

Spotlight on EMF Research

Spotlight on “Genetic profiling of rat gliomas and cardiac schwannomas from life-time radiofrequency radiation exposure study using a targeted next-generation sequencing gene panel” by Brooks et al. in PLoS One (2024)

Kategorie [Hochfrequente Felder, experimentelle Tierstudie]

Spotlight - Jun/2024 no.2 (Deu)

Kompetenzzentrum Elektromagnetische Felder (KEMF)

1 Einordnung des Artikels in den Kontext durch das BfS

Das National Toxicology Program (NTP) und das Ramazzini Institut (RI, dem die Autoren des vorliegenden Papiers angehören) führten in der Vergangenheit Studien zu den gesundheitlichen Auswirkungen einer lebenslangen Exposition von Ratten gegenüber hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF) durch. Obwohl diese Studien nicht gänzlich konsistent sind, deuten sie auf ein erhöhtes Auftreten von bösartigen Gliomen (eine häufige Art von Hirntumoren) und bösartigen Schwannomen des Herzens insbesondere bei gegenüber HF-EMF exponierten männlichen Ratten hin. Die Studien haben einige Einschränkungen, die in Stellungnahmen des BfS erläutert werden [2-4]. Darüber hinaus haben neuere epidemiologische Studien kein erhöhtes Risiko für Hirntumore in Verbindung mit HF-EMF-Exposition gefunden [5, 6]. Dennoch bleibt unklar, ob die Gliomagenese unter den besonderen Umständen der Rattenstudien eine Relevanz für menschliche Tumore hat.

2 Resultate und Schlussfolgerungen aus der Perspektive der Autoren

Brooks et al. [1] untersuchten die genetischen Veränderungen in den bösartigen Tumoren der Ratten, die im Rahmen der RI-Studie gewonnen wurden, um ihre Bedeutung für menschliche Erkrankungen zu bewerten. Die Ratten wurden in der RI-Studie entweder scheinexponiert oder Fernfeld-HF-EMF mit einer spezifischen Ganzkörper-Absorptionsrate (SAR) von 0,001, 0,03 oder 0,1 W/kg ausgesetzt. Brooks et al. entnahmen Archivproben von insgesamt 14 Gliomen und neun Herzschnannomen, darunter zwei spontan aufgetretenen Hirn- und einem Herztumor aus nicht-exponierten Ratten. Alle Tumore stammten von zwei Jahre alten Ratten. Falls die HF-EMF-Exposition Mutationen verursacht, erwarteten die Autoren, dass diese

Schäden bereits bei erwachsenen Ratten nachweisbar sind, bevor sich die Tumore im für Ratten relativ hohen Alter von zwei Jahren manifestieren. Daher wurden dreißig HF-EMF-exponierte, tumorfreie Ratten-Gehirngewebe (ENT) zu einem Zwischenzeitpunkt von einem Jahr entnommen. Außerdem wurden altersgleiche normale Gewebe von jeweils neun nicht-exponierten Ratten als Kontrollen verwendet. Zur Kontrolle von Keimbahnvarianten war von jeder Ratte DNA aus Nierengewebe verfügbar.

Die histopathologische Charakterisierung der Tumore zeigte, dass die bösartigen Gliome der Ratten niedrigmalignen diffusen Gliomen des Menschen ähnelten.

Ein targeted Next-Generation-Sequencing (NGS)-Panel wurde für 23 für menschliche Hirntumore besonders relevante Gene erstellt und umfasste entweder die gesamte proteinkodierende Gensequenz oder spezifische "Hotspot"-Positionen, die in menschlichen Gliomen häufig und spezifisch mutiert sind. Die erzeugten DNA-Bibliotheken deckten eine Gesamtlänge von 64.759 Basenpaaren ab. Die Bibliotheken aus allen Tumoren und normalen Geweben wurden mit einer >1000-fachen Coverage sequenziert. Zwei bioinformatische Methoden wurden eingesetzt, um die Sequenzierungsdaten zu verarbeiten, sie mit dem Rn6-Referenzgenom der Ratte zu vergleichen und Varianten mit Allelhäufigkeiten von >1% zu detektieren. In der Nieren-DNA entdeckte Varianten, die sich von der bekannten Rattengenomsequenz unterschieden, wurden aus den betreffenden Gewebedaten herausgefiltert. Ebenso wurden identifizierte Varianten ausgeschlossen, die sowohl in HF-EMF-exponierten als auch in nicht-exponierten Rattenproben vorkamen. Nach der Filterung konzentrierten sich die Autoren auf die verbleibenden Mutationen, die in HF-EMF-exponierten Tumor- und Nicht-Tumorgeweben gefunden wurden.

Es wurde eine Vielzahl exonischer Punktmutationen gefunden, d. h. Mutationen, die die proteinkodierende Sequenz betreffen: 1058 in Gliomen, 397 in exponiertem normalem Hirngewebe (ENT) und 744 in Schwannomen. Gliome und ENT hatten 38 Abweichungen gemeinsam.

Diejenigen Mutationen, die vermutlich für die Funktion des kodierten Proteins schädlich sind, wurden mit allen dokumentierten Mutationen in allen Krebsarten verglichen, die in der Datenbank Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) verfügbar sind. Etwa 25 % der in dieser Studie identifizierten spezifischen Veränderungen sind auch in COSMIC aufgeführt. Die Relevanz spezifischer Mutationen für menschliche Krebsarten schwankte, wobei einige Gene (*Tp53*, *Cdkn2a*, *ErbB2*, *Chek2*, *Kras* und *Pik3r1*) viele Veränderungen aufwiesen, die mit COSMIC-Einträgen übereinstimmen, während dies bei anderen Genen (*Idh1/2*, *Atrx*, *Notch1*, *Pten*, *Rb1* und *Setd2*) nicht der Fall war. Im Gegensatz zu menschlichen Gliomen, die häufig Hotspot-Mutationen in den Genen *IDH1* und *IDH2* aufweisen, wurden in den Rattentumoren keine entsprechenden Mutationen gefunden. Obwohl *Setd2* in dieser Studie in allen Gliomen und Herzschnannomen mutiert vorgefunden wurde, ist in COSMIC nur eine entsprechende Nonsense-Mutation verzeichnet.

Brooks et al. führten die erste targeted NGS-Analyse von genetischen Veränderungen in Rattengliomen durch. Die Autoren folgern aus ihren Ergebnissen, dass entweder teilweise andere Genmutationen für die Krebsentstehung bei Ratten von Bedeutung sind als beim Menschen, oder aber dass HF-EMF ein anderes Spektrum an Mutationen verursacht als in humanen Gliomen nachweisbar ist. Rattengliome tragen im Gegensatz zu den meisten humanen Gliomen *Idh1/Idh2*-Wildtyp Gene, unabhängig davon, ob die Tumore spontan oder durch HF-EMF-Exposition entstanden waren. Darüber hinaus wurden manche der in Gliomen entdeckten genetischen Veränderungen auch in exponiertem normalem Hirngewebe gefunden, was einen Einblick in die molekulare Krankheitsentstehung während der lebenslangen Exposition gegenüber HF-EMF ermöglicht.

3 Kommentare des BfS

Obwohl einige Studien zu dem Schluss kommen, dass Expositionen gegenüber HF-EMF genetische Schäden verursachen können [7], haben bisherige Studien keine eindeutig und reproduzierbar nachweisbaren Folgen solcher Schäden auf der DNA-Ebene in Form von somatischen Mutationen in normalem oder

Tumor-Gewebe gezeigt. Brooks et al. analysierten Mutationen in 23 mit menschlichem Krebs in Verbindung stehenden Genen in Rattentumoren, die aus einer vorherigen Studie zur lebenslangen Exposition gegenüber HF-EMF gewonnen wurden [8]. Gliome treten in Ratten selten auf, auch in Karzinogenitätsstudien bei Ratten sind sie nur vereinzelt vermehrt feststellbar. Dementsprechend existieren nur wenige Daten zum molekulargenetischen Status von Rattengliomen [1]. Die vorliegende Studie ist die erste, die eine detaillierte histopathologische Untersuchung und eine molekulargenetische NGS-Analyse solcher Tumoren vorgenommen hat. Ein bemerkenswerter Befund der Studie ist das Fehlen der für humane Gliome charakteristischen Mutationen in den *IDH1*- und *IDH2*-Genen bei Rattengliomen. Folglich ähneln diese Tumoren am ehesten humanen niedrigmalignen IDH-Wildtyp-Gliomen. Laut den Autoren lässt die geringe Anzahl verfügbarer Gliome und Schwannome allerdings keine verlässlichen Schlüsse über Mutationsmuster zu. Damit erscheinen die Studienziele als etwas erklärungsbedürftig. Eine translationale Relevanz zwischen der Ratte und dem Menschen hinsichtlich der molekularen Charakteristik ihrer Gliome und Herzschwannome zu finden, wie von den Autoren als Zielstellung formuliert, wäre von vornherein wenig gewinnbringend. Denn Gliome in der Ratte, selbst in den wenigen mit Gliominzidenz assoziierten Karzinogenitätsstudien, treten selten auf, sodass unvertretbar viele Ratten in Tierversuchen verwendet werden müssten, um die Ratte als Modell zur Studie des Glioms in Zukunft zu benutzen. Andererseits treten auch Herzschwannome bei Ratten selten und beim Menschen extrem selten auf [9]. Ein anderes, sinnvolles, aber von den Autoren nur peripher ausgewiesenes Ziel wäre der Nachweis durch HF-EMF-Exposition verursachter Mutationen, insbesondere anhand der ENT Proben. Wie nachfolgend dargelegt, fehlt es der Bearbeitung dieser Frage jedoch an der erforderlichen wissenschaftlichen Stringenz.

Die Publikation enthält einige Widersprüche in Text und Abbildungen, die die Lesbarkeit des Artikels beeinträchtigen und seine Aussagefähigkeit in Zweifel ziehen: So stimmen beispielsweise die Daten zu sämtlichen detektierten Basenvarianten in ENT, wie sie in der entsprechenden Abbildung dargestellt sind, nicht mit anderen Elementen der Veröffentlichung überein, die sich auf diese Daten beziehen. Es ist daher nicht völlig klar, welche Daten zu ENT korrekt sind.

Weitere Unklarheiten erschweren die Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Die Mutationsprofile von Spontantumoren werden weder in den Abbildungen angegeben noch im Text diskutiert. Obwohl insgesamt nur drei Tumore von nicht-exponierten Ratten analysiert wurden, hätten deren Daten dennoch auf grundlegende Unterschiede zu den mutmaßlich durch HF-EMF-Exposition verursachten Tumoren hinweisen können. Die vorherige Publikation des RI führte keine Gruppe von Ratten als Teil des Studiendesigns auf, die für eine Auswertung zu einem Zwischenzeitpunkt vorgesehen waren [8]. Es ist daher unklar, ob das ENT-Material in demselben experimentellen Rahmen gewonnen wurde wie die lebenslang exponierten Kohorten. Die Autoren geben ferner an, dass zur Ermittlung der Mutationen für jede Probe individuelle Filter angewendet wurden, was einen direkten Vergleich der verschiedenen Proben erschwert. Die Allelhäufigkeiten für die einzelnen Mutationen wurden dabei nicht angegeben. Es wurde auch nicht erwähnt, wie genau Mutationen als schädlich definiert wurden und wie viele schädliche Mutationen zwischen Gliomen und ENT überlappten. Darüber hinaus hätten häufig aufgetretene Mutationen z. B. durch Sanger-Sequenzierung validiert werden können.

Die Relevanz der detektierten Mutationen wurde anhand dessen bewertet, ob entsprechende Mutationen auch in der COSMIC-Datenbank für menschliche Tumore katalogisiert sind. Es wäre allerdings aufschlussreicher gewesen, die Mutationsprofile direkt mit denen des gleichen Tumortyps zu vergleichen, also humanen diffusen niedrigmalignen Gliomen. Bei der Betrachtung solcher Daten des GLASS-Konsortiums [10] fällt auf, dass einige häufig mutierte Gene in humanen IDH-Wildtyp-Gliomen vor allem durch Deletionen oder Amplifikationen gekennzeichnet sind. Daher hätten die Autoren eine Analyse der Kopienzahlvariation für die relevanten Gene vornehmen können. Der Vergleich mit menschlichen Gliomen zeigt auch, dass es Paare von Genen gibt, deren Mutationen sich gegenseitig ausschließen. Im Vergleich dazu enthielten viele Rattengliome und -schwannome dieser Studie Mutationen in der Mehrzahl der 23 Gene in ein und demselben Tumor, darunter auch in Genpaaren, die dafür bekannt sind, sich gegenseitig auszuschließen. Die Autoren sind auf diese Auffälligkeit nicht eingegangen. Außerdem wurden Nonsense-

Mutationen, die in vielen Fällen die Proteinfunktion deaktivieren, häufig in onkogenen Genen wie *Egfr* entdeckt. Dies ist unerwartet, da tumorfördernde Mutationen in diesen Genen normalerweise zu einer Hyperaktivität der Proteinprodukte führen. Diese Widersprüche schränken die Interpretierbarkeit der Studie weiter ein.

Das größte Defizit des Studienberichts ist die fehlende Darstellung der Mutationsprofile von altersgleichen, aber nicht-exponierten Normalgeweben. Mutationen, die zwischen nicht-exponierten und exponierten Geweben überlappten, wurden ohne weitere Angaben als Falsch-Positive ausgeschlossen, und die Daten aus nicht-exponierten Normalgeweben nicht weiter berücksichtigt. Es wurde also nicht darauf eingegangen, ob, welche und wieviele Basenveränderungen in den nicht-exponierten Normalgeweben nach Ausschluss der Überlappung übrigblieben. Eine ähnliche Gesamtanzahl von Mutationen in nicht-exponierten Geweben, jedoch an anderen Basenpositionen als in Tumoren und ENT, würde auf eine altersbedingte Zunahme der Mutationslast hindeuten, wie von Li et al. [11] für gealtertes menschliches Gewebe gezeigt. Dies würde gegen eine, von den Autoren implizierte mutagene Wirkung der HF-EMF-Exposition sprechen. Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft und ein möglicher Grund dafür, warum die Analyse der Mutationsprofile von nicht-exponierten Normalgeweben trotz Vorliegens der Daten von den Autoren nicht dargestellt wurde, ist die sehr heterogene Lesetiefe der Sequenzierung zwischen den untersuchten Geweben, die bis zu einem Faktor von 500 variierte. Es wurde nicht gezeigt, ob sich die Lesetiefe im Durchschnitt zwischen HF-EMF-exponierten und nicht-exponierten Geweben unterschied. Eine hohe Lesetiefe in einer Gruppe von Proben würde die verlässliche Erkennung seltener Varianten ermöglichen, während dieselben Varianten in einer anderen, mit viel geringerer Tiefe sequenzierten Gruppe von Proben nicht gefunden werden könnten. Damit wäre auch die Gesamtanzahl der erkannten Mutationen verzerrt, wenn die Lesetiefe zwischen den Gruppen ungleich verteilt wäre.

Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Schritt dazu, eine Datengrundlage zu potenziellen mutagenen Wirkungen von HF-EMF auf DNA-Sequenzebene zu schaffen. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die vorgeschlagene NGS-Analyse zur Charakterisierung der Gliomagenese bei Ratten technisch noch nicht überzeugend genug ist, um in weiteren solchen Untersuchungen verwendet zu werden. Aus Strahlenschutzsicht liefern die Studienergebnisse außerdem keine stichhaltigen Belege für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen HF-EMF-Exposition und Tumorentstehung in der RI-Studie, wie er von den Autoren in der vorliegenden Studie behauptet wird.

Referenzen

- [1] Brooks AM, Vornoli A, Kovi RC, et al. Genetic profiling of rat gliomas and cardiac schwannomas from life-time radiofrequency radiation exposure study using a targeted next-generation sequencing gene panel. *PLoS One* 2024;**19**(1):e0296699 doi: 10.1371/journal.pone.0296699 [published Online First: 20240117].
- [2] <https://www.bfs.de/DE/bfs/wissenschaft-forschung/emf/stellungnahmen/langzeitstudie-ratten-ramazzini.html>.
- [3] <https://www.bfs.de/DE/bfs/wissenschaft-forschung/emf/stellungnahmen/ntp-studie/dossier-ntp-studie.html>
- [4] Kuhne J, Schmidt JA, Geschwentner D, Pophof B, Ziegelberger G. Thermoregulatory Stress as Potential Mediating Factor in the NTP Cell Phone Tumor Study. *Bioelectromagnetics* 2020;**41**(6):471-79 doi: 10.1002/bem.22284 [published Online First: 20200721].
- [5] Feychting M, Schuz J, Toledano MB, et al. Mobile phone use and brain tumour risk - COSMOS, a prospective cohort study. *Environ Int* 2024;**185**:108552 doi: 10.1016/j.envint.2024.108552 [published Online First: 20240302].
- [6] Choi KH, Ha J, Bae S, et al. Mobile Phone Use and Time Trend of Brain Cancer Incidence Rate in Korea. *Bioelectromagnetics* 2021;**42**(8):629-48 doi: 10.1002/bem.22373 [published Online First: 20210920].
- [7] Smith-Roe SL, Wyde ME, Stout MD, et al. Evaluation of the genotoxicity of cell phone radiofrequency radiation in male and female rats and mice following subchronic exposure. *Environ Mol Mutagen* 2020;**61**(2):276-90 doi: 10.1002/em.22343 [published Online First: 20191113].
- [8] Falcioni L, Bua L, Tibaldi E, et al. Report of final results regarding brain and heart tumors in Sprague-Dawley rats exposed from prenatal life until natural death to mobile phone radiofrequency field representative of a 1.8 GHz GSM base station environmental emission. *Environ Res.* 2018;**165**:496-503. doi:10.1016/j.envres.2018.01.037
- [9] Rahouma M, Baudo M, Khairallah S, et al. Primary Cardiac Schwannoma: A Meta-Analysis of Individual Case Reports. *J Clin Med* 2023;**12**(10) doi: 10.3390/jcm12103356 [published Online First: 20230509].
- [10] Barthel FP, Johnson KC, Varn FS, et al. Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature* 2019;**576**(7785):112-20 doi: 10.1038/s41586-019-1775-1 [published Online First: 20191120].
- [11] Li R, Di L, Li J, et al. A body map of somatic mutagenesis in morphologically normal human tissues. *Nature* 2021;**597**(7876):398-403 doi: 10.1038/s41586-021-03836-1 [published Online First: 20210825].



Impressum

Bundesamt für Strahlenschutz
Postfach 10 01 49
38201 Salzgitter

Tel.: +49 30 18333-0
Fax: +49 30 18333-1885
E-Mail: spotlight@bfs.de
De-Mail: epost@bfs.de-mail.de

www.bfs.de

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:

urn:nbn:de:0221-2024061144258

Spotlight - Jun/2024 no.2 (Deu)