

**Charité-Universitätsmedizin Berlin**  
**Campus Benjamin Franklin**  
**Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie**  
**Direktor: Prof. Dr. R. Tauber**

**DNA-Strangbrüche in humanen HL-60**  
**Promyelozytenleukämiezellen zur Einschätzung biologischer**  
**Wirkungen nach Exposition mit hochfrequenten**  
**elektromagnetischen Feldern (2450 MHz)**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der**  
**medizinischen Doktorwürde**  
**der Charité-Universitätsmedizin Berlin**  
**Campus Benjamin Franklin**

vorgelegt von Leila Violette Khubnazar  
aus Schiras

Referent: Prof. Dr. R. Tauber

Korreferent:

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am:

meinen Eltern gewidmet

# **ADDENDUM und CORRIGENDUM**

**zur**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
der Charité-Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin**

**DNA-Strangbrüche in humanen HL-60  
Promyelozytenleukämiezellen zur Einschätzung biologischer  
Wirkungen nach Exposition mit hochfrequenten  
elektromagnetischen Feldern (2450 MHz)**

vorgelegt von Leila Violette Khubnazar  
aus Schiras

Referent: Prof. Dr. R. Tauber

Korreferent: Prof. Dr. W.-K. Hofmann

Die entscheidenden Experimente zu dieser Dissertation wurden im Jahr 1999 durchgeführt, die Promotion 2006 abgeschlossen. Im Jahr 2010 wurde berechtigte Kritik an der Arbeit geäußert, die sich insbesondere auf die Dokumentation der Ergebnisse und auf Diskrepanzen bei der Auswertung bezog. Der relative Unterschied zwischen den exponierten und nicht-exponierten Zellen bleibt davon jedoch praktisch unberührt.

Ich danke der Promotionskommission der Charité für die Möglichkeit, durch ein „Addendum und Corrigendum“ den Sachverhalt richtig zu stellen bzw. evtl. entstandene Fragen beantworten zu dürfen.

Das Corrigendum betrifft insbesondere die Auswertung der im Jahr 1999 durchgeführten Experimente zur EMF-Exposition und den Vergleich der Ergebnisse dieser Experimente mit den im Jahr 2002 durchgeführten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimenten. Als Addendum wurde zusätzlich eine visuelle Auswertung der mittels Comet-Assay untersuchten EMF-exponierten und nicht-exponierten Zellen angefügt. Zudem erfolgte eine Auflistung aller Einzelwerte im Anhang, und die Diskussion wurde durch einige aktuelle Arbeiten ergänzt.

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>ADDENDUM UND CORRIGENDUM .....</b>	<b>4</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>6</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>10</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>13</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>16</b>
<b>1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Magnetische und elektromagnetische Felder.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2. Derzeitiger Stand der wissenschaftlichen Diskussion.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3. Wichtige experimentelle Studien zur biologischen Wirkung von HF-EMF .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4. Methoden zum Nachweis genetischer Veränderungen.....</b>	<b>24</b>
<b>1.5. Methoden zum Nachweis von Störungen der Zellvitalität und des Zellwachstums .</b>	<b>27</b>
1.5.1. Vitalität .....	27
1.5.2. Apoptose.....	28
1.5.3. Zellproliferation .....	31
1.5.4. Zellzyklus .....	32
<b>1.6. Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....</b>	<b>33</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1. Chemikalien und Geräte.....</b>	<b>34</b>
2.1.1. Chemikalien .....	34
2.1.2. Materialien und Lösungen zur Mikrogelelektrophorese (Comet-Assay).....	35
2.1.3. Lösungen zur Zellkultur (Medien und Zusatzlösungen) .....	39

2.1.4.	Testkits und Sonstiges .....	39
2.1.4.1.	Reagenzien für den Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung .....	39
2.1.4.2.	Reagenzien für den Mykoplasmentest .....	39
2.1.4.3.	Reagenzien zur Apoptosetestung mittels TUNEL-Assay und Annexin V-Assay ...	40
2.1.5.	Geräte .....	41
<b>2.2.</b>	<b>Kultivierung humaner HL-60-Zellen .....</b>	<b>43</b>
2.2.1.	HL-60-Zellen als in-vitro-Testsystem.....	43
2.2.2.	Kulturbedingungen.....	44
2.2.3.	Steriles Arbeiten.....	44
2.2.4.	Mykoplasmen-Test.....	45
<b>2.3.</b>	<b>Befeldungsanlage, Versuchsdurchführung und Vitalitätsmessung .....</b>	<b>47</b>
2.3.1.	Befeldungsanlage .....	47
2.3.1.1.	Auswahlkriterien für die GTEM-Zelle.....	47
2.3.1.2.	GTEM-Zelle und Hochfrequenzbefeldung.....	48
2.3.1.3.	Hochfrequenz-Abschirmbox und Kontrolluntersuchung .....	49
2.3.2.	Versuchsdurchführung .....	50
2.3.3.	Bestimmung der Vitalität mittels Trypanblauexklusionstest.....	52
<b>2.4.</b>	<b>Untersuchung der DNA-Schädigung mittels Comet-Assay .....</b>	<b>52</b>
2.4.1.	Versuchsvorbereitung und Agarosegelpräparation.....	53
2.4.2.	Lysierung von Zell- und Kernmembran.....	54
2.4.3.	Alkalische Denaturierung .....	55
2.4.4.	Elektrophoretische Auftrennung der DNA.....	55
2.4.5.	Färbung.....	55
2.4.6.	Mikroskopie und Analyse der DNA-Migration.....	56
2.4.6.1.	Digitale Auswertung gespeicherter Bilder des Comet-Assays .....	56
2.4.6.2.	Visuelle Auswertung des Comet-Assays.....	59
<b>2.5.</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimente .....</b>	<b>60</b>
<b>2.6.</b>	<b>Untersuchung zur Apoptose mittels TUNEL-Assay und Annexin V-Assay .....</b>	<b>61</b>
2.6.1.	TUNEL-Assay .....	61
2.6.2.	Annexin V-Assay.....	62

<b>2.7. Untersuchungen zur Zellproliferation und zum Zellzyklus .....</b>	<b>63</b>
2.7.1. Bestimmung des Wachstumsverhaltens und der Verdoppelungszeit.....	63
2.7.2. Bestimmung des Zellzyklus mittels Flowzytometrie.....	64
2.7.3. Statistische Analyse.....	65
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>66</b>
<b>3.1. DNA-Schädigung nach RF-Exposition.....</b>	<b>66</b>
3.1.1. Tail length.....	67
3.1.2. Olive Tail Moment.....	70
3.1.3. Tail Extent Moment .....	72
3.1.4. Tail-DNA.....	74
<b>3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimente .....</b>	<b>80</b>
<b>3.3. Vitalität nach RF-Exposition.....</b>	<b>86</b>
<b>3.4. Untersuchungen zur Apoptose .....</b>	<b>86</b>
3.4.1. Annexin V-Assay.....	86
3.4.2. TUNEL-Assay .....	88
3.4.3. Zusammenfassung.....	89
<b>3.5. Untersuchungen zum Zellzyklus und zum Wachstumsverhalten .....</b>	<b>89</b>
3.5.1. Beeinflussung des Zellzyklus nach EMF-Exposition .....	89
3.5.2. Beeinflussung des Wachstumsverhaltens nach EMF-Exposition.....	90
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
<b>NACHTRAG ZUR DISKUSSION.....</b>	<b>100</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>104</b>
<b>6. LITERATUR .....</b>	<b>106</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>144</b>
<b>7.1. Lebenslauf .....</b>	<b>144</b>



<b>7.2.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>145</b>
<b>7.3.</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>146</b>
<b>7.4.</b>	<b>Tabellenanhang</b> .....	<b>147</b>
7.4.1.	Anhang zur digitalisierten Auswertung des Comet-Assays .....	147
7.4.2.	Anhang zur visuellen Auswertung des Comet-Assays.....	161

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Daten zur Kometenbildung (Tail length) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7). n stellt die Zahl der pro Versuch ausgewerteten Zellen dar.
- Tab. 2: Daten zur Kometenbildung (Olive Tail Moment) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7). n stellt die Zahl der pro Versuch ausgewerteten Zellen dar.
- Tab. 3: Daten zur Kometenbildung (Tail Extent Moment) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7). n stellt die Zahl der pro Versuch ausgewerteten Zellen dar.
- Tab. 4: Daten zur Kometenbildung (Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7). n stellt die Zahl der pro Versuch ausgewerteten Zellen dar.
- Tab. 5: Daten zur zusammenfassenden Darstellung der Kometenbildung (Tail length, OTM,

Tail Extent Moment und Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

Tab. 6: Visuelle Auswertung der EMF-exponierten HL-60-Zellen und der nicht-exponierten Kontrollzellen nach Durchführung des Comet-Assays für Experiment 1 bis 7 mit der Einteilung der Zell-Schadigungsgrade in 5 Kategorien nach der Vorlage von Anderson et al. 1994. Dargestellt ist die Anzahl der insgesamt ausgewerteten Zellen pro unabhängigem Experiment und die der entsprechenden Schädigungskategorie zugeordnete Zellzahl. In der jeweils untersten Zeile stellt sich der errechnete score dar.

Tab. 7: Daten zur Kometenbildung (Tail length) bei HL-60-Zellen nach Durchführung des Comet-Assays nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung (100 µmol/l, 0,5 h). Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte der Tail lengths, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurde, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte aller drei Experimente.

Tab. 8: Daten zur Kometenbildung (Olive Tail Moment) bei HL-60-Zellen nach Durchführung des Comet-Assays nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung (100 µmol/l, 0,5 h). Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte des Olive Tail Moments, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurde, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte aller drei Experimente.

Tab. 9: Daten zur Kometenbildung (Tail Extent Moment) bei HL-60-Zellen nach Durchführung des Comet-Assays nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung (100 µmol/l, 0,5 h). Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte des Tail Extent Moments, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurde, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte aller drei Experimente.

Tab.10: Daten zur Kometenbildung (Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach Durchführung des Comet-Assays nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung (100 µmol/l, 0,5 h). Dargestellt sind für die

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte der Tail-DNA, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurde, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte aller drei Experimente.

Tab.11: Verdoppelungszeit bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Einzelergebnisse aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ubiquitäres Vorkommen elektromagnetischer Felder.

Abb. 2: In-vivo Veränderung eines Lymphozyten in den verschiedenen Stadien der Apoptose.

Abb. 3: Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellplasmamembran während der Apoptoseinduktion. Quelle: Clontech [1996].

Abb. 4: GTEM-Zelle (Hersteller EMCO, USA, Modell 5302) als Feldgenerator in der Gesamtansicht (links). Detailaufnahmen der Acrylprobenhalter mit den Versuchsröhrchen in der GTEM-Zelle (rechts).

Abb. 5: Hochfrequenz-Abschirmbox (HF-Box bzw. Kontrollbox) in der Gesamtansicht (links). Detailaufnahmen der Acrylprobenhalter mit den Versuchsröhrchen in der Hochfrequenz-Abschirmbox (rechts).

Abb. 6: Schematische Darstellung eines Kometen in der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay).

Abb. 7: Repräsentative Mikrophotographie einer Kometenbildung bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{mol/l}$ , 0,5 h) als Kontrolle in der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay).

Abb. 8: Repräsentative Mikrophotographien einer nicht-exponierten Kontrollzelle (linkes Bild) und von Mikrowellen-exponierten Zellen (rechtes Bild) mit entsprechender Kometenbildung in der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay).

Abb. 9: Kometenbildung (Tail length) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse

aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

Abb. 10:Kometenbildung (Olive Tail Moment) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

Abb. 11:Kometenbildung (Tail Extent Moment) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

Abb. 12:Kometenbildung (Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle. Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

Abb. 13:Kometenbildung (Tail length) bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 0,5 h). Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontrolle die Mittelwerte der Tail lengths, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurden.

Abb. 14:Kometenbildung (Olive Tail Moment) bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 0,5 h). Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontrolle die Mittelwerte des Olive Tail Moments, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurden.

Abb. 15:Kometenbildung (Tail Extent Moment) bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 0,5 h). Dargestellt sind für die positive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontrolle die Mittelwerte des Tail Extent Moments, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurden.

Abb. 16:Kometenbildung (Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(100 µmol/l, 0,5 h). Dargestellt sind für die positive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontrolle die Mittelwerte der Tail-DNA, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurden.

Abb. 17: Test auf Apoptose-Induktion in HL-60-Zellen nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg, Bilder rechts) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle (Bilder links) mittels Annexin V-Assay ohne (oben) und mit 3 h 0,5 µg/ml Camptothecin-Behandlung (unten).

Abb. 18: Test auf Apoptose-Induktion in HL-60-Zellen nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg, Bilder rechts) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle (Bilder links) mittels TUNEL-Assay ohne (oben) und mit 3 h 0,5 µg/ml Camptothecin-Behandlung (unten).

Abb. 19: Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie mit Darstellung des Verhältnisses von HL-60-Zellen in der G1/G0-, S- und G2/M-Phase nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg, Bild rechts) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle (Bild links).

Abb. 20: Verdoppelungszeit bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, C.W., 24 h, SAR 1,114 W/kg) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.

## Abkürzungsverzeichnis

bidest.	bidestilliert
CCD video camera	Charge-Coupled Device
CDMA	Code Division Multiple Access
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CW	Continuous Wave
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxy-Uraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMF	Elektromagnetfeld
EPA	Environmental Protection Agency
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FDMA	Frequency Division Multiple Access
FISH	Fluorezenz In Situ Hybridisierung
FKS	Fötales Kälberserum
FM	Frequency Modulation
FMCW	Frequency Modulated Continuous Wave
g	Erdschwerkraft
GSM	Global System for Mobile communication
γ-Strahlung	Gammastrahlung
GHz	Gigahertz
GTEM	Gigahertz-Transversal-Elektromagnetische Zelle
h	Stunde
HF	Hochfrequenz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Hz	Hertz
iDEN	High Speed Circuit Switched Data (Motorola)
KHz	Kilohertz
LMP-Agarose	Low Melting Point Agarose



mg	Milligramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mV	Millivolt
MW	Mikrowelle
mW	Milliwatt
NMP-Agarose	Normal Melting Point Agarose
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphatgepufferte Saline (engl.: Phosphate Buffered Saline)
RF	Radiofrequenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTL	Radio Transmission Line
s	Sekunde
SAR	Specific Absorbed Rate
SCE	Sister Chromatid Exchange
TDMA	Time Division Multiple Access
TdT	Terminale desoxynucleotidyl Transferase
TEM	Transversal-Elektromagnetische Zelle
TEM	Tail Extent Moment
THAM	Tris-Puffer
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
UMTS	Universal Mobile Telekommunikations System
Upm	Umdrehungen pro Minute
W	Watt

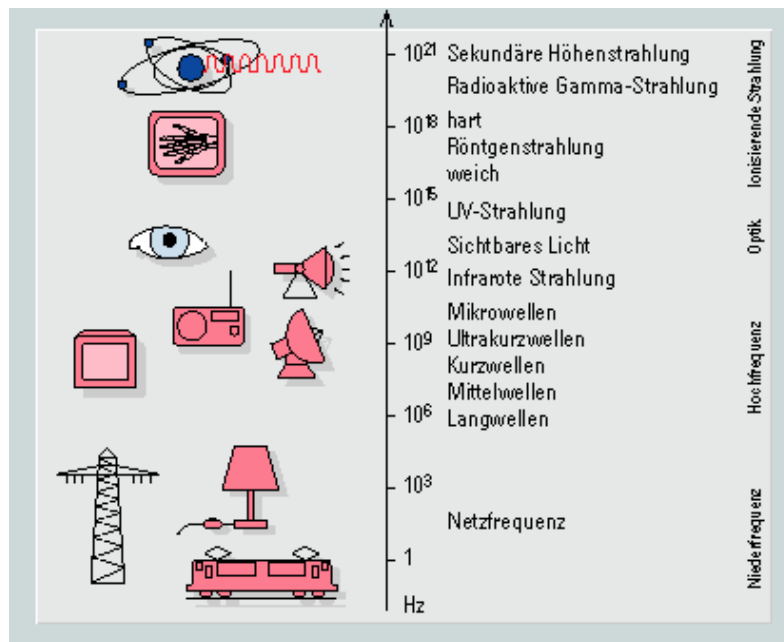
# **1. Einleitung und Fragestellung**

## **1.1. Magnetische und elektromagnetische Felder**

Seit längerer Zeit wird vermutet, daß schwache magnetische oder elektromagnetische Felder (EMF) mit biologischen Systemen interagieren können (Leitgeb 1991, Baumann 1992, Bernhardt 1992, Silny 1993, Polk 1996). Bekannte Beispiele sind die Orientierungsleistungen mancher Insekten (Etheredge et al. 1999), von Vögeln (Leitgeb 1991, Liboff und Jenrow 2000) und Meeressäugern (Luschi et al. 1998, Lohmann et al. 2001) am Erdmagnetfeld. Auf der anderen Seite verursachen insbesondere epidemiologische Studien, nach denen ein Zusammenhang zwischen schwachen magnetischen Feldern und bestimmten bösartigen Erkrankungen bestehen könnte (Wertheimer und Leeper 1979, Savitz und Calle 1987, Cridland 1993, Michaelis 1993, Stamm 1993, Bowman et al. 1995, Gurney et al. 1995, Haas und Schaefer 1995, Stamm und Zemann 1997, Thériault et al. 1994, Löscher und Mevissen 1995, Meinert und Michaelis 1996, Goldsmith 1997a und b, Juutilainen und Lang 1997, Petridou et al. 1997, Repacholi 1997a, Juutilainen und de Seze 1998, Elwood 1999, Moulder et al. 1999, Blettner und Berg 2000, Blettner et al. 2000, Rothman 2000, Armstrong et al. 2001, Bartsch et al. 2002, Wilen et al. 2003, 2004, Blaasaas et al. 2004), in der Bevölkerung große Unruhe. Die Aussagekraft dieser Studien wird von zahlreichen Wissenschaftlern wegen der unzureichenden statistischen Auswertung angezweifelt (Nimtz 1994, Repacholi 1997a, Kieback und Krause 1995). Ein physikalischer Wechselwirkungsmechanismus zwischen schwachen Magnetfeldern und biologischen Systemen ist bisher nicht bekannt (Nimtz 1994, Nimtz und Mäcker 1994, Obe 1995).

Mit dem Aufkommen elektrischer und elektrotechnologischer Einrichtungen, deren Funktionen auf der Erzeugung, Aussendung und Nutzung elektromagnetischer Felder beruht, bzw. die als Nebenwirkungen elektromagnetische Felder weit höherer Intensität als die natürlicher Quellen emittieren, erhob sich die Frage nach den biologischen Wirkungen bzw. der biologischen Verträglichkeit solcher Felder. Da es in jüngerer Zeit immer mehr und schneller zu einer Verbreitung von Geräten im Radiofrequenz- und Mikrowellenbereich (30 kHz - 300 GHz) sowohl in den Konsumentenhaushalten (Löscher und Mevissen 1995, Moulder et al. 1999) als auch im öffentlichen Bereich, nämlich in der Telekommunikation (Malyapa et al. 1997a und b, Dolk et al. 1997a und b), in der Industrie (Löscher und Mevissen 1995, Dulce 1997, Malyapa et al. 1997a) und im Militär (Malyapa et al. 1997a) gekommen ist, wuchs auch die Wachsamkeit

eines großen Teils der Bevölkerung gegenüber potentiellen Gesundheitsschäden. Besonders in den letzten Jahren mit der immer häufigeren Nutzung von hochfrequenten Elektromagnetfelder aussendenden Mobiltelefonen (800 - 2200 MHz) (Malyapa et al. 1997a und b, Rothman und Loughlin al. 1996) und dem ständig wachsenden Bedarf an Telekommunikationsanlagen aller Art gibt es heute viele genutzte Frequenzbereiche (Abb. 1), so daß ubiquitär eine ständige EMF-Exposition besteht („Elektrosmog“) (Leitgeb 1991).



**Abb. 1: Ubiquitäres Vorkommen elektromagnetischer Felder**

Es besteht ein hoher Klärungsbedarf, ob und gegebenenfalls wie diese Felder mit biologischen Systemen, also Lebewesen, Organen oder Zellen, interagieren können. Hierbei ist von großem wissenschaftlichem Interesse, welche primären Wirkmechanismen (die „Ankoppelung“ schwacher EMF) den biologischen Beobachtungen zugrunde liegen.

Vor 1960 waren die einzig bekannten Effekte nichtionisierender elektromagnetischer Felder (10 kHz-300 GHz) thermale Effekte und der Elektroschock (Sheikh 1986, Moroz et al. 2002, Ichioka et al. 2003). Somit wurden nationale, in den verschiedenen Ländern jedoch unterschiedliche Grenzwerte eingeführt, mit dem Ziel, daß bei deren Einhaltung die bei der Absorption elektromagnetischer Wellen entstehenden thermischen Wirkungen vermieden werden sollen (Baumann 1992, Krause 1993, Nimtz 1994, Kieback und Krause 1995, Zemmann 1997). Seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts haben eine große Anzahl an

Tierexperimenten und humane Studien gezeigt, daß nichtionisierende elektromagnetische Felder den Metabolismus aller Körpersysteme, wie z.B. das hämatologische System, das Immunsystem und das Fortpflanzungssystem (Danilin et al. 1969, Sheikh 1986, Leitgeb 1991) beeinflussen können (Onodera et al. 2003, Dabrowski et al. 2003). Diese sogenannten biologischen Effekte treten bereits bei geringsten Feldstärken auf und werden auch als nicht-thermische Effekte bezeichnet (Baumann 1992, Bernhardt 1992, Repacholi 1998). Es handelt sich dabei häufig um modulierte Hochfrequenzfelder oder um Mikrowellen im Millimeterbereich. Für diese Wirkungen elektromagnetischer Strahlung mit Lebewesen kennt man noch keine allgemein akzeptierten Mechanismen. Da thermische Effekte von Elektromagnetfeldern aufgrund der geringen Feldstärken und damit der geringen übertragenen Energien ausscheiden (Tenforde 1990, 1991, 1992, Bernhardt 1992, Cridland 1993, Sienkiewicz et al. 1994, Nimtz 1994, Nimtz und Mäcker 1994, Obe 1995, Polk 1996), werden vermehrt nicht-lineare Prozesse und Prinzipien der stochastischen Resonanz diskutiert (Behari 1999).

Es existieren zwar zahlreiche Hypothesen, aber keine ausreichende zuverlässige Information, die für eine Risikobewertung oder für die Ableitung von Personenschutzwerten nützlich sind. Die klassische Einteilung der biologischen Wirkungen von Hochfrequenz-Strahlung in thermische und athermische oder nicht-thermische Effekte ist eine grobe Vereinfachung, da aufgrund der komplizierten Wirkungsmechanismen elektromagnetischer Energie mit biologischen Objekten und der ungleichförmigen Feldverteilung im Körper eine Unterscheidung insbesondere bei niedrigen Intensitäten häufig nicht möglich ist (Leitgeb 1991, Bernhardt 1992). Diese klassische Einteilung ist somit selbst eine Quelle vieler Unklarheiten. Nach wie vor ist es notwendig, die fundamentalen Wirkmechanismen besser zu verstehen, da nicht jede einzelne Frequenz im Hinblick auf mögliche vorhandene biophysikalische und biologische Wechselwirkungen untersucht werden kann.

Durch die wachsende Ausbreitung der Mobilfunktechnik ist der Mensch einerseits den emittierten hochfrequenten Feldern der Basisstationen sowie denen der Mobiltelefone ausgesetzt. Die Verunsicherung darüber, ob diese Exposition zu gesundheitsschädlichen Konsequenzen führt, nimmt in der Gesellschaft deutlich zu. Die aufgrund der immer leistungsfähiger werdenden Technik notwendige zusätzliche Errichtung von Basisstationen, wie sie insbesondere für die Umsetzung der UMTS-Technologie notwendig werden wird, wird in besonders deutlichem Maße zu einer Sensibilisierung der Bevölkerung führen. Die Fragestellung, inwieweit allgegenwärtige hochfrequente Felder des Alltags gesundheitliche Beeinträchtigungen bzw. sogar Schädigungen bei Mensch und Tier hervorrufen, wird nach wie vor nicht nur in der Öffentlichkeit, sondern auch zwischen Experten kontrovers diskutiert. Grund dafür ist, daß

bisherige Forschungsergebnisse, obwohl breit angelegt, auch heute noch keine eindeutige Antwort auf diese Frage zulassen.

Daher können in der Öffentlichkeit vorgetragene Mutmaßungen über eine Langzeitwirkung dieser Felder oder ihre besondere Wirksamkeit auf Kinder, alte und kranke Menschen nicht restlos ausgeräumt werden. Weitere, fundierte wissenschaftliche Untersuchungen im Hinblick auf Gesundheitsrisiken bzw. insbesondere auf ein krebsförderndes Potential sind dringend notwendig, um solchen Ängsten sachlich begegnen zu können. Dabei sollten sich In-vitro-Studien auf die Klärung von Veränderungen in der Zellkinetik, in der Zellproliferation, auf die Klärung von Effekten auf Gen-Ebene, auf Veränderungen der Signaltransduktion und auf Änderungen in der Membranstruktur und -funktion sowie auf generelle biophysikalische und biochemische Effekte von Radiofrequenzfeldern konzentrieren. In-vivo-Studien sollten dagegen Fragen der potentiellen Tumorpromotion, Copromotion und -progression sowie mögliche synergistische genotoxische, immunologische und karzinogene Effekte bei Langzeit-Hochfrequenz-Exposition klären. Intensive Forschung ist von Nöten, um zu verstehen, ob elektromagnetische Felder im allgemeinen tatsächlich im Stande sind, DNA-Schäden zu verursachen oder z.B. die Melatoninsynthese (Yellon et al. 1991, Kato et al. 1993, 1994, Liburdy et al. 1993a und b, Grota et al. 1994, Löscher et al. 1994, David und Reibenweber 1995), die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Salford et al. 1994, 2003, Schirmacher et al. 2000, Stögbauer 2002) und die Gehirnreaktion neurotrophen Medikamenten gegenüber zu beeinflussen. Auch Berichten über EMF-induzierte Augenstruktur und -funktionsveränderungen (Kues et al. 1992, Saito et al. 1998) müßte weiterhin nachgegangen werden. Gegebenenfalls müssen auf diese Art gewonnene Erkenntnisse zur Ergreifung administrativer Maßnahmen führen.

## **1.2. Derzeitiger Stand der wissenschaftlichen Diskussion**

Die derzeitigen Grenzwerte für elektromagnetische Felder berücksichtigen die bekannten und wissenschaftlich zweifelsfrei belegten biologischen Wirkungen, die bei Überschreitung bestimmter Schwellenwerte nachgewiesen wurden und deren Auftreten bei Einhaltung dieser Grenzwerte ausgeschlossen werden können. Zu gesundheitsrelevanten Effekten auf Mensch und Tier aber auch zu Effekten auf zellulärer Ebene sind besonders zu berücksichtigen:

- Auslösung und Förderung von Krebserkrankungen (Savitz und Calle 1987),
- Einflüsse auf das Nervensystem und die Gehirnfunktion (Hamblin et al. 2004),
- Beeinflussungen des Verhaltens (Prolic et al. 2003),
- Steuerung der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (Stögbauer 2002),

- Beeinflussungen des Herz-Kreislauf-Systems ((Braune et al. 2002),
- Beeinträchtigungen des Immunsystems (Onodera et al. 2003),
- Störungen der Fortpflanzung und Embryonalentwicklung (Danilin et al.1969, Sienkiewicz et al. 1994, Behari und Mathur 1997, Thalau 2002),
- Wirkungen auf zellulärer Ebene, wie Einflüsse auf Genexpression, Genotoxizität (Malyapa et al. 1997a und b, 1998a, Ivancsits et al. 2002, 2003, Tice et a. 2002, Simko et al. 2001, Heynick et al. 2003),
- Zellkommunikation, Zellproliferation, Enzym-Aktivitäten (Goodman et al. 1989, Goodman und Henderson 1991, Behari 1998, Loberg et al. 2000).

Bei den hochfrequenten elektromagnetischen Strahlungen sind dies vor allem Effekte, die den thermischen Wirkungen (Erwärmung von Zellgewebe) zugeschrieben werden. Die elektromagnetische Strahlung bewirkt dabei eine Erwärmung des Gewebes bis hin zu einer kritischen Temperaturerhöhung (Goldstein et al. 2003).

Allerdings werden in den letzten Jahren innerhalb der Biowissenschaften eine Reihe von biologischen Effekten diskutiert, die nicht durch Wärmeeinwirkungen hervorgerufen, sondern den nicht-thermischen Wirkungen von elektromagnetischen Strahlen zugeschrieben werden (Masley et al. 1999, Hyland 2000, vgl. auch Wiedemann et al. 2002). Hier handelt es sich um Effekte wie die Beeinflussung des Ionenhaushaltes von Zellen (Meyer et al. 1995, Behari 1998), die Aktivität von Enzymen (Behari 1998), die Zellteilungsrate (Goodman et al. 1991, Goodman und Henderson 1991), die Hirnaktivität (Marino et al. 2002, 2003a und b, Hamblin et al. 2004) und andere (Blank et al. 1995, Blank und Soo 1996, 1997, Berg 1995, 1999). Solche Effekte sollen schon weit unterhalb der Grenzwerte für Wärmeeinwirkungen beobachtet worden sein und vor allem erst bei chronischer (länger andauernder) Einwirkung bzw. erst als Spätfolge entstehen. Auch weiß man noch zu wenig darüber, ob diese, zum Teil subtilen Effekte für den Menschen tatsächlich ein Gesundheitsrisiko darstellen. Die Forschung und die Datenlage zu dieser Problematik sind derzeit allerdings noch äußerst dürftig.

Besonderes Interesse gilt jedoch den Effekten, die im Zusammenhang mit der Tumorgenese stehen. In bisherigen Arbeiten konnte jedoch bislang kein schlüssiger Hinweis geführt werden, daß elektromagnetische Felder über eine Tumorinitiation im Sinne der Mehrstufenkanzerogenese zur Auslösung eines Krebsgeschehens führen (McCann et al. 1993 1998, Murphy et al. 1993, Moulder et al. 1995, McCann 1998, Moulder 1998). Nicht einheitliche Ergebnisse legen nahe, daß eine Beteiligung von Elektromagnetfeldern am Prozeß der Kanzerogenese allenfalls im

Sinne der Tumorpromotion bzw. Copromotion möglich ist (Löscher et al. 1993, Mevissen et al. 1993, Rannug et al. 1994).

### **1.3. Wichtige experimentelle Studien zur biologischen Wirkung von HF-EMF**

Biologen, Biophysiker, Mediziner und andere Wissenschaftler beschäftigen sich seit Jahrzehnten mit den Auswirkungen elektromagnetischer Felder. Allein zum Mobilfunk existieren mehrere Tausend Studien, wobei jedes Jahr gerade durch die Einführung der UMTS-Technologie neue hinzukommen. Bei den Studien unterscheidet man zwischen Zellstudien, Tierstudien und epidemiologischen Studien.

Es gibt eine ganze Reihe von Schlüsselarbeiten experimenteller Studien zur biologischen Wirkung hochfrequenter Felder.

Lai und Singh erregten mit ihren Studien aufsehen, da sie (Lai und Singh 1995, 1996a und b) in einem in-vivo-Versuch an Ratten 4 Stunden nach Exposition mit 2450 MHz (SAR 1,2 W/kg) vermehrt Strangbrüche in Hirnzellen gegenüber der Kontrolle fanden. Malyapa et al. (1998a) wiederholten die Arbeiten von Lai und Singh. Sie konnten die Ergebnisse nicht bestätigen, zeigten jedoch, daß die Art der Tötung der Tiere einen Einfluß auf das Entstehen von Strangbrüchen hat. In den Untersuchungen wurden relevante Frequenzbereiche verwendet und es wurde auf Temperaturkonstanz geachtet. In-vitro-Versuche von Malyapa et al (1997a und b) an humanen permanenten Glioblastomzellen und an Mausbindegewebszellen bei 2450 MHz, 835,62 MHz und 847,74 MHz wiesen ebenfalls keine Wirkung auf die DNA nach. Dagegen zeigte sich bei Zellen, die als Positivkontrolle ionisierenden Strahlen ausgesetzt worden waren, sofort nach Exposition eine deutliche Induktion von DNA-Strangbrüchen.

Vijayalaxmi et al. (2000) führten gut dokumentierte Untersuchungen an humanen Lymphozyten durch. Die Exposition mit 2450 MHz (2 h) zeigte auch hier sofort und 4 Stunden nach Exposition keine Induktion von DNA Strangbrüchen. Ionisierende Strahlen bewirkten dagegen Strangbrüche.

Auch andere Forschungsgruppen, wie Hook et al. (2004) und Lagroye et al. (2004a und b) konnten keinerlei DNA-schädigende Wirkung von HF-EMF feststellen.

Es existieren neben den Zellstudien einige wichtige und aussagekräftige Tierstudien als Langzeitversuche an Nagetieren, bei denen kein Effekt der Hochfrequenzfelder auf ein eventuelles Krebsgeschehen gefunden wurde. Dazu gehören Arbeiten von Chou et al. (1992), Toler et al. (1997), Imaida et al. (1998a und b), Frei et al. (1998a und b), Adey et al.

(1999,2000), Chagnaud et al. (1999), Heikkinen et al. (2001), Zook und Simmens (2001) und Bartsch et al. (2002). Es sei an dieser Stelle auf den Übersichtsartikel von Verschaeve und Maes (1998) hingewiesen.

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten, die einen krebsfördernden Effekt von EMF verneinen, steht eine australische Studie von Repacholi 1997, bei der eine Zunahme von Lymphknotenkrebs bei genetisch veränderten Mäusen beobachtet wurde (Repacholi et al. 1997b). Allerdings wies diese Studie einige Mängel auf. Die Ergebnisse mehrerer Wiederholungstudien mit verbesserter Methodik stehen derzeit noch aus. Ein erstes Ergebnis durch Utteridge et al. (2002) konnte Repacholis Beobachtung in Hinsicht einer Zunahme von Lymphknotenkrebs nach Einwirkung von Mobilfunkfeldern jedoch nicht bestätigen.

#### **1.4. Methoden zum Nachweis genetischer Veränderungen**

Mutagene und kanzerogene Effekte sind die Langzeitfolge von DNA-Schäden. Um das karzinogene Potential von genotoxischen Substanzen und Strahlen abschätzen zu können, sind verschiedene Nachweismethoden entwickelt worden. Dabei werden am häufigsten molekularbiologische und biochemische Verfahren angewandt, um DNA-Strangbrüche nachzuweisen (Olive et al. 1990, Tice et al. 1990, 1991, Fortini et al. 1996, Singh et al. 1991, McKelvey-Martin et al. 1998). Zu diesen Methoden gehören die alkalische Sucrose-Sedimentation, die Nucleoid-Sedimentation, die Pulsfeldelektrophorese, die in-situ-Nick-Translation sowie die alkalische Filterelution (Tice et al. 1990, 1991, Singh et al. 1991, Fairbairn et al. 1995, Leroy et al. 1996, Nelms et al. 1997, Slamenova et al. 1997, Bowers et al. 1999). Für eine sensitive und reproduzierbare Erfassung von DNA-Schäden erfordern die meisten der genannten Testverfahren eine große Anzahl von Zellen (Olive et al. 1990, McKelvey-Martin et al. 1998) und die radioaktive Markierung der DNA-Nukleotide (Bowers et al. 1999). Somit bleibt der DNA-Schadensnachweis lediglich auf sich teilende Zellen beschränkt (Tice et al. 1990, 1991, Olive et al. 1990, Plappert et al. 1995, Bowers et al. 1999). Außerdem liefern die molekularbiologischen und biochemischen Techniken nur Informationen über das durchschnittliche Schadensausmaß in der Gesamtheit einer Zellpopulation (Olive et al. 1990, Nelms et al. 1997, Bowers et al. 1999).

Außer den genannten Methoden existieren auch zytogenetische Testsysteme, die Chromosomenaberrationen (z.B. FISH-Assay), die Bildung von Mikrokernen (Mikrokerntest), Schwesterchromatidaustauschvorgänge (SCE-Test) sowie das Wachstums- und



Vermehrungsverhalten von Zellen (= Proliferationsindex) aufzeigen können. Während auf der einen Seite der Schwesterchromatidaustausch-Test DNA-Schäden auf Einzelstrang-Ebene erfasst, werden DNA-Doppelstrangschäden durch die Chromosomenaberrationsrate nachgewiesen. Der Mikrokerntest wiederum ist ein in der Ökotoxikologie, aber auch in der klinischen Toxikologie häufig genutzter Test, wobei er hier hauptsächlich an Knochenmarkszellen durchgeführt wird. Mikrokerne entstehen dann, wenn bei der Anaphase der Mitose das Kernchromatin nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Somit gibt die Mikrokernrate über Störungen am Spindelapparat sowie über Chromosomenschäden Auskunft (Heddle et al. 1991). Da es bei der Krebsentstehung zu einem Kontrollverlust der ansonsten exakt regulierten Entwicklung und Proliferation von Zellen kommt, liefern Veränderungen dieser Parameter ebenfalls wichtige Erkenntnisse. Dabei spielen Funktionsveränderungen von Proliferationsregulatoren, wie Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, durch Tumorpromotoren ebenso eine Rolle wie Zellkommunikations- und -differenzierungsfaktoren, immunologische Faktoren und Störungen in DNA-Reparatursystemen.

Im Gegensatz zu Verfahren, die ein durchschnittliches Maß an Schädigung des genetischen Materials in Gesamtzellpopulationen darstellen, beruht die Einzelzell-Gelelektrophorese, auch Mikrogelelektrophorese oder Comet-Test genannt, auf der Messung von DNA-Strangbrüchen in einzelnen kernhaltigen Zellen. Der Comet-Assay wurde nach Vorarbeiten von Rydberg und Johanson (1978), die als erste DNA-Strangbrüche auf Einzelzellniveau aufzeigen konnten, im Jahr 1984 von Östling und Johanson entwickelt.

Einzel- und Doppelstrangbrüche können durch chemische oder physikalische Einwirkungen entstehen (Miyamae et al. 1997a und b). Sie sind die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden (Singh et al. 1988, Collins et al. 1997, Collins 2002). Die nachgewiesenen Strangbrüche können direkt durch Mutagene, durch Apoptose (Olive et al. 1993a, Gopalakrishna und Khar 1995, Fairbairn et al. 1995, Anderson und Plewa 1998, Collins 2002) oder indirekt durch unvollständige DNA-Reparatur (Tice et al. 1990, Fortini et al. 1996, Speit et al. 1996, Collins et al. 1997, Zhong et al. 1997, Anderson und Plewa 1998, Collins 2002) bedingt sein.

Das Prinzip des Comet-Assay basiert auf der Wanderung gebrochener oder relaxierter DNA-Stücke in einem elektrischen Feld (Malyapa et al. 1998b). Bei diesem Test werden Zellen auf einem Objektträger in Agarosegel eingebettet, mit einer Salz- und Laugenlösung lysiert und für kurze Zeit einer Elektrophorese ausgesetzt. Vor und während der Elektrophorese findet das sogenannte „unwinding“, d.h. die Auflösung der Chromosomenstruktur und die Entspiralisierung der DNA statt, in der dann auch die Elektrophorese durchgeführt wird. Anschließend werden die

Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht. Je nach Ausmaß der Schädigung wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente aus dem Kern in Richtung Anode und erzeugen eine Form, die an den Schweif eines Kometen erinnert und die zur Namensgebung des Testes führte (siehe Abb. 5, 6 und 7). Der DNA-Schaden kann durch die Umverteilung genetischen Materials aus dem Kern in den Schweif quantifiziert werden. Dazu stehen sowohl manuelle Methoden als auch Bildanalyseverfahren zur Verfügung, wobei letztere eine genauere Auswertung der DNA-Verteilung erlauben.

Bei dem ursprünglichen Comet-Assay von Östling und Johanson wird die Lyse und Elektrophorese unter neutralen Bedingungen ausgeführt, und es können somit nur DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden (Singh et al. 1988). DNA-Doppelstrangbrüche haben eine biologisch schwerwiegendere Konsequenz als Einzelstrangbrüche, da sie direkt zu Chromosomenaberrationen und zum Verlust von genetischem Material führen können. Da aber viele Substanzen um das 5 - 2000 fache mehr Einzelstrang- als Doppelstrangbrüche erzeugen und auch bevorzugt zu alkali-labilen Schäden führen (Singh et al. 1988), wurde im Jahre 1988 von Singh und seinen Mitarbeitern der heute gängige alkalische Comet-Assay eingeführt. Eine zweite von Singh etwas differierende alkalische Version des Comet-Assay entstand außerdem im Labor von Olive et al.

Die Zahl der Publikationen, die methodisch auf dem Comet-Assay fußen, steigt kontinuierlich an. So existieren abgesehen von den drei Hauptversionen zahlreiche andere Protokolle, die vor allem in den Lyse-, Denaturierungs- und Elektrophoresebedingungen variieren. Dabei werden die Versuchsbedingungen des Comet-Assays der Fragestellung und der zu untersuchenden Gewebs- und Zellart angepaßt.

Einer der wichtigsten Vorteile des Comet-Assay ist, daß er beim Nachweis von DNA-Schäden sowohl die gesamte Zellpopulation als auch die einzelne Zelle in Betracht zieht und somit im Gegensatz zu Verfahren, die nur ein durchschnittliches Maß an Schädigung des genetischen Materials in Gesamtzellpopulationen darstellen, die Messung von DNA-Strangbrüchen in einzelnen kernhaltigen Zellen erlaubt (Östling und Johansson 1984, Singh et al. 1988, Olive et al. 1990, 1992, Tice et al. 1990, Fairbairn et al. 1995, Hellman et al. 1995, Klaude et al. 1996, Speit et al. 1996, Collins et al. 1997, Zhong et al. 1997, McKelvey-Martin et al. 1998, Neubauer et al. 1998) . Er deckt dabei nicht nur interzelluläre Unterschiede in Hinsicht Sensibilität oder umgekehrt Resistenz gegenüber chemischen und physikalischen Noxen auf (Tice et al. 1990, McKelvey-Martin et al. 1993, Hellman et al. 1995, Tice und Strauss 1995), sondern ermöglicht auch einen Einblick in zelluläre Reparaturvorgänge (Tice et al. 1990, Singh et al. 1991, McKelvey-Martin et al. 1993, 1998, Fairbairn et al. 1995, Fortini et al. 1996, Speit et al. 1996,

Collins et al. 1997, Miyamae et al. 1997a und b, Zhong et al. 1997, Anderson und Plewa 1998, Neubauer et al. 1998, Bowers et al. 1999) . In Kombination mit anderen Tests, wie z.B. dem FISH-Test (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung), können Schäden und Reparaturabläufe sogar an spezifischen DNA-Sequenzen erforscht werden (McKelvey-Martin et al. 1998). Durch Einsatz von läsions-spezifischen Enzymen wiederum ist eine genauere Klassifizierung von Schäden je nach Ursache möglich.

Der Comet-Assay kann neben den erwähnten Doppelstrangbrüchen, Einzelstrangbrüchen und alkali-labilen Schäden auch DNA-Schäden durch Crosslinker und sogar zytotoxische Vorgänge wie Apoptose und Nekrose nachweisen (Olive et al. 1993a, Fairbairn et al. 1995, 1996, Hartmann und Speit 1997, Miyamae et al. 1997a und b, Bowers et al. 1999).

Durch das Einbetten der Zellen in eine Agarosegelschicht, die von zwei anderen Gelschichten eingerahmt wird (Sandwich-System), ergeben sich weitere Vorteile des Comet-Assay: Zum einen sind alle Zellen im Gel homogenen Versuchsbedingungen unterworfen, zum anderen werden sie auch vor künstlichen Schäden, die bei der Zellgewinnung und Handhabung des Tests entstehen könnten, geschützt (Singh et al. 1991, Bowers et al. 1999). Außerdem wird für den Comet-Assay auf diese Weise im Vergleich zu anderen Tests nur eine geringe Zahl an Zellen von ca.10.000-100.000 benötigt (Tice et al. 1990, McKelvey-Martin et al. 1993, 1998, Tice und Strauss 1995, Rojas et al. 1996, Salagovic et al. 1996, Anderson und Plewa 1998, Neubauer et al. 1998, Bowers et al. 1999, Oppitz et al. 1999, Tebbs et al. 1999).

Somit kann der Comet-Assay im Vergleich zu anderen Methoden selbst eine sehr geringfügige Schädigung des zu untersuchenden Zellmaterials (0,1 Brüche pro  $10^9$  Da) nachweisen.

Auf Grund der oben aufgeführten zahlreichen Vorteile und der hohen Sensitivität des Comet-Assays wurde er in dieser Arbeit zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen und damit zur Erfassung genetischer Schäden an den HL-60-Zellen gewählt.

## **1.5. Methoden zum Nachweis von Störungen der Zellvitalität und des Zellwachstums**

### **1.5.1. Vitalität**

Der Trypanblauexklusionstest ist eine gängige Methode, um die Vitalität von Zellen zu bestimmen. Er beruht auf der Fähigkeit lebensfähiger Zellen, Farbe auszuschließen. Da apoptotische Zellen ihre Membranintegrität behalten, wird in den frühen Stadien der Apoptose von den Zellen die Farbe nicht in die Zelle hinein gelassen, während nekrotische Zellen mit verletzter Plasmamembran dazu nicht mehr imstande sind und somit angefärbt werden. Auf diese

einfache Weise können gesunde, lebensfähige bzw. im Frühstadium apoptotische von nekrotischen Zellen unterschieden werden.

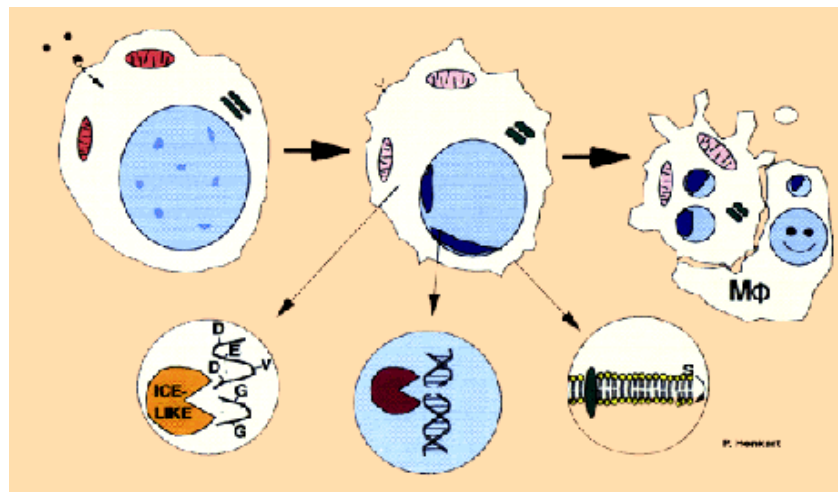
Die Abschätzung zytotoxischer Effekte ist im Rahmen dieser Arbeit eine wesentliche Voraussetzung vor der Durchführung des Comet-Assays. Der Trypanblauexklusionstest wurde somit bei allen Experimenten routinemäßig ausgeführt. Dadurch daß zytotoxische Effekte zu DNA-Strangbrüchen führen können, die sich in der Elektrophorese als verändertes DNA-Wanderungsverhalten darstellen, wurde hier der Comet-Assay nicht bei Proben mit mehr als 30 % Zytotoxizitätszeichen, sprich vermehrte Anfärbung mit Trypanblau, durchgeführt.

### **1.5.2. Apoptose**

In höheren Organismen kann der Zelltod in zwei prinzipiell unterschiedlichen Formen auftreten: Apoptose und Nekrose (Cohen 1993a). Im Gegensatz zur Nekrose wird bei der Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird (Cohen 1993a und b, Sachs und Lotem 1993, Savill et al. 1993, Nelms et al. 1997, Simon 1997) von der Zelle selbst ein genetisches Programm aktiviert, das zum Tod dieser Zelle führt. Die Apoptose ist also ein wichtiger homöostatischer Mechanismus des Immunsystems und vieler anderer Systeme (Kerr et al. 1972, Cohen et al. 1992, Allen et al. 1993a und b, Steller 1995, Thompson 1995, Dibbert und Simon 1997). Eine Fehlfunktion bzw. Fehlregulation dieses Prozesses könnte eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl pathologischer Zustände, einschließlich der HIV-Infektion (Thompson et al. 1992, 2001, Cohen D. A. 1993, Cohen J. J. 1993c und d, Wyllie 1994, Wyllie et al. 1994, Martin und Green 1995a, Steller 1995, Thompson 1995, Bäumlner et al. 1996, Gougeon et al. 1996a, b und c, Dibbert und Simon 1997, Thompson und Yang 2000), spielen.

Bei der Apoptose kommt es zu morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle, die für den Apoptoseprozeß im Gegensatz zur Nekrose charakteristisch sind (Creutz 1992, Fadok et al. 1992a und b, 1993, Gorczyca et al. 1993a, Cohen 1993a, Martin und Green 1995b, Martin et al. 1995). Das Phänomen der Zellkernverletzung im frühen Stadium der Apoptose und die nachfolgende DNA-Fragmentierung kann als ein Hauptkennzeichen für den Ablauf eines solchen Prozesses gesehen werden (Nelms et al. 1997). Weitere für die Apoptose charakteristische Prozesse sind Veränderungen der Zellgröße und -granulation, Veränderungen der Plasmamembran und Membranpermeabilität, die Formation so genannter Apoptose-Körperchen („apoptotic bodies“) und die Modifikation der Zelloberfläche mit der „Ausstülpung“ von Phospholipiden (Duvall et al. 1985, Compton 1992, Creutz 1992, Fadok et al. 1992a und b, Martin et al. 1995, Vermes et al. 1995, Ramakrishnan et al. 1998).

Die folgende Abb. 3 soll schematisch die in-vivo Veränderung eines Lymphozyten in den verschiedenen Stadien der Apoptose veranschaulichen. Die Phagozytose in dieser Abbildung gehört in-vivo zu den frühen Stadien des Apoptosevorganges und kann außer von den „professionellen“ Phagozyten, den Makrophagen, auch von anderen Zellen, wie z.B. von Epithelzellen und Tumorzellen durchgeführt werden (Savill et al. 1993). Dadurch daß Freßzellen zerfallende Zellen schnell erkennen und beseitigen, wird eine Schädigung benachbarter Zellen und eine Entzündungsreaktion vermieden. Außerdem wird der Organismus vor möglichen bei der Apoptose aus der Zelle freigesetzten Substanzen geschützt.



**Abb. 2: In-vivo Veränderung eines Lymphozyten in den verschiedenen Stadien der Apoptose.** Die normale Zelle hat ein spärliches Zytoplasma und ein heterogenes nukleäres Chromatin, die den meisten Zellraum beanspruchen. Die Zelle verliert bereits an Volumen und das Chromatin beginnt sich zu klumpen und halbmondförmig entlang der Kernmembran anzulagern. Das endoplasmatische Retikulum, vereinfacht als ein Doppelstrich dargestellt, schwillt an. Die Zytoplasmamembran beginnt sich auszustülpfen und es kommt zur Abschnürung von Bläschen, den sog. „Apoptosekörperchen“. Das Zellvolumen nimmt weiter ab und das Chromatin im nun inzwischen aufgeteilten Kern lagert sich nun deutlich halbmondförmig an die entsprechende Kernmembran an. Am rechten Rand der apoptotischen Zelle ist ein Makrophage zu sehen, der beginnt die Zelle und ihre Fragmente zu umschließen, um sie zu phagozytieren.

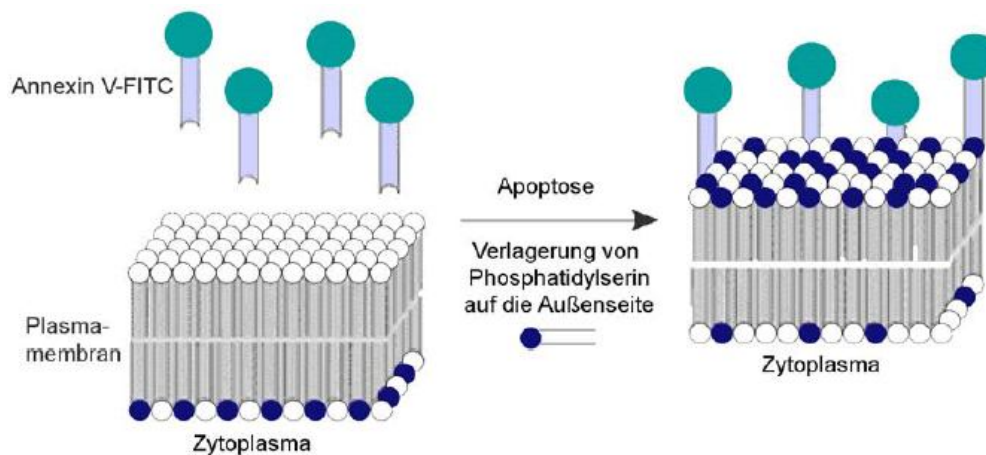
Zur Klärung der bei 2450 MHz und 24 h beobachteten Effekte an HL-60-Zellen muß die Möglichkeit einer Induktion von Apoptose geklärt werden. Es wird daher untersucht, ob ein apoptotischer oder nekrotischer Zelltod induziert wird. Es gibt eine Vielzahl von Methoden, Apoptoseprozesse in einzelnen Zellen aufzuzeigen (Darzynkiewicz et al. 1992, 2001, Afanasyev et al. 1993, Bryson et al. 1994, Otsuki et al. 2003). In dieser Arbeit werden dafür zwei Methoden verwendet, nämlich der Annexin V-Assay und der TUNEL-Assay. Dabei wird der Annexin V-Assay als Test zum Nachweis früher Apoptoseprozesse verwendet, während der TUNEL-Assay eher späte Apoptoseveränderungen nachweisen soll.

## **TUNEL-Assay**

Die Abkürzung TUNEL steht für Terminale Desoxyribosyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labelling (Mochizuki et al. 2003, Portera-Cailliau 1994, Sgonc und Wick 1994, Rojo und Gonzalez 1998). Er ist ein enzymatischer Assay und erlaubt eine schnelle phänotypische Identifizierung einzelner apoptotischer Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie, auf die weiter unten näher eingegangen wird (Gavrieli et al. 1992, Mochizuki et al. 2003, Portera-Cailliau 1994, Sgonc und Wick 1994). Weiterhin ist durch den TUNEL-Assay eine Unterscheidung von nekrotischen und apoptotischen Prozessen sowie eine Differenzierung von primären DNA-Strangbrüchen, wie sie z.B. durch zytotoxische Chemikalien oder energiereiche Strahlung verursacht werden, möglich (Gorczyca et al. 1993b). Die bei der Apoptose oben bereits erwähnte, typische, durch die Aktivierung kalzium- und magnesiumabhängiger Nukleasen zustande kommende Fragmentierung genomischer DNA führt zur Entstehung freier OH-Enden, die mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden detektiert werden können (Nelms et al. 1997). Die Reaktion wird durch endständige Desoxynucleotidtransferase (TdT) beschleunigt. Die zur Fluoreszenz gebrachte DNA kann qualitativ mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht und durch Durchflußzytometrie quantifiziert werden (Nelms et al. 1997).

## **Annexin V-Assay**

Die zweite in dieser Arbeit angewendete Methode zum Nachweis von Apoptoseprozessen ist der Annexin V-Assay. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose und die grobe Abgrenzung von frühen zu späten Apoptosevorgängen (Darzynkiewicz et al. 1992, Frey 1997, <http://www.zymed.com/products/33-xxxx/33-1200.html>). Annexin V ist ein Kalzium-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein (Andree et al. 1990). Es besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin, das sich normalerweise bei intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet. In frühen Apoptosestadien, wenn die Zellmembran noch intakt ist, verlagert sich das Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, wo es mit Annexin interagieren kann (Vermees et al. 1995, Mochizuki et al. 2003). In-vivo führt die Erkennung des Phosphatidylserin durch Phagozyten zu einer raschen Beseitigung der Zellen. Daher sind bei der Apoptose keine Anzeichen einer exsudativen Entzündung zu beobachten, wie sie beim nekrotischen Zelltod zu erwarten sind.



**Abb. 3: Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran während der Apoptoseinduktion. Quelle: Clontech [1996].**

Da nekrotische Zellen auf Grund des Verlustes der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden können und bei in-vitro-Versuchen nicht beseitigt werden, ist eine Differenzierung der apoptotischen von nekrotischen Zellen erforderlich. Hierfür eignen sich DNA-Farbstoffe wie beispielsweise Propidiumjodid (PJ), die nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen oder Zellen in sehr späten Apoptosestadien passieren können (<http://www.zymed.com/products/33-xxxx/33-1200.html>). Die simultane Anwendung von Annexin und Propidiumjodid ermöglicht so eine einfache Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen sowie eine grobe Einschätzung des Apoptosestadiums (Darzynkiewicz et al. 1992, Frey 1997, <http://www.zymed.com/products/33-xxxx/33-1200.html>).

### 1.5.3. Zellproliferation

Das Wachstumsverhalten bzw. die Verdopplungszeit von Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Beobachtung der Wirkung elektromagnetischer Felder.

Die Beeinflussung dieser stellt einen wesentlichen Eingriff in einen komplexen Vorgang dar, an dem viele Einzelvorgänge beteiligt sind (Fitzner 1995). Es ist allgemein bekannt, daß ihre Veränderungen und damit einhergehend bestimmte Mutationen in Genen und Chromosomen eine primäre Ursache für die Kanzerogenese darstellen. Mutationen entstehen meist nicht direkt, sondern erst als Reaktion der Zellen auf DNA-Schäden, die zur Reparatur der Schäden führt.

Ein verändertes Zellwachstum kann somit zu einer Veränderung des DNA-Reparatursystems und eine daraus folgende erhöhte Mutationsrate bewirken (Diener und Eberle 1995). Zum anderen kann eine Wachstumsveränderung zu umfassenden immunbiologischen Konsequenzen mit einer zellwachstumsfördernden Wirkung im Sinne einer

Promotion von Tumorzellen bei gleichzeitiger Schwächung immunkompetenter Abwehrzellen führen (Diener und Eberle 1995).

An den HL-60-Zellen in der Suspensionskultur läßt sich das Wachstumsverhalten relativ einfach überprüfen, indem die Vermehrungsrate mit und ohne Magnetfeldeffekte durch Bestimmung der Verdopplungszeit ermittelt wird (Fitzner et al. 1997).

#### **1.5.4. Zellzyklus**

Nicht nur Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen, sondern auch Veränderungen der Länge einzelner Zellzyklusstadien spielen in der Entstehung und „Fixierung“ von Mutationen eine erhebliche Rolle (Antonopoulos und Obe 1997a und b). Wird z. B. die G1-Phase im Zellzyklus, in der Reparaturvorgänge stattfinden, erheblich verkürzt, so können nicht alle Schäden repariert werden, und in der Folge kann es zur Krebsentstehung kommen (Antonopoulos und Obe 1997a und b).

Die Durchflußzytometrie (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom (Carter und Meyer in Ormerod 1994, siehe auch <http://flowcyt.salk.edu/sitelink.html>). Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren (Carter und Meyer in Ormerod 1994). Die Durchflußzytometrie ist eine ursprünglich in der Immunologie verwendete Methode, die heutzutage weit über immunologische Fragen hinaus für praktisch jeden zellulären Parameter, der sich in Fluoreszenzintensität ausdrücken läßt, verwendet werden kann (Carter und Meyer in Ormerod 1994). Sie wird zum Beispiel außer in der Diagnostik von Immundefekten auch zur Phänotypisierung von leukämischen Zellen bei der Routinediagnostik zur Klassifikation von Leukämien (Tatsumi 1993), im Rahmen von Phagozytenfunktionstests (Lehmann et al. 2000) bzw. im Test für die Erfassung der Qualität von Antikörper-Präparaten (Schaffner et al. 2003), bei Zytokinmessungen (Pala et al. 2000), bei der Darstellung der Zellkinetik (Lacombe und Belloc 1996, Darzynkiewicz et al. 2001) und, wie in dieser Arbeit, zur Darstellung fragmentierter Zellkerne im Rahmen von Apoptosetests angewandt (Ormerod in Ormerod 1994, Vermes et al. 2000, Ormerod 2001). Die Methode der Durchflußzytometrie beruht auf der Messung der Fluoreszenz von Einzelzellen und liefert somit Informationen auf Einzelzellebene. Die Aussage über die Gesamtpopulation der untersuchten Zellen wird aus der Summe der Einzelzellinformationen gebildet (Ormerod 1994). Voraussetzung dazu ist jedoch das Vorliegen



der gefärbten Zellen in Suspension.

## **1.6. Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klärung der Frage, ob mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) ein Einfluß hochfrequenter elektromagnetischer Felder, wie sie beispielsweise von handelsüblichen Mikrowellengeräten bei fehlerhafter Abschirmung emittiert werden, auf die genomische Struktur humaner Zellen nachweisbar ist. Zur Klärung dieser Frage sollen humane Promyelozytenleukämiezellen HL-60 24 Stunden lang in einer GTEM-Zelle unter standardisierten Bedingungen hochfrequenten elektromagnetischen Feldern von 2450 MHz bei einem SAR von ca. 1,114 W/kg ausgesetzt und anschließend untersucht werden. Die im elektromagnetischen Feld exponierten Zellen sollen dabei mit ansonsten methodisch identischen Kontrollen ohne Hochfrequenzexposition verglichen werden.

Die Auswertung des Comet-Assays erfolgt unter Verwendung eines automatisierten Bildanalyse-Programms, wobei die Parameter Tail length, Olive Tail Moment, Tail Extent Moment und Tail-DNA bestimmt werden sollen. Zusätzlich erfolgt für die EMF-exponierten und die nicht-EMF-exponierten HL-60-Zellen eine visuelle Auswertung nach der Vorlage von Anderson et al. (1994).

Neben der Untersuchung der Genomintegrität der Zellen sollen auch weitere Effekte, die in unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang mit der Exposition gegenüber Elektromagnetfeldern auftreten können, näher betrachtet werden. Dazu gehören Veränderungen der Vitalität der Zellen (untersucht mittels des Trypanblauexklusionstest), Apoptoseprozesse (untersucht mittels des TUNEL- und Annexin V-Assay), Störungen des Wachstumsverhaltens bzw. der Zellproliferation (untersucht mittels der Bestimmung der Verdoppelungszeit) sowie Veränderungen des Zellzyklus (untersucht mittels der Durchflußzytometrie).

Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, ob ein gefundener DNA-Schaden zu einer Änderung des Wachstumsverhaltens von bereits transformierten menschlichen Tumorzellen führt und ob damit eine Kanzerogenität des einwirkenden physikalischen Agens in diesem hochspeziellen Zellsystem nachzuweisen ist. Aus dem Nachweis eines möglichen Potentials hochfrequenter Felder, DNA-Strangbrüche zu induzieren, welche Mutationen und damit potentiell Krebs verursachen können, würden sich weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Gentoxizität unter umweltrelevanten Bedingungen herleiten. Diese Arbeit möchte dazu beitragen, die zugrunde liegenden Phänomene der Wirkungen schwacher EMF auf biologische Systeme aufzuklären.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Chemikalien und Geräte**

#### **2.1.1. Chemikalien**

Aceton reinst, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland;

Agarose zur DNA/RNA-Elektrophorese für die Molekularbiologie, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Agarose. Low Melting Point für die Molekularbiologie, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Aqua Spüllösung, Wasser für Injektionszwecke, Delta Pharma, Pfullingen, Germany

Camptothecin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei zur Analyse, Korngröße ~ 0,2 - 1 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland

EDTA (Triplex) für die Molekularbiologie, Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol absolut, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland

Ethidiumbromid, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –30% ige Lösung (entspricht 10mM als Ausgangslösung)

Kaliumdihydrogenphosphat für die Molekularbiologie, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumchlorid zur Analyse, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumhydroxid-Plätzchen zur Analyse, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumchlorid für die Molekularbiologie, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumlauroylsarkosinatkonzentrat 20 % für die Biochromatographie, Merck, Darmstadt, Deutschland

Propidiumjodid, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

RNase, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Salzsäure 25 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Triton X 100 (t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol) für die Molekularbiologie, Merck, Darmstadt, Deutschland

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (THAM, Pufferan, Tris-Puffer), Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

## 2.1.2. Materialien und Lösungen zur Mikrogelelektrophorese (Comet-Assay)

### *Stammlösungen*

<b>PBS pH 7,4</b>	NaCl	8 g (136,9 mM)
	KCl	0,2 g (2,7 mM)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4 g (7,9 mM)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g (1,5 mM)
Salze in 1000 ml bidest. Wasser lösen, autoklavieren und Lösung bei 4 °C lagern		

<b>Lyse Lösung pH 10,0</b>	NaCl	146,1 g (2,8 M)
	EDTA	37,2 g (143 mM)
	Tris-Puffer	1,2 g (8,5 mM)
	NaOH	12 g (337 mM)
Substanzen zunächst in 700 ml bidest. Wasser lösen. Nach vollständiger Lösung 50 ml 20%iges Lauroylsarkosinatkonzentrat dazugeben, mit HCl pH 10,0 einstellen und anschließend mit bidest. Wasser auf 890 ml auffüllen. Die Lyse-Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert. Bilden sich bei der Lagerung weiße Kristalle aus, so muß die Lösung auf 40 °C erhitzt werden, bis sich diese lösen.		

<b>EDTA-Lösung pH 10,0</b>	200 mM
7,44 g EDTA in ca. 60 ml bidest. Wasser lösen, mit 5 M NaOH pH 10,0 einstellen und anschließend auf 100 ml auffüllen. Die EDTA-Lösung wird bei 4 °C gelagert.	

<b>NaOH-Lösung</b>	5 mM
200 g NaOH in 100 ml bidest. Wasser lösen und bei Raumtemperatur lagern.	

<b>NaOH-Lösung</b>	300 mM
7,2 g NaOH in 600 ml bidest. Wasser lösen und bei Raumtemperatur lagern.	

<b>Neutralisationspuffer pH 7,5</b>	Tris-Puffer	24,2 g (0,4 M)
in 450 ml bidest. Wasser lösen, mit HCl pH 7,5 einstellen und auf 500 ml auffüllen. Der Neutralisationspuffer wird gebrauchsfertig bei 4 °C gelagert.		

<b>Färbe-Lösung</b>	Ethidiumbromid- Lösung 1 %	10 mg/ml
Ethidiumbromid-Stammlösung im Dunkeln bei 4 °C lagern.		

### **Gebrauchslösungen**

<b>Normal Melting Agarose (N-Agarose) 0,65%</b>	
0,065g mit einer Feinwaage abwiegen, anschließend 10 ml PBS (siehe Stammlösungen) dazugeben und durch Erwärmen (Mikrowelle) und Schütteln vollständig lösen, so daß eine klare Flüssigkeit entsteht. Dabei darf die Agarose nicht zu sehr erhitzt werden, da sie ansonsten denaturiert.	

<b>Low Melting Agarose (LMP-Agarose) 0,5%</b>	
0,005 g mit einer Feinwaage abwiegen, anschließend 10 ml PBS (siehe Stammlösungen) dazugeben und durch Erwärmen (Mikrowelle) und Schütteln vollständig lösen, so daß eine klare Flüssigkeit entsteht. Auch hier darf die Agarose nicht zu sehr erhitzt werden, um eine Denaturierung zu verhindern. Sowohl die N-Agarose als auch die LMP-Agarose werden vor dem Gebrauch immer frisch hergestellt.	

<b>Endgültige Lyse-Lösung</b>	Lyse-Stammlösung (siehe vorne)	89 %
	DMSO	10 %
	Triton X 100	1 %
Lösungen in einem Färbeglas zu einem Endvolumen von 100 ml in obigem Verhältnis mischen und ca. 1 h vor Gebrauch bei 4 °C lagern. Es ist wichtig, die endgültige Lyse-Lösung immer frisch herzustellen, da die Lösung sonst ausflockt.		

<b>Elektrophorese-Puffer</b>	300 mM NaOH	250 ml
	200 mM EDTA	1,25 ml
Lösungen mischen und ca. 45 - 60 Minuten vor Gebrauch bei 4 °C kühl lagern. Auch der Elektrophorese-Puffer wird immer frisch hergestellt.		

<b>Neutralisationspuffer</b>	
Der Neutralisationspuffer (siehe Stammlösungen) wird am Versuchstag gebrauchsfertig aus dem Kühlschrank genommen.	

<b>Färbe-Lösung</b>	Ethidiumbromid-Stammlösung 1 %
vor Gebrauch mit bidest. Wasser 1:2.500 verdünnen = 4 µg/ml. Gebrauchslösung anschließend in kleine Eppendorf-Röhrchen aliquotieren und im Dunkeln bei 4 °C lagern.	

### **2.1.3. Lösungen zur Zellkultur (Medien und Zusatzlösungen)**

#### ***Zellkultivierung***

FKS (Fötales Kälberserum) bei 56 °C 30 Minuten lang hitze-inaktivieren und portioniert bei -18 °C einfrieren, Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Hepes Puffer 1M, GIBCO BRL Produkte für die Zellkultur, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland

PBS-Waschpuffer, Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Magnesium und Calcium, bei 4 °C aufbewahren, GIBCO BRL Produkte für die Zellkultur, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Penicillin/Streptomycin, 10.000/E/10.000 µg/ml, lyophilisiert, mit 5 ml sterilem Aqua bidest. rekonstituieren, Biochrom KG, Berlin, Deutschland

RPMI-1640 Medium, mit Glutamax™, GIBCO BRL Produkte für die Zellkultur, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland

### **2.1.4. Testkits und Sonstiges**

#### **2.1.4.1. Reagenzien für den Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung**

Trypanblau-Lösung 0,4 %, GIBCO BRL Produkte für die Zellkultur, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland

#### **2.1.4.2. Reagenzien für den Mykoplasmentest**

Mycoplasma Detection Kit, Enzym-Immunoassay für den Nachweis von Mykoplasmen/Acholeplasmen (M. arginini, M. hyorhinitis, A. laidlawii, M. orale), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland.

Der Kit enthält:

- 1a-d. Wand-Antikörper (lyophilisiert; nach Rekonstitution gebrauchsfertige Lösung)
  - 1a. Anti-M. arginini
  - 1b. Anti-M. hyorhinois
  - 1c. Anti-A. laidlawii
  - 1d. Anti-M. orale
2. Blockierungslösung (gebrauchsfertig)
3. Wasch-Puffer (10-fach; nach Verdünnung gebrauchsfertig)
4. Proben-Puffer (gebrauchsfertig)
5. Kontroll-Lösung (lyophilisiert; nach Rekonstitution gebrauchsfertige Lösung)
- 6a-d. Detektions-Antikörper (lyophilisiert; nach Rekonstitution gebrauchsfertige Lösung)
  - 6a. Anti-M. arginini-Biotin
  - 6b. Anti-M. hyorhinois-Biotin
  - 6c. Anti-A. laidlawii-Biotin
  - 6d. Anti-M. orale-Biotin
7. Streptavidin - alkalische Phosphatase (gebrauchsfertig)
8. Substrat-Puffer (gebrauchsfertig)
9. Substrat-Tabletten

Die rekonstituierten Lösungen sind bei 4 °C gelagert 2 Monate stabil.

### **2.1.4.3. Reagenzien zur Apoptosetestung mittels TUNEL-Assay und Annexin V-Assay**

#### **a) TUNEL-Assay:**

TUNEL-Reaction-Mixture, Roche, Mannheim, Deutschland

PBS (siehe 2.1.2)

Paraformaldehyd als Fixationslösung: 4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4

Propidiumjodid-Stammlösung: 50 µg/ml Propidiumjodid in PBS

Camptothecin: a) Stammlösung 2 mg/ml (in DMSO)

b) Gebrauchslösung 2 µg/ ml (in Zellkulturmedium)



## **b) Annexin V-Assay:**

Annexin binding buffer (bei 4 °C lagern), Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Annexin V-FITC Reagenz (bei 4 °C lagern), Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland

PBS (siehe 2.1.2)

Propidiumjodid-Stammlösung: 50 µg/ml Propidiumjodid in PBS

Camptothecin: a) Stammlösung 2 mg/ml (in DMSO)

b) Gebrauchslösung 2 µg/ml (in Zellkulturmedium)

## **2.1.5. Geräte**

Analysenwaage, mechanisch, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Blue Max <sup>TM</sup>Jr. Konisches Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml), steril, aus Polypropylen, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Digital Thermometer, Modell 4200, Abbott Diagnostika GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Durchflußzytometer, Elite XL-4-Color, Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA

Elektrophoresekammer PHERO-sub, BIOTEC-FISCHER GmbH, Reiskirchen, Deutschland

Elisa-Reader (=Microplate-Reader), Spectra Max 340 PC mit zugehöriger Software Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA

Eppendorf Mikropipetten (50, 100 und 200 µl), Netheler und Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Reference fix Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Standardtips Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C mit Rotor (5402 oder AF01; F-45-18-11), Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Eppendorf-Zentrifuge mit Mikroplattenrotor, Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Axioplan, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Olympus Bx 60 mit Bx-TFC1 Filter (40er Objektiv) zusammen mit Colorview 12 Camera + analySIS-Software zur digitalen Bilderfassung, Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland

Glas-Pipetten, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Heraeus Labor-Umlufttrockenschrank, Heraeus Instruments GmbH, Produktbereich Thermotech, Hanau, Deutschland

Heraeus Megafuge 2.0 mit Rotor (klein: HFA 15.2 oder 3041, groß 8155 mit 8160 E Einsätzen), Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

Heraeus Wärmeschrank Typ UT 6, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

Inverses Mikroskop Telaval 31, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland

Laborgläser single frosted, Deckglaszuschneiderei Renate Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

Laborwaage, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Magnetomix Magnetstabrührer, Colora Meßtechnik GmbH, Lorch, Deutschland

Mikrotiterplatten,  $\gamma$ -Strahlen behandelt, 96 Näpfe mit je ca. 300  $\mu$ l, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Mikrowelle „Optiquick“, Moulinex, Samou GmbH, Radolfzell, Deutschland

Mikrowellenofen: Micro and Browner, Panasonic Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

neoLab Aufbewahrungsboxen für Vials (103×130×45 mm)

neoLab Multi-Rack, 40 Stellplätze

neoLab Röhrchengestelle neoRack 4 × 4

neoLab Laborflaschen aus Duranglas (50 ml - 200 ml)

neoLab Laborspezialprodukte, Heidelberg, Germany

Neubauer Zählkammer, Brand GmbH & Co., Wertheim, Deutschland

PCR Tubes 0,2 ml, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

Petrischalen, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland

pH-/Ionen-Meter PHM 240 und Pufferlösung pH 4,01; 7,0; 10,0; MeterLab Produkte,

Radiometer Copenhagen, Radiometer Analytical S.A., Villeurbanne CEDEX-Lyon, France

Pipettboy Pipettierhilfe, Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland

Power Pac 300 Power Supply, Bio-Rad, München, Deutschland

Reaktionsgefäße (Microcentrifuge Tubes) 1,5 ml, Brand GmbH & Co., Wertheim, Deutschland

Rundbodenröhrchen (14 ml), steril, aus Polystyrol, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Schüttler, Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Standard Power Pac P25, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland

Sterilfilter Qualilab, Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Darmstadt, Deutschland

Wasserbad Typ 3043, Köttermann, Hänigsen, Deutschland

Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe 250, 750 ml, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe 40, 160 ml, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland

## **2.2. Kultivierung humaner HL-60-Zellen**

### **2.2.1. HL-60-Zellen als in-vitro-Testsystem**

Die in den Versuchen untersuchten HL-60-Zellen stammen aus der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (ATCC, Rockville, MD, USA). Ursprünglich wurden diese Zellen von einer 36-jährigen Nordamerikanerin, die an einer akuten myeloischen Leukämie

erkrankt war, entnommen (Collins et al. 1977, 1978, 1980, Gallagher et al. 1979, Newburger et al. 1979, Collins 1987). Diese Zellen sind in ihrer Entwicklung von der pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks auf der Stufe der Promyelozyten stehen geblieben (Collins et al. 1978, Gallagher et al. 1979). Lediglich 10 % der in Kultur gehaltenen HL-60-Zellen sind zu einer Differenzierung zu funktionstüchtigen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen fähig (Collins et al. 1978, 1979, 1980, Collins 1987, Chang 1990, Ahmed et al. 1991). Mit steigender Anzahl an Zellpassagen sinkt jedoch die Quote spontaner Zelldifferenzierung bei den in Suspensionskultur wachsenden HL-60-Zellen (Gallagher et al. 1979).

### **2.2.2. Kulturbedingungen**

Die Kultivierung der HL-60-Zellen erfolgt in flüssiger Nährlösung aus 500 ml RPMI 1640 Medium mit Glutamax, 50 ml fötalem Kälberserum (=10 %), 5 ml 1M Hepes-Puffer sowie 5 ml Penicillin/Streptomycin, welches steril-filtriert hinzugegeben wird. Das fötale Kälberserum wird nach 56 °C und 30 Minuten Hitzeinaktivierung in kleinen Aliquots bei -18 °C im Tiefkühlfach aufbewahrt und nach Bedarf aufgetaut (im Wasserbad oder bei Zimmertemperatur). Kultiviert werden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Kulturflaschen mit membranhaltigen Schraubverschlüssen, die einen Gasaustausch der Zellen erlauben.

Um eine Zelldichte von annähernd 0,5 – 1×10<sup>6</sup> Zellen/ml zu halten, werden die HL-60-Zellen alle 2 - 3 Tage mit frischem Medium passagiert (1:3 oder 1:4). Vor jeder Zellpassage wird die Zellkultur unter einem Mikroskop in Hinblick auf Wachstum und Morphologie beurteilt und auf etwaige Verunreinigungen oder Kontamination geprüft.

### **2.2.3. Steriles Arbeiten**

Alle Schritte der Zellkultur müssen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden, um Verunreinigungen von außen oder eine Kontamination durch Mikroorganismen zu verhindern. Dabei ist besonders auf Viren, Pilze und vor allem Prokaryonten wie Mykoplasmen zu achten. Es seien hier dazu kurz einige generelle Maßnahmen angeführt, die in dieser Arbeit beachtet wurden. Die sterilen Arbeitsschritte wurden in einem Reinraumarbeitsplatz (Sterilbank) durchgeführt. Der Brutschrank für die Zellinkubation wurde regelmäßig desinfiziert. Beim Herausnehmen der Zellen waren Türen und Fenster im Arbeitsraum geschlossen, um extreme Luftzirkulationen zu vermeiden. Lösungen, Medien und Materialien waren steril. Nicht steril gelieferte Materialien und Lösungen wurden autoklaviert oder steril-filtriert. Es wurde auf die korrekte Lagerung und auf etwaige Verfallsdaten bei den Substanzen geachtet. Das

Zellkulturmedium wurde nach frischer Herstellung als „Sterilprobe“ einige Tage im Wärmeschrank inkubiert. Nur wenn das Medium keinen Farbumschlag und auch keine Trübung zeigte, konnte es für die Zellen verwendet werden. Die Zellkulturflaschen wurden in regelmäßigen Abständen gewechselt (alle 4 - 5 Tage). Einmal in der Woche und je nach Zustand der Zellen erfolgte eine Zentrifugierung und komplette Neuaufnahme der Zellen in frischem Medium. Ferner wurden die Zellen vor jeder Zellpassage unter dem Mikroskop betrachtet und bezüglich ihrer Vitalität beurteilt. Zudem erfolgte unmittelbar vor den Versuchen und weiterhin in regelmäßigen Abständen ein Vitalitätstest (siehe unten).

Alle 1 - 2 Monate wurde ein Mykoplasmen-Test, auf den nachfolgend noch näher eingegangen wird, durchgeführt.

#### **2.2.4. Mykoplasmen-Test**

Mykoplasmen sind prokaryotische Zellen, die bei einer Kontamination von Zellkulturen zu Veränderungen des Wachstums, des Stoffwechsels, der Morphologie und der Lebensfähigkeit der Zellen führen, so daß Experimente mit Zellkulturen unzuverlässig werden können (Barile et al. 1978, McGarrity und Carson 1982, McGarrity 1984, McGarrity et al. 1984, Kotani und McGarrity 1986, McGarrity und Kotani 1986, Bölske 1988). Verunreinigungen durch Mykoplasmen können lange Zeit unbemerkt bleiben, da sie auch mikroskopisch nicht unbedingt zu sichtbaren Veränderungen führen. Weil kontaminierte Zellkulturen bei Versuchen zu unzuverlässigen Ergebnissen führen können, ist die regelmäßige Suche nach Mykoplasmen unerlässlich (Hay et al. 1989, Tully 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu ein Enzym-Immunoassay, der Mycoplasma Detection Kit von Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland, gewählt, der den Nachweis der häufigsten Mykoplasmen/Acholeplasmen erlaubt. Diese sind *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini* und *A. laidlawii*. Im Kit sind gegen die jeweilige Mykoplasmen-/Acholeplasmen-Art polyklonale Antikörper enthalten, welche getrennt in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben werden und dort als Wand-Antikörper haften bleiben. Durch Zugabe von Blockierungslösung werden unspezifische Bindungsstellen der Antikörper abgesättigt. Danach erfolgen zwischen allen weiteren Schritten Waschvorgänge, wobei anschließend auf eine sorgfältige Entfernung des Waschpuffers zu achten ist. Nun werden in die Mikrotiterplattennäpfe die Probe (Zellsuspension mit Probenpuffer gemischt), die Positivkontrolle (Kontroll-Lösung mit Waschpuffer gemischt) und die Negativkontrolle (Medium oder Waschpuffer mit Probenpuffer gemischt) gefüllt.

Befinden sich Mykoplasmen oder deren Fragmente in der Zellsuspension, so binden sie als

Antigen an die Wand-Antikörper. Im folgenden Schritt heftet sich an das wandfixierte Antigen ein mit Biotin gekoppelter Antikörper (Detektions-Antikörper). An das Biotin wiederum bindet die Streptavidin-alkalische Phosphatase, die das im letzten Schritt hinzugegebene 4-Nitrophenylphosphat (Substrat-Lösung aus Substrat-tablette in Substratpuffer gelöst) durch eine enzymatische Reaktion umsetzt und somit sichtbar wird.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe eines Microplate-Readers bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen Substratlösung.

Bei der Positivkontrolle kommt es zu einem gelben Farbumschlag, während die Negativkontrolle farblos bleibt. Der Probenbereich wird mit diesen beiden verglichen, wobei die Grenzen zu positivem bzw. negativem Ergebnis laborintern festgelegt werden. Der Test wurde nach dem Hersteller-Protokoll durchgeführt:

Vor der Durchführung des Tests müssen alle Reagenzien Raumtemperatur (18-25 °C) erreicht haben. Testdauer: 1 Tag mit einer Inkubation über Nacht.

Je 0,25 ml der Wand-Antikörper-Lösung in je 4 Näpfe einer Mikrotiterplatte pipettieren. Mikrotiterplatte dicht abdecken und 2 h bei 37 °C inkubieren. Die Lösung aus den Näpfen der Mikrotiterplatte durch Absaugen und Ausklopfen auf ein sauberes, trockenes Tuch (z.B. Zellstoff) sorgfältig entfernen; 0,25 ml Blockierungs-Lösung in alle mit Antikörper beschichteten Näpfe pipettieren und 30 min bei 37 °C inkubieren. Die Lösung aus den Näpfen der Mikrotiterplatte durch Absaugen und Ausklopfen auf ein sauberes, trockenes Tuch sorgfältig entfernen; Näpfe 3 x mit Wasch-Puffer-Lösung spülen und anschließend Wasch-Puffer sorgfältig entfernen. 0,2 ml der vorbereiteten Probe in jede der „Probennäpfe“ pipettieren; 0,2 ml der Negativkontrolle bzw. der Positivkontrolle in die jeweiligen Kontrollnäpfe pipettieren; Mikrotiterplatte dicht abdecken und über Nacht bei 4 °C inkubieren. Erneut waschen. 0,2 ml der Detektions-Antikörper-Lösung in die vier korrespondierenden Näpfe pipettieren; Mikrotiterplatte dicht abdecken und 2 h bei 37 °C inkubieren. Es erfolgt ein nochmaliger Waschvorgang. 0,2 ml Streptavidin-AP-Lösung in jeden der 16 Näpfe pipettieren; Mikrotiterplatte dicht abdecken und 1 h bei 37 °C inkubieren. Erneut waschen. 0,2 ml Substrat-Lösung in jeden der 16 Näpfe pipettieren und 1 h bei 18-25°C inkubieren. Zur Auswertung Proben gegen Substrat-Lösung mit einem Microplate-Reader bei 405 nm messen oder visuell auswerten.

## **2.3. Befeldungsanlage, Versuchsdurchführung und Vitalitätsmessung**

### **2.3.1. Befeldungsanlage**

#### **2.3.1.1. Auswahlkriterien für die GTEM-Zelle**

Für die Hochfrequenzexposition der Zellproben wird eine GTEM-Zelle (=Gigahertz-Transversal-Electro-Magnetic-Zelle) verwandt.

Die Geschichte dieser für die Untersuchung elektromagnetischer Verträglichkeit heute wichtigen Meßeinrichtung geht auf klassische Feldtestverfahren zur Messung der Störfestigkeit und Störmessung elektronischer Systeme zurück. So wurde aus offenen, einfachen Wellenleiterstrukturen, wie z.B. der Streifenleiteranordnung oder Stripline-Anordnung, die geschirmte TEM-Zelle und schließlich die auch für höhere elektromagnetische Frequenzen geeignete GTEM-Zelle entwickelt.<sup>1</sup> Charakteristisch für alle diese Wellenleiterstrukturen ist die Ausbreitung der Wellen im sog. TEM-Mode (Transversal Electro-Magnetic), bei der das elektrische und magnetische Feld senkrecht aufeinander stehen und diese wiederum im rechten Winkel zur Ausbreitungsrichtung der Welle. Durch diese Strukturen ist somit eine Wellenausbreitung möglich, die annähernd homogene Feldverteilungen, vergleichbar denen in der natürlichen Umwelt, gewährleistet (Neibig 1997). Die TEM-Zelle und die GTEM-Zelle stellen koaxiale Wellenleiter mit rechteckförmigem Querschnitt dar, die an beiden oder auch nur an einem Ende (GTEM-Zelle) trichterförmig in koaxiale Kabelsysteme übergehen (Neibig 1997). Die Entwicklung dieser Felderzeuger brachte viele Vorteile mit sich: Da beide geschirmte Räume darstellen, sind sie für Störfestigkeitsuntersuchungen, aber auch für Befeldungsuntersuchungen - wie in dieser Arbeit - gut geeignet. Einerseits kommt es nämlich zu keiner Beeinflussung durch elektromagnetische Wellen aus der Umgebung; andererseits wird umgekehrt bei der Simulation von Pulsfeldern eine Abstrahlung nach außen und somit eine störende Beeinflussung der Meßgeräte verhindert (Neibig 1997). Außerdem ist die Messung elektromagnetischer Felder und ihrer Wirkung in weiten Frequenzbereichen möglich, und es können mit gängigen Speiseleistungen ausreichende Feldstärkewerte erreicht werden (Neibig 1997).

---

<sup>1</sup> Die GTEM-Zelle ist eine Entwicklung der Firma Asea Brown Boverie, Schweiz. Sie wird in Lizenz von folgenden Herstellern produziert und vertrieben: EMCO, Austin, USA; Rayproof, London, UK; Meßelektronik Berlin, Deutschland; ELENA, Tokyo, Japan.

Während die TEM-Zelle nur im tiefen Frequenzbereich keine Einschränkungen besitzt, konnte bei der GTEM-Zelle durch eine Kombination aus Widerständen mit Mikrowellenabsorbern im Abschlussteil der Grenzfrequenzbereich zusätzlich noch in den hohen Gigahertzbereich verschoben werden (Neibig 1997). Dabei wirken in den tiefen Frequenzbereichen (<80 MHz) die konzentrierten Widerstände reflexionsmindernd, während im hohen Frequenzbereich (>80 MHz) die Absorber zum Tragen kommen. Etwaige Feldstörungen und -inhomogenitäten werden somit allein durch die Konstruktion der GTEM-Zelle vermieden bzw. minimal gehalten (Neibig 1997). Alle hier exemplarisch aufgeführten Aspekte, haben zur Wahl der GTEM-Zelle für die Expositionsversuche geführt.

### **2.3.1.2. GTEM-Zelle und Hochfrequenzbefeldung**

Die GTEM-Zelle (Hersteller EMCO, USA, Modell 5302) als Feldgenerator wurde vom Forschungsverbund „EMV Biologischer Systeme“, TU Braunschweig, zur Verfügung gestellt. Als Signalquelle dient ein Signalgenerator vom Typ SME 03 (Rohde & Schwarz), dem ein Bandverstärker zur Erhöhung der Ausgangsleistung für die gewünschte Frequenz nachgeschaltet ist. Da der Signalgenerator nicht pulsmulierbar ist, wurde zudem zwischen Signalgenerator und Leistungsverstärker ein Pulsmodulator eingebaut (Fitzner et al. 1997). In der GTEM-Zelle befindet sich eine Hochfrequenz-(HF)-Detektordiode, die die Spannungsschwankungen in der GTEM-Zelle mißt (Fitzner et al. 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit werden HL-60-Zellen 24 Stunden lang 2450 MHz, d.h. Ultraschallhochfrequenzen im Mikrowellenbereich, ausgesetzt. Dabei beträgt die in die GTEM-Zelle eingespeiste Leistung 8,5 Watt, was einem SAR-Wert (Specific Absorbed Rate) von ca. 1114 mW/kg entspricht. Die spezifische Absorptionsrate SAR ist als die in Wärme umgewandelte Strahlungsenergie bezogen auf die Maße des betrachteten Körpers definiert (Neibig 1997). Sie wird häufig als dosimetrische Größe zur quantitativen Beschreibung biologischer Effekte bei Einwirkung von Hochfrequenzstrahlung mit Frequenzen über 10 MHz verwendet (Leitgeb 1991, Baumann 1992, Nitz 1994, Polk 1996). Die vom HF-Detektor angegebene Spannung befindet sich beim Befeldungsversuch ungefähr im Bereich von 570 - 600 mV. Die zu untersuchenden Zellen werden über die gesamte Versuchsdauer hinweg in Röhren mit Nährmedium belassen. Diese Röhren werden in einen Acrylglas-Probenhalter eingesetzt, der an ein Ölthermostatsystem angeschlossen ist. Durch einen Weißölkreislauf, der mit Hilfe von Schlauchsystemen um die Röhren geleitet und durch einen Badthermostaten (Typ Haake F 3-S) umgewälzt wird, kann eine homogene Temperatur von 37 °C ( $\pm 0,1$  °C)



gewährleistet werden (Fitzner et al. 1997). Eine Überwärmung des Systems wird wiederum durch ein zwischengeschaltetes Kühlaggregat verhindert. Die Probenhalter werden auf einem Styropor-Ständer schräg im Winkel von 45° gelagert und sind mit Temperatursensoren versehen, die eine Kontrolle der Temperaturkonstanz erlauben. Dazu sind Temperaturanzeigen an jedem Ölkreislaufsystem angebracht. Zusätzlich werden die Temperaturdaten wie auch die Daten der HF-Detektor-Diode fortlaufend durch einen angeschlossenen PC erfaßt und ausgewertet. Aus sekundlich eingehenden Daten wird nach jedem Minutenwechsel der Mittelwert gebildet, welcher auf Festplatte und anschließend auf Diskette festgehalten wird.



**Abb. 4: GTEM-Zelle (Hersteller EMCO, USA, Modell 5302) als Feldgenerator in der Gesamtansicht (links). Detailaufnahme der Acrylprobenhalter mit den Versuchsröhrchen in der GTEM-Zelle (rechts).** Die GTEM-Zelle wurde vom Forschungsverbund „EMV Biologischer Systeme“, TU Braunschweig, zur Verfügung gestellt.

### 2.3.1.3. Hochfrequenz-Abschirmbox und Kontrolluntersuchung

Zur Kontrolle gegenüber den befeldeten Zellen werden Zelleröhrchen in einem wie in der GTEM-Zelle identisch gebauten Acrylprobenhalter in einer Hochfrequenz-Abschirmbox (HF-Box bzw. Kontrollbox) im Winkel von 45° gelagert. Entsprechend den befeldeten Zellen werden auch die Kontrollröhrchen in der HF-Abschirmbox mit Weißöl umflossen, und es erfolgt auch hier durch die Temperatursensoren bzw. die daran angeschlossene Temperaturanzeige eine ständige Temperaturkontrolle. Auf diese Weise werden den unbefeldeten Zellen die gleichen konstanten Temperaturbedingungen von 37 °C ( $\pm 0,1$  °C) wie den befeldeten Zellen gewährleistet. Durch die Kontrollbox sind die Zellen nicht nur vor der Einwirkung von Elektromagnetwellen, sondern auch vor jeglichem Lichteinfall, welches das Versuchsergebnis beeinflussen könnte, geschützt.



**Abb. 5: Hochfrequenz-Abschirmbox (HF-Box bzw. Kontrollbox) in der Gesamtansicht (links). Detailaufnahmen der Acrylprobenhalter mit den Versuchsröhrchen in der Hochfrequenz-Abschirmbox (rechts).** Die Hochfrequenz-Abschirmbox wurde vom Forschungsverbund „EMV Biologischer Systeme“, TU Braunschweig, zur Verfügung gestellt.

### 2.3.2. Versuchsdurchführung

Da eine geeignete Positivkontrolle für die o.g. Befeldungsversuche, die im Jahr 1999 durchgeführt wurden, fehlte, erfolgen drei neue Versuchsreihen im Jahr 2002, bei denen als Kontrolle eine Behandlung der Zellen mit  $H_2O_2$  vorgenommen wird.

Die Textausschnitte, die sich im Originaltext auf die mit  $H_2O_2$  behandelten HL-60-Zellen beziehen, werden in dieser korrigierten Textversion getrennt in einem gesonderten Abschnitt (2.5.) behandelt.

Die Versuchsanordnung zur EMF-Exposition besteht aus einer GTEM-Zelle (Modell 5302, Hersteller EMCO, USA), einem Signalgenerator (Typ SME 03, Rhode & Schwarz, Deutschland) und Bandverstärkern für den Frequenzbereich von 900 MHz und 1,8 GHz. Ein Thermostat hält eine konstante Temperatur von  $37\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$  aufrecht. Die Proben werden dem Hochfrequenzfeld 24 h lang ausgesetzt. Für die In-vitro-Untersuchungen werden menschliche Promyelozytenleukämiezellen HL-60 benutzt. Die Zellen werden in einem RPMI 1640 Medium gezüchtet.

#### a) Vorwärmen der Befeldungsanlage

Da von Anfang an über die gesamte Versuchsdauer eine konstante Temperatur von 37 °C in den Weißölkreisläufen herrschen sollte, müssen die Temperaturkreisläufe mindestens 1 – 2 h vor Versuchsbeginn eingeschaltet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses bereits 24 h vor Versuchsbeginn gemacht. Während dieser „Anwärmungszeit“ stehen für die Probenhalter statt der Röhren mit Zellsuspension Dummy-Röhren, die mit Medium gefüllt werden, zur Verfügung.

#### b) Zellvorbereitung und Befeldungsversuch

Die Versuche mit den HL-60-Zellen werden immer bei einer konstanten Zellkonzentration („Ausgangskonzentration“) von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml durchgeführt; das entspricht bei 4ml pro Röhren ungefähr einer Zellzahl von 200.000 Zellen pro Röhren. Dazu werden die Zellen zunächst in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit frischem Medium auf die nötige Zelldichte eingestellt.

Für die Fragestellung der Wirkung elektromagnetischer Felder auf HL-60-Zellen werden insgesamt 12 Röhren mit jeweils 4ml und  $5 \times 10^4$  Zellen/ml verwendet.

5 Röhren mit jeweils 4 ml Zellsuspension werden in die GTEM-Zelle gestellt und 24 h lang einem elektromagnetischen Feld mit 2450 MHz ausgesetzt. Die Zellen des 1. Röhrens werden nach der 24 h Befeldung zur Erfassung eventueller genotoxischer Effekte von Elektromagnetfeldern auf Zellen dem Comet-Assay zugeführt.

Die Zellen der anderen 4 Röhren werden nach der Befeldung zur Klärung der Frage eventueller Apoptoseinduktion durch elektromagnetische Felder im TUNEL- und im Annexin V-Assay bearbeitet. Als Positivkontrolle hierzu wurden 2 der 4 Röhren für 3h mit 0,5 µg/ml Camptothecin, einem Apoptose-Induktor, inkubiert und danach aufgearbeitet.

Als Kontrolle und zum Vergleich zu den befeldeten Zellen kommen für die gleiche Zeitspanne des Befeldungsversuchs jeweils 6 Röhren mit je 4 ml Zellsuspension in die HF-Abschirmbox. Diese Zellen werden als „Kontrollzellen“ bezeichnet. Sie werden nach dem Experiment ebenfalls den oben genannten Assays zugeführt.

Außerdem werden allen EMF-exponierten und nicht-EMF-exponierten Zellröhren noch Aliquots zur Bestimmung eventueller zytotoxischer Effekte von Elektromagnetfeldern, die mittels Trypanblaufärbung festzustellen sind, und zur Bestimmung der Zellzahl zur Ermittlung

des Zellwachstums entnommen.

Alle Versuchsabläufe und späteren Auswertungen werden unverblindet durchgeführt.

Parallel zur Befeldungsanlage wird die EDV-gestützte Erfassung der Ölkreislauftemperaturen über den gesamten Expositionszeitraum gestartet. Zum Abschluss des Experiments werden als zusätzliche Kontrolle manuell die Temperaturen sowohl in den befeldeten Röhrchen als auch in einem Teil der nicht befeldeten Zellröhrchen gemessen und dokumentiert.

### **2.3.3. Bestimmung der Vitalität mittels Trypanblauexklusionstest**

Um eventuelle akute zytotoxische Effekte von elektromagnetischen Wellen auf HL-60-Zellen aufzuzeigen, werden Zellen 24 h lang einer Befeldung ausgesetzt und anschließend, wie in der Einleitung beschrieben, einer Vitalfärbung mittels Trypanblau zugeführt.

50 µl sowohl der Zellsuspension nach Befeldung als auch der scheinexponierten Zellen werden mit 50 µl 0,4 % iger Trypanblaulösung gemischt und anschließend in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wird das Verhältnis von lebenden bzw. lebensfähigen Zellen zu stark geschädigten oder abgestorbenen Zellen bestimmt (<http://www.medizin.fu-berlin.de/copharma/students/immunkurs/ZellZaehl.pdf>). Eine Zahl lebensfähiger Zellen unter 80 % wird als Indikator für Zytotoxizität definiert.

Der Prozentsatz vitaler Zellen wird folgendermaßen kalkuliert:

$$\text{Prozent vitaler Zellen} = \text{Zahl nicht gefärbter Zellen} \times 100 / \text{Gesamtzahl gezählter Zellen}$$

### **2.4. Untersuchung der DNA-Schädigung mittels Comet-Assay**

Der in dieser Arbeit zur Feststellung genotoxischer Wirkungen elektromagnetischer Felder durchgeführte alkalische Comet-Assay erfolgte nach der Vorschrift von Singh et al. 1988 gemäß den Vorgaben von Tice et al. 1990, 2000, Fairbairn et al. 1995 und Klaude et al. 1996.

Eine Zelldichte von ca. 50.000 Zellen pro Objektträger stellte sich als zur Auswertung geeignet heraus. In der eisgekühlten Elektrophoresekammer ergab sich bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA eine Spannung von 25 V. Vorversuche zur Ermittlung der optimalen „unwinding“- und Elektrophoresezeiten zeigten, daß bei einer Elektrophoresezeit von 20 Minuten hervorgerufene DNA-Schäden empfindlicher detektiert wurden als bei kürzeren

Elektrophoresezeiten. Eine neutrale Elektrophorese, bei der nur die physiologisch bedeutenden Doppelstrangbrüche, aber keine Einzelstrangbrüche ermittelt werden können, ist für die hier bearbeitete Fragestellung nicht empfindlich genug (Singh et al. 1988, Olive et al. 1990, Tice et al. 1990, Klaude et al. 1996, Singh und Stephens 1997, Miyamae et al. 1997, McKelvey-Martin et al. 1998). Wegen starker Diffusion der Kerne, die eine Auswertung erschwerten, wurde der neutrale Comet-Test nicht weiter verfolgt. Eine Zunahme der DNA-Schädigung durch Lichteinwirkung wurde durch weitgehende Abdunkelung während der Aufarbeitung nach Exposition minimiert. Bei einem Testversuch mit Lichteinwirkung stellte sich heraus, daß künstliches Licht im Gegensatz zu Sonnenstrahlung einen nur unbedeutenden Einfluß auf die DNA-Schäden hat.

#### **2.4.1. Versuchsvorbereitung und Agarosegelpräparation**

*Vorbereitung der Agarosegele und anderer Gebrauchslösungen:* Die Agarose-Gele wie auch die anderen Gebrauchslösungen werden immer am Versuchstag frisch hergestellt (genaue Angaben zur Herstellung siehe bei Material und Methoden).

*Vorbereitung der Objektträger:* Vor Beginn des Comet-Assay müssen die Glasobjektträger (single frosted), auf die man später die Gelschichten aufträgt, gründlich gereinigt werden. Dazu werden sie zunächst mit Aceton behandelt und auf fusselfreies Papier zum Trocknen gelegt. Danach kommen die Objektträger für mindestens 24 h in ein Ethanolbad (70 %), werden abgeflammt und schließlich bis zum Versuchsbeginn vor Staub geschützt aufbewahrt.

*Vorbereitung einer Kühlvorrichtung:* Für den Versuch wird eine eisgekühlte Unterlage vorbereitet, die mit Alufolie wasserdicht abgedeckt wird.

Nach Beendigung der 24 Stunden im Hochfrequenzexpositionsversuch werden alle Röhren aus den Probenbehältern der GTEM-Zelle und der HF-Abschirmbox herausgenommen. Nun werden die EMF-exponierten und nicht-EMF-exponierten Zellen der Bestimmung des Zellwachstums, dem Vitalitätstest mittels Trypanblau und den weiteren Tests wie Annexin V-Assay, TUNEL-Assay und Comet-Assay zugeführt. Da die HL-60-Zellen temperaturempfindlich sind, müssen alle weiteren Schritte möglichst schnell erfolgen.

Dem Comet-Assay wird also 1 Röhren mit befeldeten Zellen und 1 Röhren mit unbefeldeten Zellen als „Kontrolle“ zugeführt.

Die Zellen in den Röhren werden zunächst vorsichtig resuspendiert. Nun werden aus jedem

Röhrchen 2 ml Zellsuspension zu je 1 ml in zwei kleine Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml Tubes) überführt und dann bei ca. 2.000 Upm. ~ 320 g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird langsam abpipettiert, so daß nur noch das Zellpellet übrig bleibt.

Jetzt wird mit dem Auftragen der ersten Agarose-Gelschicht begonnen. Für eine optimale Haltbarkeit der Gele auf den Objektträgern hat sich gezeigt, daß es unerlässlich ist, diese vorher in einem Umlufttrockenschrank bei ~ 65 °C anzuwärmen. Außerdem hat sich als günstig erwiesen, das auf einen Objektträger pipettierte, noch flüssige Gel mit Hilfe eines zweiten Objektträgers auf beide gleichmäßig zu verteilen. Für die erste Schicht werden 400 µl Normal Melt Agarose-Lösung aufgetragen und verstrichen. Die Objektträger werden nun zum Festwerden der Gele für ca. 1 Minute auf die vorbereitete Eisplatte gelegt, wobei darauf zu achten ist, daß sie nicht austrocknen.

Mit der zweiten Gel-Schicht werden die HL-60-Zellen aufgetragen. Dazu wird das Zellpellet aus einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 150 µl Low Melt Agarose-Lösung vorsichtig resuspendiert und auf die erste Gelschicht aufgetragen. Jetzt kommen die Objektträger für kurze Zeit wieder auf die Eisplatte.

Dieser Schritt wird auch mit dem anderen Eppendorf-Reaktionsgefäß der gleichen Probe wiederholt. Somit ergeben sich vier Objektträger für jede Ursprungs-Zellprobe. Man erhält also: 4 Objektträger mit befeldeten Zellen und 4 Objektträger mit in der HF-Abschirmbox unbefeldeten Zellen.

Nach dem Erstarren des Gels werden nun wiederum 150 µl Low Melt Agarose-Lösung als dritte Gelschicht (=Deckschicht) aufgetragen und verstrichen. Ein letztes Mal werden die Objektträger auf die Eisplatte gelegt.

#### **2.4.2. Lysierung von Zell- und Kernmembran**

Nach dem Erstarren der letzten Agaroseschicht kommen die Objektträger in die vorgekühlte Final lysing solution. Hier werden die Gelplatten 1 Stunde lang im Dunkeln bei 4 °C belassen. Dabei kommt es durch die hohe Salz- und Laugenkonzentration (alkalischer pH) sowohl zu einer Lyse der Zellen als auch zu einer Entfaltung („unwinding“) der DNA. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Objektträger aus der Lyselösung genommen und mit bidestilliertem Wasser abgespült.

Alle folgenden Schritte werden unter möglichst geringer Lichteinwirkung ausgeführt, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

### **2.4.3. Alkalische Denaturierung**

Nun kommen die Objektträger in die Elektrophoresekammer, in die langsam der vorgekühlte Elektrophorese-Puffer gegeben wird. Der Puffer wird nur bis knapp über die Oberfläche der Objektträger aufgefüllt (~ 2 - 5 mm), um ein Fortschwimmen der Gele zu verhindern. Der alkalische pH des Puffers führt zu einer weiteren Entfaltung und Entwindung („unwinding“) der DNA. Dabei kommt es zu einer Relaxierung der sonst dicht gepackten chromosomalen Struktur. Die optimale „unwinding“-Zeit ist in der Literatur umstritten und variiert von Labor zu Labor. Da aber beispielsweise diskutiert wird, daß es bei einer längeren Denaturierungszeit von 40 - 60 Minuten zu einer „künstlichen“ Comet-Formation kommen kann (Bowers et al. 1999), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine „unwinding“-Zeit von 20 Minuten gewählt.

### **2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung der DNA**

Nach Ablauf der alkalischen Denaturierung wird die Elektrophorese bei konstant 25 V gestartet. Die Stromstärke kann durch Nachgießen des Elektrophorese-Puffers etwas korrigiert und stabilisiert werden.

Damit sich die Elektrophorese-Kammern nicht erwärmen, werden sie über die gesamte Laufzeit von 20 Minuten bei 4 °C gelagert und betrieben (Eiskühlung oder Kältearbeitsschrank). Nach Beendigung dieser Zeit werden die Gelplatten entnommen und mit doppelt destilliertem Wasser abgespült.

Der gleiche Vorgang der alkalischen Denaturierung und Elektrophorese wird für die nach der Lyse zwischengelagerten Objektträger wiederholt.

Neutralisation

Nach dem Elektrophorese-Lauf werden die Gelplatten mit dem Neutralisationspuffer dreimal über insgesamt 30 Minuten gespült. Auf diese Weise werden jegliche Basen-, Tensid- und Salzreste entfernt, die die Anfärbung der Gele beeinträchtigen könnten.

### **2.4.5. Färbung**

Die Präparate werden mit je 50 µl Ethidiumbromid-Lösung (1% ig, 1:2.500 verdünnt) angefärbt. Die Objektträger können dann im Kühlschrank in einer feuchten Kammer bei 4 °C für einige wenige Tage aufbewahrt werden, ohne daß die Gele eintrocknen oder die Fluoreszenzfärbung auffallend nachläßt.

## **2.4.6. Mikroskopie und Analyse der DNA-Migration**

Die Präparate werden fluoreszenzmikroskopisch untersucht und beurteilt.

Die Intensität der Fluoreszenz bei den zweidimensionalen „Kometenbildern“ ist proportional zur DNA-Menge. Ein Comet besteht zum einen aus einem „Kometenkopf“ und zum anderen aus einem „Kometenschweif“ (Nelms et al. 1997). Der Kometenkopf besteht aus nicht-fragmentierter, intakter DNA, die in der Elektrophorese nicht aus dem Kern herausgewandert und somit als nicht geschädigt zu interpretieren ist (Nelms et al. 1997). Bei dem Schweif dagegen handelt es sich um fragmentierte, geschädigte DNA mit Strukturverlust, die je nach Ausmaß der Schädigung unterschiedlich weit aus der Kernregion gewandert ist (Nelms et al. 1997). Die Schädigung ist umso stärker, je ausgeprägter der Kometenschweif erscheint (Anderson et al. 1994 und 1998, Kobayashi et al. 1995, Collins et al. 1997, Nelms et al. 1997, Tice et al. 2000, Heaton et al. 2002,).

Nach der ersten Begutachtung der Objektträger unter dem Mikroskop (Olympus, Hamburg) zum Zweck der Qualitätskontrolle des Experiments unmittelbar nach Versuchsende werden nach ein bis maximal drei Tagen von den zur Verfügung stehenden Objektträgern der befeldeten Zellen und der unbefeldeten Zellen pro unabhängigem Experiment bis zu 25 Zellen fotografiert. Die Auswahl der Zellen zur Fotografie erfolgt dabei zufällig durch mäanderförmiges Absuchen des Objektträgers.

Die Fotografie und digitale Speicherung der Bilder wird an einem zweiten Fluoreszenzmikroskop (Olympus Bx 60 mit Bx-TFC1 Filter, 40er Objektiv) zusammen mit einer darauf angebrachten Kamera (Colorview 12 Camera + analySIS-Software zur digitalen Bilderfassung, Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) durchgeführt. Das für eine „objektive“ Auswertung notwendige Bildauswertesystem „Komet 4.0“ (Optilas, Puchheim, Germany) stand jedoch im Jahr 1999 nicht zur Verfügung. Es erfolgte daher eine sonst unübliche Auswertung der gespeicherten Bilder. Dies geschah im Jahr 2002 nach Erwerb der „Komet 4.0“ Software. Mit Hilfe eines Makros für Excel™ (Microsoft Corporation, USA) von Kinetic Images konnte dabei auf die Rohdaten der Messungen zugegriffen werden. Zusätzlich wurden jetzt nachträglich die fotografierten Zellen noch visuell, also „subjektiv“, gemäß der Vorlage von Anderson et al. (1994) analysiert.

### **2.4.6.1. Digitale Auswertung gespeicherter Bilder des Comet-Assays**

Die digitale Auswertung der Zellen erfolgt unter Verwendung des Auswertungsprogramms „Komet 4.0“ (Kinetic Imaging, Optilas Puchheim, Germany). Hierbei wird das abgespeicherte



Fluoreszenzbild auf einen Monitor übertragen und dort über die Komet-Software ausgewertet. Die meisten Software-Versionen, so auch diese, ermitteln eine Reihe von Meßparameter von jedem analysierten „Kometen“. Die „Comets“ werden dabei eingerahmt und automatisch unter Berücksichtigung des Hintergrundes unter Verwendung eines Excel-Makros vermessen. In diesem Makro werden als Maß für die DNA-Schädigung unterschiedliche Parameter der DNA-Schädigung errechnet.

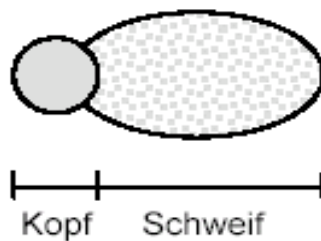
In dieser Arbeit werden zur Auswertung die gängigsten Parameter Tail length (Singh et al. 1988, 1991, Tice et al. 1990, Yusuf et al. 2000), Olive Tail Moment (OTM, Olive et al. 1990, 1993b, Hellman et al. 1995, Leroy et al. 1996, Fairbairn et al. 1996, Nelms et al. 1997, Bowers et al. 1999, Yusuf et al. 2000), Tail Extent Moment (TEM, Nelms et al. 1997, Vian et al. 2002, Yusuf et al. 2000, Avishai et al. 2003) und Tail-DNA (Nelms et al. 1997, Edler et al. 2002, Kim et al. 2002) herangezogen. Hierbei muß zwischen den tatsächlichen Meßgrößen Tail length und Tail-DNA sowie den abgeleiteten rechnerischen Größen Olive Tail Moment und Tail Extent Moment, unterschieden werden.

Insgesamt werden, je nach Versuch, bei der computergestützten Vermessung von den EMF-exponierten Zellen minimal 10 und maximal 24 Zellen ausgewertet. Bei den nicht-exponierten Zellen sind es minimal 14 Zellen und maximal 28 Zellen. Diese unterschiedlichen Anzahlen gehen hauptsächlich darauf zurück, dass von den fotografierten Zellen aufgrund von Überlagerungen und Unschärfen nicht alle vermessen werden konnten

Die bei der Bildanalyse verwendeten digitalen, gängigen Parameter Tail length, Olive Tail Moment, Tail Extent Moment und Tail DNA werden wie folgt definiert:

Tail length	Abstand zwischen dem Kometenkopf und dem letzten DNA-Fragment
Olive Tail Moment	Produkt aus der errechneten Differenz der DNA-Intensität von Schweif zu Kopf und dem Anteil an Gesamt-DNA im Schweif (gemessen als Fluoreszenzintensität im Schweif) Olive Tail Moment = (mittlere Intensität Schweif - mittlere Intensität Kopf) × Tail%DNA/100
Tail Extent Moment	Produkt aus Schweiflänge und Anteil an Gesamt-DNA im Schweif (gemessen als Fluoreszenzintensität im Schweif) Dieses Tail Moment beinhaltet sowohl die Menge der kleinsten

	<p>meßbaren gewanderten DNA-Fragmente (dargestellt durch die Kometenschweif-Länge) und die Zahl der kleinsten relaxierten / zerbrochenen DNA-Fragmente (dargestellt durch die DNA-Intensität im Kometen-Schweif)</p> <p>Tail Extent Moment =</p> <p>Schweiflänge × Tail%DNA/100</p>
Tail-DNA	<p>Differenz zwischen gesamter Kometen-DNA und DNA im Kometenkopf, dies entspricht dem Anteil an in den Schweif gewanderter DNA in Prozent</p>



**Abb. 6: Schematische Darstellung eines Kometen in der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay).** Im Kopf des Kometen befindet sich weitgehend intakte DNA, im Schweif die im elektrischen Feld gewanderte fragmentierte DNA.

Alle gewählten Parameter repräsentieren das Ausmaß der DNA-Fragmentation, wobei bei den letzten drei Auswertungsparametern nicht nur die durch die DNA-Fragmentation zustande kommende Kometenschweiflänge, sondern auch der Gehalt an DNA im Schweif berücksichtigt wird.

Früher war man davon ausgegangen, daß die Schweiflänge das Ausmaß des DNA-Schadens ausreichend repräsentieren könnte, da ja die DNA bei stärkerer Schädigung in immer kleinere Fragmente zerfällt und somit in einem längeren Kometenschweif resultiert (Nelms et al. 1997). Doch seither wurde immer wieder aufgezeigt, daß die Bestimmung der Schweiflänge allein nicht ausreichend ist. Denn, obwohl die Länge des Schweifes bei geringen Schädigungsgraden stetig anwächst, erreicht sie ab einem bestimmten Punkt ein Plateau (Olive et al. 1990, 1992, Nelms et al. 1997, Zhong et al. 1997). Ab diesem Punkt nimmt zwar nicht mehr die Länge des Kometenschweifes zu, wohl aber die Menge an DNA im Schweif (Nelms et al. 1997). So wurde

1990 von Olive et al. die Bestimmung des auch in dieser Arbeit genutzten „Tail Moment“ eingeführt, welches beide Faktoren, nämlich die Schweiflänge und den Gehalt an DNA kombiniert.

#### **2.4.6.2. Visuelle Auswertung des Comet-Assays**

Die visuelle Auswertung der EMF-exponierten und der nicht-EMF-exponierten Zellen erfolgt nach dem Verfahren von Collins et al. (1993 und 1997) mit der Einteilung der Schädigungsgrade analog zu Anderson et al. (1994).

Danach erfolgt die Einteilung der Zellschäden in 5 Kategorien (1 bis 5) nach dem prozentualen Anteil der in den Cometenschweif gewanderten DNA.

Dabei wird wie folgt eingeteilt:

- 1 = Schädigungsgrad 1, keine DNA-Migration in den Schweif  
<5% DNA im Schweif
- 2 = Schädigungsgrad 2, kurze Migration der DNA in den Schweif  
5-20% DNA im Schweif
- 3 = Schädigungsgrad 3, mittelgradige Wanderung der DNA in den Schweif  
20-40% DNA im Schweif
- 4 = Schädigungsgrad 4, lange Migration der DNA in den Schweif  
40-95% DNA im Schweif
- 5 = Schädigungsgrad 5, vollständige Migration der DNA in den Schweif, kein Zellkern mehr sichtbar  
>95% DNA im Schweif

Durch die folgende Formel wird dann ein score errechnet, der zwischen 100 und 500 liegt:

$$\text{Prozentzahl der Zellen in der Kategorie 1} \times 1 + \text{Prozentzahl der Zellen in der Kategorie 2} \times 2 + \text{Prozentzahl der Zellen in der Kategorie 3} \times 3 + \text{Prozentzahl der Zellen in der Kategorie 4} \times 4 + \text{Prozentzahl der Zellen in der Kategorie 5} \times 5 = \text{score (Zahl zwischen 100 und 500)}.$$

Insgesamt können bei den EMF-exponierten Zellen minimal 13 und maximal 35 Zellen pro Versuch ausgewertet werden. Bei den nicht-exponierten Zellen sind es minimal 16 Zellen und maximal 46 Zellen. Diese Zahlen liegen etwas über denen der digital ausgewerteten Zellen, da bei der visuellen Auswertung auch mehrere Zellen, die wegen ihrer Lage in Bezug zu benachbarten Zellen mit der Comet 4.0 Software nicht auswertbar sind, beurteilt werden können.

## 2.5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimente

Bei den Befeldungsexperimenten im Jahr 1999 konnte eine Positivkontrolle nicht erfolgreich einbezogen werden. Zur Überprüfung der Sensitivität des Versuchsprotokolls werden deshalb im Jahr 2002 drei neue Versuchsreihen durchgeführt, bei denen eine Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorgenommen wird.

Hierzu werden  $5 \times 10^4$  HL-60-Zellen/ml in einer Petrischale für 0,5 h im Brutschrank mit 100 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und danach sofort im Comet-Assay aufgearbeitet.

Danach erfolgt zum Zweck der Qualitätskontrolle unmittelbar nach Versuchsende eine Begutachtung der Objektträger unter dem Mikroskop (Olympus, Hamburg). Die Auswertung der Zellen nach Elektrophorese-Lauf und Färbung erfolgt im Unterschied zur Auswertung der EMF-exponierten Zellen und der nicht-exponierten Zellen (vgl. 2.4.6.1) während des Mikroskopierens der Objektträger, das heißt ohne vorheriges Fotografieren der Zellen.

Für die Auswertung werden die Zellen durch mäanderförmiges Absuchen des Objektträgers mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Zeiss Axioplan bei 400facher Vergrößerung zufällig ausgewählt. Die Auswertung der Zellen erfolgt unter Verwendung des Auswertungs-Programms Komet 4.0 (Kinetic Imaging, Optilas Puchheim). Hierbei wird das Bild über eine CCD Video-Kamera direkt auf den Monitor übertragen und digitalisiert vermessen. Eine gesonderte Fotografie und Abspeicherung der vermessenen Bilder erfolgt nicht.

Auch hier werden bei der computergestützten Auswertung die Parameter Tail length (Singh et al. 1988, 1991, Tice et al. 1990, Yusuf et al. 2000), Olive Tail Moment (OTM, Olive et al. 1990, 1993b, Hellman et al. 1995, Leroy et al. 1996, Fairbairn et al. 1996, Nelms et al. 1997, Bowers et al. 1999, Yusuf et al. 2000), Tail Extent Moment (TEM, Nelms et al. 1997, Vian et al. 2002, Yusuf et al. 2000, Avishai et al. 2003) und Tail-DNA (Nelms et al. 1997, Edler et al. 2002, Kim et al. 2002) bestimmt.

Insgesamt kommen bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontrolle bei der Versuchsreihe 1 50 Zellen, bei der Versuchsreihe 2 und 3 jeweils 100 Zellen zur Auswertung.

Zeitgleich zu den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen werden im Labor unbehandelte HL-60-Zellen als Negativkontrolle untersucht. Diese Negativkontrollen zeigen bei der ersten Mikroskopie keine Wanderung der DNA in den Cometenschweif und werden daher von mir nicht dokumentiert.

In dieser Arbeit sind Daten als persönliche Mitteilung von Dr. R. Gminski zum Vergleich aufgeführt.

## 2.6. Untersuchung zur Apoptose mittels TUNEL-Assay und Annexin V-Assay

### 2.6.1. TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay (siehe auch unter 1.5.2) wurde unter Verwendung des „In Situ Cell Detection Kit“ von Boehringer Mannheim durchgeführt. Hiermit kann das terminale deoxynucleotidyl transferase-vermittelte dUTP nick end labelling zur Darstellung fluoreszenzmarkierter Nukleotide in DNA-Fragmenten vereinfacht durchgeführt und das inkorporierte Fluorescein-dUTP durchflußzytometrisch quantifiziert werden. Dabei werden die, die entsprechenden Laser passierenden Fluoreszenz-Ereignisse im Kanal FL-1 (FITC, Fluorescein) und Kanal F3 (PJ) zur Diskriminierung apoptotischer und nekrotischer Zellen gezählt und in einem entsprechenden Histogramm mit Auftrag FL-1 als Ordinate und F3 als Abszisse dargestellt. Durch Festlegung von vier Bereichen (sogenannten Gates) im Dot-Plot-Histogramm nach Protokoll des Herstellers kann somit eindeutig zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen unterschieden werden.

*Probenvorbereitung:* Zum einen wird ein Probenröhrchen (4 ml), welches in der GTEM-Zelle 24 h lang einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt wurde, dem TUNEL-Assay zugeführt. Zum anderen werden die Kontrollzellen, die sich parallel zur Exposition 24 h lang in einer HF-Abschirmbox befanden, ebenfalls diesem Apoptosetest unterzogen. Auf diese Weise werden auch Apoptosevorgänge, die bei den in der HF-Box nicht befeldeten Zellen durch eventuell fehlende optimale Brutschrankbedingungen mit CO<sub>2</sub>-Begasung in Gang gesetzt werden könnten, aufgedeckt.

Zusätzlich werden zum Nachweis der Apoptoseinduzierbarkeit bei HL-60 Zellen (Positivkontrolle) sowohl befeldete Zellen als auch nicht befeldete Kontrollzellen mit dem Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin behandelt.

Dabei werden die HL-60-Zellen ebenfalls auf eine Zelldichte von etwa  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und mit Camptothecin (0,5 µg/ml) für 3 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

*Zellfixation:* Die HL-60-Zellen werden nach Ablauf des Befeldungsversuchs zunächst zwei Mal bei 4 °C mit PBS-BSA 1 % durch Zentrifugation bei 10.000 Upm für 6 sec. gewaschen und anschließend auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Nun werden jeweils 100 µl der Zellsuspension in eine V-bottomed 96 well Mikrotiterplatte gegeben (100 µl/well) und 100 µl frisch hergestellter PBS-Formaldehydlösung 4 % (pH 7,4) zu jedem Well hinzugefügt.

Anschließend erfolgt eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur. Um in dieser Zeit das Zusammenklumpen der Zellen zu verhindern, werden die Mikrotiterplatten auf einen Schüttler gestellt.

*Permeabilisierung:* Die Mikrotiterplatten werden jetzt bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert und das Fixierungsmittel durch leichtes Absaugen mit Hilfe einer Pipette entfernt. Anschließend erfolgt, wie oben bereits beschrieben, erneut ein 2 maliges Waschen mit 200 µl/well PBS-1 % BSA. Danach werden die Zellen in 100 µl/well Permeabilisationslösung (0,1 % Triton X 100 in 0,1 % Natriumcitrat) für 2 Minuten bei 4 °C resuspendiert.

*Markierung:* Nun folgen erneut zwei Waschschritte mit PBS-BSA 1 % (200 µl / well). Dann werden 50 µl / Well TUNEL-Lösung (reaction mixture) oder 50 µl/well Label solution als Negativkontrolle zu den Zellen hinzugegeben. Die Mikrotiterplatten werden anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit im Zellinkubator kommen erneut zwei Waschvorgänge mit einer Resuspension des Zellpellets in 500 µl PBS-BSA 1 %.

*Analyse:* Nun können die Zellen durchflußzytometrisch analysiert werden. Die Fragmentation von DNA im Rahmen von Apoptosevorgängen ist dabei als grüne Farbe zu sehen.

### **2.6.2. Annexin V-Assay**

Die zweite in dieser Arbeit angewendete Methode zum Nachweis insbesondere früher Apoptoseprozesse ist der Annexin V-Assay (siehe auch unter 1.5.2). Die Durchführung des Annexin V-Tests erfolgte nach dem Annexin V Staining Protocol von Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland.

Annexin V als Calcium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin auf der Zytoplasmaseite der Zellmembran ist ein wichtiger Marker, um apoptotische Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin zu identifizieren. Propidiumjodid (PJ) dient als Standard-Viabilitätsmarker für durchflußzytometrische Untersuchungen und erlaubt eine Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen. Lebende Zellen mit intakter Membran nehmen kein Propidiumjodid auf, wohingegen Membranen toter oder geschädigter Zellen durchlässig für Propidiumjodid werden. Somit befinden sich Zellen, die sich positiv für Annexin V anfärben lassen, aber kein Propidiumjodid aufnehmen, in einem frühen Apoptose-Stadium. Zellen, die sowohl Annexin V-FITC als auch Propidiumjodid-positiv sind, befinden sich entweder in späten Apoptose-Stadien oder sind nekrotisch. Zellen, die sich sowohl negativ für Annexin V als auch für Propidiumjodid darstellen, können als intakt angesehen werden. Durchflußzytometrisch werden die entsprechenden Laser passierenden Fluoreszenz-Ereignisse

im Kanal FL-1 (FITC, Fluorescein) und Kanal F3 (PJ) zur Diskriminierung der oben genannten zellulären Eigenschaften gezählt und in einem entsprechenden Histogramm mit Auftrag FL-1 als Ordinate und F3 als Abszisse dargestellt. Durch Festlegung von vier Bereichen (sogenannten Gates) im Dot-Plot-Histogramm nach Protokoll des Herstellers kann somit eindeutig zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen unterschieden werden.

*Probenvorbereitung:* Zum einen wird ein Probenröhrchen (4 ml), welches in der GTEM-Zelle 24 h lang einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt wurde, dem Annexin V-Assay zugeführt. Zum anderen werden die Zellen, die sich parallel zur Exposition 24 h lang in einer HF-Abschirmbox befanden, ebenfalls diesem Apoptosetest unterzogen. Auf diese Weise werden auch Apoptosevorgänge, die bei den in der HF-Box nicht befeldeten Zellen durch eventuell fehlende optimale Brutschrankbedingungen mit CO<sub>2</sub>-Begasung in Gang gesetzt werden könnten, aufgedeckt. Zusätzlich wird zum Nachweis der Apoptoseinduzierbarkeit in HL-60 Zellen (Positivkontrolle) sowohl befeldete Zellen als auch Kontrollzellen mit dem Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin behandelt. Dabei werden die HL-60-Zellen ebenfalls auf eine Zelldichte von etwa 1×10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt und mit Camptothecin (0,5 µg/ml) für 3 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Die jeweiligen HL-60-Zellproben werden zwei Mal mit kaltem PBS-Puffer durch Zentrifugieren bei 10.000 Upm für 6 sec. gewaschen.

*Markierung:* Danach werden 100 µl der Zelllösung (ca. 1×10<sup>5</sup> Zellen) mit 5 µl Annexin V-FITC sowie 2 µl Propidiumjodid-Farbstoff versetzt. Nach gutem Durchmischen werden die Zellen mit den Farbstoffen für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Als letzter Schritt werden jeder Probe 400 µl von 1× Bindungspuffer hinzugefügt.

*Analyse:* Innerhalb einer Stunde kann nun eine Analyse mittels Durchflußzytometrie (Elite XL-4-color, Beckman Coulter, Inc., Miami, Florida, USA) erfolgen. Die apoptotischen Zellen färben sich dabei rotbraun an.

## **2.7. Untersuchungen zur Zellproliferation und zum Zellzyklus**

### **2.7.1. Bestimmung des Wachstumsverhaltens und der Verdopplungszeit**

Die Verdopplungszeit wird aus der Versuchsdauer und der eingesetzten Zellzahl pro ml sowie der zum Versuchsende erhaltenen Zellzahl berechnet.

Für die Versuche werden die Zellsuspensionen immer in der gleichen Zellzahl von

$5 \times 10^4$  Zellen/ml Suspension hergestellt und dann auf die einzelnen Versuchsröhrchen verteilt.

Um Einflüsse der Temperatur auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu vermeiden, wird vor und während der gesamten Befeldungszeit auf konstante Temperaturbedingungen von  $37^\circ\text{C}$  geachtet. Eine Abweichung von bis zu  $0,1^\circ\text{C}$  wird dabei in Kauf genommen.

Die vor und nach dem Experiment erhaltene Zellzahl wird mittel einer Neubauerkammer bestimmt.

Die für die Verdoppelung benötigte Zeit einer Zelllinie ist die Generationszeit  $t_g$

$$t_g = \log 2 \times dt / \log N - \log N_0$$

wobei  $dt$  = Expositionszeit (24 h),  $N_0$  = Ausgangszellzahl zu Versuchsbeginn,  $N$  = Zellzahl nach Versuchende ist (Lindl 2002).

### **2.7.2. Bestimmung des Zellzyklus mittels Flowzytometrie**

Eine Analyse des Zellzyklus erfolgt am einfachsten auf Grundlage einer DNA-Quantifizierung über eine große Anzahl von Zellen. Der am weitesten verbreitete Farbstoff für die DNA-Analyse ist Propidiumjodid (PJ). Es interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und hat eine sehr hohe Quantenausbeute. Da es aber auch an doppelsträngige RNA binden kann, ist es für eine optimale DNA-Analyse notwendig, die Zellen mit RNase zu behandeln. Die hier angewandte Methode nutzt außerdem Ethanol, um die Zellen zu fixieren und die Membran für Propidiumjodid permeabel zu machen. Aus der Fluoreszenzintensität des DNA-spezifischen Farbstoffes, läßt sich die Position einzelner Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen (G1, S und G2M) ermitteln. Zur Untersuchung des Zellzyklus werden die befeldeten bzw. Kontrollzellen zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Resuspendierte Zellen werden in Pipette aufgenommen und in 5 ml 70% Methanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) gegeben. Danach wird mindestens 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert (Zellen sind so mehrere Tage haltbar). Nach Zugabe von eiskaltem PBS und anschließender Zentrifugation (2000 rpm) wird das Pellet aufgeschüttelt und in PBS resuspendiert. Es erfolgt dann die Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  RNase ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) und eine anschließende Inkubation für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Dunkeln. Schließlich wird  $200 \mu\text{l}$  Propidiumjodid (Stammlösung  $1 \text{ mg/ml}$  als Endkonzentration  $50 \mu\text{g/ml}$ ) zugegeben, so daß die Zellen nach 5 Minuten im FACS (Elite X4-color, Beckmann Coulter, Inc., Florida, USA) gemessen werden können. Zur Darstellung des Zellzyklus wird der G1/G0 Peak auf etwa 250 rel. Fluoreszenzeinheiten eingestellt. Die x-Achse (FL3-H) entspricht der Fluoreszenzintensität und spiegelt somit den



DNA-Gehalt in den Zellen wider. Auf der y-Achse ist die Zellzahl in Form von Counts aufgeführt. Die statistische Auswertung kann mit Hilfe von gesetzten Auswerte-Regionen, die den einzelnen Zellzyklusphasen entsprechen, geschehen.

### **2.7.3. Statistische Analyse**

Von jeder Versuchsreihe wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung bestimmt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des einseitigen t-Tests auf Signifikanz geprüft ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Die Anzahl der Meßwerte (n) gibt die Anzahl von Versuchen an.

Die dargestellten Ergebnisse ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung von 7 bzw. von 3 unabhängigen Versuchsdurchläufen.

### 3. Ergebnisse

Im nachfolgenden werden die Ergebnisse der in-vitro-Studien an Suspensionskulturen von humanen Leukämiezellen (Promyelozyten), die hochfrequenten elektromagnetischen Feldern von 2450 MHz ausgesetzt wurden, dargestellt. Es werden DNA-Schädigung, Vitalität, Apoptose sowie Änderung des Wachstumsverhaltens untersucht. Die im elektromagnetischen Feld exponierten HL-60-Zellen werden mit Kontrollzellen ohne Hochfrequenzexposition verglichen. Getrennt davon erfolgt zudem eine digitalisierte Auswertung der als Kontrolle für 0,5 h im Brutschrank mit 100 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzten HL-60-Zellen.

#### 3.1. DNA-Schädigung nach RF-Exposition

Mit Hilfe des Comet-Assays wird untersucht, ob vermehrt DNA-Schäden in exponierten Zellen im Vergleich zu nicht-exponierten auftreten.

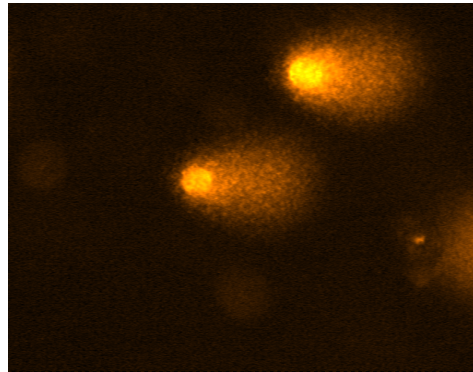
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt über die Bildung von Hydroxylradikalen ( $\cdot$ OH) zur DNA-Fragmentierung. Als Kontrolle werden Zellen untersucht, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden.

Abb.7 zeigt ein repräsentatives Bild einer durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kontrolle, 100 µmol/l, 0,5 h) geschädigten DNA. Abb. 8 ist zu entnehmen, daß die nicht befeldeten Kontrollzellen keinen Kometenschweif und somit keine erkennbaren DNA-Schäden zeigen. Die elektromagnetischen Feldern (2450 MHz, 1,114 W/kg) über 24 h exponierten Zellen dagegen zeigen deutliche Kometenschweife verschiedener Länge und Form. Diese Schweifentwicklung ist durch die Fragmentation der DNA erklärbar (Nelms et al. 1997). Somit ist die Schädigung umso stärker, je ausgeprägter der Kometenschweif erscheint (Nelms et al. 1997).

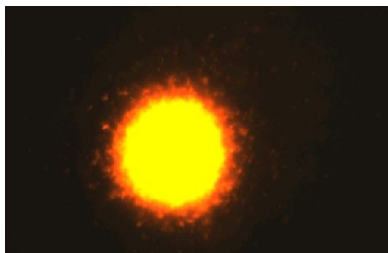
Die Auswertung der Kometenschweife erfolgt zum einen digitalisiert mit Hilfe der Parameter Tail length, Olive Tail Moment, Tail Extent Moment und durch die Messung des DNA-Gehaltes in Prozent im Schweif. Diese Parameter werden im Rahmen der rechnergestützten Bewertung der Kometen mit Hilfe des Programmes Komet 4.0 (Kinetic Imaging) ermittelt. Zum anderen erfolgt eine visuelle Auswertung der Zellen nach der Vorlage von Anderson et al. (1994), durch Einteilung der Zellen in fünf Schädigungsgrade je nach Ausmaß der DNA-Wanderung in den Kometenschweif.

In den nachfolgenden Tabellen und entsprechenden Säulendiagrammen werden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der gemessenen Parameter (Tail length, Tail-DNA, Olive Tail Moment und Tail Extent Moment) von den aus 2 Objektträgern zufällig gewählten und ausgewerteten Zellen dargestellt. Die Auswertung erfolgte für die

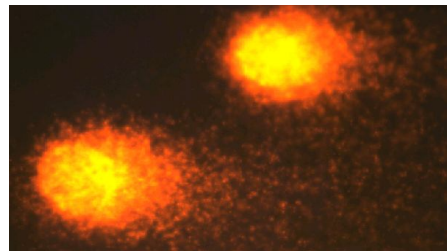
EMF-exponierten und nicht-exponierten Zellen aus 7 unabhängigen Experimenten. Bei den mit  $H_2O_2$  behandelten Zellen sind es drei Experimente. Die ausführlichen Tabellen mit den einzelnen Messwerten sind im Anhang dargestellt.



**Abb. 7: Repräsentative Mikrophotographie einer Kometenbildung bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit  $H_2O_2$  (100  $\mu\text{mol/l}$ , 0,5 h) als Kontrolle in der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay).**



nicht-exponierte Kontrollzelle



Mikrowellen-exponierte Zellen  
(2450 MHz, 1,114 W/kg, 24 h)

**Abb. 8: Repräsentative Mikrophotographien einer nicht-exponierten Kontrollzelle (linkes Bild) und von Mikrowellen-exponierten Zellen (rechtes Bild) mit entsprechender Kometenbildung in der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay).**

## Digitalisierte Auswertung der HL-60-Zellen

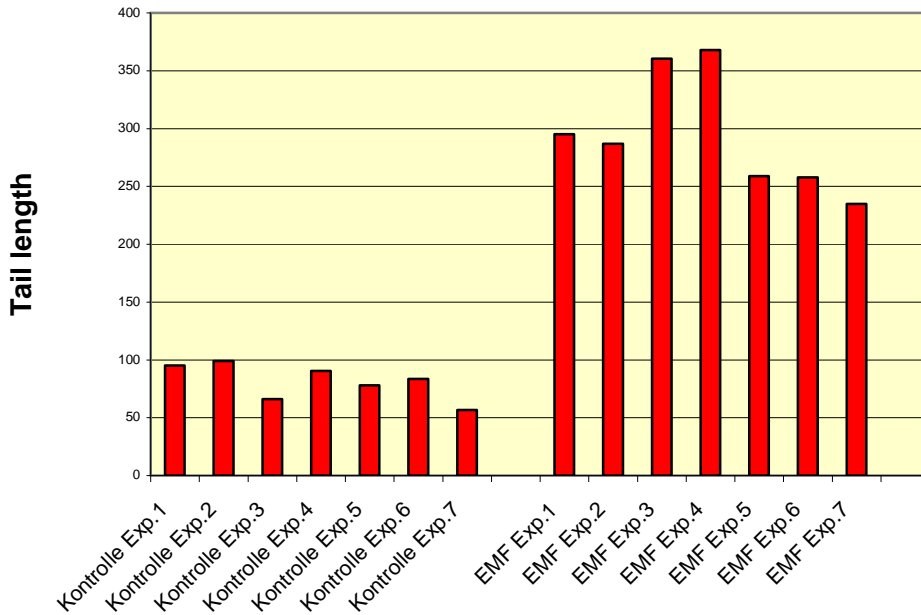
### 3.1.1. Tail length

Die Messung der Tail lengths zählte zu der ersten quantitativen Art der Erfassung des DNA-Schadens im Comet-Assay. Sie ist definiert als der Abstand zwischen dem äußeren Rand

des Kometenkopfes und dem Ende des Kometenschweifes. In Tab. 1 und im Säulendiagramm (Abb. 9) sind für sieben unabhängige Experimente die Mittelwerte der Tail lengths dargestellt, die aus den Einzelwerten der in jedem Versuch ausgewerteten Zellen berechnet wurden. Verglichen werden die Tail lengths der mit 2450 MHz befeldeten HL-60-Zellen und der unbefeldeten Kontrollzellen.

**Tab. 1: Daten zur Kometenbildung (Tail length) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7). n stellt die Zahl der pro Versuch ausgewerteten Zellen dar.

Versuchsgruppe	n	Tail length
Kontrolle Exp.1	14	95,21
Kontrolle Exp.2	21	99,14
Kontrolle Exp.3	22	66,18
Kontrolle Exp.4	25	90,52
Kontrolle Exp.5	15	78,00
Kontrolle Exp.6	23	83,44
Kontrolle Exp.7	28	56,75
Mittelwert		81,32
SD		15,51
EMF Exp. 1	11	295,18
EMF Exp.2	10	286,90
EMF Exp.3	17	360,53
EMF Exp.4	23	368,00
EMF Exp.5	24	258,92
EMF Exp.6	23	275,74
EMF Exp.7	23	234,96
Mittelwert		297,18
SD		49,89



**Abb. 9: Kometenbildung (Tail length) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

Die Ergebnisse zeigen, daß bei den mit 2450 MHz 24 h lang befeldeten Zellen viel längere Kometenschweife vorhanden sind, und zwar durchgehend in allen Versuchen, als bei den unbefeldeten Kontrollzellen. Die Werte gehen bei den Kontrollzellen von 56,75 minimal bis 99,14 maximal, so daß sich somit rechnerisch eine Standardabweichung von 15,51 ergibt. Der mittlere Tail length-Wert der sieben Versuchsreihen bei den nicht-exponierten Kontrollzellen beträgt 81,32. Die Tail lengths der mit 2450 MHz befeldeten HL-60-Zellen liegen ungefähr beim Dreifachen der Schweiflängenwerte der unbefeldeten Kontrollzellen. Die Werte reichen hier von minimal 234,96 bis maximal 368, wobei die berechnete Standardabweichung 49,89 und damit ebenfalls etwa das Dreifache der Kontrolle beträgt. Bei den Versuchen 3 und 4 betragen die Längen der Kometenschweife mehr als das 5fache (Versuch 3) und ca. das 4fache (Versuch 4) der entsprechenden unbefeldeten Zellen. Da die Auswertung anhand der fotografierten Fluoreszenzbilder erfolgte, handelt es sich um relative Längen, also nicht um die üblicherweise ermittelten absoluten Längen in  $\mu\text{m}$ .

Die Unterschiede zwischen den EMF-exponierten und nicht-exponierten Zellen sind signifikant ( $p < 0,0001$ ).

### 3.1.2. Olive Tail Moment

Nachfolgend wird als Parameter für das Ausmaß der DNA-Schädigung das von Olive et al. (1990) entwickelte „Olive Tail Moment“ (OTM) bestimmt. Dieser Parameter wird ermittelt aus der Differenz der DNA-Intensität von Schweif zu Kopf und dem Anteil an Gesamt-DNA im Schweif und ermöglicht auf diese Weise eine Einschätzung des Grades der DNA-Schädigung.

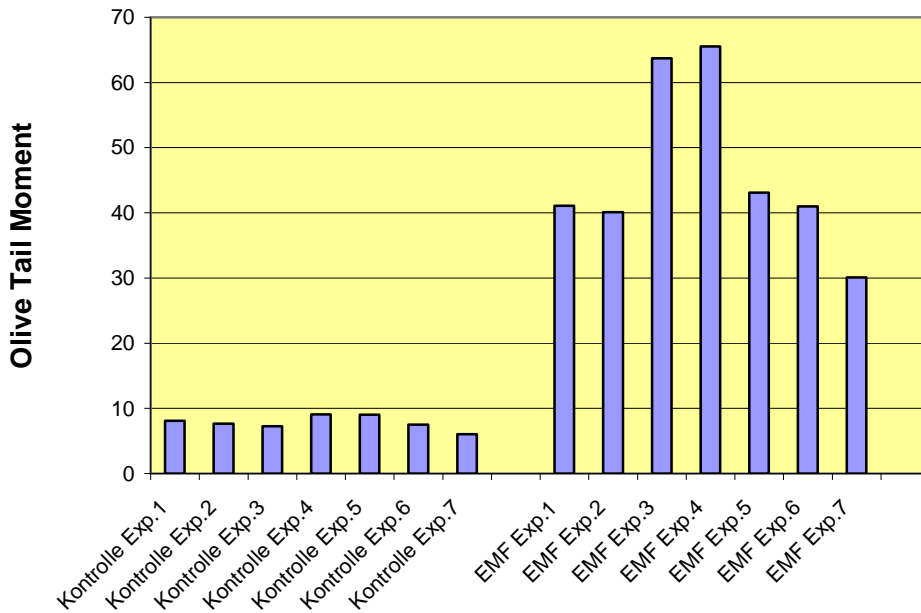
In Tab. 2 und dem dazugehörigen Diagramm (Abb. 10) sind für die 7 unabhängigen Experimente die Mittelwerte aus den jeweiligen Einzelergebnissen der Kometenbildung gemessen als Olive Tail Moment (OTM) für die nicht-exponierten Kontrollzellen und EMF-exponierten Zellen aufgetragen.

Auch hier zeigt sich, wie bereits bei der Darstellung der Tail length, ein deutlicher Unterschied zwischen den unbefeldeten Kontrollzellen auf der einen und den EMF-exponierten Zellen auf der anderen Seite. Das OTM der über 24 h 2450 MHz ausgesetzten Zellen liegt mindestens 5fach über dem der unbefeldeten Kontrollzellen.

Die nicht-befeldeten Zellen weisen niedrige Olive Tail Moment-Werte mit minimal 6,05 bis maximal 9,08 auf, wobei sich rechnerisch eine Standardabweichung von 1,06 ergibt. Der Mittelwert beträgt 7,81. Bei den befeldeten Zellen fallen auch hier die Experimente 3 und 4 ins Auge, die besonders hohe OTM-Werte von 63,70 bzw. 65,53 aufweisen. Der Mittelwert des OTM bei den befeldeten Zellen beträgt 46,37.

**Tab. 2: Daten zur Kometenbildung (Olive Tail Moment) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7). n stellt die Zahl der pro Versuch ausgewerteten Zellen dar.

Versuchsgruppe	n	OTM
Kontrolle Exp.1	14	8,08
Kontrolle Exp.2	21	7,66
Kontrolle Exp.3	22	7,26
Kontrolle Exp.4	25	9,08
Kontrolle Exp.5	15	9,03
Kontrolle Exp.6	23	7,49
Kontrolle Exp.7	28	6,05
Mittelwert		7,81
SD		1,06
EMF Exp. 1	11	41,08
EMF Exp.2	10	40,12
EMF Exp.3	17	63,70
EMF Exp.4	23	65,53
EMF Exp.5	24	43,12
EMF Exp.6	23	40,97
EMF Exp.7	23	30,09
Mittelwert		46,37
SD		4,97



**Abb. 10: Kometenbildung (Olive Tail Moment) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp.1-Exp. 7).

### 3.1.3. Tail Extent Moment

Ein weiterer Auswertungsparameter zur Quantifizierung des DNA-Schadens ist der sogenannte Tail Extent Moment (TEM). Dieser vereinigt zum einen die Schweiflänge des Kometen und zum anderen den Anteil an DNA im Schweif.

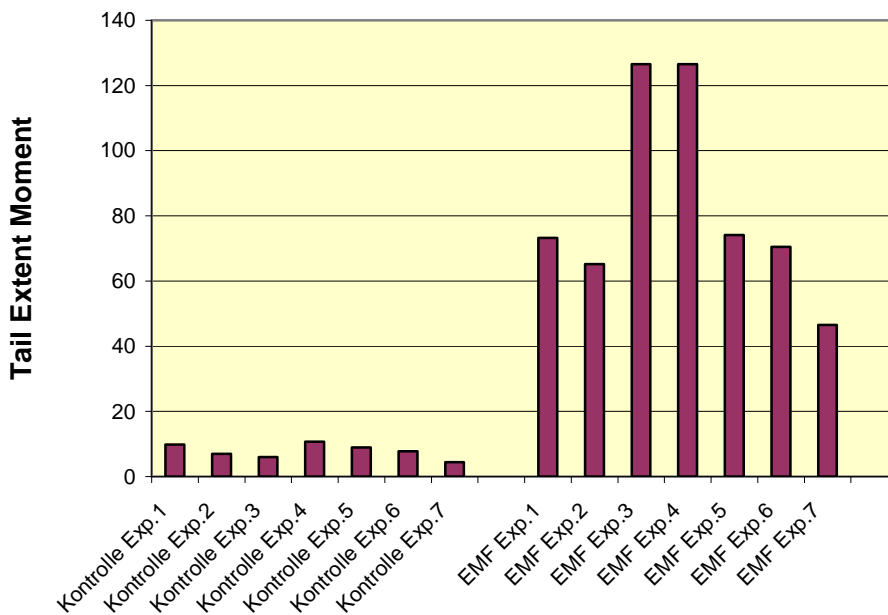
In Tab. 3 und in Abb. 11 sind für Kontroll- und EMF-exponierte HL-60-Zellen (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg, 24 h) die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten für die Kometenbildung mit dem Parameter Tail Extent Moment dargestellt.

Auch für den Parameter TEM zeigen sich bei EMF-exponierten Zellen deutlich höhere Werte als für die nicht-EMF exponierten Kontrollzellen. Der maximale Wert beträgt für die EMF-exponierten HL-60-Zellen 126,56 (Versuch 4), der minimale Wert 46,51 (Versuch 7). Auch hier fallen die Experimente 3 und 4 ins Auge, die die höchsten Werte bilden. Die TEM-Werte der nicht-EMF-exponierten HL-60-Zellen gehen von minimal 4,44 (Versuch 7) bis maximal 10,68 (Versuch 4).



**Tab. 3: Daten zur Kometenbildung (Tail Extent Moment) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7). n stellt die Zahl der pro Versuch ausgewerteten Zellen dar.

Versuchsgruppe	n	Tail Extent Moment
Kontrolle Exp.1	14	9,78
Kontrolle Exp.2	21	6,94
Kontrolle Exp.3	22	5,98
Kontrolle Exp.4	25	10,68
Kontrolle Exp.5	15	8,96
Kontrolle Exp.6	23	7,72
Kontrolle Exp.7	28	4,44
Mittelwert		7,79
SD		2,20
EMF Exp. 1	11	73,27
EMF Exp.2	10	65,15
EMF Exp.3	17	126,55
EMF Exp.4	23	126,56
EMF Exp.5	24	74,14
EMF Exp.6	23	70,46
EMF Exp.7	23	46,51
Mittelwert		83,23
SD		31,02



**Abb. 11: Kometenbildung (Tail Extent Moment) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

### 3.1.4. Tail-DNA

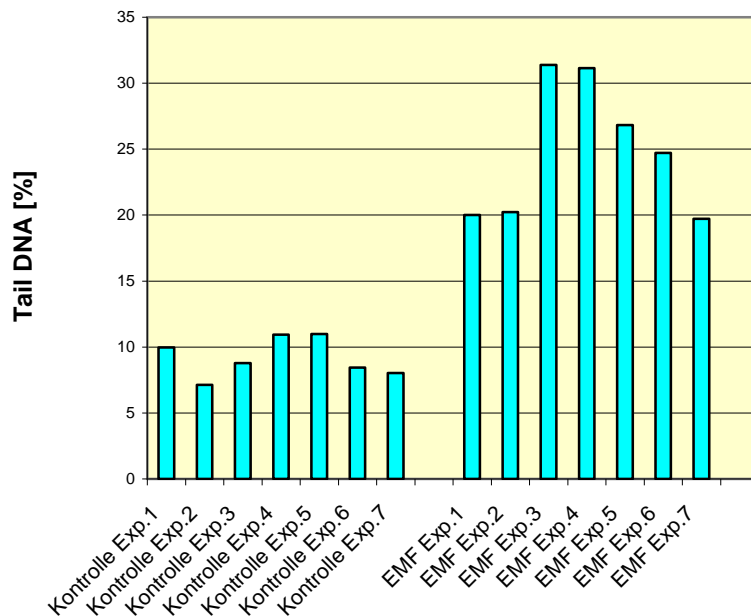
Die Tail-DNA ist der Prozentsatz an DNA, der vom Kometenkopf in den Schweif gewandert ist. Bei der Berechnung der Tail-DNA spielt die Länge des Kometenschweifes damit keine Rolle, sondern nur die Menge an DNA.

Dargestellt sind in Tabelle 4 und in Abbildung 12 die Tail-DNA-Werte für Kontroll- und EMF-exponierte Zellen als Mittelwerte aus den jeweiligen Einzelergebnissen aus 7 unabhängigen Experimenten.

Bei den EMF-exponierten Zellen zeigen sich je nach Experiment Tail-DNA-Werte von minimal 19,73 (Versuch 7) bis maximal 31,38 (Versuch 3). Im Mittel ergibt sich für die 7 Experimente ein Wert von 24,86. Die errechnete Standardabweichung der EMF-exponierten Zellen beträgt 5,12. Bei den nicht-EMF-exponierten Kontrollzellen liegt der kleinste Tail-DNA-Wert bei 7,14 (Versuch 2) und der größte Wert bei 10,99 (Versuch 5). Es ergibt sich ein Mittelwert von 9,19.

**Tab. 4: Daten zur Kometenbildung (Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7). n stellt die Zahl der pro Versuch ausgewerteten Zellen dar.

Versuchsgruppe	n	Tail-DNA (%)
Kontrolle Exp.1	14	9,98
Kontrolle Exp.2	21	7,14
Kontrolle Exp.3	22	8,79
Kontrolle Exp.4	25	10,94
Kontrolle Exp.5	15	10,99
Kontrolle Exp.6	23	8,44
Kontrolle Exp.7	28	8,02
Mittelwert		9,19
SD		1,48
EMF Exp.1	11	20,01
EMF Exp.2	10	20,24
EMF Exp.3	17	31,38
EMF Exp.4	23	31,15
EMF Exp.5	24	26,82
EMF Exp.6	23	24,71
EMF Exp.7	23	19,73
Mittelwert		24,86
SD		5,12



**Abb. 12: Kometenbildung (Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß sich mit Hilfe des Comet-Assays DNA-Strangbrüche in den mit 2450 MHz befeldeten Zellen nachweisen lassen.

Nicht EMF-exponierte HL-60-Zellen zeigen keine oder nur sehr geringe Anzeichen einer DNA-Schädigung.

Tab. 5 zeigt im Überblick Mittelwerte und Standardabweichungen der induzierten DNA-Schäden aus 7 unabhängigen Experimenten bei den mikrowellenexponierten HL-60-Zellen und den nicht-EMF-exponierten Kontrollzellen. Als Meßgrößen für die im Comet-Assay erhobenen Werte sind hier die Parameter Tail length, Olive Tail Moment, Tail Extent Moment und Tail-DNA dargestellt. Es zeigen sich für mikrowellenexponierte Zellen deutlich höhere Werte als für unbefeldete Kontrollzellen.

**Tab. 5: Daten zur zusammenfassenden Darstellung der Kometenbildung (Tail length, OTM, Tail Extent Moment und Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Mikrowellenbefeldung (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) nach Durchführung des Comet-Assays im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind für EMF-Exposition und Kontrollzellen die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Einzelergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten (Exp. 1-Exp. 7).

Versuchsgruppe	Tail length	OTM	Tail Extent Moment	Tail-DNA
Mittelwert aus Kontrolle Exp. 1-7	81,32	7,81	7,79	9,19
SD aus Kontrolle Exp. 1-7	15,51	1,06	2,20	1,48
Mittelwert aus EMF Exp. 1-7	297,18	46,37	83,23	24,86
SD aus EMF Exp. 1-7	49,89	4,97	31,02	5,12

Im einzelnen, nochmals verdeutlichend zusammengefaßt, betragen die Mittelwerte aus 7 Experimenten für die mikrowellenexponierten HL-60-Zellen für die Tail length 297,18, für Olive Tail Moment 46,37, für Tail Extent Moment 83,23 und für die Tail-DNA 24,86, wobei die Standardabweichungen bei den Messparametern Olive Tail Moment mit 4,97 und Tail-DNA mit 5,12 nicht erheblich voneinander abweichen. Eine große Standardabweichung zeigen dagegen das Tail Extent Moment mit 31,02 und die Tail length mit 49,89.

Die unbefeldeten Kontrollzellen zeigen bei allen 4 Meßparametern, wie für eine Negativkontrolle zu erwarten, nur geringe Anzeichen von DNA-Schädigung, die als basales Ereignis interpretiert werden muß. Die höchsten Werte finden sich dabei im Mittel bei der Tail-length mit 81,32. Die Mittelwerte der unbefeldeten Zellen im Olive Tail Moment und Tail Extent Moment sowie in der Tail-DNA weichen dagegen kaum voneinander ab und betragen 7,81 (OTM), 7,79 (Tail Extent Moment) und 9,19 (Tail-DNA). Die Standardabweichungen sind bei den unbefeldeten Kontrollzellen im Vergleich zu den befeldeten Zellen deutlich geringer.

Zusammenfassend wird auch in dieser Abbildung der Unterschied im Ausmaß der DNA-Fragmentation bzw. -schädigung zwischen unbehandelten Zellen einerseits und mikrowellenexponierten HL-60-Zellen andererseits deutlich.

## Visuelle Auswertung der HL-60-Zellen

Die visuelle Auswertung der im Comet-Assay bearbeiteten HL-60-Zellen erfolgt nach dem Prinzip von Collins et al. (1993) nach Modifikation von Anderson et al. (1994).

Hierbei erfolgt eine Einteilung der Zell- bzw. DNA-Schäden je nach Schweregrad in 5 Kategorien (1 bis 5). Den einzelnen Kategorien werden in der Literatur Prozentzahlen der in den Kometenschweif gewanderten DNA zugeordnet (siehe Beschreibung auf Seite 59 in Material und Methoden).

Bei der visuellen Auswertung der fotografierten Zellen können mehr Zellen ausgewertet werden, da hier im Unterschied zur digitalen Auswertung eine zu große Nähe benachbarter Zellen auf dem Objektträger bis hin zur teilweisen Überlagerung bei der subjektiven Beurteilung nicht ins Gewicht fällt. Betont sei, dass aber die visuelle Auswertung mit der Einteilung der Zellen in Schädigungsgrade (in dieser Arbeit von 1 bis 5) eine auswerterabhängige, subjektive Beurteilung darstellt.

Die zusammenfassende Auswertung der Einzelergebnisse aus den sieben unabhängigen EMF-Experimenten ist in Tabelle 6 dargestellt.

Die Ergebnisse der Auswertung der einzelnen Zellen pro Versuch finden sich im Anhang.

**Tab. 6: Visuelle Auswertung der EMF-exponierten HL-60-Zellen und der nicht-exponierten Kontrollzellen nach Durchführung des Comet-assays für Experiment 1 bis 7 mit der Einteilung der Zell-Schädigungsgrade in 5 Kategorien nach der Vorlage von Anderson et al. 1994.** Dargestellt ist die Anzahl der insgesamt ausgewerteten Zellen pro unabhängigem Experiment und die der entsprechenden Schädigungs-kategorie zugeordnete Zellzahl. In der jeweils untersten Zeile stellt sich der errechnete score dar.

Versuch	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Exp.7
	EMF	EMF	EMF	EMF	EMF	EMF	EMF
Anzahl der insgesamt ausgewerteten Zellen	13	14	33	27	29	29	35
Anzahl in Kategorie 1	-	-	-	-	-	-	-
Anzahl in Kategorie 2	-	3	-	-	1	1	-
Anzahl in	6	9	3	10	17	13	14

<b>Kategorie 3</b>							
<b>Anzahl in Kategorie 4</b>	7	2	30	17	11	15	21
<b>Anzahl in Kategorie 5</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>errechneter score</b>	353,85	292,86	390,91	362,96	334,48	348,28	360
<b>Versuch</b>	<b>Exp.1</b>	<b>Exp.2</b>	<b>Exp.3</b>	<b>Exp.4</b>	<b>Exp.5</b>	<b>Exp.6</b>	<b>Exp.7</b>
	<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>Anzahl der insgesamt ausgewerteten Zellen</b>	16	34	46	43	31	36	44
<b>Anzahl in Kategorie 1</b>	14	22	46	28	10	10	29
<b>Anzahl in Kategorie 2</b>	2	12	-	15	21	26	15
<b>Anzahl in Kategorie 3</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Anzahl in Kategorie 4</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Anzahl in Kategorie 5</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>errechneter score</b>	112,5	135,29	100	134,88	167,74	172,22	134,09

Anhand der errechneten scores ist sichtbar, dass die EMF-exponierten HL-60-Zellen im Vergleich zu nicht exponierten Zellen ca. 3 bis annähernd 4fach höhere Werte aufweisen.

Dieses weist auf DNA-Strangbrüche bei den exponierten Zellen hin.

Mittelwert und Standardabweichung betragen bei den exponierten Zellen  $349,05 \pm 30,17$  (SD), bei den Kontrollen  $136,67 \pm 26,36$ .

### 3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimente

Die Durchführung und Auswertung der drei unabhängigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimente erfolgt im Jahr 2002. Daher sind die Ergebnisse in einem gesonderten Abschnitt dargestellt.

Die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten HL-60-Zellen werden nach Durchführung des Comet-Assays unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des Auswertungs-Programms Komet 4.0 (Kinetic Imaging, Optilas Puchheim) direkt vermessen. Eine gesonderte Fotografie und digitale Abspeicherung wie bei den EMF-exponierten und den nicht-exponierten Kontrollzellen erfolgt nicht, so dass die erhaltenen Messwerte nicht vergleichbar sind.

In den folgenden Tabellen und Säulendiagrammen sind jeweils das arithmetische Mittel und die Standardabweichung für die Parameter Tail length, Olive Tail Moment, Tail Extent Moment und Tail-DNA für die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten HL-60-Zellen dargestellt. Dabei kommen im Versuch 1 50 Zellen und im Versuch 2 und 3 jeweils 100 Zellen zur Auswertung.

Die Werte für unbehandelte Zellen sind zum Vergleich von R. Gminski als persönliche Mitteilung zur Verfügung gestellt. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, bei denen je 100 Zellen ausgewertet wurden.

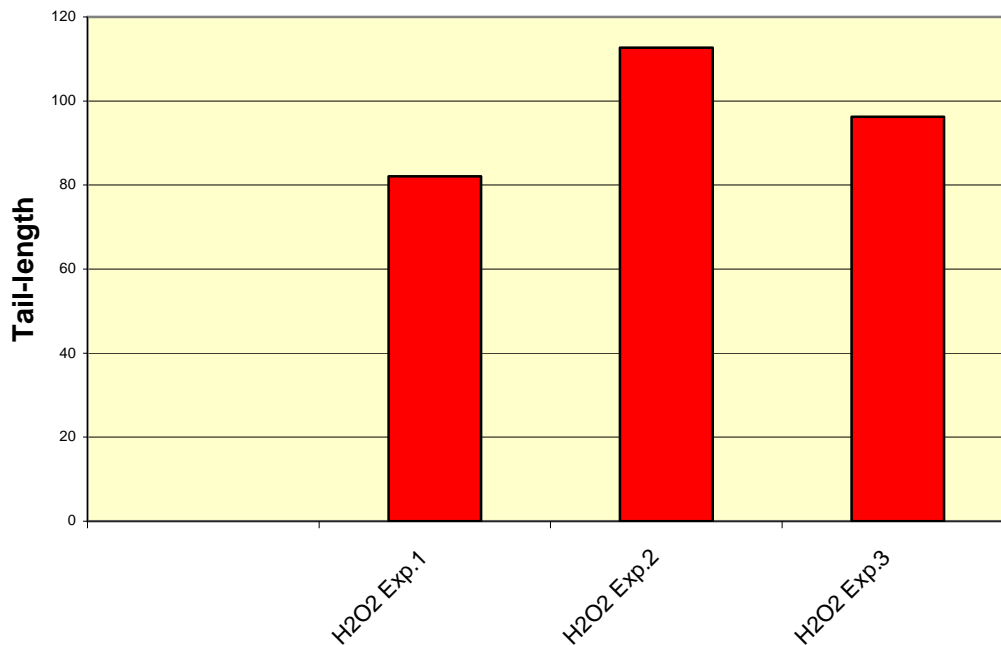
Die Vergleichbarkeit der Werte der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen und der unbehandelten Zellen ist jedoch nur unter der Einschränkung möglich, dass die Untersuchung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen und der nicht behandelten Zellen nicht im selben Experiment erfolgte.

In Tabelle 7 und im Säulendiagramm (Abb. 13) sind für 3 unabhängige Versuche die Mittelwerte der Tail lengths für die für eine halbe Stunde mit 100µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen aufgetragen.

**Tab. 7: Daten zur Kometenbildung (Tail length) bei HL-60-Zellen nach Durchführung des Comet-Assays nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung (100 µmol/l, 0,5 h).** Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte der Tail lengths, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurde, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte aller drei Experimente.

Versuchsgruppe	n	Tail length
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.1	50	82,11
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.2	100	112,67
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.3	100	96,22
Mittelwert		97,00
SD		15,30





**Abb. 13: Kometenbildung (Tail length) bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 0,5 h).** Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte der Tail lengths, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurden.

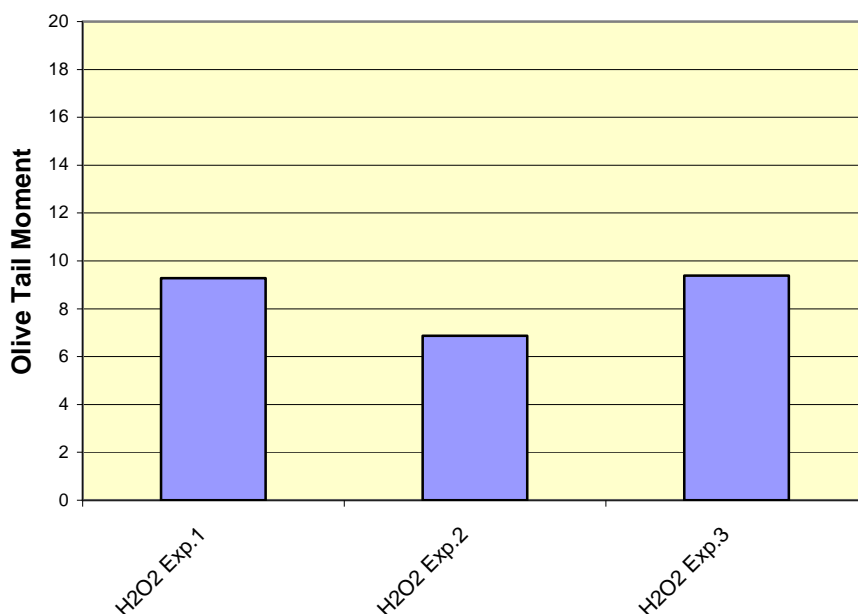
Die Werte für die Tail lengths betragen für Versuch 1 82,11, für Versuch 2 112,67 und für Versuch 3 96,22. Im Mittel ergibt sich ein Wert von 97,00. Für unbehandelte Zellen wurde eine Tail length von 27,49 bestimmt (R. Gminski, persönliche Mitteilung).

Die für mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte Zellen gemessenen Zahlen liegen deutlich über denen der unbehandelten Zellen.

In Tabelle 8 und im Säulendiagramm (Abb. 14) sind für die 3 unabhängigen Versuche die Mittelwerte des Olive-Tail-Moments für die für eine halbe Stunde mit 100µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen aufgetragen.

**Tab. 8: Daten zur Kometenbildung (Olive Tail Moment) bei HL-60-Zellen nach Durchführung des Comet-Assays nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung (100 µmol/l, 0,5 h).** Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte des Olive Tail Moments, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurde, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte aller drei Experimente.

Versuchsgruppe	n	Olive Tail Moment
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.1	50	9,28
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.2	100	6,87
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.3	100	9,39
Mittelwert		8,51
SD		1,42



**Abb. 14: Kometenbildung (Olive Tail Moment) bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 0,5 h).** Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte des Olive Tail Moments, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurden.

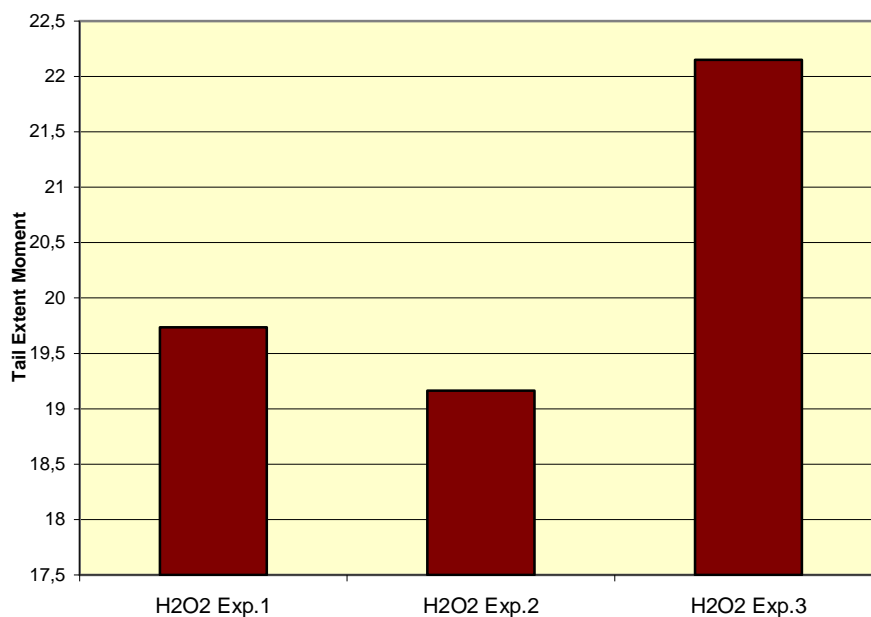
Die Werte für die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen betragen für Versuch 1 9,28, für Versuch 2 6,87 und für Versuch 3 9,39. Im Mittel ergibt sich ein Wert von 8,51, der einem Wert entspricht, den man bei einer deutlichen DNA-Fragmentation sieht.

Für unbehandelte Zellen wurde ein Olive Tail Moment von 0,84 bestimmt (R. Gminski, persönliche Mitteilung).

In der folgenden Tabelle 9 und im Säulendiagramm (Abb. 15) sind die Mittelwerte der jeweiligen Einzelergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten für den Parameter Tail Extent Moment aufgetragen.

**Tab. 9: Daten zur Kometenbildung (Tail Extent Moment) bei HL-60-Zellen nach Durchführung des Comet-Assays nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung (100 µmol/l, 0,5 h).** Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte des Tail Extent Moments, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurde, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte aller drei Experimente.

Versuchsgruppe	n	Tail Extent Moment
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.1	50	19,74
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.2	100	19,16
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.3	100	22,15
Mittelwert		20,35
SD		1,59



**Abb. 15: Kometenbildung (Tail Extent Moment) bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 0,5 h).** Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte des Tail Extent Moments, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurden.

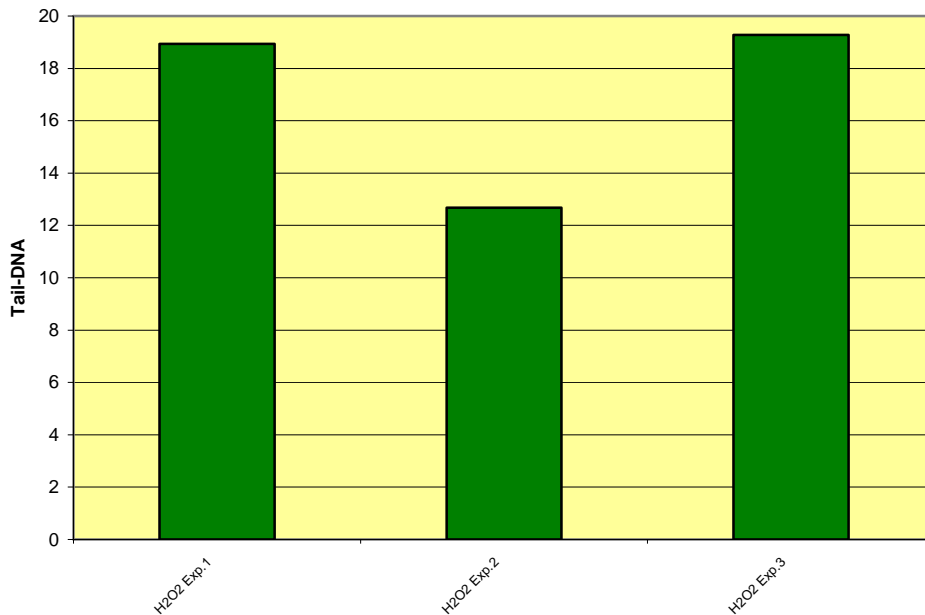
Bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen sind die Tail-Extent-Moment-Werte im Mittel der drei Experimente bei 20,35.

Für unbehandelte Zellen wurde eine Tail Extent Moment von 1,89 bestimmt (R. Gminski, persönliche Mitteilung).

In Tabelle 10 und im Säulendiagramm (Abb. 16) sind für die 3 unabhängigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Versuche die Mittelwerte für den Parameter Tail-DNA aufgetragen.

**Tab. 10: Daten zur Kometenbildung (Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach Durchführung des Comet-Assays nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung (100 µmol/l, 0,5 h).** Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte der Tail-DNA, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurde, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte aller drei Experimente.

Versuchsgruppe	n	Tail-DNA (%)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.1	50	18,94
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.2	100	12,68
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exp.3	100	19,28
Mittelwert		16,97
SD		3,72



**Abb. 16: Kometenbildung (Tail-DNA) bei HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 0,5 h).** Dargestellt sind für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Kontrolle die Mittelwerte der Tail-DNA, die in jedem der drei Experimente für n Zellen ermittelt wurden.

Bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen zeigen sich Mittelwerte von minimal 12,68 und maximal 19,28. Im Mittel ergibt sich ein Wert von 16,97, die Standardabweichung beträgt 3,72.

Für unbehandelte Zellen wurde ein Tail-DNA-Wert von 3,72 bestimmt (R. Gminski, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend zeigt sich zwischen den unbehandelten Zellen (persönliche Mitteilung R. Gminski) und den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten HL-60-Zellen ein deutlicher Unterschied. Dieses macht deutlich, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genotoxische Wirkung aufweist.

Vergleicht man die Werte der nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen, die durch direkte Auswertung der Zellen mit der Komet 4.0 Software gewonnen wurden, mit den Werten, die durch die Auswertung der gespeicherten Bilder der nicht EMF exponierten Zellen mit der selben Software erhalten wurden, zeigen sich deutliche Unterschiede. So beträgt z. B. der Mittelwert für die Tail-DNA bei direkter Messung 3,72 (s. o.), nach Auswertung der gespeicherten Fotografien jedoch 9,19 (Tab. 4). Bei der Bestimmung der Tail length ergibt sich bei direkter Auswertung ein Wert von 27,49, bei der Auswertung der gespeicherten Bilder von 81,32.

Dies beruht einmal auf einer Veränderung des Maßstabs, der durch die fotografische Dokumentation bedingt ist, zum anderen ist nicht auszuschließen, dass es durch die Fotografie

und anschließende Digitalisierung zu einem Verlust bzw. zu Veränderungen von Informationen im Vergleich zur direkten Bildanalyse kommt. Die Werte, die durch die Auswertung der gespeicherten Bilder erhalten wurden, sind somit nicht mit Werten vergleichbar, die durch eine direkte Auswertung von Zellen gewonnen wurden. Hinzukommt, dass die Vergleichbarkeit der Werte noch dadurch eingeschränkt ist, dass die unbehandelten Zellen aus unterschiedlichen Experimenten stammen.

### **3.3. Vitalität nach RF-Exposition**

Zur Klärung der bei 2450 MHz und 24 h beobachteten Effekte an HL-60-Zellen muß die Möglichkeit eines zytotoxischen Effekts ausgeschlossen werden. Dieses erfolgt, wie Eingangs erwähnt, mit Hilfe des Trypanblauexklusionstests, der sofort im Anschluß an die 24 h Befeldungs- bzw. Versuchszeit durchgeführt wird. Es läßt sich zeigen, daß die Zahl lebensfähiger Zellen bei allen Experimenten nicht unter 90 % fällt. Somit kann nach 24 -ständiger Exposition mit Mikrowellen keine Erhöhung der Zahl vital geschädigter Zellen festgestellt werden.

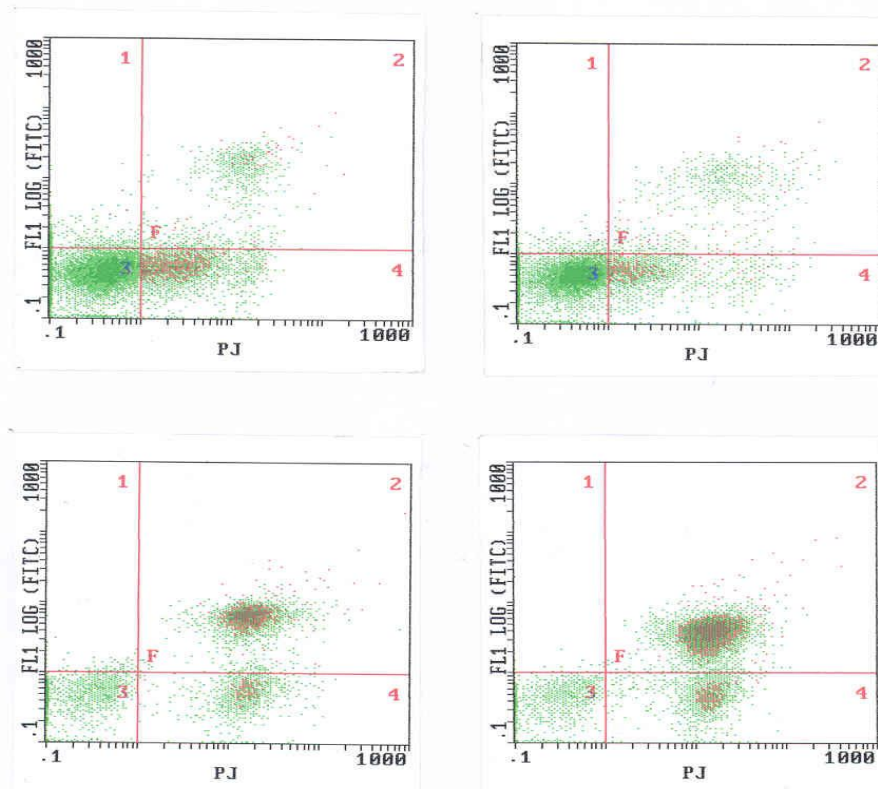
### **3.4. Untersuchungen zur Apoptose**

Um die bei 2450 MHz und 24 h beobachteten Effekte an HL-60-Zellen zu klären, muß die Möglichkeit einer Induktion von Apoptose untersucht werden.

Zur Feststellung apoptotischer Prozesse werden zwei Methoden verwendet: der Annexin V-Assay und der TUNEL-Assay. Dabei wird der Annexin V-Assay als Test zum Nachweis früher Apoptosevorgänge verwendet, während der TUNEL-Assay eher späte Apoptoseveränderungen nachweisen soll.

#### **3.4.1. Annexin V-Assay**

In Abb. 17 werden Apoptosevorgänge mittels Annexin V-Assay bei den befeldeten HL-60-Zellen und bei den in der HF-Abschirmbox unbefeldeten Zellen (Kontrolle) dargestellt. Als Positivkontrolle wurde beiden Gruppen von HL-60-Zellen, den unbefeldeten und den befeldeten Zellen, je 0,5 µg/ml des Apoptose-Induktors Camptothecin über 3 h zugesetzt. Die dargestellten Dot-Plot-Histogramme zeigen Apoptose-induzierte Annexin V-FITC-Signale (FL-1) gegen den DNA-Gehalt (Propidiumjodid-Signal, PJ).



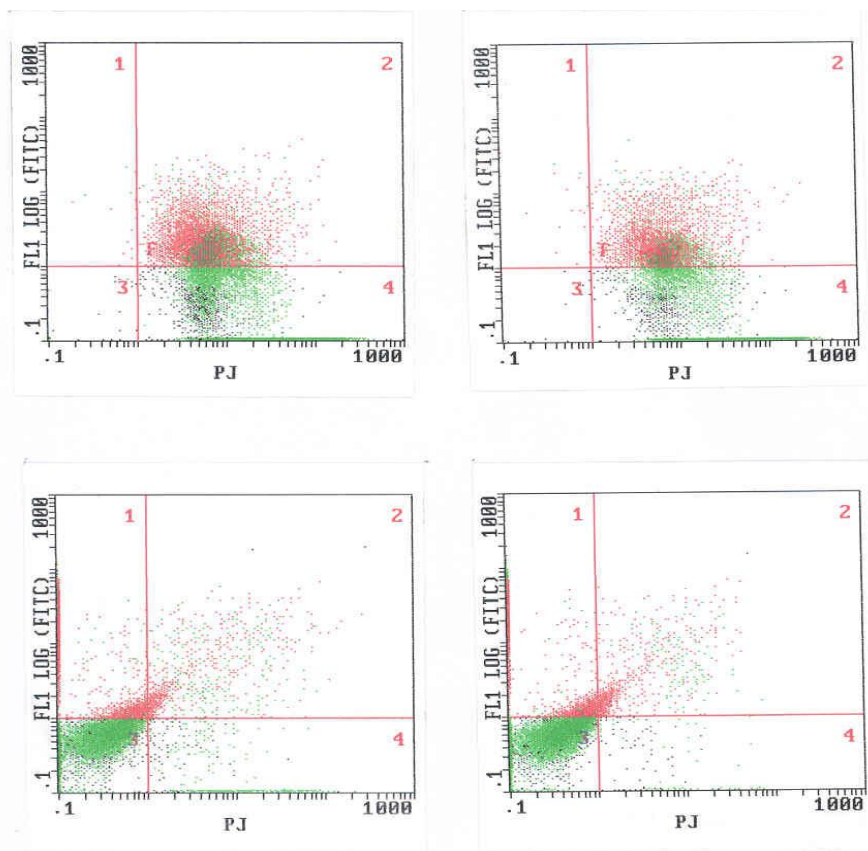
**Abb. 17: Test auf Apoptose-Induktion in HL-60-Zellen nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg, Bilder rechts) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle (Bilder links) mittels Annexin V-Assay ohne (oben) und mit 3 h 0,5 µg/ml Camptothecin-Behandlung (unten). Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse nach Färbung mit Annexin V-FITC (y-Achse: FL-1) und Propidiumjodid (x-Achse: PJ, DNA-Gehalt).**

Bei den nicht mit Camptothecin vorbehandelten HL-60-Zellen zeigt sich sowohl bei befeldeten als auch bei unbefeldeten Zellen keine wesentliche Apoptoseinduktion. Allen mit Camptothecin vorbehandelten HL-60-Zellen, sei es die den EMF-exponierten oder nicht-befeldeten Zellen, sind dagegen deutliche Apoptoseprozesse nachzuweisen.

Die in der oberen Bilderreihe dargestellten, von nicht mit Camptothecin behandelten Zellen ausgehenden geringen Apoptose-Vorgänge könnten als eventuelle spontane bzw. physiologische oder auch durch das Fehlen von optimalen Brutschrankbedingungen erklärt werden. Essentiell ist jedoch, daß zwischen den befeldeten und nicht-befeldeten Zellen keine Unterschiede in der Apoptoserate nachweisbar sind. Somit induzieren die hier verwendeten HF-EMF unter den vorliegenden Versuchsbedingungen keine zusätzlichen Apoptosevorgänge.

### 3.4.2. TUNEL-Assay

In Abb. 18 werden Apoptosevorgänge mittels TUNEL-Assay bei den befeldeten HL-60-Zellen und bei den in der HF-Abschirmbox unbefeldeten Zellen (Kontrolle) dargestellt. Als Positivkontrolle wurde beiden Gruppen von HL-60-Zellen, den unbefeldeten und den befeldeten Zellen, je 0,5 µg/ml des Apoptose-Induktors Camptothecin über 3 h zugesetzt. Die dargestellten Dot-Plot-Histogramme zeigen Apoptose-induzierte TUNEL-FITC-Signale (FL-1) (y-Achse) gegen den DNA-Gehalt (Propidiumjodid-Signal, PJ) (x-Achse).



**Abb. 18: Test auf Apoptose-Induktion in HL-60-Zellen nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg, Bilder rechts) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle (Bilder links) mittels TUNEL-Assay ohne (oben) und mit 3 h 0,5 µg/ml Camptothecin-Behandlung (unten). Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse, die nach Färbung mit TUNEL-FITC (y-Achse: FL-1) und Propidiumjodid (x-Achse: PJ, DNA-Gehalt).**



Bei den nicht mit Camptothecin vorbehandelten befeldeten oder unbefeldeten HL-60-Zellen zeigen sich vergleichbar zu den Ergebnissen vom Annexin V-Assay keine wesentlichen Hinweise auf Apoptoseinduktion.

Dagegen sind bei allen Camptothecin-vorbehandelten HL-60-Zellen, exponiert oder nicht-befeldet, wie auch schon beim Annexin V-Assay, deutliche Apoptoseprozesse nachzuweisen. Essentiell ist somit auch hier, daß zwischen den befeldeten und nicht-befeldeten Zellen keine Unterschiede in der Apoptoserate herrschen. Somit induzieren EMF unter den vorliegenden Versuchsbedingungen keine zusätzlichen Apoptosevorgänge.

### **3.4.3. Zusammenfassung**

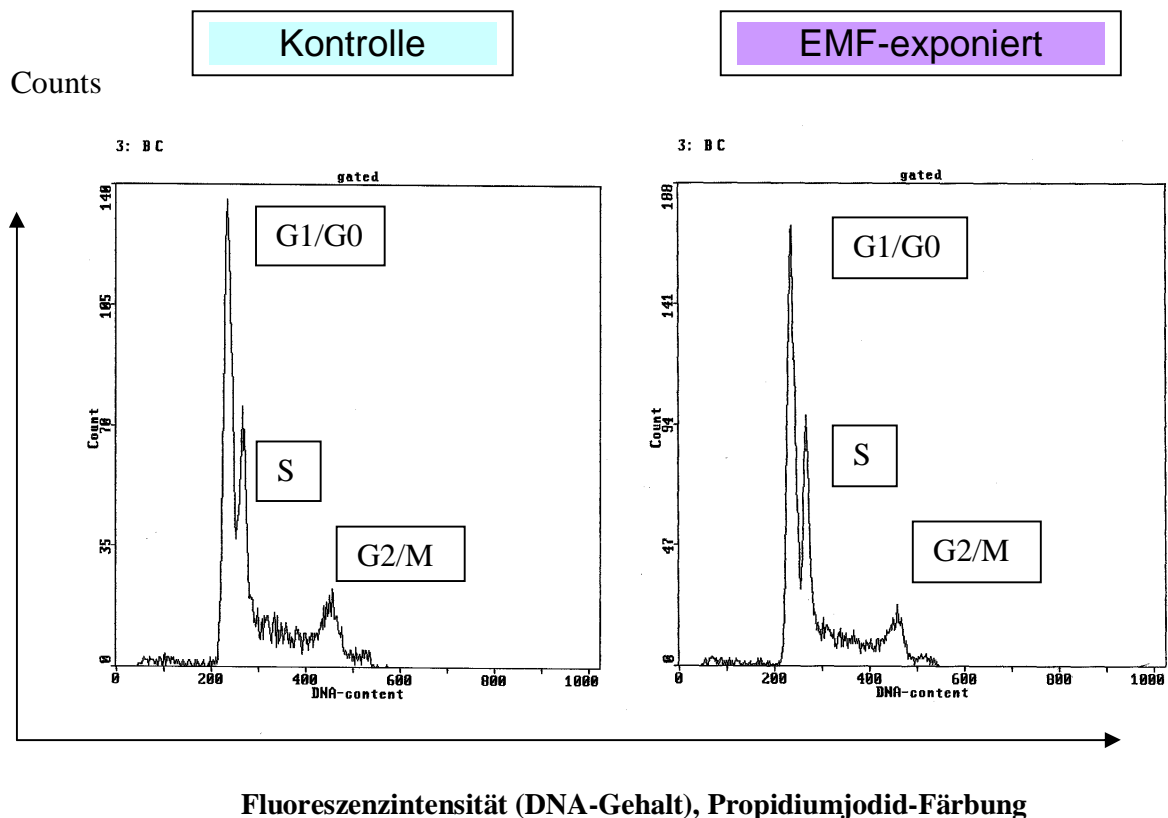
Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß die dem 2450 MHz Hochfrequenzfeld exponierten, bereits transformierten humanen Promyelozytenleukämiezellen HL-60 ohne Camptothecin-Behandlung im Vergleich zu den identischen Kontrollzellen keine Unterschiede zeigen. Damit wird deutlich, daß die Mikrowellenexposition keine erhöhte Apoptoserate bei den HL-60-Zellen induziert. Bei den mit dem Apoptose-Induktor Camptothecin behandelten Positivkontrollzellen zeigen sowohl die zusätzlich EMF-exponierten HL-60-Zellen als auch die mit Camptothecin behandelten Kontrollzellen Apoptosezeichen, die in der Stärke in etwa vergleichbar sind. Diese Schlußfolgerung kann sowohl aus den Ergebnissen des Annexin V-Assay als auch aus den Ergebnissen des TUNEL-Assay gezogen werden.

## **3.5. Untersuchungen zum Zellzyklus und zum Wachstumsverhalten**

Die Beeinflussung des Zellzyklus und des Wachstumsverhaltens bzw. der Verdopplungszeit von Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Beobachtung der Wirkung elektromagnetischer Felder.

### **3.5.1. Beeinflussung des Zellzyklus nach EMF-Exposition**

Die Zellzyklusmessungen erfolgen mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Die hier abgebildeten repräsentativen Propidiumjodid-gefärbten Histogramme (Abb. 19) zeigen den Effekt elektromagnetischer Wellen nach 24 h Exposition auf den Zellzyklus der HL-60-Zellen. Die linke Graphik zeigt die nicht befeldeten Kontrollzellen und die rechte Graphik vergleichend die RF-EMF-exponierten Zellen. Evident wird, daß es keinerlei nennenswerte Veränderungen in der Proliferation oder im Übergang in verschiedene Zellzyklusstadien zwischen exponierten und nicht-exponierten Zellen gibt. Beide Gruppen, sowohl befeldete als auch unbefeldete Zellen, verhalten sich also gleich.



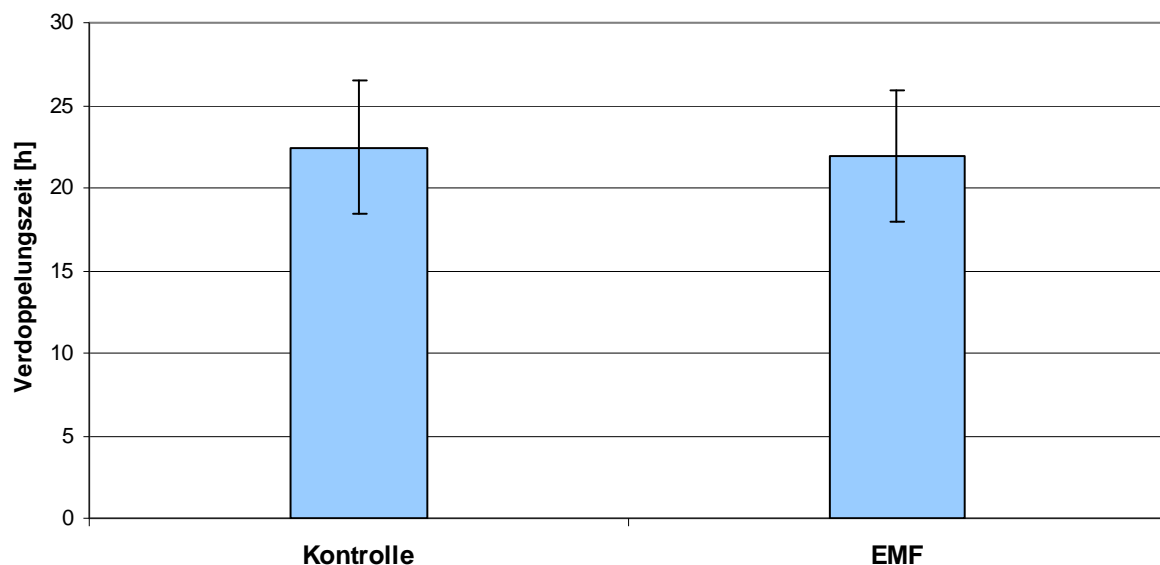
**Abb. 19: Zellzyklusmessung mittels Durchflußzytometrie mit Darstellung des Verhältnisses von HL-60-Zellen in der G1/G0-, S- und G2/M-Phase nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg, Bild rechts) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle (Bild links). G1/G0-, S- und G2/M-Peaks sind markiert.**

### 3.5.2. Beeinflussung des Wachstumsverhaltens nach EMF-Exposition

Um eine eventuelle Beeinflussung des Zellwachstums durch die Einwirkung elektromagnetischer Wellen aufzuzeigen wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen die Verdopplungszeit der HL-60-Zellen bestimmt. Eine Veränderung des Wachstumsverhaltens der Zellen kann einerseits eine Veränderung in der Wachstumsgeschwindigkeit bedeuten, andererseits kann sie aber auch durch Veränderungen der Länge bestimmter Zellzyklen verursacht werden. Ebenso erfaßt die Bestimmung des Zellwachstums, im Gegensatz zur Bestimmung der akuten Zytotoxizität mittels Trypanblaufärbung, auch reversible Veränderungen in der log-Wachstumsphase der HL-60-Zellen. So steht das veränderte Wachstumsverhalten repräsentativ für komplexe Veränderungen im DNA-Reparatursystem mit dabei fehlerhaften Abläufen für eventuell entstehende Mutationen und ihre „Fixierung“. So kann die Untersuchung des Zellwachstums wichtige Hinweise für die Tumorpromotion bzw. -propagation geben. Durch die Analyse des Wachstums bzw. der Wachstumshemmung können demnach wichtige Informationen zur toxischen Wirkung von RF-EMF gewonnen werden.

**Tab. 11: Verdoppelungszeit bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Einzelergebnisse aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

	Versuchsgruppe	
	Kontrolle	EMF
Exp. 1	18,90	17,80
Exp. 2	26,90	25,70
Exp. 3	21,60	22,30
Mittelwert	22,47	21,93
SD	4,07	3,96



**Abb. 20: Verdoppelungszeit bei HL-60-Zellen nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) im Vergleich zur nicht befeldeten Kontrolle.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Einzelergebnisse aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

In Abb. 20 sind die Verdopplungszeiten nach 24-stündiger Befeldung mit Mikrowelle (2450 MHz, SAR 1,114 W/kg) im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Dabei werden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Einzelergebnisse aus jeweils 3 unabhängigen

Experimenten aufgeführt.

Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß sich die Verdopplungszeiten der Kontrollzellen nicht wesentlich von denen der befeldeten Zellen unterscheiden. Die Verdoppelungszeit EMF-exponierter Zellen beträgt  $21,9 \pm 4,0$  h, die der Kontrollzellen  $22,5 \pm 4,1$  h.

Der Abbildung ist zusammenfassend zu entnehmen, daß die dem Hochfrequenzfeld (2450 MHz) exponierten, bereits transformierten humanen weißen Promyelozytenleukämiezellen im Vergleich zu den identischen Kontrollzellen ohne EMF-Exposition keine vielfache Steigerung des Wachstums zeigen.

## 4. Diskussion

Die Diskussion um mögliche Gesundheitseffekte durch im Alltag vorkommende Hochfrequenzfelder, die bei der Nutzung von Mobilfunkgeräten oder Mikrowellengeräten auftreten, hat sich zunehmend auf die Fragestellung nach karzinogenen Effekten und damit auf die Auslösung von Veränderungen auf DNA-Ebene fokussiert.

Unstrittig ist inzwischen, daß mögliche krebserzeugende Effekte von EMF im Radiofrequenzbereich nicht auf direkte genotoxische Wirkungen zurückzuführen sind, da in diesen Bereichen nicht ausreichend hohe Energien erzeugt werden können, um auf diese Weise Biomoleküle wie z.B. die DNA durch Spaltung von Atombindungen zu schädigen (Bernhardt 1992, Tenforde 1990, 1991, 1992, Cridland 1993, Heikkinen et al. 2001). Ein Forschungsschwerpunkt gilt daher der Frage, ob Mobilfunkfelder bei der Krebsentwicklung verstärkend wirken können.

Die grundlegende Strategie der vorliegenden Doktorarbeit war es zu prüfen, ob Mikrowellenfelder in der Lage sind, die DNA-Integrität in Form von DNA-Strangbrüchen zu verändern, die Vitalität der Zellen, das Wachstumsverhalten bzw. die Zellproliferation und den Zellzyklus zu beeinflussen und/oder Apoptoseprozesse zu induzieren. Als Ergebnis zeigt sich, daß die verwendeten HF-EMF (2450 MHz, continuous wave, SAR 1,114 W/kg, 24 h Befeldungszeit) bei den HL-60-Zellen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen geführt haben. Veränderungen in der Vitalität oder im Wachstumsverhalten der Zellen, wie Veränderungen der Zellproliferation oder des Zellzyklus, oder eine Induktion von Apoptoseprozessen werden durch die EMF nicht verursacht.

Die nachfolgende Diskussion beschränkt sich nicht nur auf die verwendeten Frequenzen und Modulationen, die originär bei der Mikrowelle Einsatz finden, sondern ist auch auf Studien die mit anderen Trägerfrequenzen im Bereich von 100 MHz bis 10 GHz gearbeitet haben ausgedehnt.

Der Nachweis von DNA-Strangbrüchen in dieser Arbeit deckt sich mit den Ergebnissen der Versuche von Lai und Singh (1995, 1996a und b), in denen mit Hilfe des Comet-Assays 4 Stunden nach Exposition mit einem gepulsten 2450 MHz-Feld (2 h) bei einem SAR von 0,6 bis 1,2 W/kg ein statistisch signifikanter Anstieg von Einzel- und Doppelstrangbrüchen im

Hippocampus und im Gehirn von Sprague-Dawley-Ratten nachgewiesen werden konnte. Wurden die Tiere vor der Exposition gegenüber EMF mit Substanzen wie Melatonin oder N-tert-butyl- $\alpha$ -Phenylnitron behandelt, die als Radikalfänger gelten, so traten keine Veränderungen an der DNA auf (Lai und Singh 1997a und b). Die gleiche Arbeitsgruppe wies in Folgearbeiten 1997 und 1998 DNA-Strangbrüche in Rattenhirnzellen auch nach Exposition mit einem 60 Hz Magnetfeld nach (Lai und Singh 1997c, Singh und Lai 1998).

Es seien noch weitere Arbeitsgruppen genannt, die ebenfalls nach Mikrowellenexposition signifikante DNA-Strangbrüche fanden:

Verschaeve et al. (1994), benutzten ein GSM Mobilfunksignal, um menschliche und von Ratten abstammende Lymphozyten zu exponieren. Dabei zeigten sich signifikant erhöhte Strangbruchraten bei höheren, aber noch nicht thermisch wirkenden Expositionsenergien.

Phillips et al. (1998) exponierten für 2 Stunden Molt-4 T-lymphoblastoide Zellen mit Mobilfunk im SAR-Bereich von 0,0024 W/kg bis 0,026 W/kg. Die Exposition gegenüber diesen niedrigen Energien zeigte sowohl eine Erhöhung als auch eine Senkung von DNA-Schäden. Der Nachweis der verminderten DNA-Schäden deutet möglicherweise auf eine zunächst gestiegene Rate an DNA-Strangbrüchen mit einer darauf anschließenden Reparaturphase hin (Meltz 1995).

Die Ergebnisse der sogenannten Reflex-Studie 2004 (<http://www.izgmf.de/Reflex-Project-Zusammenfassung.pdf>) zeigen ein ähnliches Bild. Neben humanen Fibroblasten wurden auch Granulosazellen und vergleichbar mit dieser Arbeit HL-60 Zellen mit in die Untersuchungen einbezogen. Die HF-EMF-Exposition wurde mit 1900 MHz (GSM) oder 1800 MHz (GSM) für 24 h mit SAR-Werten von 0,3 bis 2,0 W/kg durchgeführt. Die Autoren der Studien haben für den Nachweis von DNA-Schädigungen den alkalischen und den neutralen Comet-Assay verwendet. DNA-Brüche konnten mit beiden Comet-Assay-Versionen nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse auf Einzel- und Doppelstrangbrüche hinweisen. Zusätzlich wurde bei den HL-60 Zellen durchflußzytometrisch die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) nachgewiesen, so daß die Autoren diskutieren, daß die DNA-Brüche durch die Bildung von freien Radikalen induziert wurden (Fitzner et al. 2004). Insbesondere Rüdiger et al. aus der Reflex-Forschungsgruppe (Rüdiger et al. 2003), der kultivierte humane Fibroblasten für 16 h und 24h HF-EMF von 1800 MHz bei SAR-Werten von 1,2 oder 2 W/kg aussetzte, konnte mit Hilfe des Comet-Assays zeigen, daß Expositionsmodulationen wie intermittierend und TALK-Modus mehr DNA-Schaden verursachten als kontinuierliche Radiofrequenzen allein.

All die genannten Studien zeigen eine Übereinstimmung in Hinsicht auf DNA-Strangbrüche nach HF-EMF-Exposition mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen. Auch wenn zum Nachweis von Strangbrüchen bei allen der Comet-Assay verwendet worden ist, so können die Resultate ansonsten nur schwer verglichen werden. Grund dafür sind unterschiedliche Befeldungsanlagen, verschiedene Expositionsfrequenzen und -modulationen, unterschiedlich lange Expositionszeiten, verschiedene SAR-Werte sowie unterschiedliche, schwer vergleichbare Zelltypen. Auch können bei einigen Arbeiten auf Grund fehlender Temperaturkontrolle thermische Wirkungen nicht ausgeschlossen werden.

Gegenüber den Arbeiten, die DNA-Schäden nach Elektromagnetfeldexposition nachweisen, stehen eine Vielzahl von Untersuchungen, die genotoxische Wirkungen von HF-EMF verneinen. So stehen die Ergebnisse von Malyapa et al. (1998a) in direktem Widerspruch zu den Arbeiten von Lai und Singh (1995, 1996a und b). Hier wurden in einer Replikation der Versuche von Lai und Singh (1995, 1996a und b) unter gut vergleichbaren Versuchsbedingungen Sprague-Dawley-Ratten 2 Stunden lang mit 2450 MHz kontinuierlichem EMF und einem mittleren SAR von 1,2 W/kg befeldet und anschließend mit einer Guillotine oder durch CO<sub>2</sub>-Vergiftung getötet. Die dann entnommenen Proben vom Kortex und Hippocampus der Tiere wurden im alkalischen Comet-Assay auf DNA-Schäden hin untersucht. Die statistische Bewertung zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der DNA-Brüche zwischen exponierten und scheinexponierten Tieren. Diejenigen Tiere, die jedoch mit CO<sub>2</sub> eingeschlafert worden waren, wiesen eine erhöhte Anzahl von DNA-Strangbrüchen auf. Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, welche Unsicherheiten bei der Bewertung von DNA-Brüchen durch verschiedene Faktoren, wie z.B. allein durch die Art der Tötung der Tiere, entstehen können.

In einer früheren in-vitro-Studie untersuchten Malyapa et al. (1997a) permanente Glioblastomzellen der Linie U87MG und C3H 10T1/2 Bindegewebszellen aus C3H-Mäusen nach 2 stündiger Exposition in einem 2450 MHz Feld mit SAR-Werten von 0,7 und 1,9 W/kg mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays und fanden ebenfalls keinerlei DNA-schädigenden Einfluß der Elektromagnetfelder. Auch in einer zweiten Versuchsreihe, in der die gleichen Zellen Feldern der amerikanischen Mobilfunknormen 835,62 MHz „frequency-modulated continuous-wave“ (FMCW) und 847,74 MHz „code-division multiple-access“ (CDMA) mit einem SAR-Wert von 0,6 W/kg bei unterschiedlichen Befeldungszeiten von bis zu 24 h ausgesetzt wurden, ließ sich kein schädigender Einfluß auf die DNA nachweisen (Malyapa et al. 1997b). In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde die Wirkung von

Mobilfunkfeldern mit höheren SAR-Werten von 3,2 bis 5,1 W/kg (CW und moduliert) an den C3H 10T1/2 Bindegewebszellen getestet, wobei die Expositionszeiten bei 2, 4 und 24 Stunden lagen (Li et al. 2001, Malyapa et al. 2001). Auch hier konnten mit dem Comet-Assay in keiner Gruppe DNA-Schäden nachgewiesen werden, was zeigt, daß unter diesen Bedingungen auch Felder oberhalb der Grenzwerte keinen DNA-Schaden induzieren.

Mehrere Arbeiten zu dieser Problematik veröffentlichte auch die Arbeitsgruppe von Vijayalaxmi et al. in den Jahren 1997 bis 2001, wobei sie zum Teil den alkalischen Comet-Assay verwendeten. In einer Arbeit von 2000 wurde entsprechend der Arbeit von Malyapa ebenfalls versucht, die Ergebnisse von Lai und Singh zu reproduzieren, in dem menschliche Lymphozyten in-vitro nach 2 stündiger Exposition in einem gepulsten 2450 MHz EMF bei einem SAR von  $2,135 \pm 0,005$  W/kg im alkalischen Comet-Assay untersucht wurden. Es konnten auch hier bei den im Elektromagnetfeld exponierten Zellen, im Gegensatz zu den mit ionisierender Strahlung behandelten Zellen (Positivkontrolle), weder unmittelbar, noch 4 Stunden nach der Befeldung Änderungen der DNA aufgezeigt werden (Vijayalaxmi et al. 2000).

Als weitere in-vitro-Untersuchungen seien noch Arbeiten von McNamee et al. (2002a und b) genannt, in denen humane Blutkulturen 2 Stunden lang bei relativ konstanter Temperatur um 37 °C einem kontinuierlichen und einem pulsmodulierten 1900 MHz EMF bei SAR-Werten von 0 bis 10 W/kg ausgesetzt und anschließend mit Hilfe des Comet-Assays untersucht wurden. Es konnten keinerlei DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden.

Es gibt noch weitere Arbeiten zu diesem Gebiet, die negative Ergebnisse in Hinsicht DNA-Strangbrüche zeigen. In einer umfangreichen Arbeit haben Tice et al. (2002) den Einfluß von mehreren Feldkonfigurationen, nämlich 837 MHz mit 12,5 kHz sinusförmig oder mit 217 Hz pulsförmig moduliert (TDMA und CDMA) und 1909,8 MHz mit 217 Hz pulsförmig moduliert GSM bei einer Expositionsdauer von jeweils 3 und 24 h in vier SAR-Wertstufen zwischen 1 und 10 W/kg (meist 1, 2,5, 5 und 10 W/kg) auf Vollblutkulturen untersucht. Dazu wurde die alkalische Version des Comet-Assays durchgeführt. Es zeigten sich keine DNA-Strangbrüche durch die Einwirkung von HF-EMF.

Zhang et al. (2002) untersuchten ebenfalls humane Blutzellen nach Exposition mit 2450 MHz Mikrowellenfeldern. Sie verglichen Zellen, die im Elektromagnetfeld für 2 Stunden exponiert wurden, mit Zellen, die für 24 Stunden Mitomycin C ausgesetzt waren und mit Zellen, die nach der Elektromagnetfeldexposition zusätzlich Mitomycin C für 24 Stunden erhalten hatten.



Auch hier zeigte sich, daß die Elektromagnetfelder allein keine DNA-Schäden induzieren konnten. Durch das Zellgift Mitomycin C induzierte Schäden jedoch wurden in Kombination mit HF-EMF verstärkt.

In zwei neueren Studien (Roti Roti 2004, Lagroye et al. 2004b) wurden C3H 10T1/2 Bindegewebszellen aus C3H Mäusen auf die Wirkung von 2450 MHz (CW) untersucht, wobei auch hier der Comet-Assay angewandt wurde. Bei beiden Arbeitsgruppen wurden die Zellen 2 Stunden lang bei SAR-Werten von 1,9 W/kg exponiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen 4 Gy ionisierender Strahlung oder Cisplatin (als Kontrolle für DNA-Protein-Schäden) ausgesetzt. Die Autoren fanden keine signifikanten Veränderungen durch die HF-EMF in Bezug auf die Induktion von gentoxischen Effekten.

Mit Ausnahme der Reflex-Studie gibt es in der Literatur nur wenige Untersuchungen zur Gentoxizität mittels Comet-Assay nach HF-EMF-Exposition an Zellkulturen in vitro unter gleichzeitiger Beobachtung möglicher Störungen der Zellproliferation und/oder apoptotischer Vorgänge.

Zu diesen Studien gehört eine Arbeit von McNamee et al. (2003), die in Anlehnung an die oben genannten Experimente von 2002 der gleichen Arbeitsgruppe entstand. In dieser Studie wurden humane Blutzellen statt wie vorher für 2 Stunden nun für 24 Stunden einem kontinuierlichen oder gepulsten EMF von 1900 MHz bei konstanter Temperatur von  $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  und SAR-Werten von 0 bis 10 W/kg ausgesetzt und anschließend mit dem alkalischen Comet-Assay untersucht. Es konnten hier auch nach der längeren Expositionszeit von 24 Stunden keine DNA-Schäden nachgewiesen werden. Das parallel untersuchte Proliferationsverhalten (Proliferations Index) zeigte ebenfalls keinen Unterschied der exponierten Zellen zu den Kontrollen.

Als weitere Arbeiten, die sich mit der Frage nach Apoptosevorgängen zusätzlich zur Untersuchung von DNA-Schäden mittels Comet-Assay beschäftigten, seien Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Hook et al. (2004a und b) genannt. Sie setzten Molt-4 T-lymphoblastoide Zellen 24 Stunden lang vier verschiedenen Frequenzmodulationsformen, nämlich 847,74 MHz (CDMA), 835,62 MHz (FDMA), 813,56 MHz (iDEN) und 836,55 MHz (TDMA) bei SAR-Werten von 3,2 W/kg für CDMA und FDMA, 2, 4 oder 24 mW/kg für iDEN und 2,6 oder 26 mW/kg für TDMA, aus und untersuchten sie anschließend mit Hilfe des Comet- und

Annexin V-Assays. Es konnten zwischen den befeldeten Zellen und den Kontrollzellen keine statistisch signifikanten Unterschiede in Hinsicht DNA-Schäden oder Apoptose nachgewiesen werden (Hook et al. 2004a). In weiterführenden Arbeiten wurden zusätzlich zu humanen Molt-4 Zellen auch C3H 10T1/2 Mausfibroblasten auf die Wirkung von 835,62 MHz (CDMA) oder 847,74 MHz (FM) bei SAR-Werten von 3,2 W/kg untersucht. Die Expositionszeiten betragen 2, 4 oder 24 Stunden. Auch hier wurde zur Detektion von DNA-Schäden der Comet-Assay und zur Erfassung von Apoptoseprozessen der Annexin V-Assay verwendet. Es fanden sich wie bei der ersten Arbeit auch hier keinerlei Hinweise auf DNA-Strangbrüche oder Apoptose (Hook et al. 2004b). Die selbe Arbeitsgruppe untersuchte humane Molt-4 Lymphoblasten auch für Expositionszeiten von 2, 3 oder 21 Stunden in einer TEM-Zelle 815 und 835 MHz (FMCW, iDEN, CDMA und TDMA) bei SAR-Werten von 2, 4, 24  $\mu$ W/kg und etwa 3 W/kg und untersuchte sie anschließend mit Hilfe des Comet-Assays und des Annexin V-Assays. Auch hier konnten keine DNA-Schäden aufgezeigt werden (Hook et al. 2004b).

Erwähnenswert sei an dieser Stelle auch eine Studie von Miyakoshi et al. (2002, 2004), die humane Gliomazellen MO54 und Hamsteroarialzellen CHO-K1 für eine Expositionszeit von 2 Tagen kontinuierlichen HF-EMF von 2450 MHz und 1500 GHz (PDC) bei hohen SAR-Werten von bis zu 200 W/kg aussetzten. DNA-Strangbrüche bei SAR-Werten von bis zu 100 W/kg wurden nicht gefunden. Arbeiten zu Zellzyklusveränderungen dauern noch an.

DNA-Brüche stellen einen sehr empfindlichen und frühen Parameter zur Messung genotoxischer Effekte dar. Die biologische Bedeutung der DNA-Strangbrüche ist jedoch unklar, da diese zum Beispiel auch bei sportlichen Aktivitäten wie Laufen etc. auftreten und vom Körper meist effektiv repariert werden können. Untersuchungen mit ionisierenden Strahlen zeigen eine rasche und vollständige Reparatur der Schäden an. Es ist daher davon auszugehen, daß mögliche Strangbrüche, die auch durch nicht-ionisierende Strahlung wie hochfrequente elektromagnetische Felder ausgelöst werden, rasch und effektiv repariert werden. Somit stellt sich die Frage ob der Nachweis von DNA Strangbrüchen angesichts ihrer unklaren biologischen Bedeutung als ein alleiniger Parameter ausreichend sei. Aus diesem Grund sind zusätzliche, stützende Befunde wie die Untersuchungen zur Zellproliferation, Zellzyklus oder Zellwachstum sowie von Apoptosevorgängen unerlässlich.

Aus diesem Grund legten die Autoren der bereits weiter oben genannten Reflex-Studie 2004

(<http://www.izgmf.de/Reflex-Project-Zusammenfassung.pdf>) auf ergänzende Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und zu Apoptosevorgängen besonderen wert. Bei humanen Fibroblasten, Granulosazellen und HL-60-Zellen konnten nach 24 stündiger Exposition mit 1800 MHz (GSM) und 1900 MHz (GSM) bei SAR-Werten von 0,3 bis 2 W/kg DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden. Die näher untersuchten HL-60-Zellen zeigten jedoch weder Veränderungen der Zellproliferation, des Zellzyklus oder des Zellwachstums noch Anzeichen von Apoptosevorgängen. Dieses letztgenannte Ergebnis der Reflex-Studie korreliert mit den Daten, die auch in dieser Arbeit mit demselben Zellsystem gefunden wurden.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, daß die in beiden Arbeiten gefundenen DNA-Schäden zu keiner Änderung des Wachstumsverhaltens der bereits transformierten menschlichen Tumorzellen führten. Somit ist eine Kanzerogenität der einwirkenden HF-EMF in diesem hochspeziellen Zellsystem nicht nachzuweisen.

Der Nachweis genotoxischer Wirkungen durch HF-EMF auf bereits transformierte HL-60-Zellen kann nicht automatisch auf andere Zellen, besonders nicht auf primäre Zellen, und schon gar nicht auf Organismen bzw. auf den Menschen übertragen werden.

Schlußfolgernd aus dem Vergleich der Ergebnisse dieser Doktorarbeit und den oben erwähnten Studien kann festgestellt werden, daß es bisher keinen unwidersprochenen Nachweis direkter oder indirekter genetischer Schäden durch Exposition mit HF-EMF in Form von DNA-Strangbrüchen gemessen mit dem Comet-Assay gibt.

## Nachtrag zur Diskussion

Bei der Frage nach der Wirkung von elektromagnetischen Feldern und ihrer in vitro und in vivo Effekte werden in den letzten Jahren zunehmend eine Reihe biologischer Effekte diskutiert, die den nicht-thermischen Wirkungen von elektromagnetischen Strahlen zugeschrieben werden (Masley et al. 1999, Hyland 2000, vgl. auch Wiedemann et al. 2002, Leszczynski et al. 2002, Nakamura et al. 2003, Belyaev 2005, Friedman et al. 2007, Campisi et al. 2010).

Bei den in vitro Untersuchungen geht es um Veränderungen in der Proteinbiosynthese und der Apoptose, um die Beeinflussung von Enzymaktivitäten, insbesondere antioxidativ wirkender Enzyme und Veränderungen im Ionenhaushalt von Zellen. Ein wichtiger Aspekt betrifft auch die mögliche Bildung freier Radikale und ihre Reaktion mit der DNA (Meyer et al. 1995, Behari 1998, Paulraj und Behari 1999, 2002, 2004, 2006a und b, Bohr und Bohr 2000, Leszczynski et al. 2002, Nylund und Leszczynski 2006, Behari und Paulraj 2007, Friedmann et al. 2007, Joubert et al. 2007 und 2008, De Iuliis et al. 2009, Campisi et al. 2010, Kesari und Behari 2009 und 2010, Kesari et al. 2010).

Auch wurden zahlreiche Arbeiten zu in vivo Einflüssen von EMF auf das Nervensystem, auf den Gehirnmotabolismus, die Blut-Hirn-Schranke und die Gehirnfunktion veröffentlicht (Töre 2001, Stögbauer 2002, Leszczynski et al. 2002, Hamblin et al. 2004, Mausset-Bonnefont et al. 2004, Xu et al. 2006, Brillaud et al. 2007, Zhao et al. 2007, Carruba et al. 2008, Volkow et al. 2011).

Allerdings bleiben die Ergebnisse bezüglich der Wirkung von EMF weiter uneinheitlich.

So können Hook et al. (2004), Lagroye et al. (2004a und b) und Zeni et al. (2003) keinerlei DNA-schädigende Wirkungen von HF-EMF feststellen. Dagegen beschrieben Joubert et al. im Jahr 2008 die Induktion von Apoptose bei kultivierten Rattenhirnzellen nach EMF-Exposition (Joubert et al. 2008). Die gleiche Arbeitsgruppe hatte allerdings ein Jahr zuvor keine Apoptose nach EMF-Exposition beobachten können (Joubert et al. 2007). Ebenso kontrovers sind die Befunde von EMF auf die Zelldifferenzierung, auf Apoptoseprozesse, auf die Bildung von Hitze-Schock-Proteinen oder freier Radikale sowie auf die Plasmamembran und die Entstehung von DNA-Schäden (Cleary et al. 1996, Capri et al. 2004, Lantow et al. 2006, Lixia et al. 2006).

2005 wurden durch eine an der REFLEX-Studie (Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards From Low Energy Electromagnetic Field Exposure Using Sensitive in vitro Methods) teilnehmende Arbeitsgruppe DNA-Strangbrüche nach EMF-Exposition bei humanen Fibroblasten und bei transformierten Rattengranulosazellen beschrieben (Diem et al. 2005). Der Nachweis der DNA-Schäden erfolgte durch den neutralen und alkalischen Comet-Assay.

Dieses Resultat konnte durch eine Wiederholung des Experiments unter gleichen Bedingungen mit entsprechender EMF-Exposition und Durchführung des alkalischen Comet-Assay durch die Arbeitsgruppe von Speit et al. nicht reproduziert werden (Speit et al. 2007).

Auch konnten die in der Reflexstudie mit HL-60-Zellen erhobenen Befunde mit einer anderen Zellcharge nicht wiederholt werden (R. Gminski, persönliche Mitteilung).

Auch zeigte eine interlaboräre Studie, die Lymphozytenkulturen von 10 gesunden Spendern verwendete, keine genotoxischen Effekte von EMF (Scarfi et al. 2006).

Eine neuere Studie von Campisi et al. von 2010 fand eine Steigerung in der Bildung freier Sauerstoffradikale und eine erhöhte DNA-Fragmentation bei kultivierten Ratten-Astroglialzellen nach 20minütiger Exposition von modulierter EMF (900MHz mit 50Hz-Amplituden bei sinusoidaler Wellenform und 100%igem Modulationsindex). Diese Beobachtung wurde auf eine Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels, hervorgerufen durch eine Hyperstimulation der Glutamat-Rezeptoren, zurückgeführt. Kein Effekt war allerdings bei kürzerer EMF-Exposition oder kontinuierlicher Applikationsform der EMF nachweisbar (Campisi et al. 2010).

Neben den Zellstudien gibt es auch einige aussagekräftige Tierstudien, insbesondere Studien mit Ratten und Mäusen.

Eine gute Übersicht über zur Frage der Karzinogenität von RF-EMF bietet die Arbeit von Moulder et al. (2005).

In mehreren Studien von Paulraj und Behari konnte an Rattenhirnen nach Exposition gegenüber EMF ein Anstieg im Calciumionen-Ausfluß, eine Steigerung der Ornithindecaboxylase-Aktivität sowie eine Abnahme der Calcium-Ionen-abhängigen Proteinkinase-Aktivität festgestellt werden (Paulraj et al. 1999, Paulraj und Behari 2002, 2004, 2006a). Diese Effekte wurden damit erklärt, dass eine Exposition gegenüber EMF zu Veränderungen von Membran-gebundenen Enzymen führt und dadurch Veränderungen der Zellproliferation- und Zelldifferenzierung im Sinne eines Tumorpromotors hervorrufen könnte (Paulraj und Behari 2002, 2004).

Unter Verwendung des Comet-Assays konnte die gleiche Arbeitsgruppe um Paulraj vermehrt DNA-Strangbrüche bei Rattenhirnen nach Exposition gegenüber Elektromagnetfeldern von 16,5GHz und 2,45GHz aufzeigen (Paulraj und Behari 2006b, Behari und Paulraj 2007, Kesari et al. 2010). Auch eine weitere Arbeit an Ratten nach Exposition mit 50 GHz-EMF zeigte DNA-Strangbrüche sowie eine signifikante Verminderung verschiedener antioxidativer Enzyme, wie Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase. Zudem wurde eine Reduktion der Proteinkinase C-Aktivität nachgewiesen. Die Katalase-Aktivität war jedoch erhöht (Kesari und Behari 2009). Die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Veränderungen von Enzymaktivitäten konnten noch

in einer weiteren Arbeit nach EMF-Exposition mit 2,45GHz gezeigt werden (Kesari und Behari 2010).

Die Autoren kamen zu dem Schluß, dass freie Radikale eine Rolle bei der Verminderung der Proteinkinase C-Aktivität sowie bei den Veränderungen der antioxidativ wirkenden Enzyme und der Induktion von DNA-Strangbrüchen spielen könnten (Kesari und Behari 2009).

Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten Veränderungen von Zellenzymaktivitäten nach EMF-Exposition (Meral et al. 2007) und postulierten, dass oxidativer Stress eine Schlüsselrolle bei Veränderungen von Zellprozessen und möglicherweise bei der Entstehung von DNA-Schäden spielen könnte (Friedman et al. 2007, Guney et al. 2007, Desai et al. 2009, De Iuliis et al. 2009, Campisi 2010). In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnten Guney et al. bei Endometriumzellen von 900MHz-EMF-exponierten Ratten einen Anstieg von Stickoxid und Malondialdehyd, einem Biomarker für oxidativen Stress, nachweisen. Dieser Anstieg war nach Zugabe von Vitamin C und E vermindert. Zudem wurde in den EMF-exponierten Endometriumzellen eine Reduktion von Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase beobachtet. Auch hier konnte die Aktivität der genannten antioxidativen Enzyme unter Hinzugabe von Vitamin C und E beeinflusst bzw. gesteigert werden (Guney et al. 2007).

In einer anderen Studie von Kesari und Behari (2010) wurde bei Ratten nach kontinuierlicher EMF-Exposition (2,45 GHz) eine Abnahme der Spermienzahl beobachtet. Auch zeigte sich eine Steigerung apoptotischer Zellen in den Rattenhoden. Wie bereits bei den o.g. Untersuchungen an Rattenhirnen sahen die Forscher auch hier eine Veränderung antioxidativer Enzyme wie Superoxiddismutase oder Glutathionperoxidase und eine Steigerung der Katalaseaktivität. Die Autoren folgerten, dass chronische EMF-Exposition durch vermehrten oxidativen Stress zur Tumorpromotion führen könnte (Kesari et al. 2010). Auch eine Arbeit von Mailankot et al. ergab Hinweise für vermehrten oxidativen Stress nach EMF-Exposition und zeigte zudem eine verringerte Spermienmotilität bei Ratten (Mailankot et al. 2009).

In diesem Zusammenhang sei auch eine in-vitro-Studie von De Iuliis et al. erwähnt, in der menschliche Spermatozoen, die gegenüber oxidativem Stress als besonders sensibel gelten, EMF von 1,8 GHz und verschiedenen SAR-Werten von 0,4 W/kg bis 27,5 W/kg exponiert wurden. Es zeigte sich neben einer verringerten Spermienmotilität und -vitalität auch ein dosisabhängiger Anstieg mitochondrial gebildeter freier Radikale. Parallel dazu konnte auch eine vermehrte Menge an oxidativen DNA-Schäden und DNA-Strangbrüchen festgestellt werden (De Iuliis et al. 2009). DNA-Strangbrüche wurden weiterhin auch in einer humanen Trophoblastzelllinie nach hochfrequenter EMF-Exposition berichtet (Franzellitti et al. 2010).

Der Einfluß von EMF auf Spermien bzw. auf die männliche Fertilität wurde auch in mehreren

retrospektiven epidemiologischen Studien analysiert. Einen Überblick über die Datenlage und die verschiedenen, auch kontroversen Studien (in vitro, in vivo am Tier und epidemiologische Studien) gibt die Arbeit von Desai et al. (2009) und die Arbeit von Agarwal et al. (2011).

Hardell et al. führten seit den 90er Jahren mehrere Fallkontrollstudien durch, um einen Zusammenhang zwischen der Nutzung von Mobiltelefonen und dem Risiko von Hirntumoren zu untersuchen. Dabei ergaben sich Hinweise auf eine Erhöhung des Risikos für verschiedenartige Gehirntumore, insbesondere bei Langzeitnutzern von analogen Mobiltelefonen. Dabei wurde vor allem eine Erhöhung des Tumorrisikos auf der Seite des Kopfes gesehen, an der überwiegend telefoniert wurde (Hardell et al. 2005, 2006, 2007, Hardell und Carlberg 2009, Kurana et al. 2009, Hardell et al. 2010, 2011).

Einige der oben erwähnten Arbeiten zeigen eine Übereinstimmung bezüglich des Auftretens von DNA-Strangbrüchen nach HF-EMF-Exposition mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen. Wie bereits in der Diskussion erwähnt, sind aber die Resultate der Publikationen, auch wenn bei vielen Arbeiten der Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen verwendet worden ist, mit den Ergebnissen dieser Arbeit schwer vergleichbar. Grund dafür sind unterschiedliche Befeldungsanlagen, verschiedene Expositionsfrequenzen und -modulationen, unterschiedlich lange Expositionszeiten, verschiedene SAR-Werte sowie unterschiedliche Zelltypen. Es ist daher in diesem Rahmen nicht möglich, den Gründen für die widersprüchlichen Befunde nachzugehen.

Im Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen stellt die Temperaturkontrolle und die Einhaltung der Temperaturkonstanz einen besonders kritischen und fehleranfälligen Punkt dar, um den Effekt thermischer Nebenwirkungen ausschliessen zu können. So weist eine Grazer Forschungsgruppe anhand ihrer EMF-Untersuchungen an Proteinen auf die Notwendigkeit einer exakten Temperaturkontrolle im Reaktionsgefäß selbst hin, wie sie erst neuerdings durch eine „fiber-optic temperature control“ möglich ist (Damm et al. 2012). Im vorliegenden Fall wurde bei den 1999 durchgeführten Experimenten die Temperatur nur in der Kühlflüssigkeit bestimmt, so dass zusätzliche thermische Effekte nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden können. Insgesamt aber zeigt auch dieser Nachtrag zur Diskussion, dass eine endgültige Antwort auf die Frage eines biologischen Effektes nach einer EMF-Exposition noch aussteht.

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die unmittelbare Exposition von humanen Leukämiezellen gegenüber Elektromagnetfeldern von 2450 MHz, wie sie beispielsweise von handelsüblichen Mikrowellen bei fehlerhafter Abschirmung emittiert werden, die Bildung von DNA-Schäden induzieren kann. Außer genotoxischen Effekten wurden somit auch zytotoxische Effekte hochfrequenter elektromagnetischer Wellen untersucht.

Dazu wurden humane promyelozytische Leukämiezellen HL-60 24 Stunden lang einem 2450 MHz Elektromagnetfeld unter standardisierten Bedingungen ausgesetzt. Die Befeldung der Zellen findet in einer bereits vor dieser Arbeit beschriebenen GTEM-Zelle statt. Durch die in der GTEM-Zelle bestehende Elektromagnetwellenausbreitung im sogenannten TEM-Mode werden annähernd homogene Feldverteilungen, vergleichbar denen in der natürlichen Umwelt, gewährleistet. Die in die GTEM-Zelle eingespeiste Leistung beträgt 8,5 Watt, was einer spezifischen Absorptionsrate SAR von ca. 1,114 W/kg entspricht. Parallel zu den befeldeten Zellen werden Kontrollzellen in einer HF-Abschirmbox, wo der Einfluß induzierter Elektromagnetfelder ausgeschlossen bleibt, untersucht. Alle Zellen, sowohl die befeldeten als auch die unbefeldeten Kontrollzellen, haben vor und während der Versuchszeit möglichst optimale Bedingungen. Bei einer Ausgangszellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml verbleiben alle Zellen bis unmittelbar vor Beginn der Versuche im Brutschrank. Während des Versuchs herrschen durch den um die Zellröhrchen zirkulierenden Weißölkreislauf konstante  $37^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ , wobei Temperatursensoren die Temperaturkonstanz überwachen. Um Apoptoseprozesse nachzuweisen, werden als Positivkontrolle Zellen, die später entweder befeldet oder in der HF-Abschirmbox nicht befeldet werden, mit dem Apoptose-Induktor Camptothecin behandelt. Nach Ablauf der 24 h im Befeldungsversuch werden die befeldeten und die unbefeldeten Zellen den verschiedenen Testverfahren zugeführt. Durch die Durchführung von Vitalitätstests, wie dem Trypanblauexklusionstest, können zytotoxische Effekte aufgezeigt werden. Durch den TUNEL- und Annexin V-Assay wiederum sind Apoptosevorgänge aufzeigbar. Als Kontrolle für eventuelle genotoxische Effekte werden HL-60-Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt und ebenfalls dem Comet-Assay zugeführt.

Der Comet-Assay schließlich offenbart ganz allgemein DNA-Schäden im Sinne von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Diese können neben der direkten Strangbruchinduktion sowohl als Apoptoseprozesse, Nekroseprozesse oder aber auch als veränderte DNA-Reparaturprozesse interpretiert werden. Somit vereinigt der Comet-Assay einerseits den



Nachweis von Reparaturprozessen, von zytotoxischen und genotoxischen Prozessen, und bedarf zur genaueren Unterscheidung jedoch noch zusätzlicher Testverfahren. Schließlich wird in dieser Arbeit als Parameter für die Wachstumsgeschwindigkeit noch die Verdoppelungszeit zwischen den in der HF-Abschirmbox unbefeldeten und den in der GTEM-Zelle befeldeten Zellen verglichen.

Die in der Arbeit mit Hilfe der unterschiedlichen Testverfahren ermittelten Ergebnisse ergeben, daß die Exposition von humanen HL-60-Zellen gegenüber Elektromagnetfeldern von 2450 MHz DNA-Strangbrüche induziert. Die Auslösung von Apoptoseprozessen hingegen kann durch die im TUNEL- und Annexin V-Assay erhobenen Ergebnisse ausgeschlossen werden. Auch signifikante Veränderungen in der Vitalität der Zellen, Veränderungen im Zellzyklus und schließlich im Zellwachstum können bei den befeldeten Zellen im Vergleich zu unbefeldeten Zellen nicht festgestellt werden. Um auszusagen, ob die gesehenen Strangbrüche im Comet-Assay jedoch gleichzusetzen sind mit direkter schädigender Wirkung der hochfrequenten EMF oder ob die Strangbrüche indirekt durch veränderte Reparaturprozesse entstehen, bedarf es weiterer Experimente und anderer zusätzlicher Testverfahren. Dieses würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen, so daß es Aufgabe anderer Forschungsgruppen sein wird, dieser Frage nachzugehen.

In der wissenschaftlichen Diskussion stellte sich die Frage, warum DNA-Brüche bei Lai und Singh (1995) nicht sofort, sondern erst nach vier Stunden festgestellt worden waren.

Da bis heute keine allgemein akzeptierte Vorstellung über die eventuellen Wirkungsmechanismen dieser Felder auf Zellen vorliegt, sollten weitere in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen vor allem mit hochstandardisierten und damit allgemein akzeptierten Expositionsanlagen in dieser Hinsicht durchgeführt werden.

## 6. Literatur

Adey W. R., C. V. Byus, et al. (1999). "Spontaneous and nitrosourea-induced primary tumors of the central nervous system in Fischer 344 rats chronically exposed to 836 MHz modulated microwaves." *Radiat Res* 152(3): 293-302.

Adey W. R., C. V. Byus, et al. (2000). "Spontaneous and nitrosourea-induced primary tumors of the central nervous system in Fischer 344 rats exposed to frequency-modulated microwave fields." *Cancer Res* 60: 1857-63.

Afanasyev V. N., B. A. Korol, et al. (1993). "The use of flow cytometry for the investigation of cell death." *Cytometry* 14(6): 603-609.

Agarwal A., Singh A., et al. (2011). "Cell Phones and Male Infertility: A Review of Recent Innovations in Technology and Consequences." *International Braz J Urol* 37(4): 432-454.

Ahmed N., J. F. Williams, et al. (1991). "The human promyelocytic HL60 cell line: a model of myeloid cell differentiation using dimethylsulphoxide, phorbol ester and butyrate." *Biochem Int* 23(3): 591-602.

Allen P. D., S. A. Bustin, et al. (1993a). "Programmed cell death (apoptosis) in immunity and haematological neoplasia." *Br J Biomed Sci* 50(2): 135-149.

Allen P. D., S. A. Bustin, et al. (1993b). "The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system." *Blood Rev* 7(1): 63-73.

Anderson D., Yu T.-W., et al. (1994). "The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay." *Mutat Res* 307: 261-271.

Anderson D. and M. J. Plewa (1998). "The International Comet Assay Workshop." *Mutagenesis* 13(1): 67-73.

Anderson D., Yu T.-W., et al. (1998). "REVIEW. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure." *Mutagenesis* 13 (6): 539-555.

Andree H. A., C. P. Reutelingsperger, et al. (1990). "Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers." *J Biol Chem* 265(9): 4923-4928.

Antonopoulos A. and G. Obe (1997a). "Der Einfluß von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf den Zellzyklus und die Frequenz von Schwesterchromatidaustauschen: Analysen an menschlichen Lymphozyten in Kultur", in Brinkmann K., Friedrich G. *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 5*, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1997, S. 156-177.

Antonopoulos A. and G. Obe (1997b). "Effects of high-frequency electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro." *Mutat Res* 395(2-3): 209-214.

Armstrong B. G., J. Deadman, et al. (2001). "The determinants of Canadian children's personal exposures to magnetic fields." *Bioelectromagnetics* 22(3): 161-169.

Avishai N., C. Rabinowitz, et al. (2003). "Use of the comet assay for studying environmental genotoxicity: comparisons between visual and image analyses." *Environ Mol Mutagen* 42(3): 155-165.

Barile M. F., H. E. Hopps, M. W. Grabowski (1978), in McGarrity G. J., Murphy G. D. and Nichols W. W. (Hrsg) "Mycoplasma Infection of Cell Cultures" . Plenum Press, New York, S. 35-45.

Bartsch H., C. Bartsch, et al. (2002). "Chronic exposure to a GSM-like signal (mobile phone) does not stimulate the development of DMBA-induced mammary tumors in rats: results of three consecutive studies." *Radiat Res* 157(2): 183-190.

Baumann J. (1992). "Immissionsgrenzwerte zum Schutz der Bevölkerung vor nichtionisierender elektromagnetischer Strahlung im Frequenzbereich 100 kHz-300 GHz", in Schmeer H.R., Elektromagnetische Verträglichkeit EMV '92, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1992, S. 73-85.

Baumler C. B., T. Bohler, et al. (1996). "Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children." *Blood* 88(5): 1741-1746.

Behari J. and R. Mathur (1997). "Exposure effects of static magnetic field on some physiological parameters of developing rats." *Indian J Exp Biol* 35(8): 894-897.

Behari J. (1998). "Interaction of low level modulated RF." *J Bioelectrochem Bioenerg.* 47(1): 247-252.

Behari J. (1999). "Issues in electromagnetic field-biointeractions." *Indian J Biochem Biophys* 36(5): 352-360.

Behari J., Paulraj R. (2007). "Biomarkers of induced electromagnetic field and cancer." *Indian Journal of Experimental Biology* 45: 77-85

Belyaev I. (2005). "Non-thermal biological effects of microwaves." *Microwave Review* 2005 13-29.

Berg H. (1995). "Possibilities and problems of low frequency weak electromagnetic fields in cell biology." *Bioelectrochem Bioenerg* 38(1): 153-159.

Berg H. (1999). "Problems of weak electromagnetic field effects in cell biology." *Bioelectrochem Bioenerg* 48(2): 355-360.

Bernhardt J. H. (1992). "Non-ionizing radiation safety: radiofrequency radiation, electric and magnetic fields." *Phys Med Biol* 37(4): 807-844.

Blaasaas K. G., T. Tynes, et al. (2004). "Risk of selected birth defects by maternal residence close to power lines during pregnancy." *Occup Environ Med* 61(2): 174-176.

Blank M., L. Soo, et al. (1995). "Effects of low frequency magnetic fields on Na,K-ATPase activity." *Bioelectrochem Bioenerg* 38(2): 267-273.

Blank M. and L. Soo (1996). "The threshold for Na,K-ATPase stimulation by electromagnetic fields (Short communication)." *Bioelectrochem Bioenerg* 40(1): 63-65.

Blank M. and L. Soo (1997). "Frequency dependence of Na,K-ATPase function in magnetic fields." *Bioelectrochem Bioenerg* 42(2): 231-234.

Blettner M. and G. Berg (2000). "Are mobile phones harmful?" *Acta Oncol* 39(8): 927-930.

Blettner M., J. Michaelis, et al. (2000). "Workshop on research into the health effects of cellular telephones." *Epidemiology* 11(5): 609-611.

Bohr H., Bohr J. (2000). "Microwave enhanced kinetics observed in ORD studies of protein." *Bioelectromagnetics* 21: 68-72.

Bolske G. (1988). "Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods." *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 269(3): 331-340.

Bowers M. T., S. Ramachandran, et al. (1999). "Optimization of single-cell gel electrophoresis (SCGE) for quantitative analysis of neuronal DNA damage." *BioTechniques* 26: 282-289.

Bowman J. D., D. C. Thomas, et al. (1995). "Hypothesis: the risk of childhood leukemia is related to combinations of power-frequency and static magnetic fields." *Bioelectromagnetics* 16(1): 48-59.

Braune S., A. Riedel, et al. (2002). "Influence of a radiofrequency electromagnetic field on cardiovascular and hormonal parameters of the autonomic nervous system in healthy individuals." *Radiat Res* 158(3): 352-356.

Brillaud E., Piotrowski A., et al. (2007). "Effect of an acute 900 MHz GSM exposure on glia in the rat brain: a time-dependent study." *Toxicology* 238: 23-33.

Bryson G. J., B. V. Harmon, et al. (1994). "A flow cytometric study of cell death: failure of some models to correlate with morphological assessment." *Immunol Cell Biol* 72(1): 35-41.

Campisi A., Gulino M., et al. (2010). "Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field." *Neuroscience Letters* 473: 52-55

Capri M., Scarcella E., et al. (2004). "In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential." *Radiat Res* 162(2): 211-218.

Carrubba S. and Marino A.A. (2008). "The effects of low-frequency environmental-strength electromagnetic fields on brain electrical activity: a critical review of the literature." *Electromagn. Biol. Med.* 27: 83-101

Carter N. P. and E. W. Meyer (1994). "Introduction to the principles of flow cytometry", in Ormerod M. G.: *Flow cytometry. A practical approach.* Oxford University Press, Oxford, pp 1-25.

Chagnaud J. L., J. M. Moreau, et al. (1999). "No effect of short-term exposure to GSM-modulated low-power microwaves on benzo(a)pyrene-induced tumours in rat." *Int J Radiat Biol* 75(10): 1251-1256.

Chang Z. F. (1990). "Post-transcriptional regulation of thymidine kinase gene expression during monocytic differentiation of HL-60 promyelocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 169: 780-787.

Chou C. K., A. W. Guy, et al. (1992). "Long-term, low-level microwave irradiation of rats." *Bioelectromagnetics* 13(6): 469-496.

Cleary S. F., Du Z., et al. (1996). "Effect of isothermal radiofrequency radiation on cytolytic T lymphocytes." *FASEB J* , 10(8): 913-919.

Clontech (1996) : ApoAlert™ Annexin V Apoptosis Kit; Clontech Archives; Available at: <http://clontech.com/archive/JUL96UPD/ApoAlert.html>.

Cohen J. J., R. C. Duke, et al. (1992). "Apoptosis and programmed cell death in immunity." *Annu Rev Immunol* 10: 267-293.

Cohen J. J. (1993a). "Apoptosis." *Immunol Today* 14(3): 126-30.

Cohen J. J. (1993b). "Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function." *Chest* 103(2 Suppl): 99-101.

Cohen, J. J. (1993c). "Apoptosis: the physiologic pathway of cell death." *Hosp Pract (Off Ed)* 28(12): 35-43.

Cohen J. J. (1993d). "What causes the immune system collapse seen in AIDS?" *Science* 260 (5112): 1256.

Cohen D. A., E. A. Fitzpatrick, et al. (1993). "Activation-dependent apoptosis in CD4+ T cells during murine AIDS." *Cell Immunol* 151(2): 392-403.

Collins S. J., R. C. Gallo, et al. (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." *Nature* 270(5635): 347-349.

Collins S. J., F. W. Ruscetti, et al. (1978). "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(5): 2458-2462.

Collins S. J., F. W. Ruscetti, et al. (1979). "Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide." *J Exp Med* 149(4): 969-974.

Collins S. J., A. Bodner, et al. (1980). "Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells." *Int J Cancer* 25(2): 213-218.

Collins S. J. (1987). "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression." *Blood* 70(5): 1233-1244.

Collins A. R., Duthie S. J., et al. (1993). "Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA." *Carcinogenesis* 14 (9): 1733-1735.

Collins A., M. Dusinská, et al. (1997). "Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications." *Environ Mol Mutagen* 30: 139-146.

Collins A. R., V. L. Dobson, et al. (1997). "The comet assay: what can it really tell us?" *Mutat Res* 375(2): 183-193.

Collins A. R. (2002). "The comet assay. Principles, applications, and limitations." *Methods Mol Biol* 203: 163-177.

Compton M. M. (1992). "A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome." *Cancer Metastasis Rev* 11(2): 105-119.

Creutz C. E. (1992). "The annexins and exocytosis." *Science* 258(5084): 924-931.



Cridland N. A. (1993). "Electromagnetic fields and Cancer: A Review of Relevant Cellular Studies", Rep. No. NRPB-R256, National Radiological Protection Board, Chilton, Didcot, Oxon, UK, 1993.

Dabrowski M. P., W. Sienkiewicz, et al. (2003). "Immunotropic effects in cultured human blood mononuclear cells pre-exposed to low-level 1300 MHz pulse-modulated microwave field." *Electromagnetic Biology and Medicine* 22(1): 1-13.

Damm M., C. Nussold, et al. (2012). "Can electromagnetic fields influence the structure and enzymatic digest of proteins? A critical evaluation of microwave-assisted proteomics protocols." *Journal of Proteomics* 75: 5533-5543.

Danilin V. A., A. K. Voronin, et al. (1969). "The state of health of personnel working in high-voltage electric fields." *Gig. Tr. Prof. Zabol*, 13, 51, 1969.

Darzynkiewicz Z., S. Bruno, et al. (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry* 13(8): 795-808.

Darzynkiewicz Z., E. Bedner, et al. (2001). "Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis." *Semin Hematol* 38(2): 179-193.

David E. und J. Reißerweber (1995): "Melatonin beim Menschen", in Brinkmann K. , Kärner H. C., Schaefer H., *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 4*, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1995.

De Iuliis G. N., Newey R. J., et al. (2009). "Mobile Phone Radiation Induces Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Human Spermatozoa In Vitro." *Plos ONE* 4(7): e6446. doi: 10.1371/journal.pone.0006446.

Desai N. R., Kesai K. K., et al. (2009). Review "Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system." *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7: 114.

Dibbert B. and H. U. Simon (1997). "[The molecular mechanism of apoptosis. Report of the 4th European Conference on Apoptosis]." *Dtsch Med Wochenschr* 122(16): 523-526.

Diem E., Schwarz C., et al. (2005). "Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R 17 rat granulosa cells in vitro." *Mutat.Res.* 583: 178-183.

Diener S., Eberle P. (1995). "Zellproliferation, SCE-und Chromosomenaberrationsrate sowie Mikrokernfrequenz humaner peripherer Lymphozyten nach Einwirkung von 50-Hz-Magnetfeldern", in Brinkmann, K., Kärner, H. C., Schaefer, H., *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 4, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1995, S. 64-83.*

Dolk H., G. Shaddick, et al. (1997a). "Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain. I. Sutton Coldfield transmitter." *Am J Epidemiol* 145(1): 1-9.

Dolk H., P. Elliott, et al. (1997b). "Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain. II. All high power transmitters." *Am J Epidemiol* 145(1): 10-17.

Dulce H.-J. (1997): "Medizinische Diskussion experimenteller Ergebnisse, Risiken und Verträglichkeiten hochfrequenter elektromagnetischer Felder", in Brinkmann, K., Friedrich, G. *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 5, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1997, S. 244-253.*

Duvall E., A. H. Wyllie, et al. (1985). "Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)." *Immunology* 56(2): 351-358.

Edler L., B. S. Kim, et al. (2002). "The Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay as a Means to Estimate the Radiation Sensitivity of Individuals : Statistical Parameters of the Dose-Time Response Surface." *NATO CCMS WS, Kiev, April 2002.*

Elwood J. M. (1999). "A critical review of epidemiologic studies of radiofrequency exposure and human cancers." *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1: 155-168.

Etheredge J. A., S. M. Perez, et al. (1999). "Monarch butterflies (*Danaus plexippus* L.) use a magnetic compass for navigation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13845-13846.

Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992a). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *J Immunol* 148(7): 2207-2216.

Fadok, V. A., J. S. Savill, et al. (1992b). "Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells." *J Immunol* 149(12): 4029-4035.

Fadok V. A., D. R. Voelker, et al. (1993). "The ability to recognize phosphatidylserine on apoptotic cells is an inducible function in murine bone marrow-derived macrophages." *Chest* 103(2 Suppl): 102.

Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. (1995). "The comet assay: a comprehensive review." *Mutat Res* 339(1): 37-59.

Fairbairn D. W., D. K. Walburger, et al. (1996). "Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis." *Scanning* 18(6): 407-416.

Fitzner R. (1995) "Untersuchungen zur Krebspromotion", in Brinkmann, K., Kärner, H. C., Schaefer, H., *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 4*, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1995, S. 110-127.

Fitzner R., E. Langer, et al. (1997). "Wachstumsverhalten von HL-60-Zellen unter Einfluß von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern zur Prüfung auf krebspromovierende Effekte", in Brinkmann, K., Friedrich, G. *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 5*, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1997, S. 179-203.

Fitzner R, R. Gminski, et al. (2004). "Radiofrequency electromagnetic fields (1800 MHz) induce elevated production of reactive oxygen species in human promyelocytic HL-60 cells." Bioelectromagnetics Society 26th Annual Meeting, 21.-24 June, Washington, 2004.

Fortini P., G. Raspaglio, et al. (1996). "Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay." *Mutagenesis* 11(2): 169-175.

Franzellitti, S., P. Valbonesi, et al. (2010). "Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8 GHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay." *Mutation Research* 683: 35–42

Frei M. R., R. E. Berger, et al. (1998a). "Chronic exposure of cancer-prone mice to low-level 2450 MHz radiofrequency radiation." *Bioelectromagnetics* 19(1): 20-31.

Frei M. R., J. R. Jauchem, et al. (1998b). "Chronic, low-level (1.0 W/kg) exposure of mice prone to mammary cancer to 2450 MHz microwaves." *Radiat Res* 150(5): 568-576.

Frey T. (1997). "Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems." *Cytometry* 28(3): 253-263.

Friedmann J., Kraus S., et al. (2007). "Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies." *Biochem J* 405: 559-568.

Gallagher R., S. Collins, et al. (1979). "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia." *Blood* 54(3): 713-733.

Gavrieli Y., Y. Sherman, et al. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *J Cell Biol* 119(3): 493-501.

Goldsmith J. R. (1997a). "Epidemiologic evidence relevant to radar (microwave) effects." *Environ Health Perspect* 105 Suppl 6: 1579-1587.

Goldsmith J. R. (1997b). "TV broadcast towers and cancer: the end of innocence for radiofrequency exposures." *Am J Ind Med* 32(6): 689-692.

Goldstein L. S., M. W. Dewhirst, et al. (2003). "Summary, conclusions and recommendations: adverse temperature levels in the human body." *Int J Hyperthermia* 19(3): 373-384.

Goodman R., L. X. Wei, et al. (1989). "Exposure of human cells to low-frequency electromagnetic fields results in quantitative changes in transcripts." *Biochim Biophys Acta*. 1989 Dec 22;1009(3): 216-220.

Goodman R. and Henderson A. S. (1991). "Transcription and translation in cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields." *Bioelectrochem Bioenerg* 25: 335-355.

Gopalakrishna P. and A. Khar (1995). "Comet assay to measure DNA damage in apoptotic cells." *J Biochem Biophys Methods* 30(1): 69-73.

Gorczyca W., M. R. Melamed, et al. (1993a). "[Programmed death of cells (apoptosis)]." *Patol Pol* 44(3): 113-119.

Gorczyca W., J. Gong, et al. (1993b). "Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays." *Cancer Res* 53(8): 1945-1951.

Gougeon M. L., H. Lecoecur, et al. (1996a). "Comparative analysis of apoptosis in HIV-infected humans and chimpanzees: relation with lymphocyte activation." *Immunol Lett* 51(1-2): 75-81.

Gougeon M. L., H. Lecoecur, et al. (1996b). "Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression." *J Immunol* 156(9): 3509-3520.

Gougeon M. L., H. Lecoer, et al. (1996c). "Selective loss of the CD4+/CD26+ T-cell subset during HIV infection." *Res Immunol* 147(1): 5-8.

Grota L. J., R. J. Reiter, et al. (1994). "Electric field exposure alters serum melatonin but not pineal melatonin synthesis in male rats." *Bioelectromagnetics* 15(5): 427-437.

Guney M., Ozguner F., et al. (2007). "900 MHz radiofrequency-induced histopathologic changes and oxidative stress in rat endometrium: protection by vitamins E and C." *Toxicology and Industrial Health* 2007; **23**: 411-420.

Gurney J. G., S. Davis, et al. (1995). "Childhood cancer occurrence in relation to power line configurations: a study of potential selection bias in case-control studies." *Epidemiology* 6(1): 31-35.

Haas H.-G. und Schaefer H. (1995): "Magnetische Felder und Krebsentstehung: Eine kritische Übersicht", in Brinkmann K., Kärner H. C., Schaefer H., *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme*, Band 4, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1995.

Hamblin D. L., A. W. Wood, et al. (2004). "Examining the effects of electromagnetic fields emitted by GSM mobile phones on human event-related potentials and performance during an auditory task." *Clin Neurophysiol* 115(1): 171-178.

Hardell L., Carlberg M., et al. (2005). "Use of cellular or cordless telephones and the risk for Non-Hodgkin's Lymphoma." *International Archives of Occupational and Environmental Health* 78(8): 625-632.

Hardell L., Hansson Mild K., et al. (2006). Review. "Tumour risk associated with use of cellular telephones or cordless desktop telephones." *World Journal of Surgical Oncology* 4: 74.

Hardell L., Carlberg M., et al. (2007). "Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for  $\geq 10$  years." *Occup Environ Med.* 64(9): 626-632.

Hardell L., Carlberg M. (2009). "Mobile phones, cordless phones and the risk for brain

tumours." *Int J Oncol.* 35(1): 5-17.

Hardell L., Carlberg M., et al. (2010). "Mobile Phone Use and the Risk for Malignant Brain Tumors: A Case-Control Study on Deceased Cases and Controls." *Neuroepidemiology* 35:109-114.

Hardell L., Carlberg M., et al. (2011). "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.* 38: 1465-1474.

Hartmann A. and G. Speit (1997). "The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay)." *Toxicol Lett* 90(2-3): 183-188.

Hay R. J., M. L. Macy, et al. (1989). "Mycoplasma infection of cultured cells." *Nature* 339: 487-488.

Heaton P. R., Ransley R., et al. (2002). "Application of Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay for Assessing Levels of DNA Damage in Canine and Feline Leukocytes." *J. Nutr.* June 2002 132: 6 1598S-1603S.

Heddle J. A., M. C. Cimino, et al. (1991). "Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future." *Environ Mol Mutagen* 18(4): 277-291.

Heikkinen P., V. M. Kosma, et al. (2001). "Effects of mobile phone radiation on X-ray-induced tumorigenesis in mice." *Radiat Res* 156(6) : 775-785.

Hellman B., H. Vaghef, et al. (1995). "The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay." *Mutat Res* 336(2): 123-131.

Heynick L. N., S. A. Johnston, et al. (2003). "Radio frequency electromagnetic fields: cancer, mutagenesis, and genotoxicity." *Bioelectromagnetics Suppl* 6: 74-100.

Hook, G. J., P. Zhang, et al. (2004a). "Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after in vitro exposure to radiofrequency radiation." *Radiat Res* 161(2): 193-200.

Hook, G. J., P. Zhang, et al. (2004b). "Measurement of DNA damage and apoptosis in mammalian cells exposed to radiofrequency fields at high SAR in vitro." *Radiat Res.* 161: 193-200.

Hyland G. J. (2000). "Physics and biology of mobile telephony." *Lancet* 356(9244): 1833-1836.

Ichioka S., M. Minegishi, et al. (2003). "Skin temperature changes induced by strong static magnetic field exposure." *Bioelectromagnetics* 24(6): 380-386.

Imaida K., M. Taki, et al. (1998a). "The 1.5 GHz electromagnetic near-field used for cellular phones does not promote rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay." *Jpn J Cancer Res* 89(10): 995-1002.

Imaida K., M. Taki, et al. (1998b). "Lack of promoting effects of the electromagnetic near-field used for cellular phones (929.2 MHz) on rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay." *Carcinogenesis* 19(2): 311-314.

Ivancsits S., E. Diem, et al. (2002). "Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts." *Mutat Res* 519(1-2): 1-13.

Ivancsits S., E. Diem, et al. (2003). "Intermittent extremely low frequency electromagnetic fields cause DNA damage in a dose-dependent way." *Int Arch Occup Environ Health* 76(6): 431-436.

Joubert V., Leveque P., et al. (2007). "No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields." *Bioelectromagnetics* 28: 115-121.



Joubert V., Bourthoumieu S., et al. (2008). "Apoptosis is induced by radiofrequency field through the caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons." *Radiat. Res.* 169: 38-45

Juutilainen J. and S. Lang (1997). "Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview." *Mutat Res* 387(3): 165-171.

Juutilainen J. and R. de Seze (1998). "Biological effects of amplitude-modulated radiofrequency radiation." *Scand J Work Environ Health* 24(4): 245-254.

Kato M., K. Honma, et al. (1993). "Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal melatonin levels in rats." *Bioelectromagnetics* 14(2): 97-106.

Kato M., K. Honma, et al. (1994). "Circularly polarized 50-Hz magnetic field exposure reduces pineal gland and blood melatonin concentrations of Long-Evans rats." *Neurosci Lett* 166(1): 59-62.

Kato M., K. Honma, et al. (1994). "Recovery of nocturnal melatonin concentration takes place within one week following cessation of 50 Hz circularly polarized magnetic field exposure for six weeks." *Bioelectromagnetics* 15(5): 489-92.

Kerr J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-257.

Kesari KK. und Behari J. (2009). "Fifty-gigahertz microware exposure effect of radiations on rat brain." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 158(1): 126-139

Kesari KK. und Behari J. (2010). "Effect of micorwave at 2,45GHz radiations on reproductive system of male rats." *Toxicological and Environmental Chemistry* 92: 1135-1147.

Kesari KK., Behari J., et al. (2010). "Mutagenic response of 2.45 GHz radiation exposure on rat brain." *Int. J. Radiat. Biol.* 86(4): 334-343.

Kieback D. und Krause N. (1995): "Der Stand der Normung von Sicherheitswerten für die Exposition im niederfrequenten elektromagnetischen Feld", in Brinkmann K., Kärner H. C., Schaefer H., Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 4, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1995.

Kim B. S., J. J. Park, et al. (2002). "New measure of DNA repair in the single-cell gel electrophoresis (comet) assay." *Environ Mol Mutagen* 40(1): 50-56.

Klaude M., S. Eriksson, et al. (1996). "The comet assay: mechanisms and technical considerations." *Mutat Res* 363(2): 89-96.

Kobayashi H., Sugiyama C., et al. (1995). "A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay." *MMS Commun* 3: 103–115.

Kotani H. and G. J. McGarrity (1986). "Identification of mycoplasma colonies by immunobinding." *J Clin Microbiol* 23(4): 783-785.

Krause N. (1993): "Niederfrequente elektromagnetische Felder- Grenzwerte und Sicherheit-EG-Richtlinienvorschlag „ Physikalische Einwirkungen", in VDE-Fachbericht 45/ Tagungsband der VDE-Fachtagung: Biologische Wirkungen elektromagnetischer Felder, Bad Nauheim, 09./10.11.1993.

Kues H. A., J. C. Monahan, et al. (1992). "Increased sensitivity of the non-human primate eye to microwave radiation following ophthalmic drug pretreatment." *Bioelectromagnetics* 13(5): 379-393.

Lacombe F. and F. Belloc (1996). "Flow cytometry study of cell cycle, apoptosis and drug resistance in acute leukemia." *Hematol Cell Ther* 38(6): 495-504.

Lagroye I., R. Anane, et al. (2004a). "Measurement of DNA damage after acute exposure to pulsed-wave 2450 MHz microwaves in rat brain cells by two alkaline comet assay methods." *Int J Radiat Biol* 80(1): 11-20.

Lagroye I., G. J. Hook, et al. (2004b). "Measurements of alkali-labile DNA damage and protein-DNA crosslinks after 2450 MHz microwave and low-dose gamma irradiation in vitro." *Radiat Res* 161(2): 201-214.

Lai H. and N. P. Singh (1995). "Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells." *Bioelectromagnetics* 16: 207-210.

Lai H. and N. P. Singh (1996a). "Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation." *Int. J. Rad. Biol.* 69 (4): 513-521.

Lai H. and N. P. Singh (1996b) Reply to "Comment on 'Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells' ". *Bioelectromagnetics* 17: 166.

Lai H. and N. P. Singh (1997a). "Melatonin and N-tert-butyl-a-phenylnitron Block 60 Hz magnetic field-induced DNA single- and double-strands Breaks in Rat Brain Cells." *J. Pin. Res.* 22: 152-162.

Lai H. and N. P. Singh (1997b). "Melatonin and Spin-Trap compound Block Radiofrequency Electromagnetic Radiation-induced DNA Strands Breaks in Rat Brain Cells." *Bioelectromagnetics* 18: 446-454.

Lai H. and N. P. Singh (1997c). "Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells." *Bioelectromagnetics* 18(2): 156-165.

Lantow M., Lupke M., et al. (2006). "ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes." *Radiat Environ Biophys* 45(1): 55-62.

Lehmann A. K., S. Sornes, et al. (2000). "Phagocytosis: measurement by flow cytometry." *J Immunol Methods* 243 (1-2): 229-242.

Leitgeb N. (1991). "Strahlen, Wellen, Felder, Ursachen und Auswirkungen auf Umwelt und Gesundheit", Deutscher Taschenbuch Verlag München und Georg Thieme Verlag Stuttgart, Originalausgabe 1990, 2. Auflage 1991.

Leroy T., P. Van Hummelen, et al. (1996). "Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis." *J Toxicol Environ Health* 47(5): 409-422.

Leszczynski D., Joenväärä S., et al. (2002). "Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects." *Differentiation* 70 (2-3): 120–129.

Li L., K. S. Bisht, et al. (2001). "Measurement of DNA damage in mammalian cells exposed in vitro to radiofrequency fields at SARs of 3-5 W/kg." *Radiat Res.* 56(3): 328-332.

Liboff A. R. and K. A. Jenrow (2000). "New model for the avian magnetic compass." *Bioelectromagnetics* 21(8): 555-565.

Liburdy R. P., D. E. Callahan, et al. (1993a). "Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade. Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction." *FEBS Lett* 334(3): 301-308.

Liburdy R. P., T. R. Sloma, et al. (1993b). "ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 60 Hz fields block melatonin's oncostatic action on ER+ breast cancer cell proliferation." *J Pineal Res* 14(2): 89-97.

Lindl T. (2002). "Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag/Fischer (Gustav)", 5. Aufl. 2002.

Lixia S., Yao K., et al. (2006). "Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells." *Mutat Res* 2006, 602(1-2): 135-142.

Loberg L. I., W. R. Engdahl, et al. (2000). "Cell viability and growth in a battery of human breast cancer cell lines exposed to 60 Hz magnetic fields." *Radiat Res* 153(5 Pt 2): 725-728.

Lohmann K. J., S. D. Cain, et al. (2001). "Regional magnetic fields as navigational markers for sea turtles." *Science* 294(5541): 364-366.

Loscher W. and M. Mevissen (1994). "Animal studies on the role of 50/60-Hertz magnetic fields in carcinogenesis." *Life Sci* 54(21): 1531-1543.

Loscher W. and M. Mevissen (1995). "Linear relationship between flux density and tumor co-promoting effect of prolonged magnetic field exposure in a breast cancer model." *Cancer Lett* 96(2): 175-180.

Loscher W., M. Mevissen, et al. (1993). "Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field." *Cancer Lett* 71(1-3): 75-81.

Loscher W., U. Wahnschaffe, et al. (1994). "Effects of weak alternating magnetic fields on nocturnal melatonin production and mammary carcinogenesis in rats." *Oncology* 51(3): 288-295.

Luschi P., G. C. Hays, et al. (1998). "The navigational feats of green sea turtles migrating from Ascension Island investigated by satellite telemetry." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265(1412): 2279-2284.

Mailankot M., Kunnath A. P., et al. (2009). "Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats." *Clinics* 64: 561-565.

Malyapa R. S., E. W. Ahern, et al. (1997a). "Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation." *Radiat. Res.* 148(6): 608-617.

Malyapa R. S., E. W. Ahern, et al. (1997b). "Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz)." *Radiat Res* 148(6): 618-627.

Malyapa R. S., E. W. Ahern, et al. (1998a). "DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia." *Radiat Res* 149(6): 637-645.

Malyapa R. S., C. Bi, et al. (1998b). "Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation." *Radiat Res* 149(4): 396-400.

Malyapa R. S., L. Li, et al. (2001). "Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz)." *Radiat Res* 156(3): 328-332.

Marino A. A., E. Nilsen, et al. (2002). "Consistent magnetic-field induced dynamical changes in rabbit brain activity detected by recurrence quantification analysis." *Brain Res* 951(2): 301-310.

Marino A. A., E. Nilsen, et al. (2003a). "Consistent magnetic-field induced dynamical changes in rabbit brain activity detected by recurrence quantification analysis." *Brain Res* 964(2): 317-326.

Marino A. A., E. Nilsen, et al. (2003b). "Nonlinear changes in brain electrical activity due to cell phone radiation." *Bioelectromagnetics* 24(5): 339-346.

Martin S. J. and D. R. Green (1995a). "Apoptosis during HIV infection. A cytopathic effect of HIV or an important host-defense mechanism against viruses in general?" *Adv Exp Med Biol* 374: 129-138.

Martin S. J. and D. R. Green (1995b). "Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?" *Cell* 82(3): 349-352.

Martin S. J., G. A. O'Brien, et al. (1995). "Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis." *J Biol Chem* 270(12): 6425-6428.

Masley M. L., B. F. Habbick, et al. (1999). "Are wireless phones safe? A review of the issue." *Can J Public Health* 90(5): 325-329.

Mausset-Bonnefont A.-L., Hirbec H., et al. (2004). "Acute exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields induces glial reactivity and biochemical modifications in the rat brain." *Neurobiol. Dis.* 17: 445-454.

McCann J., F. Dietrich, et al. (1993). "A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields." *Mutat Res* 297(1): 61-95.

McCann J. (1998). "Cancer risk assessment of extremely low frequency electric and magnetic fields: a critical review of methodology." *Environ Health Perspect* 106(11): 701-717.

McCann J., F. Dietrich, et al. (1998). "The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update." *Mutat Res* 411(1): 45-86.

McGarrity G. J. and D. A. Carson (1982). "Adenosine phosphorylase-mediated nucleoside toxicity. Application towards the detection of mycoplasmal infection in mammalian cell cultures." *Exp Cell Res* 139(1): 199-205.

McGarrity G. J. (1984). "Mycoplasma infection of cell cultures: thymidine incorporation of culture supernatants as a screening test." *J Immunol* 133(3): 1683.

McGarrity G. J., V. Vanaman, et al. (1984). "Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review." *In Vitro* 20(1): 1-18.

McGarrity G. J. and H. Kotani (1986). "Detection of cell culture mycoplasmas by a genetic probe." *Exp Cell Res* 163(1): 273-278.

McKelvey-Martin V. J., M. H. Green, et al. (1993). "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review." *Mutat Res* 288(1): 47-63.

McKelvey-Martin V. J., E. T. Ho, et al. (1998). "Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells." *Mutagenesis* 13(1): 1-8.

McNamee J. P., P. V. Bellier, et al. (2002a). "DNA damage and micronucleus induction in human leukocytes after acute in vitro exposure to a 1.9 GHz continuous-wave radiofrequency field." *Radiat Res* 158(4): 523-533.

McNamee J. P., P. V. Bellier, et al. (2002b). "DNA damage in human leukocytes after acute in vitro exposure to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field." *Radiat Res* 158(4): 534-537.

McNamee J. P., P. V. Bellier, et al. (2003). "No evidence for genotoxic effects from 24 h exposure of human leukocytes to 1.9 GHz radiofrequency fields." *Radiat Res* 159(5): 693-697.

Meinert R. and J. Michaelis (1996). "Meta-analyses of studies on the association between electromagnetic fields and childhood cancer." *Radiat Environ Biophys* 35(1): 11-18.

Meltz M. L. (1995). "Biological effects versus health effects: an investigation of the genotoxicity of microwave radiation.", in: *Radiofrequency Radiation Standards*, NATO ASI Series (B.J. Klaueberg Ed). New York, Plenum Press, 1995: 235-241.

Meral I., Mert H., et al. (2007). "Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs." *Brain Reserch*, 1169: 120-124.



Mevissen M., A. Stamm, et al. (1993). "Effects of magnetic fields on mammary tumor development induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rats." *Bioelectromagnetics* 14(2): 131-143.

Meyer R., Gollnick F., Wolke S. (1995). "Der Einfluß hochfrequenter EM-Felder auf die Calcium-Homöostase von Herzmuskelzellen und Lymphozyten." Edition Wissenschaft.

Michaelis J. (1993): "Epidemiologische Studien über elektromagnetische Felder und Krebserkrankungen bei Kindern", in VDE-Fachbericht 45/ Tagungsband der VDE-Fachtagung: Biologische Wirkungen elektromagnetischer Felder, Bad Nauheim, 09./10.11.1993.

Miyakoshi, R. S., et al. (2002/2004). "2.4 GHz (CW) and 1.5 GHz (PDC) exposure on micronucleus formation, sister chromatid exchange, chromosome aberrations, DNA damage, and genetic mutation as well cell cycle, signal transduction, transformation and cell division." *Electrical Engineering in Japan* (2002) 141: 9-15, *Mutation Research* (2004) 541: 81-89.

Miyamae Y., K. Zaizen, et al. (1997a). "Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens." *Mutat Res* 393(1-2): 99-106.

Miyamae Y., K. Iwasaki, et al. (1997b). "Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition." *Mutat Res* 393(1-2): 107-113.

Mochizuki T., Y. Kuge, et al. (2003). "Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with <sup>99m</sup>Tc-Annexin V." *J Nucl Med* 44(1): 92-97.

Moroz P., S. K. Jones, et al. (2002). "Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions." *Int J Hyperthermia* 18(4): 267-284.

Moulder J. E. and K. R. Foster (1995). "Biological effects of power-frequency fields as they relate to carcinogenesis." *Proc Soc Exp Biol Med* 209(4): 309-324.

Moulder, J. E. (1998). "Power-frequency fields and cancer." *Crit Rev Biomed Eng* 26(1-2): 1-116.

Moulder J. E., L. S. Erdreich, et al. (1999). "Cell phones and cancer: what is the evidence for a connection?" *Radiat Res* 151(5): 513-531.

Moulder J. E., Foster K. R., et al. (2005). „Mobile phones, mobile phone base stations and cancer: a review.“ *International Journal of Radiation Biology* 81: 189-203.

Murphy J. C., D. A. Kaden, et al. (1993). "International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Power frequency electric and magnetic fields: a review of genetic toxicology." *Mutat Res* 296(3): 221-240.

Nakamura H., Matsuzaki I., et al. (2003). "Nonthermal effects of mobile-phone frequency microwaves on uteroplacental functions in pregnant rats." *Reprod. Toxicol.* 17: 321-326.

Neibig U. (1997). "Expositionsanlagen des 1. Forschungsvorhabens", in Brinkmann K., Friedrich G. *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 5*, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1997.

Nelms B. E. (1997). "Measuring Apoptosis in Individual Cells with the Comet Assay." *Promega Notes Number 64*, 1997, p. 13.

Neubauer S., T. Liehr, et al. (1998). "Estimation of DNA single-strand breaks by single cells gel electrophoresis in tumor cells." *Genet Anal* 14(4): 121-124.

Newburger P. E., M. E. Chovaniec, et al. (1979). "Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation." *J Cell Biol* 82(2): 315-322.

Nimtze G. und S. Mäcker (1994): "Elektrosmog", Myers Forum, BI-Taschenbuchverlag, Mannheim 1994.

Nimtze G. (1994). "Die physikalische Wirkung elektromagnetischer Strahlung auf den Menschen", in Schmeer H.R., Elektromagnetische Verträglichkeit EMV '94, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1994, S. 31-33.

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

Obe G. (1995). "Sind niederfrequente elektromagnetische Felder mutagen?", in Brinkmann K., Kärner H. C., Schaefer H., Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 4, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1995, S. 84-89.

O'Leary E. S., E. R. Schoenfeld, et al. (2003). "Wire coding in the EMF and Breast Cancer on Long Island Study: relationship to magnetic fields." *J Expo Anal Environ Epidemiol* 13(4): 283-293.

Olive P. L., J. P. Banáth, et al. (1990). "Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay"." *Radiat Res* 122: 86-94.

Olive P. L., D. Wlodek, et al. (1992). "Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis." *Exp Cell Res* 198: 259-267.

Olive P. L., G. Frazer, et al. (1993a). "Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay." *Radiat Res* 136: 130-136.

Olive P. L. and J. P. Banáth (1993b). "Induction and rejoining of radiation induced DNA single-strand breaks: "Tail moment" as a function of position in the cell cycle." *Mutation Research*, 294, 275-283.

Onodera H., Z. Jin, et al. (2003). "Effects of 10-T static magnetic field on human peripheral blood immune cells." *Radiat Res* 159(6): 775-779.

Oppitz U., S. Denzinger, et al. (1999). "Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions." *Strahlenther Onkol* 175(7): 341-346.

Ormerod M. G. (1994). "Further applications to cell biology", in Ormerod M. G.: *Flow cytometry. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp 261-273.

Ormerod M. G. (1994). "Preparing suspensions of single cells", in Ormerod M. G.: *Flow cytometry. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp 45-54.

Ormerod M. G. (2001). "Using flow cytometry to follow the apoptotic cascade." *Redox Rep* 6(5): 275-287.

Östling O. and K. J. Johanson (1984). "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 291-298.

Otsuki Y., Z. Li, et al. (2003). "Apoptotic detection methods – from morphology to gene." *Prog Histochem Cytochem* 38(3): 275-339.

Pala P., T. Hussel, et al. (2000). "Flow cytometric measurement of intracellular cytokines.", *Journal of Immunological Methods* 243(1-2): 107-124.

Paulraj R., Behari J., et al. (1999). "Effect of amplitude modulated RF radiation on calcium ion efflux and ODC activity in chronically exposed rat brain", *Indian J Biochem Biophysics* 36: 337-340.

Paulraj R., Behari J. (2002). "The effect of low level continuous 2.45GHz wave on brain enzymes of developing rat brain." *Electromagnetic Biology and Medicine* 21(3):231-241.

Paulraj R., Behari J. (2004). "Radiofrequency radiation effect on protein kinase C activity in rats' brain", *Mutation Research* 585: 127–131.

Paulraj R., Behari J (2006a). "Protein Kinase C Activity in Developing Rat Brain Cells Exposed to 2.45GHz Radiation", *Electromagnetic Biology and Medicine* 25; 25:61–70.

Paulraj R., Behari J. (2006b). "Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation." *Mutation Research* 596: 76-80.

Petridou E., D. Trichopoulos, et al. (1997). "Electrical power lines and childhood leukemia: a study from Greece." *Int J Cancer* 73(3): 334-348.

Phillips J. L., O. Ivaschuk, et al. (1998). "DNA damage in molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields in vitro." *Bioelectrochem Bioenerg* 45: 103-110.

Plappert U., K. Raddatz, et al. (1995). "DNA-damage detection in man after radiation exposure - the comet assay - its possible application for human biomonitoring." *Stem Cells* 13 Suppl 1: 215-222.

Polk C. (1996). "CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields", CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1996.

Portera-Cailliau C., C. H. Sung, et al. (1994). "Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3): 974-978.

Prolic Z., R. Jovanovic, et al. (2003). "Behavioral differences of the insect *Morimus funereus* (Coleoptera, Cerambycidae) exposed to an extremely low frequency magnetic field." *Electromagnetic Biology and Medicine* 22(1): 63-73.

Ramakrishnan N., R. Chen, et al. (1998). "Pyruvate prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis." *Free Radic Res* 29(4): 283-295.

Reflex 2004: <http://www.izgmf.de/Reflex-Project-Zusammenfassung.pdf>.

Repacholi M. H. (1997a). "Radiofrequency field exposure and cancer: what do the laboratory studies suggest?" *Environ Health Perspect* 105 Suppl 6: 1565-1568.

Repacholi M. H., A. Basten, et al. (1997b). "Lymphomas in E mu-Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHz electromagnetic fields." *Radiat Res* 147(5): 631-640.

Repacholi M. H. (1998). "Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs." *Bioelectromagnetics* 19(1): 1-19.

Rojas E., M. Valverde, et al. (1996). "DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single-cell gel electrophoresis assay." *Mutat Res* 370(2): 115-120.

Rojo M. C. and M. E. Gonzalez (1998). "In situ detection of apoptotic cells by TUNEL in the gill epithelium of the developing brown trout (*Salmo trutta*)." *J Anat* 193 ( Pt 3): 391-398.

Rothman K. J. (2000). "Epidemiological evidence on health risks of cellular telephones." *Lancet* 356(9244): 1837-1840.

Rothman K. J., J. E. Loughlin, et al. (1996). "Overall mortality of cellular telephone customers." *Epidemiology* 7(3): 303-305.

Roti Roti J.L. (2004). "2450 MHz (CW) exposure and effects on DNA crosslinking." *Radiation Research* 161: 201-214.

Rudiger H., E. Diem, et al. (2003). "Non-thermal DNA breackage by mobile phone radiation in human fibroblasts." Meeting February 2003, institute of Physics, London.

Rydberg B., Johanson K. J. (1978) in Hanawalt P. C. and Friedberg E. C. (Hrsg.). "DNA repair mechanism." Academic Press, New York, pp 465-468.

Sachs L. and J. Lotem (1993). "Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy." *Blood* 82(1): 15-21.

Sachs L. (2002). "Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden." Springer Verlag, Heidelberg, 2002.

Saito K., T. Saiga, et al. (1998). "Reversible irritative effect of acute 2.45GHz microwave exposure on rabbit eyes – a preliminary evaluation." *J Toxicol Sci* 23(3): 197-203.

Salagovic J., J. Gilles, et al. (1996). "The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites." *Folia Biol (Praha)* 42(1-2): 17-21.

Salford L. G., A. Brun, et al. (1994). "Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz." *Microsc Res Tech* 27(6): 535-542.

Salford L. G., A. E. Brun, et al. (2003). "Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones." *Environ Health Perspect* 111(7): 881-883; discussion A408.

Savill J., V. Fadok, et al. (1993). "Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis." *Immunol Today* 14(3): 131-136.

Savitz D. A. and E. E. Calle (1987). "Leukemia and occupational exposure to electromagnetic fields: review of epidemiologic surveys." *J Occup Med* 29(1): 47-51.

Scarfi M.R., Fresegna A.M., et al. (2006). "Exposure to radiofrequency radiation (900 MHz, GSM signal) does not affect micronucleus frequency and cell proliferation in human peripheral blood lymphocytes: an interlaboratory study." *Radiat. Res.* 165: 655-663.

Schaffner G., T. Kayser, et al. (2003). "Validation of flow cytometry to quantify the potency of anti-D immunoglobulin preparations." *Vox Sang* 84(2): 129-136.

Schirmacher A., S. Winters, et al. (2000). "Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood-brain barrier in vitro." *Bioelectromagnetics* 21(5): 338-345.

Sgonc R. and G. Wick (1994). "Methods for the detection of apoptosis." *Int Arch Allergy Immunol* 105(4): 327-332.

Sheikh K. (1986). "Exposure to electromagnetic fields and the risk of leukemia." *Arch Environ Health* 41(1): 56-63.

Sienkiewicz Z. J., L. Robbins, et al. (1994). "Effects of prenatal exposure to 50 Hz magnetic fields on development in mice: II. Postnatal development and behavior." *Bioelectromagnetics* 15(4): 363-375.

Silny J. (1993). "Biologische Wirkungen niederfrequenter elektromagnetischer Felder- Biomedizinische Untersuchungen und Modellvorstellungen", VDE-Fachbericht 45/ Tagungsband der VDE-Fachtagung: Biologische Wirkungen elektromagnetischer Felder, Bad Nauheim, 09./10.11.1993.

Simko M., D. Richard, et al. (2001). "Micronucleus induction in Syrian hamster embryo cells following exposure to 50 Hz magnetic fields, benzo(a)pyrene, and TPA in vitro." *Mutat Res* 495(1-2): 43-50.

Simon H. U. (1997). "[Programmed cell death]." *Dtsch Med Wochenschr* 122(6): 167-168.

Singh N. P., M. T. McCoy, et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Exp Cell Res* 175(1): 184-191.

Singh N. P., R. R. Tice, et al. (1991). "A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides." *Mutat Res* 252(3): 289-296.



Singh, N. P. and R. E. Stephens (1997). "Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching." *Mutat Res* 383(2): 167-175.

Singh N. and H. Lai (1998). "60 Hz magnetic field exposure induces DNA crosslinks in rat brain cells." *Mutat Res* 400(1-2): 313-320.

Slamenova D., A. Gabelova, et al. (1997). "Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations." *Mutat Res* 383(3): 243-252.

Speit G., S. Hanelt, et al. (1996). "Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis." *Toxicol Lett* 88(1-3): 91-98.

Speit G., Schütz P., et al. (2007). "Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible." *Mutat. Res.* 626: 42-47.

Stamm A. (1993). "Untersuchungen zur Magnetfeldexposition der Bevölkerung im Niederfrequenzbereich", in Brinkmann K. und Schaefer H., *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme*, Band 3, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1993.

Stamm A. und E. Zeemann (1995). "Möglichkeiten zur Erfassung niederfrequenter magnetischer Felder in epidemiologischen Studien", in Brinkmann K., Kärner H.C., Schaefer H., *Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme*, Band 4, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1995, S. 36-63.

Steller H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." *Science* 267 (5203): 1445-1449.

Stögbauer F. (2002). "Beeinflussung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke durch elektromagnetische Felder." *Edition wissenschaft* 15: 3-16.

Tatsumi N. (1993) "[Present and future of flow cytometry]." *Rinsho Byori* 41(9): 977-981.

Tebbs R. S., J. E. Cleaver, et al. (1999). "Modification of the Comet assay for the detection of DNA strand breaks in extremely small tissue samples." *Mutagenesis* 14(4): 437-438.

Tenforde T. S. (1990). "Biological responses to static and time-varying magnetic fields", in Wilson B. W., Stevens R. G., Anderson L. E. (Eds.) *Extremely-Low-Frequency Electromagnetic Fields: The Question of Cancer*, Battelle Press, Columbus, OH, 1990, 291.

Tenforde T. S. (1991). "Biological interactions of extremely-low-frequency electric and magnetic fields", *Bioelectrochemistry Bioenergetics*, 25, 1.

Tenforde T. S. (1992). "Biological interactions and potential health effects of extremely-low-frequency magnetic fields from power lines and other common sources." *Annu Rev Public Health* 13: 173-196.

Thalau H. P. (2002). "Embryonalentwicklung unter dem Einfluss hoch- und niederfrequenter Felder. Eine Bestandsaufnahme teratologischer Studien." *Edition Wissenschaft* 17: 3-77.

Theriault G., M. Goldberg, et al. (1994). "Cancer risks associated with occupational exposure to magnetic fields among electric utility workers in Ontario and Quebec, Canada, and France: 1970-1989." *Am J Epidemiol* 139(6): 550-572.

Thompson H. J., R. Strange, et al. (1992). "Apoptosis in the genesis and prevention of cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1(7): 597-602.

Thompson C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* 267(5203): 1456-1462.

Thompson T. C. and G. Yang (2000). "Regulation of apoptosis in prostatic disease." *Prostate Suppl* 9: 25-28.

Thompson K. A., J. C. McArthur, et al. (2001). "Correlation between neurological progression and astrocyte apoptosis in HIV-associated dementia." *Ann Neurol* 49(6): 745-752.

Tice R. R., P. W. Andrews, et al. (1990). "The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair." *Basic Life Sci* 53: 291-301.

Tice R. R., P. W. Andrews, et al. (1991). "The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells." *Adv Exp Med Biol* 283: 157-164.

Tice R. R. and G. H. Strauss (1995). "The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans." *Stem Cells* 13 Suppl 1: 207-214.

Tice R. R., E. Agurell, et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." *Environ Mol Mutagen* 35(3): 206-221.

Tice R. R., G. G. Hook, et al. (2002). "Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells." *Bioelectromagnetics* 23(2): 113-126.

Töre F., Duloc P.E., et al. (2001). "Two-hour exposure to 2-W/kg, 900 MHz GSM microwaves induces plasma protein extravasation in rat brain and dura mater." *EBEA Proceedings September 2001, Helsinki, Finland*: 43-45.

Toler J. C., W. W. Shelton, et al. (1997). "Long-term, low-level exposure of mice prone to mammary tumors to 435 MHz radiofrequency radiation." *Radiat Res* 148(3): 227-234.

Tully J. G. (1996). "Diagnosis of mycoplasma infections of cell cultures." Introductory remarks. In: J.G. Tully and S. Razin, *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, Vol. II., Diagnostic Procedures. Academic Press, Inc., San Diego, 1996, 405-410.

Utteridge T. D., V. Gebiski, et al. (2002). "Long-term exposure of E-mu-Pim1 transgenic mice to 898.4 MHz microwaves does not increase lymphoma incidence." *Radiat Res* 158(3): 357-364.

Vermes I., C. Haanen, et al. (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *J Immunol Methods* 184(1): 39-51.

Vermes I., C. Haanen, et al. (2000). "Flow cytometry of apoptotic cell death." *J Immunol Methods* 243(1-2): 167-190.

Verschaeve L., D. Slaets, et al. (1994). "In vitro and in vivo genetic effects of microwaves from mobile phone frequencies in human and rat peripheral blood lymphocytes", in: *Proceedings of Cost 244 Meetings on Mobile Communication and Extremely Low Frequency field: Instrumentation and measurements in Bioelectromagnetics Research.* (ed.: Simunic D.), pp 74-83.

Verschaeve L. and A. Maes (1998). "Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields." *Mutat Res* 410(2): 141-165.

Vian L., A. Yusuf, et al. (2002). "The Liverbeads as a tool for the comet assay." *Mutat Res* 519(1-2): 163-170.

Vijayalaxmi, M. R. Frei, et al. (1997). "Frequency of micronuclei in the peripheral blood and bone marrow of cancer-prone mice chronically exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation." *Radiat Res* 147(4): 495-500.

Vijayalaxmi, N. Mohan, et al. (1997a). "Proliferation and cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2450 MHz radiofrequency radiation." *Int J Radiat Biol.* 72(6): 751-757.

Vijayalaxmi, M. R. Frei, et al. (1997b). "Frequency of micronuclei in the peripheral blood and bone marrow of cancer –prone mice chronically exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation." *Radiat Res* 147: 495-500.

Vijayalaxmi, B. Z. Leal, et al. (2000). "Primary DNA damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2450 MHz radiofrequency radiation." *Radiat Res* 153(4): 479-486.

Vijayalaxmi, W. F. Pickard, et al. (2001a). "Micronuclei in the peripheral blood and bone marrow cells of rats exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation." *Int J Radiat Biol.* 77(11): 1109-1115.

Vijayalaxmi, B. Z. Leal, et al. (2001b). "Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (835.62 MHz, FDMA)." *Radiat Res.* 155(1 Pt 1): 113-121.

Volkow N. D., Tomasi D., et al. (2011). "Effects of cell phone radiofrequency signal exposure on brain glucose metabolism." *JAMA.* 2011; 305(8):808-813).

Wertheimer N. and E. Leeper (1979). "Electrical wiring configurations and childhood cancer." *Am J Epidemiol* 109(3): 273-284.

Wiedemann P., Schütz H., Thalmann A. (2002) „Mobilfunk und Gesundheit - Risikobewertung im wissenschaftlichen Dialog.“ Forschungszentrum Jülich, Programmgruppe Mensch, Umwelt, Technik;

siehe auch: <http://www.eletric-words.com/cell/abstracts/index-vitro.html>.

Wilen J., M. Sandstrom, et al. (2003). "Subjective symptoms among mobile phone users – a consequence of absorption of radiofrequency fields?" *Bioelectromagnetics* 24(3): 152-159.

Wilen J., R. Hornsten, et al. (2004). "Electromagnetic field exposure and health among RF plastic sealer operators." *Bioelectromagnetics* 25(1): 5-15.

Wyllie A. H. (1994). "Death from inside out: an overview." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345(1313): 237-241.

Wyllie A. H., P. J. Carder, et al. (1994). "Apoptosis in carcinogenesis: the role of p53." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 59: 403-409.

Yellon S. M. (1991). "An acute 60-Hz magnetic field exposure suppresses the nighttime melatonin rise in the pineal and circulation of the adult Djungarian hamster," Abstracts of the Annual Review of Research on Biological Effects of 50 and 60 Hz Electric and Magnetic Fields, Milwaukee, WI, November 3-7, 1991, A-25.

Yusuf A. T., L. Vian, et al. (2000). "In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells." Mutat Res 468(2): 227-234.

Zemann E. (1997). "Technische Grundlagen der Mobilfunktechnik und Grenzwerte", in Brinkmann K., Friedrich G. Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 5, VDE-Verlag Berlin, Offenbach 1997.

Zeni O., Chiavoni A.S. et al. (2003). "Lack of genotoxic effects (micronucleus induction) in human lymphocytes exposed in vitro to 900 MHz electromagnetic fields." Radiat. Res. 160: 152-158.

Zhang M. B., J. L. He, et al. (2002). "Study of low-intensity 2450MHz microwave exposure enhancing the genotoxic effects of mitomycin C using micronucleus test and comet assay in vitro." Biomed Environ Sci 15(4): 283-290.

Zhao T., Zou S., et al. (2007). "Exposure to cell phone radiation up-regulated apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes." Neuroscience Letters 412: 34-43.

Zhong B. Z., W. Z. Whong, et al. (1997). "Detection of mineral-dust-induced DNA damage in two mammalian cell lines using the alkaline single cell gel/comet assay." Mutat Res 393(3): 181-187.

Zook B. C. and S. J. Simmens (2001). "The effects of 860 MHz radiofrequency radiation on the induction or promotion of brain tumors and other neoplasms in rats." *Radiat Res* 155(4): 572-583.

Xu S., Ning W., et al. (2006). "Chronic exposure to GSM 1800MHz microwaves reduces excitatory synaptic activity in cultured hippocampal neurons." *Neuroscience Letters* 398: 253-257

## **7. Anhang**

### **7.1. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **7.2. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 2000 bis Januar 2006 am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie in der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, unter der Leitung von Prof. Dr. R. Tauber und Oberarzt Dr. R. Fitzner experimentell erarbeitet und niedergeschrieben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. Tauber und Herrn Oberarzt Dr. med. R. Fitzner für die Überlassung des aktuellen und interessanten Dissertationsthemas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und Frau Dr. rer. nat. Dr. med. K. Schlatterer und Herrn Dr. rer. nat. R. Gminski für die Anregungen, Ratschläge und konstruktive Kritik während der gesamten Dauer der Arbeit.

### 7.3. Erklärung

„Ich, Leila Violette Khubnazar, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

»DNA-Strangbrüche in humanen HL-60 Promyelozytenleukämiezellen zur Einschätzung biologischer Wirkungen nach Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (2450 MHz)«

selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

---

Datum

---

Leila Violette Khubnazar

## 7.4. Tabellenanhang

### 7.4.1. Anhang zur digitalisierten Auswertung des Comet-Assays

#### Experiment 1:

EMF-exponierte HL-60-Zellen:

Comet-Nummer	TL	Tail-DNA	OTM	TEM Optilas
EMF-Exp. 1 Comet 1	422,00	20,07	47,52	84,70
EMF-Exp. 1 Comet 2	647,00	37,86	107,59	244,97
EMF-Exp. 1 Comet 3	147,00	7,65	15,24	11,24
EMF-Exp. 1 Comet 4	203,00	4,85	8,06	9,85
EMF-Exp. 1 Comet 5	245,00	7,20	18,34	17,65
EMF-Exp. 1 Comet 6	207,00	13,16	26,16	27,24
EMF-Exp. 1 Comet 11	263,00	25,37	48,16	66,72
EMF-Exp. 1 Comet 12	259,00	36,21	51,62	93,78
EMF-Exp. 1 Comet 13	511,00	38,19	80,12	195,16
EMF-Exp. 1 Comet 14	227,00	18,41	30,64	41,78
EMF-Exp. 1 Comet 15	116,00	11,14	18,37	12,92
<b>MW</b>	<b>295,18</b>	<b>20,01</b>	<b>41,08</b>	<b>73,27</b>

ausgewertete Zellen: 11

#### Experiment 1:

Nicht-exponierte HL-60-Kontrollzellen:

Comet-Name	TL	Tail-DNA	OTM	TEM Optilas
Kontrolle Exp. 1 Comet 1	47	8,61	6,77	4,04
Kontrolle Exp. 1 Comet 2	151	14,46	10,77	21,84
Kontrolle Exp. 1 Comet 3	128	10,98	8,51	14,05
Kontrolle Exp. 1 Comet 4	97	16,22	12,22	15,73
Kontrolle Exp. 1 Comet 5	108	6,77	5,38	7,32

Kontrolle Exp. 1 Comet 6	102	6,05	5,74	6,17
Kontrolle Exp. 1 Comet 9	46	3,12	3,13	1,43
Kontrolle Exp. 1 Comet10	101	8,24	6,34	8,32
Kontrolle Exp. 1 Comet11	72	4,59	3,53	3,3
Kontrolle Exp. 1 Comet12	123	15,62	15,43	19,22
Kontrolle Exp. 1 Comet13	95	10,56	7,02	10,03
Kontrolle Exp. 1 Comet14	113	11,2	10,67	12,66
Kontrolle Exp. 1 Comet15	117	6,13	4,76	7,17
Kontrolle Exp. 1 Comet16	33	17,2	12,89	5,67
<b>MW</b>	<b>95,21</b>	<b>9,98</b>	<b>8,08</b>	<b>9,78</b>

ausgewertete Zellen: 14

**Experiment 2:**

EMF-exponierte HL-60-Zellen:

<b>Comet-Nummer</b>	<b>TL</b>	<b>Tail-DNA</b>	<b>OTM</b>	<b>TEM Optilas</b>
EMF Exp. 2 Comet 1	266,00	12,23	26,69	32,53
EMF Exp. 2 Comet 2	284,00	12,71	28,30	36,10
EMF Exp. 2 Comet 3	362,00	34,08	65,40	123,38
EMF Exp. 2 Comet 4	461,00	34,34	91,37	158,32
EMF Exp. 2 Comet 5	326,00	17,25	39,75	56,22
EMF Exp. 2 Comet 6	328,00	26,20	67,84	85,94
EMF Exp. 2 Comet 7	283,00	35,28	39,76	99,83
EMF Exp. 2 Comet 8	119,00	6,80	12,57	8,10
EMF Exp. 2 Comet 9	147,00	12,26	17,75	18,02
EMF Exp. 2 Comet 10	293,00	11,27	11,74	33,01
<b>MW</b>	<b>286,90</b>	<b>20,24</b>	<b>40,12</b>	<b>65,15</b>

ausgewertete Zellen: 10

**Experiment 2:**

Nicht-exponierte HL-60-Kontrollzellen:

<b>Comet-Nummer</b>	<b>TL</b>	<b>Tail-DNA</b>	<b>OTM</b>	<b>TEM Optilas</b>
Kontrolle Exp. 2 Comet 1	31,00	6,43	5,99	1,99
Kontrolle Exp. 2 Comet 2	45,00	9,64	7,90	4,34
Kontrolle Exp. 2 Comet 3	130,00	10,05	8,29	13,06
Kontrolle Exp. 2 Comet 8	100,00	5,81	6,16	5,81
Kontrolle Exp. 2 Comet 9	86,00	9,91	7,35	8,53
Kontrolle Exp. 2 Comet 10	122,00	9,70	13,04	11,83
Kontrolle Exp. 2 Comet 11	88,00	9,88	10,86	8,69
Kontrolle Exp. 2 Comet 12	102,00	4,75	5,12	4,84
Kontrolle Exp. 2 Comet 13	88,00	13,70	11,77	12,05
Kontrolle Exp. 2 Comet 14	92,00	6,75	8,02	6,21
Kontrolle Exp. 2 Comet 15	183,00	7,21	10,54	13,19

Kontrolle Exp. 2 Comet 16	127,00	3,27	5,93	4,15
Kontrolle Exp. 2 Comet 17	80,00	5,69	6,60	4,55
Kontrolle Exp. 2 Comet 18	35,00	6,57	5,44	2,30
Kontrolle Exp. 2 Comet 19	167,00	5,30	6,86	8,85
Kontrolle Exp. 2 Comet 20	71,00	8,46	9,98	6,01
Kontrolle Exp. 2 Comet 21	99,00	4,07	5,62	4,03
Kontrolle Exp. 2 Comet 22	129,00	3,57	4,52	4,61
Kontrolle Exp. 2 Comet 23	120,00	10,79	10,88	12,95
Kontrolle Exp. 2 Comet 24	93,00	3,09	4,19	2,87
Kontrolle Exp. 2 Comet 25	94,00	5,21	5,76	4,89
<b>MW</b>	<b>99,14</b>	<b>7,14</b>	<b>7,66</b>	<b>6,94</b>

ausgewertete Zellen: 21

### Experiment 3:

EMF-exponierte HL-60-Zellen:

Comet-Name	TL	Tail-DNA	OTM	TEM Optilas
EMF Exp. 3 Comet 1	233,00	43,06	53,16	100,34
EMF Exp. 3 Comet 2	322,00	43,08	72,23	138,71
EMF Exp. 3 Comet 3	293,00	16,68	41,76	48,88
EMF Exp. 3 Comet 4	203,00	15,75	30,67	31,98
EMF Exp. 3 Comet 5	251,00	24,96	43,05	62,66
EMF Exp. 3 Comet 6	447,00	45,61	96,26	203,90
EMF Exp. 3 Comet 7	329,00	42,34	57,96	139,30
EMF Exp. 3 Comet 8	518,00	24,61	43,94	127,48
EMF Exp. 3 Comet 9	496,00	32,79	70,77	162,61
EMF Exp. 3 Comet 10	528,00	34,31	79,32	181,16
EMF Exp. 3 Comet 11	159,00	16,89	30,30	26,86
EMF Exp. 3 Comet 12	206,00	25,84	43,71	53,23
EMF Exp. 3 Comet 13	213,00	24,54	42,42	52,28
EMF Exp. 3 Comet 14	188,00	20,44	36,80	38,44
EMF Exp. 3 Comet 15	562,00	38,57	116,82	216,77
EMF Exp. 3 Comet 16	825,00	57,04	169,57	470,58
EMF Exp. 3 Comet 17	356,00	27,01	54,16	96,16
<b>MW</b>	<b>360,53</b>	<b>31,38</b>	<b>63,70</b>	<b>126,55</b>

ausgewertete Zellen: 17

### Experiment 3:

Nicht-exponierte HL-60-Kontrollzellen:

Name	TL	Tail-DNA	OTM	TEM Optilas
Kontrolle Exp. 3 Comet 1	30,00	7,80	7,88	2,34
Kontrolle Exp. 3 Comet 2	54,00	6,12	5,57	3,30
Kontrolle Exp. 3 Comet 3	88,00	7,30	6,60	6,42
Kontrolle Exp. 3 Comet 4	62,00	4,35	4,12	2,69
Kontrolle Exp. 3 Comet 5	73,00	11,94	9,69	8,72
Kontrolle Exp. 3 Comet 6	44,00	16,68	12,93	7,34
Kontrolle Exp. 3 Comet 7	69,00	3,12	3,23	2,15
Kontrolle Exp. 3 Comet 8	83,00	2,84	4,58	2,36

Kontrolle Exp. 3 Comet 9	74,00	7,84	8,26	5,80
Kontrolle Exp. 3 Comet 10	105,00	7,55	4,60	7,93
Kontrolle Exp. 3 Comet 11	83,00	11,87	7,72	9,85
Kontrolle Exp. 3 Comet 12	96,00	3,26	2,58	3,13
Kontrolle Exp. 3 Comet 13	97,00	18,29	12,67	17,74
Kontrolle Exp. 3 Comet 14	87,00	12,02	8,81	10,46
Kontrolle Exp. 3 Comet 15	104,00	9,94	10,58	10,34
Kontrolle Exp. 3 Comet 16	24,00	7,59	6,54	1,82
Kontrolle Exp. 3 Comet 17	47,00	16,09	10,29	7,56
Kontrolle Exp. 3 Comet 18	24,00	5,77	4,01	1,39
Kontrolle Exp. 3 Comet 19	20,00	4,94	4,43	0,99
Kontrolle Exp. 3 Comet 20	43,00	10,34	7,49	4,45
Kontrolle Exp. 3 Comet 21	109,00	10,97	11,84	11,96
Kontrolle Exp. 3 Comet 22	40,00	6,80	5,34	2,72
<b>MW</b>	<b>66,18</b>	<b>8,79</b>	<b>7,26</b>	<b>5,98</b>

ausgewertete Zellen: 22



#### Experiment 4:

EMF-exponierte HL-60-Zellen:

Comet-Name	TL	Tail-DNA	OTM	TEM Outilas
EMF Exp. 4 Comet 1	175,00	10,49	18,97	18,36
EMF Exp. 4 Comet 2	385,00	25,31	58,18	97,44
EMF Exp. 4 Comet 3	381,00	29,31	61,30	111,68
EMF Exp. 4 Comet 4	578,00	37,30	86,76	215,59
EMF Exp. 4 Comet 5	252,00	25,79	34,02	65,00
EMF Exp. 4 Comet 6	302,00	24,89	44,01	75,18
EMF Exp. 4 Comet 7	410,00	36,72	54,62	150,55
EMF Exp. 4 Comet 8	418,00	31,27	79,34	130,70
EMF Exp. 4 Comet 9	321,00	28,48	59,10	91,41
EMF Exp. 4 Comet 10	671,00	55,61	162,47	373,11
EMF Exp. 4 Comet 11	316,00	22,02	49,88	69,57
EMF Exp. 4 Comet 12	602,00	47,14	126,18	283,79
EMF Exp. 4 Comet 13	495,00	35,68	98,05	176,60
EMF Exp. 4 Comet 14	429,00	43,84	94,18	188,08
EMF Exp. 4 Comet 15	498,00	45,32	129,10	225,69
EMF Exp. 4 Comet 16	221,00	29,84	45,13	65,95
EMF Exp. 4 Comet 17	389,00	24,39	58,97	94,88
EMF Exp. 4 Comet 18	191,00	16,44	30,52	31,39
EMF Exp. 4 Comet 19	515,00	33,99	79,71	175,03
EMF Exp. 4 Comet 20	317,00	41,47	41,12	131,47
EMF Exp. 4 Comet 21	173,00	31,08	29,67	53,77
EMF Exp. 4 Comet 22	183,00	19,01	27,82	34,79
EMF Exp. 4 Comet 25	242,00	20,97	38,18	50,76
<b>MW</b>	<b>368,00</b>	<b>31,15</b>	<b>65,53</b>	<b>126,56</b>

ausgewertete Zellen: 23

#### Experiment 4:

Nicht-exponierte HL-60-Kontrollzellen:

Comet-Name	TL	Tail-DNA	OTM	TEM Otilas
Kontrolle Exp. 4 Comet 1	57,00	10,59	7,17	6,04
Kontrolle Exp. 4 Comet 2	53,00	22,61	11,90	11,98
Kontrolle Exp. 4 Comet 3	59,00	3,07	3,97	1,81
Kontrolle Exp. 4 Comet 4	59,00	5,01	4,12	2,96
Kontrolle Exp. 4 Comet 5	229,00	18,84	25,04	43,14
Kontrolle Exp. 4 Comet 6	96,00	9,45	9,05	9,07
Kontrolle Exp. 4 Comet 7	77,00	20,18	11,71	15,54
Kontrolle Exp. 4 Comet 8	149,00	8,56	7,15	12,76
Kontrolle Exp. 4 Comet 9	78,00	3,62	3,22	2,82
Kontrolle Exp. 4 Comet 10	128,00	4,40	4,69	5,63
Kontrolle Exp. 4 Comet 11	73,00	15,02	12,88	10,96
Kontrolle Exp. 4 Comet 12	79,00	16,57	12,50	13,09
Kontrolle Exp. 4 Comet 13	117,00	8,18	6,19	9,57
Kontrolle Exp. 4 Comet 14	101,00	10,59	11,07	10,69
Kontrolle Exp. 4 Comet 15	270,00	13,08	9,48	35,31
Kontrolle Exp. 4 Comet 16	13,00	6,01	3,92	0,78
Kontrolle Exp. 4 Comet 17	117,00	15,23	11,27	17,82
Kontrolle Exp. 4 Comet 18	17,00	4,73	4,32	0,80
Kontrolle Exp. 4 Comet 19	138,00	10,07	9,75	13,89
Kontrolle Exp. 4 Comet 20	46,00	11,47	9,25	5,28
Kontrolle Exp. 4 Comet 21	24,00	6,24	6,46	1,50
Kontrolle Exp. 4 Comet 22	38,00	11,32	8,94	4,30
Kontrolle Exp. 4 Comet 23	58,00	14,85	10,70	8,61
Kontrolle Exp. 4 Comet 24	83,00	9,41	8,82	7,81
Kontrolle Exp. 4 Comet 25	104,00	14,35	13,50	14,93
<b>MW</b>	<b>90,52</b>	<b>10,94</b>	<b>9,08</b>	<b>10,68</b>

ausgewertete Zellen: 25

**Experiment 5:**

EMF-exponierte HL-60-Zellen:

<b>Comet-Name</b>	<b>TL</b>	<b>Tail-DNA</b>	<b>OTM</b>	<b>TEM Optilas</b>
EMF Exp. 5 Comet 1	383,00	22,62	54,03	86,62
EMF Exp. 5 Comet 2	280,00	22,77	41,51	63,76
EMF Exp. 5 Comet 3	196,00	26,45	34,19	51,84
EMF Exp. 5 Comet 4	200,00	20,9	30,5	41,79
EMF Exp. 5 Comet 5	315,00	24,35	25,82	76,71
EMF Exp. 5 Comet 6	148,00	29,93	32,65	44,3
EMF Exp. 5 Comet 7	316,00	49,18	66,68	155,41
EMF Exp. 5 Comet 8	140,00	26,08	32,15	36,52
EMF Exp. 5 Comet 9	160,00	29,64	33,32	47,43
EMF Exp. 5 Comet 10	239,00	28,6	43,43	68,34
EMF Exp. 5 Comet 12	258,00	32,93	44,14	84,95
EMF Exp. 5 Comet 14	252,00	16,39	32,72	41,31
EMF Exp. 5 Comet 15	150,00	23,54	29,36	35,31
EMF Exp. 5 Comet 16	153,00	22,39	28,03	34,26
EMF Exp. 5 Comet 17	227,00	12,96	24,85	29,41
EMF Exp. 5 Comet 18	158,00	23,97	29,06	37,87
EMF Exp. 5 Comet 19	302,00	24,03	48,06	72,56
EMF Exp. 5 Comet 20	628,00	40,28	107,71	252,96
EMF Exp. 5 Comet 21	214,00	23,16	45,14	49,56
EMF Exp. 5 Comet 22	484,00	29,87	76,24	144,57
EMF Exp. 5 Comet 23	436,00	43,65	73,29	190,33
EMF Exp. 5 Comet 24	134,00	22,3	31,13	29,89
EMF Exp. 5 Comet 25	231,00	15,86	31,39	36,64
EMF Exp. 5 Comet 26	210,00	31,86	39,42	66,9
<b>MW</b>	<b>258,92</b>	<b>26,82</b>	<b>43,12</b>	<b>74,14</b>

ausgewertete Zellen: 24

### Experiment 5:

Nicht-exponierte HL-60-Kontrollzellen:

<b>Comet-Name</b>	<b>TL</b>	<b>Tail-DNA</b>	<b>OTM</b>	<b>TEM Otilas</b>
Kontrolle Exp. 5 Comet 1	94,00	7,85	5,19	7,38
Kontrolle Exp. 5 Comet 2	21,00	6,19	4,7	1,3
Kontrolle Exp. 5 Comet 3	90,00	14,18	12,31	12,76
Kontrolle Exp. 5 Comet 4	119,00	7,9	6,18	9,4
Kontrolle Exp. 5 Comet 5	73,00	8,91	6,88	6,5
Kontrolle Exp. 5 Comet 6	60,00	6,98	7,26	4,19
Kontrolle Exp. 5 Comet 7	73,00	15,31	10,7	11,18
Kontrolle Exp. 5 Comet 8	19,00	5,77	5,52	1,1
Kontrolle Exp. 5 Comet 9	88,00	7,53	8,87	6,63
Kontrolle Exp. 5 Comet 10	46,00	15,43	11,62	7,1
Kontrolle Exp. 5 Comet 11	105,00	12,64	12,01	13,28
Kontrolle Exp. 5 Comet 12	108,00	15,59	11,82	16,83
Kontrolle Exp. 5 Comet 13	82,00	15,97	9,95	13,1
Kontrolle Exp. 5 Comet 14	95,00	15,65	12,98	14,87
Kontrolle Exp. 5 Comet 15	97,00	9,04	9,44	8,77
<b>MW</b>	<b>78</b>	<b>10,99</b>	<b>9,03</b>	<b>8,96</b>

ausgewertete Zellen: 15

## Experiment 6:

EMF-exponierte HL-60-Zellen:

Comet-Name	TL	Tail-DNA	OTM	TEM Otilas
EMF Exp. 6 Comet 1	213,00	37,31	30,95	79,48
EMF Exp. 6 Comet 2	228,00	38,68	47,65	88,18
EMF Exp. 6 Comet 3	310,00	29,21	38,87	90,54
EMF Exp. 6 Comet 6	272,00	23,75	36,75	64,61
EMF Exp. 6 Comet 7	173,00	17,16	29,49	29,69
EMF Exp. 6 Comet 8	321,00	19,23	36,95	61,74
EMF Exp. 6 Comet 9	214,00	19,18	34,25	41,05
EMF Exp. 6 Comet 10	359,00	34,61	64,88	124,26
EMF Exp. 6 Comet 11	393,00	34,88	61,17	137,07
EMF Exp. 6 Comet 12	352,00	23,43	55,56	82,47
EMF Exp. 6 Comet 13	348,00	32,24	60,29	112,20
EMF Exp. 6 Comet 14	405,00	34,88	64,81	141,26
EMF Exp. 6 Comet 15	221,00	15,51	29,51	34,27
EMF Exp. 6 Comet 16	284,00	15,58	29,33	44,24
EMF Exp. 6 Comet 17	181,00	29,43	39,55	53,28
EMF Exp. 6 Comet 18	265,00	29,01	32,24	76,88
EMF Exp. 6 Comet 19	279,00	16,56	31,07	46,20
EMF Exp. 6 Comet 20	275,00	28,56	42,74	78,54
EMF Exp. 6 Comet 21	156,00	16,80	29,83	26,21
EMF Exp. 6 Comet 22	227,00	15,17	29,39	34,45
EMF Exp. 6 Comet 23	395,00	24,52	55,51	96,84
EMF Exp. 6 Comet 24	249,00	16,50	31,37	41,09
EMF Exp. 6 Comet 25	222,00	16,23	30,13	36,04
<b>MW</b>	<b>275,74</b>	<b>24,71</b>	<b>40,97</b>	<b>70,46</b>

ausgewertete Zellen: 23

## Experiment 6:

Nicht-exponierte HL-60-Kontrollzellen:

<b>Comet-Name</b>	<b>TL</b>	<b>Tail-DNA</b>	<b>OTM</b>	<b>TEM Optilas</b>
Kontrolle Exp. 6 Comet 1	91,00	14,73	11,38	13,40
Kontrolle Exp. 6 Comet 2	95,00	6,95	5,29	6,61
Kontrolle Exp. 6 Comet 3	105,00	10,94	10,14	11,49
Kontrolle Exp. 6 Comet 4	49,00	10,64	8,23	5,21
Kontrolle Exp. 6 Comet 5	111,00	16,42	12,03	18,23
Kontrolle Exp. 6 Comet 6	36,00	10,09	8,53	3,63
Kontrolle Exp. 6 Comet 7	75,00	4,52	5,06	3,39
Kontrolle Exp. 6 Comet 8	225,00	12,73	17,33	28,63
Kontrolle Exp. 6 Comet 9	16,00	13,51	9,49	2,16
Kontrolle Exp. 6 Comet 10	114,00	6,35	5,91	7,24
Kontrolle Exp. 6 Comet 11	122,00	16,42	12,71	20,03
Kontrolle Exp. 6 Comet 12	76,00	10,72	12,50	8,15
Kontrolle Exp. 6 Comet 13	77,00	9,66	8,77	7,43
Kontrolle Exp. 6 Comet 14	110,00	11,57	10,57	12,73
Kontrolle Exp. 6 Comet 15	15,00	2,91	2,33	0,44
Kontrolle Exp. 6 Comet 16	69,00	4,24	3,38	2,92
Kontrolle Exp. 6 Comet 17	95,00	1,83	2,82	1,74
Kontrolle Exp. 6 Comet 18	77,00	4,30	2,83	3,31
Kontrolle Exp. 6 Comet 19	27,00	3,96	3,27	1,07
Kontrolle Exp. 6 Comet 20	40,00	2,97	3,07	1,19
Kontrolle Exp. 6 Comet 21	80,00	1,92	3,16	1,53
Kontrolle Exp. 6 Comet 22	121,00	5,25	4,27	6,35
Kontrolle Exp. 6 Comet 23	93,00	11,57	9,19	10,76
<b>MW</b>	<b>83,44</b>	<b>8,44</b>	<b>7,49</b>	<b>7,72</b>

ausgewertete Zellen: 23

**Experiment 7:**

EMF-exponierte HL-60-Zellen:

<b>Comet-Name</b>	<b>TL</b>	<b>Tail-DNA</b>	<b>OTM</b>	<b>TEM Otilas</b>
EMF Exp. 7 Comet 1	224,00	13,11	19,60	29,37
EMF Exp. 7 Comet 2	221,00	22,23	29,04	49,14
EMF Exp. 7 Comet 3	146,00	27,61	30,14	40,31
EMF Exp. 7 Comet 4	201,00	17,71	27,13	35,59
EMF Exp. 7 Comet 5	241,00	9,60	24,71	23,15
EMF Exp. 7 Comet 6	257,00	27,34	33,28	70,25
EMF Exp. 7 Comet 11	266,00	12,25	16,70	32,58
EMF Exp. 7 Comet 12	149,00	12,58	20,53	18,74
EMF Exp. 7 Comet 13	267,00	12,36	29,78	32,99
EMF Exp. 7 Comet 14	218,00	15,19	26,30	33,13
EMF Exp. 7 Comet 15	181,00	22,76	29,45	41,20
EMF Exp. 7 Comet 16	195,00	22,53	31,52	43,92
EMF Exp. 7 Comet 17	235,00	18,93	26,33	44,50
EMF Exp. 7 Comet 18	415,00	15,02	36,31	62,34
EMF Exp. 7 Comet 19	248,00	40,62	51,46	100,74
EMF Exp. 7 Comet 20	233,00	25,01	35,30	58,27
EMF Exp. 7 Comet 21	244,00	26,81	44,12	65,42
EMF Exp. 7 Comet 22	244,00	15,98	17,33	38,98
EMF Exp. 7 Comet 23	220,00	18,16	35,73	39,95
EMF Exp. 7 Comet 24	154,00	15,37	22,54	23,67
EMF Exp. 7 Comet 25	229,00	10,84	19,59	24,83
EMF Exp. 7 Comet 26	388,00	26,76	48,63	103,82
EMF Exp. 7 Comet 27	228,00	24,92	36,53	56,81
<b>MW</b>	<b>234,96</b>	<b>19,73</b>	<b>30,09</b>	<b>46,51</b>

ausgewertete Zellen: 23

## Experiment 7:

Nicht-exponierte HL-60-Kontrollzellen:

Comet-Name	TL	Tail-DNA	OTM	TEM Optilas
Kontrolle Exp. 7 Comet 1	119,00	6,09	5,10	7,25
Kontrolle Exp. 7 Comet 2	45,00	11,51	7,53	5,18
Kontrolle Exp. 7 Comet 3	78,00	11,71	8,74	9,13
Kontrolle Exp. 7 Comet 4	38,00	9,48	8,14	3,60
Kontrolle Exp. 7 Comet 5	60,00	6,03	5,16	3,62
Kontrolle Exp. 7 Comet 6	76,00	4,05	4,73	3,08
Kontrolle Exp. 7 Comet 7	93,00	7,50	6,19	6,98
Kontrolle Exp. 7 Comet 8	93,00	3,41	5,26	3,17
Kontrolle Exp. 7 Comet 9	50,00	13,22	10,65	6,61
Kontrolle Exp. 7 Comet 10	67,00	15,57	8,49	10,43
Kontrolle Exp. 7 Comet 11	25,00	7,97	5,49	1,99
Kontrolle Exp. 7 Comet 12	52,00	7,00	4,15	3,64
Kontrolle Exp. 7 Comet 13	17,00	4,83	3,54	0,82
Kontrolle Exp. 7 Comet 14	34,00	9,56	7,37	3,25
Kontrolle Exp. 7 Comet 15	63,00	8,93	5,01	5,62
Kontrolle Exp. 7 Comet 16	43,00	4,25	3,62	1,83
Kontrolle Exp. 7 Comet 17	55,00	14,00	10,52	7,70
Kontrolle Exp. 7 Comet 18	42,00	7,48	5,51	3,14
Kontrolle Exp. 7 Comet 19	53,00	6,33	4,16	3,35
Kontrolle Exp. 7 Comet 20	42,00	3,97	4,36	1,67
Kontrolle Exp. 7 Comet 21	50,00	9,02	7,44	4,51
Kontrolle Exp. 7 Comet 22	25,00	12,10	8,16	3,03
Kontrolle Exp. 7 Comet 23	98,00	4,68	3,94	4,58
Kontrolle Exp. 7 Comet 24	45,00	12,57	10,09	5,65
Kontrolle Exp. 7 Comet 25	75,00	10,83	6,79	8,12
Kontrolle Exp. 7 Comet 26	60,00	2,71	2,28	1,63
Kontrolle Exp. 7 Comet 27	31,00	3,54	2,84	1,10
Kontrolle Exp. 7 Comet 28	60,00	6,26	4,24	3,76
<b>MW</b>	<b>56,75</b>	<b>8,02</b>	<b>6,05</b>	<b>4,44</b>

ausgewertete Zellen: 28



#### 7.4.2. Anhang zur visuellen Auswertung des Comet-Assays

<b>Experiment 1 EMF Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 1 EMF Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2I4EL76W f00000003	4
Zelle 2	Archive 2I4EL76W f00000004	4
Zelle 3	Archive 2I4EL76W f00000005	3
Zelle 4	Archive 2I4EL76W f00000006, Zelle oben rechts	3
Zelle 5	Archive 2I4EL76W f00000007	3
Zelle 6	Archive 2I4EL76W f00000008	3
Zelle 7	Archive 2I4EL76W f00000009	4
Zelle 8	Archive 2I4EL76W f00000010	4

Zelle 9	Archive f00000011	2I4EL76W	4
Zelle 10	Archive f00000012	2I4EL76W	4
Zelle 11	Archive f00000015	2I4EL76W	4
Zelle 12	Archive f00000016, rechts	2I4EL76W Zelle oben	3
Zelle 13	Archive f00000017	2I4EL76W	3

<b>Experiment 1 Kontrolle Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 1 Kontrolle Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive f00000049	2I4EL76W 1
Zelle 2	Archive f00000050	2I4EL76W 1
Zelle 3	Archive f00000051	2I4EL76W 1

Zelle 4	Archive f00000052	2I4EL76W	1
Zelle 5	Archive f00000053, Zelle oben	2I4EL76W	1
Zelle 6	Archive f00000054	2I4EL76W	1
Zelle 7	Archive f00000055	2I4EL76W	1
Zelle 8	Archive f00000056	2I4EL76W	2
Zelle 9	Archive f00000057	2I4EL76W	1
Zelle 10	Archive f00000058	2I4EL76W	1
Zelle 11	Archive f00000059	2I4EL76W	2
Zelle 12	Archive f00000060, Zelle oben	2I4EL76W	1
Zelle 13	Archive f00000061, Zelle rechts	2I4EL76W	1
Zelle 14	Archive f00000061, Zelle links	2I4EL76W	1

Zelle 15	Archive f00000062	2I4EL76W	1
Zelle 16	Archive f00000063	2I4EL76W	1

<b>Experiment 2 EMF Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 2 EMF Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive f00000026	2J4667IM 3
Zelle 2	Archive f00000027	2J4667IM 3
Zelle 3	Archive f00000028, Zelle oben	2J4667IM 4
Zelle 4	Archive f00000028, Zelle unten	2J4667IM 3
Zelle 5	Archive f00000029	2J4667IM 3
Zelle 6	Archive f00000030, Zelle rechts	2J4667IM 3

Zelle 7	Archive 2J4667IM f00000030, Zelle links	4
Zelle 8	Archive 2J4667IM f00000031, Zelle oben	3
Zelle 9	Archive 2J4667IM f00000031, Zelle unten	3
Zelle 10	Archive 2J4667IM f00000032	3
Zelle 11	Archive 2J4667IM f00000033	3
Zelle 12	Archive 2J4667IM f00000034	2
Zelle 13	Archive 2J4667IM f00000035, Zelle oben	2
Zelle 14	Archive 2J4667IM f00000035, Zelle unten	2

<b>Experiment 2 Kontrolle Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 2 Kontrolle Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2J4667IM f00000001	1

Zelle 2	Archive f00000002	2J4667IM	1
Zelle 3	Archive f00000003, Zelle Mitte	2J4667IM	1
Zelle 4	Archive f00000004, Zelle Mitte	2J4667IM	1
Zelle 5	Archive f00000005, Zelle oben	2J4667IM	1
Zelle 6	Archive f00000005, Zelle Mitte	2J4667IM	1
Zelle 7	Archive f00000006	2J4667IM	1
Zelle 8	Archive f00000007	2J4667IM	1
Zelle 9	Archive f00000008, Zelle Mitte rechts	2J4667IM	1
Zelle 10	Archive f00000009, Zelle oben	2J4667IM	1
Zelle 11	Archive f00000010, Zelle rechts	2J4667IM	1

Zelle 12	Archive 2J4667IM f00000010, Zelle links	1
Zelle 13	Archive 2J4667IM f00000011	1
Zelle 14	Archive 2J4667IM f00000012, Zelle Mitte	1
Zelle 15	Archive 2J4667IM f00000013, Zelle oben	1
Zelle 16	Archive 2J4667IM f00000013, Zelle unten	2
Zelle 17	Archive 2J4667IM f00000014, Zelle Mitte	2
Zelle 18	Archive 2J4667IM f00000015, Zelle oben	2
Zelle 19	Archive 2J4667IM f00000015, Zelle unten	2
Zelle 20	Archive 2J4667IM f00000016, Zelle Mitte	1
Zelle 21	Archive 2J4667IM f00000017, Zelle unten	1

Zelle 22	Archive 2J4667IM f00000018, Zelle rechts oben	1
Zelle 23	Archive 2J4667IM f00000018, Zelle links oben	2
Zelle 24	Archive 2J4667IM f00000018, Zelle links Mitte	2
Zelle 25	Archive 2J4667IM f00000019, Zelle oben	2
Zelle 26	Archive 2J4667IM f00000019, Zelle unten	2
Zelle 27	Archive 2J4667IM f00000020, Zelle oben	2
Zelle 28	Archive 2J4667IM f00000021, Zelle oben	1
Zelle 29	Archive 2J4667IM f00000022, Zelle Mitte unten	2
Zelle 30	Archive 2J4667IM f00000023, Zelle oben	1



Zelle 31	Archive 2J4667IM f00000023, Zelle unten	2
Zelle 32	Archive 2J4667IM f00000024	2
Zelle 33	Archive 2J4667IM f00000025, Zelle rechts	1
Zelle 34	Archive 2J4667IM f00000025, Zelle links	1

<b>Experiment 3 EMF Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 3 EMF Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2J4J27F2 f00000001, Zelle oben	3
Zelle 2	Archive 2J4J27F2 f00000001, Zelle unten rechts	4
Zelle 3	Archive 2J4J27F2 f00000002, Zelle unten	4
Zelle 4	Archive 2J4J27F2 f00000003, Zelle Mitte	4

Zelle 5	Archive 2J4J27F2 f00000004, Zelle oben	4
Zelle 6	Archive 2J4J27F2 f00000004, Zelle unten	4
Zelle 7	Archive 2J4J27F2 f00000005	4
Zelle 8	Archive 2J4J27F2 f00000006, Zelle unten	4
Zelle 9	Archive 2J4J27F2 f00000007, Zelle Mitte	4
Zelle 10	Archive 2J4J27F2 f00000007, Zelle unten	4
Zelle 11	Archive 2J4J27F2 f00000008, Zelle unten	4
Zelle 12	Archive 2J4J27F2 f00000009, Zelle oben	4
Zelle 13	Archive 2J4J27F2 f00000009, Zelle Mitte	4
Zelle 14	Archive 2J4J27F2 f00000009, Zelle unten	4
Zelle 15	Archive 2J4J27F2 f00000010, Zelle Mitte	4

Zelle 16	Archive f00000011	2J4J27F2	4
Zelle 17	Archive f00000012, Zelle oben	2J4J27F2	4
Zelle 18	Archive f00000013, Zelle oben	2J4J27F2	4
Zelle 19	Archive f00000013, Zelle unten	2J4J27F2	4
Zelle 20	Archive f00000014, Zelle Mitte	2J4J27F2	4
Zelle 21	Archive f00000015	2J4J27F2	3
Zelle 22	Archive f00000016, Zelle Mitte	2J4J27F2	4
Zelle 23	Archive f00000017	2J4J27F2	4
Zelle 24	Archive f00000018	2J4J27F2	4
Zelle 25	Archive f00000019	2J4J27F2	4
Zelle 26	Archive f00000020	2J4J27F2	4

Zelle 27	Archive 2J4J27F2 f00000021, Zelle oben	3
Zelle 28	Archive 2J4J27F2 f00000021, Zelle Mitte	4
Zelle 29	Archive 2J4J27F2 f00000021, Zelle unten	4
Zelle 30	Archive 2J4J27F2 f00000022	4
Zelle 31	Archive 2J4J27F2 f00000023, Zelle Mitte	4
Zelle 32	Archive 2J4J27F2 f00000024	4
Zelle 33	Archive 2J4J27F2 f00000025	4

<b>Experiment 3 Kontrolle Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 3 Kontrolle Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2J4J27F2 f00000026, Zelle oben	1
Zelle 2	Archive 2J4J27F2 f00000026, Zelle unten	1

Zelle 3	Archive 2J4J27F2 f00000027, Zelle oben	1
Zelle 4	Archive 2J4J27F2 f00000027, Zelle Mitte	1
Zelle 5	Archive 2J4J27F2 f00000028, Zelle oben rechts	1
Zelle 6	Archive 2J4J27F2 f00000028, Zelle Mitte	1
Zelle 7	Archive 2J4J27F2 f00000028, Zelle unten links	1
Zelle 8	Archive 2J4J27F2 f00000029, Zelle oben links	1
Zelle 9	Archive 2J4J27F2 f00000029, Zelle unten rechts	1
Zelle 10	Archive 2J4J27F2 f00000030, Zelle oben	1
Zelle 11	Archive 2J4J27F2 f00000030, Zellen unten rechts	1

Zelle 12	Archive 2J4J27F2 f00000030, Zelle unten links	1
Zelle 13	Archive 2J4J27F2 f00000031, Zelle oben	1
Zelle 14	Archive 2J4J27F2 f00000031, Zelle unten	1
Zelle 15	Archive 2J4J27F2 f00000032, Zelle oben	1
Zelle 16	Archive 2J4J27F2 f00000032, Zelle Mitte	1
Zelle 17	Archive 2J4J27F2 f00000032, Zelle unten rechts	1
Zelle 18	Archive 2J4J27F2 f00000032, Zelle unten links	1
Zelle 19	Archive 2J4J27F2 f00000033, Zelle oben rechts	1
Zelle 20	Archive 2J4J27F2 f00000033, Zelle oben links	1

Zelle 21	Archive 2J4J27F2 f00000033, Zelle unten links	1
Zelle 22	Archive 2J4J27F2 f00000034, Zelle Mitte oben	1
Zelle 23	Archive 2J4J27F2 f00000034, Zelle Mitte unten	1
Zelle 24	Archive 2J4J27F2 f00000035, Zelle oben rechts	1
Zelle 25	Archive 2J4J27F2 f00000035, Zelle unten rechts	1
Zelle 26	Archive 2J4J27F2 f00000035, Zelle oben links	1
Zelle 27	Archive 2J4J27F2 f00000036, Zelle Mitte rechts	1
Zelle 28	Archive 2J4J27F2 f00000036, Zelle unten links	1

Zelle 29	Archive 2J4J27F2 f00000037, Zelle oben rechts	1
Zelle 30	Archive 2J4J27F2 f00000037, Zelle oben Mitte	1
Zelle 31	Archive 2J4J27F2 f00000037, Zelle unten links	1
Zelle 32	Archive 2J4J27F2 f00000038, Zelle oben Mitte	1
Zelle 33	Archive 2J4J27F2 f00000038, Zelle oben links	1
Zelle 34	Archive 2J4J27F2 f00000039, Zelle unten rechts	1
Zelle 35	Archive 2J4J27F2 f00000039, Zelle Mitte links	1
Zelle 36	Archive 2J4J27F2 f00000040, Zelle unten rechts	1



Zelle 37	Archive 2J4J27F2 f00000040, Zelle oben links	1
Zelle 38	Archive 2J4J27F2 f00000041	1
Zelle 39	Archive 2J4J27F2 f00000042, Zelle Mitte	1
Zelle 40	Archive 2J4J27F2 f00000043, Zelle rechts	1
Zelle 41	Archive 2J4J27F2 f00000043, Zelle Mitte	1
Zelle 42	Archive 2J4J27F2 f00000043, Zelle links	1
Zelle 43	Archive 2J4J27F2 f00000044, Zelle oben	1
Zelle 44	Archive 2J4J27F2 f00000044, Zelle unten rechts	1
Zelle 45	Archive 2J4J27F2 f00000044, Zelle unten links	1
Zelle 46	Archive 2J4J27F2 f00000045, Zelle unten rechts	1

<b>Experiment 4 EMF Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 4 EMF Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2J4J97P9 f00000001, Zelle oben	4
Zelle 2	Archive 2J4J97P9 f00000001, Zelle unten	3
Zelle 3	Archive 2J4J97P9 f00000002	4
Zelle 4	Archive 2J4J97P9 f00000003	4
Zelle 5	Archive 2J4J97P9 f00000004, Zelle oben	4
Zelle 6	Archive 2J4J97P9 f00000004, Zelle unten	4
Zelle 7	Archive 2J4J97P9 f00000005	4
Zelle 8	Archive 2J4J97P9 f00000006, Zelle rechts unten	3
Zelle 9	Archive 2J4J97P9 f00000007	4

Zelle 10	Archive f00000008	2J4J97P9	3
Zelle 11	Archive f00000009	2J4J97P9	4
Zelle 12	Archive f00000010	2J4J97P9	3
Zelle 13	Archive f00000011	2J4J97P9	4
Zelle 14	Archive f00000012	2J4J97P9	4
Zelle 15	Archive f00000013	2J4J97P9	4
Zelle 16	Archive f00000014	2J4J97P9	4
Zelle 17	Archive f00000015	2J4J97P9	4
Zelle 18	Archive f00000016	2J4J97P9	4
Zelle 19	Archive f00000017, Mitte	2J4J97P9 Zelle oben	3

Zelle 20	Archive f00000018	2J4J97P9	4
Zelle 21	Archive f00000019	2J4J97P9	3
Zelle 22	Archive f00000020	2J4J97P9	4
Zelle 23	Archive f00000021	2J4J97P9	3
Zelle 24	Archive f00000022, Zelle oben	2J4J97P9	3
Zelle 25	Archive f00000022, Zelle unten	2J4J97P9	3
Zelle 26	Archive f00000023	2J4J97P9	3
Zelle 27	Archive f00000025	2J4J97P9	4

<b>Experiment 4 Kontrolle Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 4 Kontrolle Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2J4J97P9 f00000026, Zelle oben links	1
Zelle 2	Archive 2J4J97P9 f00000026, Zelle unten rechts	1
Zelle 3	Archive 2J4J97P9 f00000027, Zelle rechts	1
Zelle 4	Archive 2J4J97P9 f00000027, Zelle links	1
Zelle 5	Archive 2J4J97P9 f00000028	1
Zelle 6	Archive 2J4J97P9 f00000029, Zelle rechts	1
Zelle 7	Archive 2J4J97P9 f00000029, Zelle links	1
Zelle 8	Archive 2J4J97P9 f00000030	2
Zelle 9	Archive 2J4J97P9 f00000031, Zelle rechts	1

Zelle 10	Archive 2J4J97P9 f00000031, Zelle links	2
Zelle 11	Archive 2J4J97P9 f00000032, Zelle rechts	1
Zelle 12	Archive 2J4J97P9 f00000032, Zelle links	1
Zelle 13	Archive 2J4J97P9 f00000033, Zelle oben	1
Zelle 14	Archive 2J4J97P9 f00000033, Zelle Mitte	2
Zelle 15	Archive 2J4J97P9 f00000034, Zelle oben rechts	1
Zelle 16	Archive 2J4J97P9 f00000034, Zelle unten links	2
Zelle 17	Archive 2J4J97P9 f00000035	2
Zelle 18	Archive 2J4J97P9 f00000036, Zelle oben rechts	2
Zelle 19	Archive 2J4J97P9 f00000036, Zelle oben links	1

Zelle 20	Archive 2J4J97P9 f00000037, Zelle oben rechts	2
Zelle 21	Archive 2J4J97P9 f00000037, Zelle Mitte	1
Zelle 22	Archive 2J4J97P9 f00000037, Zelle unten	1
Zelle 23	Archive 2J4J97P9 f00000037, Zelle oben links	2
Zelle 24	Archive 2J4J97P9 f00000038, Zelle rechts	1
Zelle 25	Archive 2J4J97P9 f00000038, Zelle links	1
Zelle 26	Archive 2J4J97P9 f00000039, Zelle oben rechts	2
Zelle 27	Archive 2J4J97P9 f00000039, Zelle Mitte rechts	1
Zelle 28	Archive 2J4J97P9 f00000040, Zelle oben rechts	1

Zelle 29	Archive 2J4J97P9 f00000040, Zelle Mitte	1
Zelle 30	Archive 2J4J97P9 f00000040, Zelle unten	1
Zelle 31	Archive 2J4J97P9 f00000041, Zelle unten rechts	1
Zelle 32	Archive 2J4J97P9 f00000041, Zelle unten Mitte	2
Zelle 33	Archive 2J4J97P9 f00000042	1
Zelle 34	Archive 2J4J97P9 f00000043, Zelle oben	1
Zelle 35	Archive 2J4J97P9 f00000043, Zelle Mitte links	1
Zelle 36	Archive 2J4J97P9 f00000044, Zelle unten Mitte	1
Zelle 37	Archive 2J4J97P9 f00000045, Zelle oben	2



Zelle 38	Archive f00000045, Zelle unten	2J4J97P9	1
Zelle 39	Archive f00000046	2J4J97P9	1
Zelle 40	Archive f00000047	2J4J97P9	2
Zelle 41	Archive f00000048	2J4J97P9	2
Zelle 42	Archive f00000049	2J4J97P9	2
Zelle 43	Archive f00000050	2J4J97P9	2

<b>Experiment 5 EMF Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 5 EMF Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive f00000001	2J4WG7OJ 3
Zelle 2	Archive f00000002	2J4WG7OJ 4

Zelle 3	Archive f00000003	2J4WG7OJ	4
Zelle 4	Archive f00000004	2J4WG7OJ	4
Zelle 5	Archive f00000005	2J4WG7OJ	4
Zelle 6	Archive f00000006	2J4WG7OJ	4
Zelle 7	Archive f00000007, Zelle rechts	2J4WG7OJ	4
Zelle 8	Archive f00000008; Zelle unten Mitte	2J4WG7OJ	3
Zelle 9	Archive f00000009	2J4WG7OJ	3
Zelle 10	Archive f00000010	2J4WG7OJ	3
Zelle 11	Archive f00000011	2J4WG7OJ	3
Zelle 12	Archive f00000012	2J4WG7OJ	3

Zelle 13	Archive 2J4WG7OJ f00000013, Zelle oben Mitte	3
Zelle 14	Archive 2J4WG7OJ f00000013, Zelle unten rechts	3
Zelle 15	Archive 2J4WG7OJ f00000014, Zelle oben	3
Zelle 16	Archive 2J4WG7OJ f00000015, Zelle unten rechts	3
Zelle 17	Archive 2J4WG7OJ f00000016	3
Zelle 18	Archive 2J4WG7OJ f00000017	3
Zelle 19	Archive 2J4WG7OJ f00000018	4
Zelle 20	Archive 2J4WG7OJ f00000019, Zelle Mitte rechts	4
Zelle 21	Archive 2J4WG7OJ f00000020, Zelle oben links	2

Zelle 22	Archive 2J4WG7OJ f00000020, Zelle Mitte	3
Zelle 23	Archive 2J4WG7OJ f00000020, Zelle unten rechts	3
Zelle 24	Archive 2J4WG7OJ f00000021, Zelle oben Mitte	4
Zelle 25	Archive 2J4WG7OJ f00000022	4
Zelle 26	Archive 2J4WG7OJ f00000023	4
Zelle 27	Archive 2J4WG7OJ f00000024, Zelle Mitte	3
Zelle 28	Archive 2J4WG7OJ f00000024, Zelle unten rechts	3
Zelle 29	Archive 2J4WG7OJ f00000025	3

<b>Experiment 5 Kontrolle Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 5 Kontrolle Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2J4WG7OJ f00000027	1
Zelle 2	Archive 2J4WG7OJ f00000028	1
Zelle 3	Archive 2J4WG7OJ f00000029, Zelle oben Mitte	2
Zelle 4	Archive 2J4WG7OJ f00000029, Zelle unten links	2
Zelle 5	Archive 2J4WG7OJ f00000030	2
Zelle 6	Archive 2J4WG7OJ f00000031	2
Zelle 7	Archive 2J4WG7OJ f00000032	2
Zelle 8	Archive 2J4WG7OJ f00000033	1

Zelle 9	Archive 2J4WG7OJ f00000034, Zelle unten rechts	2
Zelle 10	Archive 2J4WG7OJ f00000035	1
Zelle 11	Archive 2J4WG7OJ f00000036	2
Zelle 12	Archive 2J4WG7OJ f00000037, Zelle rechts	2
Zelle 13	Archive 2J4WG7OJ f00000037, Zelle links	2
Zelle 14	Archive 2J4WG7OJ f00000038, Zelle rechts	2
Zelle 15	Archive 2J4WG7OJ f00000038, Zelle links	1
Zelle 16	Archive 2J4WG7OJ f00000039, Zelle rechts	2
Zelle 17	Archive 2J4WG7OJ f00000039, Zelle links	2
Zelle 18	Archive 2J4WG7OJ f00000040	2

Zelle 19	Archive f00000041	2J4WG7OJ	2
Zelle 20	Archive f00000042, Mitte	2J4WG7OJ Zelle unten	2
Zelle 21	Archive f00000043	2J4WG7OJ	2
Zelle 22	Archive f00000044, Zelle Mitte	2J4WG7OJ	1
Zelle 23	Archive f00000045, Zelle oben	2J4WG7OJ	1
Zelle 24	Archive f00000046	2J4WG7OJ	1
Zelle 25	Archive f00000047, Zelle rechts	2J4WG7OJ	1
Zelle 26	Archive f00000048, Zelle rechts	2J4WG7OJ	2
Zelle 27	Archive f00000048, Zelle links	2J4WG7OJ	2
Zelle 28	Archive f00000049	2J4WG7OJ	1

Zelle 29	Archive 2J4WG7OJ f00000050, Zelle oben	2
Zelle 30	Archive 2J4WG7OJ f00000051, Zelle rechts	2
Zelle 31	Archive 2J4WG7OJ f00000051, Zelle links	2

<b>Experiment 6 EMF Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 6 EMF Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2J4W274G f00000001, Zelle Mitte links	3
Zelle 2	Archive 2J4W274G f00000002	4
Zelle 3	Archive 2J4W274G f00000003, Zelle Mitte	3
Zelle 4	Archive 2J4W274G f00000004, Zelle oben	3
Zelle 5	Archive 2J4W274G f00000004, Zelle unten	2



Zelle 6	Archive 2J4W274G f00000006, Zelle rechts	3
Zelle 7	Archive 2J4W274G f00000006, Zelle links	3
Zelle 8	Archive 2J4W274G f00000007	4
Zelle 9	Archive 2J4W274G f00000008, Zelle rechts	3
Zelle 10	Archive 2J4W274G f00000009	3
Zelle 11	Archive 2J4W274G f00000010	4
Zelle 12	Archive 2J4W274G f00000011, Zelle rechts	4
Zelle 13	Archive 2J4W274G f00000012	4
Zelle 14	Archive 2J4W274G f00000013	4
Zelle 15	Archive 2J4W274G f00000014, Zelle oben	3
Zelle 16	Archive 2J4W274G f00000015, Zelle rechts	3

Zelle 17	Archive 2J4W274G f00000016	4
Zelle 18	Archive 2J4W274G f00000017, Zelle unten	3
Zelle 19	Archive 2J4W274G f00000018, Zelle unten rechts	4
Zelle 20	Archive 2J4W274G f00000018, Zelle unten links	4
Zelle 21	Archive 2J4W274G f00000019, Zelle Mitte	4
Zelle 22	Archive 2J4W274G f00000019, Zelle unten	4
Zelle 23	Archive 2J4W274G f00000020, Zelle Mitte	3
Zelle 24	Archive 2J4W274G f00000021, Zelle links	3
Zelle 25	Archive 2J4W274G f00000022	4
Zelle 26	Archive 2J4W274G f00000023, Zelle oben	4

Zelle 27	Archive 2J4W274G f00000023, Zelle unten	4
Zelle 28	Archive 2J4W274G f00000024	3
Zelle 29	Archive 2J4W274G f00000025	4

<b>Experiment 6 Kontrolle Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 6 Kontrolle Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2J4W274G f00000028, Zelle Mitte links	2
Zelle 2	Archive 2J4W274G f00000029	2
Zelle 3	Archive 2J4W274G f00000030, Zelle oben	1
Zelle 4	Archive 2J4W274G f00000030, Zelle Mitte	1
Zelle 5	Archive 2J4W274G f00000030, Zelle unten	1

Zelle 6	Archive 2J4W274G f00000031, Zelle rechts	1
Zelle 7	Archive 2J4W274G f00000031, Zelle Mitte	1
Zelle 8	Archive 2J4W274G f00000031, Zelle links	1
Zelle 9	Archive 2J4W274G f00000032	2
Zelle 10	Archive 2J4W274G f00000033	2
Zelle 11	Archive 2J4W274G f00000034, Zelle oben	1
Zelle 12	Archive 2J4W274G f00000034, Zelle Mitte	1
Zelle 13	Archive 2J4W274G f00000035, Zelle oben rechts	2
Zelle 14	Archive 2J4W274G f00000035, Zelle oben links	1
Zelle 15	Archive 2J4W274G f00000035, Zelle Mitte	1

Zelle 16	Archive 2J4W274G f00000035, Zelle unten rechts	2
Zelle 17	Archive 2J4W274G f00000036, Zelle oben	2
Zelle 18	Archive 2J4W274G f00000036, Zelle unten	2
Zelle 19	Archive 2J4W274G f00000037, Zelle oben rechts	2
Zelle 20	Archive 2J4W274G f00000038, Zelle Mitte	2
Zelle 21	Archive 2J4W274G f00000039	2
Zelle 22	Archive 2J4W274G f00000040	2
Zelle 23	Archive 2J4W274G f00000041	2
Zelle 24	Archive 2J4W274G f00000042	2
Zelle 25	Archive 2J4W274G f00000043, Zelle Mitte	2

Zelle 26	Archive            2J4W274G f00000044, Zelle rechts	2
Zelle 27	Archive            2J4W274G f00000044, Zelle links	2
Zelle 28	Archive            2J4W274G f00000045, Zelle oben	2
Zelle 29	Archive            2J4W274G f00000045, Zelle unten	2
Zelle 30	Archive            2J4W274G f00000046	2
Zelle 31	Archive            2J4W274G f00000047, Zelle oben	2
Zelle 32	Archive            2J4W274G f00000047, Zelle unten	2
Zelle 33	Archive            2J4W274G f00000048, Zelle oben	2
Zelle 34	Archive            2J4W274G f00000048, Zelle unten	2
Zelle 35	Archive            2J4W274G f00000049	2
Zelle 36	Archive            2J4W274G f00000050	2

<b>Experiment 7 EMF Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 7 EMF Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2K4987MY f00000001, Zelle Mitte	3
Zelle 2	Archive 2K4987MY f00000002	3
Zelle 3	Archive 2K4987MY f00000003, Zelle rechts	4
Zelle 4	Archive 2K4987MY f00000003, Zelle links	4
Zelle 5	Archive 2K4987MY f00000004	4
Zelle 6	Archive 2K4987MY f00000005	4
Zelle 7	Archive 2K4987MY f00000006	4
Zelle 8	Archive 2K4987MY f00000007	3
Zelle 9	Archive 2K4987MY f00000008	4

Zelle 10	Archive 2K4987MY f00000009	3
Zelle 11	Archive 2K4987MY f00000010, Zelle Mitte	3
Zelle 12	Archive 2K4987MY f00000010, Zelle unten rechts	3
Zelle 13	Archive 2K4987MY f00000011	4
Zelle 14	Archive 2K4987MY f00000012, Zelle rechts	3
Zelle 15	Archive 2K4987MY f00000013	3
Zelle 16	Archive 2K4987MY f00000014, Zelle oben	4
Zelle 17	Archive 2K4987MY f00000014, Zelle Mitte	4
Zelle 18	Archive 2K4987MY f00000014, Zelle unten	4
Zelle 19	Archive 2K4987MY f00000015	4



Zelle 20	Archive 2K4987MY f00000016, Zelle oben	4
Zelle 21	Archive 2K4987MY f00000016, Zelle unten	4
Zelle 22	Archive 2K4987MY f00000017, Zelle rechts	3
Zelle 23	Archive 2K4987MY f00000017, Zelle links	3
Zelle 24	Archive 2K4987MY f00000018, Zelle oben	4
Zelle 25	Archive 2K4987MY f00000018, Zelle unten	4
Zelle 26	Archive 2K4987MY f00000019, Zelle rechts	3
Zelle 27	Archive 2K4987MY f00000020	4
Zelle 28	Archive 2K4987MY f00000021, Zelle oben	3
Zelle 29	Archive 2K4987MY f00000021, Zelle unten	4
Zelle 30	Archive 2K4987MY f00000022, Zelle oben	4

Zelle 31	Archive 2K4987MY f00000022, Zelle unten	4
Zelle 32	Archive 2K4987MY f00000023	4
Zelle 33	Archive 2K4987MY f00000024, Zelle oben	3
Zelle 34	Archive 2K4987MY f00000024, Zelle unten	3
Zelle 35	Archive 2K4987MY f00000025	4

<b>Experiment 7 Kontrolle Comet- Fluoreszenzbild</b>	<b>Experiment 7 Kontrolle Comet-Fluoreszenzbild</b>	<b>Visuelle Auswertung der Cometen</b>
Zelle 1	Archive 2K4987MY f00000026	1
Zelle 2	Archive 2K4987MY f00000027, Zelle rechts	1
Zelle 3	Archive 2K4987MY f00000027, Zelle Mitte unten	1

Zelle 4	Archive f00000028	2K4987MY	2
Zelle 5	Archive f00000029	2K4987MY	2
Zelle 6	Archive f00000030, Zelle links oben	2K4987MY	2
Zelle 7	Archive f00000030, Zelle rechts unten	2K4987MY	2
Zelle 8	Archive f00000031, Zelle oben	2K4987MY	1
Zelle 9	Archive f00000031, Zelle rechts unten	2K4987MY	2
Zelle 10	Archive f00000031, Zelle links unten	2K4987MY	2
Zelle 11	Archive f00000032, Zelle oben links	2K4987MY	1
Zelle 12	Archive f00000032, Zelle rechts Mitte	2K4987MY	2

Zelle 13	Archive 2K4987MY f00000032, Zelle rechts unten	2
Zelle 14	Archive 2K4987MY f00000033, Zelle oben rechts	2
Zelle 15	Archive 2K4987MY f00000033, Zelle oben links	1
Zelle 16	Archive 2K4987MY f00000034, Zelle oben links	2
Zelle 17	Archive 2K4987MY f00000034, Zelle unten rechts	1
Zelle 18	Archive 2K4987MY f00000035, Zelle rechts	1
Zelle 19	Archive 2K4987MY f00000035, Zelle links	2
Zelle 20	Archive 2K4987MY f00000036	2
Zelle 21	Archive 2K4987MY f00000037	1
Zelle 22	Archive 2K4987MY f00000038, Zelle oben	1
Zelle 23	Archive 2K4987MY f00000038, Zelle unten	1

Zelle 24	Archive            2K4987MY f00000039, Zelle rechts	1
Zelle 25	Archive            2K4987MY f00000039, Zelle links	1
Zelle 26	Archive            2K4987MY f00000040, Zelle oben links	1
Zelle 27	Archive            2K4987MY f00000040, Zelle Mitte	1
Zelle 28	Archive            2K4987MY f00000041, Zelle oben	1
Zelle 29	Archive            2K4987MY f00000041, Zelle unten	1
Zelle 30	Archive            2K4987MY f00000042, Zelle oben	1
Zelle 31	Archive            2K4987MY f00000042, Zelle unten	1
Zelle 32	Archive            2K4987MY f00000043	1
Zelle 33	Archive            2K4987MY f00000044, Zelle Mitte	1
Zelle 34	Archive            2K4987MY f00000044, Zelle unten rechts	1

Zelle 35	Archive 2K4987MY f00000044, Zelle unten links	1
Zelle 36	Archive 2K4987MY f00000045, Zelle Mitte	1
Zelle 37	Archive 2K4987MY f00000046	1
Zelle 38	Archive 2K4987MY f00000047, Zelle oben	1
Zelle 39	Archive 2K4987MY f00000047, Zelle unten	1
Zelle 40	Archive 2K4987MY f00000048, Zelle Mitte	1
Zelle 41	Archive 2K4987MY f00000049, Zelle rechts	1
Zelle 42	Archive 2K4987MY f00000050, Zelle oben links	2
Zelle 43	Archive 2K4987MY f00000050, Zelle unten Mitte	2
Zelle 44	Archive 2K4987MY f00000050, Zelle unten rechts	2