

Spotlight on EMF Research

Spotlight on “Transcriptional landscape of human keratinocyte models exposed to 60-GHz millimeter-waves” von Martin et al. in Toxicology in Vitro (2024)

Kategorie [Hochfrequente Felder, In-vitro-Studie]

Spotlight - Sep/2024 no.1 (Deu)

Kompetenzzentrum Elektromagnetische Felder (KEMF)

1 Einordnung des Artikels in den Kontext durch das BfS

Millimeterwellen (mmW), also elektromagnetische Felder (EMF) mit Frequenzen zwischen 30 und 300 GHz und Wellenlängen im mm-Bereich (daher der Name), sollen als Informationsträger in kommenden 5G/6G-Netzen höhere Datenraten bei reduzierter Latenz ermöglichen. MmW weisen Eindringtiefen in menschliche Gewebe unter 1 mm auf und werden daher in den oberflächlichen Hautschichten absorbiert, wo ihre Energie in Wärme umgewandelt wird [2]. Bisherige Studien konnten keine wesentlichen nicht-thermischen biologischen Effekte von mmW nachweisen [3]. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich wurden empfohlen [4].

2 Resultate und Schlussfolgerungen aus der Perspektive der Autorenschaft

In vorhergehenden Arbeiten haben die Autoren der vorliegenden Studie menschliche Keratinozyten – Zellen der oberflächlichsten Hautschicht – mmW ausgesetzt. Mittels Microarray-Analysen untersuchten sie die Genexpression von exponierten und Kontroll-Zellkulturproben. Es zeigten sich keine reproduzierbaren Veränderungen in den in der Zelle vorliegenden („exprimierten“ im Folgenden) RNA-Molekülen. Die festgestellten Abweichungen konnten auf Wärmeeffekte zurückgeführt werden [5, 6].

Biologische Heterogenität zwischen Individuen kann die Reproduzierbarkeit zuvor erzielter Ergebnisse beeinträchtigen. Um dies in der aktuellen Studie zu berücksichtigen, verwendeten die Autoren drei verschiedene Keratinozytenproben [1]. Zwei davon – HEK und NHEK – waren primäre, d.h. frisch isolierte und nur kurzzeitig kultivierte Keratinozyten aus Pools von jeweils drei menschlichen Spendern, die von zwei verschiedenen Anbietern bezogen wurden. Die dritte war die immortalisierte humane HaCaT-Zelllinie, die bereits an langfristige Zellkulturbedingungen angepasst war. Um den Einfluss von mmW auf die Genexpressionsprofile der drei Zelltypen zu untersuchen, setzten Martin et al. die Zellen drei Stunden lang

entweder einer Scheinexposition oder reaktiven Nahfeld-EMF bei 60,4 GHz [7] und 20 mW/cm² einfallender Leistungsdichte (incident power density, IPD) aus. Sie maßen den Temperaturanstieg des Zellkultur-Mediums aufgrund der mmW-Exposition und schlossen entsprechende Hitzeschock-Kontrollen ein, indem sie die Temperatur des Zellkultur-Inkubators auf das gleiche Niveau anpassten. Darüber hinaus setzten sie HaCaT-Zellen 14 Stunden lang Scheinexposition, Hitze oder mmW bei einer IPD von 10 mW/cm² aus. Es wurde ebenfalls ein Dosis-Wirkungs-Experiment durchgeführt, bei dem HaCaT-Zellen für drei Stunden mmW mit IPD von 5, 10 oder 20 mW/cm² ausgesetzt wurden. Die durch diese IPD-Werte erzeugte Wärme wurde durch geeignete Hitzeschock-Kontrollen berücksichtigt. Diese IPD-Werte wurden gewählt, weil sie die früheren und jüngsten Expositionsgrenzwerte umfassen, die von der International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) empfohlen wurden. Die mRNA-Zusammensetzung des gewonnenen Zellmaterials wurde mittels Bulk RNA barcoding sequencing (BRB-seq) [8] analysiert. Das weit verbreitete linear models for microarray data (LIMMA) R-Paket wurde verwendet, um statistisch signifikante Gene zu identifizieren.

Im ersten Teil der Analyse überprüften die Autoren die Sensitivität der BRB-seq-Methode zur Erkennung biologischer Unterschiede zwischen Proben. Sie verglichen dafür die drei unterschiedlichen scheinexponierten Keratinozytenproben miteinander. Die beiden Primärkulturen ähnelten einander mehr als der HaCaT-Zelllinie, wie aus der Anzahl der statistisch signifikanten Gene aus den Vergleichen hervorging. Die zwischen primären und HaCaT-Zellen differentiell exprimierten Gene waren mit den Vorgängen der Hautdifferenzierung und Zellteilung assoziiert. Dies bestätigte die Erwartung, dass immortalisierte, an Zellkulturbedingungen angepasste Zelllinien sich biologisch von primärem Zellmaterial unterscheiden, das dem Ursprungsgewebe ähnlicher ist.

Anschließend wurden für jeden einzelnen Zelltyp die Genexpressionsprofile nach drei Stunden Schein-, Hitze- oder mmW-Exposition bei 20 mW/cm² miteinander verglichen. Differentiell exprimierte Gene wurden nur in HaCaT (14 Gene) und HEK-Kulturen (vier Gene) mit einer Überlappung in zwei Genen gefunden. Die gleichen Gene, die nach mmW-Exposition verändert vorlagen, änderten sich auch durch die Hitzeexposition. Sie wurden funktionell dem biologischen Pfad „Protein processing in endoplasmic reticulum“ zugeordnet, der Gene umfasst, die die wichtigen Hitzeschock-Proteine HSP70 und HSP27 kodieren. Beim Vergleich der mmW-Exposition mit der Hitzekontrolle war nur das Gen für HSP70 statistisch signifikant differentiell exprimiert und nur in HEK-Zellen. Dieses Ergebnis konnte mit der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (QPCR) nicht bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte sich mit der QPCR-Methode, dass HSP70 nach der Behandlung in den beiden anderen Keratinozytenkulturen überexprimiert war, aber ebenfalls ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen mmW- und hitzeexponierten Proben. Die Überexpression von HSP27 nach Hitzeexposition von HaCaT-Zellen wurde durch die QPCR bestätigt.

Je höher das Expositionsniveau im Dosis-Wirkungs-Experiment war, desto mehr differentiell exprimierte Gene wurden in den Genexpressionsprofilen von HaCaT-Zellen gefunden. Die veränderten Gene waren mit der Reaktion auf Hitze und mit Proteinfaltung assoziiert. Im Vergleich zu den entsprechenden Hitzeschock-Kontrollen gab es zwei, sieben bzw. zwei differentiell exprimierte Gene bei IPD-Werten von 5, 10 bzw. 20 mW/cm². Die meisten dieser Gene veränderten sich auch als Reaktion auf Hitze im Vergleich zur Scheinexposition. Nach 14-stündiger mmW- oder Hitzeexposition wurden keine differentiell exprimierten Gene gefunden.

Die Autoren schlussfolgern, dass die Effekte von Millimeterwellen auf die Genexpression der Zellen der obersten Hautschicht auf Wärmeeffekte zurückzuführen sind. Die geringfügigen Unterschiede sind wahrscheinlich durch die unterschiedliche Art und Weise bedingt, wie Wärme von Millimeterwellen oder der Luft eines warmen Zellkultur-Inkubators übertragen wird.

3 Kommentare des BfS

Die vorliegende Studie untersuchte die Auswirkungen kurzfristiger Nahfeld-Expositionen gegenüber Millimeterwellen (zukünftig z.B. bei 5G/6G genutzt) auf Zellen der obersten Hautschicht. Dabei wurde das Expositionsszenario eines am Körper getragenen Geräts, das mmW aussendet, simuliert. Alle beobachteten Veränderungen in der Genexpression waren mit thermischen Effekten der mmW vereinbar, was dem aktuellen mechanistischen Verständnis entspricht und bei der Grenzwertfestlegung berücksichtigt ist. Es wurden keine Hinweise auf nicht-thermische Effekte gefunden.

Die Studie war sorgfältig kontrolliert und erlaubt eine gewisse Verallgemeinerung der Ergebnisse, da verschiedene und unabhängige Quellen von Keratinozyten sowie unterschiedliche Expositionsniveaus und -dauern verwendet wurden. Die Unterschiede zwischen den primären Keratinozytenkulturen und der etablierten Zelllinie sowie die beobachtete Dosis-Wirkungs-Beziehung sind plausible Ergebnisse, die auf die technische Validität des Ansatzes hinweisen. Der Befund, dass differentiell exprimierte Gene nach Hitzeeinwirkung oder mmW-Exposition mit dem biologischen Pfad „Protein processing in endoplasmic reticulum“ assoziiert waren, ist zu erwarten, da eine solche Reaktion auf Hitze der Zelle hilft, mit Proteinen umzugehen, die sich aufgrund von Überhitzung fehlfalten.

Für jede Bedingung und jeden Zelltyp wurden vier Replikate mittels BRB-seq analysiert, was einen üblichen Kompromiss zwischen Kosten, Durchführbarkeit und statistischer Aussagekraft in vergleichbaren Genexpressionsstudien darstellt. Um ein Gen als differentiell exprimiert zwischen Schein-, mmW- oder Hitzeexposition zu klassifizieren, wurde in der aktuellen Studie eine Standardregel verwendet: Ein Gen gilt als differentiell exprimiert, wenn sich sein Niveau um mindestens das 1,5-fache ändert. Um jedoch noch kleinere Veränderungen in der Genexpression zu erkennen, wird empfohlen, mindestens sechs und bis zu zwölf biologische Replikate einzubeziehen [9].

Zwei differentiell exprimierte Gene wurden in der QPCR-Validierung berücksichtigt und die Ergebnisse aus der BRB-seq wurden nur teilweise bestätigt. Es bleibt unklar, ob die anderen differentiell exprimierten Gene bestätigt worden wären, wenn eine QPCR an allen durchgeführt worden wäre.

Es gibt keine Angaben darüber, ob die Forscher während der Experimente verblindet waren. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass Beobachterverzerrungen die vorliegenden Ergebnisse beeinflusst haben, da keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression gefunden wurden. Darüber hinaus sind hochauflösende Genomanalysen weniger anfällig für Verzerrungen durch den Experimentator, da zwischen der Gewinnung des biologischen Materials durch Biologen oder Mediziner und dem Erhalt der aufbereiteten Sequenziererergebnisse eine längere Zeitspanne liegt. Die Ergebnisse werden durch reproduzierbare computergestützte Methoden erzielt, die in der Regel von einem Bioinformatiker durchgeführt werden.

In dieser Studie wurde zur Beschreibung der Expositionshöhe die einfallende Leistungsdichte (incident power density, IPD) verwendet. Die von der International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) in den 2020-Richtlinien empfohlenen „Referenzwerte“ für die IPD eignen sich jedoch nicht für die Bewertung lokaler reaktiver Nahfeldexpositionen bei Frequenzen über 6 GHz. Für solche Expositionen, wie sie in dieser Studie verwendet wurden, empfiehlt die ICNIRP die Einhaltung von „Basisgrenzwerten“, um eine übermäßige Erwärmung oder thermische Effekte im menschlichen Gewebe zu vermeiden [2]. Speziell für Frequenzen über 6 GHz sollte der Grenzwert für die berufliche Exposition auf der lokal absorbierten Leistungsdichte (APD) basieren, die abhängig von der gemittelten Fläche 10 oder 20 mW/cm² nicht überschreiten sollte [2]. Für eine genaue Abschätzung der APD sind in der Regel numerische Feldsimulationen erforderlich. Dennoch behalten die Studienergebnisse ihre Aussagekraft, wie abschließend dargelegt.



Eine Exposition gegenüber mmW mit einer IPD von 5 mW/cm^2 führte zu einer Erwärmung des Zellkultur-Mediums um ca. $1,2 \text{ }^\circ\text{C}$. Eine Exposition mit einer IPD von 20 mW/cm^2 erwärmte das Medium um $4,3 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $5,7 \text{ }^\circ\text{C}$. Gemäß den ICNIRP-Richtlinien, die spezifische Schwellenwerte festlegen, um gesundheitsschädliche Wirkungen durch Erwärmung zu vermeiden und die Erhöhung der Hauttemperatur auf weniger als $5 \text{ }^\circ\text{C}$ bei lokaler Exposition zu begrenzen, liegen diese Werte nahe am operationellen Schwellenwert für gesundheitsschädliche Wirkungen. Bei diesen Werten wurden keine Effekte auf die Genexpression beobachtet, die nicht auch in den entsprechenden "Hitzeschock"-Kontrollproben beobachtet wurden. Dies ist ein für den Strahlenschutz relevantes und methodisch robustes Ergebnis. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Exposition gegenüber mmW zu geringfügigen Veränderungen in der Genexpression führen könnte, die in dieser Studie aufgrund unzureichender statistischer Power nicht nachgewiesen werden konnten.

Referenzen

- [1] Martin C, Evrard B, Percevault F, et al. Transcriptional landscape of human keratinocyte models exposed to 60-GHz millimeter-waves. *Toxicol In Vitro* 2024;97:105808 doi: 10.1016/j.tiv.2024.105808 [published Online First: 20240312].
- [2] International Commission on Non-Ionizing Radiation P. Guidelines for Limiting Exposure to Electromagnetic Fields (100 kHz to 300 GHz). *Health Phys* 2020;118(5):483-524 doi: 10.1097/HP.0000000000001210.
- [3] Habauzit D, Nogue G, Bourbon F, et al. Evaluation of the Effect of Chronic 94 GHz Exposure on Gene Expression in the Skin of Hairless Rats In Vivo. *Radiat Res* 2020;193(4):351-58 doi: 10.1667/RR15470.1 [published Online First: 20200303].
- [4] Final Opinion on the need of a revision of the annexes in the Council Recommendation 1999/519/EC and Directive 2013/35/EU, in view of the latest scientific evidence available with regard to radiofrequency (100kHz - 300GHz), adopted by written procedure on 18 April 2023. In: Scientific Committee on Health E, Emerging R, eds., 2023:1-56.
- [5] Habauzit D, Le Quement C, Zhadobov M, et al. Transcriptome analysis reveals the contribution of thermal and the specific effects in cellular response to millimeter wave exposure. *PLoS One* 2014;9(10):e109435 doi: 10.1371/journal.pone.0109435 [published Online First: 20141010].
- [6] Martin C, Percevault F, Ryder K, et al. Effects of Radiofrequency Radiation on Gene Expression: A Study of Gene Expressions of Human Keratinocytes From Different Origins. *Bioelectromagnetics* 2020;41(7):552-57 doi: 10.1002/bem.22287 [published Online First: 20200819].
- [7] Zhadobov M, Sauleau R, Augustine R, Le Quement C, Le Drean Y, Thouroude D. Near-field dosimetry for in vitro exposure of human cells at 60 GHz. *Bioelectromagnetics* 2012;33(1):55-64 doi: 10.1002/bem.20685 [published Online First: 20110628].
- [8] Alpern D, Gardeux V, Russeil J, et al. BRB-seq: ultra-affordable high-throughput transcriptomics enabled by bulk RNA barcoding and sequencing. *Genome Biol* 2019;20(1):71 doi: 10.1186/s13059-019-1671-x [published Online First: 20190419].
- [9] Schurch NJ, Schofield P, Gierlinski M, et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *RNA* 2016;22(6):839-51 doi: 10.1261/rna.053959.115 [published Online First: 20160328].



Impressum

Bundesamt für Strahlenschutz
Postfach 10 01 49
38201 Salzgitter

Tel.: +49 30 18333-0

Fax: +49 30 18333-1885

E-Mail: spotlight@bfs.de

De-Mail: epost@bfs.de-mail.de

www.bfs.de

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
[urn:nbn:de:0221-2024091946445](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0221-2024091946445)

Spotlight - Sep/2024 no.1 (Deu)