: Quantifizierung des gebildeten DCFs als Maß für den Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies nach 30-minütiger Behandlung von HL-60-Zellen mit H₂O₂ in Konzentrationen zwischen 10 und 40 mM aus drei unabhängigen Replikaten (*: p≤0,05 gegen 0 mM).

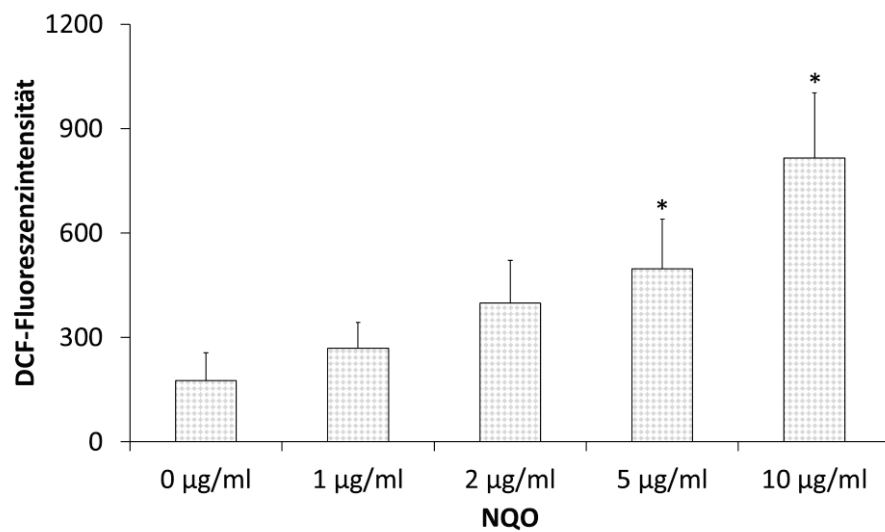


Abbildung 21: Quantifizierung des gebildeten DCF als Maß für reaktive Sauerstoffspezies nach 30-minütiger Behandlung von HL-60-Zellen mit NQO in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml aus drei unabhängigen Replikaten (*: p≤0,05 gegen 0 µg/ml).

Für beide Substanzen lag eine deutliche Dosisabhängigkeit vor. Für NQO fiel die Reaktion insgesamt etwas schwächer aus als für H₂O₂, mit durchweg niedrigeren DCF-Fluoreszenzintensitäten. Für H₂O₂ zeigte eine Konzentration von 20 mM, für NQO 5 µg/ml einen signifikanten Unterschied gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Für alle weiteren Untersuchungen wurde für die HL-60-Zellen H_2O_2 als Positivkontrolle in der Konzentration 20 mM verwendet. Für die HSZ erwies sich NQO als besser geeignet. Da mit einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nur ein leichter oxidativer Stress in diesen Zellen induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt), erfolgte die Behandlung der Kontrollen mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.1.3 Zellzyklus-Analyse

Bei der Suche nach einer geeigneten Substanz für die Positivkontrolle in den Zellzyklusuntersuchungen erwiesen sich Nocodazol (NOC) und Hydroxyharnstoff (HU) als geeignet. Während NOC zu einem G2/M-Arrest der Zellen führt, indem es an die Mikrotubuli bindet und so den Anbau weiterer Tubulin-Untereinheiten und damit das weitere Wachstum verhindert, bewirkt HU einen Arrest der Zellen in der G1-Phase durch Hemmung der DNA-Replikationsgabel. Beide Reaktionen sind reversibel, d. h. durch Entfernen der Substanzen kann der ursprüngliche Zustand wieder hergestellt werden. In der durchflusszytometrischen Messung zeigte sich ein G2/M- bzw. G1-Arrest nach NOC- bzw. HU-Behandlung in Histogrammen wie sie in Abbildung 22 veranschaulicht sind.

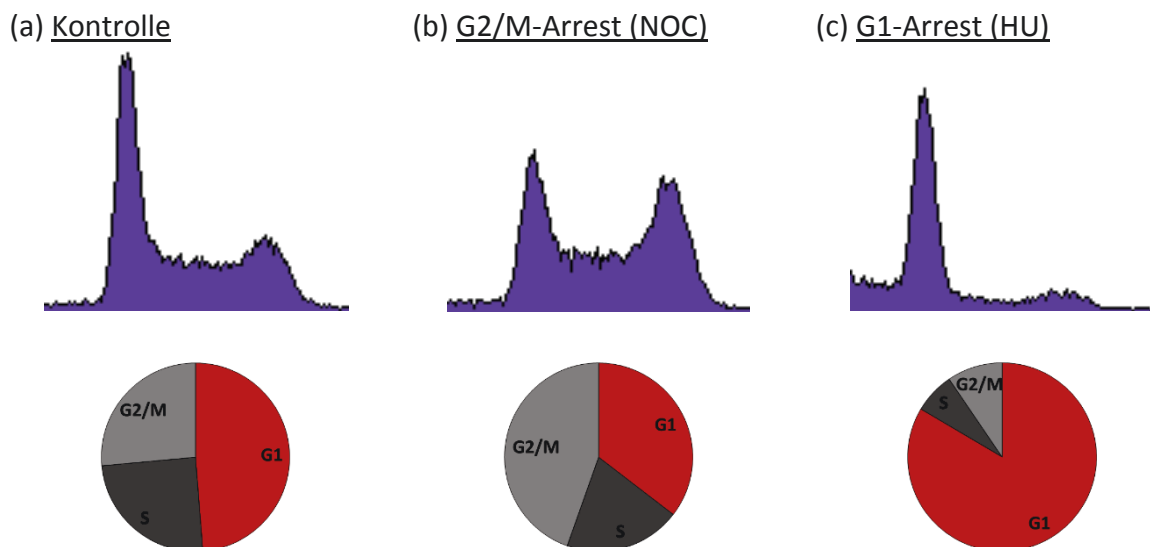


Abbildung 22: Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Messung und prozentuale Darstellung der drei unterschiedlichen Zellzyklusphasen von unbehandelten (a), mit 0,1 μM NOC (b) und 1 mM HU (c) behandelten HL-60-Zellen.

Von beiden Substanzen wurden unterschiedliche Konzentrationen mit einer Behandlungszeit von 4 h analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse aus drei unabhängigen Testläufen sind in den folgenden Abbildungen (Abbildung 23 und Abbildung 24) präsentiert.

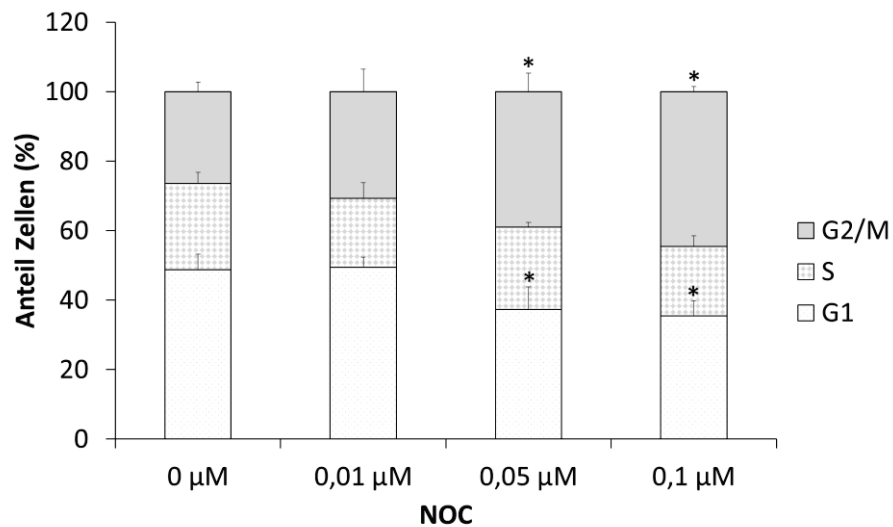


Abbildung 23: Quantifizierung des prozentualen Anteils der sich in den drei Zellzyklusphasen G1, S und G2/M befindenden HL-60-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen NOC-Konzentrationen aus drei unabhängigen Replikaten (*: $p \leq 0,05$ gegen $0 \mu\text{M}$).

Wie aus Abbildung 23 ersichtlich wird, konnte eine klare Dosisabhängigkeit beobachtet werden. Mit zunehmender NOC-Konzentration stieg die Anzahl der Zellen in der G2/M-Phase signifikant an und nahm in der G1-Phase signifikant ab. Bei der höchsten verwendeten Konzentration befanden sich fast 20 % mehr Zellen in der G2/M-Phase als in der unbehandelten Kontrolle (ca. 25 %). Dagegen zeigte sich keine merkliche Veränderung bei der Anzahl der Zellen in der S-Phase.

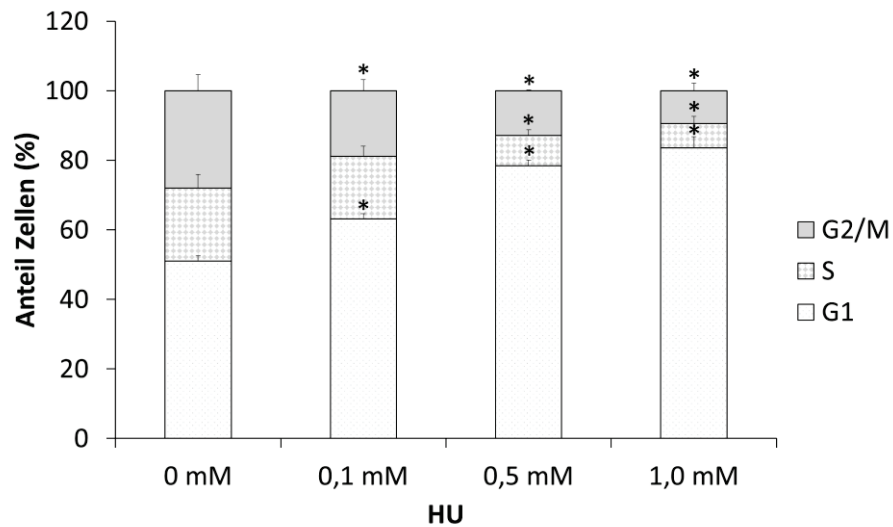


Abbildung 24: Quantifizierung des prozentualen Anteils der sich in den drei Zellzyklusphasen G1, S und G2/M befindenden HL-60-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen HU-Konzentrationen aus drei unabhängigen Replikaten (*: $p \leq 0,05$ gegen 0 mM).

Auch durch die Behandlung mit HU konnte ein klarer Effekt erzielt werden, der sich bei der höchsten untersuchten Konzentration mit ungefähr 80 % der Zellen in der G1-Phase und zunehmend weniger Zellen in der G2/M-Phase äußerte. Im Vergleich zu NOC fiel auf, dass die S-Phase nach der Behandlung mit HU nicht konstant blieb. Auch hier wurde eine signifikante Veränderung, in Form einer Abnahme, mit zunehmender HU-Konzentration beobachtet.

Für die folgenden Untersuchungen wurde NOC als Positivkontrolle mit einer Konzentration von 0,1 μM festgelegt.

5.1.4 DNA-Schaden

Für die Untersuchung der Gentoxizität wurde Methylmethansulfonat (MMS) als potentielle Positivkontrolle ausgewählt. Die Detektion der DNA-Schäden erfolgte mit der Comet-Assay-Methode. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung für Konzentrationen im Bereich von 50-150 μM nach 4-stündiger Behandlung ist in Abbildung 25 veranschaulicht. Bei den Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Replikaten.

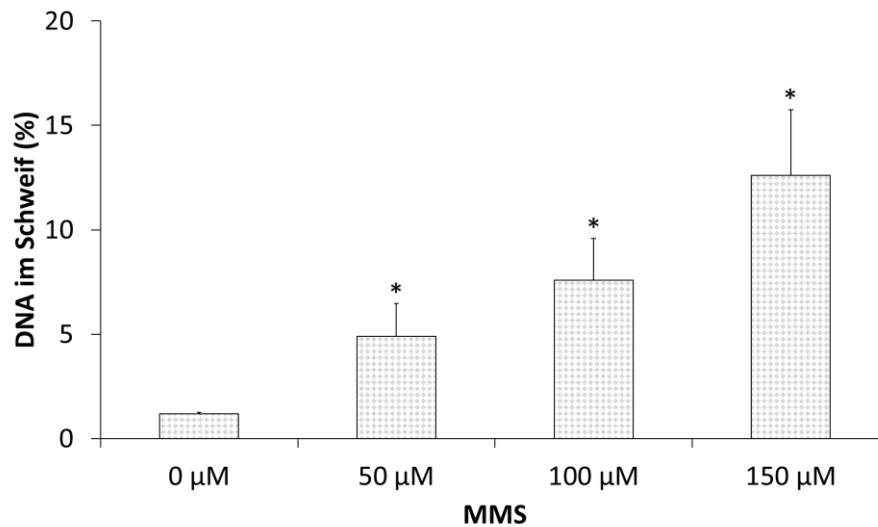


Abbildung 25: Quantifizierung des DNA-Schadens nach 4-stündiger Behandlung von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen MMS-Konzentrationen aus drei unabhängigen Replikaten (*: $p \leq 0,05$ gegen 0 μM).

Bereits für die kleinste untersuchte Konzentration von 50 μM konnte eine signifikante Erhöhung an DNA-Schäden mit dem Comet Assay detektiert und für alle höheren Konzentrationen weiter gesteigert werden. Mit knapp 5 % geschädigter DNA lag diese Probe annähernd 5-mal höher als die unbehandelte Kontrolle. Bei 150 μM wurde sogar eine mehr als 10-fache Erhöhung erzielt (ungefähr 13 %). Daher kam für die Positivkontrolle der weiteren Untersuchungen die Konzentration 150 μM zum Einsatz. Diese erwies sich auch für die HSZ als sehr gut geeignet.

In Abbildung 26 sind repräsentative Aufnahmen von der mikroskopischen Auswertung des Comet Assays für beide Zellarten gegenübergestellt. Gezeigt sind jeweils in Agarose eingebettete Zellkerne von HL-60-Zellen (a, b) und HSZ (c, d) ohne Behandlung (a, c) und nach Induktion von DNA-Schäden in Form von Doppel- und Einzelstrangbrüchen mit 150 μM MMS (b, d). Zur Quantifizierung wurde der prozentuale Anteil der DNA-Bruchstücke im Schweif herangezogen.

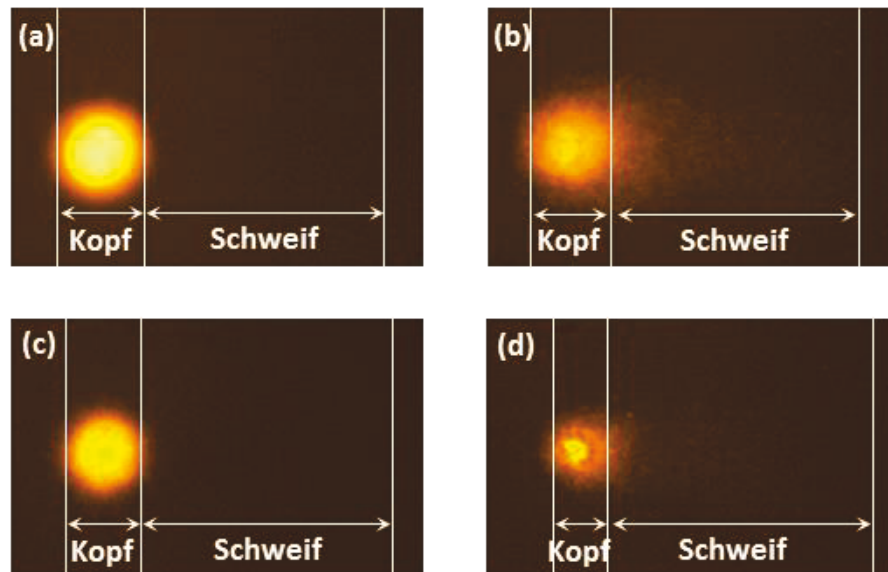


Abbildung 26: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von in Agarose-eingebetteten Zellkernen von HL-60-Zellen (a, b) und HSZ (c, d) mit intakter DNA (a, c) und mit beschädigter DNA nach Behandlung mit 150 μM MMS (b, d).

5.1.5 DNA-Reparatur

Als potentielle Positivkontrolle, die eine Inhibierung der DNA-Reparatur bewirkt, wurde Aphidicolin recherchiert. Für diese Untersuchungen wurden HL-60-Zellen einer initialen UV-Strahlung unterschiedlicher Intensität (5-40 J/m^2) ausgesetzt und mit 15 μM APH behandelt. Um eine potentielle DNA-Reparatur zu ermöglichen, folgte im Anschluss an die UV-Strahlung eine 2-stündige Inkubation. Entsprechende Kontrollen ohne APH-Behandlung wurden ebenfalls mitgeführt.

Die Quantifizierung erfolgte mit dem Comet Assay; die aus drei unabhängigen Replikaten erhaltenen Daten sind in der folgenden Abbildung 27 gezeigt.

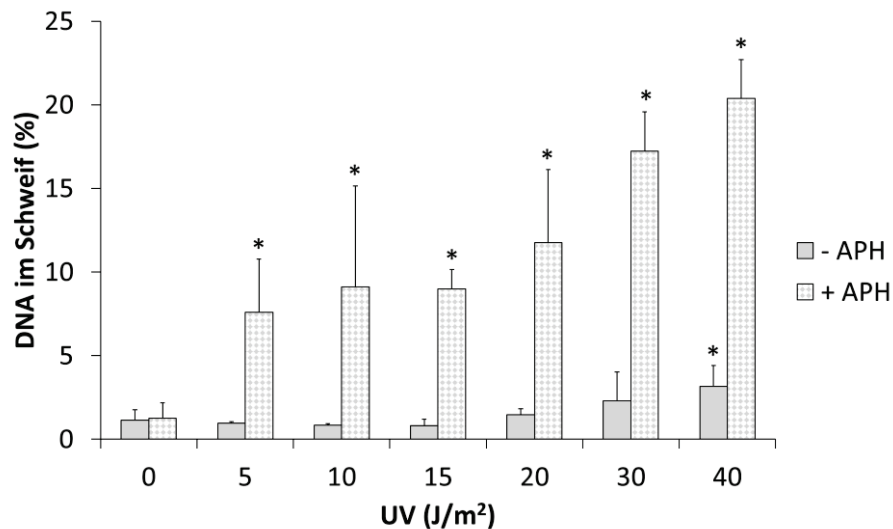


Abbildung 27: Quantifizierung des DNA-Schadens in HL-60-Zellen nach Behandlung mit UV-Strahlung unterschiedlicher Intensitäten, mit und ohne Zugabe des Reparaturinhibitors APH aus drei unabhängigen Replikaten (*: $p \leq 0,05$ gegen 0 J/m^2).

Aus den Ergebnissen in Abbildung 27 wird ersichtlich, dass eine Behandlung mit APH alleine keine Erhöhung der DNA-Strangbrüche hervorrief. Auch die Untersuchungen mit UV-Strahlung alleine führten nur zu einem geringfügigen Anstieg der DNA-Schäden, die bei der höchsten untersuchten UV-Dosis von 40 J/m^2 signifikant ausfielen. Bei Kombination beider Noxen (UV+APH) konnte jedoch eine deutliche Beeinflussung der Reparaturkapazität hervorgerufen werden. Hier zeigte sich mit steigender Intensität der UV-Strahlung auch ein Anstieg an DNA-Schäden.

Auch für die HSZ erwies sich diese Positivkontrolle als geeignet. Für die folgenden Untersuchungen dieses Endpunkts wurden daher alle Positivkontrollen im Anschluss an eine UV-Bestrahlung mit 15 J/m^2 mit $15 \mu\text{M}$ APH behandelt.

5.1.6 Differenzierung

Zur Identifizierung einer geeigneten Positivkontrolle für den Endpunkt Differenzierung wurden unterschiedliche Substanzen untersucht. Eine Differenzierung der HL-60-Zellen in Richtung Granulozyten soll unter anderem durch die Substanzen Dimethylsulfoxid (DMSO), Retinsäure (RA) und Natriumbutyrat induziert werden [159, 160]. Die Quantifizierung erfolgte durchflusszytometrisch über das Oberflächenantigen CD11b. Die Zellen wurden zunächst mit den drei Substanzen für drei und sechs Tage inkubiert. Die erhaltenen Ergebnisse aus drei (3 d) bzw. vier (6 d) unabhängigen Replikaten können Abbildung 28 entnommen werden.

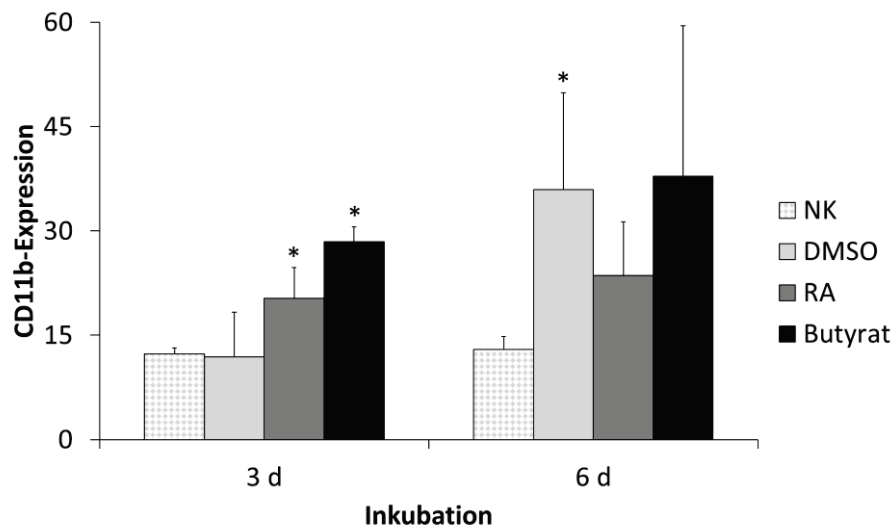


Abbildung 28: Quantifizierung des Differenzierungsstatus von HL-60-Zellen über das Oberflächenantigen CD11b nach 3- und 6-tägiger Inkubation mit DMSO (1,25 %), RA (1 μ M) und Natrium-Butyrat (0,1 mM) aus drei (3 d) bzw. vier (6 d) unabhängigen Replikaten (*: $p \leq 0,05$ gegen NK).

Verglichen mit der Kontrolle konnte prinzipiell durch jede Substanz eine Induktion der CD11b-Expression bewirkt werden. Nach drei Tagen der Behandlung war die Expression für Na-But mehr als doppelt so hoch wie bei der Kontrolle, ließ sich aber durch weitere drei Tage Inkubation nur noch geringfügig steigern. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für RA erzielt, wobei hier die Werte insgesamt etwas niedriger waren als bei Na-But. Für DMSO zeigte sich nach drei Tagen der Differenzierung keine Veränderung in der CD11b-Expression, wohingegen nach 6-tägiger Inkubation ein deutlicher Anstieg auf das Dreifache der Kontrolle zu verzeichnen war. Um noch eine stärkere CD11b-Expression zu erzielen, wurde eine weitere Versuchsreihe allein mit DMSO durchgeführt und dabei die Differenzierungszeit auf sieben Tage erhöht. Abbildung 29 veranschaulicht die Veränderung des Differenzierungsstatus im Verlauf einer gesamten Woche, wobei alle zwei Tage eine Quantifizierung erfolgte ($n=3$).

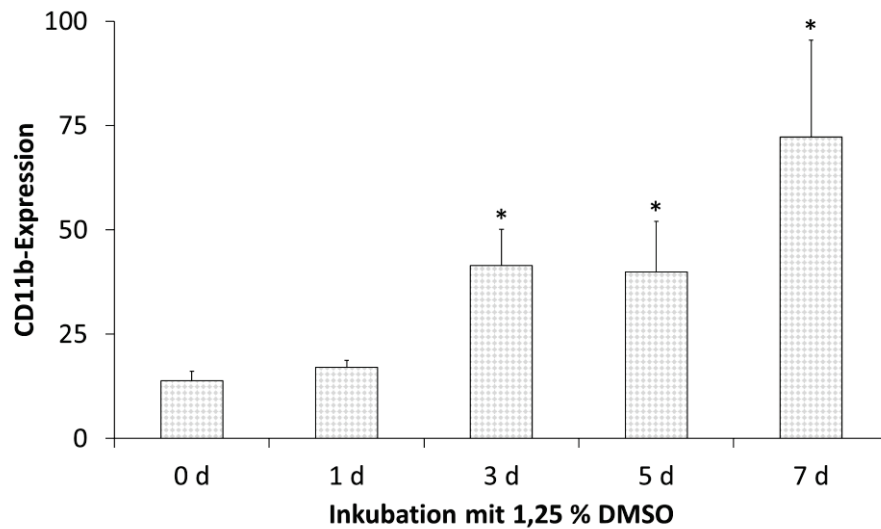


Abbildung 29: Quantifizierung der CD11b-Expression in HL-60-Zellen nach 1-, 3-, 5- und 7-tägiger Inkubation mit DMSO (1,25 %) aus drei unabhängigen Replikaten (*: $p \leq 0,05$ gegen NK).

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich, nahm die Expression des Oberflächenantigens CD11b mit zunehmender Inkubationszeit der Zellen mit 1,25 % DMSO deutlich zu. Während bei dieser Versuchsreihe bereits nach drei Tagen eine 3-fache Erhöhung erzielt werden konnte, exprimierten die Zellen nach sieben Tagen 5-mal mehr CD11b als derjenigen der unbehandelten Kontrolle.

Da eine Differenzierung der Zellen in Richtung der granulozytären Linie laut Literatur nicht nur mit der veränderten Expression von Oberflächenmarkern einhergeht, sondern auch mit einer morphologischen Veränderung des Zellkerns, wurde zusätzlich eine Kernfärbung der unbehandelten Probe und der Probe nach sieben Tagen Differenzierung durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 30 zu sehen.

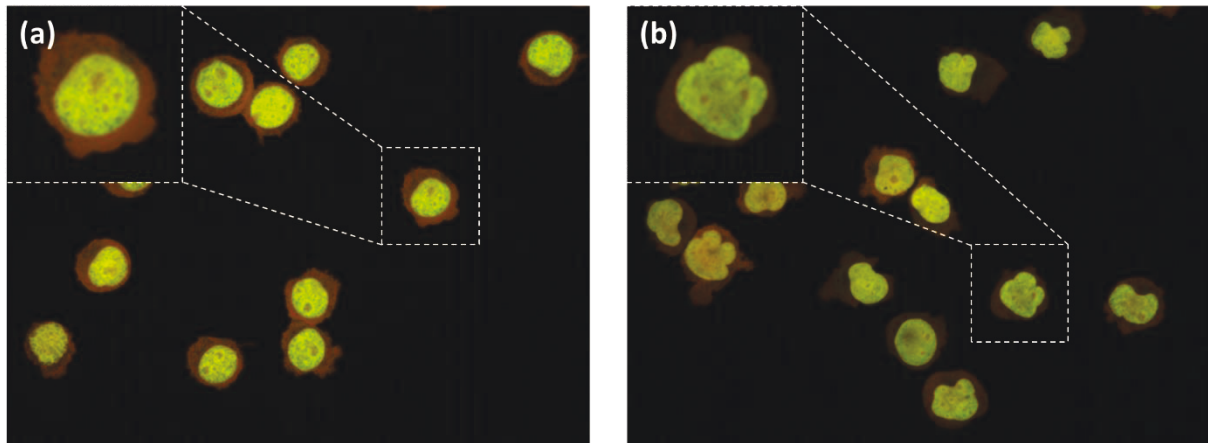


Abbildung 30: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von undifferenzierten (a) und nach 7-tägiger Behandlung mit DMSO ausdifferenzierten HL-60-Zellen (b). Grün: Zellkern, orange: Zytoplasma

Auch an der Morphologie des Zellkerns konnte im Verlauf der Differenzierung eine eindeutige Veränderung beobachtet werden. Nach sieben Tagen Differenzierung mit DMSO zeigte die Mehrheit aller Zellkerne auffällige Verformungen auf, wie dies in stärkerer Ausprägung auch in ausdifferenzierten Granulozyten vorzufinden ist. Gemeinsam mit den Befunden der durchflusszytometrischen Messungen wiesen diese Ergebnisse deutlich auf einen veränderten Differenzierungsstatus der Zellen nach Inkubation mit DMSO hin. Für alle folgenden Untersuchungen wurde demnach DMSO mit 1,25 % und sieben Tagen Behandlungszeit als Positivkontrolle für die HL-60-Zellen definiert.

Als Positivkontrolle für die Stammzellen musste eine andere Substanz identifiziert werden, da mit keiner der oben genannten Chemikalien (DMSO, RA, Na-But) eine vermehrte CD11b-Expression induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Problematisch zeigte sich hier vor allem die für eine ausreichende Differenzierung notwendige Dauer der Substanzinkubation. Im Gegensatz zu den HL-60-Zellen konnten die Stammzellen aufgrund ihrer geringen Lebensdauer nicht lange in Kultur gehalten werden, wodurch auch die Zeit für eine mögliche Differenzierung der Zellen sehr beschränkt war. Daher musste also eine Substanz gefunden werden, die innerhalb sehr kurzer Zeit eine erhöhte CD11b-Expression bewirkte.

In Vorversuchen konnte mit HL-60-Zellen die Chemikalie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als möglicher Kandidat für die PK der HSZ identifiziert werden. Mit einer 24-stündigen Inkubationszeit wurde folgende (Abbildung 31) Dosis-Wirkungs-Beziehung erhalten (n=4).

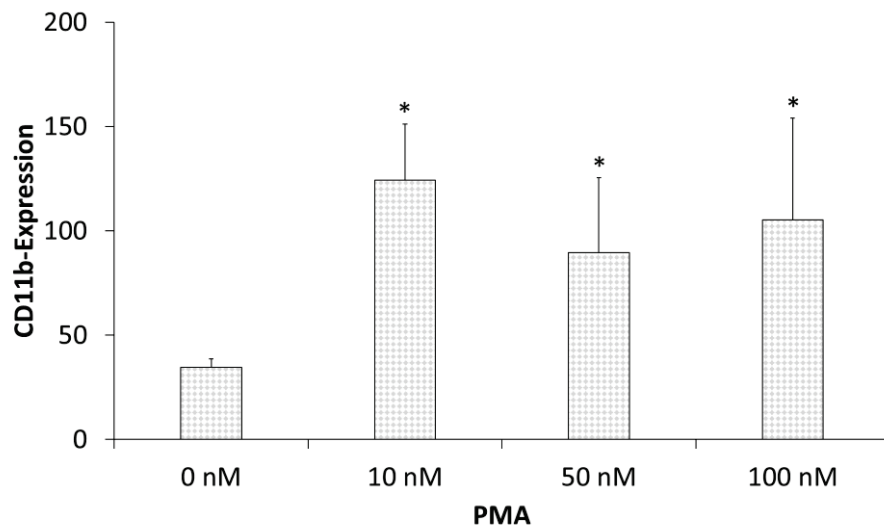


Abbildung 31: Quantifizierung der CD11b-Expression in HL-60-Zellen nach 24 h Inkubation mit PMA in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 50, 100 nM) aus vier unabhängigen Replikaten (*: $p \leq 0,05$ gegen 0 nM).

Durch Behandlung der Zellen mit PMA konnte ein deutlicher Anstieg der CD11b-Expression erzielt werden, der 4-fach höher ausfiel als in der unbehandelten Kontrolle. Mit steigender PMA-Konzentration zeigte sich jedoch keine weitere Erhöhung. Morphologische Veränderungen der Zellen in Kultur wurden ebenfalls beobachtet. Typische Aufnahmen von differenzierten und undifferenzierten HL-60-Zellen können Abbildung 32 entnommen werden.

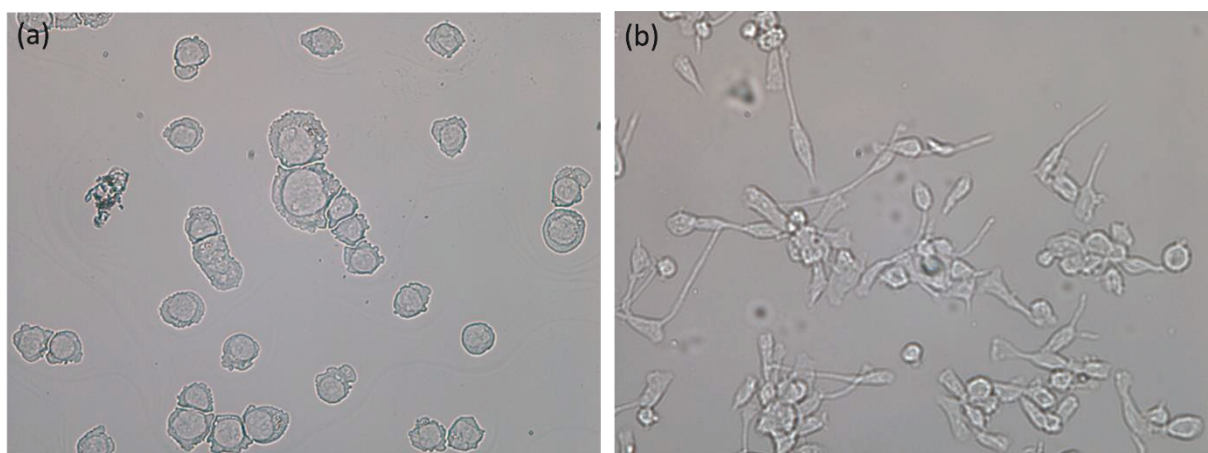


Abbildung 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten (a) und mit PMA behandelten HL-60-Zellen (b).

Während undifferenzierte Zellen eine rundliche Morphologie aufwiesen und vermehrt als Einzelzellen in Suspension vorzufinden waren, hatten PMA-differenzierte Zellen eine spindelförmige Morphologie und wuchsen adhärent in Kolonien auf der Oberfläche der Zellkulturgefäße. Aufgrund dieser Befunde wurde PMA in einer Konzentration von 10 nM und 24-stündiger Behandlung als PK für die HSZ festgelegt.

5.1.7 Histonacetylierung

Bei der Identifikation einer geeigneten Substanz, die epigenetische Veränderungen in Form von Histonacetylierungen bewirkt, wurde Trichostatin A untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen (200 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml) sowie zwei Behandlungszeiten (1 d bzw. 3 d) betrachtet. Die Ergebnisse zu diesen Experimenten, gewonnen aus drei unabhängigen Wiederholungen, sind in Abbildung 33 veranschaulicht.

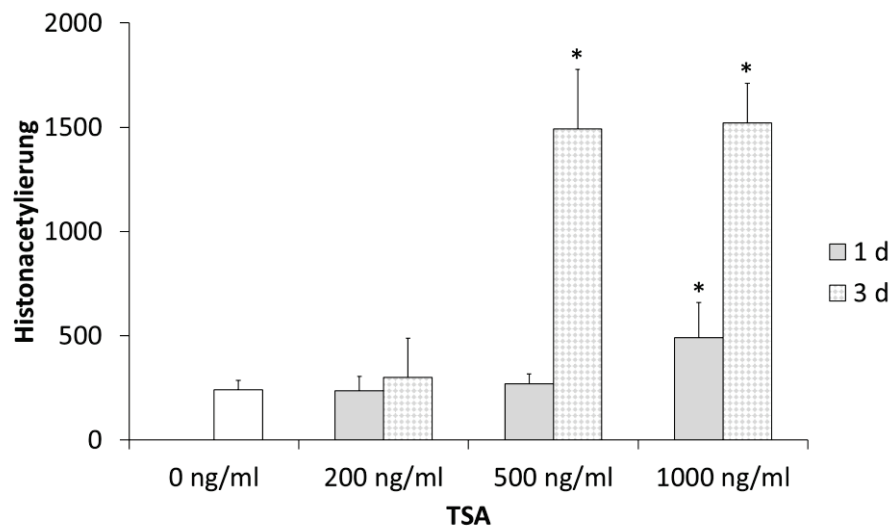


Abbildung 33: Quantifizierung der Histonacetylierung in HL-60-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen TSA-Konzentrationen für einen Tag (1 d) und für drei Tage (3 d) aus drei unabhängigen Replikaten (*: $p \leq 0,05$ gegen 0 ng/ml).

Deutliche Effekte hinsichtlich einer Erhöhung der Histonacetylierung in HL-60-Zellen konnten nach 3-tägiger Inkubation mit TSA für die Konzentrationen 500 ng/ml und 1000 ng/ml erzielt werden. Bei einer Behandlungszeit von einem Tag führte nur die höchste untersuchte Konzentration zu einem signifikanten Anstieg, der jedoch nur mit einer Verdopplung des Wertes einherging. Für die Stammzellen erwies sich die Konzentration 1000 ng/ml in Kombination mit einer 1-tägigen Behandlung als geeignet und wurde daher für die folgenden

Untersuchungen verwendet. Die Konzentration des TSA für die Behandlung der HL-60-Zellen lag bei 500 ng/ml mit einer Inkubationszeit von drei Tagen.

5.1.8 Übersicht der Positivkontrollen

Die nachfolgend dargestellte Tabelle 4 veranschaulicht die endgültig festgelegten Chemikalien für die einzelnen Endpunkte, unter Angabe der Konzentration, der Inkubationszeit und der entsprechenden Analyse-Methode.

Tabelle 4: Positivkontrollen für die untersuchten Endpunkte unter Angabe der eingesetzten Konzentration, Behandlungszeit und Untersuchungsmethode.

Endpunkt	Substanz	Konzentration	Behandlungszeit	Methode
<i>Apoptose</i>	NaAsO ₂	100 µM	6 h (HL-60) 4 h (HSZ)	Annexin-V
<i>Zellzyklus</i>	NOC	0,1 µM	4 h (HL-60) 6 h (HSZ)	DNA-Färbung
<i>Ox. Stress</i>	H ₂ O ₂ (HL-60) NQO (HSZ)	20 mM 10 µg/ml	30 min	DCF
<i>DNA-Schaden</i>	MMS	150 µM	4 h	Comet Assay
<i>DNA-Reparatur</i>	APH	15 µM	2 h	Comet Assay
<i>Differenzierung</i>	DMSO (HL-60) PMA (HSZ)	1,25 % 10 nM	7 d (HL-60) 1 d (HSZ)	CD11b
<i>Epigenetik</i>	TSA	500 ng/ml (HL-60) 1000 ng/ml (HSZ)	3 d (HL-60) 1 d (HSZ)	HAC

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die beiden Endpunkte „DNA-Schaden“ und „DNA-Reparatur“ die Behandlung der beiden Zellarten HL-60 und HSZ identisch erfolgte. Sowohl die Substanzen (MMS bzw. APH), als auch ihre Konzentrationen und die Behandlungszeiten waren für beide Zellarten gleich.

Gleiche Substanzen in derselben Konzentration wurden auch für den Nachweis von Apoptosen (NaAsO₂) und für die Zellzyklusanalyse (NOC) eingesetzt. Hier unterschied sich jedoch die Dauer der Behandlung zwischen den beiden Zellarten.

Für den Endpunkt „Epigenetik“ erfolgte die Induktion von acetyliertem Histon für beide Zellarten mit der Positivkontrolle TSA, wobei sowohl die Konzentration als auch die Behandlungsdauer zwischen HL-60-Zellen und HSZ variierte.

Unterschiedliche Substanzen kamen für die Endpunkte „Ox. Stress“ und „Differenzierung“ zum Einsatz. Dabei war die Behandlungszeit beim oxidativen Stress für beide Substanzen (H₂O₂ und NOC) gleich, bei der Differenzierung mit DMSO und PMA dagegen verschieden.

5.2 Mobilfunkexpositionen

5.2.1 Vitalität nach Mobilfunkexposition

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte für die HL-60-Zellen und HSZ im Anschluss an jede Mobilfunkexposition mit der in Kapitel 4.1.3.2 beschriebenen Methode (FDA/GelRed-Färbung). Die Ergebnisse für die HL-60-Zellen sind in Tabelle 5 und für die HSZ in Tabelle 6 wiedergegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Replikaten mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich wird, lag die Vitalität für die HL-60-Zellen für annähernd alle durchgeführten Expositionen zwischen 93 % und 99 % und ging mit kleinen SDs einher. Auffällig zeigte sich jedoch die Langzeitexposition (66 h) mit dem GSM-Standard und einem SAR-Wert von 4 W/kg. Hier lag die mittlere Vitalität der Zellen bei 44,5 % und wies durch die hohen Schwankungen zwischen den einzelnen Replikaten (Replikat 1: 26 %, Replikat 2: 38 %, Replikat 3: 69,5 %) eine hohe SD mit 22,47 % auf. Die beschriebenen (auffälligen) Werte sind in der Tabelle farblich (rot) hervorgehoben.

Tabelle 5: Vitalität nach 4- und 66-h-Exposition der HL-60-Zellen mit den Mobilfunkstandards GSM, UMTS, LTE und den Intensitäten 0–4 W/kg. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Replikaten und die zugehörigen Standardabweichungen.

Fall	SAR (W/kg)	4 h		66 h	
		Vitalität (%)	SD (%)	Vitalität (%)	SD (%)
GSM (900 MHz)	0	97,60	1,31	98,93	0,12
	0,5	95,27	2,84	97,27	1,63
	1	97,00	0,72	97,80	1,40
	2	96,67	1,33	94,87	4,30
	4	96,93	0,95	44,50	22,47
UMTS (1.950 MHz)	0	95,87	6,13	98,60	0,53
	0,5	98,33	0,64	97,20	0,53
	1	97,33	1,51	97,27	0,83
	2	99,00	0,20	96,60	1,93
	4	97,43	0,60	93,07	5,75
LTE (2.535 MHz)	0	96,47	1,86	97,73	2,08
	0,5	95,93	1,21	96,13	2,73
	1	95,07	0,50	97,43	1,21
	2	97,60	1,22	97,60	0,53
	4	96,87	1,79	98,20	1,44

Die Vitalität der HSZ nach Ende der Exposition mit den Mobilfunkstandards GSM, UMTS und LTE schwankte etwas stärker als diejenige der HL-60-Zellen, mit Werten zwischen 88 % und 96 % (siehe Tabelle 6).

Auch für die Stammzellen führte die Exposition mit GSM bei 4 W/kg zu der niedrigsten gemessenen Vitalität von 71,43 % und einer SD von 13,54 %. Die Werte der einzelnen Replikate lagen bei 72,7 % (Replikat 1), 57,3 % (Replikat 2) und 84,3 % (Replikat 3). Auch dieses Ergebnis ist in der entsprechenden Tabelle farblich markiert.

Tabelle 6: Vitalität nach 4- und 20-h-Exposition der HSZ mit den Mobilfunkstandards GSM, UMTS, LTE und den Intensitäten 0–4 W/kg. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Replikaten und die zugehörigen Standardabweichungen.

Fall	SAR (W/kg)	4 h		20 h	
		Vitalität (%)	SD	Vitalität (%)	SD
GSM (900 MHz)	0	90,43	3,15	93,60	5,04
	0,5	89,97	5,93	90,40	9,11
	1	93,37	0,60	92,57	0,45
	2	91,73	5,97	88,40	0,62
	4	88,83	4,10	71,43	13,54
UMTS (1.950 MHz)	0	96,50	5,63	92,30	5,10
	0,5	95,97	2,29	96,90	1,90
	1	92,33	5,88	93,07	2,61
	2	95,70	2,52	92,47	6,77
	4	95,27	5,59	93,53	4,74
LTE (2.535 MHz)	0	93,67	0,45	90,57	7,33
	0,5	90,30	5,82	90,60	7,58
	1	90,17	3,19	92,67	5,73
	2	94,33	3,45	89,57	5,20
	4	94,93	1,62	91,07	8,11

5.2.2 Apoptose

Nach Exposition der Zellen mit unterschiedlichen Modulationen (GSM, UMTS und LTE) des Mobilfunks und unterschiedlichen Intensitäten (0-4 W/kg) für 4 h und 66 h (HL-60) bzw. 20 h (HSZ), erfolgte die Quantifizierung von apoptotischen HL-60-Zellen und HSZ durchflusszytometrisch über die Markierung mit Annexin-V-FLUOS. In Abbildung 34 ist der prozentuale Anteil an apoptotischen HL-60-Zellen nach der jeweiligen Exposition dargestellt. Die Daten wurden ermittelt aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Replikaten.

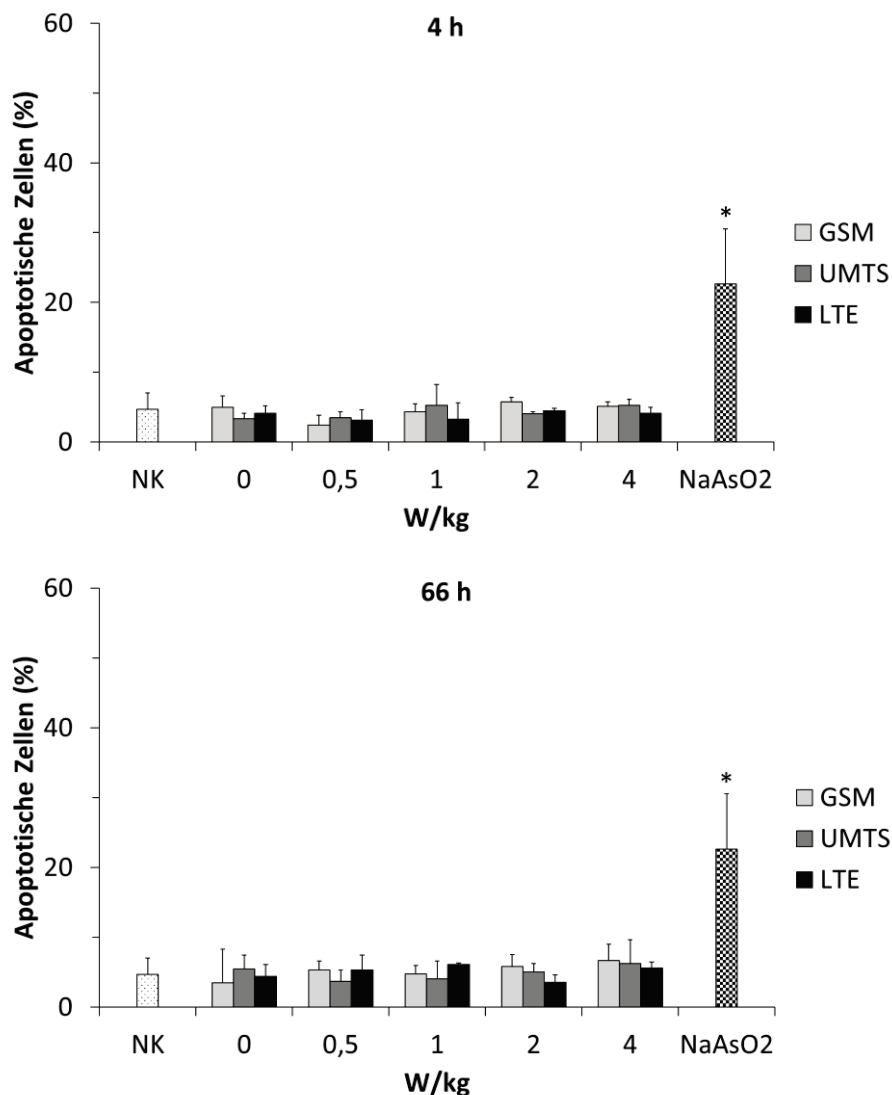


Abbildung 34: Prozentualer Anteil an früh-apoptotischen HL-60-Zellen nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit NaAsO₂) Säule (n=10) (*: p≤0,05 gegenüber NK). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

Weder für die Kurzzeit-, noch für die Langzeitexpositionen von HL-60-Zellen konnten Abweichungen in der Häufigkeit auftretender Apoptosen beobachtet werden. Mit durchschnittlich 3-6 % apoptotischen Zellen lagen die Werte für alle Modulationen und SAR-Werte auf dem Niveau der Negativkontrolle (ca. 5 %). Starke Schwankungen innerhalb der drei Replikate waren ebenfalls nicht zu verzeichnen. Eine statistisch signifikante Veränderung innerhalb der Intensitäten jeder Modulation konnte mit dem globalen Kruskal-Wallis-Test

nicht ermittelt werden. Dagegen zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung nach Behandlung der HL-60-Zellen mit der Positivkontrolle NaAsO₂. Mit mehr als 20 % apoptotischen Zellen nahm mit dieser Behandlung die Häufigkeit um das 4-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu.

Zu den Untersuchungen dieses Endpunkts in HSZ sind die Ergebnisse in Abbildung 35 veranschaulicht. Auch hier handelt es sich bei den dargestellten Werten um Mittelwerte aus drei Replikaten.

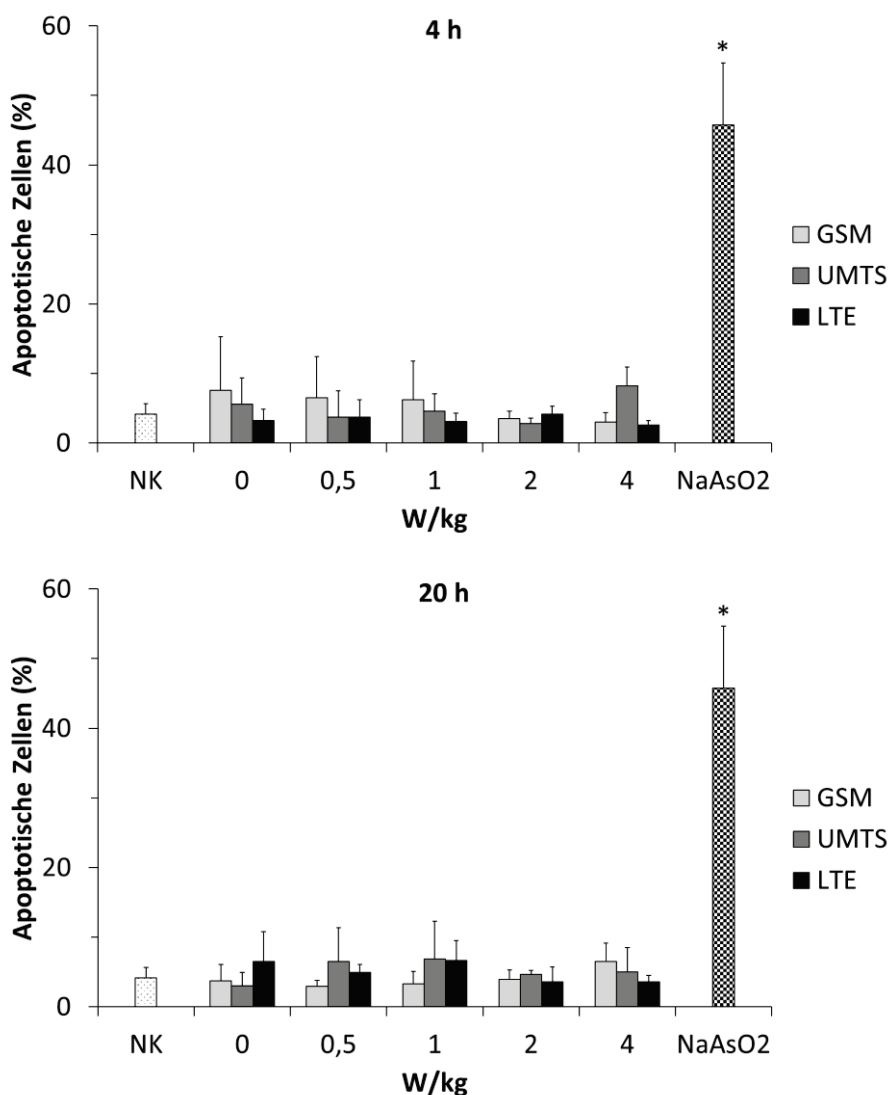


Abbildung 35: Prozentualer Anteil an früh-apoptotischen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit NaAsO₂) Säule (n=9) (*: p<0,05 gegenüber NK). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

Ähnlich der Ergebnisse zu den Untersuchungen in HL-60-Zellen zeigten sich auch für die Stammzellen keine Auffälligkeiten nach den Expositionen. Mit 3-8 % apoptotischen Zellen schienen die Werte insgesamt etwas stärker zu schwanken, befanden sich aber dennoch im Bereich der unbehandelten Kontrolle (ungefähr 4 %). Signifikante Unterschiede wurden nicht ermittelt. Durch die Behandlung mit NaAsO₂ erhöhte sich die Anzahl an apoptotischen Zellen signifikant auf ca. 45 %, was einer mehr als 10-fachen Steigerung gegenüber der Negativkontrolle entsprach. Somit zeigten die HSZ eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dieser Substanz als die HL-60-Zellen, mit durchgängig stabilen Werten.

5.2.3 Oxidativer Stress

Untersuchungen zur möglichen Veränderung des oxidativen Stresses in HL-60-Zellen und HSZ nach Mobilfunkexposition mit Frequenzen von 900 MHz (GSM), 1.950 MHz (UMTS) und 2.535 MHz (LTE) erfolgten mit der durchflusszytometrischen Bestimmung des DCF-Gehalts. Die Ergebnisse der Kurz- und Langzeitexpositionen mit den HL-60-Zellen sind für die drei analysierten Modulationen und fünf verschiedenen SAR-Werte in Abbildung 36 dargestellt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aus drei unabhängigen Replikaten.

Beim Vergleich der Kurzzeitexpositionen mit den Langzeitexpositionen fällt auf, dass die Werte der Kurzzeitexpositionen insgesamt etwas höher liegen als diejenigen der 66-h-Expositionen und als diejenigen der NK. Diese Beobachtung geht allerdings auch mit größeren Standardabweichungen einher. Die Werte der Langzeitexpositionen sind dagegen vorwiegend auf dem Niveau der NK vorzufinden und weisen geringere Abweichungen zwischen den einzelnen Replikaten auf. Signifikante Veränderungen zwischen der Scheinexposition und den vier untersuchten Intensitäten konnten mit dem Kruskal-Wallis-Test für keine der drei Modulationen (GSM, UMTS, LTE) detektiert werden. Die Behandlung der HL-60-Zellen mit der Positivkontroll-Substanz H₂O₂ führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung (15-fach) gegenüber der Negativkontrolle.

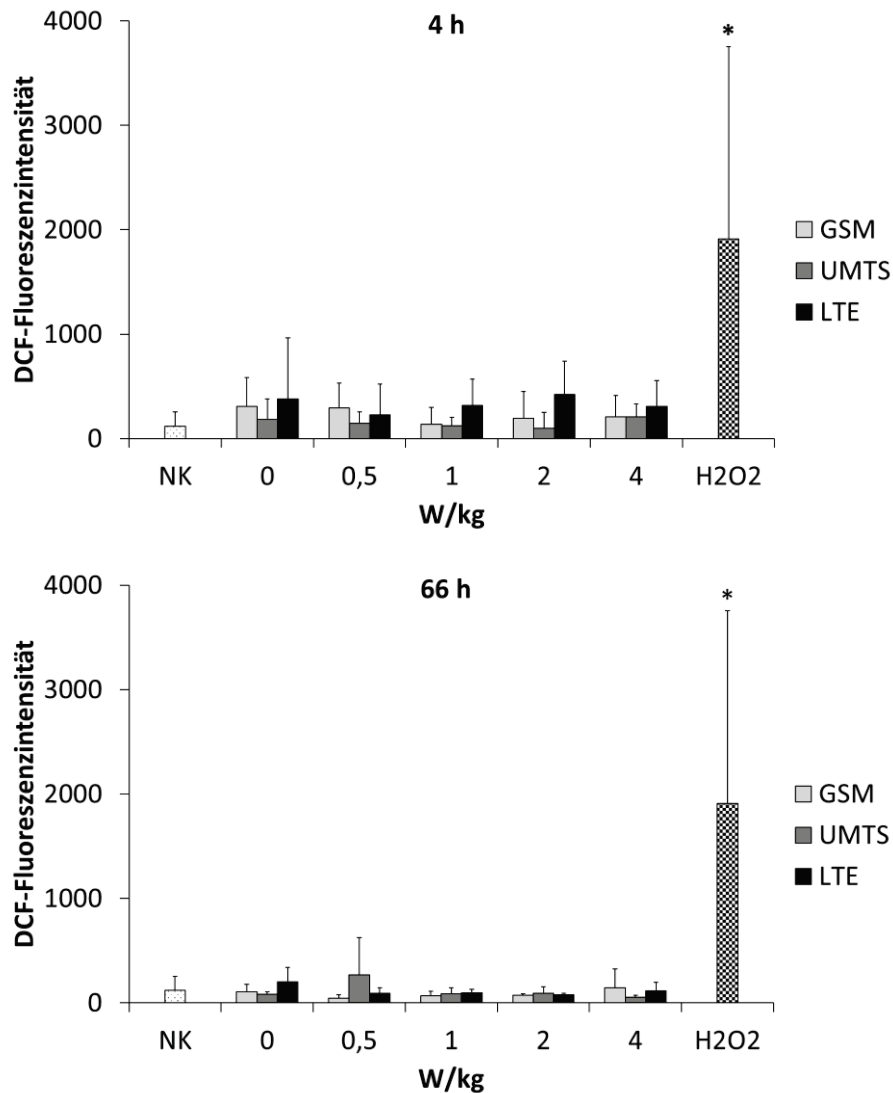


Abbildung 36: DCF-Fluoreszenzintensität nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards zur Bestimmung des oxidativen Stresses. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE- (schwarz) befehdeten Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit H₂O₂) Säule (n=29) (*: p≤0,05 gegenüber NK). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

Für die HSZ erfolgte die Bestimmung mit der gleichen Methode wie für die HL-60-Zellen. Variiert wurde für diesen Zelltyp allerdings die Substanz für die Positivkontrolle; statt H₂O₂ wurde hier NQO eingesetzt. Die Ergebnisse für die HSZ sind in Abbildung 37 veranschaulicht.

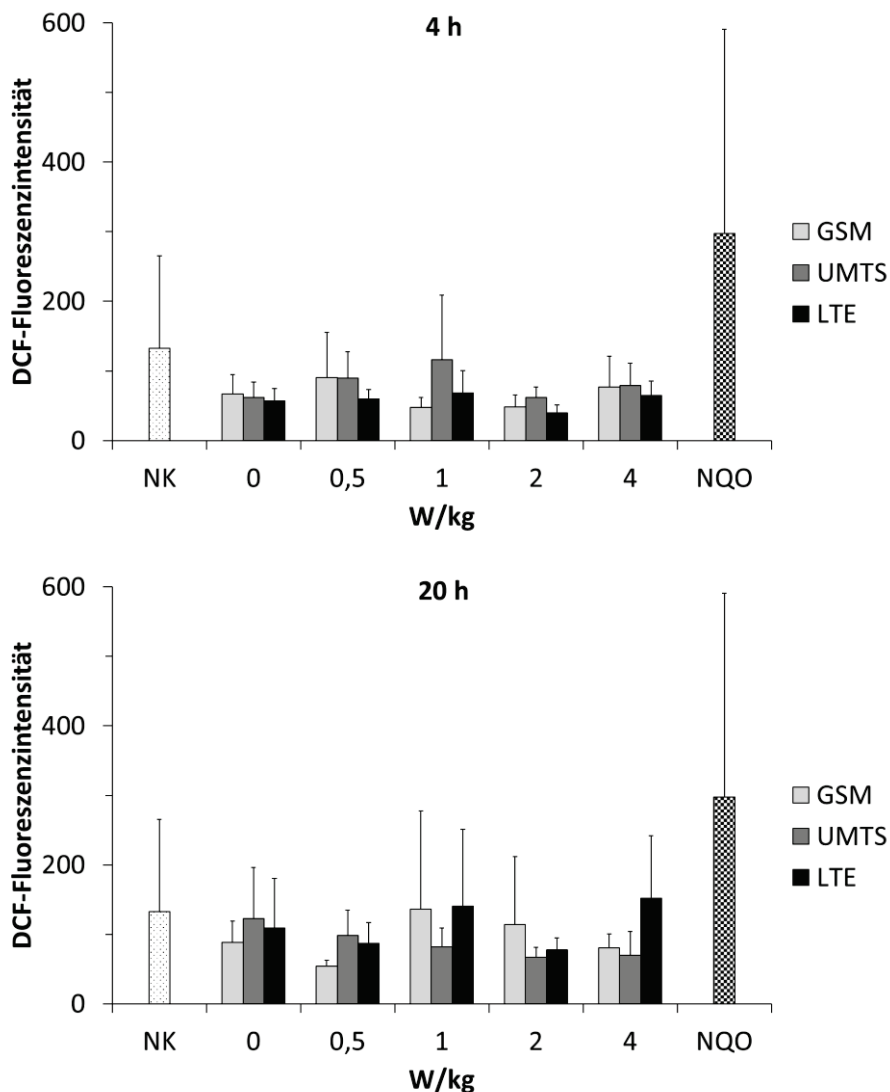


Abbildung 37: DCF-Fluoreszenzintensität nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards zur Bestimmung des oxidativen Stresses. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE- (schwarz) befehdeten Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit NQO) Säule (n=9). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

Den Ergebnissen in Abbildung 37 kann entnommen werden, dass die Werte für die DCF-Fluoreszenzintensität in Stammzellen bei beiden Expositionszeiten ungefähr im Bereich der Negativkontrolle lagen. Stärkere Schwankungen wiesen hier im Allgemeinen die Untersuchungen für die lange Expositionszeit auf, ein Unterschied zwischen den einzelnen Modulationen konnte bei beiden Expositionszeiten nicht verzeichnet werden. Die statistische Analyse mit dem globalen Kruskal-Wallis-Test wies keine signifikanten Veränderungen

zwischen der Scheinexposition und den anderen Intensitäten auf. Jedoch konnte auch für die Positivkontrolle keine signifikante Erhöhung gegenüber der Negativkontrolle erzielt werden.

5.2.4 Zellzyklus-Analyse

Mit diesem Endpunkt wurde der ordnungsgemäße Ablauf des Zellzyklus nach Mobilfunkexposition in beiden Zelltypen untersucht. Dies erfolgte über durchflusszytometrische DNA-Gehaltsbestimmung, wobei anhand der erhaltenen Histogramme die Anzahl der Zellen einer Probe in den jeweiligen Zellzyklusphasen G1, S und G2/M ermittelt wurde. Abbildung 38 stellt den prozentualen Anteil der Zellen in G1 nach 4- bzw. 66-stündiger Exposition von HL-60-Zellen mit den drei Mobilfunk-Standards gegenüber. Die Werte wurden aus drei unabhängigen Replikaten erhalten und gemittelt.

Nach 4-stündiger Exposition wiesen die Proben aller Modulationen in Kombination mit den unterschiedlichen SAR-Werten einen mit der unbehandelten Kontrolle (NK) vergleichbaren Anteil an HL-60-Zellen in der G1-Phase auf, der sich bei einem Wert von ungefähr 55 % einpendelte. Bei den Messungen für GSM mit 2 W/kg wurde in einem der drei Replikate ein Ausreißer festgestellt, der mit einem ca. 30 % höheren Wert deutlich von den Werten aus den beiden anderen Replikaten abwich und zu einer höheren Standardabweichung führte.

Mit ungefähr 60 % Zellen in der G1-Phase lagen die Werte der Langzeit-exponierten Proben für alle untersuchten Mobilfunk-Szenarien generell etwas über denjenigen der Negativkontrolle. Signifikante Unterschiede zwischen den Scheinexpositionen und den SAR-Werten 0,5, 1, 2 und 4 W/kg waren weder bei den Kurzzeit- noch bei den Langzeituntersuchungen vorhanden. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, führte die Behandlung der HL-60-Zellen mit NOC zu einer Abnahme der Zellen in G1 um ungefähr 20 % und somit zu einem signifikanten Ergebnis, getestet mit dem Mann-Whitney-U-Test.

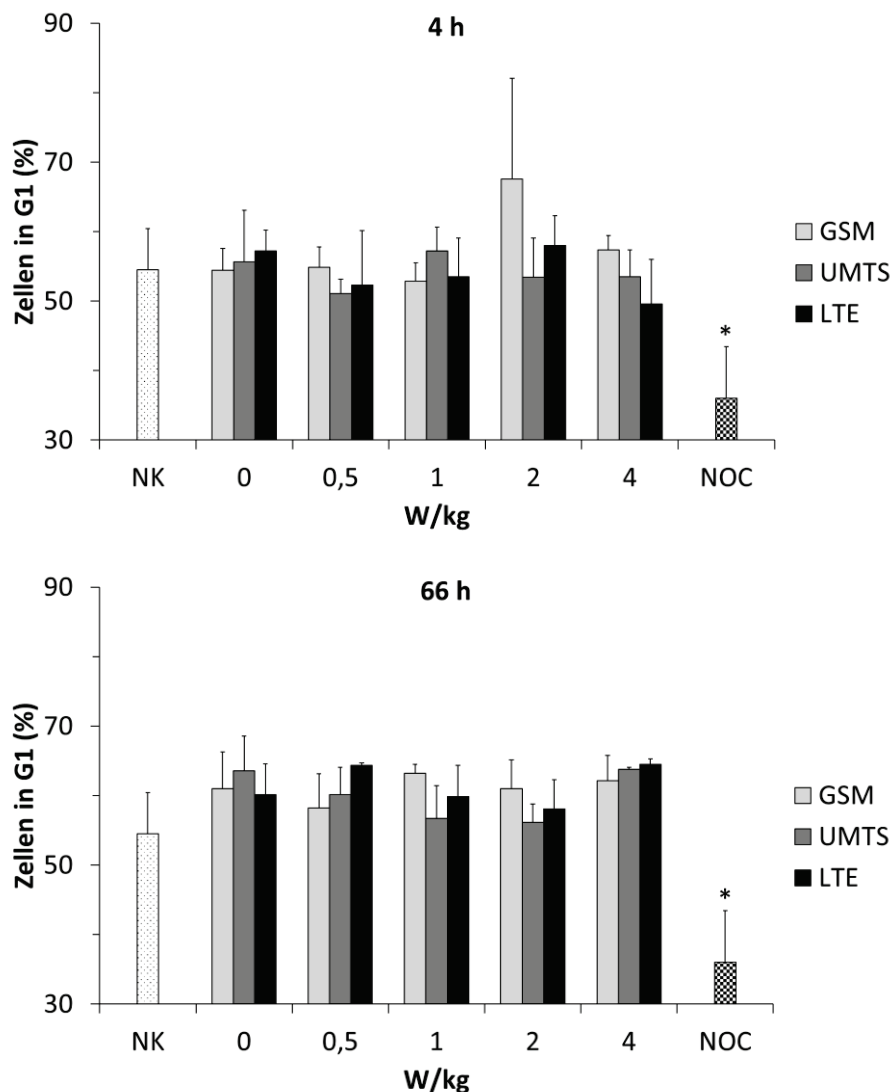


Abbildung 38: Prozentualer Anteil an Zellen in der Zellzyklusphase G1 nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit NOC) Säule (n=35) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

Die Daten zu den Zellzyklus-Untersuchungen in HSZ sind analog in Abbildung 39 präsentiert. Der prozentuale Anteil der sich in der Zellzyklusphase G1 befindenden HSZ nach Mobilfunkexposition war im Allgemeinen ähnlich hoch wie derjenige der unbehandelten Kontrolle, mit einem Mittel von 58 %. Einige Schwankungen zwischen den einzelnen Replikaten konnten zwar beobachtet, signifikante Unterschiede der untersuchten SAR-Werte im Vergleich zur Intensität 0 W/kg jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch bei diesem

Zelltyp führte die NOC-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der Zellen in G1 auf einen Wert von 43 %. Diese fiel aber um ca. 5 % geringer aus als bei den Zellen der Zelllinie HL-60.

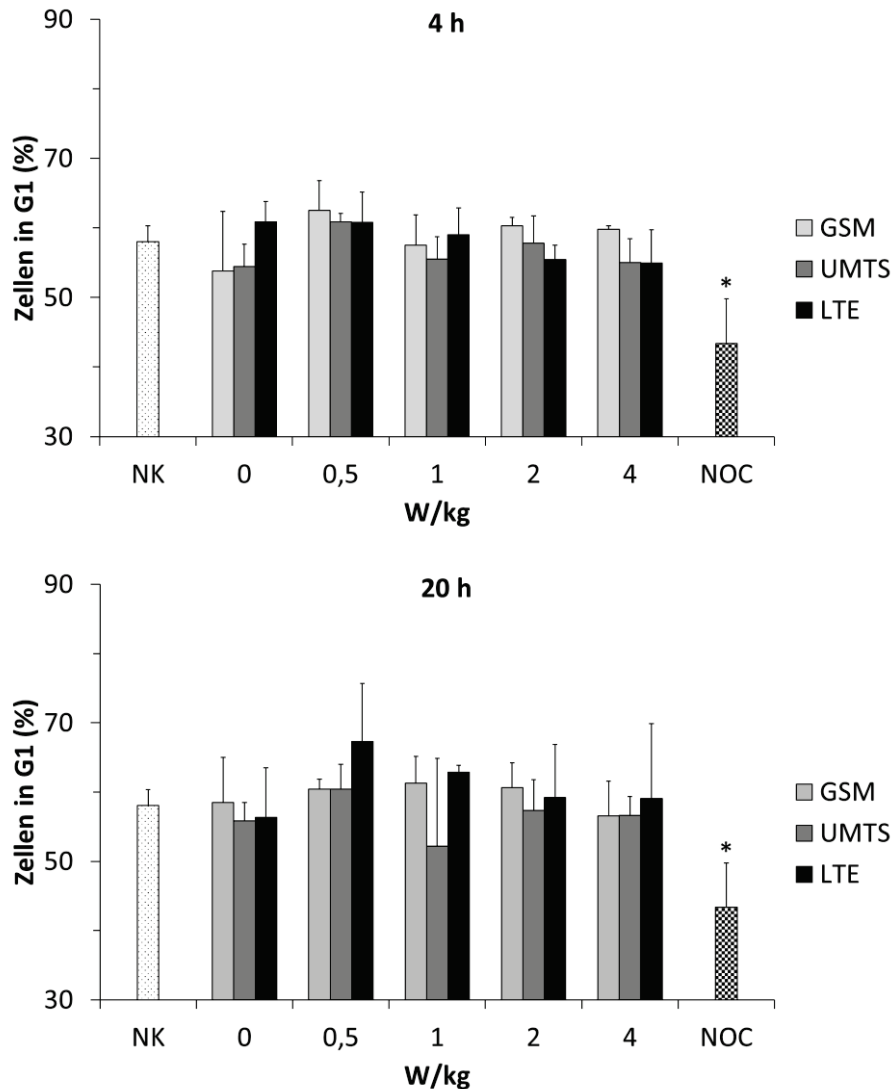


Abbildung 39: Prozentualer Anteil an Zellen in der Zellzyklusphase G1 nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit NOC) Säule (n=9) (*: p<0,05 gegenüber NK). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

5.2.5 DNA-Schaden

Um zu überprüfen, ob durch Mobilfunkstrahlung bei 900 MHz, 1.950 MHz und 2.535 MHz genotoxische Effekte in Zellen des blutbildenden Systems hervorgerufen werden können, wurden DNA-Strangbrüche (Einzel- und Doppelstrangbrüche) in HL-60-Zellen und HSZ nach Exposition mit dem Comet Assay detektiert. In Abbildung 40 und Abbildung 41 ist der prozentuale Anteil an DNA-Bruchstücken im Schweif für beide Zellarten veranschaulicht. Die dargestellten Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten aus drei unabhängigen Replikaten.

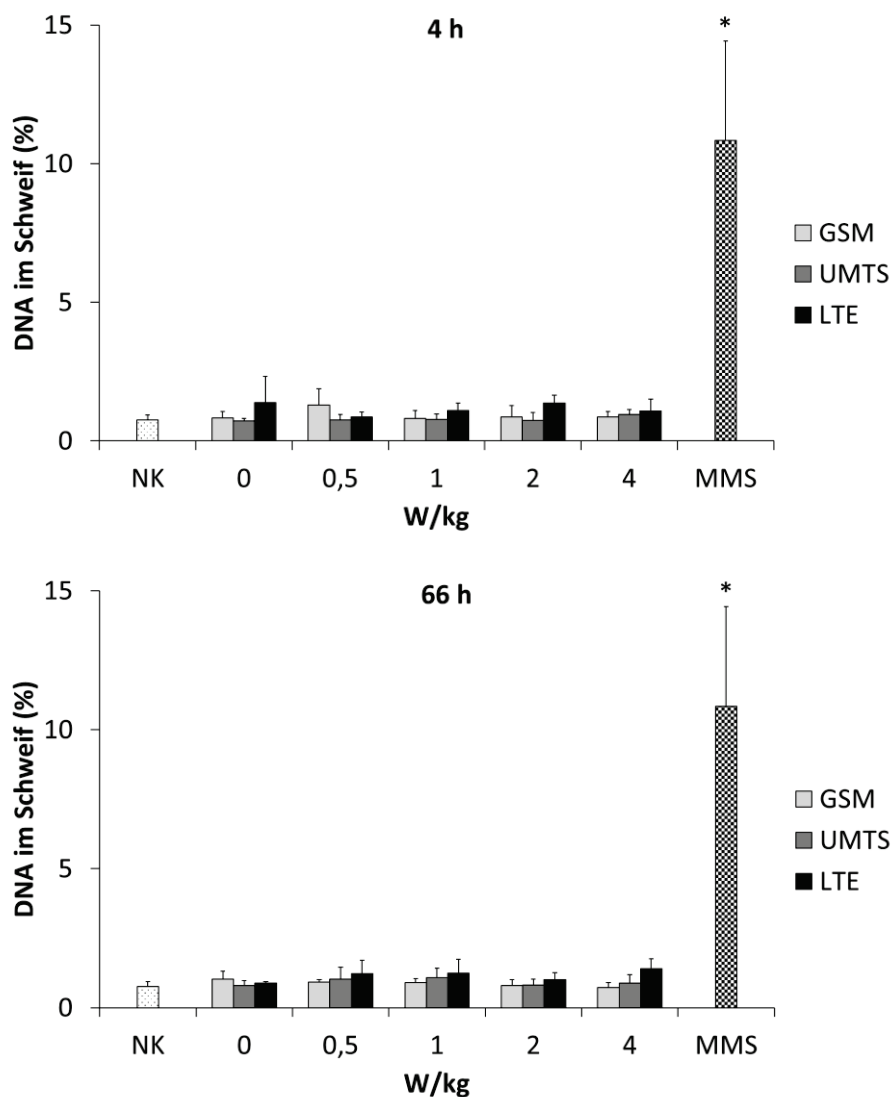


Abbildung 40: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit MMS) Säule (n=29) (*: p≤0,05 gegenüber NK). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

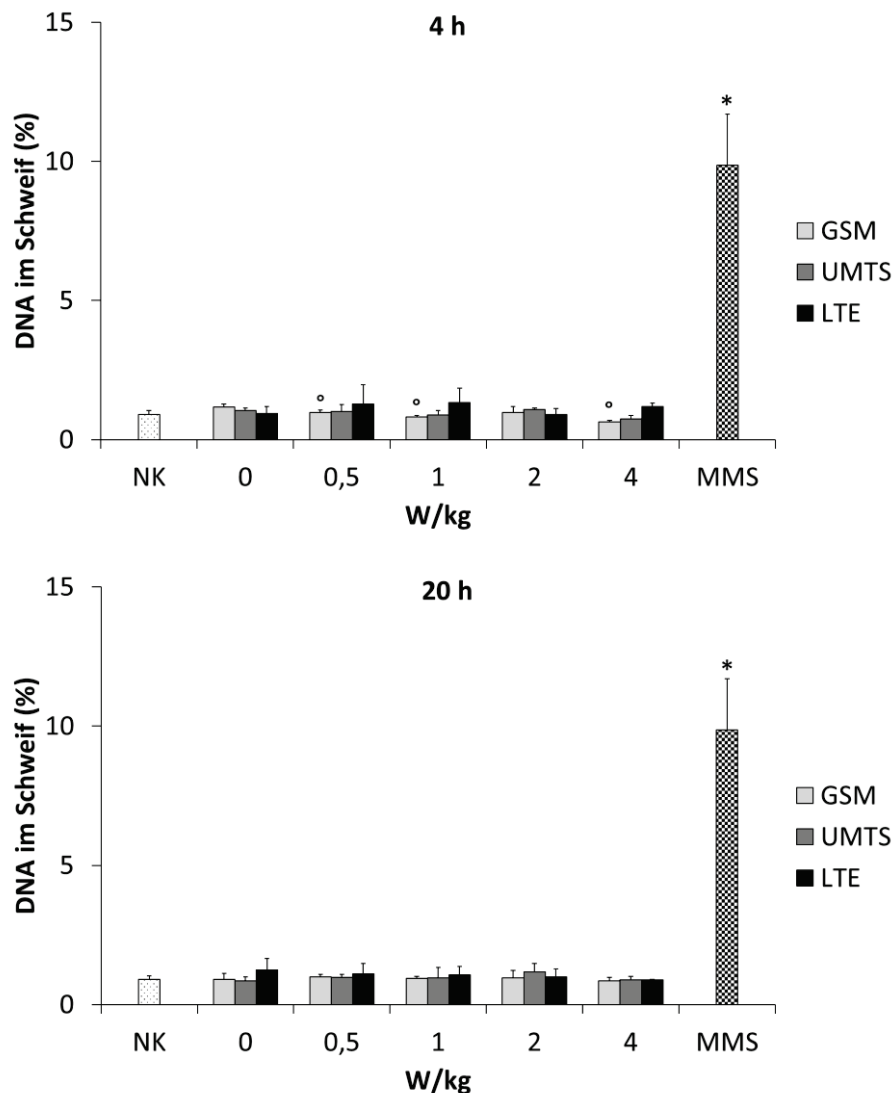


Abbildung 41: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit MMS) Säule (n=7) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK, °: $p \leq 0,05$ gegenüber 0 W/kg). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

Die erhaltenen Daten wiesen zunächst keine Auffälligkeiten nach Exposition mit unterschiedlichen Kombinationen der Mobilfunkstrahlung und Intensitäten auf, weder für die Zellen der Zelllinie HL-60 noch für die hämatopoetischen Stammzellen. Alle Proben befanden sich mit einem DNA-Schaden von ungefähr 1 % auf dem Niveau der Negativkontrolle, nur einzelne Schwankungen zwischen den Replikaten waren vorhanden. Die statistische

Auswertung mit dem Kruskal-Wallis-Test zeigte jedoch für die HSZ bei einer 4-stündigen Befeldung mit GSM (900 MHz) einen signifikanten Unterschied ($p=0,029$) zwischen den fünf untersuchten Intensitäten. Die anschließende Einzeltestung der Intensitäten 0,5, 1, 2 und 4 W/kg gegen die Scheinexposition 0 W/kg mit dem Mann-Whitney-U-Test bestätigte einen signifikant erniedrigten DNA-Schaden für diese Modulation und die SAR-Werte 0,5, 1 und 4 W/kg. Signifikanzen für alle anderen Modulationen und Expositionszeiten lagen nicht vor. Ein Vergleich der mit MMS behandelten Zellen mit den unbehandelten Kontrollen zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante Veränderung, die sich in einem ungefähr 10-fach höheren DNA-Schaden in beiden Zellarten äußerte. HL-60-Zellen reagierten dabei mit größeren Schwankungen auf die Behandlung mit MMS.

Um dieses signifikante Ergebnis zu bestätigen bzw. zu entkräften wurde eine weitere Versuchsreihe nach gleichem Schema mit HL-60-Zellen und HSZ aus einer neuen Charge durchgeführt. Die Ergebnisse der Wiederholungsexperimente sind für die HL-60-Zellen in Abbildung 42 und für die Stammzellen in Abbildung 43 veranschaulicht.

Die in den Wiederholungsexpositionen für beide Zelltypen erhaltenen Daten zeigten keine Auffälligkeiten, weder bei den Kurzzeit- noch bei den Langzeitexpositionen. Der Anteil an DNA-Schäden für die Intensitäten 0,5, 1, 2 und 4 W/kg lag mit ca. 1 % im Bereich der Sham-Exposition bzw. der unbehandelten Kontrolle (NK) mit leichten Schwankungen. Die Untersuchung der statistischen Signifikanz mit dem globalen Kruskal-Wallis-Test ergab keine signifikanten Veränderungen der vier untersuchten Intensitäten gegenüber 0 W/kg. Dagegen führte die Behandlung beider Zellarten (HL-60 und HSZ) mit MMS zu einer statistisch signifikanten Erhöhung an DNA-Schäden im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Insgesamt zeigten die Stammzellen mit fast 20 % geschädigter DNA eine stärkere Reaktion auf die Behandlung mit MMS als die HL-60-Zellen (13 % DNA-Schaden).

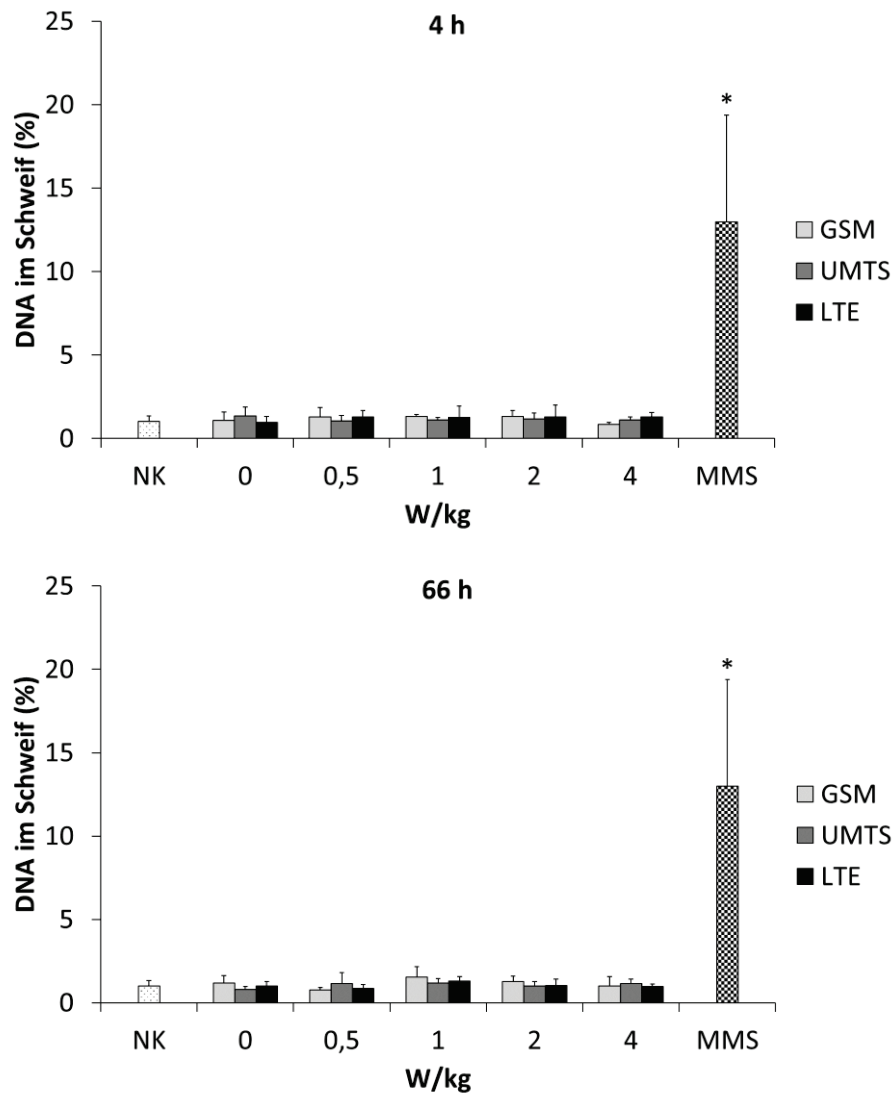


Abbildung 42: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit MMS) Säule (n=36) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK).

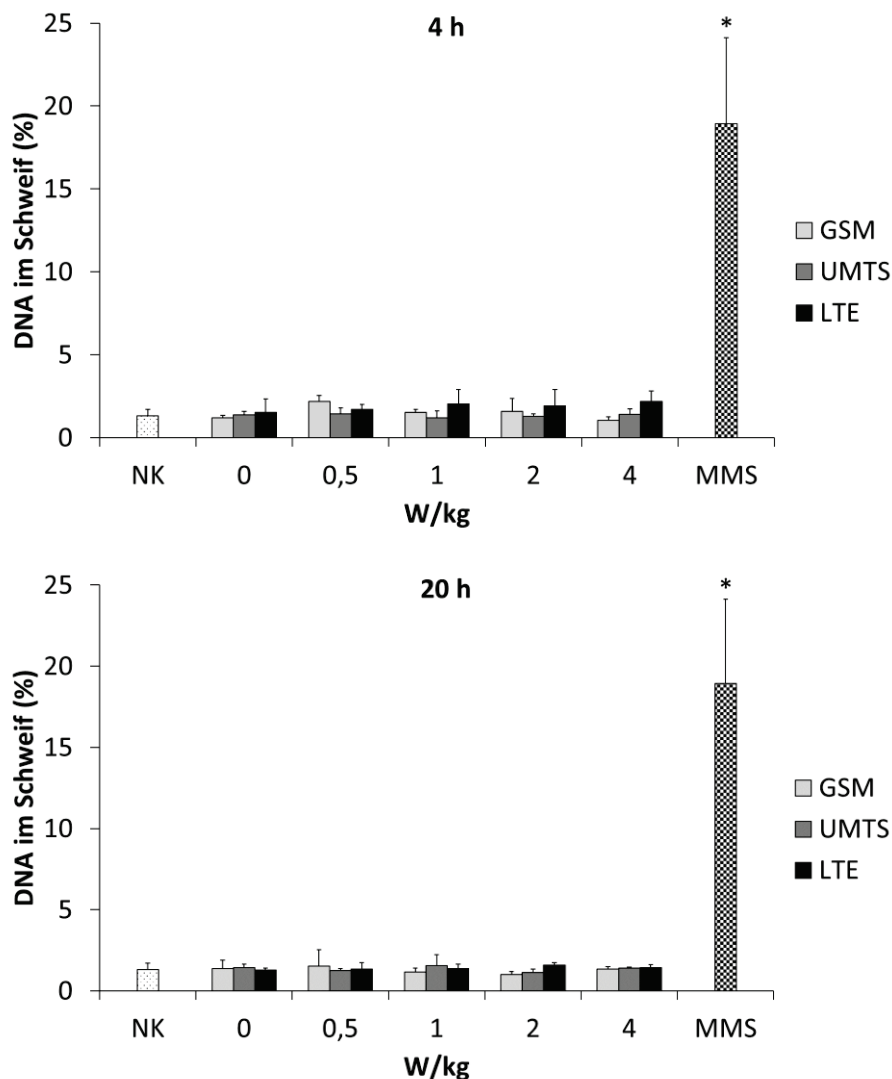


Abbildung 43: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit MMS) Säule (n=12) (*: p<0,05 gegenüber NK).

5.2.6 DNA-Reparatur

Um zu überprüfen, ob Mobilfunkstrahlung die DNA-Reparatur-Kapazität von HL-60-Zellen und HSZ beeinträchtigt, wurden den exponierten Zellen 2 h vor Ablauf der jeweiligen Exposition DNA-Schäden durch Bestrahlung mit UV-Licht induziert und nach Expositionsende die noch verbliebenen DNA-Schäden mittels Comet Assay erfasst. Es galt folgende Beziehung: je mehr DNA-Schäden detektiert wurden, desto geringer war die Kapazität der Zellen diese Schäden zu reparieren.

Bei den Zellen der Positivkontrolle bewirkte die Zugabe von APH direkt im Anschluss an die UV-Bestrahlung eine Inhibierung der Reparatur; diese Substanz wurde daher als Positivkontrolle definiert. Die Ergebnisse der Software-gestützten mikroskopischen Auswertung aller exponierten Proben sowie der entsprechenden Kontrollen sind für die HL-60-Zellen in Abbildung 44 und für die HSZ in Abbildung 45 gegenübergestellt.

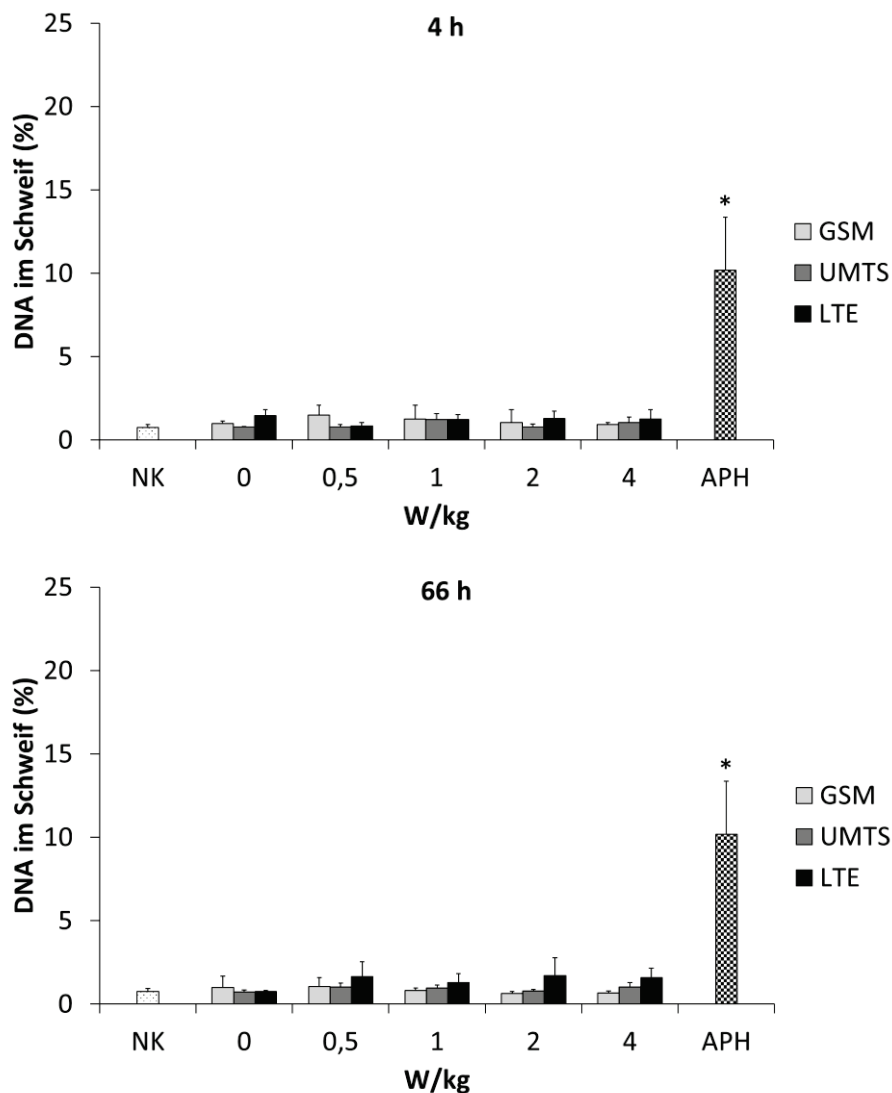


Abbildung 44: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. 2 h vor Expositionsende wurden die Zellen einer UV-Strahlung ausgesetzt und die verbliebenen DNA-Schäden für den indirekten Nachweis der DNA-Reparaturkapazität quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit APH) Säule (n=30) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

Aufgetragen wurde der gemittelte prozentuale Anteil der DNA im Schweif aus drei unabhängigen Replikaten für alle Modulationen, Intensitäten und Expositionszeiten.

Die Exposition der HL-60-Zellen mit GSM, UMTS und LTE resultierte nicht in einer veränderten Reparaturkapazität, weder nach 4 h noch nach 66 h. Mit Werten um 1 % lag das Ausmaß der DNA-Schäden nach den Expositionen im Bereich der Negativkontrolle. Eine signifikante Änderung der untersuchten Intensitäten 0,5, 1, 2 und 4 W/kg gegenüber der Sham-Exposition konnte mit dem Kruskal-Wallis-Test ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Behandlung der Zellen der Positivkontrolle mit APH führte zu einer 10-fachen Erhöhung an DNA-Schäden und zu einem signifikanten Ergebnis nach Mann-Whitney-U.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der HL-60-Zellen, wiesen auch die resultierenden DNA-Schäden nach Exposition der HSZ keine signifikanten Änderungen gegenüber der Intensität 0 W/kg der jeweiligen Modulation auf. Auch hier waren alle Werte vergleichbar mit denen der Negativkontrolle (ca. 1 % DNA im Schweif). Insgesamt zeigten sich bei den Stammzell-Expositionen stabilere Werte mit weniger Variationen zwischen den einzelnen Replikaten als es bei der Zelllinie HL-60 der Fall war. Eine nach Mann-Whitney-U signifikante Erhöhung der Positivkontrolle APH konnte auch für diesen Zelltyp erzielt werden. Mit Werten, die 16-mal mehr DNA-Schäden aufzeigten als bei der unbehandelten Kontrolle, reagierten die Stammzellen auch sensibler auf diese Behandlung als die HL-60-Zellen.

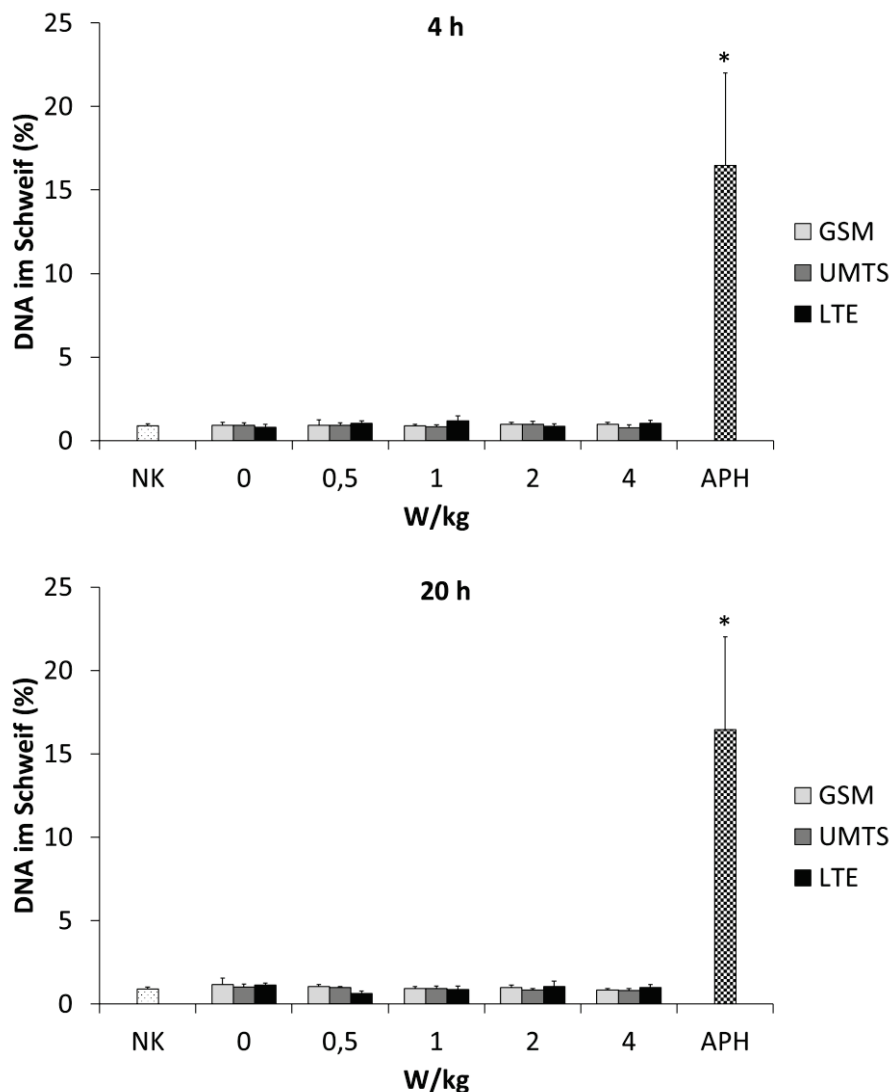


Abbildung 45: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. 2 h vor Expositionsende wurden die Zellen einer UV-Strahlung ausgesetzt und die verbliebenen DNA-Schäden für den indirekten Nachweis der DNA-Reparaturkapazität quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit APH) Säule (n=8) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK). Publiziert in Gläser *et al.* [153].

5.2.7 Differenzierung

Für den Endpunkt Differenzierung wurde der Differenzierungsstatus der untersuchten Zellen (HL-60 und HSZ) nach Markierung mit spezifischen Antikörpern gegen das Oberflächenantigen CD11b durchflusszytometrisch erfasst. Die Ergebnisse der Quantifizierung für die HL-60-Zellen

können Abbildung 46 entnommen werden. Dargestellt ist für die exponierten Proben jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Replikaten.

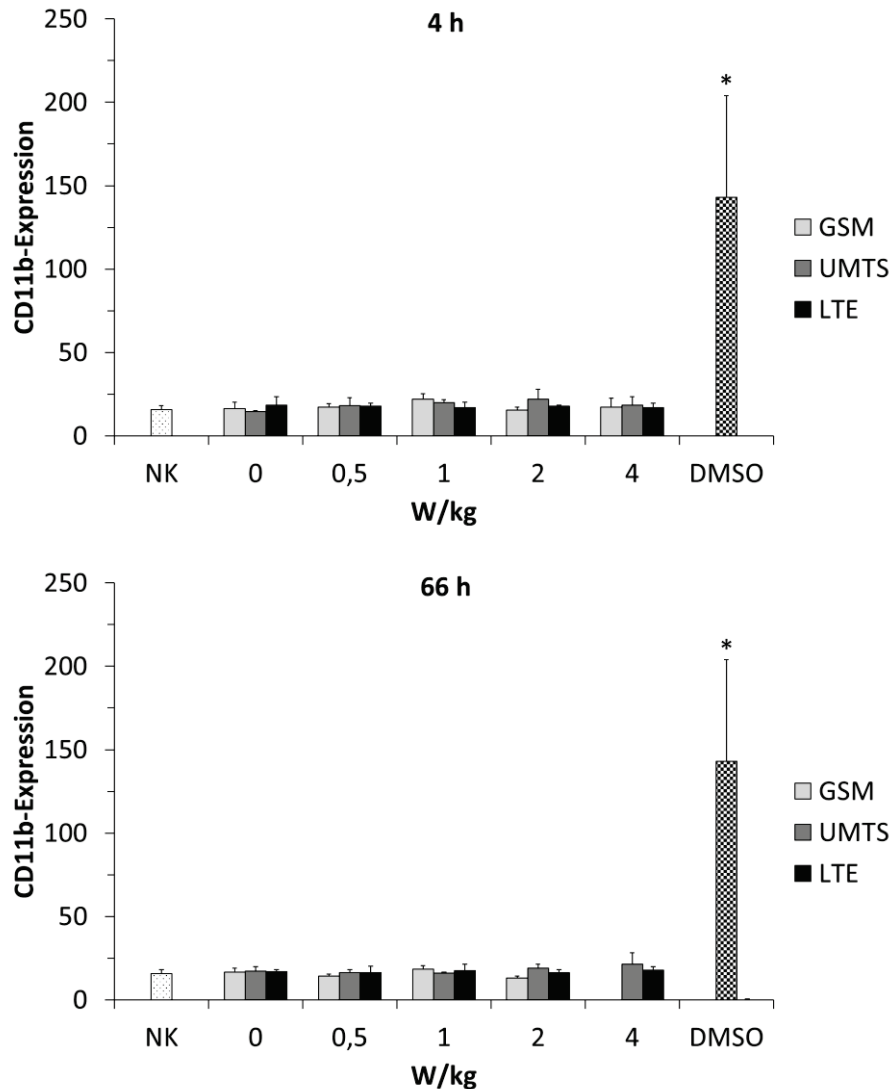


Abbildung 46: Expression des CD11b-Oberflächenproteins nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit DMSO) Säule (n=37) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK).

Sowohl die Kurz- als auch die Langzeitexpositionen der HL-60-Zellen wiesen ein ähnliches Bild auf. Die Werte aller Expositionen lagen auf Höhe der entsprechenden Scheinexpositionen mit 0 W/kg, die vergleichbar waren mit den Werten der Negativkontrolle, und zeigten nur kleine

Schwankungen zwischen den drei Replikaten. Signifikante Unterschiede der mit Mobilfunk bestrahlten Proben im Vergleich zu den Scheinexpositionen konnten daher nicht detektiert werden.

Im Gegensatz dazu wurden für die Langzeitexpositionen der Modulation GSM und den SAR-Wert 4 W/kg in allen Replikaten Werte detektiert, die stark von denjenigen der Negativkontrolle und der Scheinexposition abwichen (fehlender Wert in Abbildung 46). Alle Expositionen dieses Mobilfunkszenarios wurden zwar durchgeführt, allerdings war die Vitalität der Zellen nach Exposition sehr niedrig, mit 26 % im ersten Replikat, 38 % im zweiten Replikat und 69,5 % im dritten Replikat. Identisch zu allen anderen Expositionsszenarien, wurden auch diese Zellen im Anschluss an die Exposition jeweils für vier Tage nachinkubiert und erst am Tag sieben gemessen. Eine mikroskopische Beurteilung am Ende der Nachinkubationsperiode zeigte keine normale Morphologie der Zellen, was sich auch im Dot Blot der durchflusszytometrischen Messung nach Aufarbeitung der Proben äußerte (ein Dot Blot von unbehandelten (NK) im Vergleich zu GSM-befeldeten HL-60-Zellen kann dem Anhang entnommen werden, Abbildung A1). Diese Proben lieferten bei der Messung falsch-positive Werte, die auf Höhe der Positivkontrollen lagen. Somit erschien die Auswertung für CD11b in diesen Proben nicht sinnvoll.

Die statistische Analyse der beiden Kontrollen ergab für die Positivkontrolle DMSO signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

Die Ergebnisse der Mobilfunkexpositionen für die HSZ sind in Abbildung 47 grafisch dargestellt.

Auch bei den Stammzellen pendelten sich die Werte der Expositionen auf dem Niveau der Scheinexposition bzw. Negativkontrolle ein. Insgesamt wurden für diesen Zelltyp allerdings stärkere Schwankungen innerhalb der einzelnen Replikate für beide Expositionszeiten beobachtet. Statistische Signifikanzen konnten für die exponierten Proben mit dem globalen Kruskal-Wallis-Test nicht berechnet werden. PMA zeigte im Vergleich zu DMSO (HL-60-Zellen) zwar eine schwächere Induktion der CD11b-Expression (ungefähr 3-mal niedriger), erwies sich in diesen Untersuchungen aber dennoch als geeignete Positivkontrolle. Ein signifikanter Unterschied gegenüber der Negativkontrolle war zu verzeichnen.

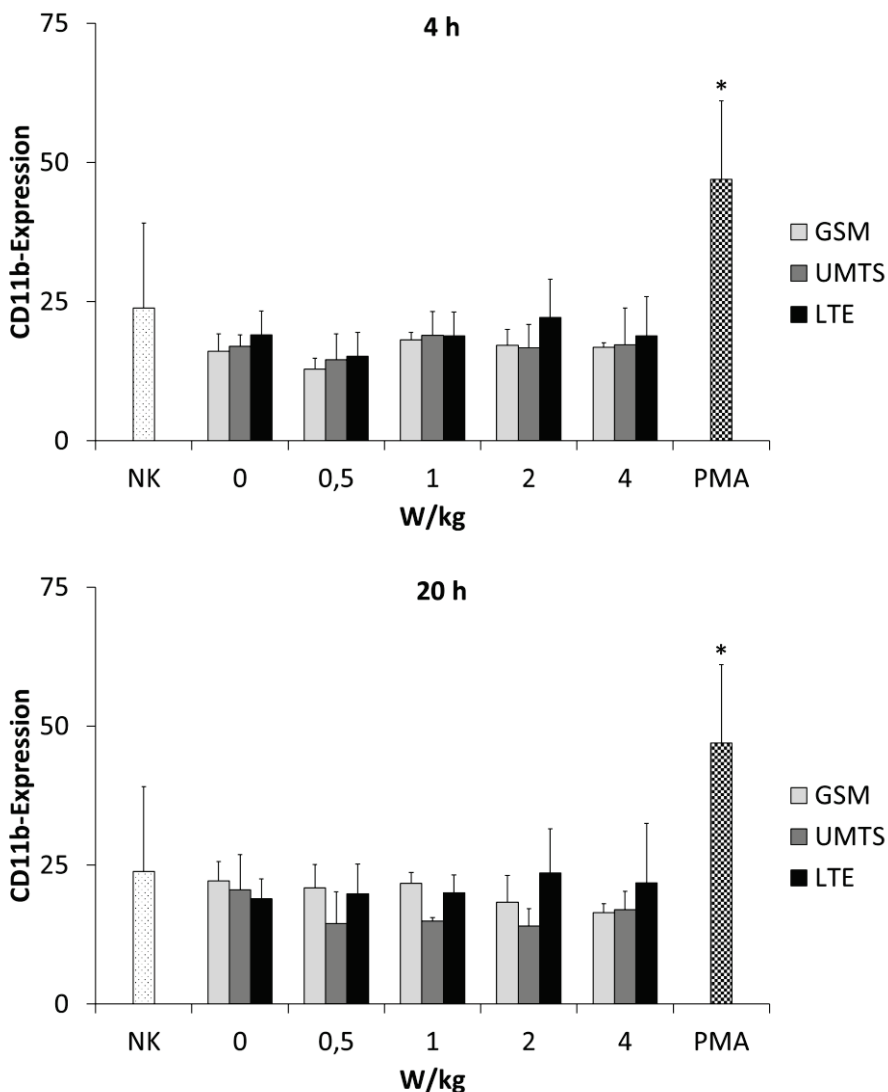


Abbildung 47: Expression des CD11b-Oberflächenproteins nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit PMA) Säule (n=14) (*: p<0,05 gegenüber NK).

5.2.8 Histonacetylierung

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung möglicher epigenetischer Veränderungen wurden Acetylierungen am Histon H3, im Besonderen an der Aminosäure Lysin 9, durch Markierung mit spezifischen Antikörpern erfasst. Die grafische Darstellung der erhaltenen Ergebnisse für alle untersuchten Kombinationen der Mobilfunkexposition erfolgte unter Angabe der Fluoreszenzintensität für acetylierte Histone. Die Werte aus drei unabhängigen

Replikaten für HL-60-Zellen können Abbildung 48 und für die HSZ Abbildung 49 entnommen werden.

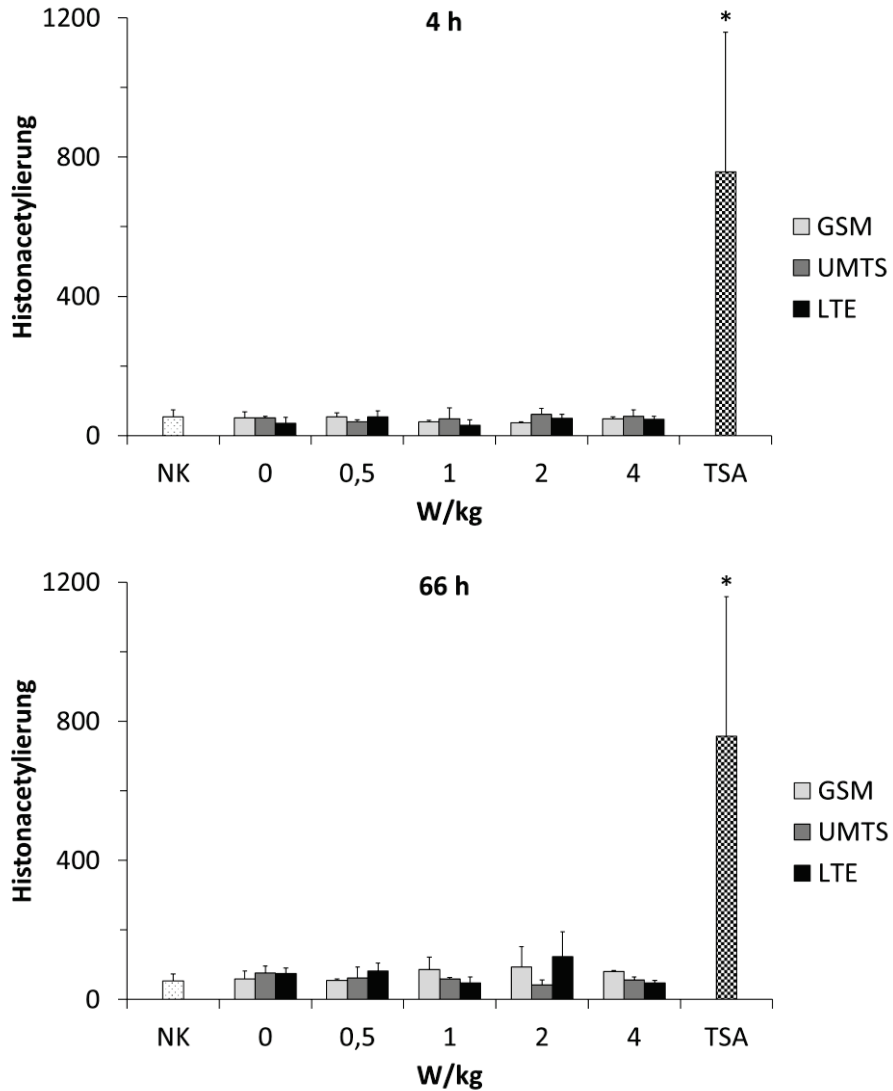


Abbildung 48: Histonacetylierung nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit TSA) Säule (n=35) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK).

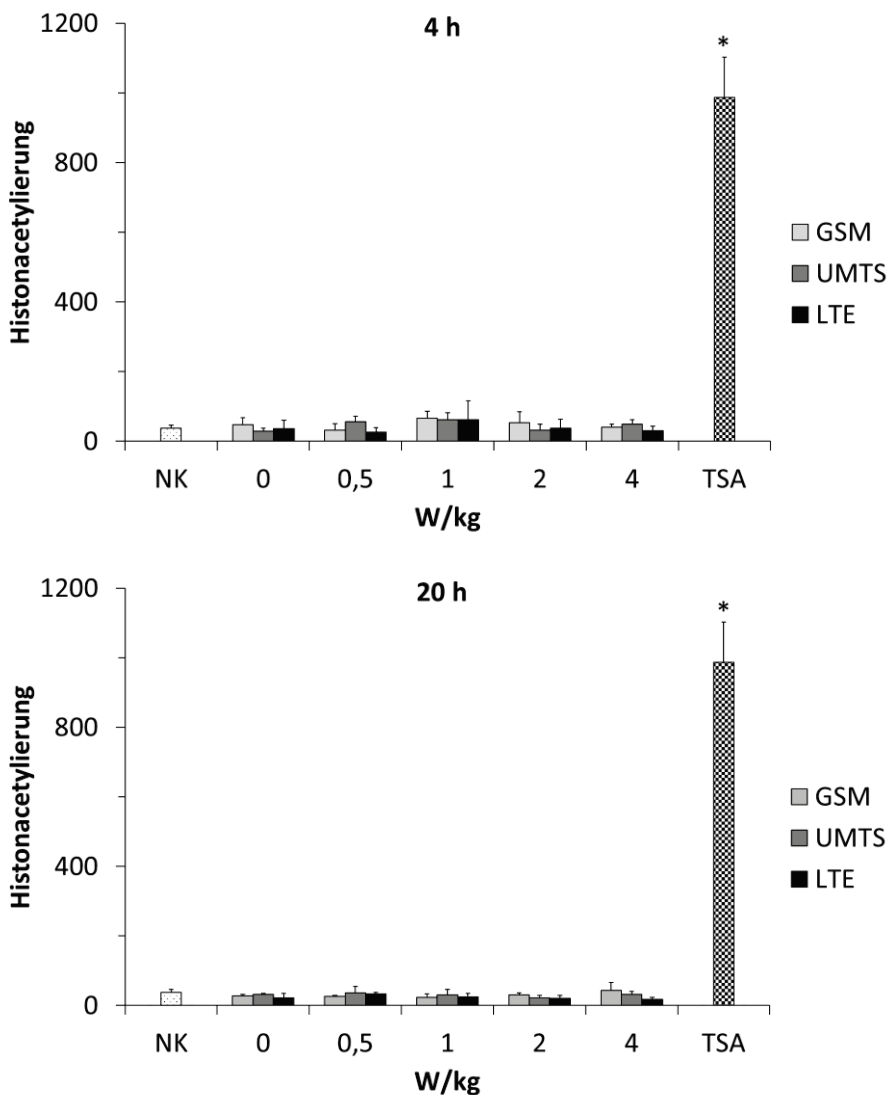


Abbildung 49: Histonacetylierung nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit TSA) Säule (n=6) (*: p<0,05 gegenüber NK).

Anhand der beiden Abbildungen wird deutlich, dass für beide Zellarten die Ergebnisse nach Mobilfunkexposition sehr ähnlich ausfielen. Alle Werte lagen annähernd auf dem Niveau der jeweiligen NKs, wobei die Werte der HL-60-Langzeitexpositionen insgesamt etwas stärkere Schwankungen aufwiesen als die Befeldungen nach 4 h und als die Untersuchungen mit den Stammzellen. Signifikante Unterschiede der untersuchten SAR-Werte im Vergleich zur den entsprechenden Schein-Expositionen konnten für keinen der Fälle nachgewiesen werden.

Die Positivkontrollen waren laut Mann-Whitney-U-Test bei beiden Zellarten signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle, wobei die Behandlung der HSZ mit TSA eine deutlich stärkere Reaktion sowie weniger Schwankungen zwischen den einzelnen Proben zeigte als dies bei den HL-60-Zellen der Fall war.

5.3 Hämatopoetische Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen

Um die Vergleichbarkeit der eingesetzten Zellsysteme für die Mobilfunkexpositionsversuche, aber auch darüber hinaus, besser zu charakterisieren, wurden hämatopoetische Stammzellen anderen Zellen des blutbildenden Systems gegenübergestellt. Als Vorläufer aller Blutzellen stehen die HSZ an oberster Stelle der Hierarchie-Ebene (siehe Abbildung 6) und besitzen das Potenzial, zu allen Zellen des blutbildenden Systems auszureifen. Es ist anzunehmen, dass sich die HSZ vor allem durch diese Eigenschaft von Zellsystemen wie immortalisierten Zelllinien oder primären (differenzierten) Zellen unterscheiden.

Mit diesen Untersuchungen sollte daher die Sensitivität von Blutzellen mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus gegenüber mutagenen Substanzen analysiert werden. Hierfür wurden die Daten der HSZ, gewonnen aus den Positivkontrollen der Mobilfunkexpositionen, mit anderen Zellen des blutbildenden Systems unter gleichen Versuchsbedingungen verglichen. Im Fokus standen dabei die Endpunkte oxidativer Stress, Zellzyklusanalyse, Gentoxizität, DNA-Reparatur und Histonacetylierung. Den HSZ gegenübergestellt wurden die zwei Zelllinien HL-60 und TK6 sowie HL-60-Zellen, die mit DMSO und Na-But für sieben Tage zur Differenzierung angeregt wurden und so stärker ausgereifte Zellen des Blutes repräsentierten. Die Überprüfung des Differenzierungsstatus erfolgte durchflusszytometrisch über die Messung von CD11b jeweils an Tag 7 und war allen weiteren Untersuchungen vorangestellt. Abbildung 50 zeigt die CD11b-Quantifizierung aus allen durchgeführten Differenzierungen sowie repräsentative Histogramme von undifferenzierten und differenzierten HL-60-Zellen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte der Fluoreszenzintensität.

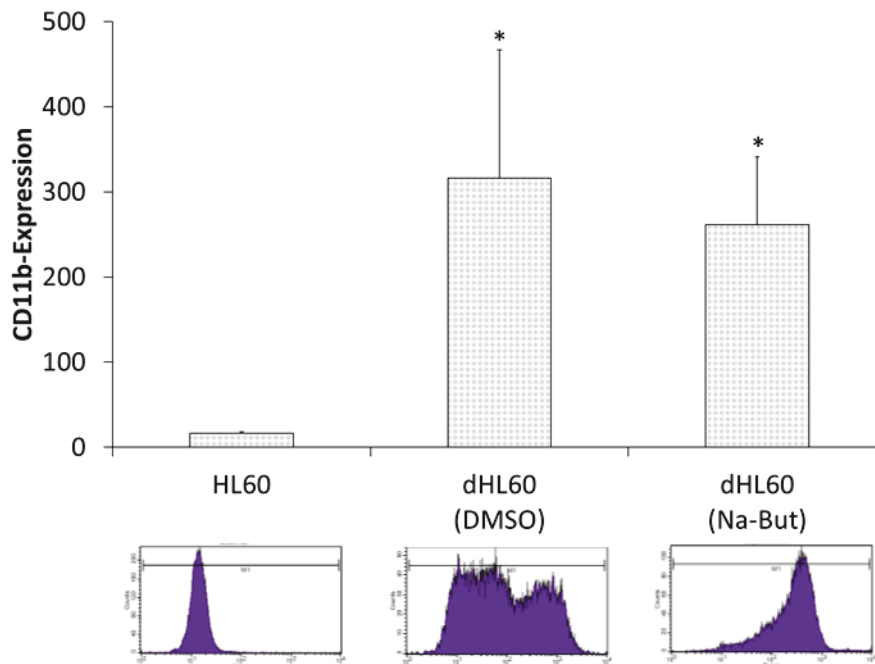


Abbildung 50: Quantifizierung des CD11b-Oberflächenantigens in undifferenzierten und differenzierten HL-60-Zellen. Die Differenzierung wurde induziert durch 7-tägige Behandlung mit DMSO oder Na-But. Die Balken zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Replikaten, repräsentative Histogramme der Behandlungen befinden sich jeweils darunter (*: $p \leq 0,05$ gegen HL60).

Beide Substanzen induzierten nach einer Behandlung von sieben Tagen eine 15- bis 20-fache Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Auch aus den Histogrammen der durchflusszytometrischen Messungen sind Veränderungen, bedingt durch die Inkubation der Zellen mit DMSO oder Na-But, ersichtlich und lassen auf eine veränderte Expression von CD11b auf der Zelloberfläche schließen. Für die unbehandelten HL-60-Zellen wurde eine basale Fluoreszenz mit einem schmalen, scharfen Peak detektiert. Dies weist darauf hin, dass sich alle Zellen in einem ähnlichen Differenzierungsstadium befinden und eine einzelne Population repräsentieren (linkes Histogramm, Abbildung 50). Durch Behandlung mit DMSO erscheint der Peak deutlich breiter, mit sehr niedrigen Fluoreszenzen, die im Bereich der Kontrolle liegen, bis hin zu hohen Fluoreszenzen (mittleres Histogramm, Abbildung 50). Dies verdeutlicht, dass sich in diesen Proben die Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien befinden und eine gemischte Population darstellen. Im Gegensatz zu DMSO resultierte die Differenzierung mit Na-But in einem schmälere Peak bei hohen Fluoreszenzen (rechtes Histogramm, Abbildung 50). Daraus kann geschlossen werden, dass hier eine weniger gemischte Population vorliegt und, dass absolut gesehen mehr Zellen

mit erhöhter CD11b-Expression vorzufinden sind. Nur ein sehr geringer Anteil der Zellen dieser Probe zeigt eine CD11b-Expression auf dem Niveau der Kontrolle.

5.3.1 Oxidativer Stress

Um die Empfindlichkeit der unterschiedlichen Zelltypen gegenüber oxidativem Stress zu untersuchen, wurden diese für 30 min mit 10 µg/ml NQO behandelt und die Induktion mit der durchflusszytometrischen DCF-Methode detektiert. Die Ergebnisse dieses Endpunkts, für jede Zellsorte einzeln auf die entsprechenden unbehandelten Kontrollen normiert, sind in Abbildung 51 gegenübergestellt.

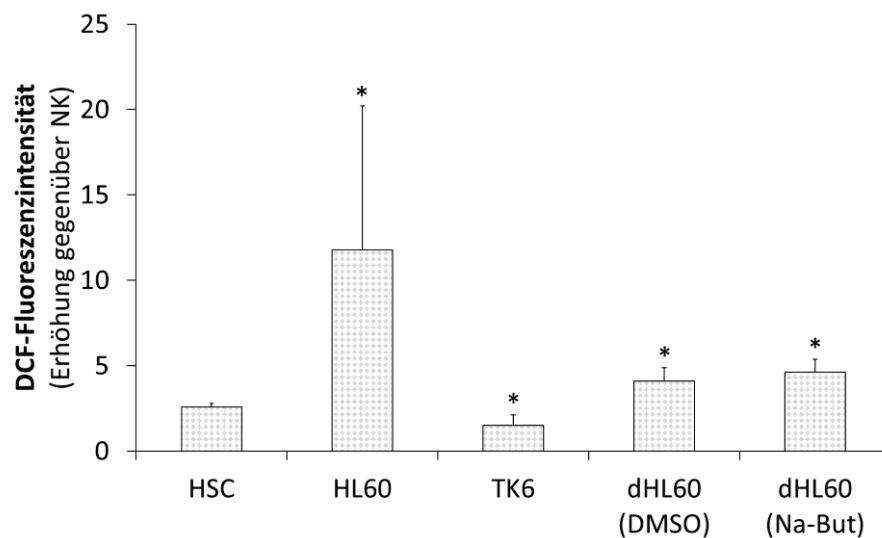


Abbildung 51: Quantifizierung der DCF-Fluoreszenz als Maß für reaktive Sauerstoffspezies in HSZ, HL-60, TK6 und dHL60 (DMSO/Na-But). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der mit NQO behandelten Zellen, für jede Zellsorte auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle normiert (n=6 für HSZ, n=7 für HL-60, n=4 für TK6 und dHL60) (*: $p \leq 0,05$ gegen HSZ).

Im Vergleich zu den Stammzellen reagierten die undifferenzierten und differenzierten HL-60-Zellen mit signifikant stärkerer Induktion von ROS bzw. oxidativem Stress durch NQO. Insbesondere die undifferenzierten HL-60-Zellen wiesen eine 4-fache Erhöhung auf, die jedoch mit fluktuierenden Werten und einer hohen Standardabweichung einherging. Die Werte der differenzierten Zellen waren annähernd um das Doppelte erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte die detektierte DCF-Fluoreszenz in den TK6-Zellen einen signifikant niedrigeren Wert als in den HSZ.

5.3.2 Zellzyklus-Analyse

Mit diesem Endpunkt sollte untersucht und gegenübergestellt werden, wie sich die verschiedenen Zelltypen während eines Substanz-induzierten Mitose-Arrests in den Zellzyklusphasen G1, S und G2/M verteilen. Die Induktion des Mitose-Arrests erfolgte über eine 6-stündige Inkubation der Zellen mit 0,1 μM NOC, an die sich die Färbung der DNA und die durchflusszytometrische Messung anschloss. Abbildung 52 zeigt typische Histogramme von den untersuchten Zellen ohne Behandlung (a) und nach NOC-Behandlung (b).

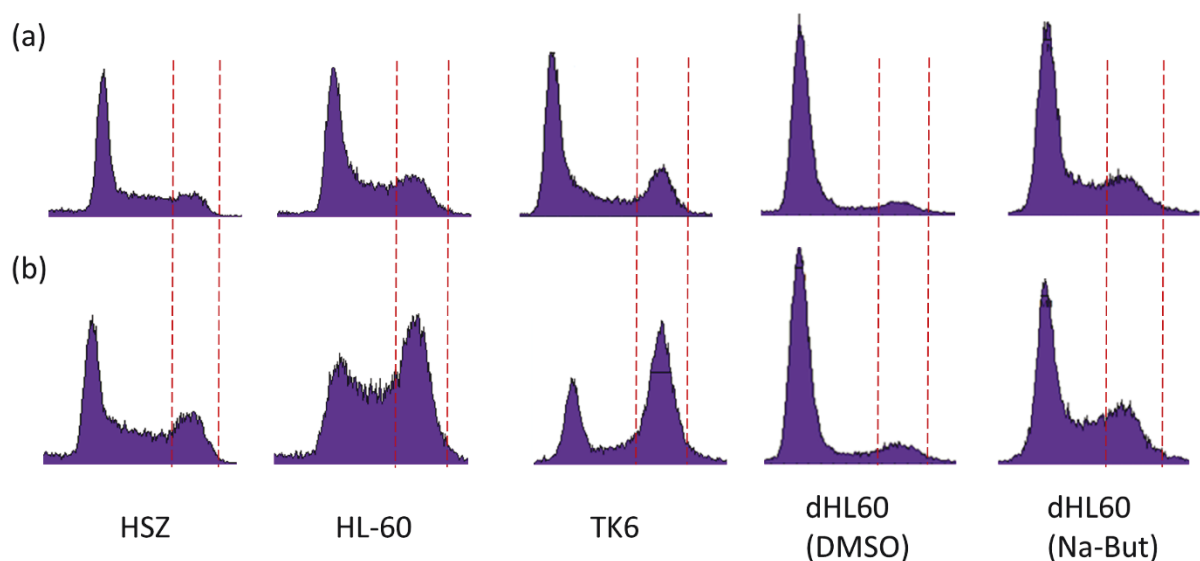


Abbildung 52: Repräsentative Histogramme für die Quantifizierung der Zellzyklusverteilung in HSZ, HL-60, TK6 und differenzierten HL-60 (DMSO, Na-But) ohne Behandlung (a) und nach 6-stündiger Inkubation mit NOC (b). Die roten Markierungslinien dienen zur Veranschaulichung der Zellverteilung in der G2/M-Phase.

Für alle Zelltypen konnte durch die Behandlung mit NOC ein G2/M-Arrest induziert werden. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen war vor allem bei den HSZ und den beiden Zelllinien ein deutlicher G2/M-Arrest zu verzeichnen, was mit einem signifikanten Anstieg der Zellzahlen in dieser Phase einherging (Daten nicht gezeigt). Dieser Arrest fiel für die beiden Zelllinien HL-60 und TK6 sogar noch stärker aus als für die Stammzellen (Daten nicht gezeigt).

Jedoch konnten bei den Zelllinien auch schon in den unbehandelten Proben mehr Zellen in der G2/M-Phase detektiert werden als bei den Stammzellen. Daher war das Verhältnis nach Normierung gegen die unbehandelten Proben, zu sehen in Abbildung 53, für diese drei

Zelltypen annähernd gleich, mit ungefähr doppelt so vielen Zellen in der G2/M-Phase nach NOC-Behandlung. Auch für die G1-Phase konnte keine Veränderung zwischen den drei Zelltypen verzeichnet werden.

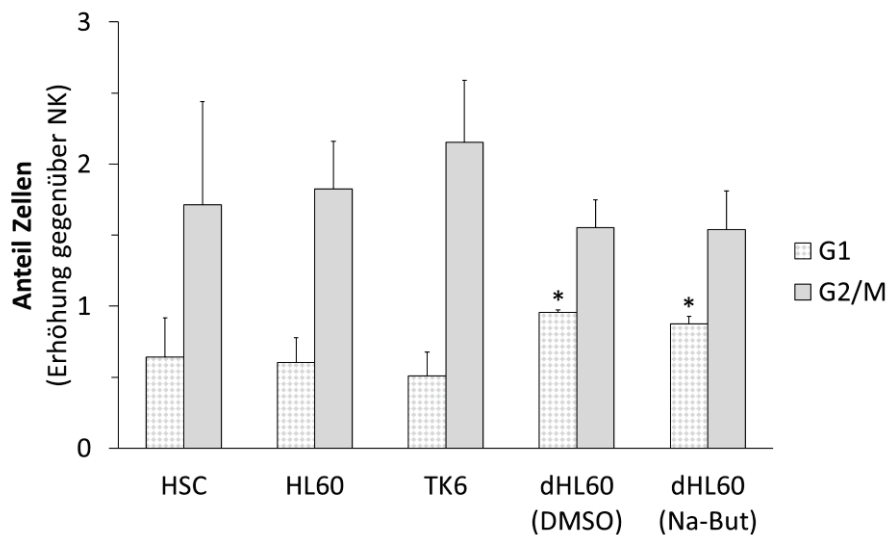


Abbildung 53: Anteil der Zellen (HSZ, HL-60, TK6 und differenzierte HL-60 mit DMSO und Na-But) in den Zellzyklusphasen G1 und G2/M nach Behandlung mit NOC. Die Werte wurden jeweils auf die unbehandelten Kontrollen normiert (n=8 für HSZ, n=7 für HL-60, n=4 für TK6 und dHL60) (*: $p \leq 0,05$ gegen HSZ).

Im Gegensatz zu den Zelllinien, nahm für die differenzierten HL-60-Zellen die Anzahl der Zellen in G2/M im Vergleich zu den Stammzellen signifikant ab (Daten nicht gezeigt). D. h. weniger Zellen als bei den HSZ arretierten in dieser Phase bedingt durch die NOC-Behandlung. Bei Betrachtung der auf die Negativkontrollen bezogenen Werte in Abbildung 53 konnte zwar eine leichte Abnahme verzeichnet werden, diese war jedoch nicht signifikant verschieden von den Werten der HSZ. Dagegen war die Anzahl der differenzierten Zellen in der Phase G1 signifikant erhöht gegenüber den HSZ. Dies spiegelte sich auch in den nicht normierten Daten (nicht gezeigt) wider.

5.3.3 DNA-Schaden

Unterschiede in der Reaktion der verschiedenen Zelltypen gegenüber genotoxischen Substanzen wurden mit dem Comet Assay nach 4-stündiger Behandlung mit 150 μ M MMS analysiert. Die Quantifizierung erfolgte über die Messung des prozentualen Anteils der DNA im Schweif, als Maß für den durch die Behandlung hervorgerufenen DNA-Schaden. In der

folgenden Abbildung (Abbildung 54) sind die gegen die unbehandelten Kontrollen normierten Werte für die fünf untersuchten Zelltypen gegenübergestellt.

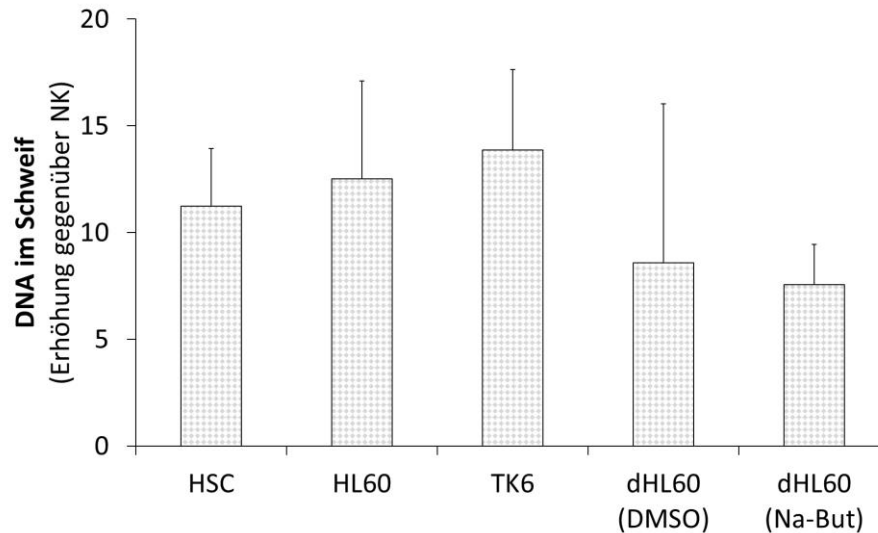


Abbildung 54: DNA-Schäden in HSZ, HL-60, TK6 und differenzierten HL-60 (DMSO, Na-But) nach Behandlung mit MMS. Für jede Probe wurde zunächst der prozentuale Anteil an geschädigter DNA im Schweif in jeweils 100 Zellen ermittelt und anschließend als Erhöhung gegenüber der entsprechenden unbehandelten Kontrolle dargestellt (n=7 für HSZ, n=4 für HL-60, TK6 und dHL60).

Im Vergleich zu den HSZ konnte kein signifikanter Unterschied in der Entstehung von DNA-Schäden für die beiden Zelllinien sowie für die differenzierten HL-60-Zellen detektiert werden. Mit einer 8- bis 14-fachen Erhöhung gegenüber der Negativkontrollen lagen die Werte für alle untersuchten Zelltypen auf einem ähnlichen Niveau.

5.3.4 DNA-Reparatur

Für die Untersuchungen der DNA-Reparatur in HSZ, HL-60, TK6 und dHL60 wurden zunächst DNA-Schäden über UV-Strahlung induziert, anschließend mit APH behandelt und nach einer Nachinkubation von 2 h die verbleibenden Schäden mittels Comet Assay ermittelt. Die Ergebnisse der normierten Werte können Abbildung 55 entnommen werden.

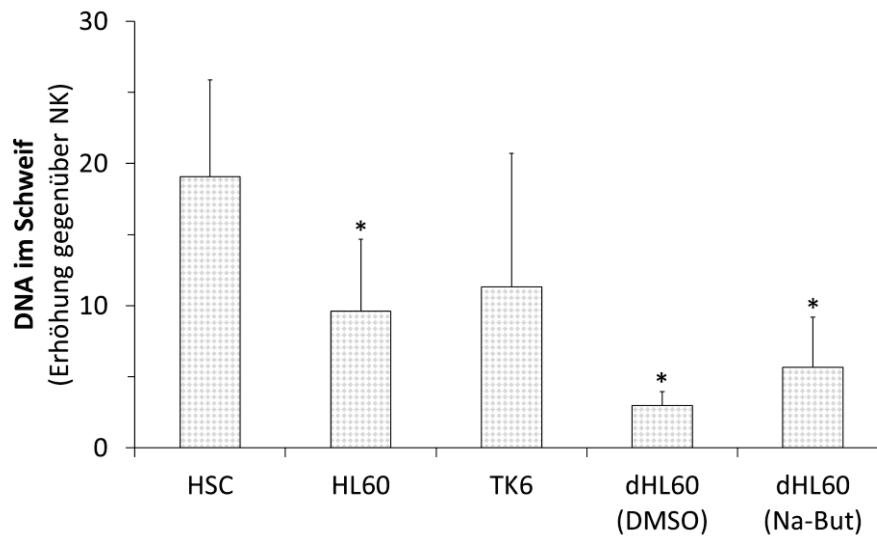


Abbildung 55: DNA-Schäden in HSZ, HL-60, TK6 und differenzierten HL-60 (DMSO, Na-But) nach Induktion der DNA-Schäden durch UV-Strahlung und anschließender Behandlung mit APH. Der prozentuale Anteil an geschädigter DNA im Schweif wurde in jeweils 100 Zellen ermittelt und als Erhöhung gegenüber den unbehandelten Kontrollen (nur UV) dargestellt (n=8 für HSZ, n=4 für HL-60, TK6 und dHL60) (*: $p \leq 0,05$ gegen HSZ).

In der dargestellten Abbildung ist zu sehen, dass sowohl die beiden Zelllinien als auch die differenzierten HL-60-Zellen nach Behandlung mit UV-Strahlung in Kombination mit APH weniger DNA-Schäden entwickelten als die Stammzellen. Für die HSZ war der Wert 20-fach höher als in der entsprechenden NK, für alle anderen Zelltypen lag die Erhöhung mit einem Faktor von 3-12 deutlich unterhalb derjenigen für HSZ. Die niedrigen Zunahmen konnten hierbei den dHL60-Zellen zugeordnet werden (ca. 3-fach für DMSO und ca. 6-fach für Na-But). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich auch für die nur mit UV-Strahlung behandelten Kontrollen. Hier wiesen vor allem die differenzierten HL-60-Zellen signifikant höhere Werte (3-6-fach) im Vergleich zu den Stammzellen auf (Daten nicht gezeigt). Dieser erhöhte DNA-Schaden ging auch einher mit einer erhöhten Apoptose-Rate. Diese war nicht nur in den UV-Kontrollen, sondern auch in den UV+APH-behandelten Proben deutlich erhöht (Daten nicht gezeigt). APH alleine zeigte diesen Effekt nicht.

5.3.5 Histonacetylierung

Die Detektion von acetyliertem Histon H3 erfolgte durchflusszytometrisch nach Behandlung der zu untersuchenden Zellen (HSZ, HL-60, TK6 und dHL60) mit dem HDAC-Inhibitor TSA für 24 h. Die gegen die entsprechenden Negativkontrollen normierten Werte für die detektierte Fluoreszenzintensität sind in Abbildung 56 veranschaulicht.

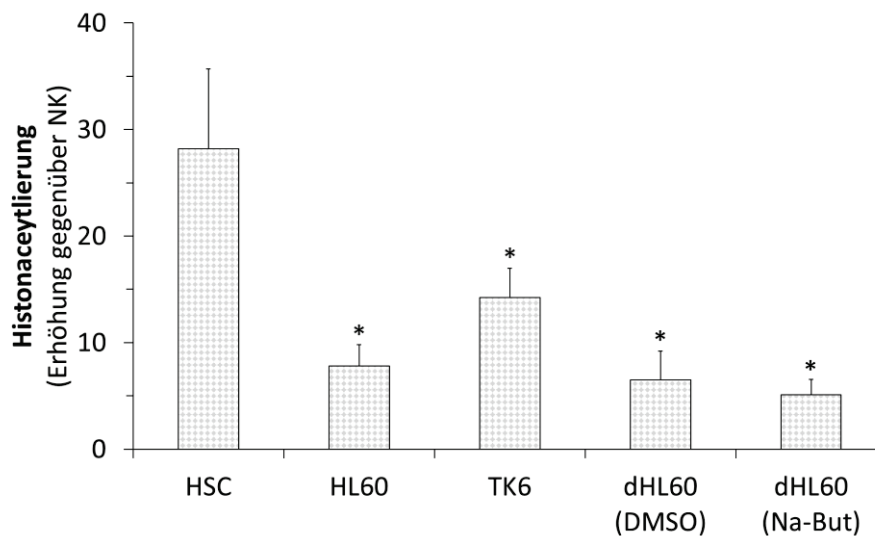


Abbildung 56: Quantifizierung der Acetylierung von Histon H3 nach Behandlung von HSZ, HL-60, TK6 und differenzierten HL-60 (DMSO und Na-But) mit TSA. Dargestellt ist die normierte mittlere Fluoreszenzintensität aus unabhängigen Experimenten (n=6 für HSZ, n=7 für HL-60, n=4 für TK6 und dHL60) (*: $p \leq 0,05$ gegen HSZ)

Auch bei diesem Endpunkt reagierten die HSZ im Vergleich zu den anderen Zellen empfindlicher gegenüber der TSA-Behandlung, was sich hier in dem höchsten Wert für die Histonacetylierung äußerte. Dieser lag für die HSZ annähernd 30-fach höher als in den zugehörigen unbehandelten Zellen. Mit Werten, die nur ungefähr 5- bis 15-mal gegenüber den Kontrollen erhöht waren, konnte bei den anderen Zelltypen eine signifikant niedrigere Histonacetylierung beobachtet werden.

6 DISKUSSION

6.1 Mobilfunkexpositionen

Mobilfunk spielt weltweit eine sehr wichtige Rolle, nicht zuletzt weil sich die Technologie kontinuierlich verbessert und die Verwendung von modernen Endgeräten schnell zunimmt. Zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen sowie epidemiologische Studien wurden durchgeführt, um potentielle Effekte von Mobilfunkstrahlung auf das biologische System beurteilen zu können. Dennoch gibt es weiterhin Bedenken bezüglich der Fragestellung, ob diese Art der nichtionisierenden Strahlung als schädlich betrachtet werden soll. Mögliche Gründe hierfür sind, dass die Methoden der veröffentlichten Studien untereinander stark variieren und Untersuchungen zur Verifizierung existierender Befunde nur selten durchgeführt werden.

Das Ziel der vorliegenden *in-vitro*-Studie war es, den Effekt von EMF im Bereich der Radiofrequenzstrahlung, die unter anderem von Mobiltelefonen emittiert wird, auf das humane hämatopoetische System zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden CD34-positive hämatopoetische Stammzellen mit modulierten Signalen für GSM (900 MHz), UMTS (1.950 MHz) und LTE (2.535 MHz) und den SAR-Werten 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg über einen kurzen (4 h) und einen langen (20 h) Zeitraum exponiert. Die gleichen Experimente erfolgten mit Zellen der Promyelozyten-Zelllinie HL-60, sodass anschließend die Ergebnisse verglichen werden konnten. Die Expositionen der beiden Zellarten unterschieden sich jedoch in der Dauer der Langzeitexposition, die für die HL-60-Zellen 66 h betrug. Bedingt durch die kurze Kulturdauer der Stammzellen von nur insgesamt 7 maximal möglichen Tagen sowie einer hohen, für die Experimente benötigten Zellzahl, wurde die Dauer der Langzeitexposition für die HSZ von 66 h auf 20 h reduziert. Auch bei der geringeren Expositionszeit konnte die Dauer eines kompletten Zellzyklus abgedeckt und somit eine ausreichende Expositionszeit für die auf Proliferation basierenden Endpunkte (z. B. die Zellzyklus-Analyse oder Differenzierung) gewährleistet werden. Da beide Zellarten zum hämatopoetischen System gehören und humanen Ursprungs sind, mussten speziesübergreifende Unterschiede nicht berücksichtigt werden. Für die Risikobewertung im Menschen stellten die HSZ das relevantere System dar. Bei diesen Zellen handelt es sich um

primäre Vorläuferzellen, die die Eigenschaft besitzen alle unterschiedlichen Zelltypen des hämatopoetischen Systems durch Differenzierung zu bilden. Im Gegensatz dazu haben die Zellen der Tumor-Zelllinie HL-60 diese Eigenschaften nicht. Nichtsdestotrotz sind die Resultate aus Experimenten mit den HL-60-Zellen wichtig zur Identifizierung Zelltyp-spezifischer Effekte von Zelllinien im Vergleich zu Primärzellen einerseits und differenzierten Zellen im Vergleich zu Stammzellen andererseits. Da die HL-60-Zellen weiterhin eine weitverbreitete Standardzelllinie darstellen, können die Ergebnisse einfacher mit anderen Publikationen verglichen werden.

So untersuchten Jin *et al.* in ihrer Studie die Vitalität und die Apoptoserate sowie weitere Endpunkte (darunter das Mitochondrien-Membran-Potential, intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel und die Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase-Aktivität) in HL-60-Zellen nach Exposition mit RF-EMF der Frequenz 900 MHz [161]. Eine Vergleichbarkeit zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist daher nicht nur hinsichtlich der gewählten Frequenz (900 MHz), sondern auch in Bezug auf die Endpunkte Vitalität und Apoptose gegeben. Auch bei der Wahl der Expositionsvorrichtung sind Parallelen zu finden. Die Zellen wurden in einer sogenannten GTEM-Zelle (Gigahertz Transverse Electromagnetic Cell) exponiert, die nach einem ähnlichen Prinzip wie die hier eingesetzte μ TEM-Zelle funktioniert.

Weitere Vergleiche können zu den von Speit *et al.* durchgeführten Untersuchungen gezogen werden. Basierend auf einer anhaltenden wissenschaftlichen Debatte über die im Jahr 2004 veröffentlichten Ergebnisse zu einer von der Europäischen Union geförderten Studie (REFLEX-Projekt [162]) wurden Wiederholungsexperimente zur Reproduktion der Ergebnisse aus der genannten Studie durchgeführt. Dabei exponierte die Arbeitsgruppe HL-60-Zellen mit RF-EMF und untersuchte mit der Comet-Assay-Methode sowie dem Mikrokern-Test mögliche gentoxische Effekte von RF-EMF [163]. Im Gegensatz zur REFLEX-Studie, in der ein Dosis-unabhängiger Effekt detektiert wurde, beobachtete die Gruppe um Speit *et al.* keine gentoxischen Effekte. Auch in der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der Gentoxizität in RF-EMF-exponierten HL-60-Zellen und HSZ mit dem Comet Assay, ebenso wie bei Speit *et al.* Des Weiteren wurden in beiden Arbeiten ähnliche Frequenzen untersucht, 1.800 MHz bei Speit *et al.* und 1.950 MHz in der vorliegenden Arbeit. Außerdem deckten die hier untersuchten SAR-Werte 1 W/kg und 2 W/kg auch den von Speit *et al.* adressierten SAR-Wert mit 1,3 W/kg ab. Somit scheint eine Vergleichbarkeit der beiden Studien gegeben.

Tao *et al.* beobachteten nach Bestrahlung von HL-60-Zellen mit EMF, dass die Zellen von nicht-phagozytierenden Suspensionszellen zu einer adhären, Fibroblasten-ähnlichen Kultur mit hoher Phagozytose-Aktivität differenzierten [164]. Einen vergleichbaren Effekt bewirkte die Behandlung mit PMA in niedrigen Konzentrationen. Der beobachtete Effekt zeigte sich weiterhin additiv für die Kombination von EMF und PMA in niedrigen Konzentrationen. Die Gruppe um Tao *et al.* kam daher zu der Schlussfolgerung, dass die Ergebnisse auf eine ähnliche Wirkungsweise der beiden Induktoren EMF und PMA beim Prozess der Differenzierung hinweisen und vermuteten ähnliche zugrundeliegende molekulare Mechanismen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine potentielle Differenzierung von HL-60-Zellen und HSZ als Ursache für RF-EMF untersucht. Zwar unterschied sich die von Tao *et al.* untersuchte Frequenz (60 Hz) deutlich von den analysierten Frequenzen hier, allerdings wurde in beiden Studien PMA als Positivkontroll-Substanz eingesetzt. PMA bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression des Oberflächenmarkers CD11b, was auf eine Differenzierung der Zellen zurückzuführen war. Dies äußerte sich auch in einer morphologischen Änderung der Zellen wie sie von Tao *et al.* beschrieben wurde. Würde nun nach Bestrahlung mit RF-EMF eine erhöhte CD11b-Expression in den Zellen gemessen werden, so könnte dieser Effekt ebenso wie bei Tao *et al.* auf einer ähnlichen Wirkungsweise von PMA und RF-EMF basieren.

Mögliche Effekte der untersuchten Mobilfunkstrahlung wurden in der hier vorliegenden Arbeit mit unterschiedlichen Endpunkten bewertet: Apoptose, Zellzyklus-Analyse, oxidativer Stress, DNA-Schaden, DNA-Reparatur, Differenzierung und Histonacetylierung. Für jeden der genannten Endpunkte wurden vorab Positivkontrollen mit geeigneten Chemikalien etabliert und parallel zu den Expositionen in regelmäßigen Abständen (1-mal pro Woche) mitgeführt. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass alle Methoden prinzipiell in der Lage waren mögliche Effekte in den exponierten Proben zu detektieren.

6.1.1 Apoptose

Nach Exposition mit den drei untersuchten Modulationen des Mobilfunks konnte für die untersuchten Zelltypen und beide Expositionszeiten keine Induktion in der Häufigkeit apoptotischer Zellen detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Mehrheit der publizierten Daten zu diesem Endpunkt überein. Die Arbeitsgruppe um Lantow *et al.*

beschäftigte sich unter anderem mit dem Effekt von RF-Strahlung bei 1.800 MHz und einem SAR-Wert von 2 W/kg auf die Apoptose-Rate in der humanen Monozytenzelllinie Mono Mac 6, konnte allerdings keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Scheinexponierten Probe nach 12 h Befeldung beobachten [165]. In einer weiteren Studie lag der Schwerpunkt der Experimente auf der Untersuchung eines möglichen Effekts bei Kombination von RF-Strahlung bei 900 MHz mit der Verwendung des Chemotherapeutikums Doxorubicin. Die Kontrolle, bei der HL-60-Zellen ausschließlich einer Behandlung mit RF-Strahlung ausgesetzt wurden, zeigte ebenfalls keine Erhöhung in der Apoptose-Rate [161]. Neben unterschiedlichen humanen Zelllinien, wurden auch primäre Zellen, wie beispielsweise mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) oder neuronale Zellen, analysiert, jedoch ohne auffällige Befunde [166, 167]. Nur wenige Publikationen berichten über induzierte Apoptose-Raten durch RF-Strahlung [168, 169]. Den entsprechenden Autoren zufolge werden diese Ergebnisse allerdings bedingt durch Serum-Entzug oder durch thermische Effekte.

6.1.2 Oxidativer Stress

Auch der intrazelluläre Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies wurde in den vorliegenden Untersuchungen nicht beeinflusst. Im Allgemeinen ergibt sich dieser Spiegel aus dem Gleichgewicht extrazellulär einwirkender und intrazellulär erzeugter reaktiver Sauerstoffspezies und der zellulären antioxidativen Abwehr. Ist dieses Gleichgewicht in der Zelle gestört, so resultiert dies in einem Status, der als oxidativer Stress bezeichnet wird.

Im Detail wurde die Induktion von oxidativem Stress mit einer durchflusszytometrischen Methode betrachtet. Ein Anstieg an intrazellulären ROS nach Exposition der HSZ und HL-60-Zellen mit Mobilfunkstrahlung bei 900 MHz, 1.950 MHz und 2.535 MHz konnte in diesen Untersuchungen jedoch nicht beobachtet werden. Diese Befunde sind konsistent mit bereits veröffentlichten Studien. In einer publizierten Studie wurden Monozyten und Lymphozyten, gewonnen aus humanem Nabelschnurblut, mit 1.800 MHz für 30 min oder 45 min exponiert, jedoch ohne nachweisbaren Effekt auf die ROS-Induktion nach der Exposition [170]. In einer weiteren Untersuchung führte die Exposition mit RF-Strahlung bei 900 MHz ebenfalls nicht zu einer Induktion an ROS in L929 Fibrosarkom-Zellen. Die Dauer der Expositionen lag bei 10 min bzw. 30 min mit SAR-Werten von 0,3 W/kg und 1 W/kg [171]. Mit der durchflusszytometrischen Erfassung von DCFH handelte es sich bei dieser Untersuchung um

die gleiche Detektionsmethode wie in der vorliegenden Studie. Die Mehrheit der in jüngster Vergangenheit durchgeführten Studien zur Mobilfunkstrahlung und oxidativem Stress wurden allerdings nicht in Zellkulturmodellen, sondern in Tiermodellen, vorwiegend Ratten, durchgeführt. Einige von ihnen berichten Effekte auf die ROS-Induktion [172, 173], andere Gruppen konnten dagegen keine signifikanten Veränderungen der für oxidativen Stress spezifischen Biomarker nach Bestrahlung der Tiere mit Mobilfunk feststellen, weder für Kurzzeit- noch für Langzeitexpositionen [174].

6.1.3 Zellzyklus-Analyse

Die Verteilung der HSZ und HL-60-Zellen in den Zellzyklusphasen nach Exposition mit Mobilfunkstrahlung zeigte sich in der vorliegenden Studie ebenfalls unverändert. Untersuchungen in der humanen Krebszelllinie MCF7 beschäftigten sich mit dem Einfluss einer Einfachapplikation mit 837 MHz und einer kombinierten Befeldung mit 837 MHz und 1.950 MHz auf die Zellzyklusverteilung und auf regulatorische Proteine des Zellzyklus wie p53, p21 oder Cycline [175]. Beide Variationen dieser Bestrahlung riefen keine Veränderungen in der Zellzyklusverteilung hervor und auch die Spiegel der regulatorischen Proteine zeigten sich unverändert. Liu *et al.* adressierten in ihren Experimenten Effekte von 3G-Signalen (1.950 MHz TD-SCDMA) auf generelle zelluläre Vorgänge in Glioblastom-Zellen. Hierfür wurden zwei humane Glioblastom-Zelllinien exponiert [176]. Trotz der relativ langen Expositionszeit von 48 h und einem SAR-Wert, der mit 5 W/kg deutlich höher lag, als der von der ICNIRP empfohlene Sicherheitsstandard von 0,08 W/kg Ganzkörper-SAR oder 2 W/kg Teilkörper-SAR [105], konnten auch hier keine Effekte auf Zellproliferation, Apoptose, Morphologie, Zellzyklus und Migration nachgewiesen werden. Diese Befunde führten daher zu der Schlussfolgerung, dass diese Art der RF-Strahlung nicht als zytotoxisches oder Tumor-förderndes Agens in den betrachteten biologischen Systemen agiert [176].

6.1.4 DNA-Schaden

Mit dem Endpunkt DNA-Schaden sollte die potentielle Gentoxizität von EMF im Bereich von RF-Strahlung in Zellen des hämatopoetischen Systems beurteilt werden. Auf den ersten Blick sahen die Ergebnisse, gewonnen mit der Methode des Comet Assays, unauffällig aus und ließen keinen offensichtlichen Effekt nach der Exposition erkennen. Die statistische Analyse

offenbarte jedoch für die Ergebnisse der ersten Untersuchungen in den Stammzellen (Abbildung 41) eine signifikante Abnahme des DNA-Schadens im Vergleich zur Scheinexposition nach Kurzzeitexposition mit der GSM-Modulation und für die SAR-Werte 0,5, 1 und 4 W/kg. Diese Beobachtung konnte allerdings weder für die Intensität 2 W/kg, noch für alle Intensitäten der Modulationen UMTS und LTE oder für die Langzeitexpositionen festgestellt werden.

Da im Comet Assay ein erhöhter Wert oft mit mehr DNA-Strangbrüchen und somit mit mehr DNA-Schaden korreliert, könnte die Abnahme in den vorliegenden Untersuchungen auf einen protektiven Effekt der Mobilfunkstrahlung hindeuten. Andererseits können aber auch andere Formen des DNA-Schadens, wie z. B. DNA-Quervernetzungen, zu niedrigeren Werten führen. Dies lässt die Interpretation zu, dass mit dieser Methode neben DNA-Strangbrüchen auch weitere DNA-Veränderungen oder aber auch eine Kombination von unterschiedlichen DNA-Veränderungen detektiert werden könnten. Eine weitere Erklärung für die statistisch signifikanten Unterschiede der genannten Proben könnte darin begründet liegen, dass die Werte der Veränderungen sehr klein waren. Dafür spricht, dass auch keine Intensitäts-abhängige Änderung vorlag.

Um die signifikanten Befunde dieser Untersuchungen zu verifizieren bzw. zu entkräften, wurde die gesamte Expositionsreihe für diesen Endpunkt sowohl für die HSZ als auch für die HL-60-Zellen wiederholt (Abbildung 42, Abbildung 43). Diesmal waren die Ergebnisse auch für die Stammzellen ohne statistisch signifikante Änderung zwischen den betrachteten SAR-Werten und der entsprechenden Scheinexposition. Die Annahme, dass die signifikanten Unterschiede der ersten Expositionsreihe durch sehr kleine Absolut-Werte der Veränderungen entstanden sind, kann auf Basis der Wiederholungsexperimente untermauert werden. Die Beobachtungen der ersten Expositionsreihe wurden daher als nicht biologisch relevant eingestuft.

Auch der Vergleich mit Befunden anderer Veröffentlichungen stützt diese Aussage. Es gibt zwar Publikationen, die einen schützenden Effekt von Mobilfunkstrahlung auf biologische Systeme zeigen, allerdings beschäftigen sich diese Studien vorwiegend mit adaptiven Antworten. Bei diesen Untersuchungen werden Zellen initial mit nichtionisierenden Feldern des Mobilfunks exponiert und anschließend anderen Stressoren, wie beispielsweise ionisierender Strahlung, gentoxischen oder radiomimetischen Substanzen ausgesetzt. Es wird

berichtet, dass die resultierenden DNA-Schäden und der oxidative Stress durch die initiale Exposition geringer ausfallen als ohne Applikation der Mobilfunkstrahlung [177-179].

Über Effekte, die zu einem Anstieg an DNA-Schäden nach Mobilfunk-Exposition führen, wurden bislang widersprüchliche Beobachtungen veröffentlicht. Einige Berichte beschreiben signifikante Erhöhungen in diesem Endpunkt, andere wiederum detektierten nicht mehr DNA-Schäden in ihren Untersuchungen. In einer vorangegangenen Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte kein Anstieg in der Mikrokern-Bildung in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Mensch/Hamster-Hybridzelllinie A_L (human-hamster hybrid) nach Exposition mit 900 MHz beobachtet werden [100]. Ebenso verhielt es sich bei Waldmann *et al.*, die die Gentoxizität in humanen peripheren Lymphozyten mit vier verschiedenen zytogenetischen Methoden untersuchten, darunter die Chromosomenaberration, der Mikrokerntest, der Schwesternchromatidaustausch und der Comet Assay [130]. Für diese Experimente wurden die Zellen mit 1.800 MHz und drei unterschiedlichen SAR-Werten (0,2, 2 und 10 W/kg) für 28 h exponiert. Andere Zelllinien, wie CHL-Zellen (chinese hamster lung cells), Astrozyten aus der Ratte, humane Epithelzellen unterschiedlichen Ursprungs (Fruchtwasser, Auge), humane Hautfibroblasten und humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs, human umbilical vein endothelial cells), waren Gegenstand der Untersuchungen bei Xu *et al.* und wurden bei 1.800 MHz und 3 W/kg durchgeführt [180]. Durch immunhistochemische Färbung von γ -H2AX, ein weitverbreiteter Marker zur Detektion von DNA-Schäden, konnte zwar ein erhöhter DNA-Schaden in einigen der Zelllinien detektiert werden, dieser äußerte sich allerdings nicht in einem Folge-Effekt auf eine messbare DNA-Fragmentierung, einen verlängerten Zellzyklusarrest, die Zellproliferation oder die Zellvitalität.

6.1.5 DNA-Reparatur

Auch für den Endpunkt der DNA-Reparatur konnten in der vorliegenden Arbeit keine Veränderungen festgestellt werden. Untersucht wurde hierbei die Kapazität von HSZ und HL-60-Zellen DNA-Schäden, induziert mittels UV-Strahlung 2 h vor Mobilfunk-Expositionsende, zu reparieren. Methode der Wahl war der Comet Assay. Die Mehrheit der publizierten Arbeiten zu dieser Thematik basiert auf Analysen auf Proteinebene. So untersuchten Bourthoumieu und Kollegen einen potentiellen Effekt von Mobilfunkstrahlung der Frequenz 900 MHz in

humanen amniotischen Zellen für 24 h und für die Intensitäten 0,25, 1, 2 und 4 W/kg [181]. Basierend auf der Tatsache, dass p53 bereits vor einer möglichen DNA-Reparatur aktiviert wird, könnte die Detektion dieses Markers laut den Autoren sensitiver sein als die konventionellen genotoxischen Methoden, wie beispielsweise der Comet Assay. Daher wählten sie als Endpunkt für die Analyse ihrer Experimente die Detektion des p53-Proteins. Im Detail wurden dabei die Expression und die Aktivierung dieses Proteins mit der Methode des Western Blots betrachtet. Da es für den SAR-Wert 4 W/kg zu einer Temperaturerhöhung von 3,5 °C kam, wurde zunächst angenommen, dass hier ein messbarer thermaler Effekt vorliegen könnte. Trotzdem konnte die Arbeitsgruppe keine signifikante Veränderung in der Expression und Aktivierung von p53 für alle analysierten SAR-Werte detektieren. Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Gruppe im Vorfeld, dass Mikrowellen der GSM-Modulation mit 905 MHz und 915 MHz sowie UMTS mit 1.947,4 MHz die Bildung von DNA-Reparatur-Foci, zusammengesetzt aus 53BP1/ γ -H2AX, in humanen Lymphozyten von hypersensitiven und gesunden Personen inhibieren [182]. Diese Inhibierung wurde sogar für bis zu drei Tage nach der Exposition aufrechterhalten. Hypersensitive Probanden zeichneten sich dadurch aus, dass die betroffenen Personen in der Nähe von EMF-Quellen (z. B. Computer oder Mobiltelefone) an zahlreichen unspezifischen Symptomen litten, darunter neurovegetative Symptome wie Kopfschmerzen, Müdigkeit und Konzentrationsschwierigkeiten sowie Veränderungen der Haut. Dies basierte auf Berichten der betroffenen Personen aus eigener Erfahrungen sowie ihrer schlechten Gesundheit. In einer nachfolgenden Studie derselben Gruppe wurden humane primäre Fibroblasten mit mesenchymalen Stammzellen hinsichtlich der 53BP1-Foci-Bildung nach GSM- und UMTS-Exposition verglichen [147]. Hier reagierten die Stammzellen empfindlicher gegenüber der Mobilfunkstrahlung, indem sie eine stärkere Inhibierung der 53BP1-Foci-Bildung aufwiesen als dies in den differenzierten Zellen der Fall war. Daher schlussfolgerten die Autoren, dass diese Befunde Hinweise auf mechanistische Zusammenhänge bei der Risikobewertung von Krebs geben könnten und dass Stammzellen ein relevanteres zelluläres Modell für die Beurteilung einer potentiellen Gefährdung von Mobilfunkstrahlung darstellen [147].

6.1.6 Differenzierung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zum Einfluss von Mobilfunkstrahlung auf die Differenzierung in HL-60-Zellen und in HSZ zeigten keine Effekte. Quantifiziert wurde die Expression des Oberflächenantigens CD11b mit einer durchflusszytometrischen Methode. CD11b (α_M -Untereinheit) gehört zur Familie der Integrine und bildet zusammen mit CD18 (β_2 -Untereinheit) das CR3-Heterodimer [183]. Es wird in unterschiedlichem Ausmaß auf Leukozyten, z. B. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und NK-Zellen, exprimiert und fungiert zusammen mit der Untereinheit CD18 als Glykoprotein in zahlreichen Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsionsinteraktionen sowie als Rezeptor für das Komplement iC3b [183, 184].

Wie bereits im zugehörigen Ergebniskapitel beschrieben, zeigten sich bei den Langzeitexpositionen der HL-60-Zellen mit dem GSM-Mobilfunkstandard und dem SAR-Wert 4 W/kg für alle drei Replikate stark erhöhte Werte der CD11b-Expression, die annähernd auf der Höhe der Positivkontrolle lagen. In den entsprechenden Proben wurde weiterhin eine niedrige Vitalität direkt nach der Exposition festgestellt, mit nur 44,5 % lebenden Zellen (Mittelwert aus den drei Replikaten, siehe Tabelle 5). Dies äußerte sich im Durchflusszytometer in einer erhöhten Fluoreszenz und führte zu falsch positiven Ergebnissen (eine vergleichende Darstellung eines Dot Blots nach durchflusszytometrischer Messung von unbehandelten (NK) und GSM-befeldeten HL-60-Zellen kann dem Anhang entnommen werden, Abbildung A1). Der Grund für die niedrige Anzahl vitaler Zellen in diesen Proben könnte darin liegen, dass insbesondere bei diesen Expositionsbedingungen die Proben in der μ TEM-Zelle, bedingt durch die technische Umsetzung, einer stärkeren Temperaturerhöhung während der Exposition ausgesetzt waren. Es wurden maximale Temperaturen von über 39,5 °C am Septum der μ TEM-Zelle aufgezeichnet, die vermutlich zum Zelltod der HL-60-Zellen führten. Für die Mobilfunkstandards UMTS und LTE zeigten sich für den gleichen SAR-Wert zwar ebenfalls höhere Maximalwerte der Temperatur am Septum, jedoch erhöhte sich hier die Temperatur während der Exposition nicht über 39 °C. Für die Langzeitexpositionen der HSZ wurden für diese Bedingungen vergleichbare Temperaturerhöhungen gemessen. Ein Zusammenhang zwischen Temperaturerhöhung und Vitalität lässt sich auch bei diesen Zellen vermuten. Hier fiel die Vitalität der Zellen ebenfalls niedriger im Vergleich zu den anderen Expositionsbedingungen aus (siehe Tabelle 6), mit ungefähr 70 % lag sie jedoch deutlich höher

als bei den HL-60-Zellen. Die quantitative Analyse der CD11b-Expression in HSZ äußerte sich allerdings nicht in erhöhten Fluoreszenzwerten, d. h. es wurden keine falsch positiven Werte detektiert, die auf einen Zelltod hindeuteten. Dies lag vermutlich an der kürzeren Expositionszeit der HSZ mit insgesamt 20 h. HL-60-Zellen wurden dagegen für 66 h exponiert und waren somit 3-mal länger den höheren Temperaturen ausgesetzt als die HSZ. Für die anderen Endpunkte konnten diesbezüglich keine Auffälligkeiten in den HL-60-Zellen festgestellt werden. Sie unterschieden sich von dem Endpunkt CD11b darin, dass die Proben direkt nach der Exposition aufgearbeitet und potentiell tote bzw. Hitze-geschädigte Zellen durch Aufarbeitungsschritte wie Zentrifugation oder Lyse eliminiert wurden. Da weiterhin bei den Kurzzeitexpositionen Beobachtungen dieser Art nicht gemacht werden konnten, scheint die Dauer der Einwirkung höherer Temperaturen eine essentielle Rolle bei thermischen Effekte, wie z. B. Apoptose, zu spielen.

Bei der Interpretation der vorliegenden Befunde kann gesagt werden, dass eine Differenzierung mit Veränderungen in der Expression des spezifischen Markers CD11b, der in Verbindung mit einer granulozytären Ausreifung stehen soll, weder für die HSZ noch für die HL-60-Zellen beobachtet werden konnten. Es kann zwar vermutet werden, dass eine granulozytäre Ausreifung in den betrachteten Zellsystemen nicht erfolgte. Eine definitive Aussage diesbezüglich kann auf der Basis der hier erhaltenen Ergebnisse jedoch nicht gemacht werden, da Zellreihen wie Granulozyten sich nicht nur durch einen Marker ausweisen, sondern durch eine bestimmte Kombination aus Oberflächenmarkern und Zelleigenschaften charakterisiert sind. Zur Stützung dieser Aussage sollten neben dem CD11b/CD18-Komplex noch weitere granulozytäre Marker, wie beispielsweise CD66b, untersucht werden.

Auch für eine allgemein gültige Aussage zur Differenzierung der Zellen in unterschiedliche Linien des blutbildenden Systems nach Mobilfunkexposition müssten in nachfolgenden Untersuchungen zusätzliche Oberflächenmarker und Zelleigenschaften analysiert werden. So könnten neben molekularbiologischen Untersuchungen auch klassische Methoden, wie die morphologische Beurteilung der Zellkerne entsprechend der Differentialblutbild-Analyse, durchgeführt werden. Diese Methode wird als Routineuntersuchung in der medizinischen Labordiagnostik eingesetzt und ermöglicht durch spezifische Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas eine Unterscheidung der zellulären Zusammensetzung in der (Blut-) Probe. Weiterhin könnten veränderte Zelleigenschaften wie die Adhärenz von Suspensionszellen an

Oberflächen analysiert werden, wie dies von Tao *et al.* in HL-60-Zellen nach Exposition mit ELF-EMF beobachtet wurde [164]. Erste Untersuchungen hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführt, indem die Anzahl adhärenter Zellen in den Zellkulturkammern nach Expositionsende bestimmt wurde (Ergebnisse für HL-60-Zellen und HSZ siehe Anhang, Abbildung A2 und A3). Da ein Effekt auch mit diesen Messungen nicht festgestellt werden konnte, stützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass durch RF-EMF keine Differenzierungseffekte induziert werden.

6.1.7 Histonacetylierung

Epigenetische Veränderung nach Befeldung von HL-60-Zellen und HSZ mit RF-EMF der GSM-, UMTS- und LTE-Standards konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Analysiert wurden mit der Durchflusszytometrie Modifikationen am Histonprotein H3 in Form von Acetylierungen. Methodisch unterschied sich die Aufarbeitung der Proben für die beiden untersuchten Zelltypen in einem Detail, nämlich der Fixierung der Zellen vor Markierung mit dem Antikörper gegen acetyliertes Histon H3. Dabei wurden HSZ fixiert, HL-60-Zellen nicht.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den erhaltenen Ergebnissen für die Zellen der Zelllinie HL-60 und die primären HSZ zu gewährleisten, wurde die Methode für die HL-60-Zellen angepasst und alle Untersuchungen aus den drei Replikaten mit Fixierung der Proben wiederholt. Grundsätzlich erschien die methodische Anpassung für die Zelllinie an dieser Stelle sinnvoller, da das Prinzip dieses Endpunkts darauf basiert, dass die im Innern des Zellkerns liegenden Zielproteine über Antikörper detektiert werden. Um den Antikörpern einen Zugang zu ihrem Antigen zu gewähren, bedarf es einer Permeabilisierung der Zellmembran, was über die Fixierung der Zellen realisiert werden kann.

Die Ergebnisse für fixierte HL-60-Proben können dem Anhang (Abbildung A4) entnommen werden. Die Auswertung lieferte keine konsistenten Ergebnisse. Alle Werte der Langzeit-exponierten Zellen (66 h) lagen deutlich über denjenigen der unfixierten Proben (vgl. Abbildung 48), unabhängig von der Frequenz und Intensität der Exposition, und waren annähernd so hoch wie die PK TSA. Dies war jedoch nicht der Fall für die Kurzzeitexpositionen (4 h) und für die mitgeführten historischen Kontrollen, unbehandelt (NK) und TSA-behandelt (PK). Die am stärksten erhöhten Werte zeigten sich für die Frequenz 2.535 MHz (LTE); diese lagen tendenziell sogar höher als die Werte der PK. Zwar waren demnach alle Proben

signifikant erhöht im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (NK), jedoch konnten keine statistisch relevanten Unterschiede der untersuchten SAR-Werte im Vergleich zu den entsprechenden Scheinexpositionen detektiert werden.

Die Tatsache, dass die beobachteten Effekte mit fixierten HL-60-Zellen nur bei den Langzeitexpositionen auftraten, nicht jedoch bei den Kurzzeitexpositionen sowie den Kontrollen, deutet darauf hin, dass es sich hierbei nicht um einen Effekt handelt, der auf die Methode zurückzuführen ist. Alle Proben wurden nach der gleichen Prozedur aufgearbeitet, wobei eine gemeinsame Aufarbeitung von Kurzzeit- und Langzeitexpositionen und von Kontrollen erfolgte. Weiterhin kann auch ein durch RF-EMF hervorgerufener Effekt ausgeschlossen werden, da neben den exponierten Proben auch alle Scheinexpositionen eine Erhöhung der gleichen Größenordnung aufwiesen. Nichtsdestotrotz scheint ein Zusammenhang zwischen den Langzeitexpositionen und den beobachteten (erhöhten) Werten für acetyliertes Histon H3 vorzuliegen. Beim Vergleich der Proben aus den Kurzzeit- und Langzeitexpositionen konnte ein Unterschied festgestellt werden: in den Langzeitexponierten Proben zeigte sich eine höhere Zelldichte in den Zellkulturkammern am Ende der Expositionen. Es wäre daher denkbar, dass durch die hohe Konzentration der Zellen die Histonacetylierung und dadurch die transkriptionelle Aktivierung von Genen induziert wird, die in der Zellzyklus-Kontrolle, der Differenzierung oder der Apoptose involviert sind.

Um diesen Sachverhalt näher klären zu können, bedarf es allerdings weiterer detaillierter Untersuchungen.

Bei Betrachtung der aktuellen Fachliteratur fällt auf, dass epigenetische Veränderungen nach Exposition mit EMF bis dato nur vereinzelt Gegenstand der Untersuchungen waren. Außerdem beschränken sich die wenigen Publikationen auf die Untersuchungen von EMF im niederfrequenten Bereich [185]. Ob RF-Strahlung epigenetische Aktivität hat und somit zur Entwicklung von Krebs beitragen könnte ohne direkt genotoxisch zu sein, wurde bisher nicht im Detail erforscht.

6.1.8 Mobilfunkstrahlung und Stammzellen – Stand der Forschung

In den vergangenen Jahren nahm die Forschung mit Schwerpunkt auf der Untersuchung von Effekten der Mobilfunkstrahlung in Stammzellen stark zu. Für den Großteil der durchgeführten Untersuchungen wurden neuronale Stammzellen und mesenchymale Stammzellen

eingesetzt. Diese Art der adulten Stammzellen spielen eine entscheidende Rolle für die Physiologie und Entwicklung des Gehirns und der Knochen und könnten möglicherweise auf dem Gebiet der regenerativen Medizin für zellbasierte Therapien verwendet werden. Tatsächlich konnten Veränderungen in der Proliferation und funktionellen Differenzierung beider Zelltypen, NSZ und MSZ, durch Befeldung mit EMF im niederfrequenten (ELF) und hochfrequenten (RF) Bereich nachgewiesen werden. Die Gewichtung der Studien lag dabei vorwiegend auf Untersuchungen mit ELF-EMF, sodass ein Vergleich mit den Expositionen der vorliegenden Studie nur eingeschränkt möglich ist. Piacentini *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass eine Exposition mit ELF-EMF die Proliferation von undifferenzierten murinen NSZ erhöhte und in differenzierten Zellen außerdem die Expression von molekularen Markern sowie funktionelle Eigenschaften von Neuronen begünstigt wurden [135]. Diese Befunde für ELF-EMF werden auch durch Ergebnisse anderer Gruppen gestärkt und konnten ferner bereits auf *in-vivo*-Untersuchungen übertragen werden [134, 137, 185]. Die Arbeitsgruppe um Chen *et al.* konnte zwar keinen Einfluss von RF-EMF auf die Rate der Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen zu Neuronen und Astrozyten beobachten, allerdings gelang es ihnen in derselben Studie zu zeigen, dass eine RF-EMF-Stimulation mit 4 W/kg über drei Tage hinweg das Auswachsen von Neuriten (efferente Zellfortsätze von Neuronen) aus NSZ-differenzierten Neuronen inhibierte [186]. Weitere Publikationen berichten über eine Begünstigung der neuronalen Differenzierung von aus dem Knochenmark stammenden MSZ [139, 140, 142, 187], vorwiegend humanen Ursprungs, sowie über eine verstärkte Proliferation und osteogene Differenzierung von aus dem Knochenmark stammenden Stromazellen (human) und Fettgewebstammzellen (murin) [146, 188] nach ELF-EMF-Stimulation.

Betrachtet man nun das blutbildende System, so fällt auf, dass bisher keine Studien zu Mobilfunkstrahlung und humanen hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt wurden. Zahlreiche Untersuchungen adressieren Effekte von RF-EMF in humanen Tumorzelllinien der hämatopoetischen Linie [161, 165] sowie in humanen primären Zellen, wie PBMC [129, 130, 170]. Außerdem wurden Effekte von EMF auf das hämatopoetische System bereits in anderen Spezies betrachtet, z. B. in der Maus oder der Ratte. Unterschiedliche Methoden wurden beschrieben, wie verschiedene Tiermodelle einer entsprechenden Strahlung ausgesetzt werden können. So schilderte Kumar *et al.*, dass zunächst Femur und Tibia der Ratte EMF im

Radiofrequenzbereich (900 und 1.800 MHz) ausgesetzt wurden und anschließend eine Extraktion der Knochenmarkszellen für weitere Untersuchungen erfolgte [124, 189]. Die Ergebnisse dieser Experimente zu Proliferationsrate und Gentoxizität wiesen keine signifikanten Veränderungen auf. In anderen Studien wurden dagegen Tiere mit EMF exponiert, im Anschluss getötet und Blutproben sowie die Ziel-Organen entnommen und für weitere Analysen herangezogen [190].

6.2 Hämatopoetische Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen

Mit diesen Untersuchungen sollte die Sensitivität von Zellen des blutbildenden Systems mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus nach Behandlung mit mutagenen Substanzen verglichen werden. Hierfür wurden den HSZ, die in der Hierarchie des blutbildenden Systems ganz oben stehen und durch Differenzierung alle Blutzellen bilden können, die Zelllinien HL-60 und TK6 gegenübergestellt. Diese Zellen befinden sich weiter unten in der Hierarchie-Ebene: bei den HL-60-Zellen handelt es sich um Promyelozyten der myeloiden Linie [191], TK6-Zellen repräsentieren dagegen Lymphoblasten der lymphatischen Linie [192]. Neben den beschriebenen Zelllinien wurden weiterhin differenzierte HL-60-Zellen mit den HSZ verglichen, die noch stärker ausdifferenzierte Zellen in der hämatopoetischen Hierarchie-Ebene repräsentieren sollten. Es ist allgemein bekannt, dass HL-60-Zellen durch Stimulation mit bestimmten Chemikalien (terminal) ausdifferenzieren können. Vorwiegend wird eine Ausreifung zu Granulozyten- oder Monozyten-ähnlichen Zellen beschrieben [159, 160]. In der vorliegenden Arbeit kamen für die Differenzierung die Chemikalien DMSO und Natrium-Butyrat zum Einsatz.

Der Vergleich zwischen den Zelltypen basierte auf den Endpunkten oxidativer Stress, Zellzyklusanalyse, Gentoxizität, DNA-Reparatur und Histonacetylierung. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sind in Kapitel 5.3 beschrieben.

6.2.1 Oxidativer Stress

Nach Induktion von oxidativem Stress durch die Substanz NQO konnten unterschiedliche Mengen an ROS, quantifiziert über die DCF-Fluoreszenz als Maß für ROS, in den untersuchten Zelltypen beobachtet werden. Dabei gilt im Allgemeinen, dass die Zellen einem höheren oxidativen Stress unterliegen, je mehr ROS oberhalb des physiologischen Werts detektiert

werden. Im Vergleich zu den HSZ waren die Werte der DCF-Fluoreszenz in undifferenzierten und differenzierten HL-60-Zellen signifikant erhöht. Die Werte der TK6-Zellen dagegen lagen signifikant unter denjenigen der HSZ.

Nogueira-Pedro *et al.* beobachteten in ihren Untersuchungen zum Einfluss von oxidativem Stress auf primäre hämatopoetische Zellen aus humanem Nabelschnurblut und auf HL-60-Zellen ein vergleichbares Ergebnis [193]. Zur Stimulation setzten sie H₂O₂ ein und konnten zeigen, dass in HL-60-Zellen bereits bei niedrigen H₂O₂-Konzentrationen Apoptose und Nekrose induziert wurde, während die Vitalität der primären Zellen auch bei den höheren Konzentrationen kaum beeinflusst wurde. Da sich die verwendete Substanz (H₂O₂) von derjenigen in der vorliegenden Arbeit (NQO) unterschied, kann ein direkter Vergleich der beiden Arbeiten auf Basis der Substanz und der eingesetzten Menge nicht erfolgen. Dennoch sind sowohl H₂O₂ als auch NQO dafür bekannt, oxidativen Stress in Zellen zu induzieren. Außerdem wurden bei der Etablierung der Positivkontrolle für den Endpunkt oxidativer Stress (siehe Kapitel 5.1.2) neben den HL-60-Zellen auch HSZ in Vorversuchen mit H₂O₂ behandelt (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung resultierte nicht in einer Induktion von oxidativem Stress bei Verwendung der gleichen Konzentrationen wie für die HL-60-Zellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den von Nogueira-Pedro *et al.* gemachten Beobachtungen überein; auch auf der Basis der eingesetzten Zellsysteme ist eine Vergleichbarkeit der beiden Studien gegeben. Die beobachteten Unterschiede, sowohl bei Nogueira-Pedro *et al.* als auch in der vorliegenden Arbeit, können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass der intrazelluläre Gehalt an ROS in Tumor-Zelllinien wie HL-60 bereits grundlegend höher ist als dies bei normalen Zellen der Fall ist [194, 195].

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, residieren die Stammzellen *in vivo* in sogenannten Stammzellnischen mit einer streng regulierten Mikroumgebung, die die Funktionen und Eigenschaften der Stamm- und Vorläuferzellen aufrechterhält. Neben zahlreichen anderen Faktoren, wird hier auch die Entstehung von ROS kontrolliert [196]. Unter physiologischen Bedingungen, mit einem niedrigen ROS-Spiegel, wirkt intrazelluläres ROS in HSZ maßgeblich an endogenen Signalen, am Überleben der Zellen, der Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mit [197, 198]. Daher ist der Erhalt eines physiologischen Redox-Status von hämatopoetischen Geweben ausschlaggebend für eine normal ablaufende Hämatopoese. Bei ROS-Spiegeln oberhalb der physiologischen Werte kann

es durch den oxidativen Stress zu Fehlfunktionen und zur Alterung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen kommen. Aus diesem Grund gelten diese Zellen als sehr sensitiv gegenüber oxidativen Stressoren wie Medikamente zur Behandlung von Krebs, Strahlung und einer erheblichen Anhäufung von ROS [199-201]. Da sich HSZ weiterhin vorwiegend in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden und wenig Energie benötigen, besitzen sie eine geringere Anzahl an intrazellulären Mitochondrien als ausgereifte Zellen [202, 203]. Es konnte gezeigt werden, dass eine geringe Anzahl an Mitochondrien in CD34-positiven HSZ mit Stammzeleigenschaften wie der Pluripotenz einhergehen. Eine Erhöhung der Mitochondrien-Biogenese führt jedoch zum Verlust dieser Eigenschaft [204].

6.2.2 Zellzyklusanalyse

Die Analyse des Zellzyklus in den fünf unterschiedlichen Zelltypen zeigte, dass sowohl in den HSZ als auch in den Zellen der Zelllinien HL-60 und TK6 die Induktion eines G₂/M-Arrests mit NOC ähnlich ausfiel. Nach der Behandlung waren ungefähr doppelt so viele Zellen in der G₂/M-Phase als in den unbehandelten Kontrollen. Für die differenzierten Zellen konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen deutlich weniger Zellen in dieser Phase arretierten. Weiterhin konnten bei den differenzierten Zellen, unabhängig davon ob sie mit NOC behandelt wurden oder nicht, signifikant mehr Zellen in der G₁-Phase detektiert werden. Dieser Befund verdeutlicht, dass die Zellen durch die Differenzierung langsamer oder nicht mehr proliferieren und aus diesem Grund sich auch nicht oder nur bedingt durch eine NOC-Behandlung in der G₂/M-Phase anreichern lassen. Das Ziel der Differenzierung war es, in diesen Untersuchungen Zellen mitzuführen, die stärker ausgereifte bzw. final ausgereifte Zellen der hämatopoetischen Hierarchie-Ebene repräsentieren; in diesem Fall Granulozyten. Da final ausgereifte Zellen des blutbildenden Systems ebenfalls nicht mehr proliferieren und nur eine begrenzte Lebensdauer haben, konnte dieser Effekt in den hier vorliegenden Untersuchungen durch die Differenzierung mit DMSO und Na-But erzielt werden.

In ihrer natürlichen Umgebung, der homöostatischen Stammzellnische im Knochenmark, durchlaufen die meisten HSZ nur sehr selten den Zellzyklus und verbleiben vorwiegend in der G₀-Phase [42]. Ein essentieller Mechanismus für den Erhalt der Quieszenz unter homöostatischen Bedingungen, aber auch während der Hämatopoese, ist die Kontrolle der

Zellzyklus-Regulation. Im Allgemeinen wird der Zellzyklus häufiger durchlaufen, sobald eine Festlegung zur Differenzierung der HSZ in Linien-spezifische Vorläuferzellen erfolgt ist [205]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zellzyklus-Regulatoren wichtige bestimmende Faktoren bei der Selbsterneuerung der Stammzellen darstellen [41, 206]. Ob HSZ in den Zellzyklus eintreten, hängt von externen Signalen der Stammzellnische ab, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren. Eine umfangreiche Zusammenfassung zu den grundlegenden Komponenten der Zellzyklus-Maschinerie, die den Ruhezustand und die Zellzyklus-Progression in HSZ regulieren, geben die Arbeiten von Pietras *et al.* und Hao *et al.* wieder [207, 208].

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit zum Endpunkt Zellzyklusanalyse zeigen, dass sich die HSZ im Zellzyklus befinden. Homöostatische Bedingungen wie sie in der Stammzellnische vorzufinden sind, lagen in diesen Untersuchungen nicht vor.

6.2.3 DNA-Schaden und DNA-Reparatur

Während ihrer gesamten Lebensspanne sind HSZ vorwiegend als ruhende Stammzellen vorzufinden. Es wurde postuliert, dass dieser Mechanismus, der unter anderem durch eine niedrige metabolische Aktivität, eine hypoxische Umgebung und lange Perioden dieses Ruhezustands charakterisiert ist, dem Schutz der Zellen dient und den intrinsischen Stress minimiert. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass HSZ gegenüber Strahlen resistenter sind als die mitotisch aktiveren Vorläuferzellen [209, 210]. Dies ist auch konsistent zu der Tatsache, dass der intrazelluläre ROS-Spiegel in HSZ niedriger als in myeloiden Vorläuferzellen ist [211] und stützt die Idee, dass Zellen, die nur selten den Zellzyklus durchlaufen, gegenüber DNA-Schäden, die durch oxidativen Stress oder Replikations-Stress hervorgerufen werden, weniger anfällig sind. Zahlreiche Erkenntnisse aus Untersuchungen zu dieser Thematik deuten darauf hin, dass es in ruhenden HSZ spezifische Mechanismen gibt, die die HSZ vor DNA-Schäden schützen sollen, sodass während des Alterungsprozesses ihre Stammzeleigenschaften und ihre Funktionalität erhalten bleiben [212, 213]. Andernfalls würden HSZ ihr Stammzellpotential verlieren oder Mutationen erwerben, was in einer Störung der Hämatopoese resultieren könnte.

Im Gegensatz zu der Hypothese, dass HSZ protektiven Mechanismen unterliegen, konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass eine abgeschwächte DNA-Reparatur im Laufe des

Alterungsprozesses zur Akkumulation von DNA-Schäden in ruhenden HSZ führt [214, 215]. Weiterhin sollen DNA-Schäden laut einer aktuellen Studie von Walter *et al.* in direkter Konsequenz bewirken, dass die HSZ ihren homöostatischen Ruhezustand verlassen und so auf physiologischen Stress, wie Infektionen oder Blutverlust, reagieren [216]. Die Arbeitsgruppe um Beerman *et al.* demonstrierte in ihren Untersuchungen, dass die allgemeine DNA-Reparatur und die Signalwege in ruhenden, aber nicht in mitotisch-aktiven HSZ geschwächt sind, wodurch es zur Anhäufung von DNA-Schäden während des Alterungsprozesses kommt [217]. Sobald diese Zellen dann die G₀-Phase verlassen und in den Zellzyklus eintreten, werden zahlreiche Signalwege zur Antwort auf DNA-Schäden aktiviert und die Reparatur der akkumulierten DNA-Schäden veranlasst. Gemeinsam mit der Erkenntnis, dass aktivierte HSZ potentiell in den Ruhezustand zurückkehren können [218], könnte diese Hypothese eine mögliche Erklärung dafür sein, wie DNA-Reparatur-Mechanismen zum Erhalt des Stammzellpools beitragen.

In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung mit MMS in allen untersuchten Zelltypen zu einer signifikanten Erhöhung an DNA-Schäden, die mit dem Comet Assay quantifiziert wurden und 8- bis 14-fach höher ausfielen als bei den Negativkontrollen. Beim Vergleich der HL-60-Zellen, TK6-Zellen und differenzierten HL-60-Zellen mit den HSZ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelltypen festgestellt werden. Diese Befunde könnten für beide der oben genannten Hypothesen sprechen. Für den ersten Fall spricht, dass die Zellen nicht in einer Mikroumgebung kultiviert wurden, wie sie in der Stammzellnische vorzufinden ist. Dadurch ging der Schutz durch die Nische verloren und die HSZ zeigten eine ähnliche Anfälligkeit gegenüber DNA-Schäden wie andere Zelltypen. Andererseits könnte die Empfindlichkeit der HSZ gegenüber DNA-schädigenden Agentien auch für eine abgeschwächte DNA-Reparatur entsprechend der zweiten Hypothese sprechen. Dies würde in der Alterung der Zellen bedingt durch Akkumulation von DNA-Schäden resultieren. Um jedoch eine allgemeingültige Aussage hierzu treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Um die Reparaturkapazität der verschiedenen Zelltypen zu vergleichen, wurden diese zunächst mit UV-Strahlung und direkt im Anschluss mit dem Reparaturinhibitor APH behandelt. Sowohl in den beiden Zelllinien als auch in den differenzierten HL-60-Zellen konnten nach der Behandlung weniger DNA-Schäden detektiert werden als in den HSZ. Dieses

Ergebnis deutet darauf hin, dass die Reparaturkapazität in HSZ speziell für diese Behandlungsart schwächer ausfällt als in den anderen untersuchten Zellen. Die durch UV-Strahlung induzierten DNA-Schäden aktivieren den Mechanismen der NER; dabei werden kurze DNA-Stränge neu synthetisiert. Eine Behandlung mit APH bewirkt dabei, dass insbesondere die DNA-Polymerase α während der Replikation gehemmt wird.

Beerman *et al.* untersuchten die Fragestellung, ob die DDR (DNA damage response) und Reparatur in ruhenden HSZ und in Vorläuferzellen unterschiedlich reguliert wird [217]. Hierfür analysierten sie die Expression von 190 Genen, die in der DDR und Reparatur involviert sind. Die große Mehrheit der untersuchten Gene war in den Vorläuferzellen signifikant hochreguliert und auch die Expression vieler Regulatoren mit Schlüsselfunktion in den entsprechenden Signalwegen war in den Vorläuferzellen stark erhöht. Der einzige Signalweg, der sich unverändert in HSZ und Vorläuferzellen zeigte, war NHEJ (non-homologous end joining). Dies war jedoch konsistent zu der Tatsache, dass NHEJ in HSZ transkriptionell aktiv ist [213]. Weiterhin wurde vermutet, dass die Expression von bestimmten DNA-Reparatur-Genen in HSZ während des Alterungsprozesses herunterreguliert ist und dass dies dazu beitragen könnte, dass HSZ DNA-Schäden anhäufen [215, 219]. Auch hierfür verglich Beerman *et al.* die Expression der unterschiedlichen Signalwege in jungen und alten HSZ und fand heraus, dass ausschließlich der NER-Signalweg in gealterten HSZ herunterreguliert ist [217]. Dies könnte den Autoren zufolge zu DNA-Addukten führen, die wiederum die Funktion der Stammzellen während des Alterungsprozesses beeinflussen könnte. Eine Alterungs-abhängige Abnahme der HSZ-Aktivität konnte bereits in einem Mausmodell mit NER-Defizienz nachgewiesen werden [220].

Auf der Basis dieser veröffentlichten Studien könnte der Grund für die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit einer Herunterregulierung des NER-Signalwegs argumentiert werden.

6.2.4 Histonacetylierung

Epigenetische Unterschiede zwischen den betrachteten Zelltypen wurden über die Acetylierung am Histon H3 (Lysin 9) nach 24-stündiger Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor TSA überprüft. Auch für diesen Endpunkt zeigten sich die HSZ empfindlicher im Vergleich zu den anderen Zellen, mit Werten die mindestens doppelt so hoch waren als für die HL-60- und

TK6-Zellen oder die differenzierten HL-60-Zellen. Zwischen den Zelllinien lag dagegen nur ein geringfügiger Unterschied vor.

Die hier erhaltenen Ergebnisse sind gegensätzlich zu den Befunden von Navakauskiene *et al.* [221]. In ihren Untersuchungen zu epigenetischen Veränderungen in humanen hämatopoetischen Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus, darunter CD34-positive Zellen, Zellen der myeloiden Leukämie-Zelllinie KG1 sowie primäre Neutrophile, gewonnen aus peripherem Blut, beobachtete die Arbeitsgruppe ähnliche Modifikationen an den Histonen H3 und H4 in den CD34-positiven Zellen und in den Neutrophilen. Die KG1-Zellen wiesen dagegen deutlich mehr dieser Modifikationen auf, die nach Induktion einer granulozytären Differenzierung durch den HDAC-Inhibitor Phenylbutyrat auch noch weiter anstiegen.

Die Tatsache, dass HSZ ein sehr umfangreiches Spektrum an Entscheidungen zum Schicksal von Zellen durchlaufen können, die von der Selbsterneuerung bis hin zur Differenzierung über unzählige spezialisierte Signalwege reichen, bringt die Frage auf, wie solch ein spezifisches Genexpressionsmuster auf der einen Hand mit dem Erhalt der Selbsterneuerung und der Multipotenz dieser Zellen konsistent sein kann. Andererseits jedoch Veränderungen in der Genexpression bewirkt, die zum Verlust genau dieser Eigenschaften führen. Untersuchungen haben gezeigt, dass epigenetische Modifikationen die Änderung der Expression von einer großen Anzahl an Genen durch Veränderung der Chromatinstruktur bewirken können, wodurch die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren zur DNA beeinflusst und das Transkriptionsprofil der Zellen verändert wird [222, 223]. Zu diesen Modifikationen zählt unter anderem auch die post-translationale Modifikation von Histonen, die die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, SUMOylierung und die Ubiquitinylierung umfasst [224]. Im Allgemeinen ist eine Hyperacetylierung von Histonen mit einer offenen Chromatin-Struktur und eine Histondeacetylierung mit einer kondensierten Chromatin-Struktur sowie der Bildung von Heterochromatin assoziiert.

Zahlreiche Indizien sprechen dafür, dass epigenetische Mechanismen auch in HSZ und während der hämatopoetischen Differenzierung eine Schlüsselrolle spielen [224, 225]. So weisen hämatopoetische Vorläuferzellen eine niedrige Expression von Linien-spezifischen Genen auf [226, 227]. Außerdem korreliert die hämatopoetische Differenzierung mit einer stufenweisen Abnahme der transkriptionellen Zugänglichkeit für Multipotenz-assoziierte

Gene [226, 228]. Auch Veränderungen in der Expression Linien-spezifischer Gene von hämatopoetischen Vorläuferzellen korrelierten mit Veränderungen der Chromatinstruktur in Promotorregionen während der Differenzierung [229, 230].

Neuere Untersuchungen zur Rolle der Epigenetik in HSZ zeigen, dass die DNA-Methylierung bei der Regulation der Linien-spezifischen Differenzierung, aber auch bei alterungsbedingten Änderungen in HSZ involviert ist [231, 232]. So analysierte Chung *et al.* die DNA-Methylierung im gesamten Genom von undifferenzierten humanen hämatopoetischen Zellen (CD34-positiv) im Vergleich zu differenzierten Zellen (CD34-negativ). Die Untersuchungen zeigten, dass undifferenzierte Zellen durch Hypomethylierung am Transkriptionsstart der Promotorregion und durch Hypermethylierung an den angrenzenden Regionen charakterisiert waren [231]. Interessanterweise wiesen die hypomethylierten Regionen eine Anreicherung an Genen auf, die Proteine für den Chromatin-Umbau codieren. Dies deutet darauf hin, dass Gene, die an der dynamischen Veränderung der Chromatinstruktur beteiligt sind, in undifferenzierten Zellen eine wichtige Rolle spielen. Dieselbe Arbeitsgruppe fand außerdem heraus, dass undifferenzierte humane und murine hämatopoetische Zellen weniger kondensierte Chromatin-Strukturen und eine höhere Rate an Histonacetylierung aufweisen [231]. Gemeinsam mit den Erkenntnissen zur DNA-Methylierung, ist der Status in undifferenzierten im Gegensatz zu differenzierten Zellen durch eine höhere Umsatzrate von epigenetischen Modifikationen charakterisiert, die einen dynamischen Zustand des Chromatins begünstigen. Während der Hämatopoese regulieren Linien-spezifische Transkriptionsfaktoren die Genexpressionsmuster durch die Rekrutierung von HAT- oder HDAC-Komplexen, um die Expression des Zielgens zu fördern. Es wird beschrieben, dass die Expression von HDAC der Klassen 1, 2, und 3 in HSZ niedrig ist, während der Differenzierung jedoch ansteigt.

7 SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Exposition mit Mobilfunkstrahlung der Modulationen GSM, UMTS und LTE in humanen hämatopoetischen Zellen, insbesondere in hämatopoetischen Stammzellen, keine biologisch nachweisbaren, nicht-thermischen Effekte bewirkt. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand einer Vielzahl an biologischen Endpunkten, die eine Interpretation in Bezug auf Vitalität und Apoptose, Differenzierung, oxidativen Stress und Reparaturmechanismen, Genotoxizität sowie epigenetische Veränderungen ermöglichen. Nichtsdestotrotz wurden im Rahmen dieser Untersuchungen nur Teilaspekte, vorwiegend auf Proteinebene, für die genannten Endpunkte betrachtet. Dies betrifft insbesondere die Endpunkte Differenzierung und Epigenetik; hier müssten weitere Parameter bzw. Marker analysiert werden, um eine finale Aussage darüber treffen zu können, ob und in wie fern Mobilfunkstrahlung diese Endpunkte in hämatopoetischen Stammzellen beeinflusst. Die Differenzierung spielt bei den Stammzellen eine entscheidende Rolle, da sie sich potentiell zu allen Arten von Blutzellen entwickeln können. Auch epigenetische Mechanismen scheinen eine Schlüsselfunktion vor allem während der hämatopoetischen Differenzierung einzunehmen. Da allerdings bisher nur wenige Ergebnisse zu diesen Endpunkten in der Literatur vorliegen, kann nur schwer ein Vergleich zu anderen Studien gezogen werden.

Zum ersten Mal wurden humane hämatopoetische Stammzellen für Untersuchungen zum schädlichen Potential von Mobilfunkstrahlung herangezogen. Diese Zellen eignen sich besonders gut als Testsystem, da Auswirkungen auf hämatopoetische Stammzellen auch Veränderungen im gesamten blutbildenden System zur Folge haben können. So können beispielsweise genotoxische Wirkungen zur Kanzerogenese führen. Weiterhin wird durch die Verwendung von hämatopoetische Stammzellen nicht nur eine kleine Subpopulation betrachtet, sondern potentiell alle Zellen des blutbildenden Systems erfasst. Dies ermöglicht eine Forschung in unterschiedliche Richtungen und ein breites Analysespektrum. Da hämatopoetische Stammzellen weiterhin zu denjenigen Stammzellen zählen, die bis heute am intensivsten erforscht wurden, können erhaltene Erkenntnisse leichter interpretiert und neue Aspekte herausgearbeitet werden.

REFERENZEN

1. Bundesamt für Strahlenschutz, B. *Elektromagnetisches Spektrum*. [cited 2016, August 2nd]; Available from: http://www.bfs.de/SharedDocs/Bilder/BfS/DE/emf/hff/em-spektrum.jpg?__blob=poster&v=4.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC), *Monographs 102, Non-Ionizing Radiation, Part 2: Radiofrequency Electromagnetic Fields*. 2012.
3. Internationale Fernmeldeunion (ITU). *ITU Statistics*. 2015 [cited 2016, November 7th]; Available from: <http://www.itu.int/en/ITU-D/Statistics/Pages/stat/default.aspx>.
4. Lauff, H. and A. Wachenfeld, *Differenzierte Betrachtung der Nutzung und der Wahrnehmung des Mobilfunks - Vorhaben FM8854*. 2014, LINK Institut für Markt- und Sozialforschung GmbH: Frankfurt am Main.
5. Redmayne, M., et al., *Cordless telephone use: implications for mobile phone research*. *J Environ Monit*, 2010. **12**(4): p. 809-12.
6. Mezei, G., M. Benyi, and A. Muller, *Mobile phone ownership and use among school children in three Hungarian cities*. *Bioelectromagnetics*, 2007. **28**(4): p. 309-15.
7. Doulatov, S., et al., *Hematopoiesis: a human perspective*. *Cell Stem Cell*, 2012. **10**(2): p. 120-36.
8. Jollie, W.P., *Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents*. *Teratology*, 1990. **41**(4): p. 361-81.
9. Palis, J. and M.C. Yoder, *Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man*. *Exp Hematol*, 2001. **29**(8): p. 927-36.
10. Palis, J., et al., *Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse*. *Development*, 1999. **126**(22): p. 5073-84.
11. Lichanska, A.M. and D.A. Hume, *Origins and functions of phagocytes in the embryo*. *Exp Hematol*, 2000. **28**(6): p. 601-11.
12. Baron, M.H., *Concise Review: early embryonic erythropoiesis: not so primitive after all*. *Stem Cells*, 2013. **31**(5): p. 849-56.
13. Palis, J., et al., *Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(8): p. 4528-33.
14. Cumano, A., et al., *Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution*. *Immunity*, 2001. **15**(3): p. 477-85.
15. Huber, T.L., et al., *Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo*. *Nature*, 2004. **432**(7017): p. 625-30.
16. Auerbach, R., H. Huang, and L. Lu, *Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac*. *Stem Cells*, 1996. **14**(3): p. 269-80.
17. Chen, T., et al., *Development of hematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells*. *J Cell Biochem*, 2015. **116**(7): p. 1179-89.
18. Zovein, A.C., et al., *Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(6): p. 625-36.
19. Tavian, M., et al., *Embryonic origin of human hematopoiesis*. *Int J Dev Biol*, 2010. **54**(6-7): p. 1061-5.
20. Rafii, S., et al., *Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition*. *Blood*, 2013. **121**(5): p. 770-80.

21. Medvinsky, A. and E. Dzierzak, *Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region*. Cell, 1996. **86**(6): p. 897-906.
22. Taoudi, S., et al., *Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(1): p. 99-108.
23. Eilken, H.M., S. Nishikawa, and T. Schroeder, *Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 896-900.
24. Yoshimoto, M. and M.C. Yoder, *Developmental biology: Birth of the blood cell*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 801-3.
25. Hirschi, K.K., *Haemogenic endothelium during development and beyond*. Blood, 2012. **119**(21): p. 4823-7.
26. Swiers, G., et al., *Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2924.
27. Bertrand, J.Y., et al., *Hematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 108-111.
28. Boisset, J.C., et al., *In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 116-20.
29. Kissa, K. and P. Herbomel, *Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 112-115.
30. Rhodes, K.E., et al., *The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 252-63.
31. Gordon-Keylock, S., et al., *Mouse extraembryonic arterial vessels harbor precursors capable of maturing into definitive HSCs*. Blood, 2013. **122**(14): p. 2338-45.
32. Nakano, H., et al., *Haemogenic endocardium contributes to transient definitive haematopoiesis*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1564.
33. Clements, W.K. and D. Traver, *Signalling pathways that control vertebrate haematopoietic stem cell specification*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(5): p. 336-348.
34. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.
35. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**: p. 452-4.
36. Siminovitch, L., E.A. McCulloch, and J.E. Till, *THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES*. J Cell Physiol, 1963. **62**: p. 327-36.
37. Fuchs, E. and T. Chen, *A matter of life and death: self-renewal in stem cells*. EMBO Rep, 2013. **14**(1): p. 39-48.
38. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1068-74.
39. de Bruin, A.M., C. Voermans, and M.A. Nolte, *Impact of interferon-gamma on hematopoiesis*. Blood, 2014. **124**(16): p. 2479-86.
40. Manz, M.G. and S. Boettcher, *Emergency granulopoiesis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(5): p. 302-314.
41. Passegue, E., et al., *Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1599-611.

42. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
43. Greco, V. and S. Guo, *Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches?* Development, 2010. **137**(10): p. 1586-94.
44. Jones, D.L. and A.J. Wagers, *No place like home: anatomy and function of the stem cell niche*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 11-21.
45. Fuchs, E., T. Tumber, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. Cell, 2004. **116**(6): p. 769-78.
46. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. Cell, 2008. **132**(4): p. 598-611.
47. Mendelson, A. and P.S. Frenette, *Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration*. Nat Med, 2014. **20**(8): p. 833-46.
48. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 349-56.
49. Scadden, D.T., *The stem-cell niche as an entity of action*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1075-9.
50. Wilson, A., et al., *Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 64-75.
51. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
52. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
53. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
54. Yoshihara, H., et al., *Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(6): p. 685-97.
55. Weber, J.M. and L.M. Calvi, *Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche*. Bone, 2010. **46**(2): p. 281-5.
56. Nakamura-Ishizu, A. and T. Suda, *Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(2): p. 2404-9.
57. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
58. Ding, L., et al., *Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 457-62.
59. Adams, G.B., et al., *Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor*. Nature, 2006. **439**(7076): p. 599-603.
60. Parmar, K., et al., *Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5431-6.
61. Mayani, H., J.A. Alvarado-Moreno, and P. Flores-Guzman, *Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation*. Arch Med Res, 2003. **34**(6): p. 476-88.
62. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
63. Guenechea, G., et al., *Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential*. Nat Immunol, 2001. **2**(1): p. 75-82.

64. Zhang, Y. and Y. Gao, *Novel chemical attempts at ex vivo hematopoietic stem cell expansion*. Int J Hematol, 2016. **103**(5): p. 519-29.
65. Takizawa, H., U. Schanz, and M.G. Manz, *Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: mission accomplished?* Swiss Med Wkly, 2011. **141**: p. w13316.
66. Sauvageau, G., N.N. Iscove, and R.K. Humphries, *In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells*. Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7223-32.
67. Choi, Y.S., et al., *Optimization of ex vivo hematopoietic stem cell expansion in intermittent dynamic cultures*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(12): p. 1969-75.
68. Dahlberg, A., C. Delaney, and I.D. Bernstein, *Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6083-90.
69. Luis, T.C., et al., *Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(4): p. 345-56.
70. Aguila, J.R., et al., *SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells*. Blood, 2011. **118**(3): p. 576-85.
71. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo*. Cell, 2002. **109**(1): p. 39-45.
72. Krosl, J., et al., *In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1428-32.
73. Domashenko, A.D., et al., *TAT-mediated transduction of NF-Ya peptide induces the ex vivo proliferation and engraftment potential of human hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2010. **116**(15): p. 2676-83.
74. Himburg, H.A., et al., *Pleiotrophin regulates the retention and self-renewal of hematopoietic stem cells in the bone marrow vascular niche*. Cell Rep, 2012. **2**(4): p. 964-75.
75. Himburg, H.A., et al., *Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells*. Nat Med, 2010. **16**(4): p. 475-82.
76. Gottschling, S., et al., *Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism*. Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 798-806.
77. Jing, D., et al., *Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-modeling the niche compartments in vitro*. Haematologica, 2010. **95**(4): p. 542-50.
78. Waselenko, J.K., et al., *Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group*. Ann Intern Med, 2004. **140**(12): p. 1037-51.
79. Dainiak, N., *Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation*. Exp Hematol, 2002. **30**(6): p. 513-28.
80. Mauch, P., et al., *Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995. **31**(5): p. 1319-39.
81. Shao, L., Y. Luo, and D. Zhou, *Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(9): p. 1447-62.
82. The INTERPHONE Study Group, *Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study*, in Int J Epidemiol. 2010. p. 675-94.
83. Hardell, L., et al., *Case-control study on the use of mobile and cordless phones and the risk for malignant melanoma in the head and neck region*. Pathophysiology, 2011. **18**(4): p. 325-33.

84. Hardell, L., et al., *Case-control study of the association between malignant brain tumours diagnosed between 2007 and 2009 and mobile and cordless phone use*. Int J Oncol, 2013. **43**(6): p. 1833-45.
85. Carlberg, M., et al., *Meningioma patients diagnosed 2007-2009 and the association with use of mobile and cordless phones: a case-control study*. Environ Health, 2013. **12**(1): p. 60.
86. Coureau, G., et al., *Mobile phone use and brain tumours in the CERENAT case-control study*. Occup Environ Med, 2014. **71**(7): p. 514-22.
87. Benson, V.S., et al., *Mobile phone use and risk of brain neoplasms and other cancers: prospective study*. Int J Epidemiol, 2013. **42**(3): p. 792-802.
88. Schuz, J., et al., *Risks for central nervous system diseases among mobile phone subscribers: a Danish retrospective cohort study*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4389.
89. Frei, P., et al., *Use of mobile phones and risk of brain tumours: update of Danish cohort study*. Bmj, 2011. **343**: p. d6387.
90. de Vocht, F., I. Burstyn, and J.W. Cherrie, *Time trends (1998-2007) in brain cancer incidence rates in relation to mobile phone use in England*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(5): p. 334-9.
91. Deltour, I., et al., *Mobile phone use and incidence of glioma in the Nordic countries 1979-2008: consistency check*. Epidemiology, 2012. **23**(2): p. 301-7.
92. Little, M.P., et al., *Mobile phone use and glioma risk: comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States*. Bmj, 2012. **344**: p. e1147.
93. Shu, X., A. Ahlbom, and M. Feychting, *Incidence trends of malignant parotid gland tumors in Swedish and nordic adults 1970 to 2009*. Epidemiology, 2012. **23**(5): p. 766-7.
94. Poulsen, A.H., et al., *Mobile phone use and the risk of skin cancer: a nationwide cohort study in Denmark*. Am J Epidemiol, 2013. **178**(2): p. 190-7.
95. Aydin, D., et al., *Mobile phone use and brain tumors in children and adolescents: a multicenter case-control study*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(16): p. 1264-76.
96. Harbo Poulsen, A., et al., *Mobile phones and multiple sclerosis--a nationwide cohort study in Denmark*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34453.
97. Cheng, Y., et al., *Extremely low-frequency electromagnetic fields enhance the proliferation and differentiation of neural progenitor cells cultured from ischemic brains*. Neuroreport, 2015. **26**(15): p. 896-902.
98. Duan, W., et al., *Comparison of the genotoxic effects induced by 50 Hz extremely low-frequency electromagnetic fields and 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in GC-2 cells*. Radiat Res, 2015. **183**(3): p. 305-14.
99. Hintzsche, H. and H. Stopper, *Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users*. Toxicol Lett, 2010. **193**(1): p. 124-30.
100. Hintzsche, H., et al., *900 MHz radiation does not induce micronucleus formation in different cell types*. Mutagenesis, 2012. **27**(4): p. 477-83.
101. Hintzsche, H., et al., *Terahertz radiation at 0.380 THz and 2.520 THz does not lead to DNA damage in skin cells in vitro*. Radiat Res, 2013. **179**(1): p. 38-45.
102. Lerchl, A., et al., *Tumor promotion by exposure to radiofrequency electromagnetic fields below exposure limits for humans*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **459**(4): p. 585-90.

103. Foster, K.R., *Thermal and nonthermal mechanisms of interaction of radio-frequency energy with biological systems*. IEEE Transactions on Plasma Science, 2000. **28**(1): p. 15-23.
104. Foster, K.R. and R. Glaser, *Thermal mechanisms of interaction of radiofrequency energy with biological systems with relevance to exposure guidelines*. Health Phys, 2007. **92**(6): p. 609-20.
105. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP), *Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz)*. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Health Phys, 1998. **74**(4): p. 494-522.
106. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP), *ICNIRP statement on the "Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz)"*. Health Phys, 2009. **97**(3): p. 257-8.
107. Friedman, J., et al., *Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies*. Biochem J, 2007. **405**(3): p. 559-68.
108. Huang, T.Q., et al., *Characterization of biological effect of 1763 MHz radiofrequency exposure on auditory hair cells*. Int J Radiat Biol, 2008. **84**(11): p. 909-15.
109. Capri, M., et al., *In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential*. Radiat Res, 2004. **162**(2): p. 211-8.
110. Lee, J.J., et al., *Acute radio frequency irradiation does not affect cell cycle, cellular migration, and invasion*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(8): p. 615-25.
111. Hintzsche, H., et al., *Terahertz electromagnetic fields (0.106 THz) do not induce manifest genomic damage in vitro*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46397.
112. Hardell, L., M. Carlberg, and K. Hansson Mild, *Pooled analysis of case-control studies on malignant brain tumours and the use of mobile and cordless phones including living and deceased subjects*. Int J Oncol, 2011. **38**(5): p. 1465-74.
113. Moulder, J.E., et al., *Mobile phones, mobile phone base stations and cancer: a review*. Int J Radiat Biol, 2005. **81**(3): p. 189-203.
114. Benson, V.S., et al., *Mobile phone use and risk of brain neoplasms and other cancers: prospective study*. Int J Epidemiol, 2013.
115. Szmigielski, S., *Cancer risks related to low-level RF/MW exposures, including cell phones*. Electromagn Biol Med, 2013. **32**(3): p. 273-80.
116. Divan, H.A., et al., *Cell phone use and behavioural problems in young children*. J Epidemiol Community Health, 2012. **66**(6): p. 524-9.
117. Feychting, M., *Mobile phones, radiofrequency fields, and health effects in children - Epidemiological studies*. Prog Biophys Mol Biol, 2011.
118. Kheifets, L., et al., *The sensitivity of children to electromagnetic fields*. Pediatrics, 2005. **116**(2): p. e303-13.
119. Morgan, L.L., S. Kesari, and D.L. Davis, *Why children absorb more microwave radiation than adults: The consequences*. Journal of Microscopy and Ultrastructure, 2014. **2**(4): p. 197-204.
120. Christ, A., et al., *Age-dependent tissue-specific exposure of cell phone users*. Phys Med Biol, 2010. **55**(7): p. 1767-83.
121. Trosic, I., I. Busljeta, and I. Pavicic, *Blood-forming system in rats after whole-body microwave exposure; reference to the lymphocytes*. Toxicol Lett, 2004. **154**(1-2): p. 125-32.

122. Demisia, G., D. Vlastos, and D.P. Matthopoulos, *Effect of 910-MHz electromagnetic field on rat bone marrow*. ScientificWorldJournal, 2004. **4 Suppl 2**: p. 48-54.
123. Galvin, M.J., G.L. MacNichols, and D.I. McRee, *Effect of 2450 MHz microwave radiation on hematopoiesis of pregnant mice*. Radiat Res, 1984. **100**(2): p. 412-7.
124. Kumar, G., et al., *Evaluation of hematopoietic system effects after in vitro radiofrequency radiation exposure in rats*. Int J Radiat Biol, 2011. **87**(2): p. 231-40.
125. Ragan, H.A., et al., *Hematologic and immunologic effects of pulsed microwaves in mice*. Bioelectromagnetics, 1983. **4**(4): p. 383-96.
126. Rosado, M.M., et al., *Effects of GSM-modulated 900 MHz radiofrequency electromagnetic fields on the hematopoietic potential of mouse bone marrow cells*. Bioelectromagnetics, 2014. **35**(8): p. 559-67.
127. Belyaev, I.Y., et al., *915 MHz microwaves and 50 Hz magnetic field affect chromatin conformation and 53BP1 foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons*. Bioelectromagnetics, 2005. **26**(3): p. 173-84.
128. Markova, E., et al., *Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and gamma-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(9): p. 1172-7.
129. Vijayalaxmi, et al., *Incidence of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes exposed to modulated and unmodulated 2450 MHz radiofrequency fields*. Bioelectromagnetics, 2013. **34**(7): p. 542-8.
130. Waldmann, P., et al., *Influence of GSM signals on human peripheral lymphocytes: study of genotoxicity*. Radiat Res, 2013. **179**(2): p. 243-53.
131. Blank, U. and S. Karlsson, *TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells*. Blood, 2015. **125**(23): p. 3542-50.
132. Clarke, M.F. and M. Fuller, *Stem cells and cancer: two faces of eve*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1111-5.
133. Jamieson, C.H., et al., *Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML*. N Engl J Med, 2004. **351**(7): p. 657-67.
134. Cuccurazzu, B., et al., *Exposure to extremely low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields enhances adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice*. Exp Neurol, 2010. **226**(1): p. 173-82.
135. Piacentini, R., et al., *Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Ca(v)1-channel activity*. J Cell Physiol, 2008. **215**(1): p. 129-39.
136. Nikolova, T., et al., *Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells*. Faseb j, 2005. **19**(12): p. 1686-8.
137. Podda, M.V., et al., *Extremely low-frequency electromagnetic fields enhance the survival of newborn neurons in the mouse hippocampus*. Eur J Neurosci, 2014. **39**(6): p. 893-903.
138. Alexandrov, B.S., et al., *Non-thermal effects of terahertz radiation on gene expression in mouse stem cells*. Biomed Opt Express, 2011. **2**(9): p. 2679-89.
139. Seong, Y., J. Moon, and J. Kim, *Egr1 mediated the neuronal differentiation induced by extremely low-frequency electromagnetic fields*. Life Sci, 2014. **102**(1): p. 16-27.
140. Park, J.E., et al., *Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation*. Neurochem Int, 2013. **62**(4): p. 418-24.

141. Kim, H.J., et al., *Extremely low-frequency electromagnetic fields induce neural differentiation in bone marrow derived mesenchymal stem cells*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2013. **238**(8): p. 923-31.
142. Cho, H., et al., *Neural stimulation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by extremely low frequency electromagnetic fields*. *Biotechnol Prog*, 2012. **28**(5): p. 1329-35.
143. Ceccarelli, G., et al., *A comparative analysis of the in vitro effects of pulsed electromagnetic field treatment on osteogenic differentiation of two different mesenchymal cell lineages*. *Biores Open Access*, 2013. **2**(4): p. 283-94.
144. Chen, C.H., et al., *Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment in vitro*. *J Appl Physiol* (1985), 2013. **114**(5): p. 647-55.
145. Ongaro, A., et al., *Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells*. *Bioelectromagnetics*, 2014. **35**(6): p. 426-36.
146. Kang, K.S., et al., *Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions*. *Exp Mol Med*, 2013. **45**: p. e6.
147. Markovà, E., L.O.G. Malmgren, and I.Y. Belyaev, *Microwaves from Mobile Phones Inhibit 53BP1 Focus Formation in Human Stem Cells More Strongly Than in Differentiated Cells: Possible Mechanistic Link to Cancer Risk*. *Environmental Health Perspectives*, 2010. **118**(3): p. 394-399.
148. 3rd Generation Partnership Project (3GPP). *GSM signals (900 MHz)*. 2015 [cited 2015, October 2nd]; Available from: http://www.3gpp.org/ftp/Specs/latest/Rel-10/51_series/.
149. Schüller, M., et al., *Proposal for generic GSM test signal*, in *Proc. 22nd BEMS Annual Meeting*. 2000: Munich, Germany. p. 122-123.
150. 3rd Generation Partnership Project (3GPP). *UMTS signals (1,950 MHz)*. 2015 [cited 2015, October 2nd]; Available from: http://www.3gpp.org/ftp/Specs/latest/Rel-10/34_series/.
151. European Telecommunications Standards Institute (ETSI). *Technical Specification for UMTS, LTE (TS 129 277 V10.0.0)*. 2011 [cited 2015, October 2nd]; Available from: http://www.etsi.org/deliver/etsi_ts/129200_129299/129277/10.00.00_60/ts_129277v100000p.pdf.
152. 3rd Generation Partnership Project (3GPP). *LTE signals (2,535 MHz)*. 2015 [cited 2015, October 2nd]; Available from: http://www.3gpp.org/ftp/Specs/latest/Rel-10/36_series/.
153. Glaser, K., et al., *Effect of Radiofrequency Radiation on Human Hematopoietic Stem Cells*. *Radiat Res*, 2016. **186**(5): p. 455-465.
154. Paffi, A., et al., *In vitro exposure: Linear and non-linear thermodynamic events in Petri dishes*. *Bioelectromagnetics*, 2015. **36**(7): p. 527-37.
155. CST. *Microwave Studio 2010*. [cited 2015, October 1st]; Available from: <https://www.cst.com/>.
156. Schönborn, F., et al., *Basis for optimization of in vitro exposure apparatus for health hazard evaluations of mobile communications*. *Bioelectromagnetics*, 2001. **22**(8): p. 547-59.

157. Ramirez, T., et al., *Sodium arsenite modulates histone acetylation, histone deacetylase activity and HMGN protein dynamics in human cells*. Chromosoma, 2008. **117**(2): p. 147-57.
158. Pons, D., et al., *Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease*. Eur Heart J, 2009. **30**(3): p. 266-77.
159. Birnie, G.D., *The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation*. Br J Cancer Suppl, 1988. **9**: p. 41-5.
160. Trayner, I.D., et al., *Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, alpha1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate*. Leuk Res, 1998. **22**(6): p. 537-47.
161. Jin, Z., et al., *The effect of combined exposure of 900 MHz radiofrequency fields and doxorubicin in HL-60 cells*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46102.
162. Report, F., *Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards From Low Frequency Electromagnetic Field Exposure Using Sensitive in vitro Methods (REFLEX)*. 2004.
163. Speit, G., R. Gminski, and R. Tauber, *Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in HL-60 cells are not reproducible*. Mutat Res, 2013. **755**(2): p. 163-6.
164. Tao, Q. and A. Henderson, *EMF induces differentiation in HL-60 cells*. J Cell Biochem, 1999. **73**(2): p. 212-7.
165. Lantow, M., et al., *Comparative study of cell cycle kinetics and induction of apoptosis or necrosis after exposure of human Mono Mac 6 cells to radiofrequency radiation*. Radiat Res, 2006. **166**(3): p. 539-43.
166. Atasoy, A., et al., *The effects of electromagnetic fields on peripheral blood mononuclear cells in vitro*. Bratisl Lek Listy, 2009. **110**(9): p. 526-9.
167. Joubert, V., et al., *No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields*. Bioelectromagnetics, 2007. **28**(2): p. 115-21.
168. Hoyto, A., et al., *Proliferation, oxidative stress and cell death in cells exposed to 872 MHz radiofrequency radiation and oxidants*. Radiat Res, 2008. **170**(2): p. 235-43.
169. Hou, Q., et al., *Oxidative changes and apoptosis induced by 1800-MHz electromagnetic radiation in NIH/3T3 cells*. Electromagn Biol Med, 2015. **34**(1): p. 85-92.
170. Lantow, M., et al., *ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes*. Radiat Environ Biophys, 2006. **45**(1): p. 55-62.
171. Zeni, O., et al., *Formation of reactive oxygen species in L929 cells after exposure to 900 MHz RF radiation with and without co-exposure to 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone*. Radiat Res, 2007. **167**(3): p. 306-11.
172. Topal, Z., et al., *The effects of prenatal long-duration exposure to 900-MHz electromagnetic field on the 21-day-old newborn male rat liver*. Turk J Med Sci, 2015. **45**(2): p. 291-7.
173. Bodera, P., et al., *Influence of electromagnetic field (1800 MHz) on lipid peroxidation in brain, blood, liver and kidney in rats*. Int J Occup Med Environ Health, 2015. **28**(4): p. 751-9.
174. Aydogan, F., et al., *The effect of 2100 MHz radiofrequency radiation of a 3G mobile phone on the parotid gland of rats*. Am J Otolaryngol, 2015. **36**(1): p. 39-46.
175. Lee, K.Y., et al., *Effects of combined radiofrequency radiation exposure on the cell cycle and its regulatory proteins*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(3): p. 169-78.

176. Liu, Y.X., et al., *Exposure to 3G mobile phone signals does not affect the biological features of brain tumor cells*. BMC Public Health, 2015. **15**: p. 764.
177. Sannino, A., et al., *Adaptive response in human blood lymphocytes exposed to non-ionizing radiofrequency fields: resistance to ionizing radiation-induced damage*. J Radiat Res, 2014. **55**(2): p. 210-7.
178. Zeni, O., et al., *Induction of an adaptive response in human blood lymphocytes exposed to radiofrequency fields: influence of the universal mobile telecommunication system (UMTS) signal and the specific absorption rate*. Mutat Res, 2012. **747**(1): p. 29-35.
179. Zong, C., et al., *Adaptive response in mice exposed to 900 MHz radiofrequency fields: bleomycin-induced DNA and oxidative damage/repair*. Int J Radiat Biol, 2015. **91**(3): p. 270-6.
180. Xu, S., et al., *Cell type-dependent induction of DNA damage by 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields does not result in significant cellular dysfunctions*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54906.
181. Bourthoumieu, S., et al., *Study of p53 expression and post-transcriptional modifications after GSM-900 radiofrequency exposure of human amniotic cells*. Bioelectromagnetics, 2013. **34**(1): p. 52-60.
182. Belyaev, I.Y., et al., *Microwaves from UMTS/GSM mobile phones induce long-lasting inhibition of 53BP1/gamma-H2AX DNA repair foci in human lymphocytes*. Bioelectromagnetics, 2009. **30**(2): p. 129-41.
183. Mikrou, A., et al., *CR3 complement receptor: cloning and characterization in rainbow trout*. Fish Shellfish Immunol, 2009. **26**(1): p. 19-28.
184. Kawai, K., et al., *CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(1): p. 192-7.
185. Leone, L., et al., *Epigenetic modulation of adult hippocampal neurogenesis by extremely low-frequency electromagnetic fields*. Mol Neurobiol, 2014. **49**(3): p. 1472-86.
186. Chen, C., et al., *Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 5103.
187. Bai, W.F., et al., *Fifty-Hertz electromagnetic fields facilitate the induction of rat bone mesenchymal stromal cells to differentiate into functional neurons*. Cytotherapy, 2013. **15**(8): p. 961-70.
188. Zhong, C., et al., *Effects of low-intensity electromagnetic fields on the proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow stromal cells*. Phys Ther, 2012. **92**(9): p. 1208-19.
189. Kumar, G., et al., *A genotoxic analysis of the hematopoietic system after mobile phone type radiation exposure in rats*. Int J Radiat Biol, 2015. **91**(8): p. 664-72.
190. Jiang, B., et al., *Adaptive response in mice exposed to 900 MHz radiofrequency fields: primary DNA damage*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32040.
191. Breitman, T.R., S.E. Selonick, and S.J. Collins, *Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2936-40.
192. Schwartz, J.L., et al., *Baseline levels of chromosome instability in the human lymphoblastoid cell TK6*. Mutagenesis, 2004. **19**(6): p. 477-82.
193. Nogueira-Pedro, A., et al., *Hydrogen peroxide (H2O2) induces leukemic but not normal hematopoietic cell death in a dose-dependent manner*. Cancer Cell Int, 2013. **13**(1): p. 123.

194. Bjelakovic, G., et al., *Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis*. *Jama*, 2007. **297**(8): p. 842-57.
195. Piccoli, C., et al., *Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **353**(4): p. 965-72.
196. Jang, Y.Y. and S.J. Sharkis, *A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche*. *Blood*, 2007. **110**(8): p. 3056-63.
197. Sardina, J.L., et al., *Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis?* *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012. **81**(3): p. 257-74.
198. Pervaiz, S., R. Taneja, and S. Ghaffari, *Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(11): p. 2777-89.
199. Zheng, Y., et al., *Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis through activation of Bax in hematopoietic cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(20): p. 3339-47.
200. Hayashi, T., et al., *Radiation-induced apoptosis of stem/progenitor cells in human umbilical cord blood is associated with alterations in reactive oxygen and intracellular pH*. *Mutat Res*, 2004. **556**(1-2): p. 83-91.
201. Yahata, T., et al., *Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells*. *Blood*, 2011. **118**(11): p. 2941-50.
202. Piccoli, C., et al., *Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(28): p. 26467-76.
203. Chen, C.T., S.H. Hsu, and Y.H. Wei, *Mitochondrial bioenergetic function and metabolic plasticity in stem cell differentiation and cellular reprogramming*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(5): p. 571-6.
204. Mantel, C., S. Messina-Graham, and H.E. Broxmeyer, *Upregulation of nascent mitochondrial biogenesis in mouse hematopoietic stem cells parallels upregulation of CD34 and loss of pluripotency: a potential strategy for reducing oxidative risk in stem cells*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(10): p. 2008-17.
205. Laurenti, E., et al., *CDK6 levels regulate quiescence exit in human hematopoietic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2015. **16**(3): p. 302-13.
206. Tesio, M. and A. Trumpp, *Breaking the cell cycle of HSCs by p57 and friends*. *Cell Stem Cell*, 2011. **9**(3): p. 187-92.
207. Hao, S., C. Chen, and T. Cheng, *Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells*. *Int J Hematol*, 2016. **103**(5): p. 487-97.
208. Pietras, E.M., M.R. Warr, and E. Passegue, *Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells*. *J Cell Biol*, 2011. **195**(5): p. 709-20.
209. Down, J.D., et al., *Variations in radiation sensitivity and repair among different hematopoietic stem cell subsets following fractionated irradiation*. *Blood*, 1995. **86**(1): p. 122-7.
210. Meijne, E.I., et al., *The effects of x-irradiation on hematopoietic stem cell compartments in the mouse*. *Exp Hematol*, 1991. **19**(7): p. 617-23.
211. Tothova, Z., et al., *FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress*. *Cell*, 2007. **128**(2): p. 325-39.

212. Milyavsky, M., et al., *A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(2): p. 186-97.
213. Mohrin, M., et al., *Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(2): p. 174-85.
214. Rossi, D.J., et al., *Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(19): p. 2371-6.
215. Rube, C.E., et al., *Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17487.
216. Walter, D., et al., *Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells*. *Nature*, 2015. **520**(7548): p. 549-52.
217. Beerman, I., et al., *Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle*. *Cell Stem Cell*, 2014. **15**(1): p. 37-50.
218. Wilson, A., et al., *Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair*. *Cell*, 2008. **135**(6): p. 1118-29.
219. Chambers, S.M., et al., *Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(8): p. e201.
220. Rossi, D.J., et al., *Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age*. *Nature*, 2007. **447**(7145): p. 725-9.
221. Navakauskiene, R., et al., *Epigenetic changes during hematopoietic cell granulocytic differentiation--comparative analysis of primary CD34+ cells, KG1 myeloid cells and mature neutrophils*. *BMC Cell Biol*, 2014. **15**: p. 4.
222. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.
223. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. *Nat Genet*, 2003. **33** **Suppl**: p. 245-54.
224. Rice, K.L., I. Hormaeche, and J.D. Licht, *Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis*. *Oncogene*, 2007. **26**(47): p. 6697-714.
225. Cerny, J. and P.J. Quesenberry, *Chromatin remodeling and stem cell theory of relativity*. *J Cell Physiol*, 2004. **201**(1): p. 1-16.
226. Hu, M., et al., *Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system*. *Genes Dev*, 1997. **11**(6): p. 774-85.
227. Miyamoto, T., et al., *Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment*. *Dev Cell*, 2002. **3**(1): p. 137-47.
228. Akashi, K., et al., *Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis*. *Blood*, 2003. **101**(2): p. 383-9.
229. Tagoh, H., et al., *Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells*. *Genes Dev*, 2002. **16**(13): p. 1721-37.
230. Bruno, L., et al., *Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(2): p. 741-56.
231. Chung, Y.S., et al., *Undifferentiated hematopoietic cells are characterized by a genome-wide undermethylation dip around the transcription start site and a hierarchical epigenetic plasticity*. *Blood*, 2009. **114**(24): p. 4968-78.

232. Beerman, I., et al., *Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(4): p. 413-25.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Elektromagnetisches Spektrum, unterteilt in verschiedene Teilbereiche der vorkommenden elektromagnetischen Wellen.....	2
Abbildung 2: Anstieg global existierender Mobiltelefone in den Jahren 2001 bis 2016.	4
Abbildung 3: Geschätzte Anzahl der Mobiltelefone pro 100 Einwohner im Jahr 2016.....	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der humanen embryonalen Hämatopoese.....	7
Abbildung 5: Mechanismen der Differenzierung und Selbsterneuerung.	8
Abbildung 6: Hierarchie des blutbildenden Systems.	10
Abbildung 7: 3D-Modell der mit vier Probencontainern beladenen μ TEM-Zelle.....	32
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Feldexpositionen.....	33
Abbildung 9: CST-Simulation mit vier Probenbehältern.	35
Abbildung 10: Histogramme der SAR-Werte im Zellkulturmedium für ein Volumen mit 1 mm Füllstand in Probencontainer 1.	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung zur Funktionsweise der Apoptose-Detektion mit der Annexin-V-Methode.	38
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Mechanismus der DCF-Methode zur Detektion von oxidativem Stress.....	40
Abbildung 13: Quantifizierung der Zellverteilung in den Zellzyklus-Phasen G1, S und G2/M.	41
Abbildung 14: Arbeitsschritte der Comet-Assay-Methode zur Quantifizierung des DNA-Schadens.....	42
Abbildung 15: Arbeitsschritte der Methode zur Quantifizierung der Reparaturkapazität.....	44
Abbildung 16: Schematische Darstellung zur Funktionsweise der CD11b-Detektion als Marker für den Differenzierungsstatus der Zellen.....	45
Abbildung 17: Mechanismus der Histonacetylierung als epigenetische Veränderung von Histonproteinen.....	47
Abbildung 18: Quantifizierung früh auftretender Apoptosen in HL-60-Zellen nach einer Behandlung mit 100 μ M NaAsO ₂ für 4, 6 und 16 h.....	50
Abbildung 19: Quantifizierung früh auftretender Apoptosen in HL-60-Zellen nach einer Behandlungszeit von 6 h mit unterschiedlichen NaAsO ₂ -Konzentrationen.....	51

Abbildung 20: Quantifizierung des gebildeten DCFs als Maß für den Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies nach 30-minütiger Behandlung von HL-60-Zellen mit H₂O₂ in Konzentrationen zwischen 10 und 40 mM..... 52

Abbildung 21: Quantifizierung des gebildeten DCF als Maß für reaktive Sauerstoffspezies nach 30-minütiger Behandlung von HL-60-Zellen mit NQO in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml. 52

Abbildung 22: Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Messung und prozentuale Darstellung der drei unterschiedlichen Zellzyklusphasen von unbehandelten (a), mit 0,1 µM NOC (b) und 1 mM HU (c) behandelten HL-60-Zellen..... 53

Abbildung 23: Quantifizierung des prozentualen Anteils der sich in den drei Zellzyklusphasen G1, S und G2/M befindenden HL-60-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen NOC-Konzentrationen. 54

Abbildung 24: Quantifizierung des prozentualen Anteils der sich in den drei Zellzyklusphasen G1, S und G2/M befindenden HL-60-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen HU-Konzentrationen..... 55

Abbildung 25: Quantifizierung des DNA-Schadens nach 4-stündiger Behandlung von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen MMS-Konzentrationen. 56

Abbildung 26: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von in Agarose-eingebetteten Zellkernen von HL-60-Zellen und HSZ mit intakter DNA und mit beschädigter DNA nach Behandlung mit 150 µM MMS. 57

Abbildung 27: Quantifizierung des DNA-Schadens in HL-60-Zellen nach Behandlung mit UV-Strahlung unterschiedlicher Intensitäten, mit und ohne Zugabe des Reparaturinhibitors APH. 58

Abbildung 28: Quantifizierung des Differenzierungsstatus von HL-60-Zellen über das Oberflächenantigen CD11b nach 3- und 6-tägiger Inkubation mit DMSO (1,25 %), RA (1 µM) und Natrium-Butyrat (0,1 mM). 59

Abbildung 29: Quantifizierung der CD11b-Expression in HL-60-Zellen nach 1-, 3-, 5- und 7-tägiger Inkubation mit DMSO (1,25 %). 60

Abbildung 30: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von undifferenzierten und nach 7-tägiger Behandlung mit DMSO ausdifferenzierten HL-60-Zellen..... 61

Abbildung 31: Quantifizierung der CD11b-Expression in HL-60-Zellen nach 24 h Inkubation mit PMA in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 50, 100 nM). 62

Abbildung 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und mit PMA behandelten HL-60-Zellen.....	62
Abbildung 33: Quantifizierung der Histonacetylierung in HL-60-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen TSA-Konzentrationen für einen Tag (1 d) und für drei Tage (3 d).....	63
Abbildung 34: Prozentualer Anteil an früh-apoptotischen HL-60-Zellen nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.	68
Abbildung 35: Prozentualer Anteil an früh-apoptotischen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	69
Abbildung 36: DCF-Fluoreszenzintensität nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards zur Bestimmung des oxidativen Stresses.....	71
Abbildung 37: DCF-Fluoreszenzintensität nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards zur Bestimmung des oxidativen Stresses.	72
Abbildung 38: Prozentualer Anteil an Zellen in der Zellzyklusphase G1 nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	74
Abbildung 39: Prozentualer Anteil an Zellen in der Zellzyklusphase G1 nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	75
Abbildung 40: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	76
Abbildung 41: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	77
Abbildung 42: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	79
Abbildung 43: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	80
Abbildung 44: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	81
Abbildung 45: DNA-Schäden nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	83

Abbildung 46: Expression des CD11b-Oberflächenproteins nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	84
Abbildung 47: Expression des CD11b-Oberflächenproteins nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	86
Abbildung 48: Histonacetylierung nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	87
Abbildung 49: Histonacetylierung nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards.....	88
Abbildung 50: Quantifizierung des CD11b-Oberflächenantigens in undifferenzierten und differenzierten HL-60-Zellen.....	90
Abbildung 51: Quantifizierung der DCF-Fluoreszenz als Maß für reaktive Sauerstoffspezies in HSZ, HL-60, TK6 und dHL60 (DMSO/Na-But).....	91
Abbildung 52: Repräsentative Histogramme für die Quantifizierung der Zellzyklusverteilung in HSZ, HL-60, TK6 und differenzierten HL-60 (DMSO, Na-But) ohne Behandlung und nach 6-stündiger Inkubation mit NOC.....	92
Abbildung 53: Anteil der Zellen (HSZ, HL-60, TK6 und differenzierte HL-60 mit DMSO und Na-But) in den Zellzyklusphasen G1 und G2/M nach Behandlung mit NOC.	93
Abbildung 54: DNA-Schäden in HSZ, HL-60, TK6 und differenzierten HL-60 (DMSO, Na-But) nach Behandlung mit MMS.	94
Abbildung 55: DNA-Schäden in HSZ, HL-60, TK6 und differenzierten HL-60 (DMSO, Na-But) nach Induktion der DNA-Schäden durch UV-Strahlung und anschließender Behandlung mit APH.	95
Abbildung 56: Quantifizierung der Acetylierung von Histon H3 nach Behandlung von HSZ, HL-60, TK6 und differenzierten HL-60 (DMSO und Na-But) mit TSA.....	96

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien unter Angabe des entsprechenden Zelltyps.	24
Tabelle 2: Verwendete Medien für den Vorgang des Auftauens von hämatopoetischen Stammzellen, basierend auf dem HPGM-Medium.	29
Tabelle 3: Merkmale der Kategorien I-III zur Quantifizierung gesunder, apoptotischer und nekrotischer Zellen anhand der Fluoreszenzen für Annexin-V und PI.	38
Tabelle 4: Positivkontrollen für die untersuchten Endpunkte unter Angabe der eingesetzten Konzentration, Behandlungszeit und Untersuchungsmethode.	64
Tabelle 5: Vitalität nach 4- und 66-h-Exposition der HL-60-Zellen mit den Mobilfunkstandards GSM, UMTS, LTE und den Intensitäten 0–4 W/kg.	66
Tabelle 6: Vitalität nach 4- und 20-h-Exposition der HSZ mit den Mobilfunkstandards GSM, UMTS, LTE und den Intensitäten 0–4 W/kg.	67

ANHANG

Mobilfunkexpositionen

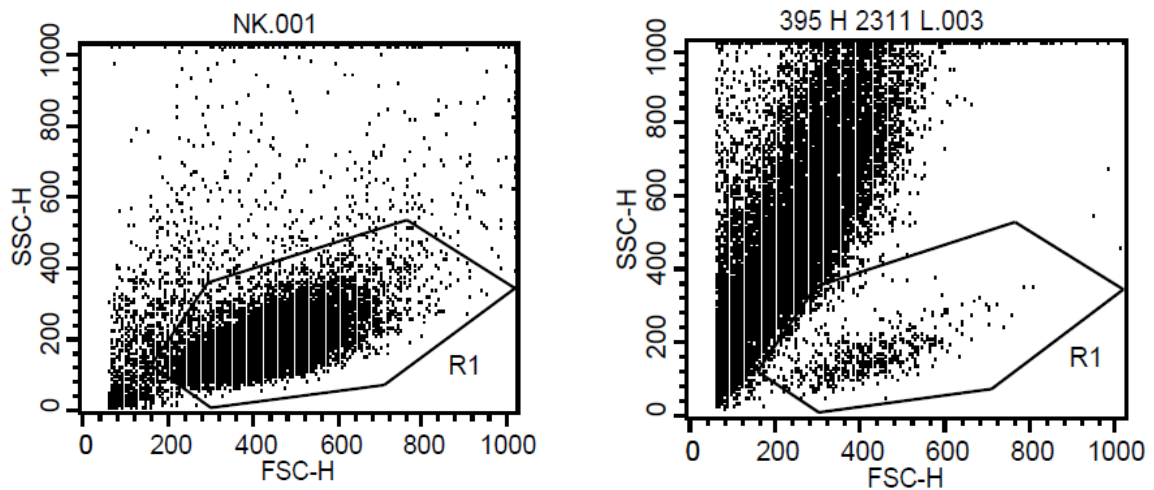
Differenzierung – CD11b

Abbildung A1: Dot Blot nach durchflusszytometrischer Messung zur Quantifizierung der Expression des Oberflächenantigens CD11b von unbehandelten HL-60-Zellen (links) und von mit GSM-befeldeten HL-60-Zellen bei 4 W/kg SAR (für 66 h) und 4-tägiger Nachinkubation (rechts).

Differenzierung – Adhärenz

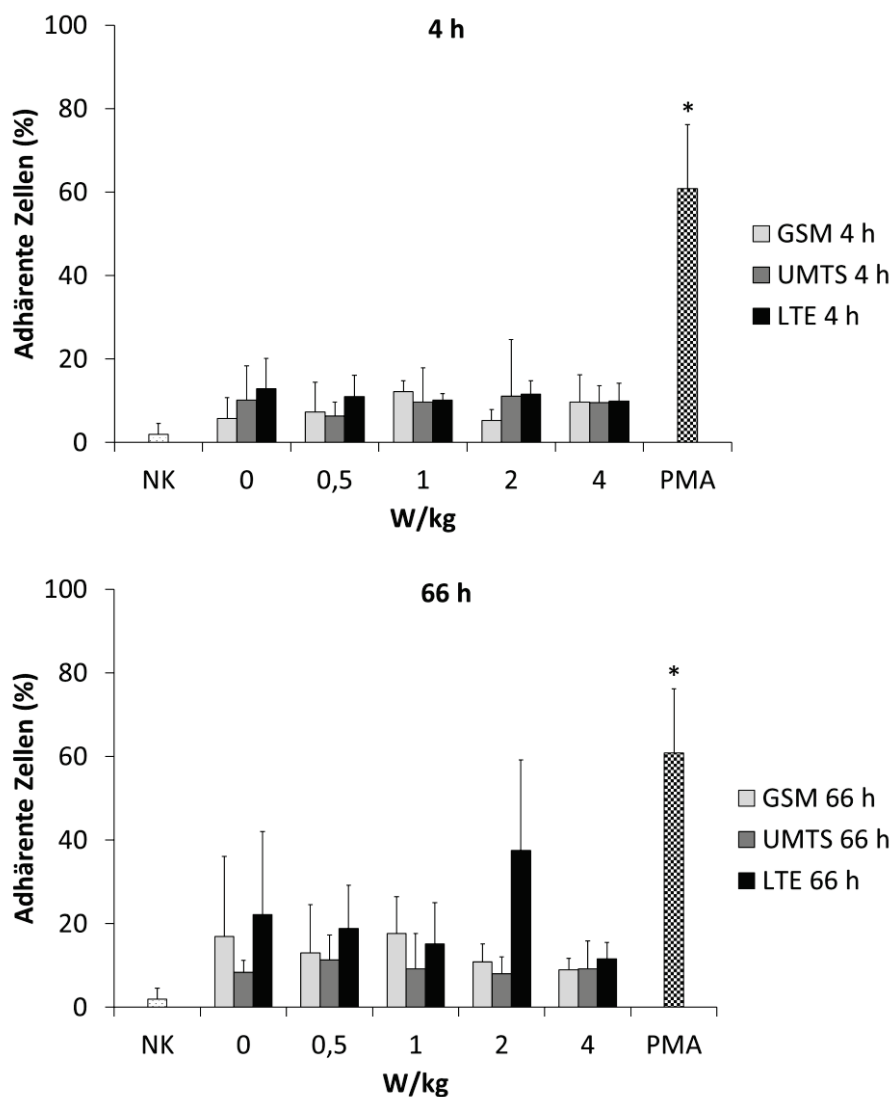


Abbildung A2: Adhärenz HL-60-Zellen nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit PMA) Säule (n=33) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK).

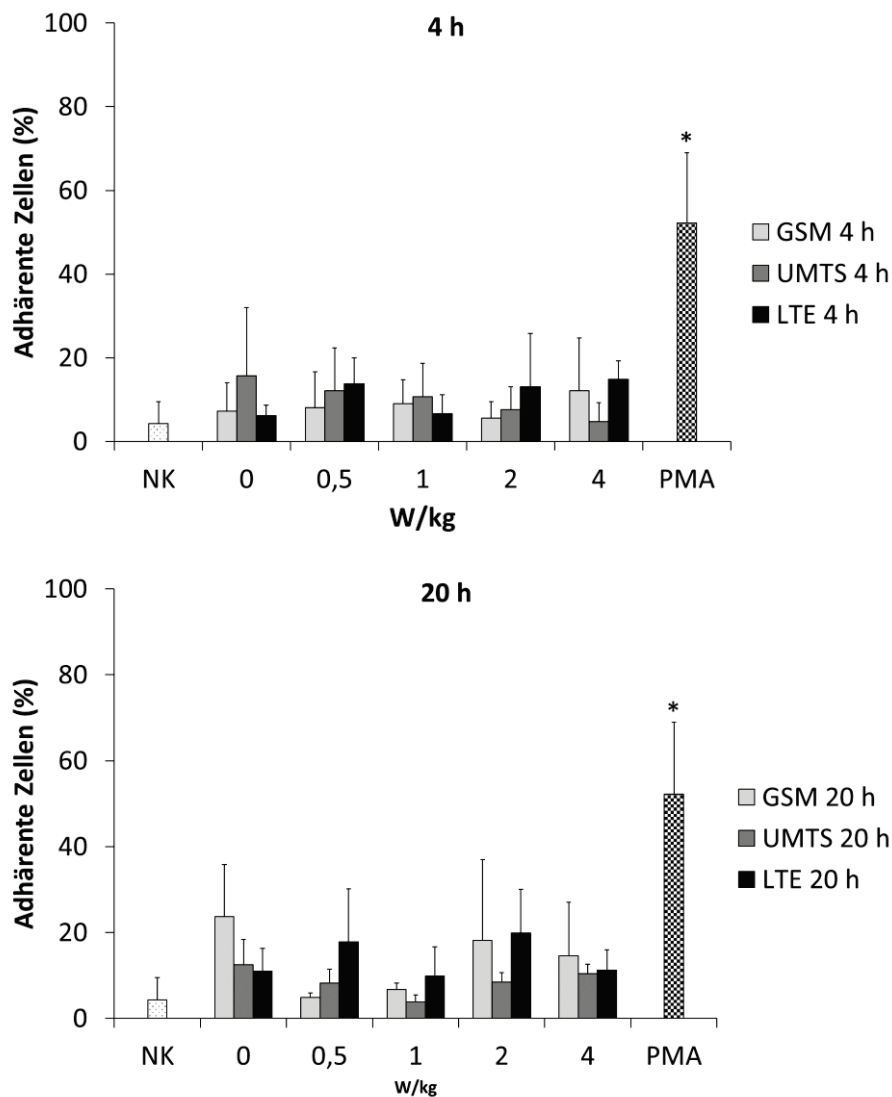


Abbildung A3: Adhärente hämatopoetische Stammzellen nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (20 h) mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit PMA) Säule (n=14) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK).

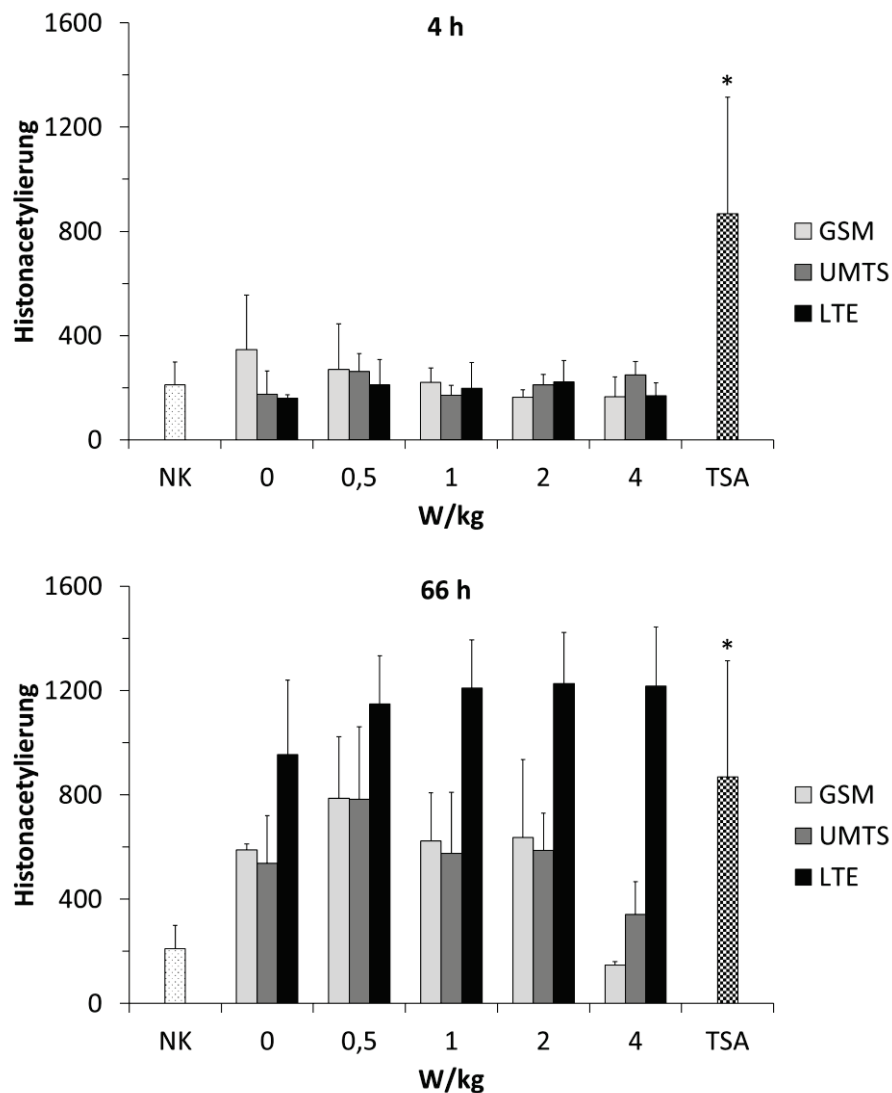
Histonacetylierung

Abbildung A4: Histonacetylierung nach Kurz- (4 h) und Langzeitexposition (66 h) von fixierten HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Mobilfunk-Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte der GSM- (hellgrau), UMTS- (dunkelgrau) und LTE-befeldeten (schwarz) Proben für die fünf untersuchten SAR-Werte 0, 0,5, 1, 2 und 4 W/kg aus drei unabhängigen Replikaten (n=3). Die Mittelwerte der 1-mal wöchentlich durchgeführten Kontrollen werden repräsentiert durch die gepunktete (unbehandelt, NK) und die karierte (behandelt mit TSA) Säule (n=35) (*: $p \leq 0,05$ gegenüber NK).

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Helga Stopper danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Doktorarbeit am Lehrstuhl für Toxikologie, die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die sehr gute fachliche Betreuung.

Ein besonderer Dank geht an **Dr. Henning Hintzsche** für die Bereitstellung des spannenden Themas, die sehr gute Betreuung und die aufmerksame und kritische Korrektur meiner Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich auch einen Dank an **PD Dr. Robert Hock** für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter aussprechen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Toxikologie für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellung bei kleineren und größeren Problemen.

Vielen Dank auch an **Martina Rohland, Kai Baaske und Thomas Kleine-Ostmann** von der PTB in Braunschweig für die Durchführung der technischen Experimente und die hervorragende Unterstützung aus der Ferne.

Ein riesen Dankeschön geht an **Eylül Bankoglu, Christin Misigaiski, Janina Dix, Theresa Arnaudov, Philipp Burkard und Malte Kircher** für die zahlreichen Diskussionen, die tolle Arbeitsatmosphäre und die vielen lustigen Augenblicke auch außerhalb des Labors. Christin war mir eine sehr große Hilfe während der gesamten Zeit und unterstützte mich tatkräftig bei den Experimenten. Vielen Dank!

Meinen lieben Freundinnen **Jenny Weyhmüller Reboredo und Corinna Rosenbaum** danke ich ganz besonders für die schöne Zeit in Würzburg, die anregenden Gespräche und ein stets offenes Ohr.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei **meinen Eltern und meiner Schwester** bedanken. Auch über die weite Entfernung hinweg wart ihr immer für mich da, habt mich ermutigt und mir Rückhalt gegeben. Durch eure liebevolle und selbstlose Unterstützung habt ihr es mir ermöglicht, mein Leben frei zu gestalten.

Mein größter Dank geht an meinen Mann **Tammo**. Durch seine unerschöpfliche Energie, gute Laune, Geduld und Ehrlichkeit hat er es geschafft, mir immer Kraft zu geben und mich zu motivieren. Danke, dass du immer an mich glaubst und an meiner Seite bist.

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Einfluss hochfrequenter Felder des Mobilfunks auf das blutbildende System *in vitro*“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 3. Dezember 2016

Katharina Gläser