



Bundesamt
für Strahlenschutz

Ressortforschungsberichte zum Strahlenschutz

Wirkungen auf Zellen der Körperoberfläche bei Expositionen mit Zenti- und Millimeterwellen (5G Frequenzen)

Vorhaben 3619S82470

Constructor University Bremen gGmbH

V. Meyer

A. I. Gronau

K. Drees

J. Jyoti

E. Cakir

M.-T. Hütt

A. Lerchl (korrespondierender Autor)

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMUV (Ressortforschungsplan) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

Impressum

Bundesamt für Strahlenschutz
Postfach 10 01 49
38201 Salzgitter

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

www.bfs.de

BfS-RESFOR-231/24

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
[urn:nbn:de:0221-2024091646255](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0221-2024091646255)

Salzgitter, August 2024

Inhalt

1	Kurzfassung.....	5
2	Abstract	5
3	Einleitung.....	6
4	Aufarbeitung des relevanten Standes von Wissenschaft und Technik.....	6
5	Exposition und Dosimetrie	7
5.1	Zielparameter und Anlagenkonzept	7
5.2	Dosimetrie	7
5.3	Temperaturverhältnisse während der Exposition	8
5.4	Steuerung und Überwachung der Exposition.....	9
6	Biologische Tests und Vorversuche	9
6.1	Kultivierung der Zellen	9
6.2	Exposition und Ernte der Zellen	10
6.3	Nukleinsäureaufreinigung	10
7	Material und Methoden	11
7.1	Zellkultur, Exposition und Zellernte	11
7.2	Untersuchung von Genexpressionsveränderungen.....	12
7.2.1	Genexpressionsanalyse	12
7.2.2	qRT-PCR.....	13
7.3	DNA-Methylierungsanalyse	15
7.4	Netzwerkanalyse.....	16
7.5	Kombinatorische Analyse	17
8	Ergebnisse.....	17
8.1	Genexpression	17
8.2	DNA-Methylierung	23
8.3	Netzwerkanalyse.....	26

9	Diskussion.....	31
9.1	Genexpression	31
9.2	DNA-Methylierung	32
9.3	Netzwerkanalyse.....	33
10	Fazit.....	33
11	Literatur.....	33
	Abbildungsverzeichnis.....	38
	Tabellenverzeichnis.....	39

1 Kurzfassung

Aufgrund der ständig steigenden Zahl drahtlos übertragener Daten ist die Entwicklung neuer Übertragungsstandards und höherer Frequenzen im 5G NR FR2 Band (24,3-27,5 GHz und 39,5-43,3 GHz) erforderlich. Mit der schnell wachsenden Nutzung der drahtlosen Kommunikationstechnologien hat die öffentliche Besorgnis über mögliche gesundheitliche Auswirkungen der elektromagnetischen Felder zugenommen. Im Mittelpunkt dieser Debatte stehen widersprüchliche Ergebnisse in der wissenschaftlichen Literatur. Als Folge der widersprüchlichen Ergebnisse stuft die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) elektromagnetische Strahlung, die den Frequenz- und Energiebereichen des 5G-Protokolls entspricht, als möglicherweise krebserregend für den Menschen ein und empfahl eine weitere Bewertung mit hoher Priorität. Da die fehlende Verblindung und Temperaturkontrolle, die Intransparenz der statistischen Methoden und die unzureichende Dosimetrie in früheren Studien ein Hauptkritikpunkt sind, sind Verbesserungen beim Studiendesign und der statistischen Analyse dringend erforderlich, um diese Situation zu klären.

Hier präsentieren wir die Ergebnisse einer verblindeten, temperaturkontrollierten Transkriptomik- und Methylierungs-Studie an menschlichen Keratinozyten und menschlichen dermalen Fibroblasten, die bei elektromagnetischen 5G-Feldern mit unterschiedlichen Frequenzen (27 GHz und 40,5 GHz), Leistungsflussdichten (1 mW/cm^2 und 10 mW/cm^2) und Expositionszeiten (2h und 48h) exponiert wurden.

Die Unterschiede in der Genexpression und Methylierung aufgrund der Exposition waren gering. Eine kombinatorische Analyse wurde angewendet, bei der alle möglichen Kombinationen der Probenzuordnung auf signifikante Unterschiede getestet wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Anzahl an differentiell exprimierten Genen und differentiell methylierten Regionen der tatsächlichen Probenzuordnung in exponiert und scheinexponiert nicht von den zufällig gefundenen Zahlen abhebt. Die Netzwerkanalyse der wenigen signifikanten Treffer lieferte ebenfalls keine Hinweise auf einen Zusammenhang der betroffenen Gene, was den Verdacht erhärtet, dass es sich bei diesen Treffern um stochastische Zufallsfunde handelt.

Diese Daten deuten darauf hin, dass elektromagnetische 5G-Felder die Genexpressionsmuster oder Methylierungsprofile in keiner erkennbaren Weise verändern. Unsere Ergebnisse liefern keine Beweise für expositionsbedingte Schäden an menschlichen Hautzellen.

2 Abstract

Due to the ever-increasing amount of wirelessly transmitted data, the development of new transmission standards and higher frequencies in the 5G NR FR2 band (24.3-27.5 GHz and 39.5-43.3 GHz) is required. With the rapidly growing use of wireless communication technologies, public concern about possible health effects of electromagnetic fields has increased. At the heart of this debate are conflicting results in the scientific literature. As a result of the conflicting findings, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified electromagnetic radiation corresponding to the frequency and energy ranges of the 5G protocol as possibly carcinogenic to humans and recommended a high priority further assessment. As the lack of blinding and temperature control, the non-transparency of statistical methods and inadequate dosimetry in previous studies are a major point of criticism, improvements in study design and statistical analysis are urgently needed to clarify this situation.

Here we present the results of a blinded, temperature-controlled transcriptomics and methylation study in human keratinocytes and human dermal fibroblasts exposed to 5G electromagnetic fields at different frequencies (27 GHz and 40.5 GHz), power densities (1 mW/cm^2 and 10 mW/cm^2) and exposure times (2h and 48h).

Differences in gene expression and methylation due to exposure were small. A combinatorial analysis was applied in which all possible combinations of sample assignment were tested for significant differences. It was found that the number of differentially expressed genes and differentially methylated regions of the actual sample assignment in exposed and sham-exposed did not differ from the numbers found by chance.

The network analysis of the few significant hits also did not provide any evidence for a correlation of the affected genes, strengthening the suspicion that these hits are stochastic random finds.

These data suggest that 5G electromagnetic fields do not alter gene expression patterns or methylation profiles in any discernible way. Our results do not provide evidence for exposure-related damage to human skin cells.

3 Einleitung

Die Einführung des 5G-Standards in der Mobilfunktechnik ist darauf zurückzuführen, dass die übertragene Datenmenge zunimmt und Sende- und Empfangseinheiten mit einer möglichst geringen Latenzzeit im Millisekundenbereich verbunden werden müssen. Derzeit findet der Roll-out von 5G in Europa statt und es werden Frequenzen des 5G New Radio Frequency Range 1 (5G NR FR1) unter 6 GHz genutzt. In den kommenden Jahren wird 5G NR FR2 mit Frequenzen von 24,3 - 27,5 GHz und 39,5 - 43,3 GHz hinzukommen. Die biologischen Wirkungen von elektromagnetischen Feldern sind stark frequenzabhängig. Im Bereich bis 3 GHz liegen die Eindringtiefen in die Haut bei etwa 10 mm, im Bereich ab 10 GHz bei 1 Millimeter und weniger. Dementsprechend sind die grundlegenden Sicherheitsgrenzen in diesen Hochfrequenzbereichen als Leistungsflussdichten definiert. Sie beträgt für die Allgemeinbevölkerung im Bereich 2 - 300 GHz 10 W/m^2 , für beruflich exponierte Personen 50 W/m^2 . Die entsprechenden Sicherheitsgrenzwerte für die elektrische Feldstärke liegen bei 61 bzw. 137 V/m.

Es gibt zwar wissenschaftliche Studien über biologische Wirkungen bei Frequenzen über 6 GHz, aber sie sind sehr heterogen in Bezug auf die Leistungsflussdichte, das untersuchte biologische Modell, die Frequenzen und die biologischen Endpunkte. Da die Absorption der elektromagnetischen Energie in den oberen Hautschichten stattfindet, sind die thermischen Effekte besonders kritisch. Bei sehr hohen Leistungsflussdichten, die weit über den Grenzwerten liegen, können daher Schmerzen und auch Verbrennungen auftreten, während sich die Hornhaut des Auges unter solchen Bedingungen trüben kann. Zu den thermischen Wirkungen gehören auch solche, die mit der Denaturierung von Proteinen verbunden sind und zu Gen- oder Chromosomenschäden führen können. Alle diese Effekte sind lange bekannt und gut erforscht [1-3].

4 Aufarbeitung des relevanten Standes von Wissenschaft und Technik

Zunächst wurden für den Zeitraum 2005 – 2019 publizierte Studien zu den Wirkungen elektromagnetischer Felder im Frequenzbereich 3 – 100 GHz erfasst und analysiert. Nach Ausschluss nicht-relevanter Publikationen (z.B. technische Reports, rein dosimetrische Analysen, Untersuchungen auf chemische Reaktionen) blieben 84 Studien übrig, die tabellarisch dargestellt wurden. Von diesen wurden die 50 analysiert und hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Frage nach biologischen Effekten bewertet, bei denen keine thermischen ($> 1^\circ\text{C}$) Effekte durch die Exposition auftraten. Die Bewertung der Studien erfolgte durch den korrespondierenden Autor (Lerchl) und stellt nicht die Meinung des Auftraggebers dar.

Die 24 identifizierten Studien an Menschen und menschlichen Zellen sind zum größten Teil nicht geeignet, mögliche schädigende oder überhaupt Wirkungen der Exposition zu den betrachteten Frequenzen aufzuzeigen. Bei 19 Studien (79%) wurden keine schädlichen Effekte gefunden. Eine Studie [4] fand Effekte, die allerdings nicht plausibel sind, und eine weitere [5], deren Ergebnisse wahrscheinlich thermisch bedingt sind. Somit zeigen 21 Studien (88%) keine schädlichen Effekte bzw. sind diese nicht als Belege für Schäden zu werten. Lediglich 3 Studien (12%) zeigen Effekte, die auch plausibel erscheinen [6-8]. Bei der Studie von Franchini et al. [6] besteht allerdings die Einschränkung, dass so viele biologische Endpunkte untersucht wurden, dass die gefundenen Effekte statistisch zu erwarten sind (Alphafehler-Kumulierung).

Die Studienergebnisse der Studien an Tieren und tierischen Zellen weisen insgesamt nicht auf Schäden durch die Exposition hochfrequenter elektromagnetischer Felder im hier untersuchten Frequenzbereich hin. Die wenigen Ausnahmen weisen auf naturwissenschaftlich / mathematisch nicht zu erklärende Phänomene hin, die überdies nur bei Studien einer Autorengruppe auftauchten. Eine weitere Ausnahme ist die Studie [9], deren Daten allerdings absolute Ausreißer sind und deren Methoden zahlreiche Mängel

aufweisen.

Vor diesem Hintergrund wurde die weitere Bearbeitung des Projekts durchgeführt. Die Wahl der Frequenzen für die Versuche wurde mit 27 GHz und 40,5 GHz an die für 5G NR FR2 geplanten zukünftig genutzten Frequenzen angelehnt.

5 Exposition und Dosimetrie

Mit der Entwicklung und dem Bau der Expositionsanlage war die Seibersdorf Labor GmbH (Seibersdorf, Österreich) betraut. Es liegt bereits ein ausführlicher Bericht dazu vor und die Ergebnisse konnten in einem Fachjournal veröffentlicht werden [10, 11].

5.1 Zielparameter und Anlagenkonzept

Neben den Vorgaben durch das Versuchsdesign gehörten folgende Punkte zu den Zielparametern [10]:

- Möglichst geringe Variation der Exposition (Spezifische Absorptionsrate; SAR) innerhalb der Zellkultur
- Software-gesteuerte und pseudo-zufällige Zuordnung der Exposition (bzw. Scheinexposition)
- Erfassung und Dokumentation aller dosimetrischer Parameter während der Exposition in Echtzeit
- Allgemeinverständliche und fehlerresistente Bedienung der Anlage
- Standardverfahren des Handlings von Zellkulturen müssen möglich sein und sind priorisiert; dazu zählt auch die Lösungsmittelbeständigkeit der verbauten Materialien für die Desinfektion
- Arbeitssicherheit: automatisches Abschalten der Exposition bei Türöffnung des Inkubators

Das Grundkonzept der Anlage sieht vor, dass die Zellkulturschalen von unten mit einer Antenne mit großer Richtwirkung (Hornantenne) exponiert werden. Es werden zwei identische Inkubatoren verwendet, die für optimale Kulturbedingungen sorgen (37°C, 5% CO₂ und gesättigte Luftfeuchtigkeit). Innerhalb eines Versuchs dient der eine Inkubator zur Exposition, während der andere zeitgleich für die Scheinexposition zuständig ist. Die Zuordnung erfolgt automatisch, pseudozufällig und verblindet über die Software. Jeder Inkubator enthält ein Antennenset, das wiederum aus jeweils zwei baugleichen Antennenanordnungen besteht. Oberhalb dieser beiden Antennen steht jeweils eine Zellkulturschale, einmal mit dem Probenmaterial (Zellen und 5 ml Medium) und einmal mit 5 ml Medium für die Temperaturmessung mittels faseroptischen Sensoren.

5.2 Dosimetrie

Die Berechnung der auf die Zellen treffenden Leistungsflussdichte ist nur auf Basis von Computersimulationen möglich, die mit Sim4Life (Zurich Med Tech) erfolgten [10]. Daher wurde zunächst das numerische Modell der Antenne (BBAH 9170, Schwarzbeck Mess-Elektronik) hinsichtlich seiner Abstrahleigenschaften unter Freifeldbedingungen validiert. Die simulierten Feldstärkewerte stimmten mit einer Abweichung von $\pm 15\%$ mit den gemessenen Werten überein, so dass das numerische Antennenmodell als valide eingestuft wurde [11]. Die dosimetrische Charakterisierung der Gesamtanlage, zu der die Messung und Berechnung der einfallenden elektrischen Feldstärke im Bereich des Probenhalters und der näherungsweise Variation der SAR im Medium durch eine Miniaturfeldsonde (EX3DV5 mit DAE3, Schmid & Partner Engineering AG) gehörte, zeigte ebenfalls eine gute Übereinstimmung zwischen Messergebnissen und Simulation.

Die transmittierende Leistungsflussdichte bzw. SAR zeigte innerhalb des Zell-Monolayers eine relativ hohe Inhomogenität [11]. Das hängt mit dem Verhältnis zwischen der Wellenlänge und dem vergleichsweise großen Schalendurchmesser zusammen und ist durch physikalische Gesetzmäßigkeiten der Wellenausbreitung begründet. Um die Homogenität dennoch so hoch wie möglich zu halten, wurde entschieden, Zellen bei der Probenahme auszusparen, die außerhalb eines definierten Flächenbereichs liegen. Da es sich hier um einen Kompromiss zwischen möglichst hoher Homogenität und möglichst großer Menge an gewonnenem Probenmaterial handelte, wurde der Flächenbereich dahingehend angepasst [siehe unten; 11]. Dadurch konnte für die 27 GHz Versuche eine geringe Abweichung beim SAR-Wert von

nur 3,66 dB bei einem Zellverlust von 12% und für die 40,5 GHz Versuche von nur 3,35 dB bei 13% Zellverlust erreicht werden.

Nach Installation und Inbetriebnahme der Expositionsanlage wurden die niederfrequenten magnetischen Hintergrundfelder gemessen, die an den Positionen der Zellkulturschalen vorherrschten. Diese Hintergrundfelder entstehen durch die Elektronik und Aggregate des Inkubators sowie durch andere elektrische Betriebsmittel, die in unmittelbarer Umgebung stehen. Die Spitzenwerte bewegen sich im Bereich zwischen 0,29 und 0,35 μT und unterscheiden sich nur minimal zwischen den beiden Inkubatoren [10].

5.3 Temperaturverhältnisse während der Exposition

Die Versuche unter Realbedingungen zeigten, dass die bei den Experimenten mit einer Leistungsflussdichte von 1 mW/cm^2 auftretenden Temperaturabweichungen zwischen den exponierten und den scheinexponierten Zellen tolerierbar waren (bis zu ca. $0,3^\circ\text{C}$; [10]). Die Berechnungen zum Temperaturanstieg des Schalenbodens während der Exposition bei 10 mW/cm^2 deuteten einen möglichen Anstieg um $2,5^\circ\text{C}$ an. Vorversuche außerhalb des Inkubators bei Raumtemperatur mit einer forcierten Kühlung über eine separate Steuereinheit der Anlage versprachen eine Senkung dieses Anstiegs um etwa 50% [10].

Bei den Vorversuchen unter Realbedingungen stellte sich heraus, dass bei 10 mW/cm^2 der in der Schalenmitte gemessene Temperaturanstieg mit bis zu ca. $1,2^\circ\text{C}$ bei 27 GHz und bis zu ca. $1,5^\circ\text{C}$ bei 40,5 GHz deutlich geringer war als vorherberechnet [10]. Grund hierfür war der laminare Luftstrom innerhalb des Inkubators, der für einen kühlenden Effekt sorgte. Trotzdem wurde weiter nach einer Möglichkeit gesucht, die exponierten und scheinexponierten Zellen möglichst gleichen Temperaturen auszusetzen. Zwar wird die menschliche Haut bei realer Exposition ebenfalls erwärmt, diese Erwärmung wird aber einerseits von der Umgebungsluft und andererseits von den angrenzenden Blutgefäßen ausgeglichen. Bei dieser Arbeit sollte ein Hauptaugenmerk darauf liegen, dass potentielle Effekte auf die Exposition zurückzuführen sind und es sich nicht um reine Temperatureffekte handelt. Die forcierte Luftkühlung wurde im Verlauf der Beratungen mit der Seibersdorf Labor GmbH wieder verworfen. Gründe hierfür waren unter anderem, dass die Umsetzung zu weiteren Auswirkungen geführt hätte (evtl. Konvektion am unteren Schalenboden, Mehrleistung des Heizelements im Inkubator mit Exposition, Entblindung), die wiederum durch geeignete Maßnahmen ausgeglichen hätten werden müssen. Der Einbau des Kühlelements und die Ausgleichsmaßnahmen hätten letztlich das eingeplante Budget überschritten und der Nutzen stand in keinem Verhältnis zum Aufwand.

Aus den genannten Gründen wurde zur Minimierung potenzieller Temperatureffekte die Innentemperatur des Inkubators, in dem die Exposition stattfindet, über die manuelle Steuerung der Inkubatorortemperatur reduziert. Da die Temperatur im Außenbereich der Schalen um $0,6^\circ\text{C}$ (27 GHz) bzw. $0,7^\circ\text{C}$ (40,5 GHz) geringer ausfallen kann als in der Schalenmitte, wurde eine Zieltemperatur von $37,3^\circ\text{C}$ in den exponierten Schalen festgelegt. Bei einer Frequenz von 27 GHz variiert damit die Temperatur in der Schale von $37,3^\circ\text{C}$ in der Schalenmitte und ca. $36,7^\circ\text{C}$ im Randbereich. Bei 40,5 GHz liegt der Wert bei $37,3^\circ\text{C}$ in der Schalenmitte und ca. $36,6^\circ\text{C}$ im Randbereich. Damit schwanken die Werte um 37°C und sind damit gut mit den scheinexponierten Zellen vergleichbar. Welche Starttemperaturen in der exponierten Schale gewählt werden musste, um die gewünschte Zieltemperatur von $37,3^\circ\text{C}$ zu erreichen, wurde im Rahmen der Vorversuche iterativ bestimmt. Zur späteren Einstellung der Inkubatoren wurde eine einzelne Person für die Versuche bei 10 mW/cm^2 entblindet, die in die Verarbeitung der Proben, Durchführung der Versuche und Analyse der Daten in keiner Weise involviert war. Für alle an der Versuchsdurchführung und Datenanalyse beteiligten Personen wurde die Verblindung aufrechterhalten. Hierfür wurde eine wöchentlich wechselnde zufällige Exposition der Inkubatoren programmiert, deren Muster nur der entblindeten Person bekannt war, so dass sie die entsprechenden Inkubatortemperaturen vor den Versuchen einstellen konnte.

5.4 Steuerung und Überwachung der Exposition

Die Steuerung der Expositionsversuche erfolgte mithilfe einer anwenderfreundlichen und fehlerresistenten Software [10]. So konnten die gewünschten Expositionsparameter eingegeben und der jeweilige Versuch gestartet werden. Automatisch und für den Versuchsleiter nicht sichtbar wurde die Zuordnung der Exposition pseudozufällig durch die Software durchgeführt.

Während der Exposition wurden alle relevanten Daten verschlüsselt gespeichert sowie die technischen Parameter überwacht. Regelmäßig wurden die Daten durch die Seibersdorf Labor GmbH geprüft und etwaige Fehlfunktionen behoben [10]. Die Expositionsanlage funktionierte einwandfrei.

6 Biologische Tests und Vorversuche

Für die Untersuchungen wurde die immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT [12] und humane dermale Fibroblasten (HDF) aus der abdominalen Dermis einer 41-jährigen Frau (caucasian, single donor) verwendet. Die HaCaT-Zellen wurden in Passage 31 (p31) vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) bezogen, die humanen dermalen Fibroblasten von Cell Applications / Merck (Darmstadt, Deutschland). Bevor mit den Expositionsexperimenten begonnen werden konnte, waren Fragestellungen vor allem bezüglich der Kultivierungsbedingungen, der Aufreinigungsmethoden für die Nukleinsäuren, der Expositionsbedingungen und Temperaturproblematik bei Exposition zu klären.

6.1 Kultivierung der Zellen

Um zu überprüfen, ob auf die Zugabe von Serum im Kulturmedium verzichtet werden kann, wurden beide Zelltypen ohne Serum, mit 2% FKS und 10% FKS kultiviert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die HaCaT-, als auch die HDF-Zellen ohne Serum und bei 2% FKS deutlich weniger proliferieren und schlechter adhären. Nur bei Zugabe von 10% Serum war Vitalität, Proliferation und Adhäsion bei beiden Zelltypen für die geplanten Experimente zufriedenstellend. Damit ergeben sich für beide Zelltypen folgende Kulturbedingungen: Kultivierung bei 37°C und 5 % CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, high glucose, GlutaMAX; Gibco / Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 10% fetalem Kälberserum (Gibco / Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 100 units/mL Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin (Gibco / Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in T75-Zellkulturflaschen (Gibco / Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Sowohl die HDF-, als auch die HaCaT-Zellen wurden zunächst in Kultur genommen und vermehrt, so dass eine ausreichende Anzahl an identischen Aliquots eingefroren werden konnte (HaCaT: p33, HDF: p4), um sicherzustellen, dass die Versuche mit Zellen der gleichen Passagen durchgeführt werden konnten. Durch den Einsatz von Zellen gleicher Passage wurden vor allem bei den dermalen Fibroblasten etwaige auf unterschiedlichen Zellpassagen beruhende Schwankungen bei den Versuchen minimiert und so eine bestmögliche Vergleichbarkeit der technischen Replikate gewährleistet. Nach dem Generieren des Zellstocks wurde je ein Aliquot mittels qPCR- basiertem Test und kolorimetrisch zellbasiertem Assay auf das Vorhandensein von Mykoplasmen getestet (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland). Das Ergebnis war bei beiden Zelltypen negativ.

Für die Expositionsversuche wurden zwei verschiedene Schalentypen getestet: die lumox® dish 50 mit gasdurchlässigem Folienboden (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und eine herkömmliche Zellkulturschale (Corning® CellBIND® Surface 60 mm Culture Dish, Corning, Tewksbury, USA). Die Adhäsion und Proliferation beider Zelltypen war auf den Corning® CellBIND®-Schalen deutlich besser, so dass diese Schalen für die Experimente ausgewählt wurden und die Dosimetrie mit diesen Schalen durchgeführt wurde.

Im Rahmen der Vorversuche wurde außerdem die optimale Zellzahl für die Untersuchungen ermittelt, damit die Zellen am Ende der Experimente (2h bzw. 48h; Aussaat der Zellen jeweils drei Tage vor Versuchsende) eine Konfluenz von ungefähr 80% aufweisen. Dadurch sollte verhindert werden, dass die Zellen ihren Differenzierungsstatus aufgrund einer zu hohen Dichte verändern [13], was zu einer dadurch bedingten Veränderung im Expressionsmuster der Zellen führen könnte. Hierbei musste zudem getestet werden, ob die am Ende der Experimente vorhandene Zellzahl ausreichend ist, um für die sich

anschließenden RNA-Seq, Methylierungs- und qRT-PCR Analysen genug Nukleinsäuren zu isolieren. Final wurde als Kompromiss zwischen Konfluenz und Ausbeute bei der Nukleinsäureisolierung die Zellzahl bei einer Aussaat drei Tage vor Versuchsende bei den HDF auf 120.000 Zellen/Schale festgelegt, bei den HaCaT auf 200.000 Zellen/Schale.

6.2 Exposition und Ernte der Zellen

Die bei der Exposition mit 10 mW/cm^2 reduzierte Inkubator Temperatur und die damit verbundene reduzierte Mediumstemperatur bei Versuchsstart in den Inkubatoren mit den aktiven Expositionseinheiten führte nach weniger als 2 h Exposition durch den Temperaturunterschied zwischen dem Schalendeckel und den durch die Exposition erwärmten Zellen / Medium zu einer starken Bildung von Kondenswasser am Deckel der Versuchs- und Temperaturüberwachungsschalen. Die Kondenswasserbildung war in mehrfacher Hinsicht problematisch: zum einen führte sie zu einer Entblendung der Experimente, da das Kondenswasser nur bei Exposition und nicht bei Schein-Exposition auftrat. Zum anderen wurde ein Effekt durch die Aufkonzentrierung des Mediums befürchtet. Um der Kondenswasserbildung vorzubeugen, wurden mehrere Ansätze mit verschiedenen Isolationsmaterialien getestet, die allerdings nicht geeignet waren, um die Kondenswasserbildung ausreichend zu reduzieren. Eine aktive Beheizung des Deckels war erforderlich, damit der Temperaturunterschied zwischen Medium und Deckel möglichst geringgehalten werden konnte. Um kein störendes elektromagnetisches Feld zu erzeugen, wurde zunächst nach einer Lösung ohne elektrische Aufheizung gesucht. Auch dieser Ansatz wurde aus verschiedenen Gründen verworfen. Letztlich wurde eine Deckelheizung konstruiert, die eine auf dem Schalendeckel liegende Metallplatte beheizt. Die Deckelheizung bestand aus einer kreisrunden Kupferplatte (Dicke 2 mm), auf die jeweils 2 Hochlastwiderstände aufgeklebt wurden. Durch einen geringen, einstellbaren Gleichstrom ($< 0,3 \text{ A}$) wurden die in Serie geschalteten Widerstände warm und übertrugen die Wärme auf die Platte, wodurch der Deckel erwärmt und eine Kondensatbildung dort verhindert wurde. Die Seibersdorf Labor GmbH bestätigte, dass diese Maßnahme keinen Einfluss auf die Dosimetrie hat.

Mit dieser Konstruktion war der Schalendeckel auch nach einer 48-stündigen Expositionszeit Kondenswasser-frei. Nur am inneren Rand der Schale setzte sich geringfügig Kondenswasser ab. Diese Restunsicherheit wurde dadurch entschärft, dass alle vier Schalen (zwei „Versuchsschalen“ und zwei Temperaturmessschalen) nach jedem Versuch mit 10 mW/cm^2 vor Abnahme der Deckelheizung so geschwenkt wurden, dass der leichte Kondenswasserfilm mit dem Medium in der Schale „abgespült“ werden und die Verblindung aufrecht erhalten bleiben konnte. Die Verwendung der Deckelheizung machte eine erneute iterative Bestimmung der Starttemperatur in den zu exponierenden Schalen erforderlich, damit am Ende der Experimente die angestrebte Zieltemperatur von $37,3^\circ\text{C}$ erreicht wird.

Direkt im Anschluss an die Exposition wurden die Versuchsschalen für die Zellernte aus den Inkubatoren entnommen. Um nur die Zellen zu ernten, die der Exposition in einem weitestgehend homogenen Bereich ausgesetzt waren, wurden die Randzellen in einem definierten Bereich mit einem Zellschaber abgeschabt und verworfen. Dies wurde ebenfalls in den Vorversuchen optimiert. Der zugrundeliegende Bereich basiert auf den Berechnungen der Seibersdorf Labor GmbH [11]. Es handelt sich bei dem Bereich bei 27 GHz um eine Ellipse mit einem Radius 24 mm/23 mm. Bei 40,5 GHz handelt sich um einen gekappten Kreis mit einem Radius von 24 mm und einem Abstand der gekappten Fläche zum Mittelpunkt von 19 mm. Im Rahmen der Vorversuche konnte gezeigt werden, dass das Entfernen der Zellen mit dem Zellschaber effektiv ist und die randständigen Zellen vollständig entfernt werden können.

6.3 Nukleinsäureaufreinigung

Die Aufreinigung der Nukleinsäuren wurde mit dem AllPrep RNA / DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt, da es mit diesem Kit möglich ist, sowohl RNA als auch DNA in einem gemeinsamen Aufreinigungsansatz zu isolieren. Innerhalb des Protokolls wurde außerdem ein DNase-Verdau durchgeführt (RNase-free DNase Set, Qiagen, Hilden Deutschland) um etwaige genomische DNA aus den RNA-Proben zu entfernen. Zur Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Nukleinsäuren wurde ein neues Spektralphotometer angeschafft und in Betrieb genommen (NanoDrop One; Thermo Scientific, Waltham, USA).

Die ersten Ergebnisse zur Nukleinsäureaufreinigung waren zweigeteilt. Zum einen konnte eine ausreichende Menge an RNA in guter Qualität isoliert werden. Zum anderen war die Ausbeute an DNA zu gering. Daher wurde zunächst die Homogenisierung mithilfe der QIAshredder Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) durch einen mechanischen Zellaufschluss mittels eines Homogenisators (ULTRA-TURRAX; IKA-Analysentechnik, Staufen, Deutschland) ersetzt. Das führte zu einer Verdopplung der DNA-Ausbeute bei gleichbleibender Reinheit. Eine deutliche Verbesserung konnte zudem durch die Erwärmung des Eluationspuffers im letzten Schritt des Allprep RNA / DNA Protokolls erreicht werden. Dadurch wurde nochmal eine Verdreifachung der DNA-Menge erzielt. Die Versuche ließen darauf schließen, dass bei den HaCaT-Zellen aus einer ca. 40-80% bewachsenen Expositionsschale eine ausreichende Menge an DNA und RNA isoliert werden kann.

Bei den Vorversuchen zur Nukleinsäureaufreinigung bei den HDFs war es deutlich schwieriger, eine ausreichende Menge an Nukleinsäuren zu extrahieren. Deshalb wurden neben der bisherigen Isolierungsmethode drei weitere getestet (New England Biolabs, Invitrogen, Norgen Biotek). Da die Ausbeute auch hier nicht zufriedenstellend erhöht werden konnte oder diese zum Verlust der Reinheit führten, wurde die Nukleinsäureaufreinigung der HDF-Zellen für die RNASeq und die Methylierungsanalyse ebenfalls mit dem Allprep RNA / DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Bei den Proben, bei denen die RNA-Ausbeute nicht für die an die RNASeq anschließende qPCR ausreichte, wurden die entsprechenden Versuche wiederholt und die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

7 Material und Methoden

Im Hauptprojekt wurden die Zellen 2 Stunden oder 48 Stunden mit einer Frequenz von 27 GHz oder 40,5 GHz und einer Leistungsflussdichte von 1 mW/cm² oder 10 mW/cm² exponiert oder scheinexponiert. Die vorgegebenen Bedingungen (2 Zelltypen, 2 Leistungsflussdichten, 2 Frequenzen, 2 Expositionsdauern, 3 Replikate) führten zu einer Anzahl von 48 Versuchen. Weitere 24 Versuche waren nötig, um die HDF-Versuche zu wiederholen und so eine ausreichende Menge an RNA für die qPCR-Validierung zu generieren.

7.1 Zellkultur, Exposition und Zellernte

Beide Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, high glucose, GlutaMAX; Gibco, Waltham, USA) mit 10% fetalem Kälberserum (Gibco, Waltham, USA) und 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, Waltham, USA) in T75-Zellkulturflaschen kultiviert (Gibco, Waltham, USA). Die HaCaT-Zellen wurden in Passage 35 und die HDF-Zellen in Passage 6-7 verwendet. Für die Exposition wurden die Zellen so ausgesät, dass nach drei Tagen Kultivierung in den 60mm-Zellkulturschalen die Experimente beendet wurden. Im Fall der 48h-Experimente bedeutet dies eine Aussaat einen Tag vor Start der Experimente, im Fall der 2h-Experimente eine Aussaat der Zellen drei Tage vor Start der Exposition. Dabei wurde die Zellzahl so gewählt, dass die Zellen am Ende der Exposition eine Konfluenz von ca. 80% aufwiesen. Dazu wurden die Zellen nach dem Standardprotokoll des Herstellers mit TrypLE (Gibco, Waltham, USA) abgelöst und pro Schale 200.000 HaCaT Zellen bzw. 120.000 HDF Zellen ausgesät.

Die Exposition und Scheinexposition der biologischen Proben erfolgte parallel in zwei 60mm-Schalen (CellBIND® Surface Culture Dish, Corning Incorporated, Corning, USA) in zwei separaten Inkubatoren (siehe oben). Bei allen Versuchen wurde die Temperatur fortlaufend mit einem fiberoptischen Sensor gemessen. Bei den Versuchen mit einer Leistungsflussdichte von 10 mW/cm² wurde außerdem eine Deckelheizung verwendet, um die Bildung von Kondenswasser zu verhindern. Den ausführenden Personen war zu keiner Zeit bekannt, in welchem der beiden Inkubatoren die Zellen exponiert wurden, und in welchem die Scheinexposition stattfand. Jeder Versuch wurde in drei Replikaten durchgeführt.

Für weitere Kontrollen neben der Scheinexposition wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Temperaturkontrollen erstellt. Jeweils drei Replikate an HaCaT- und HDF-Zellen wurden bei 40,5 GHz und 10 mW/cm² für 48h exponiert oder scheinexponiert, ohne dass die Temperaturerhöhung des Mediums und der Zellen kompensiert wurde. Die Starttemperatur des Mediums lag bei diesen Versuchen

bei 37,0°C und erhöhte sich bei den exponierten Proben auf durchschnittlich 38,3°C. Es wurden außerdem keine Deckelheizungen verwendet, so dass die Erwärmung des Mediums bei den exponierten Proben dazu führte, dass ein Teil des Mediums verdunstete und sich am Deckel als sichtbare Tropfen absetzte. Zum anderen wurden Zellen mit UV-Strahlung behandelt. Es wurden jeweils drei Replikate an HaCaT- und HDF-Zellen mit einer MinUVIS Analyselampe (DESAGA, Wiesloch, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 254 nm und einer Beleuchtungsstärke von 1 mW/cm² exponiert oder scheinexponiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und gesammelt, zweimal mit PBS (Gibco, Waltham, USA) gespült und die Zellen mit 600 µl PBS pro Schale dünn überschichtet. Die Exposition erfolgte ohne Schalendeckel für 20 sec, für die Scheinexposition wurden die Schalen bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und die Zellen mit dem zuvor gesammelten Medium versetzt. Nach 2h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium verworfen und die Zellen analog zu den anderen Versuchen geerntet und analysiert.

Im Anschluss an die Exposition wurde das Medium der Zellschalen verworfen und eine mit einem 3D-Drucker angefertigte Schablone (bei 27 GHz eine Ellipse mit einem Radius 24 mm/23 mm; bei 40,5 GHz ein gekappter Kreis mit einem Radius von 24 mm und einem Abstand der gekappten Fläche zum Mittelpunkt von 19 mm) von außen auf den Schalenboden aufgebracht und die auszusparenden Bereiche markiert. Die Zellen wurden gemäß der Markierung mit einem Zellschaber entfernt und der Zellrasen anschließend zweimal mit PBS (Gibco, Waltham, USA) gespült. Die auf der Schale verbliebenen Zellen wurden mit 350 µl Lysepuffer RLT Plus (Qiagen, Hilden, Deutschland) lysiert und mit einem Ultra-Turax Homogenisator (IKA, Staufen, Deutschland) für 30 sec homogenisiert. Bei den wiederholten HDF-Experimenten wurden für die Lyse 350 µl Lysepuffer RLT (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Zelllysate wurden mit einem Zellschaber gesammelt und in Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

Die DNA- und RNA-Extraktion erfolgte mit dem DNA/RNA Allprep Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und bei den HDF-Wiederholungsversuchen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers. DNA, RNA und Abfallstoffe wurden mit Hilfe von Silica-Membran-Säulen getrennt. Der DNase-Verdau wurde unter Verwendung des RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) in das Extraktionsverfahren integriert. Nach der Trennung und dem Waschen der Nukleinsäuren mit verschiedenen Puffern und in Zentrifugationsschritten wurde die DNA mit EB-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 70°C eluiert und 2 min auf der Säule inkubiert. Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser eluiert, das 10 Minuten auf der Säule inkubiert wurde, um die RNA-Menge zu erhöhen. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

7.2 Untersuchung von Genexpressionsveränderungen

Für die Untersuchung von Genexpressionsveränderungen wurde eine hochsensitive RNASeq-Analyse durchgeführt. Die Vorteile dieser Methode sind unter anderem, dass keine zu untersuchenden Transkripte vorgegeben werden, sondern das gesamte Transkriptom sequenziert wird. Die Ergebnisse der Analyse wurden dann mit quantitativer Real-Time RT-PCR (qPCR) validiert.

7.2.1 Genexpressionsanalyse

Insgesamt wurden 96 RNA-Proben (inkl. Scheinexposition) aus den Versuchen und 24 RNA-Proben aus den Kontrollen zur Analyse der Genexpression an IMGGM (Martinsried, Deutschland) verschickt. Die Proben wurden dort zunächst mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mittels RNA Nano LabChip Kits (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) auf ihre Integrität geprüft. Bei ausreichend hoher Integrität (RIN-Wert > 7.0) wurden die Proben weiterverwendet, anderenfalls wurde der Versuch wiederholt und die neuen Proben eingeschickt.

Die Erstellung der Transkriptom Library wurde mit der TruSeq® Stranded mRNA Technologie nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (Illumina, San Diego, USA). Es umfasste die Fragmentierung, den Poly-T-Oligo-Pulldown und die Sequenzierungsadapter-Ligation. Das NovaSeq® 6000 Next Generation Sequencing System (Illumina, San Diego, USA) wurde für die RNA-Sequenzierung verwendet. Die resultierenden Reads wurden auf 75 bp getrimmt und gegen das menschliche Referenzgenom gemappt. Diese Daten wurden an

die Constructor University übermittelt und durch die Arbeitsgruppe von Prof. Marc-Thorsten Hütt statistisch ausgewertet.

Die Gesamtzahl der Exon-Reads für jede Probe wurde aus den vom IMG M erhaltenen Read-Counts-Daten extrahiert. Bei der RNASeq-Analyse ist die Normalisierung der Daten ein wichtiger Schritt, der sorgfältig geprüft werden muss. Es gibt zahlreiche Normalisierungstechniken: Nach Bibliotheksgröße (RPKM, FPKM, ERPKM), nach Verteilung (Quantilnormalisierung, DESeq, CuffDiff, TMM, MRN), nach Tests (PoissonSeq, DEGES) oder nach Kontrollen [14]. Die wichtigsten Annahmen für die Wahl der Normalisierung nach Verteilung sind [14]: (a) Die meisten Gene sind nicht differentiell exprimiert. (b) Die technische Variation ist für differentiell exprimierte Gene (DEG) und nicht differentiell exprimierte Gene gleich. (c) Die differentielle Expression ist unter allen Bedingungen symmetrisch und es gibt keine globale Verschiebung. Diese Annahmen stimmen mit den experimentellen Erwartungen überein. Daher wurde eine Normalisierung durch Verteilung (DESeq2-Normalisierung [15, 16]) verwendet, die die Expressionsniveaus für nicht differentiell exprimierte Gene ausgleicht. DESeq2 normalisiert, indem es das Verhältnis jeder Read-Zahl zum geometrischen Mittel aller Read-Zahlen für dieses Gen über alle Proben hinweg ermittelt. Der Median dieser Verhältnisse für eine Probe (Größenfaktor) wird zur Skalierung dieser Probe verwendet. Nach der Normalisierung haben alle Proben die gleiche Verteilung. Wenn sich die Probenverteilungen anschließend nicht überschneiden, wird eine „Within Lane Normalization“ durchgeführt, indem der GC-Gehalt der Gene mit EDASeq [17] entfernt wird. Der GC-Gehalt eines Gens wirkt sich auch auf seine Expression aus, daher wird hierfür korrigiert.

Nach der Normalisierung wurden die Daten auf das Vorhandensein von Batch-Effekten getestet. Batch-Effekte sind nicht-biologische Variablen in den Experimenten, die, wenn sie nicht korrigiert werden, zu falschen Ergebnissen führen können [18, 19]. Einige Beispiele für Batches sind unterschiedliche verwendete Reagenzien, mehrere Experimentatoren, Tage, die zwischen dem Auftauen des Zellaliquots und dem Aussäen der Zellen verstrichen sind, usw. Um die Batches zu erkennen, wurden die Korrelationen zwischen der Variation in den Daten (Hauptkomponenten) und den Kovariaten mit der Funktion `DEGreport::degCovariates` in R berechnet und über die Singulärwertzerlegung (Singular Value Decomposition Analysis; SVD) mit `ggplot2` überprüft. Die Korrektur von Batch-Effekten ist einer der umstrittensten Schritte in der RNASeq-Analyse. Es gibt zwei primäre Möglichkeiten, mit Batch-Effekten umzugehen [20]: (a) Hinzufügen des Batches als Kovariate in den statistischen Modellentwurf der Analyse. (b) Entfernung von Batch-Effekten aus den Read-Counts und anschließende Durchführung der statistischen Analyse. Aus den folgenden Gründen wurde (a) gewählt:

1. Die Autoren von DESeq2 und anderen ähnlichen Tools empfehlen Ansatz (a) für die statistische Analyse und Ansatz (b) für die Visualisierung von Batch-korrigierten Daten (Handbuch des DESeq2-Pakets und Bioconductor-Support; <https://support.bioconductor.org/p/121408/>).
2. DESeq2 erfordert ganzzahlige Zählungen als Eingabe, während die meisten Batch-Korrektur-Tools nicht-ganzzahlige Werte zurückgeben. Eine Ausnahme bildet Combat-seq von SVA, wobei einige Studien darauf hinweisen, dass die Korrektur von Batch-Effekten durch Combat-seq zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann, indem die F-Statistiken der Abfrageanalyse aufgebläht werden [20].

Zur Visualisierung der Clusterung von Proben wurden Heat Maps mit hierarchisch nach durchschnittlicher Verknüpfung geclusterten Proben und Genen (`stats::as.dist`, `stats::hclust` in R) erstellt. Für die statistische Inferenz wurde das robuste und leistungsstarke Tool DESeq2 verwendet, das die negative Binomialverteilung nutzt und gleichzeitig die inhärente Variabilität der RNASeq-Daten berücksichtigt [16]. Parameter für Gene, die signifikant unterschiedlich exprimiert werden, sind ein korrigierter p-Wert $< 0,05$ und $|\log_2(\text{foldchange})| \geq 1$ für Wald-Hypothesentests.

7.2.2 qRT-PCR

Die durch die RNASeq-Analyse identifizierten differentiell exprimierten Gene wurden mittels qPCR validiert. Diese Analysen fanden im Labor von Prof. Alexander Lerchl statt. Hierbei wurden nur diejenigen Gene überprüft, die nachweislich codierend sind, Read-through Transkripte und andere nicht codierende Sequenzen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. In jeder Probe wurde außerdem die Amplifikation von

drei Referenzgenen gemessen, um die Daten entsprechend zu normalisieren. Die Auswahl der Referenzgene richtete sich nach bekannten Genen, die sich sowohl für HaCaT- als auch für HDF-Zellen als geeignet herausgestellt hatten [21, 22]. Die RNA-Proben wurden mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde jeweils 1 µg RNA mit dem gDNA Wipeout Buffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) 2 min bei 42°C behandelt und anschließend mit den Kit-Komponenten (Reverse Transkriptase, Primer Mix und Puffer; Qiagen, Hilden, Deutschland) für 15 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Inkubation für 3 min bei 95°C gestoppt. Die cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser 1:5 verdünnt und bei -80°C gelagert.

Die qRT-PCR wurde mit dem QIAquant 96 5plex qPCR Cyclor (Qiagen, Hilden, Deutschland) und dem QuantiNova LNA PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Effizienz der 13 verwendeten QuantiNova LNA PCR Assays wurde mit der Messung von Standardkurven bestimmt (Tabelle 1). Sieben der zehn Zielgene waren nur gering exprimiert (Ct-Wert ≥ 29), so dass die Standardkurven zum Teil mit den Amplifikationsprodukten der qPCR erstellt wurden (Reamplifikation). Nach Protokoll des Herstellers wurde der QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit dem zu messenden QuantiNova LNA PCR Assay (Qiagen, Hilden, Deutschland) und RNase-freiem Wasser vermischt und in weiße PCR Platten für qPCR (Brand, Wertheim, Deutschland) verteilt. Jeweils 2 µl der cDNA-Proben wurde hinzugefügt und die Messung mit dem qPCR-Cyclor nach folgendem Programm durchgeführt: 2 min bei 95°C, 45 Zyklen mit jeweils 5 sec bei 95°C und 10 sec bei 60°C. Im Anschluss an den letzten Zyklus wurde eine Schmelzkurve des Amplifikationsprodukts erstellt um ggf. unspezifische Produkte zu erkennen.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten QuantiNova LNA PCR Assays (Qiagen, Hilden, Deutschland) und GeneGlobe ID für die zehn Zielgene und drei Referenzgene (unterstrichen).

GEN	aSSAY	gENEGLOBE id
LRRC10B	HS_LRRC10B_1735998	SBH0492184
SULT1A4	HS_SULT1A4_1352321	SBH0108537
SULT1A3	HS_SULT1A3_1883973	SBH0640095
FBLN5	HS_FBLN5_1316297	SBH0072513
KRT9	HS_KRT9_1559776	SBH0315972
PCDHA9	HS_PCDHA9_1249273	SBH0005495
MIOX	HS_MIOX_1868816	SBH0624940
MMP23B	HS_MMP23B_1470323	SBH0226531
IL1RN	HS_IL1RN_1717713	SBH0473899
USP6	HS_USP6_1466093	SBH0222301
HPRT1	HS_HPRT1_1530012	SBH0286217
GAPDH	HS_GAPDH_2475369	SBH1220545
B2M	HS_B2M_1556041	SBH0312240

Die Daten der qPCR-Validierung wurden, korrigiert nach Assay-Effizienz und normalisiert zu den drei Referenzgenen, mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt [23]. Die Genexpression der Proben wurden auf signifikante Unterschiede zwischen Exposition und Scheinexposition mit dem Student's t-Test geprüft.

7.3 DNA-Methylierungsanalyse

Insgesamt wurden 96 DNA-Proben aus den Versuchen und 24 DNA-Proben aus den Kontrollen zur Analyse der Methylierung an IMGGM (Martinried, Deutschland) verschickt. Zur Sicherstellung der Qualität wurde dort zunächst die Konzentration der DNA mit dem Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) im Vergleich zu einem im Kit enthaltenen Standard bestimmt.

Die genomische DNA wurde dann mittels Bisulfit-Konvertierung modifiziert. Hierfür wurde das EZ DNA Methylation™ Direct Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die modifizierte DNA wurde dann mit dem Infinium HD Assay for Methylation (Illumina, San Diego, USA) nach Herstellerangaben denaturiert und neutralisiert. Anschließend wurde sie amplifiziert und nach enzymatischer Fragmentierung mit Isopropanol ausgefällt. Die DNA wurde resuspendiert und auf die Infinium MethylationEPIC Arrays (Illumina, San Diego, USA) hybridisiert.

Die Primer auf den BeadChips wurden komplementär zur DNA-Probe mit markierten Nukleotiden verlängert. Danach wurde die hybridisierte DNA entfernt und die markierten, verlängerten Primer gefärbt und getrocknet. Die Fluoreszenz wurde mit dem iScan™ System (Illumina, San Diego, USA) gemessen.

Für die Methylierungsanalyse wurde das umfassende Paket ChAMP in R verwendet [24]. Die von IMGGM übermittelten Intensitätsdateien wurden mit der *minfi*-Methode unter Verwendung der Funktion `champ.load()` importiert [25, 26]. Die Vorverarbeitung der Daten erfolgte durch Herausfiltern von Sonden

mit einem Erkennungswert $> 0,01$, einer Bead-Anzahl < 3 in mindestens 5 % der Proben, einer Überschneidung mit SNP-Stellen [27], einer Überschneidung mit mehreren Stellen im menschlichen Genom oder einer Ausrichtung am X/Y-Chromosom. Die Intensitäten wurden in Beta-Werten zwischen 0 und 1 importiert. Nach dem Filtern der Sonden wurden die Beta-Werte mit Hilfe der Quantile [QN;28] + Beta-Mixture Quantile [BMIQ; 29] Normalisierung korrigiert. Die QN+BMIQ-Normalisierung hat sich als äußerst zuverlässig für Microarray-Daten, einschließlich DNA-Methylierungsprotokollen von Illumina erwiesen [30]. Sie konzentriert sich darauf, die Verteilung von Typ-II-Sonden so umzuwandeln, dass sie der von Typ-I-Sonden ähnlich ist.

Nach der Normalisierung wurden die Daten wie für die RNASeq-Analyse beschrieben auf Batch-Effekte überprüft. Die erkannten Batches werden mit `champ.combat()` entfernt, das die Combat-Methode aus dem SVA-Paket verwendet [31, 32]. Die Ergebnisse verschiedener Studien deuten darauf hin, dass die Batch-Korrektur durch Combat unter Beibehaltung der Unterschiede zwischen den Abfragegruppen zu einer Aufblähung der F-Statistiken und zu falsch positiven Ergebnissen führen kann [20, 33], weshalb Artefakte als starke isolierte Signale herausgefiltert wurden, die ohne Batch-Korrekturen nicht erkennbar sind. Die Batch-korrigierten Daten wurden dann statistisch analysiert, um differenziell methylierte Regionen (differentially methylated probes; DMP) mit Hilfe von Limma [34, 35] und korrigiert für multiples Testen [36] zu finden, wobei folgende Schwellenwerte gelten: korrigierter p-Wert $< 0,05$ und $|\log_2(\text{foldchange})| \geq 0,1$.

7.4 Netzwerkanalyse

Um die Netzwerkkohärenz der unterschiedlich exprimierten/methylierten Gene im Kontext biologischer Netzwerke zu untersuchen, wurden zwei gen-zentrierte metabolische Netzwerke (Recon2 [37] und Recon3D [38]) und zwei Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke auf Gen-Ebene (String [39] und Biogrid [40]) verwendet. Der Schwerpunkt lag auf den effektiven Teilnetzen, die die Projektionen der unterschiedlich exprimierten/methylierten Gene auf das verwendete gen-zentrische Stoffwechselnetz oder das Protein-Protein-Interaktionsnetz auf Gen-Ebene darstellen. Es wurde eine umfassende Analyse der Netzwerkkohärenz in diesen Teilnetzwerken durchgeführt, indem geprüft wurde, ob die Netzwerkkonnektivität größer oder kleiner ist als zufällig erwartet.

Gen-zentrierte metabolische Netzwerke: Es wurden nach den in [41-44] beschriebenen Methoden Gen-zentrierte metabolische Modelle (GCMN) aus den Netzwerkmodellen Recon2 [37] und Recon3D [38] extrahiert. In GCMN repräsentieren die Knotenpunkte die Gene und die Eckpunkte die Verbindungen der Gene über metabolische Reaktionen. Anders ausgedrückt, eine Verbindung zwischen zwei Genen ist gegeben, wenn die mit diesen Genen verbundenen Stoffwechselreaktionen einen gemeinsamen Metaboliten aufweisen. Die primären Austauschmetaboliten ATP, ADP, CO_2 , H, NAD, NADH u.a. sind die am stärksten miteinander verbundenen Stoffwechselarten, bei denen es unwahrscheinlich ist, dass sie Verbindungen zwischen Genen mit ähnlichen Stoffwechselfunktionen herstellen, was zu einem künstlich verdichteten Stoffwechselnetz führt [45-47]. Um diesen Effekt abzuschwächen, wurden die Metaboliten entfernt, die die obersten 2 % der am stärksten verknüpften Metaboliten darstellen. Das resultierende Gen-zentrierte metabolische Netzwerk aus Recon2 hat 1.806 Knotenpunkte und 31.699 Eckpunkte. In ähnlicher Weise hat das Netzwerk aus Recon3D 3.449 Knotenpunkte und 233.235 Eckpunkte.

Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke auf Gen-Ebene: Die Analyse wurde mit zwei verschiedenen Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken auf Gen-Ebene (GPIN) durchgeführt, die aus den Datenbanken String [39] und Biogrid [40] für Protein-Protein-Interaktionen abgeleitet wurden. Um das GPIN aus der String-Datenbank zu erstellen, wurden selektiv Protein-Interaktionen aufgenommen, die mit dem menschlichen Organismus in Verbindung stehen und eine Punktzahl des Interaktions-Scores von mehr als 850 aufweisen, um ausschließlich direkte Interaktionen zu berücksichtigen. Der Interaktions-Score stellt basierend u.a. auf experimentellen Daten, Co-Expressionsanalysen und Text Mining dar, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die jeweilige Interaktion zwischen zwei Proteinen tatsächlich vorhanden ist und liegt zwischen null und 1.000 Punkte. Anschließend wurden die Protein-IDs mit den zugehörigen Gen-IDs in der Ensembl-Datenbank [48] abgeglichen. Das GPIN wird als Graph dargestellt, wobei die Gene als Knotenpunkte dienen

und die Eckpunkte die Verbindungen zwischen den Genen durch Protein-Wechselwirkungen darstellen. Der Graph hat 12.468 Knotenpunkte und 139.560 Eckpunkte. Das aus der BioGRID-Datenbank abgeleitete GPIN wird nach der oben erläuterten Methodik ohne jegliche Filterung der Interaktionswerte erstellt. Der Graph besteht aus insgesamt 21.797 Knotenpunkten und 1.018.531 Eckpunkten.

Um die Gen-Namen der Netzwerkanalyse sowohl Entrez-IDs als auch Ensembl-IDs zuzuordnen, wurde das Python-Paket *mygene* verwendet. In Fällen, in denen ein einzelner Gen-Name mehreren IDs entspricht, wurden alle zugeordneten IDs berücksichtigt.

Die differenziell exprimierten/methylierten Gene wurden auf das Netzwerk projiziert, um das effektive Teilnetz zu extrahieren. Der Konnektivitätswert eines Teilnetzes wurde bestimmt durch das Verhältnis zwischen den nicht isolierten Genen und der Gesamtzahl der im Netzwerk vorhandenen Genen. Um die Nullverteilung der Konnektivitätswerte zu erhalten, wurden 5.000 Gen-Sätze, die jeweils der Größe des effektiven Teilnetzes entsprechen, nach dem Zufallsprinzip aus dem verwendeten Netz gezogen und die Konnektivitätswerte dieser zufällig gezogenen Teilnetze berechnet. Der z-Score der Konnektivität des effektiven Teilnetzes wurde dann unter Verwendung dieser Verteilung bestimmt.

7.5 Kombinatorische Analyse

Da diese Studie sowohl für die Experimente selbst als auch für die Analyse verblindet war, wurde eine Methode entwickelt, die darauf abzielt, die tatsächliche Zuordnung der Proben zu Exposition und Scheinexposition aus anderen zufällig generierten Probengruppen durch variable Kombinatorik zu erkennen. Die 24 Proben pro Leistungsflussdichte waren aufgeteilt in jeweils 12 Versuche mit je einer schein-exponierten und einer exponierten Probe. Ohne zu wissen, welche Probe exponiert wurde, wurden alle möglichen Kombinationen von Proben zusammengestellt (212 Kombinationen), so dass jeder Versuch aus einer schein-exponierten und einer exponierten Probe bestand. Dann wurde die Genexpressionsanalyse bzw. DNA-Methylierungsanalyse durchgeführt, indem jede mögliche Probenkombination als Modelldesign aufgenommen wurde. Dies führte zu einer Zusammenstellung von Listen mit DEG bzw. DMP für alle Kombinationen.

In dieser Studie wurden zwei Signale untersucht, die durch die Durchführung der Kombinatorik abgeleitet wurden: (1) Die Anzahl der DEG bzw. DMP und ob die tatsächliche Zuordnung von schein-exponierten und exponierten Proben ein stärkeres Signal aufweist als zufällig erwartet, d.h. der z-Score der Anzahl der DEG bzw. DMP und (2) die Netzwerkkohärenz dieser DEG bzw. DMP (der z-Score der Konnektivität) und die Stärke dieses Signals im Vergleich zu anderen zufällig erzeugten Probenkombinationen (der z-Score der z-Scores). Die resultierenden Signalstärken wurden für alle möglichen Kombinationen untersucht, wobei die tatsächliche Zuordnung das stärkste Signal aufweisen sollte, wenn es einen echten Effekt der Exposition gibt. Sollten beide Analysen (1) und (2) ergeben, dass die tatsächliche Zuordnung kein stärkeres Signal als zufällig erwartet ausgibt, ist dies ein starkes Indiz dafür, dass die Exposition keinen entsprechenden Effekt erzeugt.

8 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Analysen fielen unterschiedlich aus. Während die Genexpression nach Exposition nahezu unverändert blieb, waren die Ergebnisse der Methylierungsanalyse nicht eindeutig. Dank der umfangreichen biostatistischen Auswertung, die auch neu entwickelte Auswertungsmethoden beinhaltete, kann trotzdem eine fundierte Aussage über die Auswirkungen der Exposition auf die untersuchten Parameter getroffen werden.

8.1 Genexpression

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen zeigen, dass es nur geringe Veränderungen nach Exposition gegeben hat. In Abbildung 1 sind die Heat Maps der verschiedenen Expositionsbedingungen der RNASeq-Daten zusammengefasst. Es ist deutlich zu sehen, dass die Exposition nicht zum Clustern der Proben führt, was darauf hinweist, dass die Exposition keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Genexpression der Proben hat. Bei den HaCaT-Proben (10 mW/cm²) fallen in der Heat Map drei Proben auf (ganz rechts), bei

denen mehrere Gene deutlich höher exprimiert wurden als in den restlichen Proben.

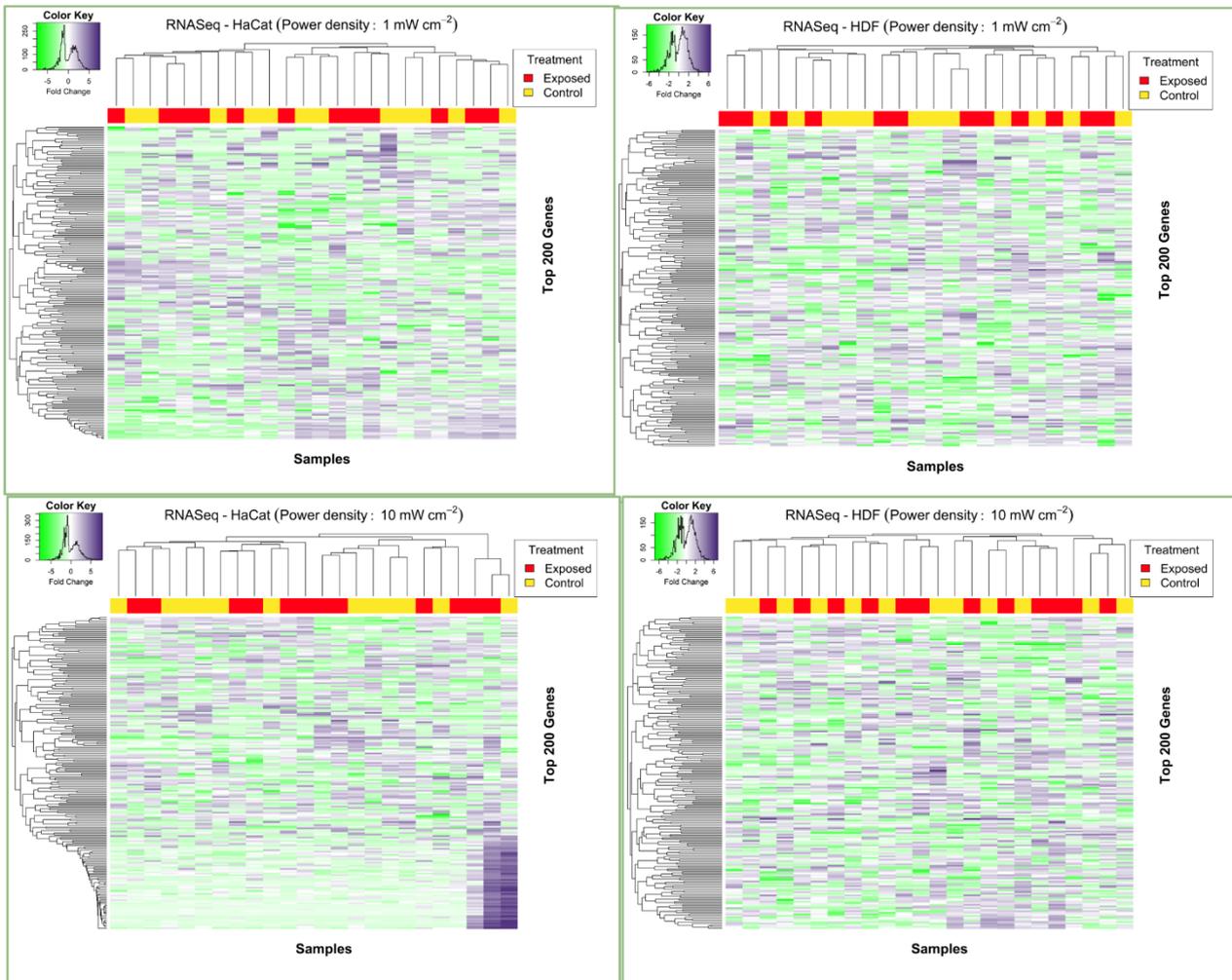


Abbildung 1 Heat Maps der RNASeq-Daten nach Exposition oder Scheinexposition.

Ähnliche Ergebnisse sind in den Heat Maps zu sehen, die die Genexpressionsdaten der Temperaturkontrollen zeigen, die der Exposition von 10 mW/cm² bei 40,5 GHz für 48 Stunden ausgesetzt wurden, ohne für die Temperaturerhöhung zu kompensieren (Abbildung 2). Auch hier ist kein klares Clustern der Proben zu beobachten. Bei den HaCaT-Proben fällt in der Heat Map eine, bei den HDF-Proben zwei Proben auf (ganz rechts), bei denen mehrere Gene deutlich höher exprimiert wurden als in den restlichen Proben.

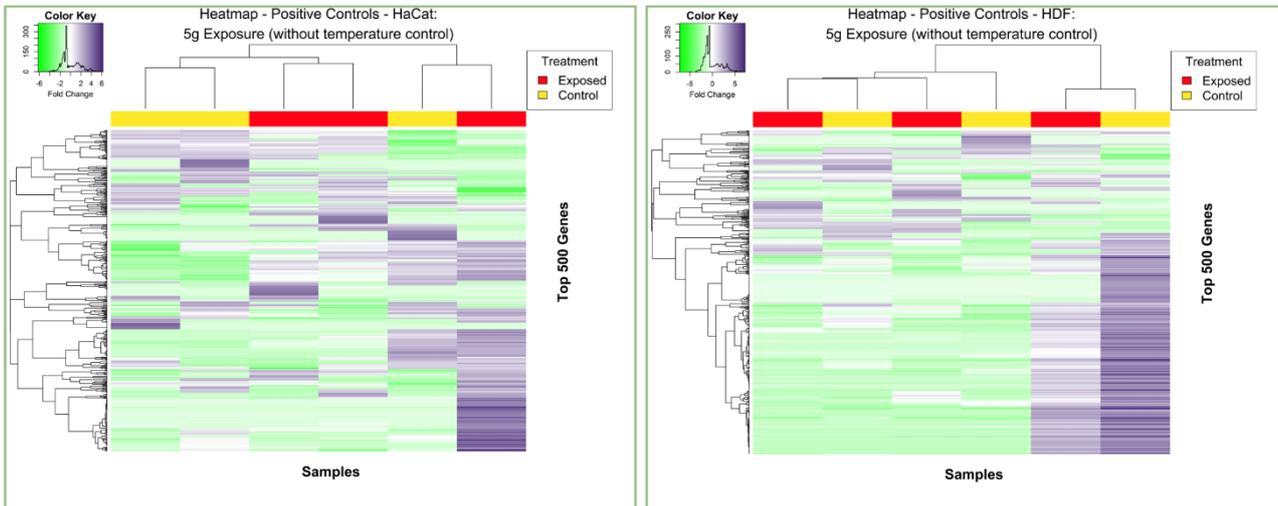


Abbildung 2: Heat Maps der RNASeq-Daten nach Exposition bei 10 mW/cm², 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation oder Scheinexposition.

Im Gegensatz dazu zeigen die Heat Maps der Kontrollen, die mit UV-Strahlung behandelt wurden, eine klare Gruppierung der Proben in exponierte und scheinexponierte Proben (Abbildung 3). Bei den HaCaT-Proben und auch bei den HDF-Proben fällt in den Heat Maps eine Probe auf (ganz rechts bzw. an vierter Stelle von links), bei denen mehrere Gene deutlich höher und andere deutlich niedriger exprimiert wurden als in den restlichen Proben.

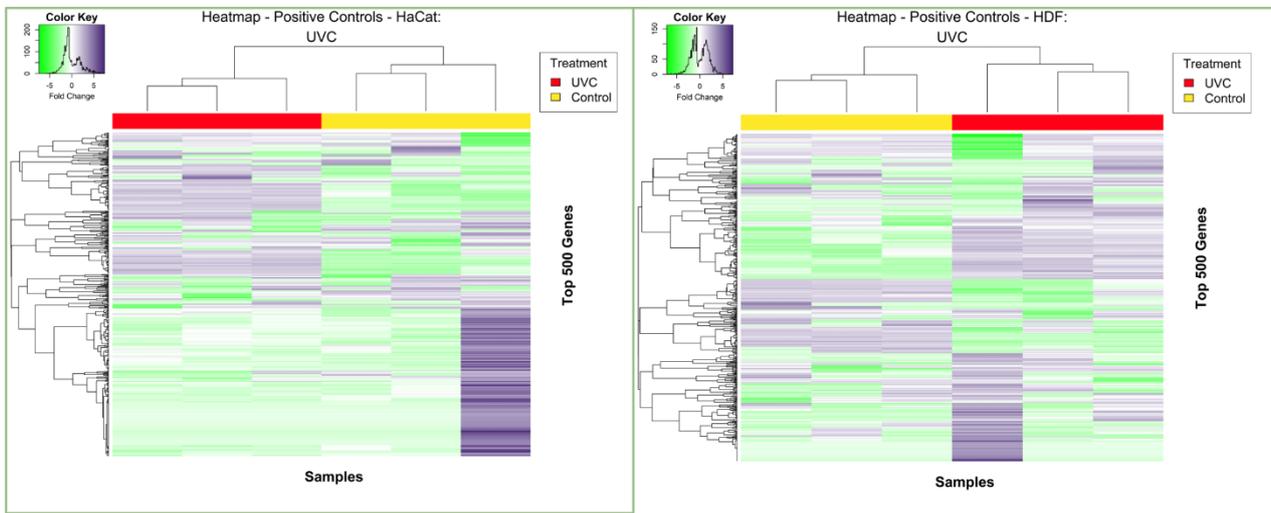


Abbildung 3: Heat Maps der RNASeq-Daten nach UV-Bestrahlung oder Scheinexposition.

Die SVD-Analyse zeigte, dass die Genexpressionswerte der Proben zwar nicht durch die Exposition selbst, aber signifikant durch Nebeneffekte beeinflusst waren ($p < 0,01$). So zeigte sich, dass es einen Einfluss hatte, wie viele Tage zwischen Auftauen des Zell-Aliquots und Aussäen der Zellen für den Versuch lagen. Das heißt, je älter die Zellen, desto höher war die Varianz. Dies war sowohl bei den HaCaT-, als auch bei den HDF-Zellen der Fall. Des Weiteren gab es einen Einfluss der Charge des verwendeten Kits für die Isolierung der RNA. Weitere signifikante Einflussfaktoren waren die Frequenz, bei der die Exposition durchgeführt wurde und die Expositionszeit.

Die Nebeneffekte wurden durch eine Batch-Korrektur vermindert, so dass die bereinigten Daten auf signifikante Unterschiede zwischen Exposition und Scheinexposition getestet werden konnten. Die Anzahl der signifikanten DEG ist in Tabelle 2 aufgelistet. Es ist deutlich zu sehen, dass bei den unterschiedlichen Expositionsbedingungen nur geringe oder gar keine Unterschiede in der Genexpression gefunden wurden. Leicht höhere Werte sind bei den HDF Zellen bei der Exposition bei einer Leistungsflussdichte von 10

mW/cm², besonders nach 48h zu sehen. Auch diese leicht höheren Werte sind allerdings nur ein Bruchteil dessen, was bei der Kontrolle nach UV-Bestrahlung gefunden wurde. Bei der Exposition ohne Temperaturkompensation (Temperaturkontrolle) sind die Werte der DEG der HDF-Zellen ähnlich gering wie bzw. sogar geringer als die mit Temperaturkompensation. Die HaCaT-Zellen zeigen deutlich erhöhte Werte nach Exposition ohne Temperaturkompensation, aber auch hier deutlich geringer als nach UV-Bestrahlung.

Tabelle 2: Anzahl der differentiell exprimierten Gene im Vergleich zwischen Exposition und Scheinexposition. Zeile 2 zeigt die Expositionsbedingung, z.B. F27 T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temperatur = Exposition bei 10 mW/cm² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation. Down = Hyporegulation, Up = Hyperregulation.

	1 mW/cm ²				10 mW/cm ²				Kontrollen	
	F27 T2	F40,5 T2	F27 T48	F40,5 T48	F27 T2	F40,5 T2	F27 T48	F40,5 T48	Temperatur	UVC
<i>HaCaT</i>										
<i>Up</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	77	176
<i>Down</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	8	286
<i>HDF</i>										
<i>Up</i>	0	0	1	0	2	2	4	4	1	479
<i>Down</i>	0	0	1	1	1	2	5	3	1	281

Tabelle 3 zeigt die Namen der durch die RNASeq-Analyse gefundenen DEG und deren Zuordnung zu den verschiedenen Expositionsbedingungen. Von diesen DEG wurden die kodierenden Gene mittels qRT-PCR in den jeweiligen Proben validiert.

Tabelle 3: Namen der differentiell exprimierten Gene im Vergleich zwischen Exposition und Scheinexposition. A: HaCaT Zellen; B: HDF Zellen. Zeile 2 zeigt jeweils die Expositionsbedingung, z.B. F27 T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Down = Hyporegulation, Up = Hyperregulation; kodierende Gene, die mittels qRT-PCR validiert wurden, sind fett gedruckt.

A

<i>HaCaT</i>				
	F27 T2	F40,5 T2	F27 T48	F40,5 T48
<i>1 mW/cm²</i>				
<i>Up</i>	LRRC10B	-	-	-
<i>Down</i>	-	-	-	-
<i>10 mW/cm²</i>				
<i>Up</i>	-	BCYRN1	FBLN5	-
<i>Down</i>	PSMC1P5	PSMC1P1	CXorf49	BCYRN1

B

<i>HDF</i>				
	F27 T2	F40,5 T2	F27 T48	F40,5 T48
<i>1 mW/cm²</i>				
<i>Up</i>	-	-	SULT1A4	-
<i>Down</i>	-	-	SULT1A3	TMLHE-AS1
<i>10 mW/cm²</i>				
<i>Up</i>	RPL18AP3	RNF103-CHMP3	PCDHA9	LOC107985251
	KRT9	HSPE1-MOB4	COX6A1P2	RNF103-CHMP3
			RPL18AP3	UBE2L1
			MIOX	LOC112268192
<i>Down</i>	CHKB-CPT1B	RPS10P19	MMP23B	PSMC1P5
		USP6	LOC105373429	COX6A1P2
			IL1RN	HMGN1P38
			C8orf44-SGK3	
			USP6	

Die Ergebnisse der Validierung der kodierenden DEG mittels qRT-PCR ergaben, dass in den Proben bei sieben der zehn validierten Gene ein Ct-Wert von ≥ 29 gemessen wurde. Bei 21 dieser 42 Messungen mit hohem Ct-Wert konnte gar kein Ct-Wert bestimmt werden, da kein Amplifikat vorhanden war. Bei den restlichen drei Genmessungen, MMP23B, SULT1A3 und SULT1A4 lagen die Ct-Werte bei 21 bis 28. Die relative Genexpression dieser drei Gene ist in Abbildung 4 zu sehen. Die Genexpression der exponierten und scheinexponierten Proben war nur in einem der zehn gemessenen Gene signifikant unterschiedlich (Student's t-Test; SULT1A3: $p = 0,027$).

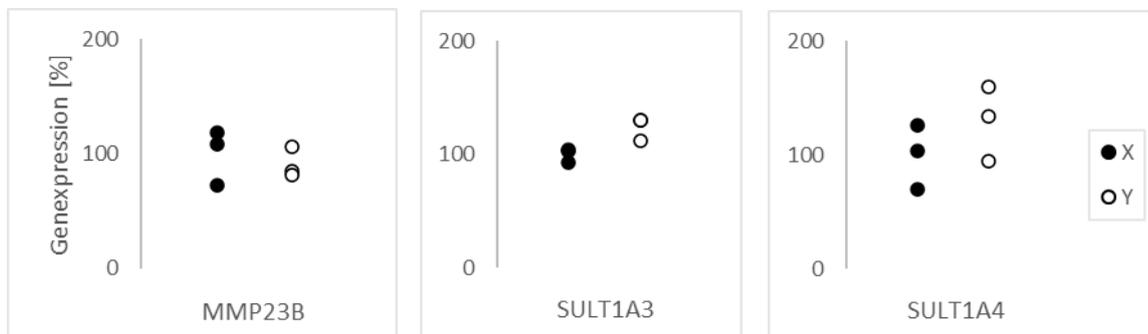


Abbildung 4: Relative Genexpression der Gene MMP23B, SULT1A3 und SULT1A4 nach qRT-PCR-Messung. Werte zeigen die Genexpression als prozentualer Anteil des Mittelwerts von X. X = exponiert; Y = scheinexponiert.

Die Ergebnisse der Kombinatorischen Analyse der Genexpressionsdaten der RNASeq ist in Abbildung 5 dargestellt. Jeweils blau markiert ist die Anzahl an DEG, die bei der Kombination gefunden wurde, die der tatsächlichen Zuordnung der Proben zu Exposition und Scheinexposition entspricht. Bei den gelb markierten Datenpunkten der Proben ist die blaue Markierung jeweils bei null oder im Bereich der zufällig gefundenen Anzahl an DEG durch die variable Probenkombination. Bei den rot markierten Datenpunkten der Kontrolle ohne Temperaturkompensation (Temp) liegt die blaue Markierung bei den Ergebnissen der HaCaT-Zellen weit außerhalb der zufällig gefundenen Anzahl an DEG, bei den Ergebnissen der HDF-Zellen ist das nicht der Fall. Bei der Kontrolle (UV-Bestrahlung) liegen beide blau markierten Datenpunkte ebenfalls weit außerhalb der zufällig gefundenen Anzahl an DEG.

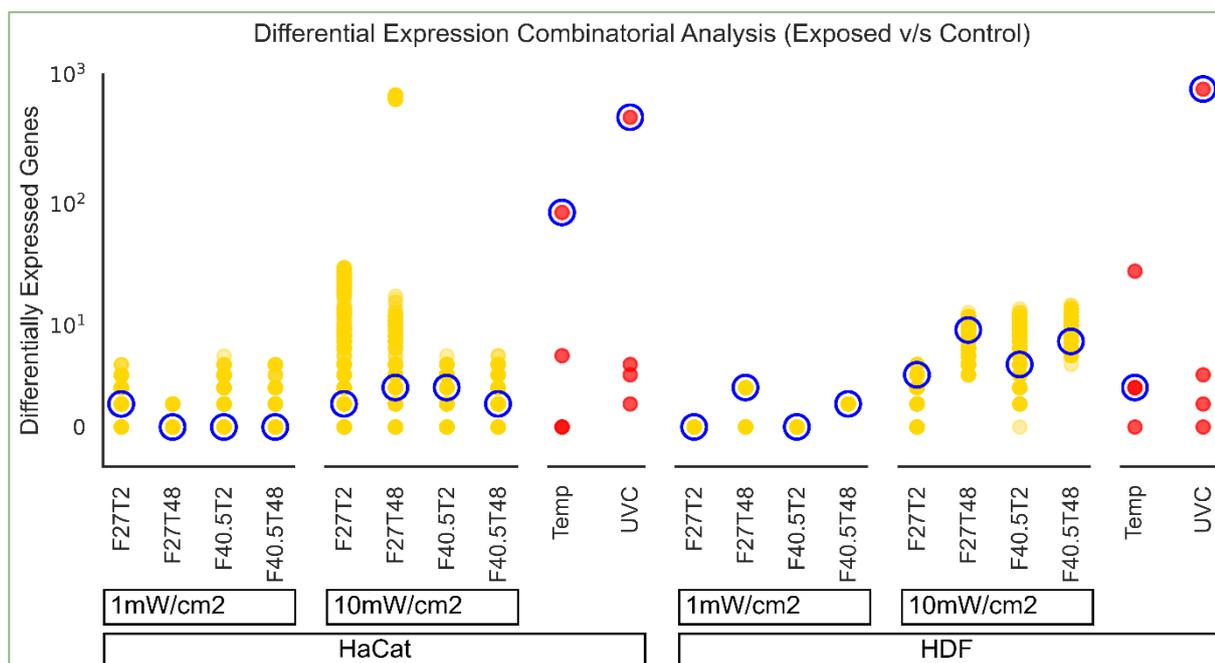


Abbildung 5: Ergebnisse der Kombinatorischen Analyse der Genexpressionsdaten der RNASeq. Die Datenpunkte zeigen die Anzahl der differentiell exprimierten Gene (DEG) nach Analyse aller möglichen Kombinationen der Proben. Jeweils blau markiert ist die Anzahl an DEG, die bei der Kombination gefunden wurde, die der tatsächlichen Zuordnung der

Proben zu Exposition und Scheinexposition entspricht. x-Achse: Expositionsbedingung, z.B. F27T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temp = Exposition bei 10 mW/cm² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation; y-Achse: Anzahl DEG, logarithmisch skaliert.

Die z-Scores der gefundenen DEG liegen bei allen getesteten Versuchsbedingungen unter dem Schwellenwert von 2,0. Dies bestätigt, dass die tatsächliche Zuordnung von schein-exponierten und exponierten Proben kein stärkeres Signal aufweist als zufällig erwartet.

8.2 DNA-Methylierung

Die Ergebnisse der Methylierungsanalysen zeigen, dass es nur geringe Veränderungen nach Exposition gegeben hat.

In Abbildung 6 sind die Heat Maps der verschiedenen Expositionsbedingungen der Methylierungsdaten zusammengefasst. Es ist deutlich zu sehen, dass die Exposition nicht zum Clustern der Proben führt, was darauf hinweist, dass die Exposition keinen oder nur einen geringen Effekt auf den DNA-Methylierungsstatus der Proben hat. Bei den HaCaT-Proben, 1 mW/cm² und auch bei den HDF-Proben, 10 mW/cm² fällt in den Heat Maps jeweils eine Probe auf (mittig bzw. im ersten Drittel), bei denen mehrere Gene deutlich höher und andere deutlich niedriger exprimiert wurden, als in den restlichen Proben.

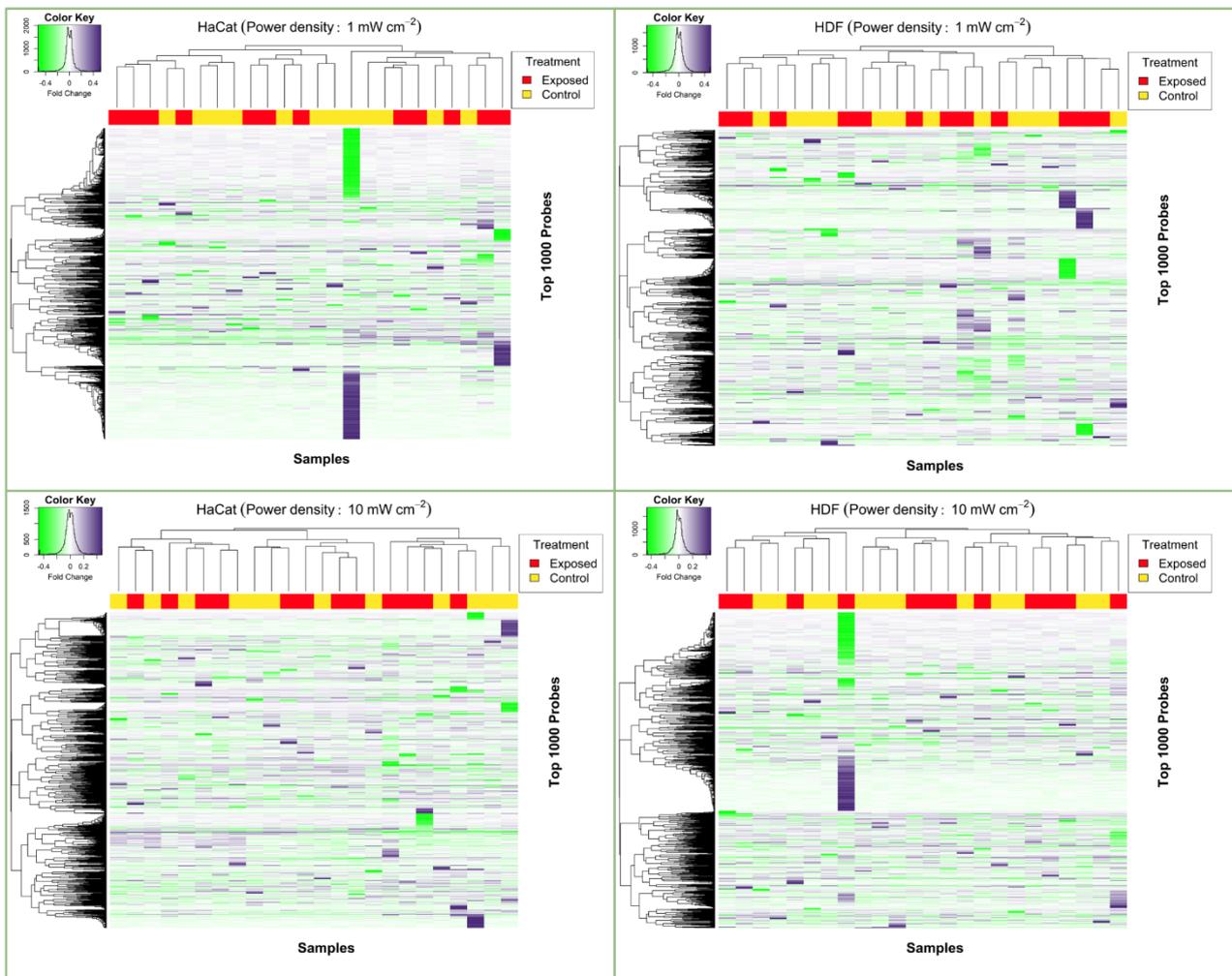


Abbildung 6: Heat Maps der Methylierungsdaten nach Exposition oder Scheinexposition.

Ähnliche Ergebnisse sind in den Heat Maps zu sehen, die die Genexpressionsdaten der Kontrollproben zeigen, die der Exposition von 10 mW/cm² bei 40,5 GHz für 48 Stunden ausgesetzt wurden, ohne für die Temperaturerhöhung zu kompensieren oder UV-Bestrahlung (Abbildung 7). Auch hier ist kein klares Clustern der Proben zu beobachten. Bei den HaCaT-Proben, und auch bei den HDF-Proben, Temperatur und UVC fällt in den Heat Maps jeweils eine Probe auf (ganz rechts), bei denen mehrere Gene deutlich höher und andere deutlich niedriger exprimiert wurden, als in den restlichen Proben.

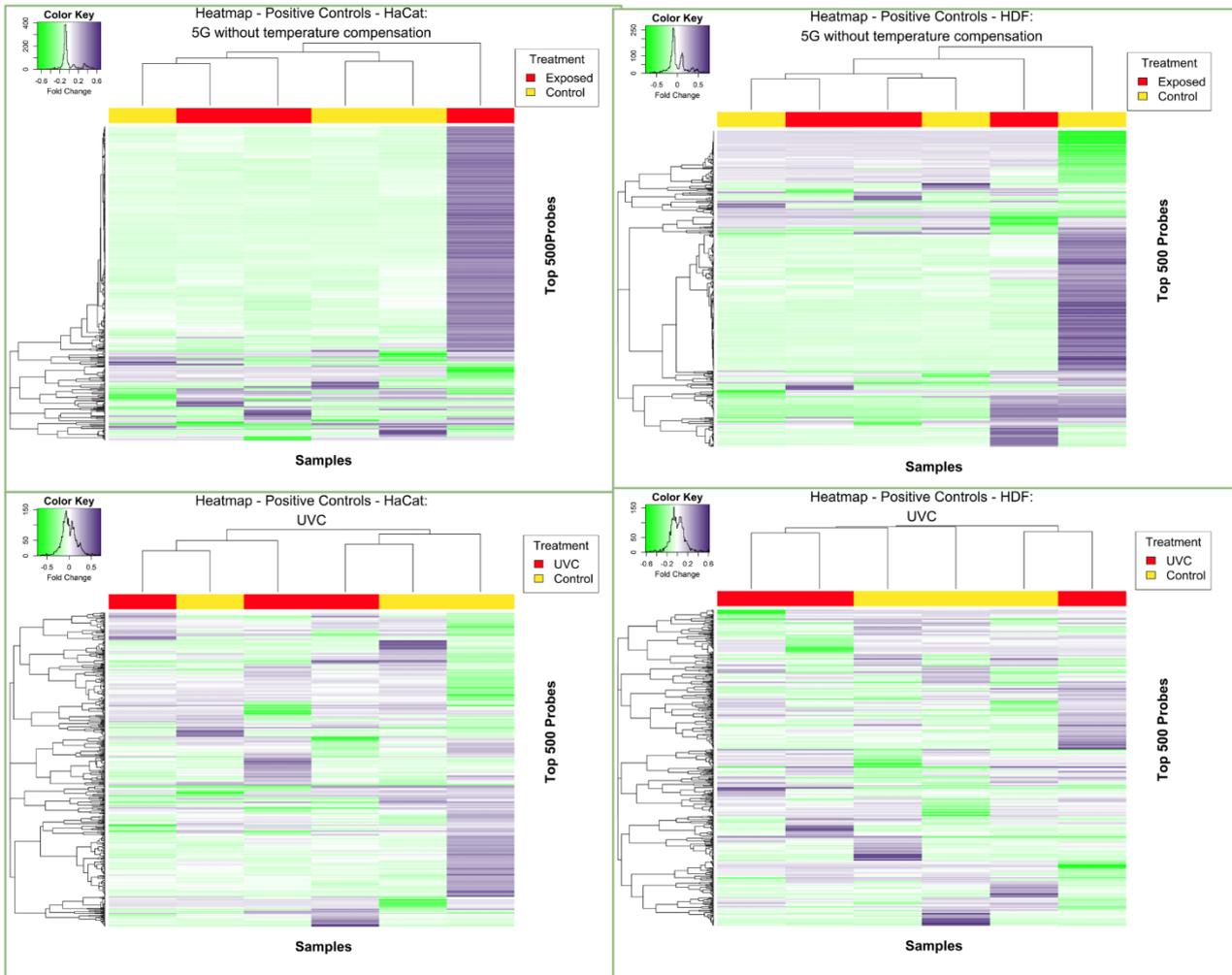


Abbildung 7: Heat Maps der Methylierungsdaten nach Exposition oder Scheinexposition. Dargestellt sind die Werte der 500 Regionen (Probes), die die höchste Varianz zwischen den Proben zeigen.

Die SVD-Analyse zeigte, dass die Methylierungswerte der Proben ebenfalls signifikant durch Nebeneffekte beeinflusst waren ($p < 0,01$). Auch hier zeigte sich bei HaCaT- und HDF-Zellen, dass es einen Einfluss hatte, wie viele Tage zwischen Auftauen des Zell-Aliquots und Aussäen der Zellen für den Versuch lagen. Daneben hatte mehr als die Hälfte der 17 getesteten Effekte einen Einfluss auf die Methylierungswerte, darunter die Identität der Experimentatorin, welches Zell-Aliquot verwendet wurde, die Passage und damit das Alter der Zellen, die Frequenz, Zeit und das Datum der Exposition, das Datum der DNA-Isolierung und das Microarray Slide. Keinen signifikanten Einfluss hingegen hatte die Exposition selbst.

Die Nebeneffekte wurden durch eine Batch-Korrektur vermindert, so dass die bereinigten Daten auf signifikante Unterschiede zwischen Exposition und Scheinexposition getestet werden konnten. Die Anzahl der signifikanten DMP ist in Tabelle 4 aufgelistet. Die Ergebnisse können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Zum einen sind leicht erhöhte Werte an DMP bei den Proben zu sehen, die bei einer Leistungsflussdichte von 1 mW/cm² exponiert wurden, wobei dieses Phänomen bei den HDF-Zellen erst nach einer Exposition von 48h auftritt, nicht jedoch nach 2h. Zum anderen ist die Anzahl an DMP bei den

Proben, die bei 10 mW/cm² exponiert wurden, fast bei null, wobei hier die Anzahl der DMP der HDF-Zellen bei einer Frequenz von 40.5 GHz nach 48h leicht höher ist. Die Kontrollproben, die bei 10 mW/cm² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation exponiert wurden, zeigen hingegen sowohl bei den HaCaT-, als auch bei den HDF-Zellen keinen deutlichen Unterschied zwischen Exposition und Scheinexposition. Bei der Kontrolle, die mit UV-Strahlung behandelt wurde, ist das Ergebnis ähnlich.

Tabelle 4: Anzahl der differentiell methylierten Regionen im Vergleich zwischen Exposition und Scheinexposition. Zeile 2 zeigt die Expositionsbedingung, z.B. F27 T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temperatur = Exposition bei 10 mW/cm² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation. Down = Hypomethylierung, Up = Hypermethylierung.

	1 mW/cm ²				10 mW/cm ²				Kontrollen	
	F27 T2	F40,5 T2	F27 T48	F40,5 T48	F27 T2	F40,5 T2	F27 T48	F40,5 T48	Temperatur	UV
<i>HaCaT</i>										
<i>Up</i>	9	23	30	21	1	1	0	0	1	1
<i>Down</i>	6	26	15	13	3	1	0	0	0	1
<i>HDF</i>										
<i>Up</i>	1	1	30	27	0	2	0	7	0	0
<i>Down</i>	1	1	30	24	0	0	0	4	2	1

Zwischen den identifizierten DMP der exponierten Proben und den Kontrollen gab es drei Übereinstimmungen. Das Gen MYO5A war sowohl in den HaCaT 1 mW/cm² F27 T48 Proben unterexprimiert, als auch in den UV-bestrahlten Proben überexprimiert. Das Gen KCNG3 war sowohl in den HaCaT 1 mW/cm² F27 T48 Proben unterexprimiert, als auch in den HaCaT 10 mW/cm² F40,5 T48 Proben ohne Temperaturkompensation überexprimiert. Das Gen EED war sowohl in den HDF 10 mW/cm² F40,5 T48 Proben überexprimiert, als auch in den UV-bestrahlten Proben unterexprimiert.

Die Ergebnisse der Kombinatorischen Analyse der Methylierungsdaten ist in Abbildung 8 dargestellt. Jeweils blau markiert ist die Anzahl an DMG, die bei der Kombination gefunden wurde, die der tatsächlichen Zuordnung der Proben zu Exposition und Scheinexposition entspricht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der kombinatorischen Analyse der Genexpressionsdaten (vgl. Abbildung 5) heben sich hier die Kontrollproben ohne Temperaturkompensation (Temp) und die UV-bestrahlten Proben nicht so stark ab. Bei allen untersuchten Proben ist die blaue Markierung jeweils bei null oder im Bereich der zufällig gefundenen Anzahl an DMP durch die variable Probenkombination. Das ist vor allem auch der Fall bei denjenigen Expositionsbedingungen, bei denen eine leicht erhöhte Anzahl an DMP gefunden wurde (HaCaT 1 mW/cm² und HDF 1 mW/cm² nach 48h).

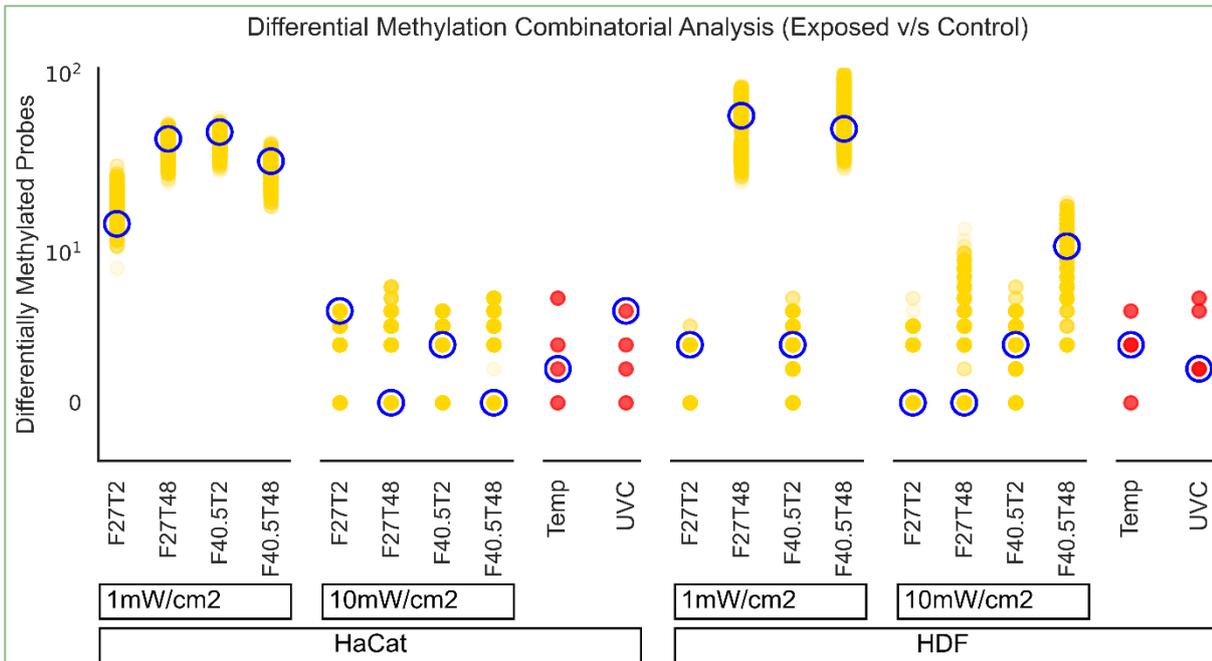


Abbildung 8: Ergebnisse der Kombinatorischen Analyse der DNA-Methylierungsdaten. Die Datenpunkte zeigen die Anzahl der differentiell methylierten Regionen (differentially methylated probes; DMP) nach Analyse aller möglichen Kombinationen der Proben. Jeweils blau markiert ist die Anzahl an DMP, die bei der Kombination gefunden wurde, die der tatsächlichen Zuordnung der Proben zu Exposition und Scheinexposition entspricht. x-Achse: Expositionsbedingung, z.B. F27T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temp = Exposition bei 10 mW/cm² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation; y-Achse: Anzahl DMP, logarithmisch skaliert.

Die z-Scores der gefundenen DMP liegen bei allen getesteten Versuchsbedingungen unter dem Schwellenwert von 2,0. Dies bestätigt, dass die tatsächliche Zuordnung von schein-exponierten und exponierten Proben kein stärkeres Signal aufweist als zufällig erwartet.

8.3 Netzwerkanalyse

Die Netzwerkkohärenz der DEG und DMP, also der z-Score der Konnektivität der gefundenen Gene innerhalb der vier verschiedenen genutzten Netzwerkmodelle lag für alle außer zwei Bedingungen bei einem z-Score von unter 2,0 und war damit in nur zwei Fällen signifikant (Tabelle 5A). Bei diesen beiden Fällen handelt es sich um die Daten zum Methylierungsstatus der HDF-Proben nach 48h Exposition mit 1 mW/cm² bei einer Frequenz von 27 GHz und 40,5 GHz. Ebenfalls signifikant ist die Netzwerkkohärenz bei den Daten der Genexpression für die Temperaturkontrollen der HaCaT-Proben (Tabelle 5B). Bei der UV-Kontrolle sind hingegen starke Signale für die Netzwerkkohärenz der DEG zu sehen. Da es bei den Daten zum Methylierungsstatus nach UV-Bestrahlung jeweils weniger als 5 Gene gab, die im Netzwerk kartiert werden konnten, konnte hier die Netzwerkkohärenz nicht berechnet werden.

Tabelle 5: Netzwerkkohärenz der differentiell exprimierten Gene (DEG) und differentiell methylierten Regionen (DMP) innerhalb der untersuchten Netzwerkmodelle gemessen als z-Score. A: z-Scores der Expositionsversuche. B: z-Scores der Kontrollen. Fehlende Kombinationen und leere Zellen: Konnektivität konnte nicht berechnet werden, weil weniger als 5 Gene auf dem Netzwerk kartiert werden konnten (mapping). Erste Zeile: Expositionsbedingung, z.B. F27T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temp = Exposition bei 10 mW/cm² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation.

A

				F27T2	F27T48	F40,5T2	F40,5T48
<i>HaCaT</i>	1 mW/cm ²	DEG	N/A				
		DMP	Biogrid	-0,25	-0,10	1,2	-0,73
			Recon3D		-0,79		
			String		-0,66	0,86	-0,25
<i>HDF</i>		DEG	N/A				
		DMP	Biogrid		2,50		1,40
			Recon3D		0,83		
			String		1,80		2,10
<i>HaCaT</i>		10 mW/cm ²	DEG	N/A			
	DMP		N/A				
<i>HDF</i>	DEG		Biogrid		-0,25		
	DMP		Biogrid				-0,38
			String				-016

B

			Temp	UV
<i>HaCaT</i>	DEG	Biogrid	2,10	1,30
		Recon2	-0,18	2,90
		Recon3D	0,29	1,10
		String	-0,09	5,40
	DMP	N/A		
<i>HDF</i>	DEG	Biogrid		3,60
		Recon2		1,10
		Recon3D		1,30
		String		4,20
	DMP	N/A		

Abbildung 9 zeigt die Projektionen der DMP auf die verwendeten biologischen Netzwerke mit signifikanter Netzwerkkohärenz. Es sind nur wenige Verbindungen zwischen den einzelnen Genregionen zu sehen.

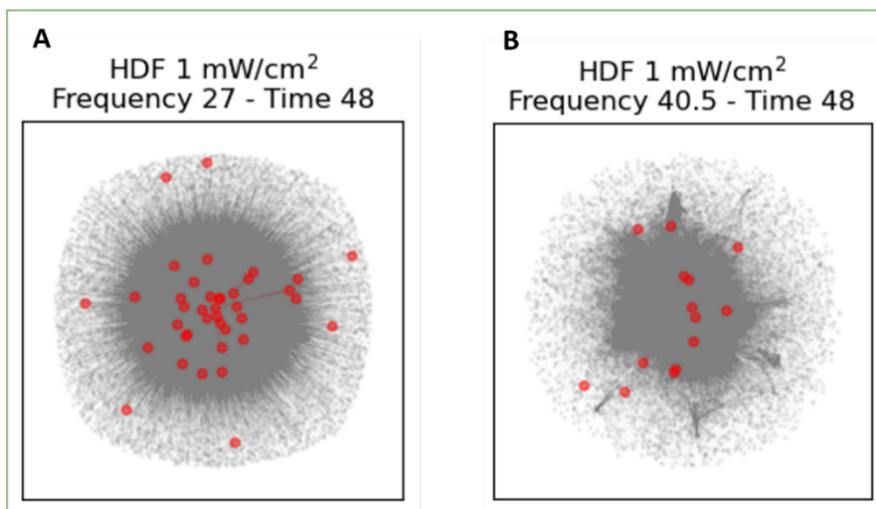


Abbildung 9: Projektion der differentiell methylierten Genregionen (DMP) auf die verwendeten biologischen Netzwerke mit signifikanter Netzwerkkohärenz. A: Biogrid-Netzwerk mit Projektion der DMP nach Exposition der HDF-Zellen mit 1 mW/cm² und 27 GHz für 48h (z-Score: 2,50). B: String-Netzwerk mit Projektion der DMP nach Exposition der HDF-Zellen mit 1 mW/cm² und 40,5 GHz für 48h (z-Score: 2,10).

Die DEG der Temperaturkontrolle der HaCaT-Zellen weisen eine ähnlich schwache Vernetzung auf (Abbildung 10A). Im Vergleich dazu kann man bei den Projektionen der DEG der Kontrollen nach UV-Bestrahlung auf die biologischen Netzwerke deutlich mehr Verbindungen zwischen den Genen erkennen, besonders beim String-Netzwerk (Abbildung 10B-E).

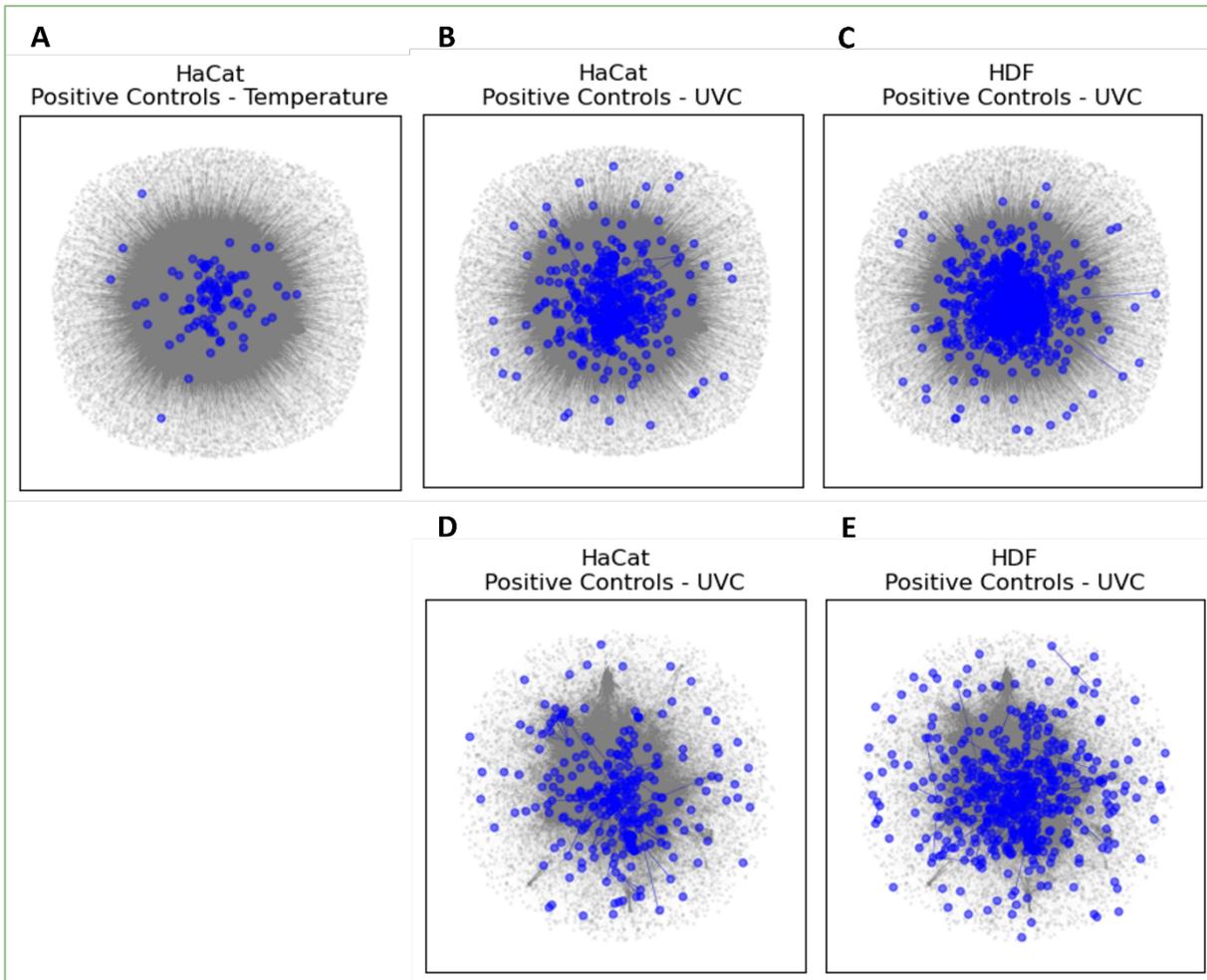


Abbildung 10: Projektion der differentiell exprimierten Gene (DEG) der Kontrollen auf die verwendeten biologischen Netzwerke (Auswahl). A: Biogrid-Netzwerk mit Projektion der DEG nach Exposition der HaCaT-Zellen mit 10 mW/cm^2 und $40,5 \text{ GHz}$ für 48h ohne Temperaturkompensation (z-Score: $2,10$). B, C: Biogrid-Netzwerk mit Projektion der DEG nach Exposition der Zellen mit UV-Strahlung (z-Score HaCaT: $1,30$; HDF: $3,60$). D, E: String-Netzwerk mit Projektion der DEG nach Exposition der Zellen mit UV-Strahlung (z-Score HaCaT: $5,40$; HDF: $4,20$).

Die Stärke des Signals der Netzwerkkohärenz im Vergleich zu anderen zufällig erzeugten Probenkombinationen (der z-Score der z-Scores) ist in Tabelle 6 aufgelistet. Keiner der errechneten z-Scores erreicht den Schwellenwert von $2,00$.

Tabelle 6: Signalstärke der Netzwerkkohärenz der differentiell exprimierten Gene (DEG) und differentiell methylierten Regionen (DMP) der Expositionsversuche innerhalb der untersuchten Netzwerkmodelle gemessen als z-Score. Fehlende Kombinationen und leere Zellen: z-Score konnte nicht berechnet werden, weil weniger als 5 Gene auf dem Netzwerk kartiert werden konnten (mapping). Erste Zeile: Expositionsbedingung, z.B. F27T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h.

				F27T2	F27T48	F40,5T2	F40,5T48	
<i>HaCaT</i>	1 mW/cm ²	DEG	N/A					
		DMP	Biogrid	-0,75	-0,47	0,46	-0,85	
			Recon3D		-1,10			
			String		-0,81	-0,63	-0,68	
<i>HDF</i>			DEG	N/A				
			DMP	Biogrid		1,30		-0,37
		Recon3D			0,69			
		String			0,48		1,20	
<i>HaCaT</i>		10 mW/cm ²	DEG	N/A				
	DMP		N/A					
<i>HDF</i>			DEG	Biogrid		0,09		
	DMP		Biogrid		-0,51			
			String		0,70			

9 Diskussion

Insgesamt zeigen die Daten wenige Hinweise darauf, dass die Genexpression und Methylierung von menschlichen Hautzellen durch die hier gewählten Expositionsbedingungen verändert wird und bestätigt damit ähnliche Daten aus der Literatur [49]. In den Heat Maps sind einige Ausreißer zu erkennen, die auf die hohe Sensitivität der hier durchgeführten Analysen schließen lässt.

9.1 Genexpression

Vor allem bei der Genexpression deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Exposition zu keiner Veränderung geführt hat. Die wenigen kodierenden Gene, die nach RNASeq-Analyse differentiell exprimiert waren, konnten zum größten Teil nicht durch die qRT-PCR Validierung bestätigt werden. Da die Expression von sieben der zehn Gene sehr gering war oder gar nicht mittels qRT-PCR gemessen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen DEG um stochastische Treffer der RNASeq-Analyse gehandelt hat. Einschränkend muss aber darauf hingewiesen werden, dass die qRT-PCR-Validierung der HDF mangels RNA-Menge nicht mit denselben Proben durchgeführt werden konnte wie die RNASeq-Analyse. Dennoch handelt es sich um eine exakte Wiederholung der Experimente, so dass ein valider Effekt auch in diesen Wiederholungsproben mit einer anderen Methode zu finden sein hätte müssen. Die Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten ähnlicher Studien zum Effekt von Millimeterwellen auf das Transkriptom von menschlichen Hautzellen überein. Habauzit und Mitarbeiter*innen [50] fanden bei einer Exposition von HaCaT-Zellen mit einer Frequenz von 60,4 GHz, einer Leistungsflussdichte von 20 mW/cm² für drei Stunden und Temperaturkompensation keine differentiell exprimierten Gene. Eine ähnliche Studie fand deutliche Effekte der Exposition auf die Genexpression von primären dermalen Fibroblasten bei 60 GHz und 2,6 mW/cm² stundenweise für mehrere Tage [51]. Daher wäre es interessant, dieses Versuchsdesign mit dem hier gezeigten Setup zu wiederholen.

Neben dem Gen MMP23B, dessen veränderte Expression nicht bestätigt werden konnte, gab es noch eine Überexpression des Gens SULT1A4 (ebenfalls nicht bestätigt) und eine Unterexpression von SULT1A3 im selben Probenet. Beide SULT1A-Gene stammen aus der gleichen Genfamilie der Sulfotransferase 1A. Diese Gene kodieren für Enzyme, die die Sulfat-Konjugation verschiedener Stoffe (u.a. Hormone und Neurotransmitter) katalysiert [52]. Die Aktivität dieser Enzyme ist thermolabil. Die Anzahl und Länge der Exons ist bei allen Mitgliedern dieser Genfamilie ähnlich, SULT1A3 und SULT1A4 sind zu über 99% homolog und kodieren für identische Proteine [53]. Somit kann eine Überexpression von SULT1A4 die Unterexpression von SULT1A3 ausgleichen und würde keine Auswirkungen auf den Mechanismus haben.

Die kombinatorische Analyse der Genexpressionsdaten ordnet die wenigen gefundenen DEG der RNASeq-Analyse ebenfalls in den Bereich der stochastischen Wahrscheinlichkeit ein. Hier wird im Vergleich zur Kontrolle nach UV-Bestrahlung noch einmal sehr deutlich, dass sich die gefundene Anzahl an DEG nicht aus der Menge an zufällig gefundenen DEG nach variabler Probenkombination heraushebt.

Die Anzahl der DEG nach UV-Bestrahlung ist bei den HaCaT-Proben insgesamt deutlich niedriger als bei den HDF-Proben. Angesichts der Lage der Keratinozyten oberhalb der Fibroblasten und der damit verbundenen Ausrichtung zum Sonnenlicht könnten diese Ergebnisse andeuten, dass die äußeren Keratinozyten resistenter gegenüber UV-Strahlung sind als die innenliegenden Fibroblasten. Eine andere Erklärung könnte sein, dass immortalisierte Zelllinien wie die HaCaT-Zellen generell resistenter gegenüber UV-Strahlung sind als primäre Zellkulturen [54]. Überraschenderweise ist es bei der Wärmeempfindlichkeit anscheinend andersherum: Die Anzahl der DEG nach Exposition bei 10 mW/cm² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation ist bei den HaCaT-Proben insgesamt höher als bei den HDF-Proben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Keratinozyten in der Lage sind, die Expression entsprechender Gene eher an veränderte Wärmebedingungen anzupassen als Fibroblasten, da die Temperatur der äußersten Schicht der Epidermis stärkeren Schwankungen ausgesetzt ist als weiter innen liegende Schichten. Das könnte dann folglich zu mehr DEG führen, da verschiedenste Signalwege auf die Erwärmung reagieren könnten. Die Erwärmung der Proben in diesem Projekt ist nicht mit dem biologischen System der Haut vergleichbar. Zum einen schützt eine Schicht abgestorbener Keratinozyten die darunterliegenden vitalen Keratinozyten. Zum anderen wird der Abtransport von Wärme nach außen durch Konvektion und nach innen durch den

Blutstrom reguliert. Des Weiteren könnte auch die veränderte Zusammensetzung des Mediums nach Exposition ein regulierender Faktor sein. Durch die Erwärmung kam es zum Verdampfen von ca. 500 μ l Wasser, so dass das in der Schale verbliebene Medium aufkonzentriert wurde, was zu einer gering veränderten Ionenkonzentration geführt hat. Neben der Erwärmung könnte auch dies ein Grund für die höhere Anzahl an DEG sein.

9.2 DNA-Methylierung

Die Anzahl an DMP ist bei den HDF-Zellen bei einer Exposition von 1 mW/cm² für 2h jeweils fast null, bei den gleichen Expositionsbedingungen für 48h allerdings leicht erhöht. Das könnte darauf hindeuten, dass dieser Zelltyp langsamer auf die Behandlung reagiert als die HaCaT-Zellen.

Die Ergebnisse der Analyse zur DNA-Methylierung sind allerdings insgesamt widersprüchlich. Angesichts der leicht erhöhten Anzahl an DMP bei einer Leistungsflussdichte von 1 mW/cm² wäre zu erwarten, dass die Anzahl an DMP bei einer Leistungsflussdichte von 10 mW/cm² noch höher oder wenigstens gleichhoch ist. Dies ist nicht der Fall, so dass hier kein Dosis-Wirkungs-Zusammenhang festgestellt werden kann. Da die Anzahl an signifikanten Nebeneffekten bei diesen Proben sehr hoch war, liegt außerdem der Verdacht vor, dass die Batch-Korrektur für die leicht erhöhte Anzahl an DMP in einigen Fällen verantwortlich ist. Eine Induktion von Unterschieden durch die Batch-Korrektur kann auftreten, wenn die Probenanzahl zu niedrig ist oder zu viele Nebeneffekte korrigiert werden [55]. Der Zusammenhang zwischen der Exposition mit elektromagnetischen Feldern und der DNA-Methylierung ist noch wenig erforscht. Im Bereich der hier untersuchten Frequenzen gibt es bis jetzt keine bekannten *in vitro* Studien. Kürzlich veröffentlicht wurden zwei unabhängige Studien zur Wirkung der Exposition bei 900 MHz auf die DNA-Methylierung von Keratinozyten [56] und zwei Krebs-Zelllinien [57]. In beiden Studien wurden deutliche Effekte gefunden, aber die Eindringtiefe der Wellen in die Zellen bzw. das Medium bei 900 MHz ist sehr viel höher (ca. 12 mm) als bei den hier untersuchten Frequenzen (ca. 0,3-0,5 mm).

Die kombinatorische Analyse der Methylierungsergebnisse liefert weitere Hinweise darauf, dass die Anzahl der gefundenen DMP sich nicht aus der Menge der zufällig gefundenen DMP nach variabler Probenkombination heraushebt. Einschränkend muss man hier allerdings sagen, dass sich die Anzahl der DMP der Kontrolle ebenfalls nicht abhebt. Die Gründe hierfür sind schwer zu benennen. Eine veränderte Methylierung in Promotorregionen kann zu einer veränderten Genexpression führen [58]. Aufgrund der vergleichsweise hohen Anzahl an DEG, die bei der RNASeq-Analyse gefunden wurden, lag daher die Erwartung nahe, dass es auch eine gewisse Anzahl an DMP geben müsste, wobei eine veränderte Genexpression auch durch andere Mechanismen, wie z.B. Histonveränderungen oder RNA-basierte Mechanismen auftreten kann [59]. Abgesehen davon zeigt die kombinatorische Analyse sehr deutlich, dass es sich bei der leicht erhöhten Anzahl an DMP jeweils um stochastische Treffer handeln könnte. Grund hierfür scheint eine erhöhte Variabilität innerhalb der jeweiligen Proben durch das Einwirken von Nebeneffekten zu sein. Damit stellt sich die Analyse der DNA-Methylierung in diesem Projekt als äußerst sensitive Methode dar, deren Ergebnisse sich sehr leicht durch äußere Faktoren beeinflussen lassen. Daher sollten Nebeneffekte in zukünftigen Studien standardmäßig überwacht und in die Analyse eingeschlossen werden. Eine weitere Empfehlung wäre, die Anzahl der Replikate zu erhöhen, um die hohe Variabilität der Proben ausgleichen zu können.

Die drei Gene, deren Methylierungsstatus übereinstimmend, wenn auch in gegensätzliche Richtungen, in verschiedenen Probensets im Vergleich zur Scheinexposition verändert war, stammen aus verschiedenen biologischen Netzwerken und haben unterschiedliche Funktionen. Das Gen MYO5A ist eins von drei Myosin V Genen, die für ein Actin-basiertes Motorprotein kodieren (RefSeq, 2023; [60]). Diese Proteine spielen beim zytoplasmatischen Vesikeltransport, bei der Ausrichtung zum Spindelpol und bei der Translokation von mRNA eine Rolle. Das Gen KCNG3 kodiert für ein Protein, das eine Untereinheit von spannungsabhängigen Kaliumkanälen ist (RefSeq, 2023; [60]). Die Funktion dieser Ionenkanäle reicht von der Freisetzung von Neurotransmittern bis zur Regulierung von Insulinsekretion. Das Gen EED kodiert für ein Protein, das als Transkriptionsfaktor wirkt, indem es Histone modifiziert (RefSeq, 2023; [60]). Insgesamt sprechen diese sehr unterschiedlichen Funktionen der übereinstimmenden Gene nicht dafür, dass durch

die Exposition bestimmte Signalwege differentiell reguliert wurden.

9.3 Netzwerkanalyse

Die Netzwerkanalyse diente der Frage, ob die gefundenen DEG und DMP innerhalb von biologischen Netzwerken über ihre Metaboliten oder über Interaktionen miteinander verbunden sind. Im Falle der DEG kann aufgrund der wenigen gefundenen Treffer bei den Expositionsversuchen nur eine Aussage über die Kontrollen getroffen werden. Die signifikant erhöhte Netzwerkkohärenz der HaCaT-Temperaturkontrolle und der Proben nach UV-Bestrahlung unterstreicht die oben beschriebenen Zusammenhänge und weist darauf hin, dass vor allem nach UV-Bestrahlung verschiedene Signalwege angeregt werden. Hierbei fällt auf, dass die HaCaT-Zellen sowohl im Stoffwechsel-, als auch im Proteininteraktionsnetzwerk signifikante Werte zeigen, die HDF-Zellen nur im Proteinnetzwerk. Das könnte daran liegen, dass beide Zelltypen unterschiedlich auf die UV-Bestrahlung reagieren. Dies wurde auch schon durch andere Studien gezeigt, in denen Fibroblasten nach UV-Bestrahlung das Enzym Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) synthetisieren, von dem man annimmt, dass es an Photoalterungsprozessen beteiligt ist [61]. Im Gegensatz dazu erhöhten Keratinozyten ihre MMP-1-Produktion nicht, sondern schütteten stattdessen andere Proteine aus (Interleukin-1 α und Interleukin-6), die indirekt die Produktion von MMP-1 in benachbarten Fibroblasten anregen.

Die DMP von zwei Expositionsbedingungen zeigten zwar eine signifikante Netzwerkkohärenz, diese ließ sich aber nicht von anderen zufällig erzeugten Probenkombinationen abheben. Das Signal für einen Zusammenhang der gefundenen DMP war demnach zu schwach. Dieser Befund ergänzt ebenfalls die oben beschriebenen Ergebnisse und erhärtet den Verdacht, dass es sich bei den gefundenen DMP um Artefakte der Batch-Korrektur handelt. Das lässt darauf schließen, dass auch der Methylierungsstatus der Zellen durch die Exposition nicht umfassend verändert wurde.

10 Fazit

Insgesamt deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass elektromagnetische 5G-Felder die Genexpressionsmuster oder Methylierungsprofile von menschlichen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten in keiner erkennbaren Weise verändern. Unsere Ergebnisse liefern somit keine Hinweise und schon gar keine Beweise für expositionsbedingte Schäden an menschlichen Hautzellen.

11 Literatur

- [1] PAKHOMOV AG, AKYEL Y, PAKHOMOVA ON, STUCK BE, MURPHY MR: Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature. *Bioelectromagnetics* 1998, 19(7):393-413.
- [2] VIJAYALAXMI, PRIHODA TJ: Genetic damage in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation: a meta-analysis of data from 63 publications (1990-2005). *Radiation Research* 2008, 169(5):561-574.
- [3] ZISKIN MC: Millimeter waves: acoustic and electromagnetic. *Bioelectromagnetics* 2013, 34(1):3-14.
- [4] SHCKORBATOV YG, PASIUGA VN, GONCHARUK EI, PETRENKO TP, GRABINA VA, KOLCHIGIN NN, IVANCHENKO DD, BYKOV VN, DUMIN OM: Effects of differently polarized microwave radiation on the microscopic structure of the nuclei in human fibroblasts. *Journal of Zhejiang University Science B* 2010, 11(10):801-805.
- [5] LE POGAM P, LE PAGE Y, HABAUZIT D, DOUE M, ZHADOBOV M, SAULEAU R, LE DREAN Y, RONDEAU D: Untargeted metabolomics unveils alterations of biomembranes permeability in human HaCaT keratinocytes upon 60 GHz millimeter-wave exposure. *Scientific Reports* 2019, 9(1):9343-9346.
- [6] Franchini V, Regalbuto E, De Amicis A, De Sanctis S, Di Cristofaro S, Coluzzi E, Marinaccio J, Sgura A,

- Ceccuzzi S, Doria A *et al*: Genotoxic Effects in Human Fibroblasts Exposed to Microwave Radiation. *Health Physics* 2018, 115(1):126-139.
- [7] KORENSTEIN-ILAN A, BARBUL A, HASIN P, ELIRAN A, GOVER A, KORENSTEIN R: Terahertz radiation increases genomic instability in human lymphocytes. *Radiation Research* 2008, 170(2):224-234.
- [8] PEREZ-CASTEJON C, PEREZ-BRUZON RN, LLORENTE M, PES N, LACASA C, FIGOLS T, LAHOZ M, MAESTU C, VERA-GIL A, DEL MORAL A *et al*: Exposure to ELF-pulse modulated X band microwaves increases in vitro human astrocytoma cell proliferation. *Histology and Histopathology* 2009, 24(12):1551-1561.
- [9] KARACA E, DURMAZ B, AKTUG H, YILDIZ T, GUDUCU C, IRGI M, KOKSAL MGC, OZKINAY F, GUNDUZ C, COGULU O: The genotoxic effect of radiofrequency waves on mouse brain. *Journal of Neuro-Oncology* 2012, 106(1):53-58.
- [10] SCHMID G, HIRTL R: Entwicklung und dosimetrische Charakterisierung einer Expositionsanlage für die Befeldung von Zellen in vitro im Frequenzbereich 26,0 - 40,5 GHz. BfS Abschlussbericht
- [11] SCHMID G, HIRTL R, GRONAU I, MEYER V, DREES K, LERCHL A: Design and Dosimetric Characterization of a Broadband Exposure Facility for In Vitro Experiments in the Frequency Range 18-40.5 GHz. *Bioelectromagnetics* 2022, 43(1):25-39.
- [12] BOUKAMP P, PETRUSSEVSKA RT, BREITKREUTZ D, HORNING J, MARKHAM A, FUSENIG NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* 1988, 106(3):761-771.
- [13] DEYRIEUX AF, ROSAS-ACOSTA G, OZBUN MA, WILSON VG: Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation. *Journal of Cell Science* 2007, 120(Pt 1):125-136.
- [14] EVANS C, HARDIN J, STOEBEL DM: Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Briefings in Bioinformatics* 2018, 19(5):776-792.
- [15] ANDERS S, HUBER W: Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 2010, 11(10):R106.
- [16] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S: Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 2014, 15(12):550.
- [17] RISSO D, SCHWARTZ K, SHERLOCK G, DUDOIT S: GC-content normalization for RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 2011, 12:480.
- [18] AKEY JM, BISWAS S, LEEK JT, STOREY JD: On the design and analysis of gene expression studies in human populations. *Nature Genetics* 2007, 39(7):807-808; author reply 808-809.
- [19] BAGGERLY KA, EDMONSON SR, MORRIS JS, COOMBES KR: High-resolution serum proteomic patterns for ovarian cancer detection. *Endocrine Related Cancer* 2004, 11(4):583-584; author reply 585-587.
- [20] NYGAARD V, RØDLAND EA, HOVIG E: Methods that remove batch effects while retaining group differences may lead to exaggerated confidence in downstream analyses. *Biostatistics* 2016, 17(1):29-39.
- [21] ALLEN D, WINTERS E, KENNA PF, HUMPHRIES P, FARRAR GJ: Reference gene selection for real-time rtPCR in human epidermal keratinocytes. *Journal of Dermatological Science* 2008, 49(3):217-225.
- [22] BRUGE F, VENDITTI E, TIANO L, LITTARRU GP, DAMIANI E: Reference gene validation for qPCR on normoxia- and hypoxia-cultured human dermal fibroblasts exposed to UVA: is beta-actin a reliable normalizer for photoaging studies? *Journal of Biotechnology* 2011, 156(3):153-162.
- [23] PFAFFL MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic*

- Acids Research* 2001, 29(9):e45.
- [24]MORRIS TJ, BUTCHER LM, FEBER A, TESCHENDORFF AE, CHAKRAVARTHY AR, WOJDACZ TK, BECK S: ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinformatics* 2014, 30(3):428-430.
- [25]ARYEE MJ, JAFFE AE, CORRADA-BRAVO H, LADD-ACOSTA C, FEINBERG AP, HANSEN KD, IRIZARRY RA: Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* 2014, 30(10):1363-1369.
- [26]FORTIN JP, TRICHE TJ, JR., HANSEN KD: Preprocessing, normalization and integration of the Illumina HumanMethylationEPIC array with minfi. *Bioinformatics* 2017, 33(4):558-560.
- [27]ZHOU W, LAIRD PW, SHEN H: Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes. *Nucleic Acids Research* 2017, 45(4):e22.
- [28]TOULEIMAT N, TOST J: Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics* 2012, 4(3):325-341.
- [29]TESCHENDORFF AE, MARABITA F, LECHNER M, BARTLETT T, TEGNER J, GOMEZ-CABRERO D, BECK S: A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics* 2013, 29(2):189-196.
- [30]WU MC, KUAN PF: A Guide to Illumina BeadChip Data Analysis. *Methods in Molecular Biology* 2018, 1708:303-330.
- [31]JOHNSON WE, LI C, RABINOVIC A: Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007, 8(1):118-127.
- [32]LEEK JT, JOHNSON WE, PARKER HS, JAFFE AE, STOREY JD: The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 2012, 28(6):882-883.
- [33]ZINDLER T, FRIELING H, NEYAZI A, BLEICH S, FRIEDEL E: Simulating ComBat: how batch correction can lead to the systematic introduction of false positive results in DNA methylation microarray studies. *BMC Bioinformatics* 2020, 21(1):271.
- [34]SMYTH GK: Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 2004, 3:Article3.
- [35]WETTENHALL JM, SMYTH GK: limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics* 2004, 20(18):3705-3706.
- [36]BENJAMINI Y, HOCHBERG Y: Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 1995, 57(1):289-300.
- [37]THIELE I, SWAINSTON N, FLEMING RM, HOPPE A, SAHOO S, AURICH MK, HARALDSDOTTIR H, MO ML, ROLFSSON O, STOBBE MD *et al*: A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nature Biotechnology* 2013, 31(5):419-425.
- [38]BRUNK E, SAHOO S, ZIELINSKI DC, ALTUNKAYA A, DRÄGER A, MIH N, GATTO F, NILSSON A, PRECIAT GONZALEZ GA, AURICH MK *et al*: Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism. *Nature Biotechnology* 2018, 36(3):272-281.
- [39]SZKLARCZYK D, GABLE AL, NASTOU KC, LYON D, KIRSCH R, PYYSALO S, DONCHEVA NT, LEGEAY M, FANG T, BORK P *et al*: The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research* 2021, 49(D1):D605-d612.

- [40] OUGHTRED R, RUST J, CHANG C, BREITKREUTZ BJ, STARK C, WILLEMS A, BOUCHER L, LEUNG G, KOLAS N, ZHANG F *et al*: The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Science* 2021, 30(1):187-200.
- [41] KNECHT C, FRETTER C, ROSENSTIEL P, KRAWCZAK M, HÜTT MT: Distinct metabolic network states manifest in the gene expression profiles of pediatric inflammatory bowel disease patients and controls. *Scientific Reports* 2016, 6:32584.
- [42] PALSSON B: Systems biology: properties of reconstructed networks: New York: Cambridge University press; 2006.
- [43] SONNENSCHN N, GEERTZ M, MUSKHELISHVILI G, HÜTT MT: Analog regulation of metabolic demand. *BMC Systems Biology* 2011, 5:40.
- [44] Sonnenschein N, Golib Dzib JF, Lesne A, Eilebrecht S, Boulkroun S, Zennaro MC, Benecke A, Hütt MT: A network perspective on metabolic inconsistency. *BMC Systems Biology* 2012, 6:41.
- [45] KHARCHENKO P, CHURCH GM, VITKUP D: Expression dynamics of a cellular metabolic network. *Molecular Systems Biology* 2005, 1:2005.0016.
- [46] MA H, ZENG AP: Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms. *Bioinformatics* 2003, 19(2):270-277.
- [47] MA HW, ZENG AP: The connectivity structure, giant strong component and centrality of metabolic networks. *Bioinformatics* 2003, 19(11):1423-1430.
- [48] Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barnes I, Bennett R *et al*: Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research* 2022, 50(D1):D988-d995.
- [49] SIMKÓ M, MATTSSON MO: 5G Wireless Communication and Health Effects-A Pragmatic Review Based on Available Studies Regarding 6 to 100 GHz. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2019, 16(18).
- [50] HABAUZIT D, LE QUEMENT C, ZHADOBOV M, MARTIN C, AUBRY M, SAULEAU R, LE DREAN Y: Transcriptome analysis reveals the contribution of thermal and the specific effects in cellular response to millimeter wave exposure. *PLoS one* 2014, 9(10):e109435.
- [51] LAWLER NB, EVANS CW, ROMANENKO S, CHAUDHARI N, FEAR M, WOOD F, SMITH NM, WALLACE VP, SWAMINATHAN IYER K: Millimeter waves alter DNA secondary structures and modulate the transcriptome in human fibroblasts. *Biomedical Optics Express* 2022, 13(5):3131-3144.
- [52] RICHES Z, STANLEY EL, BLOOMER JC, COUGHTRIE MW: Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "pie". *Drug Metabolism & Disposition* 2009, 37(11):2255-2261.
- [53] BUTCHER NJ, HORNE MK, MELLICK GD, FOWLER CJ, MASTERS CL, MINCHIN RF: Sulfotransferase 1A3/4 copy number variation is associated with neurodegenerative disease. *Pharmacogenomics Journal* 2018, 18(2):209-214.
- [54] SERINI S, DONATO V, PICCIONI E, TROMBINO S, MONEGO G, TOESCA A, INNOCENTI I, MISSORI M, DE SPIRITO M, CELLENO L *et al*: Docosahexaenoic acid reverts resistance to UV-induced apoptosis in human keratinocytes: involvement of COX-2 and HuR. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2011, 22(9):874-885.
- [55] ZHOU WA-O, KOUDIJS KKM, BÖHRINGER S: Influence of batch effect correction methods on drug induced differential gene expression profiles. *BMC Bioinformatics*. 2019 22, 20(1):437.
- [56] CANTU JC, BUTTERWORTH JW, PERALTA XG, PAYNE JA, ECHCHGADDA I: Analysis of global DNA methylation changes in human keratinocytes immediately following exposure to a 900 MHz

- radiofrequency field. *Bioelectromagnetics* 2023, 44(3-4):77-89.
- [57]RAVAIOLI F, BACALINI MG, GIULIANI C, PELLEGRINI C, D'SILVA C, DE FANTI S, PIRAZZINI C, GIORGI G, DEL RE B: Evaluation of DNA Methylation Profiles of LINE-1, Alu and Ribosomal DNA Repeats in Human Cell Lines Exposed to Radiofrequency Radiation. *International Journal of Molecular Science* 2023, 24(11):9380.
- [58]EHRlich M, LACEY M: DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics* 2013, 5(5):553-568.
- [59]ZHANG L, LU Q, CHANG C: Epigenetics in Health and Disease. *Advances in Experimental and Medical Biology* 2020, 1253:3-55.
- [60]O'LEARY NA, WRIGHT MW, BRISTER JR, CIUFO S, HADDAD D, MCVEIGH R, RAJPUT B, ROBBERTSE B, SMITH-WHITE B, AKO-ADJEI D *et al*: Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research* 2016, 44(D1):D733-745.
- [61]WANG XY, BI ZG: UVB-irradiated human keratinocytes and interleukin-1alpha indirectly increase MAP kinase/AP-1 activation and MMP-1 production in UVA-irradiated dermal fibroblasts. *Chinese Medical Journal (Engl)* 2006, 119(10):827-831.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Heat Maps der RNASeq-Daten nach Exposition oder Scheinexposition.....	18
Abbildung 2: Heat Maps der RNASeq-Daten nach Exposition bei 10 mW/cm ² , 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation oder Scheinexposition.....	19
Abbildung 3: Heat Maps der RNASeq-Daten nach UV-Bestrahlung oder Scheinexposition.....	19
Abbildung 4: Relative Genexpression der Gene MMP23B, SULT1A3 und SULT1A4 nach qRT-PCR-Messung. Werte zeigen die Genexpression als prozentualer Anteil des Mittelwerts von X. X = exponiert; Y = scheinexponiert.	22
Abbildung 5: Ergebnisse der Kombinatorischen Analyse der Genexpressionsdaten der RNASeq. Die Datenpunkte zeigen die Anzahl der differentiell exprimierten Gene (DEG) nach Analyse aller möglichen Kombinationen der Proben. Jeweils blau markiert ist die Anzahl an DEG, die bei der Kombination gefunden wurde, die der tatsächlichen Zuordnung der Proben zu Exposition und Scheinexposition entspricht. x-Achse: Expositionsbedingung, z.B. F27T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temp = Exposition bei 10 mW/cm ² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation; y-Achse: Anzahl DEG, logarithmisch skaliert.....	22
Abbildung 6: Heat Maps der Methylierungsdaten nach Exposition oder Scheinexposition.....	23
Abbildung 7: Heat Maps der Methylierungsdaten nach Exposition oder Scheinexposition. Dargestellt sind die Werte der 500 Regionen (Probes), die die höchste Varianz zwischen den Proben zeigen.....	24
Abbildung 8: Ergebnisse der Kombinatorischen Analyse der DNA-Methylierungsdaten. Die Datenpunkte zeigen die Anzahl der differentiell methylierten Regionen (differential methylated probes; DMP) nach Analyse aller möglichen Kombinationen der Proben. Jeweils blau markiert ist die Anzahl an DMP, die bei der Kombination gefunden wurde, die der tatsächlichen Zuordnung der Proben zu Exposition und Scheinexposition entspricht. x-Achse: Expositionsbedingung, z.B. F27T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temp = Exposition bei 10 mW/cm ² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation; y-Achse: Anzahl DMP, logarithmisch skaliert.....	26
Abbildung 9: Projektion der differentiell methylierten Genregionen (DMP) auf die verwendeten biologischen Netzwerke mit signifikanter Netzwerkkohärenz. A: Biogrid-Netzwerk mit Projektion der DMP nach Exposition der HDF-Zellen mit 1 mW/cm ² und 27 GHz für 48h (z-Score: 2,50). B: String-Netzwerk mit Projektion der DMP nach Exposition der HDF-Zellen mit 1 mW/cm ² und 40,5 GHz für 48h (z-Score: 2,10).....	28
Abbildung 10: Projektion der differentiell exprimierten Gene (DEG) der Kontrollen auf die verwendeten biologischen Netzwerke (Auswahl). A: Biogrid-Netzwerk mit Projektion der DEG nach Exposition der HaCaT-Zellen mit 10 mW/cm ² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation (z-Score: 2,10). B, C: Biogrid-Netzwerk mit Projektion der DEG nach Exposition der Zellen mit UV-Strahlung (z-Score HaCaT: 1,30; HDF: 3,60). D, E: String-Netzwerk mit Projektion der DEG nach Exposition der Zellen mit UV-Strahlung (z-Score HaCaT: 5,40; HDF: 4,20).	29

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten QuantiNova LNA PCR Assays (Qiagen, Hilden, Deutschland) und GeneGlobe ID für die zehn Zielgene und drei Referenzgene (unterstrichen).	15
Tabelle 2: Anzahl der differentiell exprimierten Gene im Vergleich zwischen Exposition und Scheinexposition. Zeile 2 zeigt die Expositionsbedingung, z.B. F27 T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temperatur = Exposition bei 10 mW/cm ² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation. Down = Hyporegulation, Up = Hyperregulation.	20
Tabelle 3: Namen der differentiell exprimierten Gene im Vergleich zwischen Exposition und Scheinexposition. A: HaCaT Zellen; B: HDF Zellen. Zeile 2 zeigt jeweils die Expositionsbedingung, z.B. F27 T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Down = Hyporegulation, Up = Hyperregulation; kodierende Gene, die mittels qRT-PCR validiert wurden, sind fett gedruckt.	21
Tabelle 4: Anzahl der differentiell methylierten Regionen im Vergleich zwischen Exposition und Scheinexposition. Zeile 2 zeigt die Expositionsbedingung, z.B. F27 T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temperatur = Exposition bei 10 mW/cm ² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation. Down = Hypomethylierung, Up = Hypermethylierung.	25
Tabelle 5: Netzwerkkohärenz der differentiell exprimierten Gene (DEG) und differentiell methylierten Regionen (DMP) innerhalb der untersuchten Netzwerkmodelle gemessen als z-Score. A: z-Scores der Expositionsversuche. B: z-Scores der Kontrollen. Fehlende Kombinationen und leere Zellen: Konnektivität konnte nicht berechnet werden, weil weniger als 5 Gene auf dem Netzwerk kartiert werden konnten (mapping). Erste Zeile: Expositionsbedingung, z.B. F27T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h; Temp = Exposition bei 10 mW/cm ² und 40,5 GHz für 48h ohne Temperaturkompensation.	27
Tabelle 6: Signalstärke der Netzwerkkohärenz der differentiell exprimierten Gene (DEG) und differentiell methylierten Regionen (DMP) der Expositionsversuche innerhalb der untersuchten Netzwerkmodelle gemessen als z-Score. Fehlende Kombinationen und leere Zellen: z-Score konnte nicht berechnet werden, weil weniger als 5 Gene auf dem Netzwerk kartiert werden konnten (mapping). Erste Zeile: Expositionsbedingung, z.B. F27T2 = Frequenz 27 GHz, Zeit 2h.	30