

**BIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR  
WIRKUNG VON NIEDERFREQUENTEN  
ELEKTROMAGNETISCHEN FELDERN AUF DIE  
MODULATION UND FUNKTION VON  
CONNEXONEN**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von  
Melanie Steffens  
geboren am 01. April 1971 in Celle

2008

Referent / Prüfer der Disputation: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Albert Kolb  
Korreferent / Prüfer der Disputation: PD Dr. rer. nat. Carsten Zeilinger  
Prüfer der Disputation: Prof. Dr. rer. nat. Rolf Michel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2008

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von niederfrequenten elektromagnetischen Feldern (ELF-EMF) und Temperaturänderungen auf die Funktion von Connexonen zu untersuchen. Zusätzlich wurde überprüft, welche Wirkung niederfrequente elektromagnetische Felder mit verschiedenen Frequenzen auf die DNA von Granulosa-Zellen (GC-FSHR-17) haben.

1. An hCx26, das in Froschoozyten exprimiert wurde, konnte mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two Electrode Voltage Clamp, TEVC) gezeigt werden, dass Temperaturänderungen sich unterschiedlich auf das Aktivierungsverhalten von hCx26 und rCx46 auswirken. hCx26 wird temperaturabhängig ab  $\sim 20^{\circ}\text{C}$  aktiviert und zeigt einen makroskopisch deutlich sichtbaren Auswärtsstrom.
2. Die spannungsabhängigen rCx46 Halbkanäle sind schon bei einer niedrigen Temperatur ( $7,1^{\circ}\text{C}$ ) aktiviert und zeigen eine leichte Steigerung der Stromamplitude bei Erwärmung.
3. Zur Untersuchung der Wirkung eines ELF-EM Feldes auf die Funktionalität eines Halbkanals wurde das Protein rCx46 in *Xenopus laevis* Oozyten unter drei verschiedenen ELF-EMF Expositionen exprimiert und mit der TEVC analysiert. Es konnte kein signifikanter Effekt auf die Aktivierung, die Leitfähigkeit und die Membran-Permeabilität der *Xenopus* Oozyten beobachtet werden.
4. Die Analyse der Wirkung von ELF-EMF auf die DNA von Granulosa-Zellen wurde mit einer Einzel-Zell-Gel-Elektrophorese Technik (Comet Assay) durchgeführt. Nach der ELF-EMF Applikation mit verschiedenen Expositionsparametern wurden die Zellen auf DNA-Schäden untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine zeitabhängige Veränderung von DNA-Schäden nach der ELF-EMF Exposition ( $16\frac{2}{3}$  Hz, 1 mT) mit einem Maximum bei einer Expositionsdauer von 18 Stunden. Nach einer Exposition verschiedener ELF-EMF (5 min an / 10 min aus; 18 h; 1 mT; 8,  $16\frac{2}{3}$ , 30, 50, 300 oder 500 Hz) wurden mit der alkalischen Comet Assay Methode vermehrt DNA-Schäden bei Granulosa-Zellen bei  $16\frac{2}{3}$  und 50 Hz beobachtet. Mit der Technik des neutralen Comet Assays konnten nach diesen ELF-EMF Expositionen keine signifikanten DNA-Schäden von Granulosa-Zellen festgestellt werden. Dies

deutet darauf hin, dass es sich bei den DNA-Schäden um DNA-Einzelstrangbrüche (DSB) und Crosslinks handeln könnte, die von den Zellen erkannt und repariert werden können.

5. Die Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura 2-AM an Fibroblasten und Granulosa-Zellen zeigten keine signifikanten Änderungen nach verschiedenen langen ELF-EMF Expositionen (5 min an / 10 min aus; 50 Hz; 1 mT; 4 - 17 h). Nach einer ELF-EMF Exposition und einer zusätzlichen Applikation eines Stressfaktors ( $H_2O_2$  oder KCl) konnte bei den Fibroblasten und den Granulosa-Zellen keine Veränderung der intrazellulären Kommunikation festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten DNA-Schäden nicht im Zusammenhang mit einer lang anhaltenden  $[Ca^{2+}]_i$  Änderung stehen.

Schlagwörter:

Elektrophysiologie, Connexin (Cx26, Cx46), Temperatur, ELF-EMF, Comet Assay

## Abstract

The aim of this work was to analyze the effects of extreme low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) and extracellular temperature changes on the functionality of membrane channels. Furthermore the ELF-EMFs exposure with different frequencies of DNA granulosa cells (GC-FSHR-17) should be determined. For granulosa cells and fibroblasts a potential relationship of ELF-EMF exposure and the intracellular concentration of free calcium  $[Ca^{2+}]_i$ , which could be regulated by membrane channels, should be analyzed.

1. In order to investigate the influence of ELF-EMF and extracellular temperature changes on membrane channels, *Xenopus laevis* oocytes were injected with connexin cRNA and the connexin hemichannels function was measured with the two electrode voltage clamp technique (TEVC). Connexin 26 (human, hCx26) and Connexin 46 (rat, hCx46), two hemichannel proteins, were used to analyze the effect of extracellular temperature changes during voltage clamp measurements. The results show that temperature acts as a regulator of the voltage dependent conductivity of hemichannels composed of hCx26.
2. Hemichannels composed of rCx46 already show an activation at low temperature (7,1°C), and also show a slight increase in current amplitude while temperature increased.
3. After Application of ELF-EMF for three different ELF-EMF exposures, hemichannels composed of rCx46 were analyzed with the TEVC. The voltage dependent conductivity of rCx46-connexons was not significantly affected and no effect on membrane permeability of *Xenopus* oocytes could be detected.
4. The effect of ELF-EMF on DNA level of granulosa cells was analyzed with single cell gel electrophoresis (Comet Assay). After exposure of ELF-EMFs with different exposure parameters the DNA damage of granulosa cells was analyzed with the Comet Assay technique. The results shows a time dependent increase of DNA strand breaks with a maximum at about 18 hours of exposure as observed by the alkaine Comet Assay after an ELF-EMF exposure (16 2/3 Hz, 1 mT). After different ELF-EMF exposures (5 min on / 10 min off; 18 h; 1 mT; 8, 16 2/3, 30, 50, 300 or 500 Hz), increased DNA damage of granulosa cells was observed at 16 2/3 and 50 Hz with alkaine Comet Assay protocol. With neutral Comet Assay protocol no

significant effects were detected. This data indicate that the DNA damage could be DNA single strand breaks and crosslinks, which could be detected and repaired by cells.

5. The intracellular concentration of free calcium  $[Ca^{2+}]_i$  of Granulosa cells and fibroblasts were measured by use of fluoroc coloring fura 2-AM. The data showed no significant effect after different lengths of ELF-EMF exposure (5 min on / 10 min off; 50 Hz; 1 mT; 4 - 17 h). ELF-EMF exposure and additional application of stress factors, such as  $H_2O_2$  or KCl, also caused no significant change of  $[Ca^{2+}]_i$ . This shows that the observed DNA damage does not correlate to a long persisting  $[Ca^{2+}]_i$  change.

Keywords:

Electrophysiology, Connexin (Cx26, Cx46), Temperature, ELF-EMF, Comet Assay

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Elektromagnetische Felder . . . . .	3
1.2	Wirkung von elektromagnetischen Feldern . . . . .	7
1.3	Gap Junctions . . . . .	10
1.4	Aufbau und Funktion von Gap Junction- und Halbkanälen . . . . .	10
1.5	Zielsetzung . . . . .	15
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	16
2.1.1	<i>In vitro</i> Transkription . . . . .	16
2.1.2	Einzel - Zell - Gel - Elektrophorese - Comet Assay . . . . .	17
2.1.2.1	Versuchsdurchführung des Comet Assays . . . . .	17
2.1.2.2	Auswertung der Comet Assay Versuche . . . . .	20
2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	22
2.2.1	Zellen und Zell-Präparation . . . . .	22
2.2.2	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten . . . . .	23
2.2.2.1	Oozytenentnahme . . . . .	24
2.2.2.2	Oozytenpräparation . . . . .	25
2.2.2.3	cRNA-Injektion . . . . .	25
2.3	Biophysikalische Methoden . . . . .	27
2.3.1	Intrazelluläre Kalziumkonzentrationsbestimmung . . . . .	27
2.3.2	Zwei - Elektroden Voltage - Clamp Analysen (TEVC) . . . . .	28
2.3.2.1	Messplatzaufbau . . . . .	30
2.3.2.2	Elektroden und Messpipetten . . . . .	30
2.3.2.3	Messprotokoll und Datenerfassung von Versuchen nach elektromagnetischen Exposition . . . . .	31

2.3.2.4	Messprotokoll und Datenerfassung von Versuchen bei thermischer Applikation . . . . .	32
2.3.2.5	Auswertung der elektrophysiologischen Versuche . . . . .	34
2.3.3	Aufbau zur Bestimmung der elektromagnetischen Feldeinwirkung . . .	39
2.3.4	Statistik . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Elektrophysiologische Untersuchungen von Connexinen unter Temperatur- und EMF-Einfluss . . . . .	42
3.1.1	Einfluss der Temperatur auf Connexin 26 (Homo sapiens) - hCx26 - Halbkanäle . . . . .	42
3.1.2	Einfluss der Temperatur auf Connexin 46 (Rattus norvegicus) - rCx46 - Halbkanäle . . . . .	52
3.1.3	Einfluss von ELF-EMF während der Translation auf Connexin 46 (Rattus norvegicus) - rCx46 - Halbkanäle . . . . .	57
3.2	Einfluss elektromagnetischer Felder auf die DNA-Migration im Comet Assay	77
3.2.1	Untersuchungen zu DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Alkalischer Comet Assay, pH > 13) . . . . .	77
3.2.2	Untersuchungen zu DNA Doppelstrangbrüchen (Neutraler Comet Assay, pH 8,5) . . . . .	82
3.3	Einfluss von ELF-EMF auf $[Ca^{2+}]_i$ . . . . .	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1	Elektrophysiologische Untersuchungen von Connexinen . . . . .	90
4.1.1	Elektrophysiologische Untersuchungen von Connexinen unter Temperatur-Einfluss . . . . .	91
4.1.2	Elektrophysiologische Untersuchungen von Connexinen unter EMF-Einfluss . . . . .	95
4.2	Einfluss elektromagnetischer Felder auf die DNA-Migration im Comet Assay	97
4.3	Einfluss von ELF-EMF auf $[Ca^{2+}]_i$ . . . . .	102
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>106</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>

<b>Anhang</b>	<b>I</b>
A Chemikalien . . . . .	I
B Geräte und Materialien . . . . .	III
C Lösungen, Medien und Puffer . . . . .	V
D Sequenzalignmentvergleich von hCx26 und rCx46 . . . . .	XII
E Auswertungsprotokoll zu einer ELF-EMF Exposition von der IT'IS - Founda- tion, Zürich . . . . .	XIV
F Definition der Parameter des Bildanalyseprogramms <i>CometScore<sup>TM</sup></i> . . . . .	XVIII
G Physikalische Einheiten und Konstanten . . . . .	XX
Abkürzungsverzeichnis . . . . .	XXII
Abbildungsverzeichnis . . . . .	XXIX



# 1 Einleitung

Täglich ist der Mensch den Umwelteinflüssen ausgesetzt, aber auch er hat durch die schnelle Weiterentwicklung seiner technischen Möglichkeiten einen erheblichen Einfluss auf die ihn umgebende Umwelt. Ein Beispiel für eine Veränderung durch den Menschen ist die stetig fortschreitende Möglichkeit zur Nutzung der Elektrizität.

Mitte des 19. Jahrhunderts begann die technische Nutzung des elektrischen Stroms. Mit der raschen Entwicklung der industriellen und privaten Nutzung der Elektrizität, die den heutigen Alltag und Lebensstandard der Bevölkerung bestimmt, nahmen die künstlich erzeugten elektromagnetischen Felder (EMF) in der Umwelt zu.

Zellbiologische Untersuchungen weisen daraufhin, dass elektromagnetische Felder bestimmter Frequenzen, Amplituden und Signalformen, wie sie in unserer Umwelt auftreten, mit biologischen Systemen interagieren. Zum Beispiel wurde der positive Einfluß von elektromagnetischen Feldern auf das Knochenwachstum festgestellt (Bassett et al., 1964, Lohmann et al., 2003) und so wird in der Medizin die Exposition des Menschen mit elektromagnetischen Feldern bei der Stimulation des Knochenwachstums genutzt. Neben den Wechselwirkungen von niederfrequenten elektromagnetischen Feldern (ELF-EMF) mit Enzymen, die für das Zellwachstum verantwortlich sind, wurden auch Effekte auf die Ca-Homöostase (Conti et al., 1985, Lindström et al., 1993) und den Melatoningehalt (Clark et al., 2007, Davis et al., 2006, Löscher et al., 1994) festgestellt. Auch wenn andere Forschergruppen keine signifikante Änderung des Melatoningehaltes messen konnten (Gobba F, 2006, Heikkinen et al., 1999), so wird von einigen Arbeitsgruppen ein Effekt von elektromagnetischen Feldern niedriger Frequenz und geringer Feldstärke sowie dessen Rolle als Copromotor bei der Tumorbildung diskutiert. Da in zellfreien Systemen ebenfalls Effekte von ELF-EMF nachgewiesen worden sind (Ramundo-Orlando et al., 2000, 2005), könnte vermutet werden, dass die Wirkung von elektromagnetischen Feldern über einen Einfluß auf die Protein-Protein und Protein-Lipid-Wechselwirkung verläuft.

Es gibt verschiedene technische Normen und Richtlinien, die Grenzwerte von elektromagnetischen Feldern festlegen, da durch die Einwirkung sehr starker elektromagnetischer Felder gesundheitliche Beeinträchtigungen ausgelöst werden können. Hinsichtlich einer eventuellen gesundheitlichen Beeinflussung durch schwache elektromagnetische Felder, zu denen es in den letzten Jahren unterschiedliche Studien gab, sind mögliche Wirkungs-

mechanismen noch nicht bekannt und die publizierten Ergebnisse sind widersprüchlich und kontrovers.

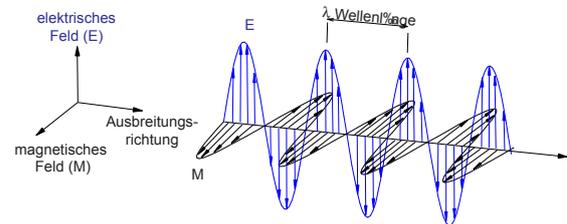
Im Rahmen dieser Arbeit soll ein möglicherweise eintretender Effekt von elektromagnetischen Feldern (EM-Felder) auf zellulärer Ebene untersucht werden.

Ein wesentliches Element des kontrollierten Zellwachstums und der Zelldifferenzierung ist die interzelluläre Kommunikation über die Zell-Zellkanäle zwischen benachbarten Zellen (Loewenstein, 1979). Zell-Zellkanäle bilden die Elemente spezialisierter Membrankontakte zwischen benachbarten Zellen. Die Bausteine der Zell-Zellkanäle bezeichnet man als Connexine (Cx), die zell- und organspezifisch im Organismus verteilt sind. Im allgemeinen liegen in räumlich begrenzten Bezirken Aggregate bis zu mehreren Tausend Zell-Zellkanäle vor und werden aufgrund ihrer Struktur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Gap Junctions bezeichnet. Gap Junctions sind nahezu in allen Metazoen nachgewiesen worden.

In einer Reihe von Studien konnte ein Tumorwachstum mit einer Änderung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions korreliert werden (Budunova, 1994, Mesnil, 2002). Auch Funktionsfehler dieser Kanäle können Krankheiten wie Hauterkrankungen, angeborene Herzfehler oder Hörfehler hervorrufen (ein Überblick ist bei Laird (2006) zu finden). Somit könnte eine eventuelle Beeinflussung der intrazellulären Kommunikation durch elektromagnetische Felder einen Hinweis auf die Charakterisierung der Auswirkungen von Magnetfeldern auf den menschlichen Organismus geben.

## 1.1 Elektromagnetische Felder

Elektromagnetische Strahlung kommt in der natürlichen Umgebung des Menschen vor. Sie entsteht durch die Schwingung elektrischer Ladungen und bezeichnet den Transport von Energie durch den Raum. Dieses elektromagnetische Wechselfeld breitet sich mit zur Ausbreitungsrichtung senkrechten Schwingungen im Vakuum wellenförmig mit Lichtgeschwindigkeit aus (Abb. 1.1.1). Die elektromagnetische Strahlung



**Abbildung 1.1.1:** Eine elektromagnetischen Welle umfasst eine sinusförmige elektrische Welle (E) und eine im rechten Winkel dazu sinusförmige magnetische Welle (M). Diese Transversalwellen (Schwingungsrichtung des elektromagnetisches Feldes senkrecht zur Ausbreitungsrichtung) pflanzen sich im Vakuum unabhängig von der Frequenz mit Lichtgeschwindigkeit fort.

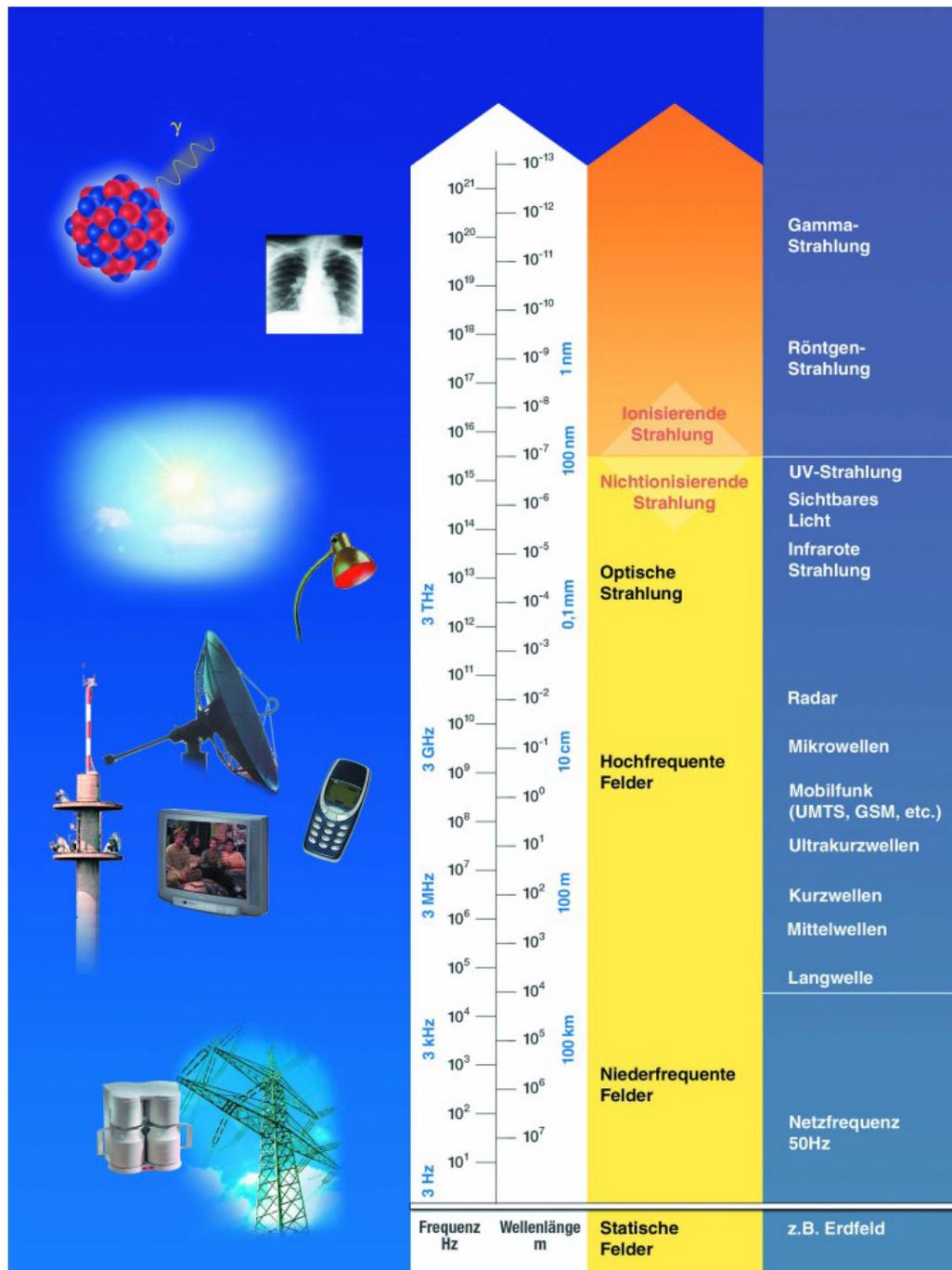
kann in Abhängigkeit zur Frequenz (Schwingungen pro Sekunde) in unterschiedlichen Erscheinungsformen beobachtet werden. Einige Beispiele für die Wellenstrahlung sind das sichtbare Licht, die Infrarotstrahlung, UV-Strahlung, Laserstrahlung, Mobilfunkstrahlung, Radiowellen, Röntgenstrahlung, Gamma-Strahlung und Mikrowellen.

Anfang des 16. Jahrhunderts entdeckten der Italiener Gian Domenico Romagnosi und der Däne Hans Christian Ørsted einen Zusammenhang zwischen Elektrizität und Magnetismus, das Phänomen des Elektromagnetismus. 1831 führten die Experimente des Naturwissenschaftlers Michael Faraday zur Entdeckung der elektromagnetischen Induktion. Die damit verbundene Entwicklung des ersten Dynamos bildete die Grundlage der modernen elektromagnetischen Technologie. In den 60er Jahren des 19. Jahrhunderts entwickelte James Clerk Maxwell die vier nach ihm benannten Maxwell'schen Gleichungen. Diese beschreiben die Entstehung von elektrischen und magnetischen Feldern durch Ladungen und Ströme sowie die Wechselwirkung untereinander bei zeitabhängigen Feldern. Durch die Verknüpfung von magnetischen und elektrischen Ereignissen lassen sich die elektrische Feldstärke (E), die magnetische Flussdichte (B) und die magnetische Feldstärke (H) zur Beschreibung eines elektromagnetischen Feldes bestimmen. Sie besagen, dass ein sich zeitlich änderndes Magnetfeld ein elektrisches Feld induziert und umgekehrt. Wenige Jahre später konnte Heinrich Rudolf Hertz experimentell Maxwells elektromagnetische Theorie des Lichtes beweisen. Ihm gelang es künstlich, Radiowellen zu erzeugen und zu übertragen. Seine Ergebnisse bildeten die Grundlage der drahtlosen Telegraphie und der heutigen Rundfunktechnik.

In Abbildung 1.1.2 ist eine Aufteilung des elektromagnetischen Spektrums dargestellt. In

diesem Spektrum wird die elektromagnetische Strahlung (Wellen) nach der Wellenlänge ( $\lambda$ ) bzw. nach der Frequenz ( $f$ ) sortiert. Die Einteilung der unterschiedlichen Wellentypen in dem kontinuierlichen Spektrum beruht auf den sich mit der Frequenz und damit auch ihrer Energie stetig ändernden Eigenschaften der Strahlung. In der Physik wird zwischen ionisierender und nichtionisierender Strahlung unterschieden. Bei der ionisierenden Strahlung handelt es sich um Strahlungsteilchen, die einen Ionisationsprozess auslösen können. Dies bedeutet, dass das Strahlungsteilchen die Energie besitzt, um Bindungen in Atomen und Molekülen aufzubrechen (diese zu ionisieren). Dafür ist eine Mindestenergie der ionisierenden Strahlung erforderlich, die oberhalb der stoffspezifischen Ionisationsenergie von 5 Elektronenvolt (eV) liegt. Mit  $E = h * f$  der Formel der Energie für Lichtquanten (Photonen), wobei  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum und  $f$  die Frequenz ist, entspricht dies einer Wellenlänge  $< 200$  nm, die wiederum der Gamma- und Röntgenstrahlung sowie kurzwelliger Ultraviolettstrahlung zugeordnet wird. Die nichtionisierende Strahlung (NIR) lässt sich in die folgenden Bereiche unterteilen:

- optische Strahlung (Wellenlängenbereich: 1 mm - 100 nm):
  - ultraviolette-Strahlung (UV) (Wellenlänge  $> 100$  nm)
  - sichtbares Licht (VIS)
  - Infrarotstrahlung (IR)
- hochfrequente elektromagnetische Felder (Frequenzbereich: 100 kHz - 300 GHz):
  - Radiowellen
  - Mobilfunkwellen
- niederfrequente elektromagnetische Felder (Frequenzbereich:  $< 100$  kHz)
- statische elektrische und magnetische Felder (0 kHz)



**Abbildung 1.1.2:** Elektromagnetisches Spektrum mit einigen für die jeweiligen Frequenzbereiche / Wellenlängen typischen Quellen. (Quelle: Bundesamt für Strahlenschutz, Deutschland; www.bfs.de)

Die Energie der nichtionisierenden Strahlung reicht nicht aus, um andere Atome oder Moleküle zu ionisieren. Der Energiegehalt dieser elektromagnetischen Wellen liegt unter den typischen Bindungsenergien, die zwischen 3 und 7 eV liegen.

Die elektromagnetischen Felder im hoch- und niederfrequenten Bereich werden in weitere Teilbereiche nach Frequenz, Wellenlänge oder Nutzung eingeteilt und sind in der

folgenden Tabelle mit den dazugehörigen Bezeichnungen dargestellt.

englische Bezeichnung		deutsche Bezeichnung		Frequenzbereich
ELF	extremely low frequency	NF	niedrig Frequenz	0,3 - 30 Hz
SLF	super low frequency	NF	niedrig Frequenz	30 - 300 Hz
ULF	ultra low frequency	NF	niedrig Frequenz	0,3 - 3 kHz
VLF	very low frequency	SLW	Längstwellen	3 - 30 kHz
LF	low frequency	LW	Langwellen	30 - 300 kHz
MF	medium frequency	MW	Mittelwellen	0,3 - 3 MHz
HF	high frequency	KW	Kurzwellen	3 - 30 MHz
VHF	very high frequency	UKW	Ultrakurzwellen	30 - 300 MHz
UHF	ultrahigh frequency	$\mu$ W	Mikrowellen	0,3 - 3 GHz
SHF	superhigh frequency		Zentimeterwellen	3 - 30 GHz
EHF	extremely high frequency		Millimeterwellen	30 - 300 GHz

**Tabelle 1.1.1:** Frequenzbandbezeichnungen

In dieser Aufteilung (International Telecommunications Union (ITU) radio regulations) wird der Begriff ELF (extremely low frequency) nur für eine Frequenzbandbreite von 0,3 - 30 Hz verwendet, in der Literatur sind jedoch unterschiedliche Frequenzeinteilungen für ELF Felder zu finden. Nach Leitgeb (1990) werden alle elektromagnetischen Felder zwischen 0,3 und 3 kHz als extremely low frequency bezeichnet. Die öffentliche Netzfrequenz in Europa (50 Hz) und die Netzfrequenz der Bahn (16 2/3 Hz) fallen in diesen niederfrequenten Bereich.

## 1.2 Wirkung von elektromagnetischen Feldern

Die Wirkung von ionisierender elektromagnetischer Strahlung auf biologische Systeme ist bedingt durch ihre hohe Energie. So können Elektronen aus Atomen oder Molekülen abgespalten werden und zu vielen unterschiedlichen Schäden führen, z. B. krebsauslösende Wirkungen in biologischen Systemen (UNSCEAR-Report, 2000). Im Frequenzbereich der nichtionisierenden Strahlung hängen die biologischen Wirkungsweisen und Schäden ebenfalls von der Frequenz und der Intensität der elektromagnetischen Exposition ab. Aufgrund ihrer niedrigen Quantenenergien vermögen sie keine Ionisationseffekte auszulösen. So liegt zum Beispiel die Energie der öffentlichen Netzfrequenz in Europa (50 Hz) mit 0,207 peV weit unter ( $10^{13}$  Potenzen) der erforderlichen Ionisierungsenergie ( $> 5$  eV). Folglich wirken andere Mechanismen auf biologische Systeme und für die Grenzwertsetzung werden von hoch- und niederfrequenten elektromagnetischen Feldern folgende Größen herangezogen: die elektrische Feldstärke (E), die magnetische Feldstärke (H) und die magnetische Flussdichte (B). In Abbildung 1.2.1 sind die Grenzwerte von Hoch- und Niederfrequenzanlagen in Deutschland (26.BImSchV, 1996) dargestellt.

Die Grenzwerte bei hochfrequenten elektromagnetischen Feldern, die in unserer Umwelt hauptsächlich in der Form von Radar, Mikro- und Radiowellen sowie beim Mobilfunk vorkommen, beruhen darauf, dass oberhalb dieser Grenzwerte eine Gewebeerwärmung verursacht wird. Dieser thermische Effekt entsteht durch die Absorption der elektromagnetischen Felder vom Gewebe. Die in Schwingung versetzten Moleküle erzeugen durch Reibung Wärme, die zu einer Temperaturerhöhung des Systems führen kann. Die Eindringtiefe und die Erwärmung des biologischen Systems hängt dabei von der Intensität und der Frequenz der elektromagnetischen Felder sowie von den Eigenschaften und der Struktur des betroffenen biologischen Gewebes ab.

Bei niederfrequenten Feldern können das elektrische und das magnetische Feld voneinander getrennt betrachtet werden.

Hochfrequenzanlagen		
Frequenz (f) in Megahertz (MHz)	Effektivwert der Feldstärke, quadratisch gemittelt über 6-Minuten-Intervalle	
	elektrische Feldstärke in Volt pro Meter (V/m)	magnetische Feldstärke in Ampere pro Meter (A/m)
10 - 400	27,5	0,073
400 - 2 000	$1,375 \sqrt{f}$	$0,0037 \sqrt{f}$
2 000 - 300 000	61	0,16
Niederfrequenzanlagen		
Frequenz (f) in Hertz (Hz)	Effektivwert der elektrischen Feldstärke, und magnetischen Flußdichte	
	elektrische Feldstärke in Kilovolt pro Meter (kV/m)	magnetische Flußdichte in Mikrottesla ( $\mu$ T)
50-Hz-Felder	5	100
162/3-Hz-Felder	10	300

**Abbildung 1.2.1:** Die Grenzwerte für Hoch- und Niederfrequenzanlagen in Deutschland (26.BImSchV, 1996)

Elektrische Felder lösen hauptsächlich Oberflächeneffekte aus, da ihre Eindringtiefe in das Gewebe sehr gering ist. Durch freibewegliche Ladungsträger in biologischen Geweben, auf die ein elektrisches Feld einwirkt, kommt es zu einer Ladungstrennung und es fließen Ströme so lange, bis sich die Geweboberfläche einheitlich aufgeladen hat und kein elektrisches Feld im Gewebeinneren mehr auftritt. Durch die Einwirkung von Wechselfeldern kann sich diese Influenz mit der Frequenz des Feldes wiederholen. Beim Menschen sind diese Ladungsumverteilungen ab einem bestimmten Schwellenwert durch die Aufladung der Körperbehaarung zu registrieren. Eine weitere Auswirkung eines elektrischen Feldes ist der Ausgleich der entstandenen Ladungsunterschiede durch Funkenentladungen.

Beim magnetischen Wechselfeld werden durch die magnetische Induktion Ströme im Inneren des biologischen Systems erzeugt, die beim Menschen ab einem bestimmten Schwellenwert zu einer Erregung von Sinnes-, Nerven- und Muskelzellen führen kann. Im oberen Frequenzbereich der niederfrequenten EM-Felder können wie bei den hochfrequenten EM-Feldern ebenfalls thermische Effekte auftreten.

In der Literatur werden den elektromagnetischen Feldern weitere nichtthermische Effekte über deren biologische Wirkungsweise kontrovers diskutiert wird zugeordnet. Eine der ersten Untersuchungen zur möglichen Beeinflussung durch elektromagnetische Felder von Hochspannungsleitungen wurde von Wertheimer und Leeper im Jahre 1979 (Wertheimer und Leeper, 1979) vorgestellt. In dieser epidemiologischen Studie, die zu vielen weiteren Folgestudien führte (Wertheimer und Leeper, 1982, Savitz et al., 1988, Tomenius, 1986, Greenland et al., 2000), wurde ein erhöhtes Leukämierisiko von Kindern, die in der Nähe zu Freileitungen wohnten, postuliert. Jedoch konnte kein biologischer Wirkungsmechanismus nachgewiesen werden, der die Entstehung von Leukämie durch niederfrequente elektromagnetische Felder erklären könnte. In Tierversuchen wurde versucht eine mögliche Beteiligung von elektromagnetischen Feldern bei der Entstehung von Krebs zu untersuchen (Galloni und Marino, 2000, Mandeville et al., 2000, Negishi et al., 2008, Otaka et al., 2002). Bei den Versuchen von Galloni und Marino (2000), Mandeville et al. (2000) und Negishi et al. (2008) wurde Mäusen bzw. Ratten ein krebserregender Stoff oder Krebszellen injiziert und anschließend niederfrequenten elektromagnetischen Feldern ausgesetzt. Es ließ sich in den Versuchen kein Zusammenhang zwischen der Krebsentstehung und ELF-EMF nachweisen. Aufgrund dieser Widersprüche zwischen den Ergebnissen der epidemiologischen Studien und den Resultaten der *in vivo* Versuche lassen sich keine Aussagen zur karzinogenen Wirkung von ELF-EMF machen. Untersuchungen der Wirkung von ELF-EM Feldern auf zellulärer Ebene zeigten zellspezifische

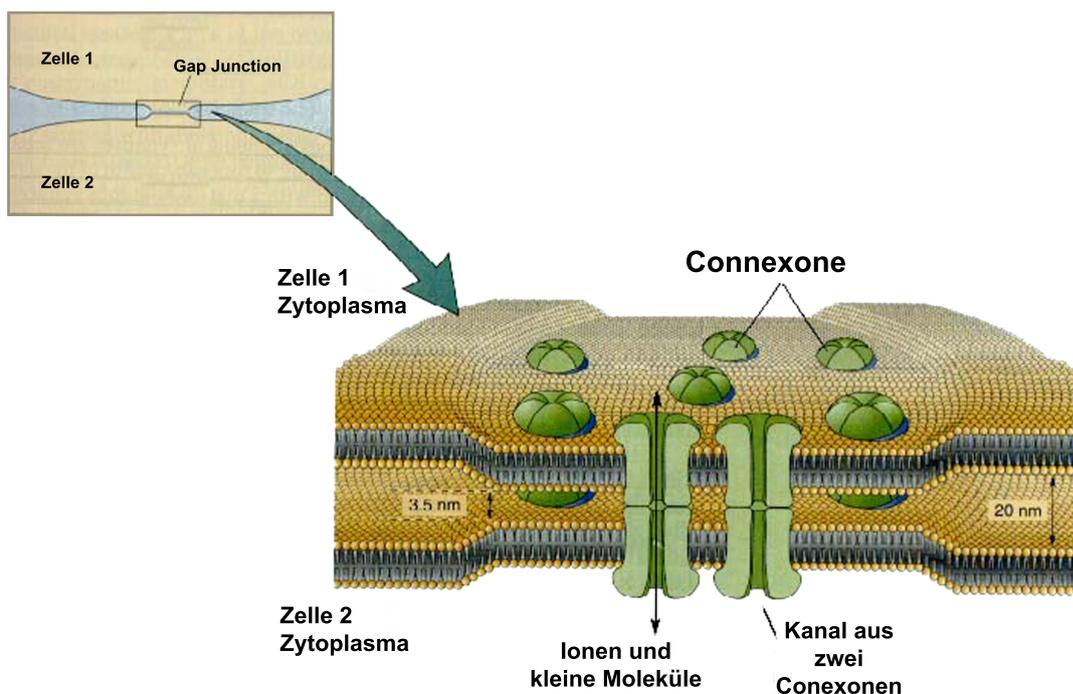
DNA-Schäden nach der Applikation von elektromagnetischen Feldern (Ivancsits et al., 2003b, 2005, Lai und Singh, 1997, 2004). Blank und Goodman (2004) entwickelten eine Theorie, bei der elektromagnetische Felder mit den Elektronen in der DNA interagieren und damit Wasserstoffbindungen in der DNA destabilisieren könnten. Diese Annahme könnte mögliche DNA-Schäden erklären. Eine weitere Hypothese besagt, dass die Ursache für pathologische Effekte von elektromagnetischen Feldern in der magnetfeldinduzierten Bildung freier Radikale in zellulären Systemen besteht (Anderson et al., 1994). Eine erhöhte Produktion freier Radikale könnte zu einer möglichen DNA-Schädigung führen. Aber auch eine Reduktion von Radikalfängern, wie z. B. Melatonin (Reiter et al., 1995), könnte DNA-Schäden verursachen.

In einigen Studien wird die Plasmamembran als Wirkungsort von elektromagnetischen Feldern postuliert. Es wird angenommen, dass sich die Transporteigenschaften und die Permeabilität der Membran verändern (Ramundo-Orlando et al., 2000, 2005). In einer weiteren Studie konnte Bersani et al. (1997) die Anhäufung von Transmembranproteinen (Integral Membrane Protein, IMP) unter Einwirkung eines gepulsten 60 Hz Feldes feststellen. Im Gegensatz dazu führte in Studien von Lohmann et al. (2003) eine Exposition eines gepulsten elektromagnetischen Feldes (15 Hz, 1,6 mT) auf zwei Cx43 exprimierende Zelllinien zu einer Reduktion des Cx43 Proteins. Diese verminderte Expression ließ die Annahme einer Reduktion der Gap Junction Kommunikation vermuten, die jedoch nicht untersucht wurde. Auch Zeng et al. (2003) zeigte eine Verminderung von Connexin 43 Gap Junctions in der Plasmamembran von Osteozyten-ähnliche-Zellen und eine gleichzeitige Erhöhung der Anzahl von Connexin 43 in der Nähe des Zellkerns. Zeng et al. vermuteten deshalb eine verminderte Gap Junction Kommunikation. Eine weitere Möglichkeit, die auf eine Störung der Zell-Zell-Kommunikation durch sogenannte Gap Junctions hinweisen könnte, wäre eine Veränderung der Leitfähigkeit durch veränderte Transportraten von Ionen, wie z. B.  $\text{Ca}^{2+}$  (Conti et al., 1985) oder eine Änderung des intrazellulären Kalziums  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kenny et al., 1997, Cho et al., 1999, Goodman et al., 1993, Karabakhtsian et al., 1994). In andere Studien konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden (Shahidain et al., 2001). Eine Möglichkeit zur Beantwortung der Frage, inwieweit niederfrequente elektromagnetische Felder einen Einfluss auf zellulärer Ebene ausüben, könnte die Untersuchung der intrazellulären Kommunikation zeigen. Die Störung dieses Kommunikations-Systems zwischen benachbarten Zellen kann eine ungehemmte Vermehrung von Krebszellen bewirken (Mesnil, 2002). Somit könnte ein Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Zell-Zell-Kommunikation eine eventuelle Erklärung für die in den epidemiologischen Studien ermittelten Ergebnisse bieten.

## 1.3 Gap Junctions

Junctions sind Zellverbindungen, die in die drei Unterarten Tight Junctions (undurchlässige Verbindungen), Desmosomen (Haftverbindungen) und Gap Junctions (kommunizierende Verbindungen) unterteilt werden. Eine der am häufigsten vorkommenden Zell-Zell-Verbindungen stellen die Gap Junctions dar. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Gewährleistung einer zielgerichteten Abstimmung zellulärer Interaktion. Durch die direkte Kommunikation über Gap Junctions können die Zellen chemische und elektrische Signale untereinander austauschen. Bei der Proliferation und der Zelldifferenzierung spielen Gap Junctions eine wichtige Rolle (Guthrie und Gilula, 1989). In der Pathogenese von vielen Erkrankungen und in der Tumorgenese werden Veränderungen der Zell-Zell-Kommunikation durch eine Änderung der Verteilung, der Expression oder der Funktion der Gap Junctions als mögliche Ursache diskutiert (Bennett et al., 1991, Fraser et al., 1987, Goodenough et al., 1996, Jiang und Gu, 2005, Yamasaki et al., 1999).

## 1.4 Aufbau und Funktion von Gap Junction- und Halbkanälen



**Abbildung 1.3.1:** Modell von Gap Junctions in der Plasmamembran  
(modifiziert nach [http://psyche.knu.ac.kr/notebook/ns/ns\\_synaptic\\_transmission.htm](http://psyche.knu.ac.kr/notebook/ns/ns_synaptic_transmission.htm))

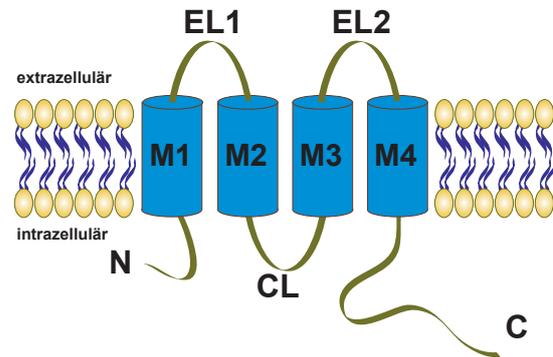
Die Gap Junctions sind Zell-Zell Kanäle, die den extrazellulären Raum zwischen zwei benachbarten Zellen überbrücken. Gap Junctions wurden bei vielen Säugtieren in fast allen Geweben nachgewiesen, wobei die Blut- und ausdifferenzierten Skelettmuskelzellen eine Ausnahme bilden (Gilula, 1987, Kumar und Gilula, 1996).

Ein Zell-Zell-Kanal besteht aus jeweils

zwei Halbkanälen (Hemichannels, Connexone), wobei jede Zelle ein Connexon zur Bildung des Kanals beisteuert. Der Halbkanal, bestehend aus jeweils sechs Connexinen, verbindet den intrazellulären Raum einer Zelle mit dem transmembranen Halbkanal der Nachbarzelle (Abb. 1.3.1).

Ein Connexon besteht aus sechs konzentrisch angeordneten Proteinuntereinheiten (Hexamer), den Connexinen (Makowski et al., 1977). Diese Connexine bilden eine Pore mit einer Länge von 150 Å und einem Durchmesser von 14 - 16 Å (1,4 - 1,6 nm). Durch diese Pore können Moleküle oder Ionen, wie z. B. Kalzium, cAMP oder ATP, von  $\approx 1000$  Dalton passieren (Alexander und Goldberg, 2003, Perkins et al., 1997, Simpson et al., 1977, White, 2003). Jede der sechs Untereinheiten (Connexine) eines Connexons besteht aus einer Polypeptidkette mit vier transmembranen Domänen (M1 - M4), zwei extrazellulären Schleifen (Loops: EL1, EL2), einer zytoplasmatischen Schleife (CL) sowie zwei intrazellulären Enden (N- und C-Terminus) (Abb. 1.4.1). Diese Basis-Topologie wird für alle Connexine angenommen (z. B. Connexin 26, Zhang und Nicholson (1994)), sodass diese sich hauptsächlich in den zytoplasmatischen und den extrazellulären Schleifen unterscheiden.

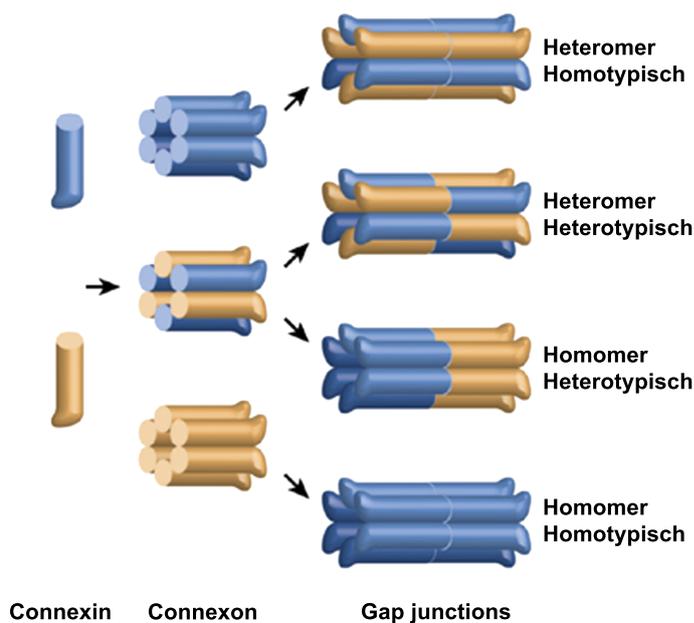
Die Aminosäuresequenz der Connexinproteine ist hoch konserviert. In der Abbildung D.1 im Anhang D ist ein Aminosequenzvergleich der in dieser Arbeit verwendeten Connexine 46 und 26 dargestellt. Der Aminosequenzvergleich zeigt in den transmembranären Bereichen eine hohe Homologie, während die extrazellulären und intrazellulären Bereiche sich unähnlich sind. Die höchste Übereinstimmung wird innerhalb der ersten beiden und der letzten transmembranären Domänen erreicht, eine höhere Variabilität existiert für M3. M3 ist vermutlich an der Architektur der Pore beteiligt. Diese Vermutung beruht auf der Tatsache, dass in der dritten transmembranen Domäne hydrophile Aminosäuren vorkommen, während die Domänen M1, M2 und M4 vorwiegend hydrophobe Aminosäuren



**Abbildung 1.4.1:** Membrantopologie des Connexins (modifiziert nach Li und Herlyn (2000))

besitzen.

Bislang sind 21 verschiedene Connexine des Menschen bekannt, die gewebs- und zellspezifisch unterschiedlich verteilt als homotypischer Gap Junction Kanal auftreten können. Jedoch besteht durch eine mögliche Kombination unterschiedlicher Connexine, die innerhalb des Gewebes bzw. der Zelle gleichzeitig auftreten können, eine Vielzahl an Kombinationzusammensetzungen (Kumar und Gilula, 1996, Sosinsky, 1995). Die verschiedenen Isotypen von Connexinen können innerhalb eines Connexons homo- und heterotypische Connexone bilden. Innerhalb eines Kanals können sich Connexone zu homomerischen und heteromerischen Gap Junction Kanäle zusammensetzen (Abb. 1.4.2). Durch diese unterschiedlichen Isotypen werden den Gap Junction-Kanälen verschiedene spezifische Eigenschaften wie z. B. Permeabilität und elektrischer Leitfähigkeit zugeordnet (Bukauskas et al., 1995, 2002, Goldberg et al., 1999, Moreno, 2004).



**Abbildung 1.4.2:** Mögliche Connexin-Anordnungen zu Connexonen und Gap Junctions (modifiziert nach Meşe et al. (2007))

Für die Nomenklatur der Connexine werden zwei verschiedene Systeme verwendet. Das erste System setzt sich aus der Abkürzung für Connexin (Cx) und der molaren Masse des Proteins, die sich hauptsächlich aus der variablen Länge des C-Terminus ergibt, sowie der Speziesabkürzung zusammen (Beyer et al., 1987, Bruzzone, 2001). So ist die Nomenklatur für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine Connexin 26 (Mensch) und Connexin 46 (Ratte) hCx26 und rCx46. Das zweite Klassifizierungssystem beruht auf der Sequenzhomologie der Connexine, teilt sie in verschiedene Gruppen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) ein und nummeriert sie entsprechend ihrer erstmaligen Klonierung fortlaufend durch (z. B.

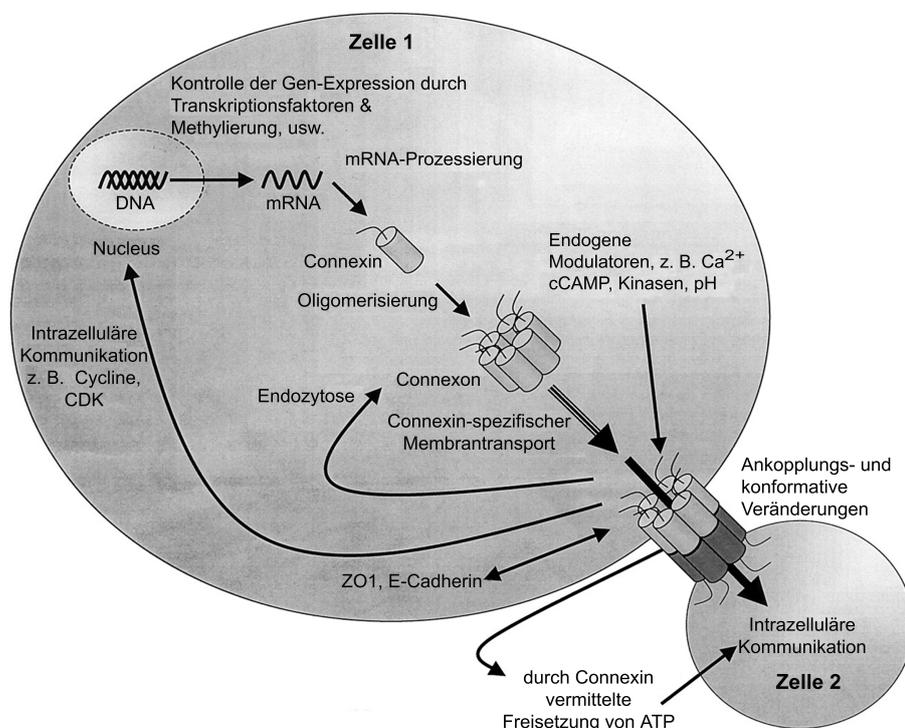
$Cx26 \cong GJ\beta2$ ,  $Cx46 \cong GJ\alpha3$ ) (Gimlich et al., 1990, Harris, 2001).

Connexine werden zell-, gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert. So findet sich Cx46 in in der Linse Paul et al. (1991) und Cx26 unter anderem in der Haut (Hennemann et al., 1992). In Abhängigkeit der verschiedenen Expressionsorte und Funktionsweisen der Connexine werden unterschiedliche Aufgaben der Gap Junctions in der Zell-Zell-Kommunikation übernommen. So werden z. B. bei Granulosa Zellen die Connexine Cx37, Cx43 und Cx45 exprimiert (Goodenough et al., 1999, Okuma et al., 1996) die je nach Connexon für unterschiedliche Ionen, Moleküle oder metabolische Substanzen über die Kanäle vermitteln (Steinberg et al., 1994). In der folgenden Tabelle 1.4.1 ist eine Übersicht einiger Connexine und ihr Vorkommen in Geweben dargestellt (Willecke et al., 2002).

Connexin	Gruppe	Masse [kDa]	Peptidlänge	Gewebe
hCx26	$\beta2$	26,4	226	Brust, Cochlea, Haut, Leber, Plazenta
hCx30	$\beta6$	30,4	261	Haut, Gehirn, Cochlea
hCx30.3	$\beta4$	30,4	266	Haut
hCx31	$\beta3$	30,9	270	Haut, Plazenta
hCx31,1	$\beta5$	31,2	271	Haut
hCx32	$\beta1$	32,0	283	Leber, Schwannsche Zellen, Oligodendrozyten
hCx36	$\alpha9$	36,1	321	Nervenzellen
hCx37	$\alpha4$	37,6	333	Endothel
hCx40	$\alpha5$	40,4	358	Herz, Endothel
hCx43	$\alpha1$	43,0	382	Fibroblasten, Granulosa u. a.
hCx45	$\gamma1$	45,7	396	Myokard, Glatte Muskulatur, Nervenzellen
hCx46	$\alpha3$	46,3	417	Linse
hCx47	$\gamma2$	46,6	437	Gehirn, Rückenmark
hCx50	$\alpha8$	49,6	441	Linse
hCx62	$\alpha10$	57,1	550	Ovar

**Tabelle 1.4.1:** Übersicht des Vorkommens von Connexinen in Geweben (aus Willecke et al. (2002))

Neben der Regulation der Zell-Zell-Kommunikation durch die zell-, gewebs- und entwicklungsspezifische Expression von Connexinen, ist die Regulation der Gap-Junction-Kanäle durch verschiedene zelluläre Mechanismen gesteuert. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Gap Junctions bzw. der Halb-Kanäle, die sich je nach Connexin unterscheiden (Elfgang et al., 1995), können durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert werden. Das Öffnen (leitender Zustand) und Schließen (nichtleitender Zustand) kann durch Änderung der Membranspannung, extra- bzw. intrazellulären Kalziumkonzentration oder des pH-Wertes bewirkt werden (Jedamzik et al., 2000, Trexler et al., 1996, 1999). Auch durch Phosphorylierungsprozesse kann z. B. die Einzelkanalleitfähigkeit und die Offenwahrscheinlichkeit verändert werden (Kwak und Jongma, 1996).



**Abbildung 1.4.3:** Mögliche Mechanismen zur Connexin Veränderung bei Tumorgenese (modifiziert nach Chipman et al. (2003))

Da die Gap Junction Kanäle eine wichtige Rolle bei der Regelung der Zellaktivität und der Proliferation einzelner Zellen spielen, könnte ein Zusammenhang mit der Veränderung ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften und einer Krebsentstehung bestehen (Mesnil, 2002). Die Veränderung der Connexine und ihrer damit verbundenen Eigenschaften kann auf verschiedenen Ebenen der Krebsentstehung stattfinden. In Abbildung 1.4.3 sind mögliche Regulationsmechanismen gezeigt, die die Veränderung der Zell-Zell-

Kommunikation via Gap Junctions bewirken könnten (Chipman et al., 2003). So könnte eine Mutation im Connexin-Gen oder eine verminderte oder fehlerhafte Proteinexpression eine Ursache sein. Auf der Proteinebene könnte die Fehllokalisierung und eine nicht korrekte Phosphorylierung eine Reduktion der intrazellulären Kommunikation bewirken (Ngezahayo et al., 1998). Änderungen der Plasmamembran können ebenfalls einen Einfluss auf die in die Zellmembran eingebauten Connexone haben.

## 1.5 Zielsetzung

Um festzustellen ob niederfrequente elektromagnetische Felder (ELF-EMF) einen Einfluss auf die intrazelluläre Kommunikation haben, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene mögliche Mechanismen der Connexin-Veränderung untersucht (Abb. 1.4.3). Eine Möglichkeit könnte die Bildung von freien Radikalen sein. In der Arbeitsgruppe von Prof. Kolb wurde gezeigt, dass die Bildung freier Radikaler die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Stützzellen im Ohr innerhalb von Minuten inhibiert (Todt et al., 2001). Auch DNA-Schäden könnten durch die Bildung freier Radikaler bewirkt werden (Anderson et al., 1992).

Zur Überprüfung der Funktionalität und des korrekten Einbaus von molekularbiologisch charakterisierten Connexinen in die Zellmembran wurde das heterologe Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyte herangezogen. In diesen Zellen konnten klonierte elektrisch leitende Connexone (Halbkanäle) *in vitro* untersucht werden. Bei den hier verwendeten Connexinen (Connexin 26 (Mensch, hCx26) und Connexin 46 (Ratte, rCx46)) wurde die Funktionalität dieser Halbkanäle während einer Temperaturapplikation und nach einer ELF-EMF Exposition analysiert.

In weiteren Versuchen wurde an Granulosa-Zellen und Fibroblasten, die verschiedene Connexine exprimieren (Tab. 1.4.1), die Wirkungen von unterschiedlichen elektromagnetischen Expositionen auf die DNA-Migration und die intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderung ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in An- und Abwesenheit eines elektromagnetischen Feldes überprüft.

## 2 Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 *In vitro* Transkription

Um die kodierte cDNA des Membranproteins in eine komplementäre cRNA-Sequenz umzuschreiben, wird das Verfahren der *in vitro* Transkription (IVT) verwendet (Melton et al., 1984, Krieg und Melton, 1987). Ausgangsmaterial zur *in vitro* Transkription stellen die Vektoren pSP64t und pGEM-HE dar. Diese klassischen *Xenopus laevis* Expressionsvektoren basieren auf Produkten der Firma Promega (pSP64 und pGEM-3z). Um die RNA nach der Transkription vor einer Degradation zu schützen, sind diese Vektoren zusätzlich mit einem 5'- und einem 3'-UTR aus einem Gen für das *Xenopus*- $\beta$ -globin ausgestattet (Melton et al., 1984, Krieg und Melton, 1984, Liman et al., 1992). In diesen Vektoren sind die kodierten Sequenzen von rCx46 und hCx26 integriert (Paul et al., 1991, Zeilinger et al., 2005). Zunächst wird die aufgereinigte Plasmid DNA linearisiert. Für die Plasmid DNA von rCx46 wird dafür das Restriktionsenzym Xba I und für die DNA von hCx26 das Enzym Nhe I verwendet. Zur Linearisierung werden etwa 4  $\mu\text{g}$  Plasmid DNA bei 37°C für eineinhalb Stunden mit 5 u/ $\mu\text{g}$  Xba I (bzw. Nhe I) und den mitgelieferten Probenpuffern (BioLab) inkubiert. Es folgt eine weitere Inkubation dieser Suspension für 30 Minuten bei 37°C unter Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Proteinase K (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und 0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS). Bei diesem Prozess werden die Phenol-stabilen Proteine inaktiviert und entfernt sowie die Probe für die folgende Phenolextraktion vorbereitet. Bei der Phenolextraktion werden aus der DNA-Probe Verunreinigungen, z. B. Proteine, entfernt. Dazu wird das Gesamtvolumen der Suspension mit  $\text{H}_2\text{O}_{DEPC}$  auf 150  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 150  $\mu\text{l}$  Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (49,5 : 49,5 : 1) aufgeschüttelt. Diese Emulsion wird bei einer folgenden fünfminütigen Zentrifugation (14 500 rpm; MinisSpin® plus, Eppendorf) in zwei Phasen aufgetrennt. Die wässrige Phase (Überstand) wird von der Phenol/Protein - Phase getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wird mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{DEPC}$  reextrahiert. Unter Zufügung von 0,1 Volumen 3 M Natrium-Acetatlösung (ca. 20 - 25  $\mu\text{l}$ ) und 1 Volumen Isopropanol bei anschließender Inkubation über Nacht bei -20°C erfolgt die Fällung der DNA aus der wässrigen Lösung. Die ausgefällte DNA wird durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 14 500 rpm) pelletiert und vom Überstand getrennt. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol (EtOH) gewaschen und nach der Trocknung in einem geeigneten Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{DEPC}$  aufgenommen.

Mit dieser linearisierten und gereinigten cDNA wird die *in vitro* Transkription mit dem mMessage mMachine Kit (mMESSAGE mMACHINE® SP6, mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit) und dem dazugehörigen IVT Protokoll der Firma Ambion durchgeführt. Die gewonnene cRNA wird in nucleasefreiem Wasser gelöst, auf eine Konzentration von  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt und kann bis zu ihrer Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

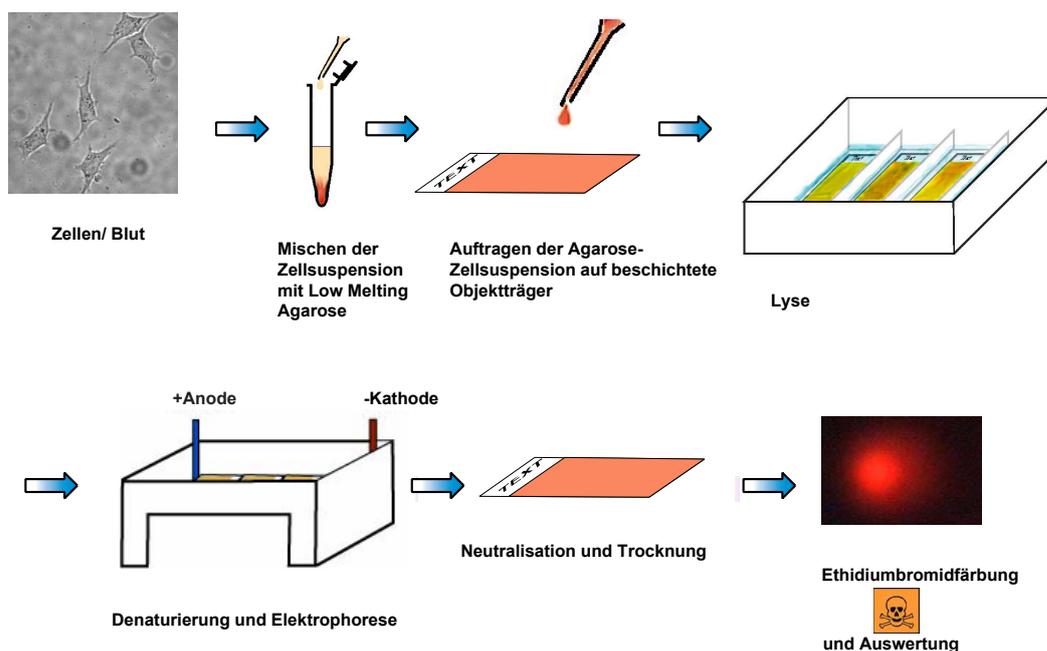
## 2.1.2 Einzel - Zell - Gel - Elektrophorese - Comet Assay

Mit der von Östling und Johanson (1984) entwickelten Einzel - Zell - Gel - Elektrophorese (single cell gel electrophoresis - SCGE), auch Comet Assay genannt, kann theoretisch jede eukaryotische Zelle auf DNA-Schäden untersucht werden. Beim Comet Assay werden die Zellen in Agarose eingebettet, lysiert und einem elektromagnetischem Feld ausgesetzt (Elektrophorese). Während der Elektrophorese können die negativen geladenen DNA Fragmente der Größe nach zum positiv geladenen Pol wandern. Nur geschädigte / fragmentierte DNA, wie z. B. DNA-Einzelstrang- (SSB) und DNA- Doppelstrangbrüche (DSB), kann aus dem Zellkern herauswandern. Singh et al. (1988) beschrieb diese Methode, die nach Ivancsits et al. (2002) modifiziert in dieser Arbeit verwendet wurde. Ein schematischer Ablauf des Comet Assays ist in Abb. 2.1.1 dargestellt.

Beim Comet Assay können durch die Modifikation des pH-Wertes, des Lyse- oder des Elektrophoresepuffers im Versuchsprotokoll unterschiedliche Versuchsergebnisse erzielt werden. Mit der alkalischen Elektrophorese ( $\text{pH} > 13$ ) werden DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüche untersucht, wohingegen es bei einem neutralen Elektrophoresepuffer ( $\text{pH} < 9$ ) zu einer DNA Migration kommt, die nur durch DNA-Doppelstrangbrüche hervorgerufen wird. Die Durchführung der Einzelzell-Gelelektrophorese unterscheidet sich in beiden Versionen nur in der Verwendung eines unterschiedlichen Elektrophoresepuffers.

### 2.1.2.1 Versuchsdurchführung des Comet Assays

Zunächst wurden die Objektträger für den Comet Assay vorbereitet. Bei diesen Objektträgern handelte es sich um spezielle durch Sandstrahlung aufgeraute Objektträger (VWR International GmbH, Deutschland), die mit einer normal schmelzenden (normal melting, NM-Agarose) Agarose-Lösung beschichtet wurden. Hierzu wurde der Objektträger in eine  $80^\circ\text{C}$  warme 1,5 %-ige NM-Agarose-PBS-Lösung zu 4/5 eingetaucht. (Das obere



**Abbildung 2.1.1:** Schematischer Ablauf des in dieser Arbeit durchgeführten Comet Assays

Fünftel diente zur späteren Kennzeichnung des Objektträgers mit einem Bleistift, da nur dieser die Versuchsdurchführungen überstand.) Die Unterseite (glatte Seite) des Objektträgers wurde vorsichtig mit einem Tuch gesäubert und der beschichtete Objektträger wurde in waagerechter Position an einem staubfreien Ort (Trockenofen, 30°C) über Nacht getrocknet.

Diese Vorbereitung und die aufgeraute Objektträgerfläche diente zum einen der besseren Haftung der später aufgetragenen Zell-Agarose-Suspensions-Schichten, zum anderen wurde hierdurch eine längere Lagerung der vorbereiteten Objektträger bei einer guten Durchrocknung ermöglicht.

Die für den Versuch benötigten Medien wurden kurz vor dem Versuch mit den vorhandenen Stocklösungen frisch angemischt. Für jeden verwendeten Objektträger wurden 5 ml des Lysepuffers benötigt, der sich aus 4,45 ml der Lyse-Stocklösung (A), 0,50 ml DMSO und 0,05 ml Triton X100 zusammensetzt: (2,5 M NaCl, 100 mM Na-EDTA, 10 mM Tris, 1 % N-Laurylsarcosin, 10 % DMSO, 1 % Triton X100) zusammensetzte. Der Elektrophoresepuffer wurde für den alkalischen Comet Assay mit 60 ml der Elektrophorese-Stocklösung (B) und 10 ml der EDTA-Stocklösung (C) angemischt und auf 2000 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt: (300 mM NaOH und 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH > 13). Für die Durchführung eines neutralen Comet Assays ergab sich die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers unter Verwendung von 400 ml Elektrophorese-Stocklösung (E) und 10 ml konzentrierter Salzsäure (rauchende Salzsäure) auf 2000 ml mit Aqua bidest.

aufgefüllt: (100 mM Tris, 300 mM NaAcetat, HCl, pH 8,5).

Die hergestellten Medien wurden bis zur Verwendung bei 4°C gekühlt aufbewahrt. Des Weiteren wurde eine niedrig schmelzende (low melting, LM-Agarose) Agarose-Lösung angesetzt und unter Rühren erwärmt (80°C) bis eine klare Lösung entsteht. Die 0,6 %-ige LM-Agarose-PBS-Lösung wurde in einem warmen Wasserbad auf 37°C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur für die Präparation der Objektträger aufbewahrt.

Die folgenden Handlungen wurden in einem abgedunkelten Raum (unter indirektem Licht oder Rotlicht) durchgeführt, da auch UV-Licht eine Schädigung der DNA der zu untersuchenden Zellen verursachen kann (Patton et al., 1999, Singh et al., 1988, Rosenstein, 1988). 20 µl einer Granulosazellsuspension ( $3 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^4$  Zellen) wurden mit 100 µl der 37°C warmen LM-Agarose-Lösung luftblasenfrei vermischt und gleichmäßig auf einen beschichteten und beschrifteten Objektträger gegeben, luftblasenfrei eingedekelt (Deckgläser: 60 mm × 24 mm) und bei 4°C ohne Lichteinfluss für zehn Minuten getrocknet. Danach wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt, indem sie seitlich vom Objektträger gezogen wurden, ohne die Zell-Agarose-Schicht durch Druck oder Zug zu beschädigen. Es folgte eine weitere Beschichtung mit 100 µl der 6 %-igen LM-Agarose-PBS Lösung, Eindeckelung und eine Trocknung bei 4°C für 10 Minuten. Der Vorteil dieser *Sandwich*-Präparation lag darin, dass eine unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeit der Zell-DNA während der Lyse und der folgenden Elektrophorese von in Agarose eingebetteten und an der Oberfläche der Agarose befindlichen Zellen verhindert wurde (Schnurstein, 2001, Singh et al., 1988). Nach dieser zweiten zehnmütigen Trocknung wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt, die beschichteten Objektträger in Quadriperm-Schalen gelegt und mit jeweils 5 ml der 4°C kühlen Lyse-Lösung überschichtet. Die auf den einzelnen Objektträgern fixierten Zellen wurden für mindestens eineinhalb Stunden (bzw. über Nacht) an einem dunklen Ort lysiert. Um einen eventuellen Beeinflussungs-Parameter des Experiments zu vermeiden, wurde in allen für diese Arbeit durchgeführten Versuchen die Zellpräparate eineinhalb Stunden bei 4°C lysiert. Während der Lyse wurden die in der Agarose eingebetteten Zellen mit den anhaftenden Proteinen zerstört und die DNA des Zellkerns blieb zurück.

Nach der Lyse wurden die Objektträger waagrecht in die auf Eis stehende Elektrophoresekammer gelegt (Beschriftung zur Kathode). Freibleibende Plätze wurden mit unbeschichteten Objektträgern ausgelegt und die Objektträger zu einer durchgehenden Fläche ohne Lücken zusammengeschoben. Während des Versuches befand sich die Elektrophoresekammer auf einem Eisbett und war horizontal mit einer Wasserwaage (Libelle) ausgerichtet. Mit der jeweiligen 4°C kühlen Elektrophorese-Lösung (alkalisch

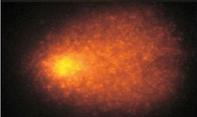
oder neutral) wurde die Elektrophoresekammer gefüllt, bis die Objektträger gleichmäßig bedeckt waren. Es folgte eine Inkubation (Equilibrierung: Entwindung der DNA) der Objektträger in dieser Elektrophorese-Lösung für exakt 40 Minuten. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 25 V und 300 mA für genau 20 Minuten. Die Strom- und Spannungswerte konnten durch Zugabe oder Abnahme der Elektrophoreselösung aus der Elektrophoresekammer eingestellt werden. Durch eine Abdeckung der Elektrophoresekammer während der Equilibrierung und der Elektrophorese konnte der Versuch zusätzlich vor einer unerwünschten Lichteinstrahlung geschützt werden. Die exakte Einhaltung der Zeiten war wichtig, da durch unterschiedliche Zeiten die DNA mehr/weniger Zeit hat sich zu entwinden (Equilibrierung) oder die DNA-Fragmente im Agarosebett längere/kürzere Strecken zurücklegen können (Elektrophorese).

Nach der Elektrophorese erfolgte die Neutralisierung der Objektträger. Hierzu wurden die Objektträger in Färbetrögen mit Aqua bidest. (bzw. 400 mM Tris-Lösung) für zweimal fünf Minuten gespült und anschließend im Trockenofen über Nacht durchgetrocknet. Danach konnten die Objektträger an einem trockenen, dunklen Ort bis zur Färbung und Auswertung aufbewahrt werden.

### 2.1.2.2 Auswertung der Comet Assay Versuche

Die präparierten Objektträger wurden mit einer 0,002 %-igen Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels zweier verschiedener Methoden:

**Einteilung der Zellen in fünf verschiedene Klassen:** Hierzu wurden pro Zellansatz mindestens zwei Objektträger ausgezählt, indem die ersten 1000 Cometen per Augenmaß in fünf verschiedene Klassen (Abb. 2.1.2, (Anderson et al., 1994)) eingeteilt wurden. Mit der Gleichung (2.1.1) konnte der Tailfaktor (Maß der DNA-Fragmentierung) eines Objektträgers ermittelt werden.

Klasse	Klassenmitte	% fragmentierte DNA	
A	2,5	< 5 %	
B	12,5	5 - 20 %	
C	30	20 - 40 %	
D	67,5	40 - 95 %	
E	97,5	>95 %	

**Abbildung 2.1.2:** Klasseneinteilung des Comet Assays nach Anderson et al. (1994) ([www.egms.de](http://www.egms.de))

$$\text{Tailfaktor [\%]} = \frac{A * F_A + B * F_B + C * F_C + D * F_D + E * F_E}{\text{Gesamtanzahl der Cometen}} \quad (2.1.1)$$

$A - E$  := Anzahl der Cometen in dieser Klasse

$F_A - F_E$  := % der fragmentierten DNA (Klassenmitte der jeweiligen Klasse)

**Bildauswertung der einzelnen Cometen:** Von jedem Zellansatz wurden von mindestens zwei Objektträgern die ersten zweihundert Bilder mit einem oder mehreren Cometen mit einer CCD-Kamera (SATISEC SAT-11SP, EHD imaging GmbH) erstellt und mit dem Programm *CometScore*<sup>TM</sup>, das von der Firma TriTek Corporation, USA angeboten wird, ausgewertet. Dieses Bildanalyseverfahren berechnet mittels Visualisierung der Verteilung (Histogramm) der Helligkeitswerte (Intensität) von Pixeln im Cometenbild die Untersuchungsparameter. Im Anhang F findet sich eine nähere Erläuterung des Programmes *CometScore*<sup>TM</sup>. Die unterschiedlichen Untersuchungsparameter der Cometen, die mit diesem Programm ermittelt werden, sind unter anderem Tail-Länge (Länge der Migration der DNA), Tail-Intensität (Menge der gewanderten DNA) oder das Tailmoment (Produkt aus Länge und Anteil der DNA im Tail) (Abb. 2.1.3). In dieser Arbeit wurde das Tailmoment verwendet, da es die Intensität und die Länge des Schweifs (Tail) berücksichtigt.

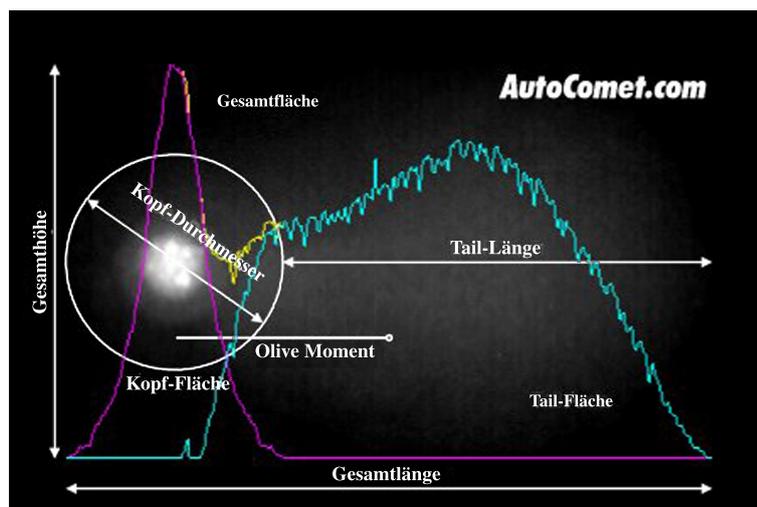


Abbildung 2.1.3: Parameterdefinition *CometScore*<sup>TM</sup> ([www.autocomet.com](http://www.autocomet.com), ©2006 TriTek Corp.)

$$\text{Tailmoment} = \%DNA_{\text{im Tail}} * \text{Länge}_{\text{Tail}} \quad (2.1.2)$$

Die DNA im Tail errechnet das Programm aus der Division der Gesamtintensität der Bildpixel im Tail durch die Gesamtintensität der Pixel des Kometen multipliziert mit 100.

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Zellen und Zell-Präparation

In dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien verwendet. Dabei handelte es sich hauptsächlich um eine Dauerkultur von Granulosazellen (Ratte) der Zelllinie FSHR-17 (GC-FSHR-17, erhalten von Prof. Dr. A. Amsterdam; Weizmann Institute of Science / Israel). Diese Zellen exprimierten das follikelstimulierende Hormon (FSH). Des Weiteren fanden eine Fibroblasten (Mensch, erhalten von Prof. Dr. H. W. Rüdiger; Klinische Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinischen Universität Wien / Österreich), Chinese Hamster Ovary (CHO, Hamster) und eine HeLa (Henrietta Lacks, Mensch) Zelllinie Verwendung. Alle Kulturen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 Ham (DMEM-F12) unter Zusatz von 10% FCS (fötales Kälber Serum, Fetal Calf Serum) und einer Penicillin/Streptomycinlösung bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Sättigung in einem Klimabrotschrank (Fa. Heraeus) in Kulturpetrischalen (Ø 50 mm) auf Glasplättchen (24 × 50 mm) angezogen. Jeden dritten Tag wurde das Zellkulturmedium (4 ml je Petrischale) der Zellen

gewechselt und alle 5 bis 7 Tage wurden die Kulturen gesplittet. Für die hier durchgeführten Versuche wurden Zellen der Passagen 10 bis 20 verwendet. Zu jedem Experiment wurde 48 Stunden vor der jeweiligen Untersuchungsmethode eine Passage (Splittung) durchgeführt.

Eine Passage erfolgte durch Entfernung des Nährmediums und durch Hinzufügen einer Trypsinlösung. Das Trypsin bewirkt bei einer ein- bis zweiminütigen Einwirkzeit eine Ablösung der Zellen vom Petrischalenboden. Durch das Zufügen vom Kulturmedium wurde die Wirkung von Trypsin auf die Zellen gestoppt und diese Zellsuspension konnte für die weitere Behandlung verwendet werden.

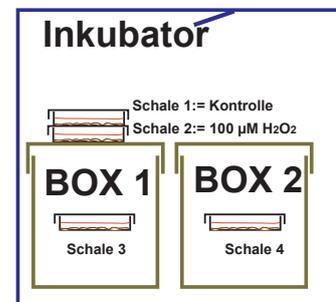
Für den hier durchgeführten Comet Assay wurden pro Versuchseinheit vier parallele Ansätze aus einer Zellkul-

turschale angesetzt (Passage). Zwei (Positiv- und Negativ-Kontrolle) der Petrischalen ( $\varnothing$  50 mm) kamen unabhängig von den zwei anderen in den Inkubator (Heraeus) und die beiden anderen wurden in jede Box (B1 und B2) des Versuchsaufbaus (Abb. 2.3.10) platziert. Die Anordnung dieser Schalen ist in der Abbildung 2.2.1 zu sehen.

Nach 24 Stunden wurde das ELF-EMF-Programm (s. S. 39) mit den zu untersuchenden Parametern gestartet. Dreißig Minuten vor dem Ende der jeweiligen ELF-EMF-Expositionszeit erfolgte eine Inkubation mit  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  der Positiv-Kontrolle. Nach Beendigung der Expositionsdauer (ELF-EMF und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Inkubation) wurden aus den vier Petrischalen lichtgeschützt vier Zellsuspensionen vorbereitet. Für jeden Zellsuspensionsansatz wurden für die Auswertung des Comet Assays jeweils drei Objektträger präpariert.

### 2.2.2 *Xenopus laevis* Oozyten

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die weitgehend undifferenzierten Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet. Diese Zellen eignen sich aufgrund ihrer hohen Translationsraten von Fremdproteinen gut als heterologes Expressions- und Translationssystem, das von Gurdon 1971 erstmalig mit einem exogenen Protein erfolgreich verwendet wurde (Gurdon et al., 1971). Durch die einfache Haltung der ausschließlich weiblichen Tiere der Familie der zungenlosen Froschlurche (*Pipidae*) bei konstanter Wassertemperatur  $20^\circ\text{C}$  und durch einen konstanten Tag-Nacht-Rhythmus (jeweils 12 Stunden), gemäß den Tierschutzbedingungen, konnten das gesamte Jahr über ohne Tötung eines Tieres *Xenopus laevis* Oozyten gewonnen werden. Diese Oozyten befinden sich im Ovar des Frosches und sind in mehrere Ovarlappen unterteilt, in



**Abbildung 2.2.1:** Schalenanordnung im ELF-EMF Aufbau im Klima-Brutschrank

denen sich Oozyten verschiedener Stadien (I - VI) befinden. Durch die Färbung und die Größe der Oozyten lassen sich diese Stadien leicht unterscheiden (Dumont, 1972). Für die elektrophysiologischen Experimente dieser Arbeit wurden Oozyten der Stadien V und VI verwendet. Diese Oozyten haben einen Durchmesser von 1 - 1,3 mm mit einem Volumen von 0,5 - 0,9 mm<sup>3</sup> und eine klar voneinander getrennte animale und vegetative Hemisphäre. In der dunkel pigmentierten Hemisphäre der Oozyte befindet sich in diesen Stadien der Zellkern und die als Exoskelett dienende Vitellinhülle ist vollständig ausgebildet. Durch die eingebrachten Mikrovilli der nicht ebenen Membran der Oozyten vergrößert sich die Membranoberfläche der Oozyte von ca. 5 mm<sup>2</sup> auf 22 mm<sup>2</sup> (Dick et al., 1970). Aufgrund dieser Größe und einer hohen Translationskapazität der Oozyte wird eine hohe Anzahl von exprimierten Halbkanälen (Hemichannels) in der Membran ermöglicht (Hilken et al., 1997).

Für die Experimente mussten die Oozyten zunächst einem Frosch entnommen und für die cRNA-Injektion vorbereitet werden. In den folgenden Abschnitten wird diese Oozytengewinnung, deren Präparation sowie die Injektion der cRNA für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche beschrieben.

### 2.2.2.1 Oozytenentnahme

Ein Frosch wurde in 1,5 g / 1,5l Wasser (0,1 % (w/v)) Tricain (3-Amiminibenzoic Acid Ethyl Ester) narkotisiert. Zusätzlich wurde seine Körpertemperatur mit Eis heruntergekühlt, um den Stoffwechsel des Frosches herabzusetzen. Durch die Kühlung wurden auch die Blutungen verringert und die Entnahme der Oozyten durch einen ca. 5 mm langen Schnitt in der Bauchdecke aus dem Ovar konnte beginnen. Die benötigte Menge an Oozyten wurde mit einer sterilen Schere von dem mit einer Pinzette durch den Bauchschnitt herausgezogenem Ovarlappen abgeschnitten und sofort in die ND96-Lösung überführt. Nach der Entnahme der Zellen aus den Ovarien erfolgte mittels einer sterilen chirurgischen Nadel und resorbierbarer Nähseide (Bondek Plus, Teleflex Medical) erst die Schließung der Muskulatur und dann die Vernähung der Bauchhaut. Diese Vorgehensweise verringert die Vernarbung des Gewebes und ermöglicht weitere Oozytenentnahmen. Der Krallenfrosch konnte nach dem Wundverschluss und der Beendigung der Narkose zurück in ein Aquarium gesetzt werden. Die Fäden der Operationsnaht lösten sich nach ein paar Wochen von selbst auf. Die Absonderungen von antimikrobiellen Peptiden durch die Froschhaut (Zasloff, 1987, Goldin, 1992) sind ein Grund dafür, dass in der Regel keine Infektionen durch Mikroorganismen an der Operationswunde entstehen.

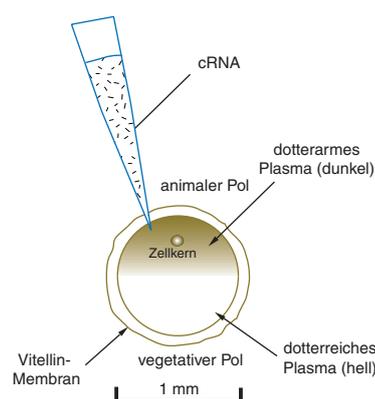
### 2.2.2.2 Oozytenpräparation

Da sich die Oozyten nach der Entnahme aus den Ovarien in einem Zellverband, bestehend aus Bindegewebe mit Blutgefäßen, Nervenfasern und Follikelzellen, befanden, wurden sie mechanisch und enzymatisch voneinander getrennt. Eine mechanische Zerteilung des Ovarlappens in höchstens 5 bis 8 zusammenhängende Oozyten erfolgte vorsichtig unter einer Stereolupe (GZ4, Leica) mit zwei Pinzetten. Anschließend wurden die Zellen mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien ND96-Lösung gespült und für ein- bis eineinhalb Stunden in einer Kollagenase-OR2-Lösung (4 mg/3 ml) unter leichtem Schütteln (120 Umdrehungen / Minute) inkubiert. Da die Aktivität der Kollagenase durch Kalzium gehemmt wird, konnte durch erneutes mehrmaliges Spülen der Oozyten mit der ND96-Lösung die Wirkung der Kollagenase gestoppt und die Kollagenase-OR2-Lösung entfernt werden. Im Anschluss wurden die sechs Entwicklungsstadien (I - VI) durchlaufenden Oozyten des *Xenopus laevis* (Dumont, 1972) unter dem Binokular aussortiert und in einer ND96- Penicillin / Streptomycin-Lösung (ND96 - Pen. / Strep.) bei 17°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 2.2.2.3 cRNA-Injektion

Für die Mikroinjektion von *Xenopus laevis* Oozyten wurde die plasmidische cDNA in komplementäre cRNA, wie auf Seite 16 beschrieben, transkribiert. Diese cRNA wurde den Oozyten mittels eines Injektors (Nanoliter Injector,  $\mu$ Tip, World Precision Instruments) injiziert. Die hierfür verwendete Injektionskapillare (4878 ONE O7E, World Precision Instruments Inc.; USA) wurde mittels eines vertikalen Glaskapillarziehgerätes (PP-830, Narishige; Japan) hergestellt. Dieser sogenannte Puller zieht mithilfe einer Heizwendel und Gewichten eine Glaskapillare in die Länge und reißt sie auseinander. Diese Glaspipettenspitze wurde mit einem Heizdraht zu einer kanülenartigen Form weiter ausgearbeitet. Diese Injektionspipetten kamen vor der Oozyteninjektion für zwei Stunden in einen Sterilisationsofen (> 200°C) und konnten danach für die Injektion der cRNA verwendet werden. Dazu wurden die Injektionskapillare mit Mineralöl luftblasenfrei gefüllt, die zu verwendende cRNA aufgezogen und in die Oozyten injiziert. Nach dieser Präparation wurden die Oozyten wieder bis zur weiteren Verwendung bei 17°C aufbewahrt.

Bei den Untersuchungen zu den Expositionen einer Temperaturänderung während der elektrophysiologischen Messung der Halbkanal-Proteine Connexin 26 (Mensch, hCx26) und Connexin 46 (Ratte, rCx46), wurden die Oozyten mit 23 nl der jeweiligen cRNA injiziert (Abb. 2.2.2). Die Konzentrationen betragen für Connexin 46 (rCx46)  $25 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$  und für Connexin 26 (hCx26)  $2 \mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ . Um die endogenen Connexin 38 (Cx38) Kanäle in den Kontroll und den mit hCx26 injizierten Oozyten zu unterdrücken (Ebihara et al., 1998), wurde zusätzlich zu den hCx26-injizierten Oozyten ein komplementäres Primerfragment der Connexin 38 (Cx38) kodierenden Sequenz verwendet (Connexin 38-antisense (ASCx38), 5'-CTG ACT GCT CGT CTG TCC ACA CAG-3') (Bruzzone et al., 1993). Die Konzentration für ASCx38 betrug in diesen Versuchen  $0,4 \mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ . Die Zwei-Elektroden Voltage-Clamp-Messungen der hCx26-ASCx38, ASCx38 und rCx46 injizierten Oozyten unter verschiedenen Temperaturapplikationen wurden nach einer Inkubationszeit von zwei bis vier Tagen in modifiziertem Barth's Medium (+ 0,82 mM  $\text{CaCl}_2$ ) bei  $17^\circ\text{C}$  durchgeführt. Für die in dieser Arbeit ausgeführten Versuche mit dem Membranprotein Connexin 46 (Ratte, rCx46) und der folgenden Exposition eines niederfrequenten elektromagnetischen Feldes wurde obige Vorgehensweise dahingehend verändert, dass anstatt des modified Barth's Medium die ND96-Lösung (s. Anhang C.2) verwendet wurde. Das Injektionsvolumen der cRNA betrug 46 nl von rCx46 mit einer Konzentration von  $25 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$ . Nach dieser Präparation kamen die rCx46 injizierten Oozyten in Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm (35 ml ND96-Medium) in die von Prof. Kuster (IT'IS-Foundation, Schweiz) gebauten ELF-EMF-Boxen (s. Abb. 2.3.10) in einem Brutschrank bei  $17^\circ\text{C}$ . In diesen Boxen wurde dann wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben die niederfrequenten elektromagnetischen Felder (ELF-EMF) für 16 h appliziert. Nach dieser 16-stündigen Exposition der unterschiedlichen ELF-EM Felder und der 16-stündigen Translationsdauer der cRNA-rCx46 wurden die elektrophysiologischen Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode durchgeführt.



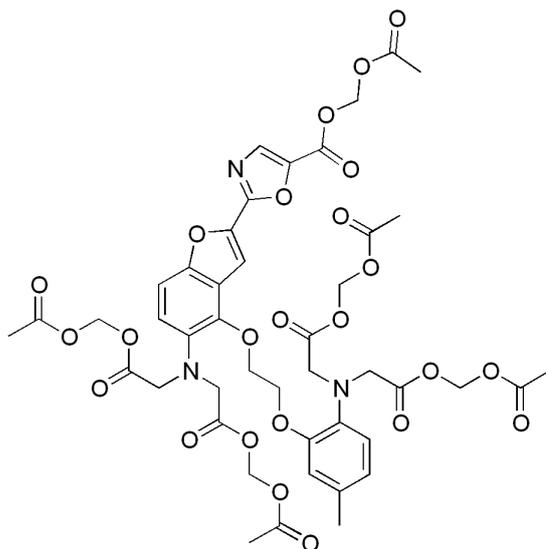
**Abbildung 2.2.2:** cRNA-Injektion in eine *Xenopus laevis* Oozyte

## 2.3 Biophysikalische Methoden

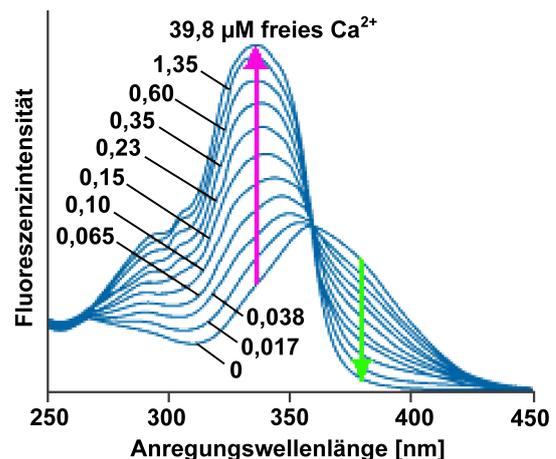
### 2.3.1 Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2-AM

Die Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 pentakis [ acetoxymethyl ] - ester (Fura-2-AM) durchgeführt (Grynkiewicz et al., 1985). Der Fura-2 Indikator hat die Eigenschaft, dass sich seine Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit mit der Wellenlänge des Anregungslichtes und der  $Ca^{2+}$ -Konzentration ändert. Wird in einer Fura-2 - Lösung  $Ca^{2+}$  hinzugegeben, bindet der Indikator am Kalzium und die Fluoreszenzintensität von an  $Ca^{2+}$  gebundenem Fura-2 nimmt bei einer Anregung von 340 nm zu (roter Pfeil in Abb. 2.3.1 b)). Gleichzeitig nimmt die Fluoreszenzintensität von freiem Fura-2 bei einer Anregung von 380 nm ab (grüner Pfeil in Abb. 2.3.1 b)). Mit dem Quotient (Ratio) (Gl. 2.3.1) aus diesen beiden Fluoreszenzintensitäten ( $F_{340}$  und  $F_{380}$ ) kann die relative intrazelluläre Kalziumkonzentration bestimmt werden. Eine Änderung dieses Quotienten ist proportional zu einer intrazellulären Kalziumkonzentrationsänderung.

$$Ratio = \frac{F_{340nm}}{F_{380nm}} \quad (2.3.1)$$



a) Chemische Strukturformel von Fura-2-AM



b) Fluoreszenzanregungsspektrum von Fura-2 in Lösung mit 0 - 39,8  $\mu M$  freiem  $Ca^{2+}$

**Abbildung 2.3.1:** Fura-2 pentakis [ acetoxymethyl ] - ester (Fura-2-AM)

a) Quelle: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fura-2AM>

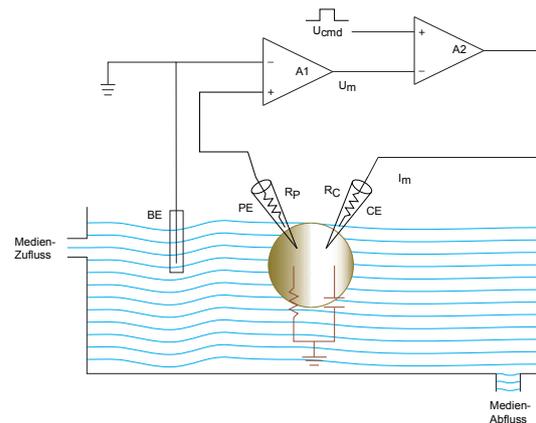
b) modifiziert nach <http://probes.invitrogen.com/handbook/figures/0476.html>

Der Indikator Fura-2 diffundiert nicht durch die Zellmembran, weshalb der Farbstoff in Verbindung mit Acetoxymethylester (Fura-2-AM) verwendet wurde. Nach der Aufnahme in die lebenden Zellen wird die Esterbindung durch Esterasen aufgespalten, ein Ausstrom des Fluoreszenzfarbstoffes verhindert und es kommt zu einer Anreicherung von Fura-2 in den Zellen. In dieser Arbeit wurden die Zellen 60 Minuten vor dem Ende einer ELF-EMF-Applikation mit Fura-2-AM (5  $\mu\text{M}$  und 1 % DMSO) beladen. Dazu wurden die Petrischalen mit den Zellen in einer Aus-Phase (10-minütige Pause einer unterbrochenen ELF-EMF Exposition) aus den im Brutschrank befindlichen  $\mu$ -Metall-Boxen (Abb. 2.3.10) herausgenommen, beladen und sofort wieder in die Boxen bzw. in den Brutschrank zurückgesetzt. Nach dem Ende der Indikationsdauer mit Fura-2-AM, die zeitgleich mit der ELF-EMF Expositionsende war, wurden die auf einem Deckglas ( $\varnothing$  10 mm) gewachsenen Zellen in eine Perfusionskammer überführt. Diese Kammer war an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss) integriert. Um das noch vorhandene extrazelluläre Fura-2-AM sowie das DMSO aus der Perfusionskammer auszuwaschen, wurden die Zellen für drei Minuten mit einem Medium (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Glucose und 10 mM HEPES) gespült. Danach wurden die Zellen bei 340 nm und 380 nm mittels einer 75W XBO Xenon Lampe in Verbindung mit einem Polychrom II Monochromator (T.I.L.L. Photonics GmbH, Deutschland) angeregt. Das Emissionslicht von 510 nm wurde mit einer digitalen CCD-Kamera (C4742-95, Hamamatsu Photonics KK, Japan) aufgenommen. Mit dem Softwareprogramm Aquacosmos (Hamamatsu Photonics KK, Japan) wurde, um  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu bestimmen, das Verhältnis der Anregung von 340 nm zu 380 nm errechnet. Alle Messungen des intrazellulären Kalziums ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) wurden etwa zehn Minuten nach der ELF-EMF Exposition gestartet und es wurden das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von vier bis acht Zellen einer Kulturschale gleichzeitig digitalisiert und später mit dem Softwareprogramm Origin (OriginLab Corporation, USA) ausgewertet.

### 2.3.2 Zwei - Elektroden Voltage - Clamp Analysen (TEVC)

Zur Untersuchung der biophysikalischen Eigenschaften hinsichtlich Temperatur, Spannungsabhängigkeit und Kinetik der hCx26 und rCx46 Halbkanäle wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik verwendet. Diese Methode wurde ebenfalls zur Analyse der Funktionalität von rCx46 Halbkanälen und nach einer ELF-EMF-Exposition während der Translation der cRNA in die Oozytenmembran herangezogen.

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik, die auf Arbeiten von Cole und Hodgkin (Cole, 1949, Hodgkin et al., 1949, Hodgkin und Huxley, 1952) zurückgeht, werden in die Connexone exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten, zwei intrazelluläre Elektroden eingestochen. Mittels dieser Elektroden kann der Stromfluss durch die Kanäle in der Oozytenmembran in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen werden (Stühmer, 1992). In Abb. 2.3.2 ist ein schematischer Aufbau des Messprinzips der



**Abbildung 2.3.2:** Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC)

Two-Electrode Voltage Clamp (TEVC) dargestellt. Mittels der Spannungs- (PE) und der Bad-Elektrode (BE) wird die Potentialdifferenz zwischen intrazellulärem Medium der Oozyte und dem extrazellulärem Badmedium gemessen. Entsprechend der Definition einer Erdung liegt das Potential der Badlösung bei 0 mV. Die gemessene Membran-spannung ( $U_m$ ) wird verstärkt und mit einer vorgegebenen Spannung ( $U_{com}$ ) verglichen. Die verstärkte Differenz vom Kommando- (bzw. Puls-) Potential und Membranpotential wird als Strom über die zusätzlich in die Oozyte eingestochene Strom-Elektrode (IE) appliziert und fließt über die Membran zur Erde (Bad-Elektrode). Dieser gemessene Strom ( $I_m$ ) entspricht dem Gesamtfluss an geladenen Teilchen durch alle Ionenkanäle, andere mögliche elektrogene Transportprozesse und Lecks in der Oozytenmembran. Bei einer starken Expression der Kanalproteine Connexin 46 und 26 (Cx46, Cx26) und der Wahl geeigneter Versuchsbedingungen dominiert der Strom durch die zu untersuchenden Halbkanäle (Connexone) der Proteine in der Oozytenmembran. Mittels eines geeigneten Messplatzaufbaus und der Ansteuerung über einen Computer mit dazugehörigen Software (HEKA Elektronik) lässt sich mit sogenannten Pulsprotokollen die Oozyte auf verschiedene Kommando-Potentiale ( $U_{com}$ ) klemmen und die resultierenden Ströme durch die Membran aufzeichnen.

### 2.3.2.1 Messplatzaufbau

Der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm Messplatz befand sich auf einem schwingungsgedämpften Steintisch und wurde, um äußere elektrische Störsignale zu verringern, von einem nach vorne offenen Faraday-Käfig umgeben. Alle leitenden Teile der Apparatur waren mit diesem Faraday-Käfig geerdet. Unter einer Stereolupe (GZ4, Leica)

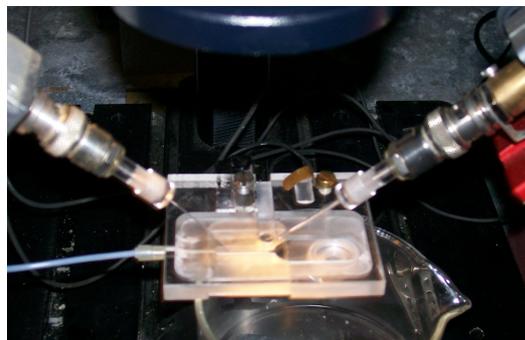


Abbildung 2.3.3: TEVC - Messplatzaufbau

war die Messkammer, in der die injizierten Oozyten platziert wurden, positioniert. In dieser Badkammer konnte mit einer peristaltischen Pumpe (LKB Pump P1, Pharmacia) ein gleichmäßiger Medienaustausch gewährleistet werden. Des Weiteren befand sich eine regelbare Temperatureinheit unter der Badkammer, sodass das die Oozyte umspülende Medium für die Versuche zum Temperatureinfluss auf verschiedene Temperaturen erwärmt bzw. gekühlt werden konnte. Die dreiachsigen Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann) zur Positionierung und Befestigung der Spannungs- und Strom-Elektrode waren zu beiden Seiten der Badkammer aufgestellt.

Die Datenverarbeitung dieses Versuchsaufbaus und die damit verbundenen Messungen erfolgten mit einem Verstärker (TEC 10CD, npi), einem Analog-Digital-Wandler (ITC16, Instrutech Cooperation) und einem mit diesen Geräten verbundenen Computer. Für die Datenaufnahme und die Applikation der Pulsprotokolle wurde in dieser Arbeit die Software Pulse (Version 8.09) von HEKA Elektronik verwendet.

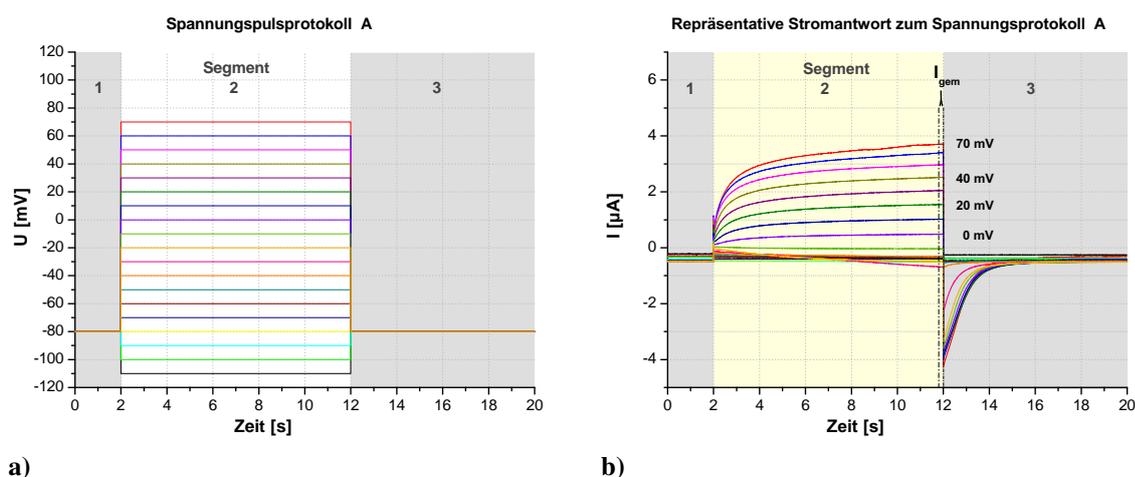
### 2.3.2.2 Elektroden und Messpipetten

Für die Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik wurden zwei Mikroelektroden und eine Bad-Elektrode benötigt. Die in die Oozyte gestochenen Mikroelektroden hatten die Aufgabe, eine vom extrazellulärem Medium unabhängige elektrische Leitung in das Zellinnere herzustellen. Diese drei Elektroden bestanden aus jeweils einem Silberdraht. Dieser Silberdraht wurde vor der Messung in einer 0,1 M HCl Lösung mittels Elektrolyse chloriert, da diese Silber/Silberchlorid (Ag/AgCl)-Elektroden nicht polarisierbar sind, den Übergang von Elektronenleitung im Draht und Ionenleitung in der Lösung verbessern und somit unverfälschte Messungen ermöglichen. Die Ag/AgCl-Elektroden (Spannungs- und Strom-Elektrode) wurden anschließend am Elektrodenhal-

ter befestigt. Für die Strom- und Spannungs-Elektrode wurden mit dem Glaspuller (PP-830, Narishige, Japan) Glaskapillare gezogen. Diese Mess-Spitzen wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, vorsichtig über die Ag/AgCl-Elektroden gezogen und mit den Mikromanipulatoren in die Badlösung in der Messkammer eingetaucht. Für die Bad-Elektrode wurde ein dünner Polyethylen-Schlauch mit 3 M KCl-Medium gefüllt, mit Agar (2 % Agar, 3 M KCl) von einer Seite verschlossen, über den chlorierten Silberdraht der Bad-Elektrode gezogen und ebenfalls in die Badkammer eingebaut. Nach der Überprüfung der Elektrodenwiderstände (Sollwert: 1 - 1,8 M $\Omega$ ) wurden die Elektrodenpotentiale auf Null abgeglichen. Nachdem eine Oozyte in die Badkammer plaziert und mit dem Messmedium gespült wurde, konnten die Spannungs- und die Strom-Elektrode vorsichtig in die Oozyte eingestochen werden und die Experimente entsprechend der Darstellung im nächsten Kapitel erfolgen.

### **2.3.2.3 Messprotokoll und Datenerfassung von Versuchen nach elektromagnetischen Exposition**

Für die Messungen der rCx46 injizierten Oozyten, die während der Translation der cRNA einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt waren, wurde der Stromfluss durch die rCx46 Halbkanäle in der Membranoberfläche untersucht. Dafür wurde ein Spannungspuls auf die Oozyte appliziert, der in Abbildung 2.3.4 a) dargestellt ist. Die Oozyte wurde auf ein festes Potential geklemmt, das Haltepotential. Bei diesem Haltepotential von -90 mV (bzw. -80 mV) befinden sich die rCx46 Halbkanäle in der Oozytenmembran im geschlossenen Zustand und es fließt kein Strom. Ausgehend von diesem Haltepotential (Abb. 2.3.4 a), Segment 1) wurde nach zwei Sekunden für zehn Sekunden ein Spannungspuls auf die Oozyte appliziert (Aktivierungspuls: Abb. 2.3.4 a), Segment 2). Nach diesen zehn Sekunden erfolgte keine Änderung der Stromamplitude (Gleichgewichtszustand ( $I_{ss}$ ), Abb. 2.3.4 b), Segment 2) und es wurde ein Spannungssprung zurück zum Haltepotential für acht Sekunden durchgeführt (Abb. 2.3.4 a), Segment 3). Durch die Spannungsänderung induziert schlossen sich die Halbkanäle (Deaktivierung: Abb. 2.3.4 b), Segment 3). Nach diesem durchgeführten Spannungspuls wurde die Oozyte für 40 Sekunden auf dem Haltepotential gehalten. Es fand keine Aufzeichnung dieser Werte statt. Diese Testspannungssprünge wurden in 10 mV Schritten von -100 mV bis +70 mV alternierend durchgeführt.

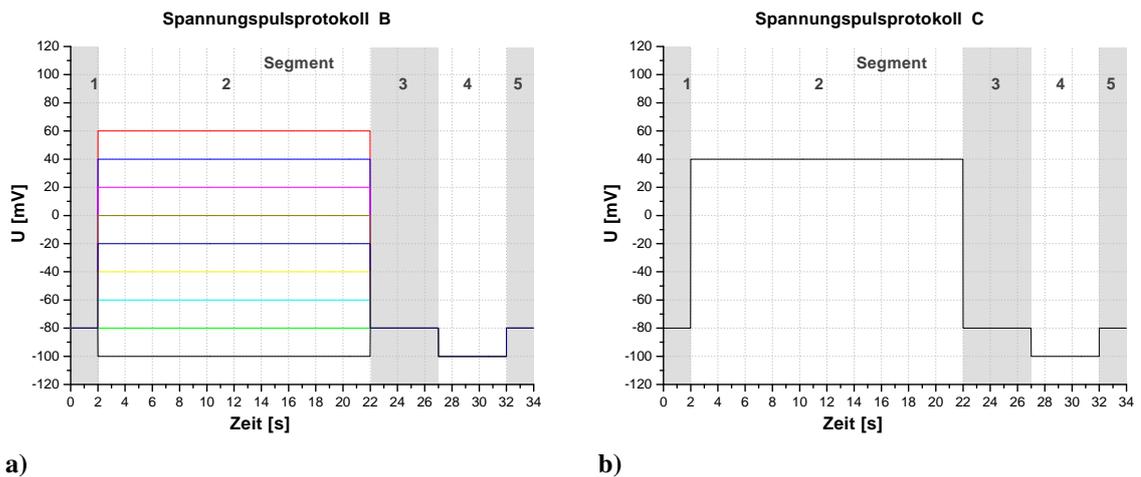


**Abbildung 2.3.4:** Spannungspulsprotokoll (a) und repräsentative Stromantwort (b) zur Untersuchung von rCx46 Halbkanälen in der *Xenopus laevis* Oozytenmembran. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Bereich in dem ( $I_{gem}$ ) zur Berechnung des steady state Stroms ( $I_{ss}$ ) als Mittelwert über 0,02 % der Messung entnommen wurde.

#### 2.3.2.4 Messprotokoll und Datenerfassung von Versuchen bei thermischer Applikation

Für die Messungen der hCx26-ASCx38, ASCx38 und rCx46 injizierten *Xenopus laevis* Oozyten, die während der Messung mit der TEVC unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt waren, wurde das Spannungspulsprotokoll in Abbildung 2.3.5 a) verwendet. Auch hier wurde die Oozyte für zwei Sekunden auf einem Haltepotential (-80 mV) gehalten und es folgte ein Spannungssprung für 20 Sekunden. Danach folgte eine Rückkehr für fünf Sekunden auf das Haltepotential, ein fünf Sekunden andauernder Sprung auf -100 mV und ein Sprung zurück auf das Haltepotential (28 s). Wie das oben beschriebene Pulsprotokoll zeigt, dauerte ein Spannungspuls 60 Sekunden, von denen 32 Sekunden aufgezeichnet wurden. Die Spannungssprünge waren in 20 mV Schritten von -100 mV bis +60 mV alternierend angelegt. Während der Applikation dieser Pulsprotokolle wurden verschiedene Temperaturen angelegt und die Stromantworten der Oozyten mit dem Programm Pulse (HEKA Elektronik) aufgenommen. Eine repräsentative Stromantwort auf das Spannungspulsprotokoll B ist in der Abbildung 2.3.6 a) dargestellt. Während der Applikation des Spannungspulsprotokolls B (Abb. 2.3.5 a)) wurde die Temperatur des die Oozyte umgebenden Badmediums verändert, aber diese blieb innerhalb des Durchlaufs eines Pulsprotokolls (Zeitdauer: 9 min) konstant. In einer weiteren Untersuchung wurde ein Spannungspuls (Abb. 2.3.5 b)) mit einem Spannungssprung von +40 mV vom Haltepotential (-80 mV, 2 s) für 20 Sekunden angelegt. Nach der Repolarisation zurück zum Haltepotential für fünf Sekunden folgte ein Pulssprung auf -100 mV (5 s) und wieder zu-

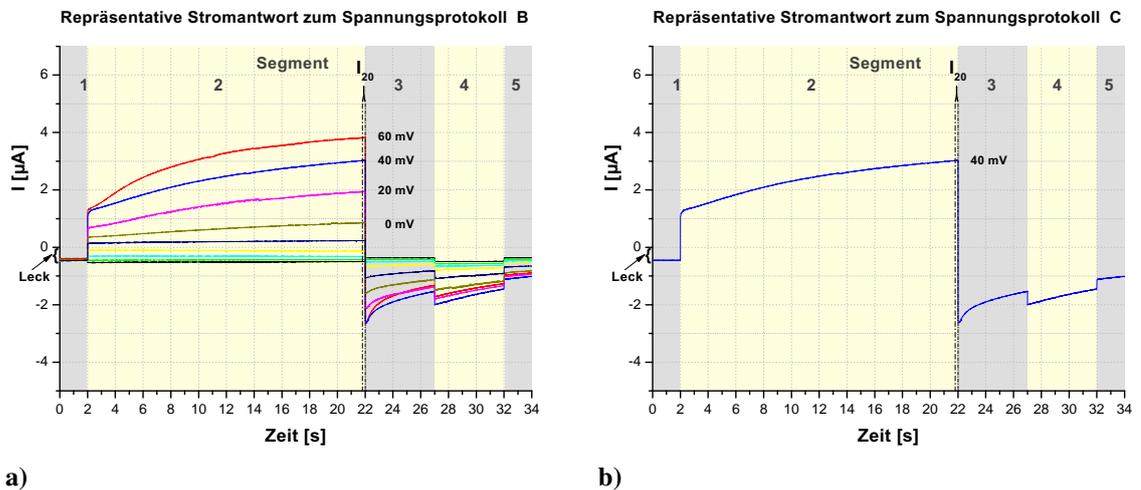
rück zum Haltepotential für 28 Sekunden. Während der Wiederholung dieses Testpulses wurde die Temperatur des Badmediums konstant von 7,1°C auf 28,7°C erwärmt (bzw. von 28,7°C auf 7,1°C heruntergekühlt). Eine repräsentative Stromantwort auf den Spannungspuls C wird in Abbildung 2.3.6 b) gezeigt.



a)

b)

**Abbildung 2.3.5:** Spannungspulsprotokolle zur Messung von in *Xenopus laevis* exprimierten rCx46 Halbkanälen



a)

b)

**Abbildung 2.3.6:** Repräsentative Stromantworten von in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten Halbkanälen auf die in Abb. 2.3.5 a) und 2.3.5 b) dargestellten Spannungspulsprotokolle B und C. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Bereich, in dem der Strom ( $I_{20}$ ) als Mittelwert über 0,02 % der Messung entnommen wurde.

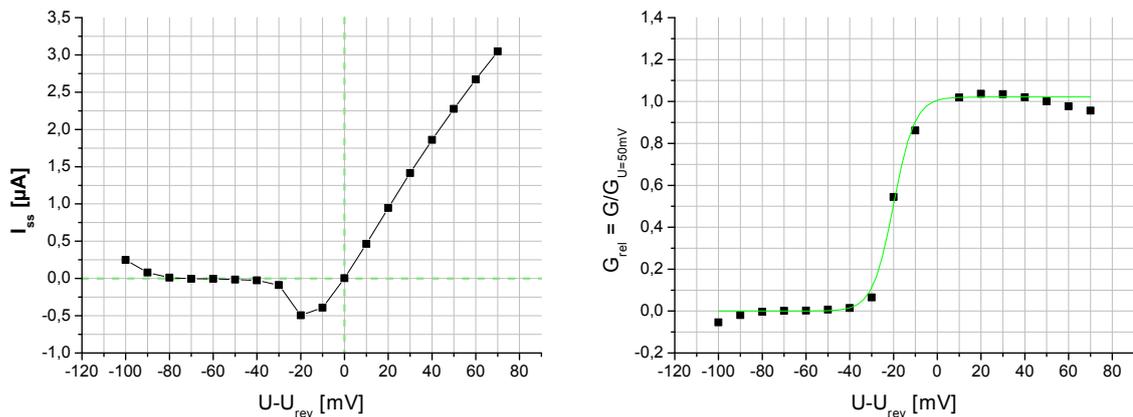
### 2.3.2.5 Auswertung der elektrophysiologischen Versuche

Um die Daten, Gleichgewichtsstrom ( $I_{ss}$ , steady-state) für rCx46 injizierte und ( $I_{20}$ ) für hCx26-ASCx38 injizierte Oozyten) sowie die Leckströme ( $I_{Leck}$ ) zu untersuchen, wurden die Stromrelaxationen mit dem Programm Pulse (HEKA Elektronik) exportiert und mit dem Programm Origin eingelesen und analysiert.

#### Auswertung für die rCx46 injizierten *Xenopus laevis* Oozyten

Die Stromamplituden der Oozyte als Antwort auf unterschiedliche Kommandospannungen wurden nach Erreichen der Sättigung (gestrichelten Linien in Abbildung 2.3.4 b) abgenommen. Die beim Haltepotential, bei dem der exprimierte Halbkanal rCx46 geschlossen sein sollte (Paul et al., 1991), entstehenden minimalen Ströme wurden entsprechend in den Amplituden korrigiert. Die Ströme beim angelegten Haltepotential, die dem Gesamtfluss an geladenen Teilchen durch die Oozytenmembran entsprachen, ließen eine Perforation der Membran oder intrinsische Kanäle (z. B. Cx38) annehmen. Lag dieser Strom zwischen  $-1 \mu\text{A}$  und  $0 \mu\text{A}$ , wurden von den Gleichgewichtsströmen ein als linear angenommener Leckstrom subtrahiert. Stromamplituden von Oozyten mit einem Leckstrom  $< -1 \mu\text{A}$  wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Mit der Betrachtung der Membran als ohmschen Widerstand erfolgte die Berechnung dieses Leckstroms durch eine lineare Regression im Intervall von  $-100 \text{ mV}$  bis  $+70 \text{ mV}$ . Dabei wurden die gemessenen Stromwerte ( $I_{gem}$ ) zu den Spannungswerten des Haltepotential, den benachbarten Spannungswerten und dem angenommenen Punkt ( $0 \text{ A}$ ,  $0 \text{ V}$ ) verwendet. (Der Wert ( $0 \text{ A}$ ,  $0 \text{ V}$ ) ergab sich aus der Annahme eines ohmschen Widerstandes.) Mit der Analysesoftware Origin (OriginLab) wurde durch diese vier Werte eine lineare Regression durchgeführt. Dabei wurde das Modell der geschätzten linearen Regression herangezogen ( $I_l = A + B * U$ ), wobei die Parameter A und B nach der Methode der kleinsten Quadrate geschätzt wurden. Diese Leckgerade ( $I_l$ ) wurde von der gemessenen Strom-Spannungskurve ( $I_{gem}(U)$ ) abgezogen ( $I_{gem} - I_l = I_{ss}$ ). Bei dieser leckreduzierten Strom-Spannungskurve wurde anschließend das Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) ermittelt. Im Umkehrpotential wechselt der Stromfluss über die Membran der Oozyte die Polarität. Zunächst wurde eine Polynom-Regression (Origin, OriginLab) mittels eines Regressionsmodells dritter Ordnung ( $I = A + B * U + C * U^2 + D * U^3$ ) durch die letzten Messwerte  $I(U) < 0$  und die beiden ersten  $I(U) > 0$  durchgeführt. Nach der Ermittlung der geschätzten Parameter (A, B, C, D) dieses Polynoms dritten Grades ergab sich durch Nullstellenbestimmung das Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) der Kurve. Die Spannung

der Strom-Spannungs-Kennlinie wurde um dieses Umkehrpotential reduziert und die Mittelwerte der leckreduzierten Gleichgewichtsströme ( $I_{ss}$ ) der einzelnen Experimente konnte gebildet werden. Ein Beispiel für eine leckreduzierte und um das Umkehrpotential verschobene Strom-Spannungs-Kurve ist in Abbildung 2.3.7 a) dargestellt.



a) Der lecksubtrahierte steady state Strom ( $I_{ss}$ ) aus dem gekennzeichneten Bereich der repräsentativen Stromantwort aus Abb. 2.3.4 b) als Funktion über die um das Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) reduzierte Spannung ( $U$ )

b) Der relative Leitwert ( $G_{rel}$ ) des Stroms aus Abb. 2.3.7 a) als Funktion über die um das Umkehrpotential reduzierte Spannung ( $U-U_{rev}$ )

**Abbildung 2.3.7:** Strom- und relative Leitwert-Spannungs-Kurve zum Spannungspulsprotokoll A

Der Leitwert ( $G$ ) eines Widerstandes ist der Kehrwert des Widerstandes. Somit ergibt sich der Leitwert der Membran als Quotient der Differenz des gemessenen Gleichgewichtsstroms ( $I_{gem}$ ), bei dem die Proteinkanäle geöffnet sein sollten und dem Leckstrom ( $I_l$ ) durch die um das Umkehrpotential reduzierte Spannung ( $U-U_{rev}$ ) (Gl. 2.3.2).

$$G(U) = \frac{I}{U} = \frac{I_{gem} - I_l}{U - U_{rev}} = \frac{I_{ss}}{U - U_{rev}} \quad (2.3.2)$$

Ein Beispiel für eine Leitwertkurve ist in der Abbildung 2.3.7 b) zu sehen. Die Mittelwerte der Leitwerte wurden aus den zu jedem Experiment separat berechneten Leitwerten der rCx46 exprimierten Oozyten gebildet und bei +50 mV normiert ( $G_{rel} = G(U) / G(+50\text{mV})$ ). Diese relative Leitwertkurve konnte mit einer Boltzmann-Funktion (Gl. 2.3.3) angepasst werden (Spray et al., 1981, Adam et al., 1977).

$$G_{rel} = \frac{1}{1 + e^{((U_{1/2} - U) \cdot \frac{zF}{RT})}} \quad (2.3.3)$$

mit molare Gaskonstante	R	= 8,314472	$\left[\frac{J}{mol\ K}\right]$
Faraday-Konstante	F	= 96485,3399	$\left[\frac{C}{mol}\right]$
halbmaximale Aktivierungsspannung	$U_{1/2}$		[V]
Temperatur	T		[K]
Ionenvaleanz	z		

Die Steigung ( $zF/RT$ ) der Kurve (Gl. 2.3.3) ergab sich mit den Konstanten und einer Temperatur von 20°C zu der Gleichung 2.3.4.

$$G_{rel} = \frac{1}{1 + e^{((U_{1/2}-U)\left(\frac{0,025}{z}\right))}} \quad (2.3.4)$$

Mit dieser Boltzmann-Funktion wurden die relativen Leitwertkurven mit dem Software Programm Origin 7.0 berechnet und die Parameter  $U_{1/2}$  und  $z$  ermittelt. Um die Kinetik der Aktivierung (rote Kurve in Abb. 2.3.8) und die Deaktivierung (blaue Kurve in Abb. 2.3.8) zu untersuchen, wurden diese mit einer Exponentialfunktion angenähert. Die Aktivierung kann mittels der Summe zweier Exponentialfunktionen mit den Amplituden  $a_1$ ,  $a_1$  und den Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_1$  dargestellt werden (Gl. 2.3.5). Die Zeitkonstante der Deaktivierung wurde durch die Annäherung an die Gleichung 2.3.6 bestimmt.

$$I_t = a_0 + a_1 \cdot (1 - e^{(-t/\tau_1)}) + a_2 \cdot (1 - e^{(-t/\tau_2)}) \quad (2.3.5)$$

$$I_t = a_0 + a_1 \cdot (1 - e^{(-t/\tau)}) \quad (2.3.6)$$

### Auswertung für die hCx26-ASCx38 und ASCx38 injizierten *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Messungen der hCx26-ASCx38 und ASCx38 injizierten Oozyten wurden nach Applikation eines Pulsprotokolls (Abb. 2.3.5) die Stromwerte zu den einzelnen Spannungen am Ende des 20 Sekunden andauernden Aktivierungspulses ausgelesen (gestrichelte Linie in Abb. 2.3.6). Die Stromamplituden erreichten für die hCx26-ASCx38 injizierten Oozyten am Ende des Spannungspulses nicht den Gleichgewichtsstrom (steady state), weshalb als Bezeichnung für diesen Analysepunkt des Stroms  $I_{20}$  gewählt wurde. Von  $I_{20}$  wurde der Leckstrom ( $I_{Leck}$ , Strom der beim Haltepotential (-80 mV) gemessen wurde, in Abb. 2.3.6 mit einer geschweiften Klammer markiert) subtrahiert.

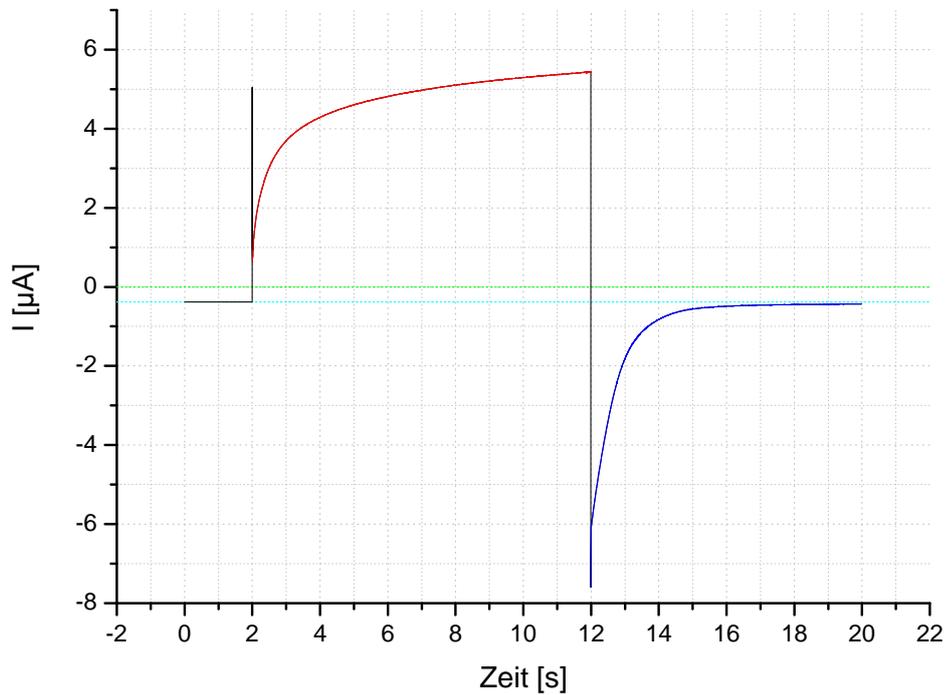
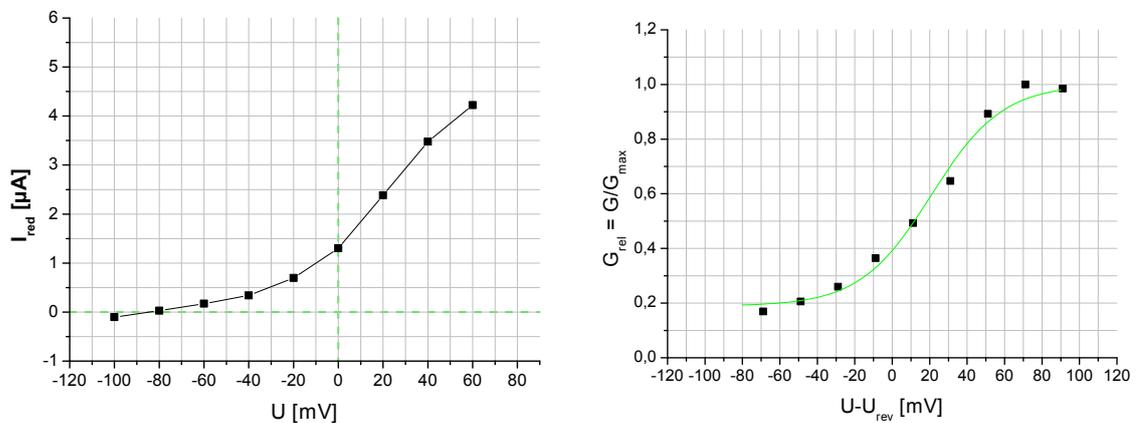


Abbildung 2.3.8: Aktivierung / Deaktivierung von Halbkanal-Strömen



a) Der leckreduzierte Strom ( $I_{red}$ ) aus dem gekennzeichneten Bereich der repräsentativen Stromantwort aus Abb. 2.3.5 als Funktion über die Spannung ( $U$ )

b) Der relative Leitwert ( $G_{rel}$ ) des Stroms  $I_{20}$  als Funktion über die um das Umkehrpotential reduzierte Spannung ( $U-U_{rev}$ )

Abbildung 2.3.9: Strom- und relative Leitwert-Spannungs-Kurve zum Spannungspulsprotokoll B

In der Abbildung 2.3.9 ist ein leckreduzierter repräsentativer Strom-Spannungsverlauf von  $I_{red}$  als Funktion zur angelegten Spannung  $U$  dargestellt.

Der Leitwert ( $G$ ) wurde mit der Gleichung 2.3.7 berechnet und auf  $G_{max}$  normiert.

$$G(U) = \frac{I}{U} = \frac{I_{20}}{U - U_{rev}} \quad (2.3.7)$$

Diese Leitwertkurve wurde mit einer Boltzmann-Funktion 2.3.8 und der Software Origin 7.0 angenähert.

$$G_{rel} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{((U_{1/2} - U)(var \cdot z))}} + A_2 \quad (2.3.8)$$

Hierbei sind  $U_{1/2}$  die halbmaximale Aktivierungsspannung,  $A_1$  ( $A_1 = 1$ , da  $G$  normiert wurde) und  $A_2$  die Amplituden. Die Variable  $var$  setzt sich aus den in Gleichung 2.3.3 definierten Parametern molare Gaskonstante ( $R$ ), Faraday-Konstante ( $F$ ) und der Temperatur ( $T$ ) zusammen ( $var = F/RT$ ). Für die verschiedenen Temperaturen ergaben sich folgende Steigungen der Boltzmann-Funktion mit denen die Parameter  $U_{1/2}$  und  $z$  errechnet wurden.

Temperatur [°C]	7,1	11,4	15,3	20,2	24,5	28,7
Temperatur [K]	280,25	284,55	288,45	293,35	297,65	301,85
$var = F/RT$	41,41	40,78	40,23	39,56	38,99	38,44

**Tabelle 2.3.1:** Variablen für die Boltzmann-Funktion

### 2.3.3 Aufbau zur Bestimmung der elektromagnetischen Feldeinwirkung

Das Expositionssystem für niederfrequente elektromagnetische Felder (ELF-EMF) wurde von der IT'IS-Foundation (Foundation for Information Technologies in Society, Zürich Schweiz) bereitgestellt.

Diese Anlage war so optimiert, dass die in den Boxen platzierten Petrischalen einem homogenen elektromagnetischen Feld ausgesetzt waren. Dafür wurden im Vorfeld der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen Vorversuche von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Kuster (IT'IS-Foundation, Schweiz) durchgeführt. In diesen Versuchen wurden die verschiedenen Petrischalengrößen, die verschiedenen Zellmedien und deren Füllhöhe in den Petrischalen als Parameter untersucht, die das von dem System erzeugte elektromagnetische Feld beeinflussen können (Schuderer et al., 2004).

Der Aufbau besteht aus zwei identisch aufgebauten Boxen (Abb. 2.3.10), die nebeneinan-

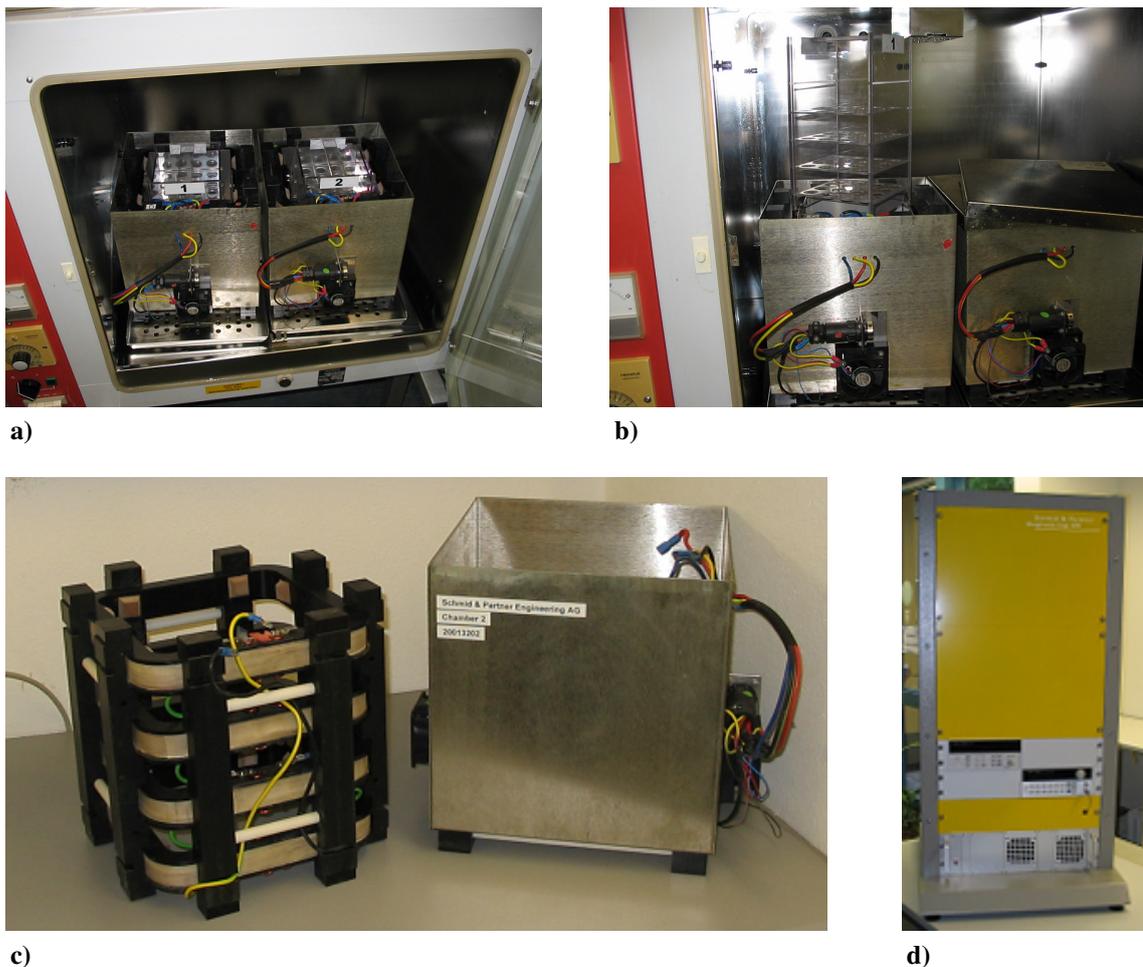


Abbildung 2.3.10: Ansicht der ELF-EMF-Anlage (IIS, IT'IS, ETH Zürich, Schweiz)

der für die Messungen der *Xenopus laevis* Oozyten in einem kommerziellen Brutschrank bei 17°C platziert waren. Für die Messungen mit Zellen, die eine konstante Umgebungsbedingung von 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und eine Luftfeuchtigkeit von 95 % benötigten, wurde der Aufbau in einen Klimabrutschrank der Firma Heraeus (B 5060 EK/CO<sub>2</sub>, Heraeus) eingebaut (Abb. 2.3.10 a) und 2.3.10 b)).

Jedes dieser beiden Spulensysteme bestand aus vier quadratischen Spulenuntereinheiten, die symmetrisch um das Spulenzentrum angeordnet waren. Die zwei äußeren Spulen bestanden aus 56 Windungen und die zwei inneren Spulen aus 50 Windungen (Abb. 2.3.10 c)). Dieses Spulensystem befand sich in einer  $\mu$ -Metall-Box, sodass äußere elektromagnetische Störungen ausgeschlossen werden konnten. Durch die Abschirmung konnte auch das in der  $\mu$ -Metall-Box erzeugte elektromagnetische Feld nicht nach außen dringen und ermöglichte so die Platzierung der zwei Boxen nebeneinander ohne gegenseitige Beeinflussung in einem Klima-Brutschrank. Im Zentrum der Vier-Spulen-Anordnung befand sich ein aus Plexiglas bestehender Halter für die Petrischalen (Abb. 2.3.10 a)). Dieser Schalenhalter (Abb. 2.3.10 b)) konnte über einen abnehmbaren aus  $\mu$ -Metall bestehenden Deckel aus der Box genommen und mit den Proben bestückt bzw. beladen werden. Dieser Plexiglashalter war von einer elektrisch geerdeten korrosionsbeständigen Stahl-Abschirmung umgeben, die sich zwischen den Spulen und dem Schalenhalter befand. Dieses Schild diente zur Abschirmung von störenden, vom System erzeugten elektrischen Feldern. Die Stahl-Abschirmung leitete zu dem die vom Strom in den Spulen erzeugte Wärme ab und die von einem in der Box installierten Lüfter erzeugte kühle Luft von unten an die Petrischalen und von oben an die Spulen weiter. An diesem Stahl-Schild war die in jeder Box installierte Temperaturelektrode befestigt, die während der Messung kontinuierlich die Temperatur des Systems aufnahm. Über einen elektronischen Messaufbau (Abb. 2.3.10 d)) und der dazugehörigen Software wurde die Applikation der ELF-EMF appliziert und kontrolliert. Somit konnte auch die Temperatur über einen Abgleich der beiden Temperaturen in den Boxen über die Lüfter konstant gehalten werden.

Nach Applikation des gewünschten elektromagnetischen Feldes, bei der das Zufallsprinzip über die Wahl, in welcher Box das ELF-EMF induziert wurde, entschied, wurden die kontinuierlich gewonnen Messdaten (Magnetfeld, Temperaturen in den Boxen und Lüfterdaten während des Experimentes) verschlüsselt aufgenommen. Die exponierten Zellen wurden mit den oben genannten Methoden untersucht und die Messdaten ausgewertet. Nach der abgeschlossenen Analyse der Messwerte wurden die codierten Expositionsdaten über die Expositionsparameter der Versuche zur Auswertung an die Mitarbeiter der Ar-

beitsgruppe Prof. Kuster (IT'IS-Foundation, Schweiz) verschickt. Die zurückerhaltenen entschlüsselten Expositionsdaten wurden anschließend den Ergebnissen der einzelnen Expositionen zugeordnet und die Einhaltung der gleichen Umgebungsbedingungen in den Boxen wurde überprüft. Im Anhang E ist in den Abbildungen E.1 bis E.4 ein Beispiel einer Auswertung dargestellt: In diesem Experiment wurde ein elektromagnetisches 50 Hz Feld mit einer magnetischen Flussdichte von 1 mT über 18 h in der Box 1 angelegt. Das Feld in Box 1 wurde in einem unterbrochenen Rhythmus (unterbrochenes ELF-EMF) angelegt: einer Exposition von fünf Minuten folgte eine zehnminütige Pause. In Abbildung E.2 sind die Temperaturen und deren Differenz der beiden Spulensysteme aufgetragen, die während der Exposition in den Boxen auftraten. Die maximale Temperaturdifferenz zwischen den Boxen in diesem Versuch lag bei  $(0,26 \pm 0,018)^\circ\text{C}$ , dies entspricht den hier durchgeführten weiteren Expositionen. Die kontinuierlichen Messwerte des Magnetfeldes in Box 1 und die Lüfter-Ströme beider Boxen sind in den Abbildungen E.3 und E.4 dargestellt.

### 2.3.4 Statistik

Die mittleren Standardfehler (sem, standard error of mean, Gl. 2.3.10) bzw. Standardabweichungen (sd, standard deviation, Gl. 2.3.9) im Ergebnisteil beziehen sich auf die berechneten Mittelwerte der Auswertungen und wurden wie folgt errechnet:

$$sd = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.3.9)$$

$$sem = \frac{sd}{\sqrt{n}} \quad (2.3.10)$$

mit  $\bar{x} := \text{Mittelwert der Messwerte}$   
 $n := \text{Anzahl der Messwerte}$

Bei den Berechnungen der relativen Mittelwerte wurden die relativen Fehler dieser Mittelwerte herangezogen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Elektrophysiologische Untersuchungen von Connexinen unter Temperatur- und EMF-Einfluss**

Gap Junction Kanäle und Connexone können durch viele verschiedene Mechanismen reguliert und beeinflusst werden. So können Änderungen der Phosphorylierung (Kwak und Jongsma, 1996, Moreno und Lau, 2007), der Ionenkonzentrationen (Dhein et al., 2002) oder des pH- Wertes (Trexler et al., 1999) das Schaltverhalten der Kanäle bzw. der Halbkanäle verändern. Da die Gap Junctions unter anderem durch die Koordination der Proliferation und Aktivität einzelner Zellen eine wichtige Position in der Zell-Zell-Kommunikation einnehmen, nehmen sie auch an der Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung teil (Goodenough et al., 1996, Laird, 2006). Eine weitere Möglichkeit einer Gap Junction Regulation könnte die externe Beeinflussung des Systems sein, wie z. B. Änderung der Umgebungstemperatur oder Einwirkung eines elektromagnetischen Feldes. Hierbei könnten höherfrequente elektromagnetische Felder mit einer thermischen Wirkung einher gehen, d. h., dass eine Erwärmung des Gewebes / der Zellen durch Absorption elektromagnetischer Strahlung stattfindet.

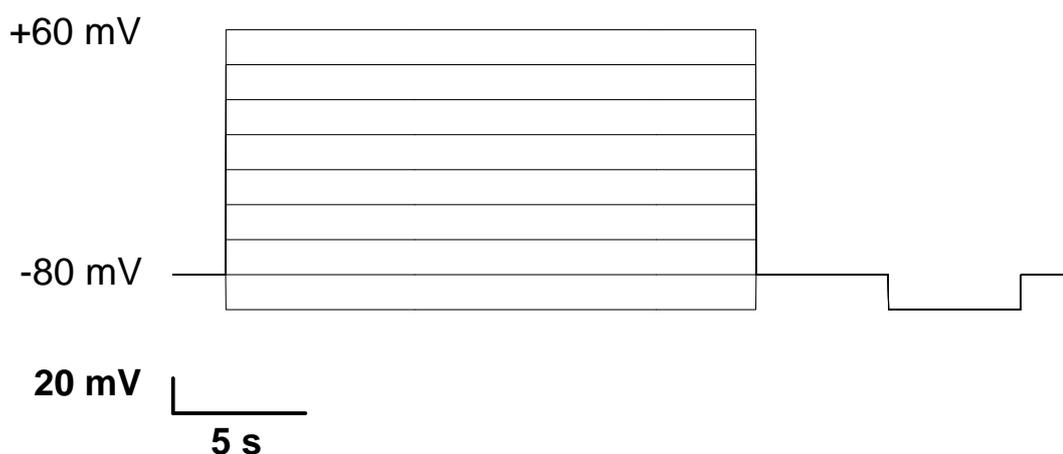
In den folgenden Abschnitten wurde die Fragestellung untersucht, ob die Temperatur hCx26 und rCx46 Halbkanäle beeinflusst. An diesem System sollte dann die Funktionalität von in exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten rCx46 Halbkanälen betrachtet werden, die während der Translationsphase des Proteins einem niederfrequentem elektromagnetischem Feld ausgesetzt waren.

#### **3.1.1 Einfluss der Temperatur auf Connexin 26 (Homo sapiens) - hCx26 - Halbkanäle**

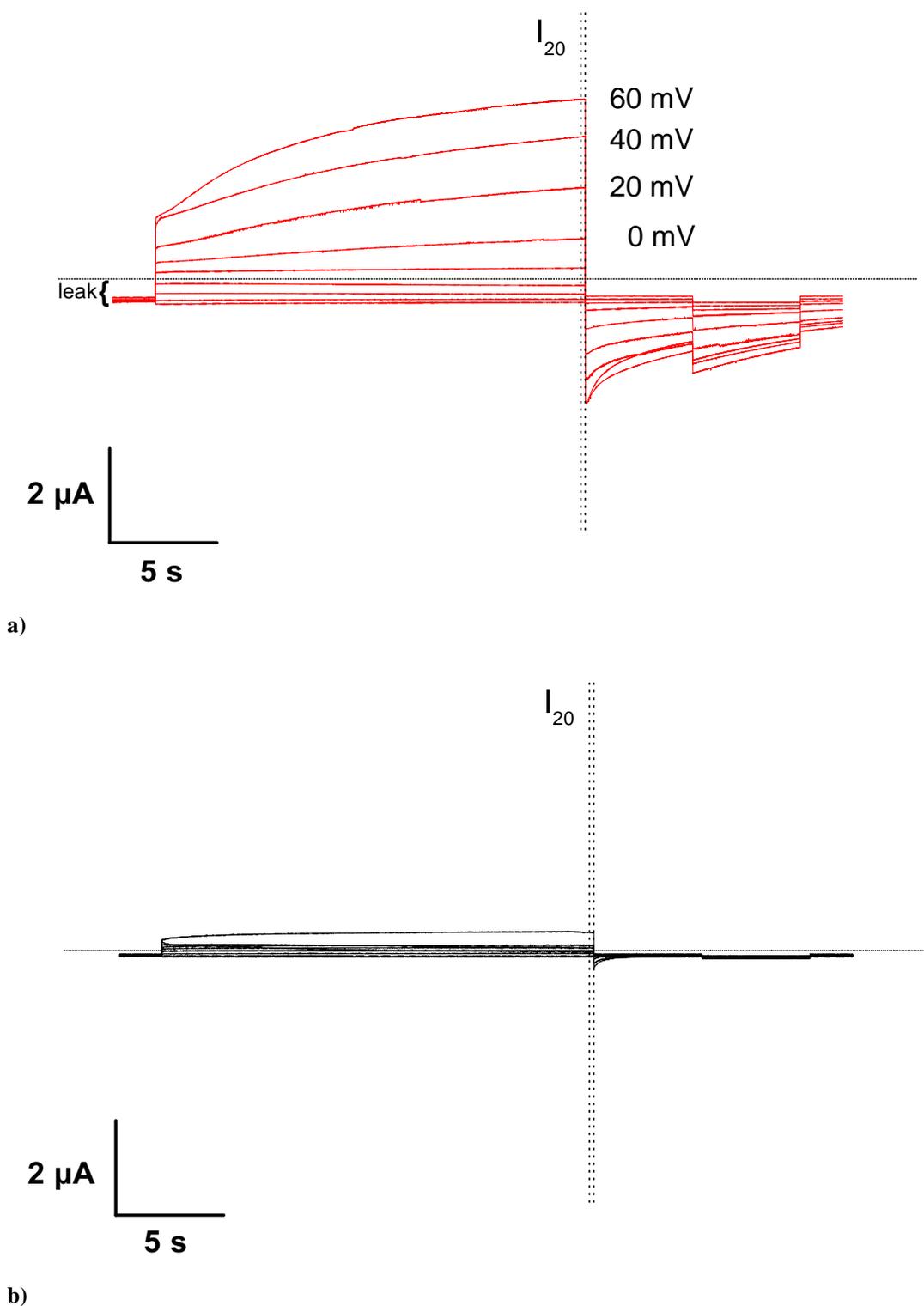
In Experimenten zur Gap Junction Kopplung im Cortischen Organ konnte gezeigt werden, dass die elektrische Kopplung durch Kühlung von 35°C auf 17°C mit einer 15 - 75 %igen Verminderung der Kopplung verbunden war (Santos-Sacchi, 1986). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt durch Erwärmung reversibel war. Jedoch ist unklar, ob an diesem Effekt die Kopplung beteiligt ist oder die Temperatur einen Einfluss auf die Connexin-Aktivität hat. Da Cx26 eines der Connexine ist, das in einer hohen Expressionsrate in Cochlear Zellen vorkommt (Kikuchi et al., 1995, 2000), könnte es an der

temperaturabhängigen Kopplung der Gap Junctions beteiligt sein.

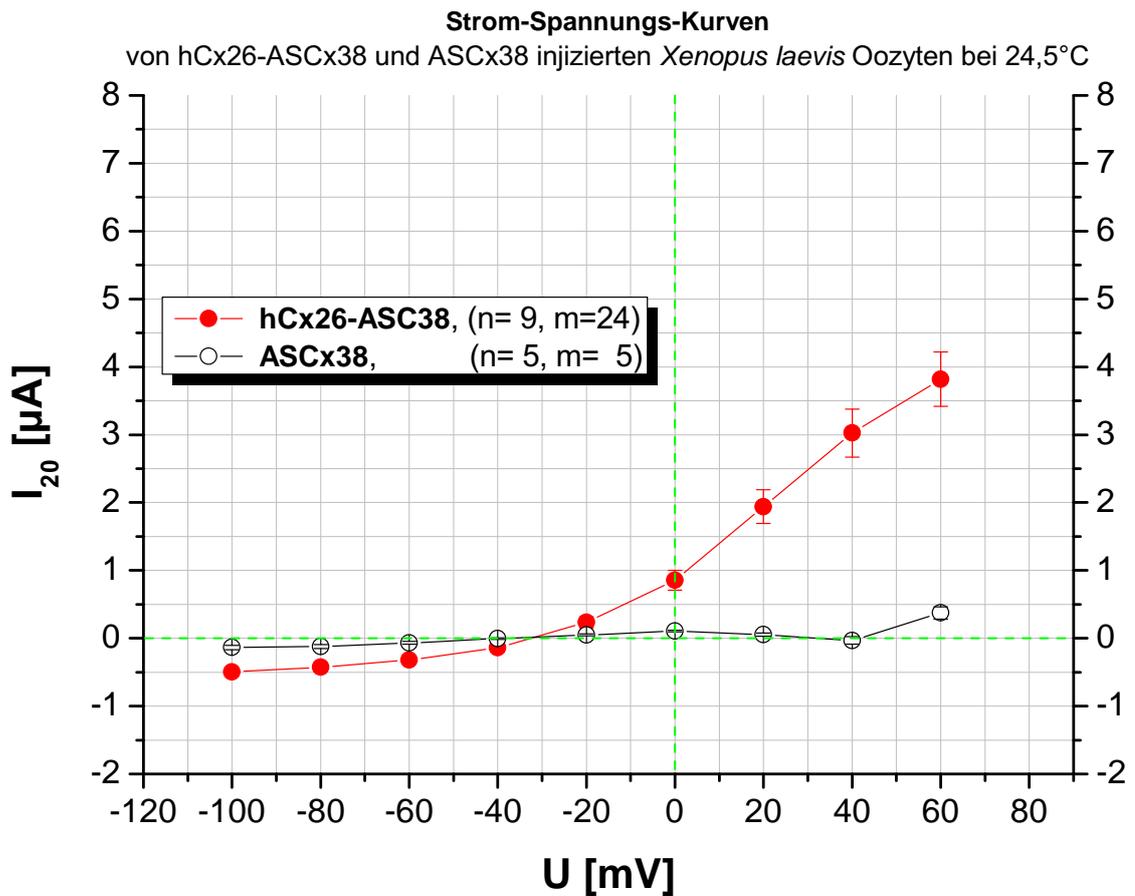
Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der Temperatur sich auf die Funktion von hCx26 Halbkanälen auswirkt, wurden in *Xenopus laevis* Oozyten hCx26 RNA und Antisense Cx38 (ASCx38) zur Expression gebracht. Die Kontroll-Oozyten, die zum Vergleich der Messungen herangezogen wurden, erhielten eine Injektion nur mit ASCx38 mit der gleichen Konzentration und dem gleichen Volumen wie sie in den hCx26-ASCx38 injizierten Oozyten vorhanden waren. Der Antisense Primer dient dazu, endogene Expression von *Xenopus* Cx38 zu verhindern. Die anschließenden Messungen mit der Zwei-Elektroden Voltage-Clamp Technik wurden zwei bis vier Tage nach der Injektion durchgeführt. In Abbildung 3.1.1 ist noch einmal das Spannungspulsprotokoll dargestellt, das auf die Oozyten appliziert wurde. In Abbildung 3.1.2 a) und Abbildung 3.1.2 b) sind die korrespondierenden Stromantworten von hCx26-ASCx38 und ASCx38 (Kontrolle) exprimierten Oozyten auf dieses Pulsprotokoll bei einer Temperatur von 24,5°C dargestellt. Die gestrichelte Linie in Abbildung 3.1.2 markiert das Intervall, in dem die Stromwerte ( $I_{20}$ ) für die Strom-Spannungs-Kurve abgelesen wurden. Diese Werte wurden nach Abzug des Leckstroms in Abbildung 3.1.3 als Funktion über die Spannung aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass hCx26 bei der polarisierenden Spannung auswärtsgerichtete Ströme vermittelt, die bei den Kontroll-Oozyten nicht beobachtet werden konnten.



**Abbildung 3.1.1:** Spannungspulsprotokoll zur Analyse von in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten hCx26-ASCx38 Halbkanälen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm Technik

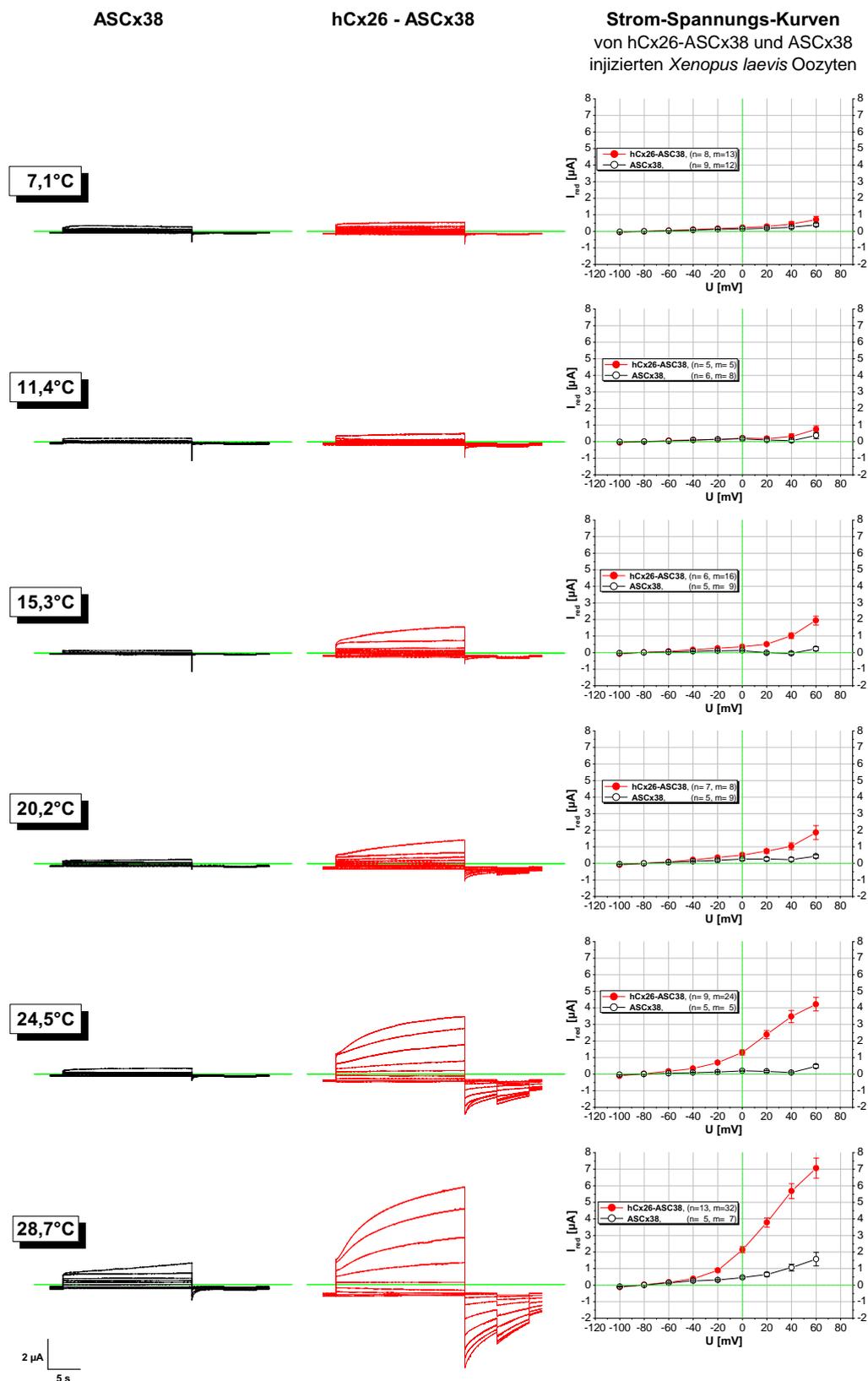


**Abbildung 3.1.2:** Analyse von in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten hCx26-ASCx38 Halbkanälen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm Technik. **(a)** und **(b)**: Mittelwert der Stromamplituden als resultierende Antwort auf die Spannungspulse der mit hCx26-ASCx38 (b:  $n=9$ ,  $m=24$ ) injizierten *Xenopus laevis* und ASCx38 injizierten Kontroll-Oozyten (c:  $n=5$ ,  $m=5$ ) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Badmedium bei einer Temperatur von  $24,5^\circ\text{C}$ . ( $n$ :=Anzahl der Oozyten,  $m$ :=Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden.)



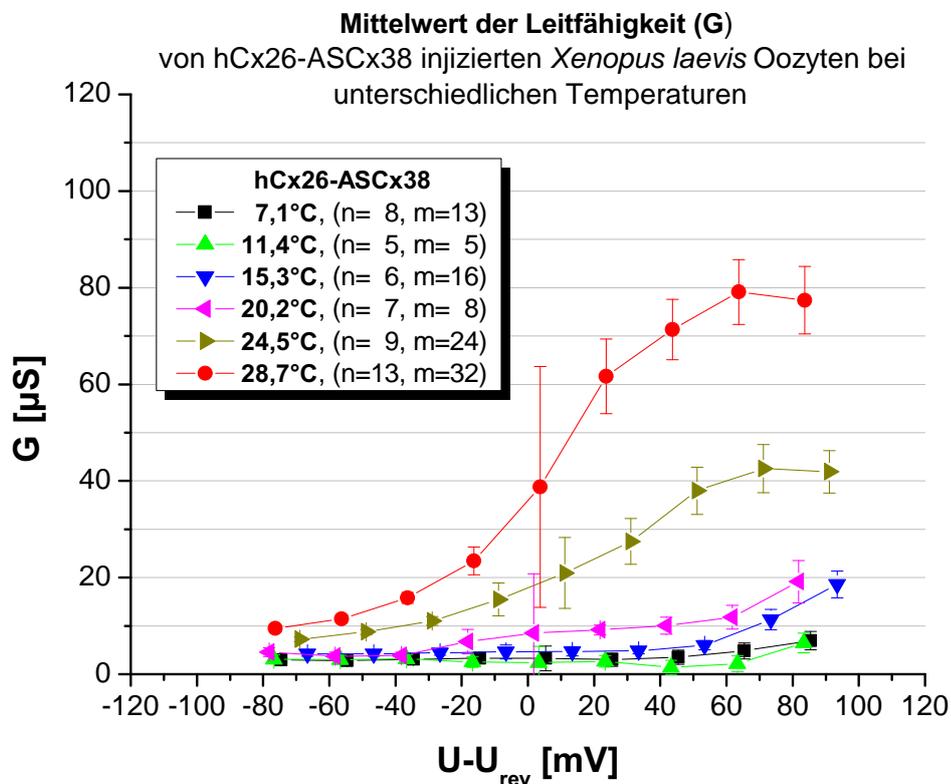
**Abbildung 3.1.3:** Mittelwert  $\pm$  sem der Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) der mit hCx26-ASCx38 injizierten *Xenopus laevis* und ASCx38 injizierten Kontroll-Oozyten und hCx26-ASCx38 in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Badmedium bei einer Temperatur von 24,5°C. (n := Anzahl der Oozyten, m := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden.)

Die Abbildung 3.1.4 zeigt die durchschnittlichen Stromamplituden von ASCx38 (Kontrolle, linke Seite) und hCx26-ASCx38 (Mitte) Oozyten während der Exposition verschiedener Temperaturen im Intervall von 7,1°C bis 28,7°C. Die dazugehörigen Mittelwerte der Strom-Spannungs-Kurven sind auf der rechten Seite der Abbildung 3.1.4 mit dem dazugehörigen Standardfehler (sem) aufgetragen. Die hCx26-ASCx38-injizierten Oozyten zeigen, dass ihre Stromamplituden und damit die Stromkurven in Abhängigkeit zum angelegten Spannungspuls mit zunehmender Temperatur ansteigen. Darüber hinaus zeigen die Stromamplituden zu einem Spannungspuls  $> -20$  mV der hCx26-ASCx38 injizierten Oozyten bei zunehmender Temperatur einen sigmoiden Verlauf.



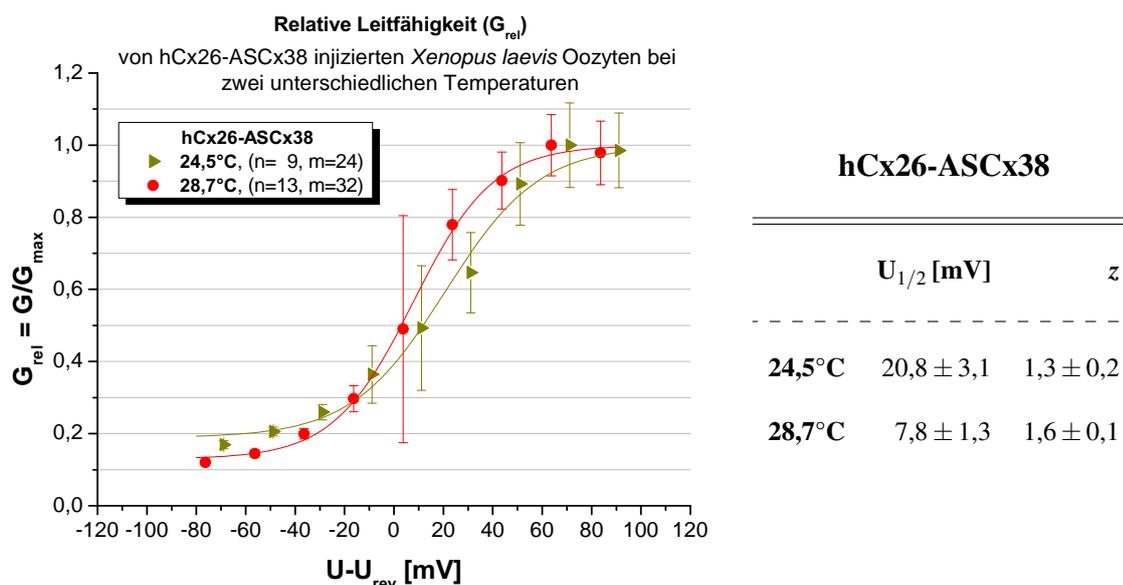
**Abbildung 3.1.4:** Stromantworten der Spannungspulse während der Applikation verschiedener Temperaturen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Badmedium. Links: Mittelwert der Stromamplituden von ASCx38 Oozyten (Kontrolle) bei verschiedenen Temperaturen. Mitte: Mittelwert der Stromamplituden von hCx26-ASCx38 Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen. Rechts: Mittelwert  $\pm$  sem des leakreduzierten Antwortstroms ( $I_{red}$ ) am Ende eines 20 s dauernden Spannungspulses aufgetragen als Funktion zur Spannung (U) zu verschiedenen Temperaturen. (n := Anzahl der Oozyten, m = Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden: ASCx38: 7,1°C: (n=9, m=12); 11,4°C: (n=6, m=8); 15,3°C: (n=5, m=9); 20,2°C: (n=5, m=9); 24,5°C: (n=5, m=5); 28,7°C: (n=5, m=7). hCx26 - ASCx38: 7,1°C: (n=8, m=13); 11,4°C: (n=5, m=5); 15,3°C: (n=6, m=16); 20,2°C: (n=7, m=8); 24,5°C: (n=9, m=24); 28,7°C: (n=13, m=32))

Aus den in Abbildung 3.1.4 gezeigten Strom-Spannungs-Kurven lassen sich die Leitwerte zu den applizierten Temperaturen berechnen. Aus den sich für jede Strom-Spannungs-Kurve errechneten Leitwerten wurden zu der entsprechenden Temperatur die Mittelwerte gebildet und mit dem Standardfehler (sem) in Abbildung 3.1.5 als Funktion über die um das Umkehrpotential reduzierte Spannung aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass der durch hCx26 vermittelte Strom durch Spannung und Temperatur reguliert wird. Die maximalen Leitwerte bei den niedrigsten Temperaturen liegen unter  $7 \mu\text{S}$ , für die beiden wärmeren Temperaturen ( $15,3^\circ\text{C}$ ,  $20,2^\circ\text{C}$ ) liegen die maximalen Leitwerte unter  $20 \mu\text{S}$ . Dies entspricht näherungsweise der Hälfte des maximalen Leitwertes bei einer Temperatur von  $24,5^\circ\text{C}$ . Bei der Temperatur  $28,7^\circ\text{C}$  steigert sich dieser Leitwert im Vergleich zum Wert bei  $24,5^\circ\text{C}$  um ca. das Doppelte und liegt bei  $80 \mu\text{S}$ . Bei den vier niedrigen Temperaturen ( $7,1^\circ$  bis  $20,2^\circ\text{C}$ ) verläuft die Leitfähigkeitskurve nicht in eine Sättigung, sodass für einen Vergleich der halbmaximalen Aktivierungsspannung ( $U_{1/2}$ ) und der Ionenvalenz, ( $z$ ) nur die gemessenen Werte für die beiden höchsten Temperaturexpositionen herangezogen wurden. Die Ionenvalenz wird auch als Gating Charge bezeichnet und beschreibt die Verschiebung elektrisch geladener Teilchen über die Zellmembran.



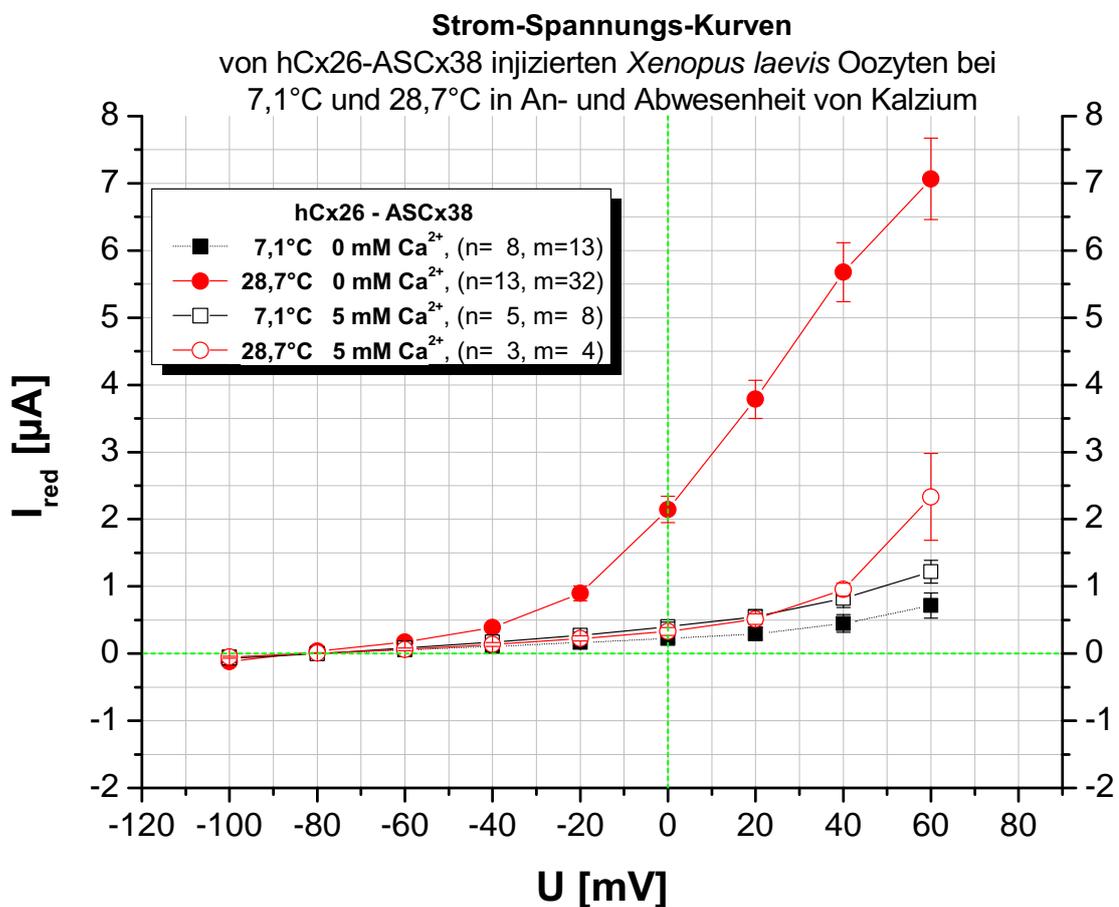
**Abbildung 3.1.5:** Leitfähigkeitskurven (G) von hCx26-ASCx38-exprimierten-Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen: Mittelwert  $\pm$  sem der Leitfähigkeitskurven (G) bei Temperaturen von  $7,1^\circ\text{C}$  bis  $28,7^\circ\text{C}$ . (n := Anzahl der Oozyten, m := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden.)

Für die Temperaturen 24,5°C und 28,7°C wurde jede berechnete Leitwertskurve beim maximalen Leitwert ( $G_{max}$ ) der Kurve normiert. Aus diesen normierten Kurven ließ sich dann der Mittelwert der normierten Leitfähigkeitskurven berechnen. Dieser Mittelwert wurde mit einer Boltzmann-Funktion ausgewertet, wobei die Steigung dieser Funktion mittels der entsprechenden Temperatur für die Leitfähigkeitskurve angepasst wurde. Die Mittelwerte der normierten Leitwerte und ihr relativer Fehler sind als Funktion über die um das Umkehrpotential reduzierte Spannung in der Abbildung 3.1.6 aufgetragen. Die Parameter aus den Boltzmann-Funktionen sind für die zwei Temperaturen rechts neben der Abbildung aufgelistet. Die halbmaximale Aktivierungsspannung  $U_{1/2}$  von hCx26-ASCx38 injizierten Oozyte liegt für beide Temperaturen im positiven Spannungsbereich. Für den Mittelwert der Messwerte bei einer Temperatur von 24,5°C beträgt  $U_{1/2}$  bei 20,8 mV und geht bei einer Temperatur von 28,7°C auf 7,8 mV herunter. Auch die Ionenvolanz  $z$  zeigt einen Abfall von 1,6 bei 24,5°C auf 1,3 bei 28,7°C, wobei diese beiden Werte im Fehlerbereich liegen.



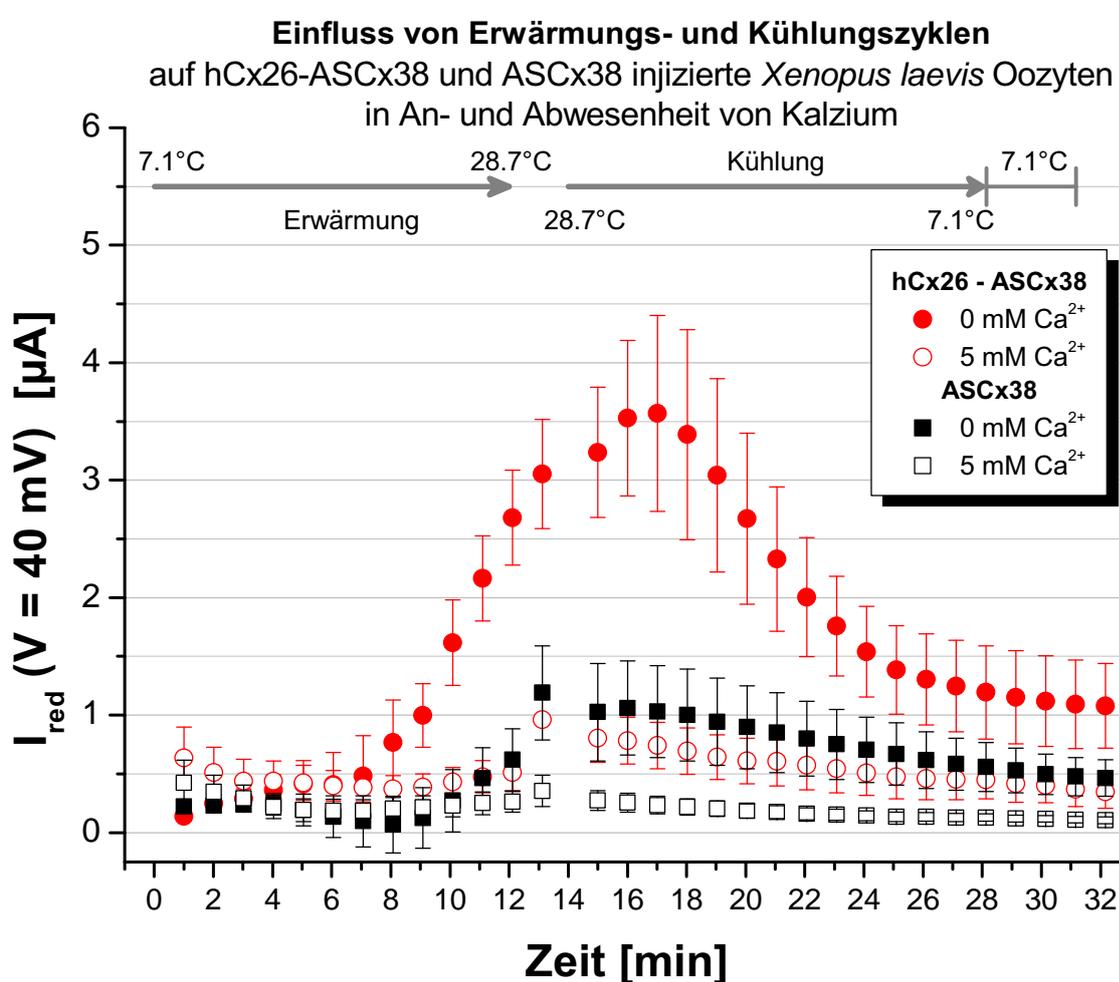
**Abbildung 3.1.6:** Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von hCx26-ASCx38-exprimierten-Oozyten bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (24,5°C und 28,7°C): Mittelwert  $\pm$  sem von Leitfähigkeitskurven, die bei  $G_{max}$  normiert wurden. Die durchgehenden Linien repräsentieren an die Mittelwertskurven genäherte Boltzmann-Funktionen ( $y_{Boltz} = 1/(1 + e^{(U_{1/2}-U)*z/var})$ ). Die Parameter aus diesen Boltzmann-Funktionen sind in der Tabelle dargestellt. (n := Anzahl der Oozyten, m := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden.)

Zur Überprüfung, ob die Temperatur den blockierenden Einfluss von Kalzium, wie von Ripps et al. (2004) gezeigt wurde, aufheben kann, wurde die Aktivität von hCx26 bei der höchsten (28,7°C) und bei der niedrigsten (7,1°C) applizierten Temperatur untersucht. Dazu wurde dem modifizierten Bath's Medium 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zugeführt und die Spannungspulse appliziert. Die leckreduzierten Ströme ( $I_{red}$ ) wurden in einem Strom-Spannungs Diagramm in Abbildung 3.1.7 aufgetragen. Bei der Temperatur von 28,7°C konnte der spannungsabhängige Strom der hCx26-ASCx38 Halbkanäle in Gegenwart von 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  unterdrückt werden.



**Abbildung 3.1.7:** Strom-Spannungs-Kurven ( $I_{red}(U)$ ) von hCx26-ASCx38 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (geschlossene Symbole) und in Gegenwart von 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (offene Symbole), die während der Messung zwei unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt waren (7,1°C und 28,7°C): Mittelwert  $\pm$  sem der Stromamplituden ( $I_{red}$ ) als Funktion über die Spannung (U). (n := Anzahl der Oozyten, m := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden.)

Um zu untersuchen, ob dieser temperaturabhängige Effekt des Stromanstiegs bei zunehmender Temperatur bei hCx26 reversibel ist, wurde ein fortwährender einminütiger Spannungspuls von +40 mV appliziert und die Temperatur des Badmediums kontinuierlich erwärmt bzw. abgekühlt. Der leckreduzierte Stromwert am Ende des +40 mV Pulses ( $I_{red}$ ) wurde als Funktion der Zeit in der Abbildung 3.1.8 dargestellt und mit den Strömen von ASCx38 injizierten Oozyten sowie in Anwesenheit von 5 mM  $Ca^{2+}$  verglichen. Die Abbildung zeigt, dass die Erhöhung des Stroms der hCx26-ASCx38 Oozyten mit der Erhöhung der Temperatur einhergeht und sich reversibel mit der Abkühlung senken lässt. Die Kontroll-Oozyten (ASCx38) zeigen nur eine kleine Steigung der Stromwerte, ebenso wie die Oozyten während der Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ .



**Abbildung 3.1.8:** Einfluss von Erwärmungs- und Kühlungszyklen: Mittelwert  $\pm$  sem von leckreduzierten Strömen nach einem +40 mV-Puls während der Erwärmung / Kühlung von hCx26-ASCx38 und ASCx38 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten in Gegenwart und Abwesenheit von 5 mM  $Ca^{2+}$ . (Erwärmung: 0 mM  $Ca^{2+}$ : hCx26-ASCx38 (n=7), ASCx38 (n=7); 5 mM  $Ca^{2+}$ : hCx26-ASCx38 (n=5), ASCx38 (n=6) / Abkühlung: 0 mM  $Ca^{2+}$ : hCx26-ASCx38 (n=7), ASCx38 (n=7); 5 mM  $Ca^{2+}$ : hCx26-ASCx38 (n=7), ASCx38 (n=5))

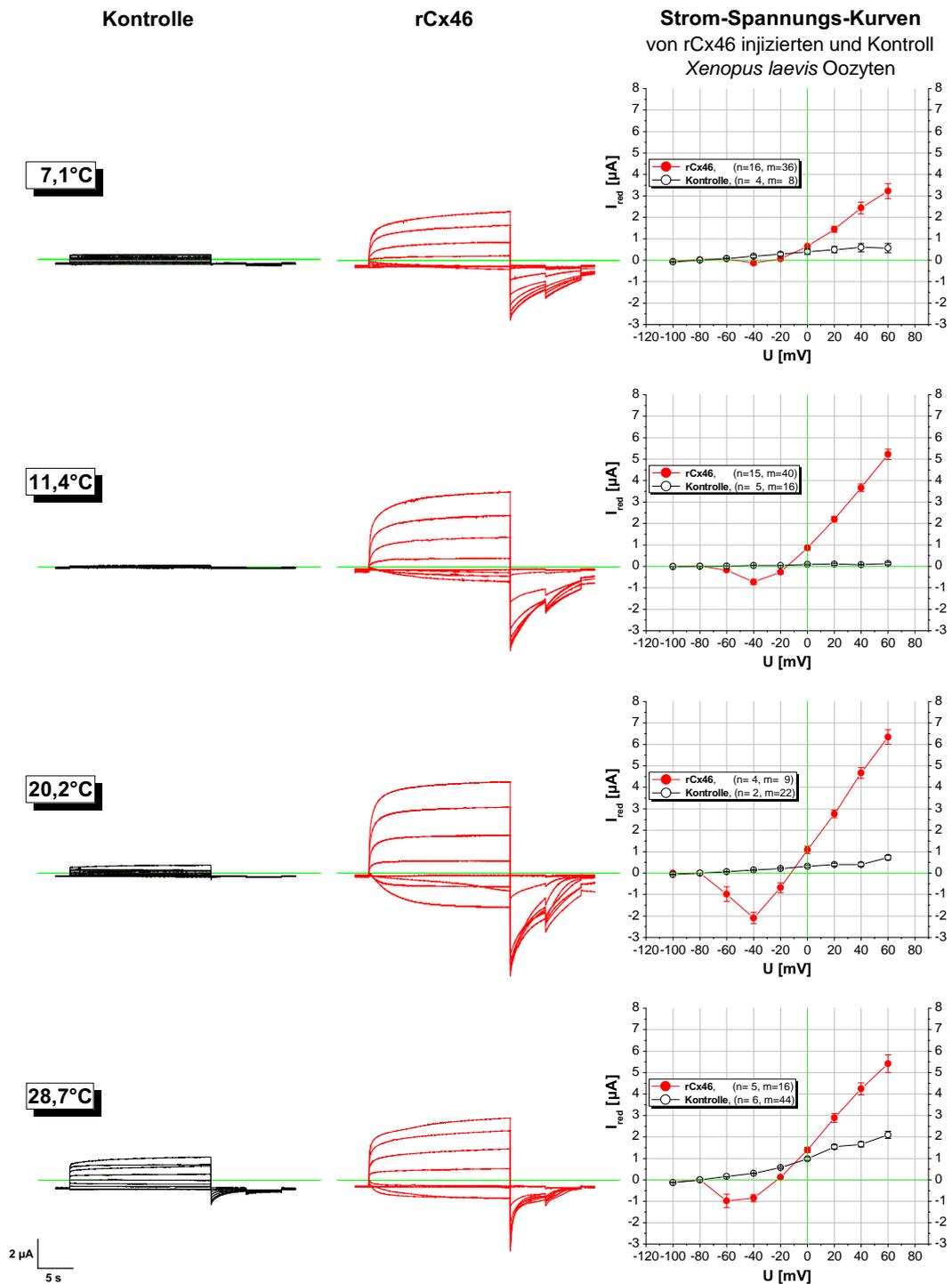
Dieses Ergebnis zeigt, dass der hCx26 Halbkanal funktional in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wird. Die für unterschiedliche Connexone blockierende Eigenschaft von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ , (z. B. für Cx46 von Pfahnl und Dahl (1999) oder für Cx50 von Beahm und Hall (2002)) konnte ebenfalls festgestellt werden. Dieses Resultat, die Aktivierung des hCx26 Halbkanals in *Xenopus laevis* Oozyten, geht mit den Ergebnissen von Ripps et al. (2004) konform. Auch die von González et al. (2006) beschriebene Spannungsabhängigkeit des Halbkanals konnte mit diesen Resultaten gezeigt werden. Es wurde jedoch zusätzlich zu diesen Eigenschaften des hCx26 Halbkanals eine temperaturabhängige Aktivierung festgestellt. Außerdem wurde die Sensitivität des Halbkanals auf extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  nicht von der Temperatur beeinflusst, d. h. die Blockierung durch eine erhöhte extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des Connexons 26 konnte auch bei höheren Temperaturen erhalten bleiben (Steffens et al., 2008).

### 3.1.2 Einfluss der Temperatur auf Connexin 46 (*Rattus norvegicus*) - rCx46 - Halbkanäle

Um herauszufinden, ob die thermische Beeinflussung des Cx26 - Halbkanals mit anderen Connexonen vergleichbar ist, wurde das Protein rCx46 für weitere Untersuchungen zur Temperaturexposition gewählt. Im Anhang D ist in Abbildung D.1 ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Connexine 26 und 46 dargestellt. Sie sind in ihren transmembranen Bereichen stark konserviert, während die extra- und intrazellulären Bereiche (Loops und Termini) sich unterscheiden. Innerhalb der transmembranen Domänen gibt es ebenfalls eine Abstufung bezüglich der Homogenität. Für die Domänen M1, M2 und M4 ist die Übereinstimmung zwischen den Connexinen größer als für die Domäne M3, die am Aufbau der hydrophilen Pore der Connexone beteiligt sein soll (Abb. 1.4.1, S. 11). Durch diese Unterschiede könnte es möglich sein, dass der rCx46 Halbkanal ein anderes Verhalten bei Änderung der Temperatur zeigt als der hCx26 Halbkanal.

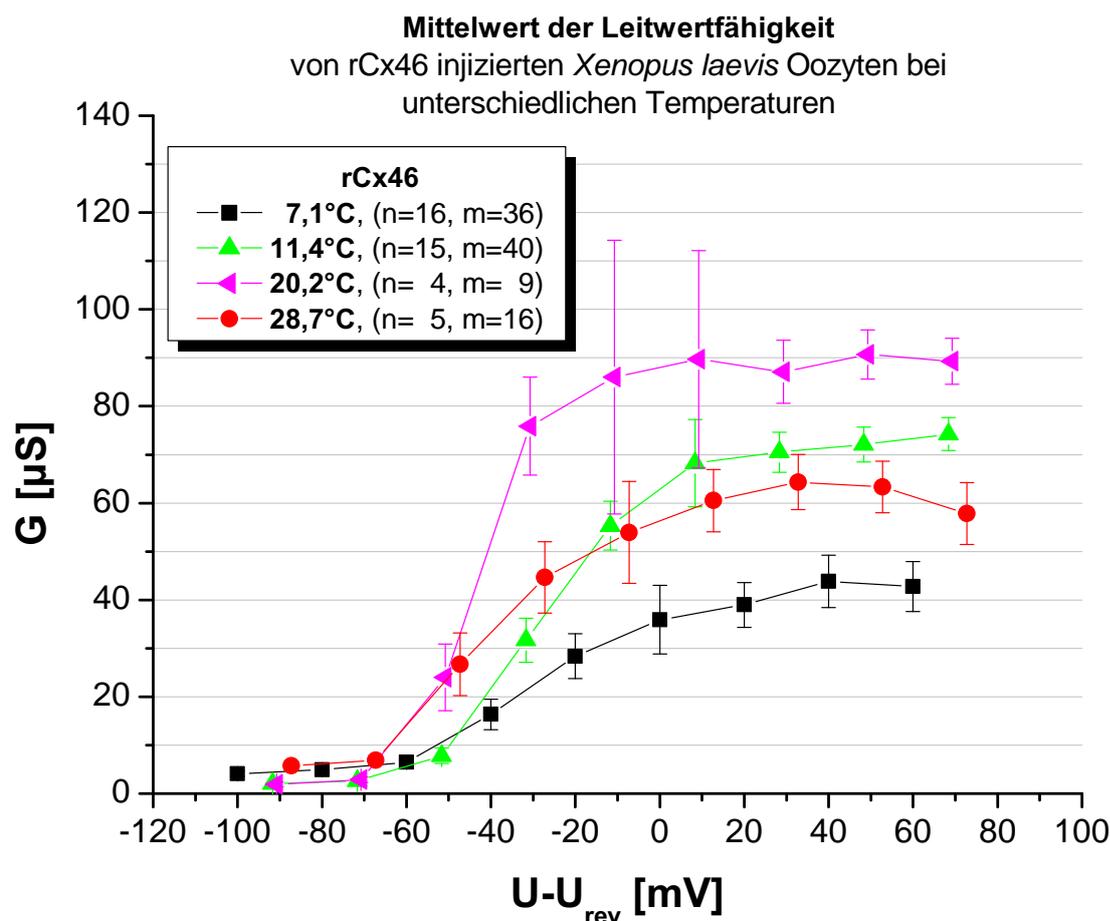
Um den Einfluss der Temperatur auf rCx46 zu untersuchen, wurden die Experimente unter den gleichen Versuchsbedingungen wie beim hCx26 - Halbkanal (Pulsprotokoll und Temperaturapplikation) durchgeführt. Da die rCx46-Proteine schnell in die Oozytenmembran einbauen, erfolgten die elektrophysiologischen Experimente ein bis zwei Tage nach der Injektion (Jedamzik et al., 2000). Um die gemessenen Stromantworten der rCx46 exprimierten Oozyten mit Kontroll-Oozyten zu vergleichen, wurden identische Experimente mit nichtinjizierten Oozyten durchgeführt.

Abbildung 3.1.9 ist eine mit der Abbildung 3.1.4 vergleichbare Darstellung der Stromamplituden und Strom-Spannungs-Kurven von rCx46 Halbkanälen während verschiedener Temperaturexpositionen. Die linke Seite der Abbildung zeigt die Stromamplituden der Kontroll-Oozyten zu vier verschiedenen Temperaturapplikationen. In der Mitte sind die Stromantworten der rCx46 exprimierten Oozyten zu den gleichen Temperaturen dargestellt. Die Strom-Spannungs-Kurven (Abb. 3.1.9, rechte Seite) zeigen den für Cx46 typischen Verlauf (Paul et al., 1991). In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass bei der niedrigen Temperatur (7,1°C) der maximale Strom mit  $\sim 3,5 \mu\text{A}$  geringer ist als bei den Temperaturen 11,4°C, 20,2°C und 28,7°C mit Strömen zwischen 4 - 5  $\mu\text{A}$ . Im Gegensatz zu den Voltage-Clamp Messungen mit hCx26 Halbkanälen konnte hier kein so deutlicher Unterschied der Stromantworten der rCx46 Halbkanäle bei unterschiedlichen Temperaturen festgestellt werden.



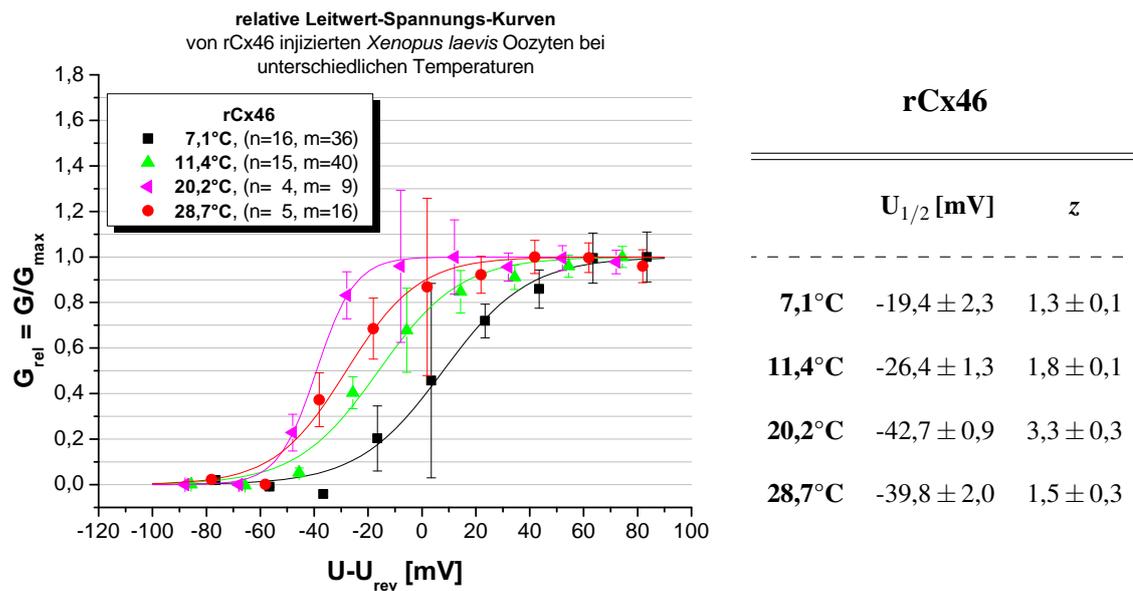
**Abbildung 3.1.9:** Stromantworten der Spannungspulse während der Applikation verschiedener Temperaturen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Badmedium. Links: Mittelwert der Stromamplituden von Kontroll-Oozyten bei verschiedenen Temperaturen. Mitte: Mittelwert der Stromamplituden von rCx46 Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen. Rechts: Mittelwert  $\pm$  sem des leckreduzierten Antwortstroms ( $I_{red}$ ) aufgetragen als Funktion zur Spannung (U) zu verschiedenen Temperaturen (n := Anzahl der Oozyten, m := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden: 7,1°C: Kontrolle (n=4, m=8); rCx46 (n=16, m=36); 11,4°C: Kontrolle (n=5, m=16); rCx46 (n=15, m=40); 20,2°C: Kontrolle (n=4, m=9); rCx46 (n=2, m=22); 28,7°C: Kontrolle (n=6, m=44); rCx46 (n=5, m=16))

Die Mittelwerte der aus den Stromwerten berechneten Leitwerte sind in Abbildung 3.1.10 als Funktion der um das Umkehrpotential reduzierten Spannung dargestellt. Im Gegensatz zu hCx26 ist der Halbkanal schon bei der niedrigen Temperatur 7,1°C offen und hat einen maximalen Leitwert von  $\sim 40 \mu\text{S}$ . Die Leitfähigkeit zeigt wie erwartet eine Zunahme bei Temperaturerhöhung.



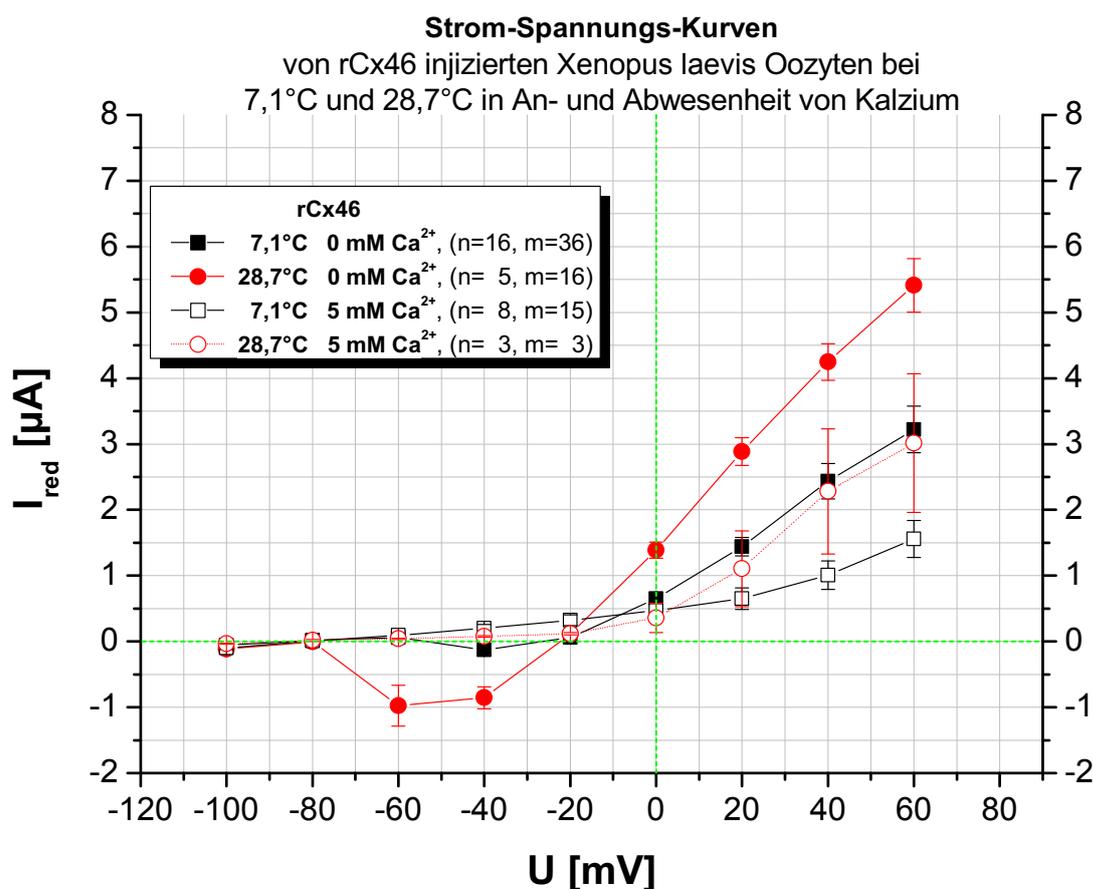
**Abbildung 3.1.10:** Leitfähigkeitskurven (G) von rCx46 exprimierten-Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen: Mittelwert  $\pm$  sem der Leitfähigkeitskurven (G) bei Temperaturen von 7,1°C bis 28,7°C. (n := Anzahl der Oozyten, m := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden.)

Für alle Temperaturen sind die relativen Leitwerte in der Abbildung 3.1.11 dargestellt. Die dazugehörige Boltzmann-Funktion zeigt, dass die halbmaximale Aktivierungsspannung  $U_{1/2}$  von rCx46 für alle Temperaturen im negativen Spannungsbereich liegt und der Betrag mit steigender Temperatur zunimmt. Die Gating Charge bleibt  $z$  bis auf den Wert für die Temperatur 20,2°C, der bei 3,3 liegt, unverändert.



**Abbildung 3.1.11:** Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von rCx46 exprimierten-Oozyten bei vier unterschiedlichen Temperaturen (7,1°C, 11,4°C, 20,2°C und 28,7°C). Mittelwert  $\pm$  sem von Leitfähigkeitskurven, die bei  $G_{max}$  normiert wurden. Die durchgehenden Linien repräsentieren an die Mittelwertskurven genäherte Boltzmann-Funktionen ( $y_{Boltz} = 1/(1 + e^{(U_{1/2}-U)*z/var})$ ). Die Parameter aus diesen Boltzmann-Funktionen sind in der Tabelle dargestellt. (n := Anzahl der Oozyten, m := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden.)

Wie auch zuvor bei den hCx26 Halbkanälen wurde die blockierende Eigenschaft von Kalzium auf die rCx46 Halbkanäle (Pfahnl und Dahl, 1999) während zweier unterschiedlicher Temperaturexpositionen untersucht. In Abbildung 3.1.12 sind die Mittelwerte der Strom-Spannungs-Kurven während der Exposition von 7,1°C und 28,7°C in An- und Abwesenheit von 5 mM  $Ca^{2+}$  aufgetragen. Bei beiden Temperaturen konnte der spannungsabhängige Strom von rCx46 Halbkanälen in Gegenwart von 5 mM  $Ca^{2+}$  unterdrückt werden.



**Abbildung 3.1.12:** Strom-Spannungs-Kurven ( $I_{red}(U)$ ) von rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$  (geschlossene Symbole) und in Gegenwart von 5 mM  $Ca^{2+}$  (offene Symbole), die während der Messung zweier unterschiedlicher Temperaturen ausgesetzt waren (7,1°C und 28,7°C): Mittelwert  $\pm$  sem der Stromamplituden ( $I_{red}$ ) als Funktion über die Spannung ( $U$ ). ( $n$  := Anzahl der Oozyten,  $m$  := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden.)

Diese Resultate zeigen, dass der rCx46 Halbkanal funktional in die Oozytenmembran eingebaut wird, spannungsabhängig aktiviert (Ebihara und Steiner, 1993, Paul et al., 1991) und diese sensitiv auf die blockierende Eigenschaft von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  (Pfahnl und Dahl, 1999) reagiert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der rCx46 Halbkanal bei höherer Temperatur eine größere Leitfähigkeit besitzt. Im Unterschied zum hCx26 Halbkanal zeigt der rCx46 Halbkanal jedoch schon bei einer niedrigen Temperatur (7,1°C) eine Aktivierung. Wie bei hCx26 bleibt auch die Sensitivität des Halbkanals auf extrazellulärem  $Ca^{2+}$  unbeeinflusst von der Temperatur, d. h. die Blockierung durch eine erhöhte extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration des Connexons 26 konnte auch bei höheren Temperaturen erhalten bleiben.

### **3.1.3 Einfluss von ELF-EMF während der Translation auf Connexin 46 (*Rattus norvegicus*) - rCx46 - Halbkanäle**

Nach Lohmann et al. (2003) und Zeng et al. (2003) könnte eine ELF-EMF Exposition zu einer Abnahme der intrazellulären Kommunikation führen. Diese mögliche ELF-EMF Wirkung mit der Annahme, dass die Kommunikation über die Connexone herabgesetzt wird, könnte sich in der Änderung der Eigenschaften der Halbkanäle widerspiegeln.

rCx46 ist ein Connexon, dessen Eigenschaften, wie z. B. die Leitfähigkeit, genau untersucht wurden (Jedamzik et al., 2000, Ngezahayo et al., 1998, Pfahnl und Dahl, 1999, Trexler et al., 1999). rCx46 zeigte in den Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur, dass es schon bei niedrigen Temperaturen (7,1°C) einen aktivierbaren Halbkanal bildet. Unter diesen Aspekten könnte eine mögliche Änderung der Funktionalität des Halbkanals nach Einfluss eines ELF-EMFs mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen werden.

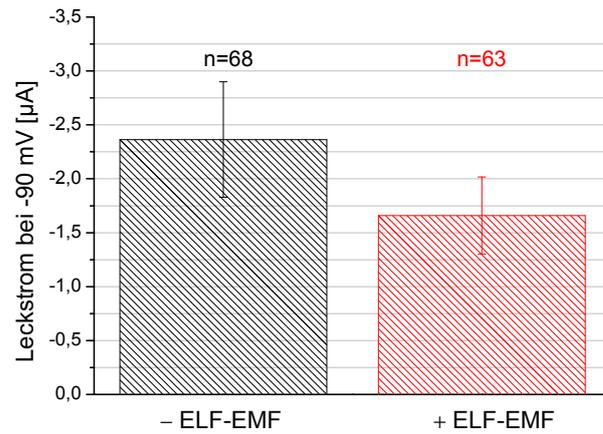
Für die Experimente wurden zu drei unterschiedlichen ELF-EMF Expositionen die Funktionalität des Connexin 46 Halbkanals untersucht. Diese Expositions-Parameter wurden gewählt, da im Rahmen des REFLEX-Projektes zunächst ein permanentes ELF-EMF mit der maximal einstellbaren Flussdichte 2,3 mT des Expositions-Aufbaus gewählt werden sollte. Nach weiteren Untersuchungen im Rahmen des Projektes wurden für ein unterbrochenes (intermittent) ELF-EM Feld mit der Flussdichte 2,3 mT und 1 mT weitere Messungen durchgeführt. Die unterbrochenen Zeiten, fünf Minuten Befeldung und zehn Minuten Pause, und die magnetische Flussdichte ergaben sich aus den Ergebnissen von Ivancsits et al. (2002, 2003b). Die an dem Projekt beteiligte Forschergruppe konnte zu diesen Werten DNA-Schäden nachweisen, weshalb die Funktionalität von Connexonen auch zu diesen Werten getestet werden sollte.

### **Einfluss von ELF-EMF auf rCx46 exprimierende *Xenopus laevis* Oozyten**

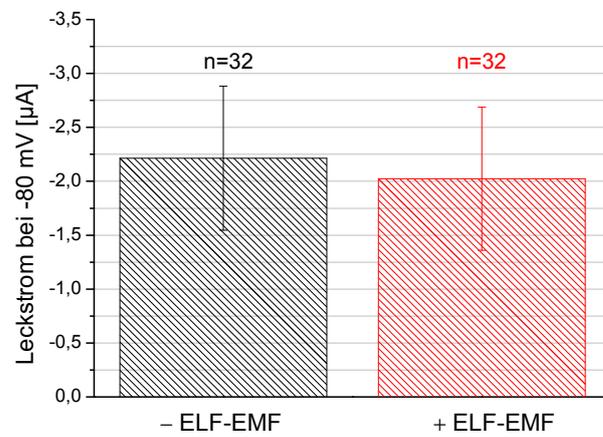
Nach der Präparation der *Xenopus laevis* Oozyten und Injektion von rCx46 wurden die Oozyten einem niederfrequenten elektromagnetischen Feld (ELF-EMF-Feld) ausgesetzt. Nach einer Expositionszeit von 16 h wurden zur Einschätzung der Intaktheit der Oozytenmembran die Leckströme der rCx46-exprimierten Oozyten nach dem Einstechen der Spannungs- und Strom-Elektrode und einem angelegten Haltepotential von -90 mV bzw. -80 mV abgelesen und der Mittelwert gebildet.

In Abbildung 3.1.13 ist der Mittelwert und der dazugehörige Standardfehler (sem) dieser Leckströme ( $I_{Leck}$ ) aller rCx46 exprimierten Oozyten nach drei unterschiedliche Expositionen aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass zwischen den Leckströmen der nicht- und exponierten Oozyten für die unterbrochenen Expositionen (50 Hz) bei 2,3 mT und 1 mT (Abb. 3.1.13 b) und Abb. 3.1.13 c)) kein Unterschied besteht. Nach einer permanenten Exposition (50 Hz (powerline), 2,3 mT) liegt der Betrag der ELM-EMF exponierten rCx46-Oozyten unter dem der nichtexponierten (Abb. 3.1.13 a)). Jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant und liegt innerhalb des Standardfehlers.

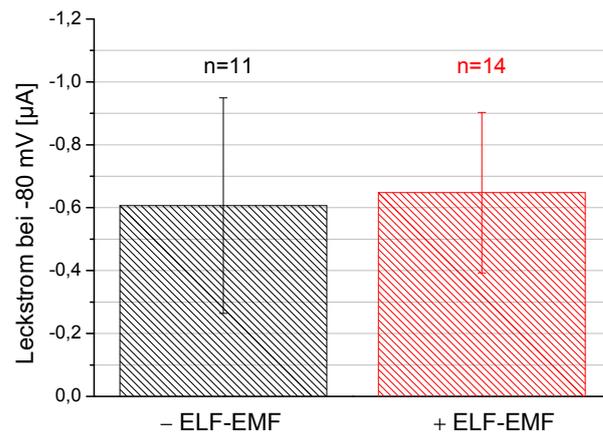
In der Abbildung 3.1.14 sind die Oozyten aus der Mittelwertbildung herausgenommen, die einen Leckstrombetrag größer als  $1 \mu\text{A}$  aufwiesen, da diese Oozyten für weitere Messungen nicht verwendet wurden (s. Methoden, S. 34). Die Abbildung zeigt, dass für alle drei ELF-EMF Applikationen der Leckstrom bei einem Haltepotential von -90 mV (-80 mV) zwischen -0,3 bis -0,5  $\mu\text{A}$  liegt und es keinen signifikanten Unterschied zu den nichtexponierten rCx46 Oozyten gibt.



a) Haltepotential: -90 mV; Permanente Exposition: 2,3 mT, 50 Hz (powerline).

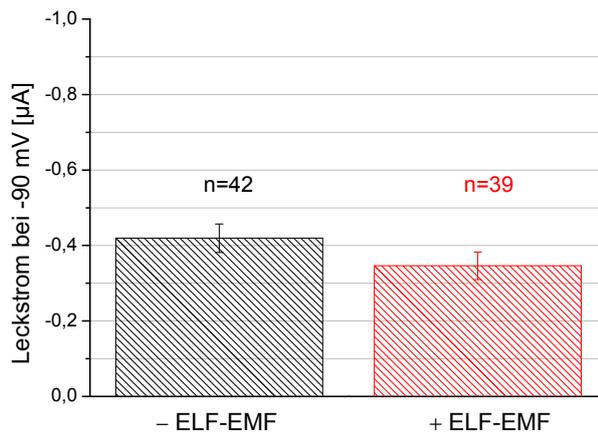


b) Haltepotential: -80 mV; Unterbrochene Exposition: 1 mT, 50 Hz (5 min an / 10 min aus).

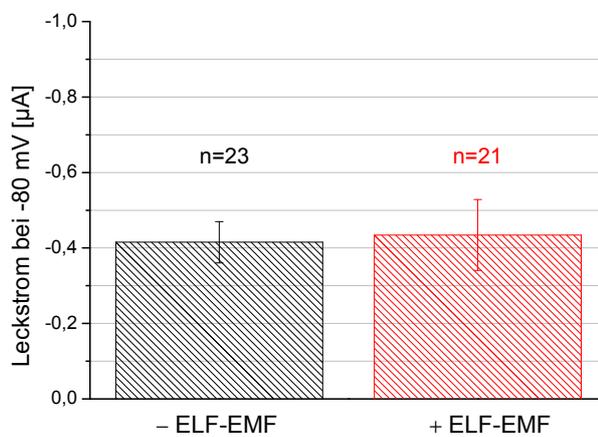


c) Haltepotential: -80 mV; Unterbrochene Exposition: 2,3 mT, 50 Hz (5 min an / 10 min aus).

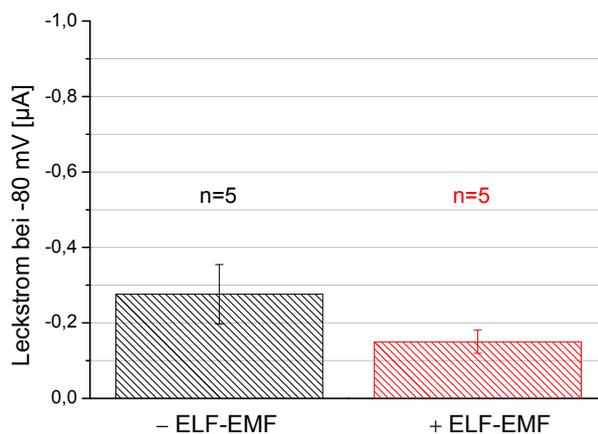
**Abbildung 3.1.13:** Mittelwerte  $\pm$  sem der Leckströme von rCx46 exprimierten Halbkanälen in *Xenopus laevis* Oozyten, die während der Translation von 16 h einer ELF-EMF-Exposition ausgesetzt waren, bei einem Haltepotential von -90 mV bzw. -80 mV. (n := Anzahl der Oozyten)



a) Haltepotential: -90 mV; Permanente Exposition: 2,3 mT, 50 Hz (powerline).



b) Haltepotential: -80 mV; Unterbrochene Exposition: 1 mT, 50 Hz (5 min an / 10 min aus).



c) Haltepotential: -80 mV; Unterbrochene Exposition: 2,3 mT, 50 Hz (5 min an / 10 min aus).

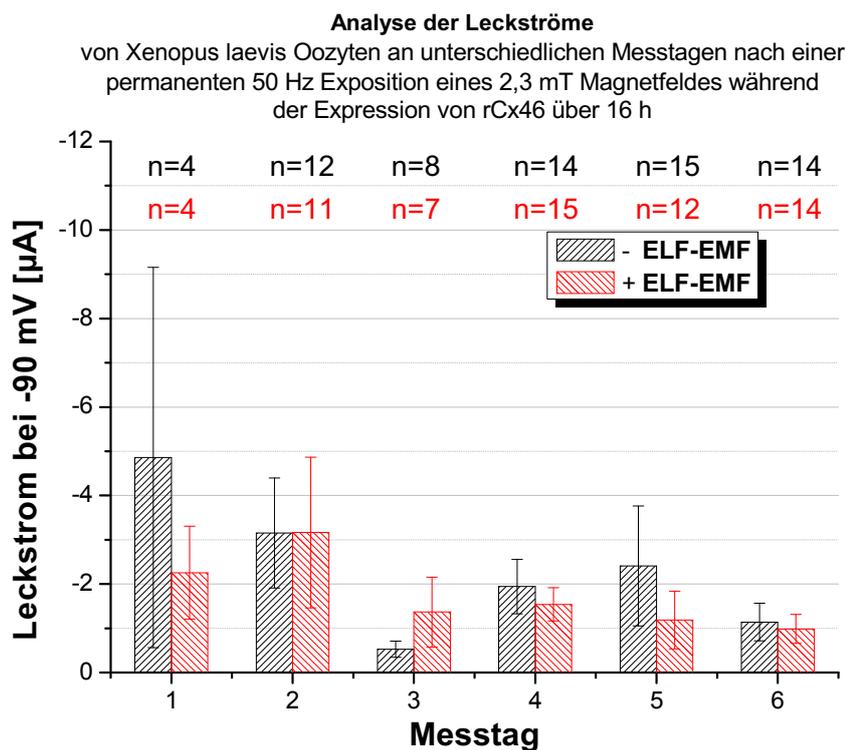
**Abbildung 3.1.14:** Mittelwerte  $\pm$  sem der Leckströme (mit  $-1 \mu\text{A} < I_{Leck} < 0 \mu\text{A}$ ) von rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten, die während der Translation von 16 h einer ELF-EMF-Exposition ausgesetzt waren, bei einem Haltepotential von -90 mV bzw. -80 mV. (n := Anzahl der Oozyten)

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass ein möglicher Effekt eines EMF-EM-Feldes auf die Intaktheit der Oozytenmembran zu gering ist und in der Mittelwertbildung untergeht, wurden die Daten für die Leckströme aus den Abbildungen 3.1.13 a) und 3.1.13 b) nach Messtagen aufgeschlüsselt in dem Diagramm 3.1.15 aufgetragen. Bei Abbildung 3.1.15 a) liegen die Mittelwerte der exponierten rCx46-Oozyten an drei von sechs Messtagen unter den Mittelwerten der nichtexponierten Oozyten, an einem Tag liegt der Leckstrommesswert der exponierten rCx46-Oozyten über und an zwei Tagen beim Mittelwert der nichtexponierten rCx46-Oozyten. Alle Mittelwerte der Leckströme nach einer permanenten EMF Applikation (50 Hz, 2,3 mT) sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich und liegen im Fehlerbereich.

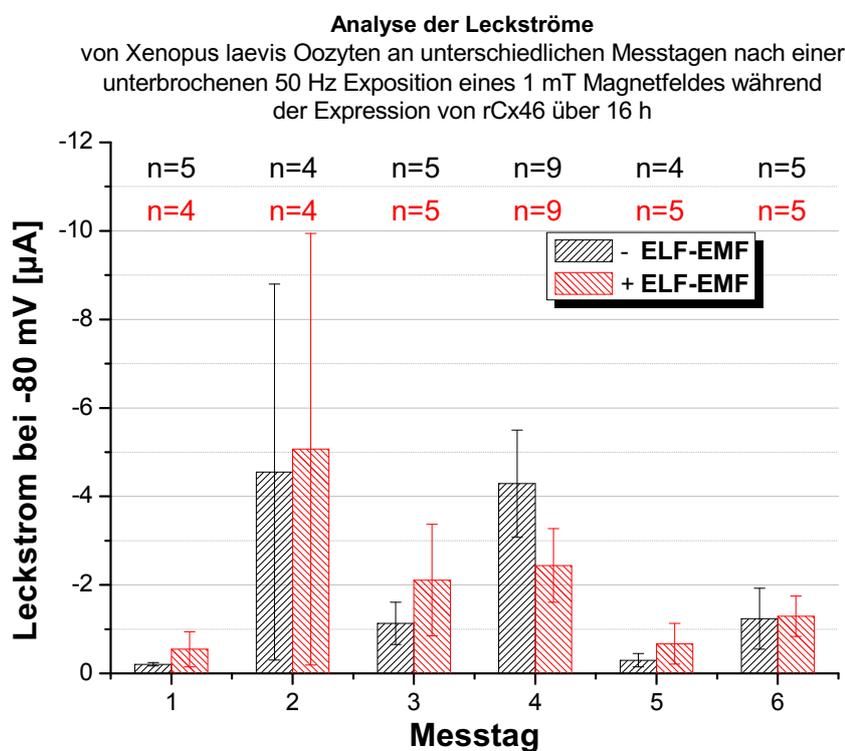
Nach der Applikation eines unterbrochenen EM-Feldes (50 Hz, 1 mT) ist zwischen den Mittelwerten der Leckströme zu verschiedenen Messtagen eine starke Schwankung festzustellen (Abb. 3.1.15 b)). Dieser Effekt bezieht sich jedoch auf die Oozytenqualität an verschiedenen Messtagen, da sich zwischen den nicht- und den exponierten rCx46 kein signifikanter Unterschied zeigt.

Die Daten ohne die Oozyten, die einen Leckstrombetrag größer als  $1 \mu\text{A}$  aufwiesen, zeigt die Abbildung 3.1.16. Hier zeigen die exponierten Cx46-Oozyten (Abb. 3.1.16 a), permanentes EMF, 50 Hz, 2,3 mT) an vier von sechs Tagen einen kleineren Mittelwertsbetrag als die nichtexponierten rCx46-Oozyten. Ein deutlicher Unterschied ist im Mittelwert von zwei Messtagen (Nr. 3 und Nr. 6, Abb. 3.1.16 a)) zu erkennen. Der Mittelwert der exponierten rCx46-Oozyten liegt am dritten Messtag deutlich unter dem Mittelwert der nichtexponierten rCx46-Oozyten. Dieser Effekt ist jedoch am sechsten Messtag genau entgegengesetzt festzustellen. Bei der Exposition von einem unterbrochenen EMF-EMF mit einer magnetischen Flussdichte von 1 mT (Abb. 3.1.16 b)) lag der Leckstromwert an fünf von sechs Tagen der exponierten rCx46-Oozyten über dem Mittelwert der nichtexponierten rCx46-Oozyten.

Diese Resultate zeigen, dass die Intaktheit der Oozytenmembran bzw. die Oozytenqualität nicht durch die drei applizierten ELF-EM Felder beeinflusst wird.

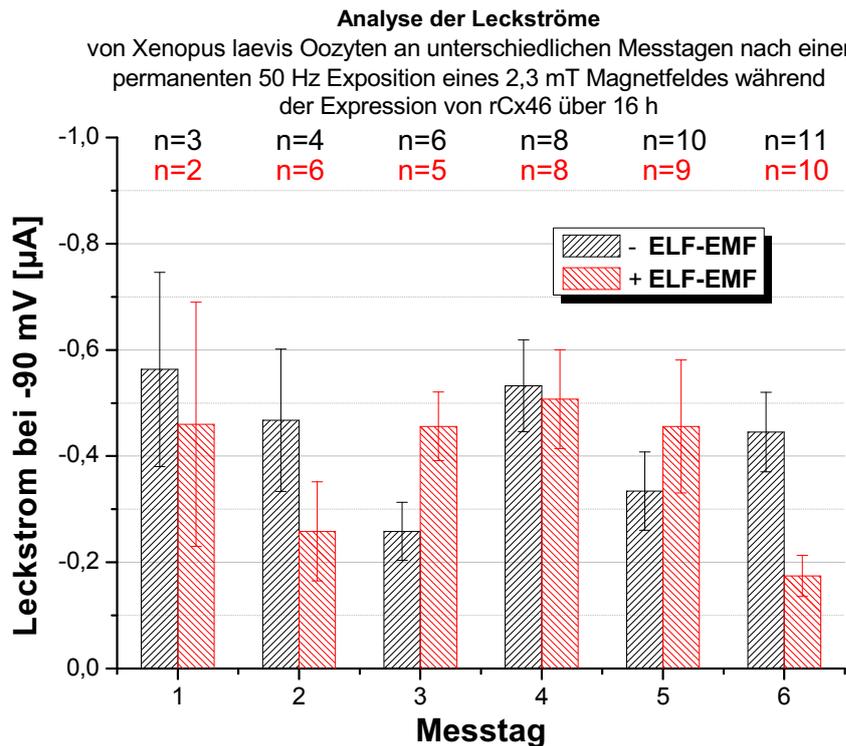


a) Haltepotential: -90 mV; Permanente Exposition: 2,3 mT, 50 Hz (powerline)

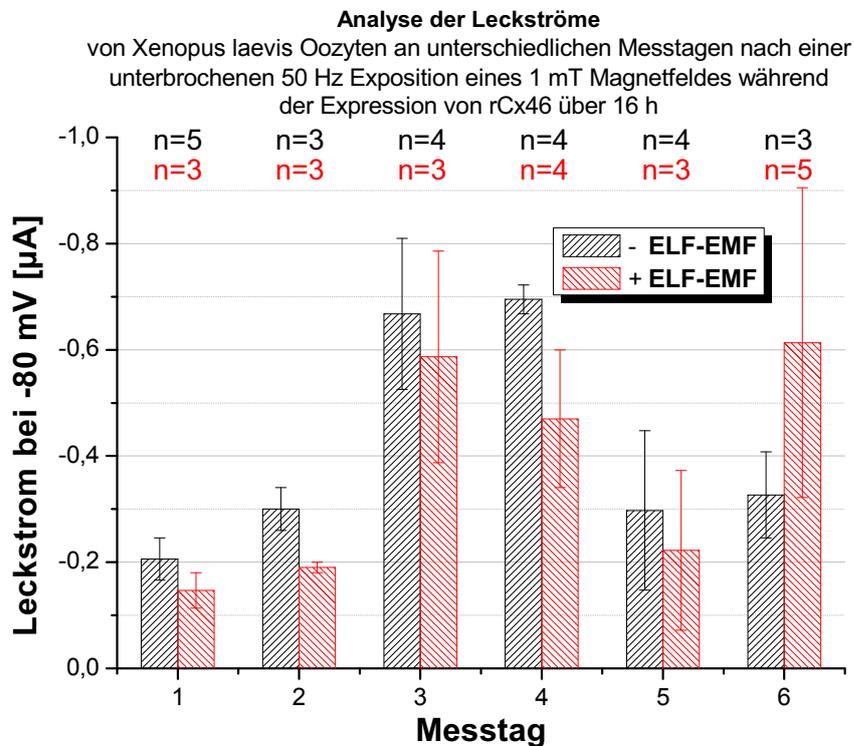


b) Haltepotential: -80 mV, Unterbrochene Exposition: 1 mT, 50 Hz (5 min an / 10 min aus)

**Abbildung 3.1.15:** Mittelwerte  $\pm$  sem Leckströme von rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten, die während der Translation von 16 h einer ELF-EMF-Exposition ausgesetzt waren, bei einem Haltepotential von -90 mV bzw. -80 mV an verschiedenen Messtagen. (n := Anzahl der Oozyten)



a) Haltepotential: -90 mV; Permanente Exposition: 2,3 mT, 50 Hz (powerline)



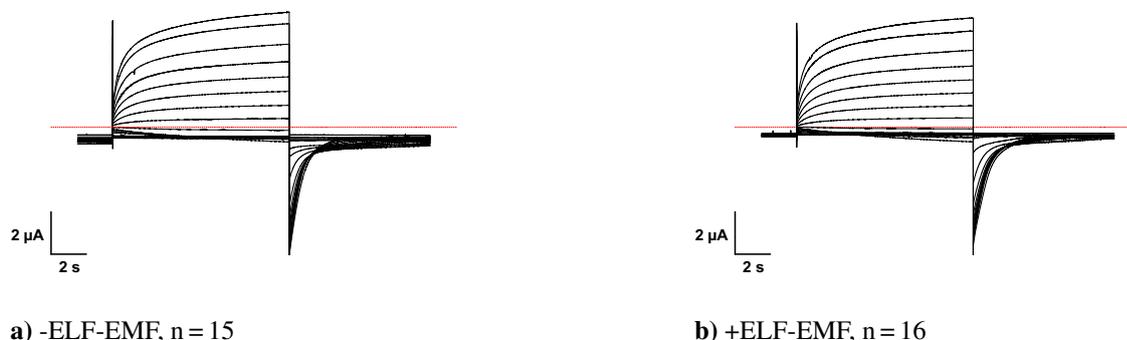
b) Haltepotential: -80 mV; Unterbrochene Exposition: 1 mT, 50 Hz (5 min an / 10 min aus)

**Abbildung 3.1.16:** Mittelwerte  $\pm$  sem der Leckströme (mit  $-1 \mu\text{A} < I_{\text{Leck}} < 0 \mu\text{A}$ ) von rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten, die während der Translation von 16 h einer ELF-EMF-Exposition ausgesetzt waren, bei einem Haltepotential von -90 mV bzw. -80 mV an verschiedenen Messtagen. (n := Anzahl der Oozyten)

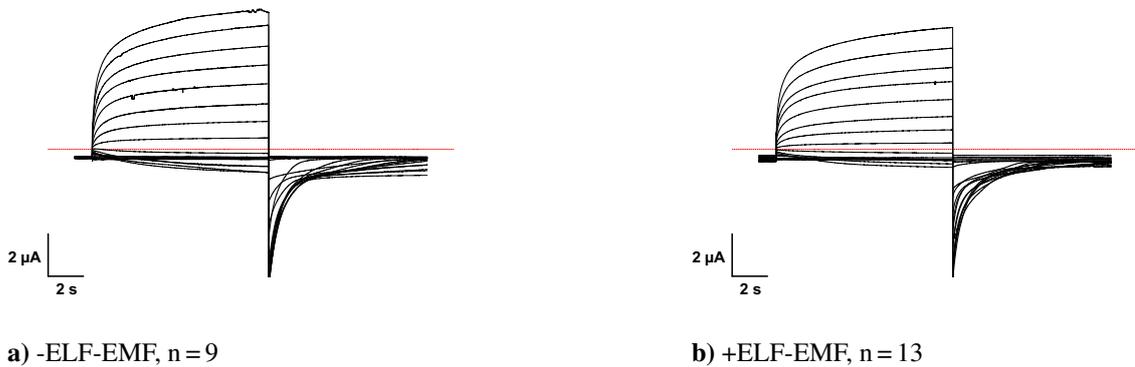
### Stromantworten von rCx46 Halbkanälen nach ELF-EMF Exposition

Da sich die applizierten elektromagnetischen Felder nicht auf die Qualität von rCx46 injizierten Oozyten auswirkten konnte mit den elektrophysiologischen Experimenten mittels der Zwei-Elektroden Spannungsklemm Technik begonnen werden. Um die Aktivität von gebildeten rCx46 Connexonen nachzuweisen, wurde ein Spannungspulsprotokoll appliziert (s. Methoden, S. 28). Die Mittelwerte der Stromamplituden von rCx46 exprimierten Oozyten nach Einfluss eines ELF-EMFs sind in den Abbildungen 3.1.17 bis 3.1.19 dargestellt.

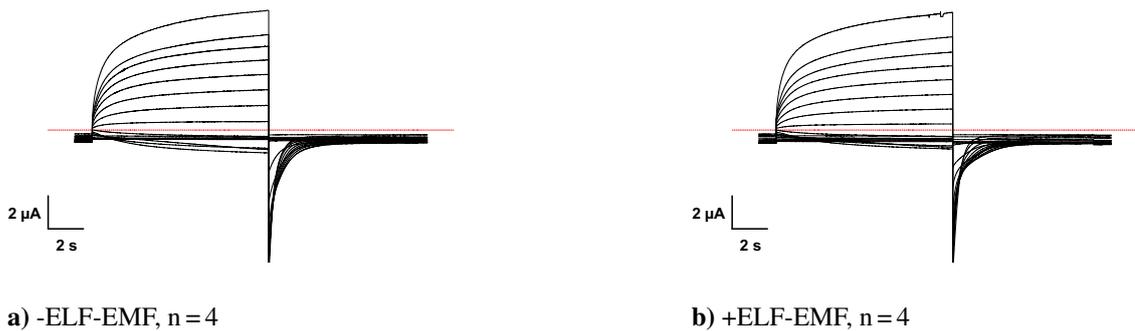
Auf der linken Seite der Abbildungen (Abb. 3.1.17 - Abb. 3.1.19) werden die Mittelwerte der Stromamplituden von Oozyten gezeigt, in denen rCx46-Connexone exprimiert wurden, die während der Translation keinem ELF-EM Feld ausgesetzt waren. Auf der rechten Seite der Abbildungen (Abb. 3.1.17 - Abb. 3.1.19) wurden die Mittelwerte von Oozyten dargestellt, die während der Translation über 16 h von rCx46 Halbkanälen einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt waren. Die Stromamplituden in allen sechs Abbildungen zeigen den für Connexin 46 typischen Verlauf (Paul et al., 1991) und wurden nicht durch eine vorherige EMF Applikation verändert. Die ELF-EMF Expositionen mit einer Flussdichte von 2,3 mT zeigen keine Auswirkung auf die Amplitude der rCx46 Oozyten. Bei der unterbrochenen elektromagnetischen Exposition mit 1 mT ist ein Unterschied in den Deaktivierungsamplituden zu sehen und die Strom-Amplitude der feldexponierten rCx46 Oozyten ist etwas geringer als die Amplitude der nichtexponierten Oozyten. Dieser Unterschied ist jedoch geringfügig und liegt im Standardfehlerbereich der Messungen.



**Abbildung 3.1.17:** Mittelwerte der Amplituden von rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten nach einer Exposition eines permanenten elektromagnetischen Feldes von 50 Hz (powerline) über 16 h bei 2,3 mT nach Applikation eines Spannungspulsprotokolls (Abb. 2.3.4 a), S. 32) bei einem Haltepotential von -90 mV. (n := Anzahl der Oozyten)



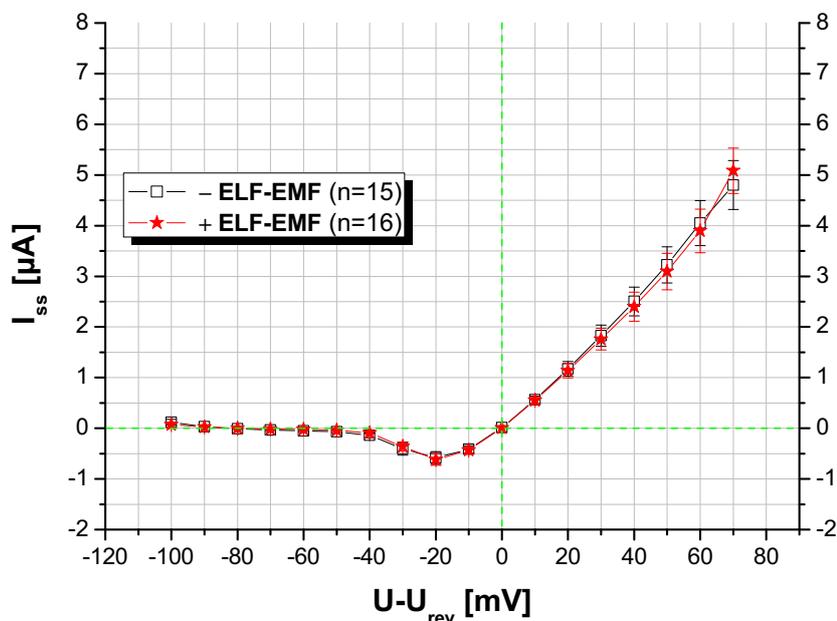
**Abbildung 3.1.18:** Mittelwerte der Amplituden von rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten nach einer Exposition eines unterbrochenen elektromagnetischen Feldes von 50 Hz über 16 h bei 1 mT (5 min an / 10 min aus) nach Applikation eines Spannungspulsprotokolls (Abb. 2.3.4 a), S. 32) bei einem Haltepotential von -80 mV. (n := Anzahl der Oozyten)



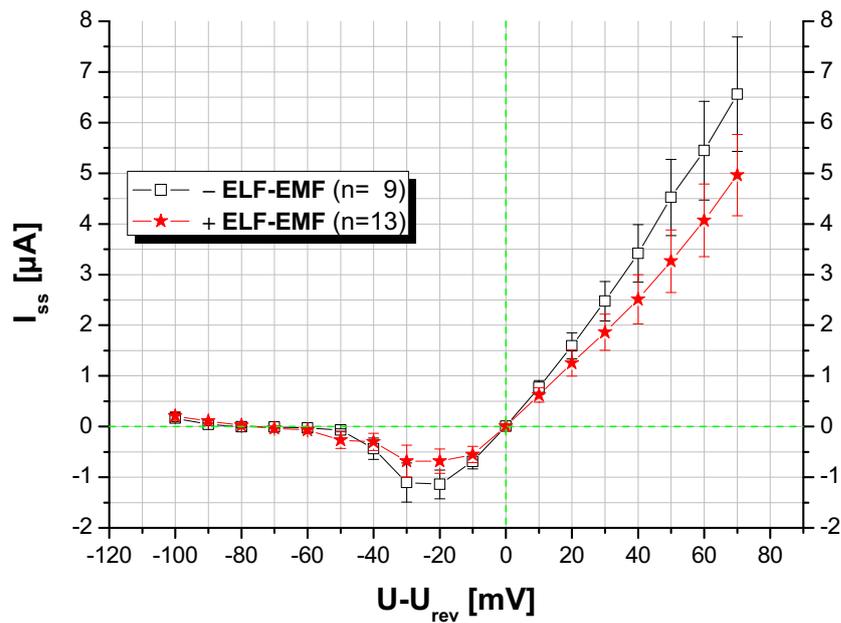
**Abbildung 3.1.19:** Mittelwerte der Amplituden von rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten nach einer Exposition eines unterbrochenen elektromagnetischen Feldes von 50 Hz über 16 h bei 2,3 mT (5 min an / 10 min aus) nach Applikation eines Spannungspulsprotokolls (Abb. 2.3.4 a), S. 32) bei einem Haltepotential von -80 mV. (n := Anzahl der Oozyten)

Eine Darstellung, die das Verhältnis zwischen dem Gleichgewichtsstrom ( $I_{ss}$ ) der rCx46 exprimierten Oozyten zum angelegten Spannungspuls verdeutlicht, ist eine Strom-Spannungs-Kurve. Dazu wurden die gemessenen Gleichgewichtsströme ( $I_{gemess}$ ) am Ende des Aktivierungspulses ausgelesen. Über diese Werte konnte nach der Leck-Subtraktion und der Ermittlung des Umkehrpotentials der arithmetische Mittelwert gebildet werden. Dieser Durchschnitt wurde mit dem dazugehörigen Standardfehler (sem) in den Abbildungen 3.1.20 bis 3.1.22 als Gleichgewichtsstrom ( $I_{ss}$ ) über die reduzierte Spannung ( $U-U_{rev}$ ) aufgetragen. Jede Abbildung (3.1.20 - 3.1.22) repräsentiert den Stromverlauf von nicht- und exponierten Oozyten zu jeweils einem elektromagnetischen

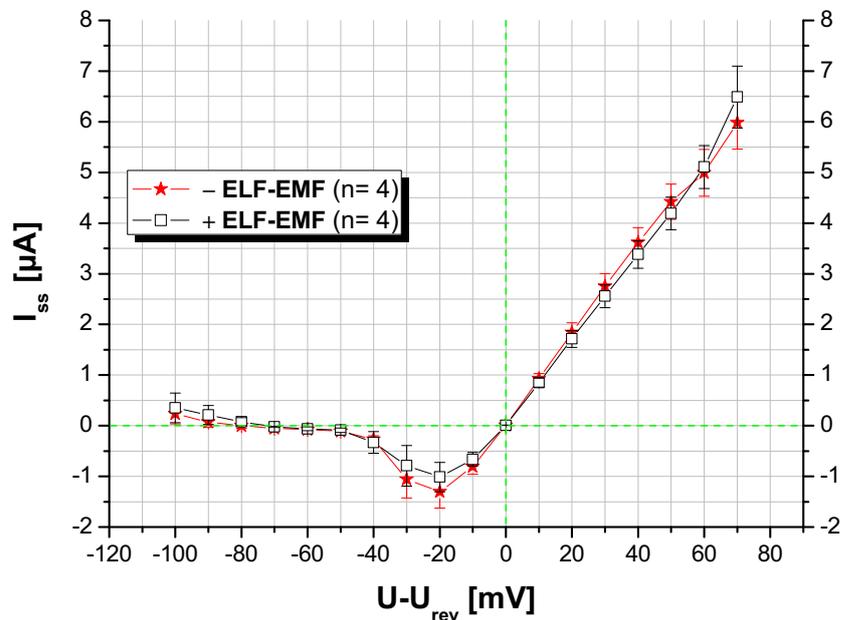
Feld, dem die Oozyten während der Translation von rCx46 ausgesetzt waren. In der Abbildung 3.1.20 ist der Stromverlauf nach einer Exposition eines permanenten 50 Hz (powerline) Feldes mit 2,3 mT magnetischer Flussdichte dargestellt. Es ist kein Unterschied im Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinien von nicht- und exponierten Oozyten zu erkennen. Die Expositionen mit der gleichen magnetischen Flussdichte und einem unterbrochenem 50 Hz Feld (Abb. 3.1.22) zeigt ebenfalls keine Kennlinienunterschiede. In den Strom-Spannungs-Kurven der nicht- und exponierten rCx46 Oozyten in Abbildung 3.1.20 bei 1 mT und 50 Hz liegen die Gleichgewichtsstromwerte der Feld-Oozyten unter den Werten der nichtexponierten Oozyten. Dieser Unterschied liegt jedoch innerhalb des mittleren Standardfehlers der nicht exponierten rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten.



**Abbildung 3.1.20:** Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) von nicht- und exponierten rCx46 exprimierten Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem von Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven), die während der Expression keinem (-ELF-EMF) oder einem permanenten ELF-EMF (50 Hz (powerline), 16 h, 2,3 mT) ausgesetzt waren, von denen der zugehörige Leckstrom und das jeweilige Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) subtrahiert wurde. (n := Anzahl der Oozyten)

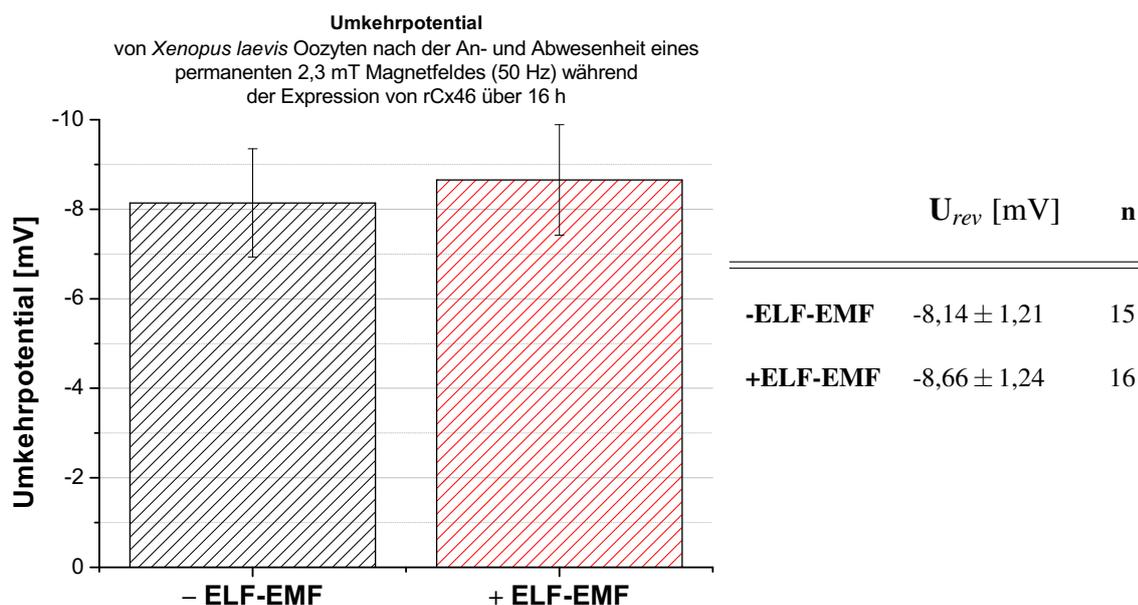


**Abbildung 3.1.21:** Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem von Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven), die während der Expression keinem (-ELF-EMF) oder einem unterbrochenen ELF-EMF (50 Hz (5 min an / 10 min aus), 16 h, 1 mT) ausgesetzt waren, von denen der zugehörige Leckstrom und das jeweilige Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) subtrahiert wurde. (n := Anzahl der Oozyten)

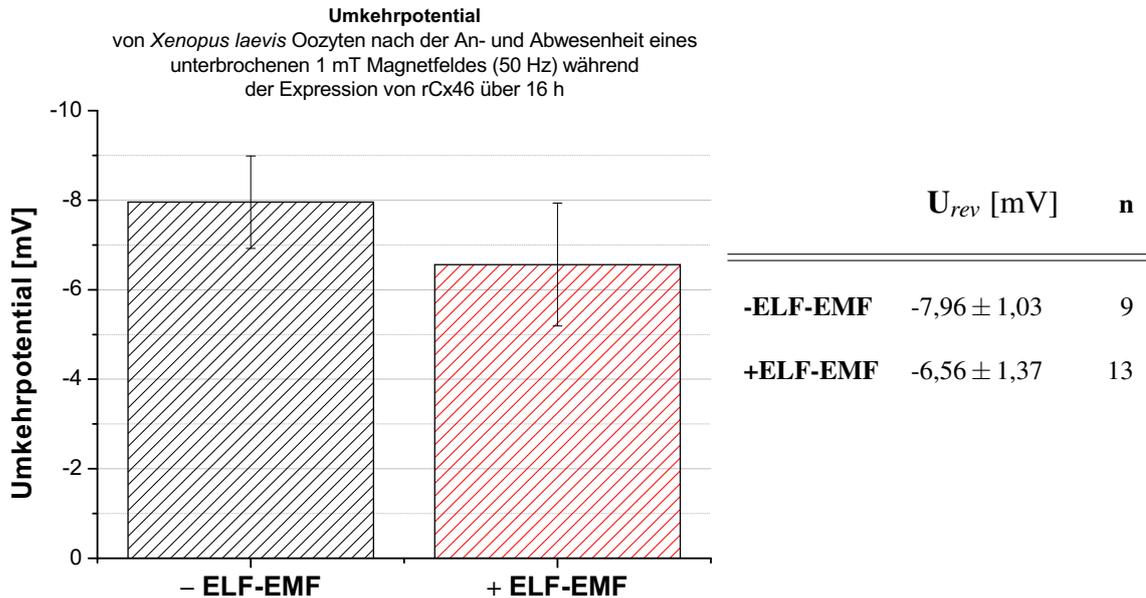


**Abbildung 3.1.22:** Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem von Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven), die während der Expression keinem (-ELF-EMF) oder einem unterbrochenen ELF-EMF (50 Hz (5 min an / 10 min aus), 16 h, 2,3 mT) ausgesetzt waren, von denen der zugehörige Leckstrom und das jeweilige Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) subtrahiert wurde. (n := Anzahl der Oozyten)

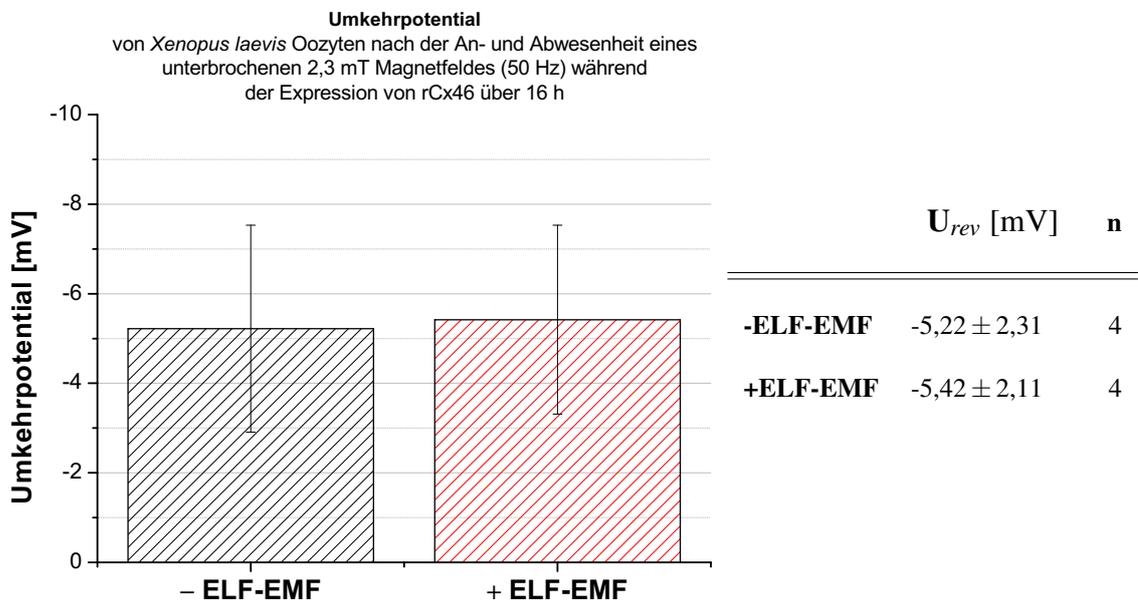
Aus den berechneten Umkehrpotentialen der einzelnen Messungen wurde der Mittelwert gebildet und in der Abbildungen 3.1.23 - 3.1.25 aufgetragen. Die einzelnen Abbildungen zeigen die Umkehrpotentiale zu den drei verschiedenen ELF-EMF Expositionen. In Abbildung 3.1.24 (1 mT; 50 Hz; 5 min an / 10 min aus) liegt der Betrag des Umkehrpotentials der feldexponierten Oozyten niedriger als der Betrag bei den nichtexponierten Oozyten. Dieses Umkehrpotential liegt im mittleren Standardfehlerbereich der Messungen und im Vergleich zur Abbildung 3.1.23 auch im Wertebereich der Messungen, die bei diesen Versuchen ermittelt wurden. Das Mittel des Umkehrpotentials aus den Versuchen, die bei einer Exposition eines unterbrochenen 50 Hz Feldes in Anwesenheit von 2,3 mT durchgeführt wurden, liegt mit  $-5,22$  mV (-ELF-EMF) und  $-5,45$  mV (Feld) über den Umkehrpotentialen der Messungen aus den Abbildungen 3.1.23 und 3.1.24, das bei etwa  $-8$  mV seinen Messwert hat. Das Umkehrpotential der nicht- und exponierten Oozyten in Abbildung 3.1.25 zeigt keine Differenz innerhalb des Experimentes unter diesen Feldexpositionsparametern.



**Abbildung 3.1.23:** Mittelwert  $\pm$  sem der Umkehrpotentiale von rCx46-exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten, die während der Translation über 16 h keinem (-ELF-EMF) oder einem EMF (+ELF-EMF) ausgesetzt waren (2,3 mT, 50 Hz (powerline), permanent). (n := Anzahl der Oozyten)



**Abbildung 3.1.24:** Mittelwert  $\pm$  sem der Umkehrpotentiale von rCx46-exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten, die während der Translation über 16 h keinem (-ELF-EMF) oder einem EMF (+ELF-EMF) ausgesetzt waren (1 mT, 50 Hz, unterbrochen (5 min an / 10 min aus)). (n := Anzahl der Oozyten)



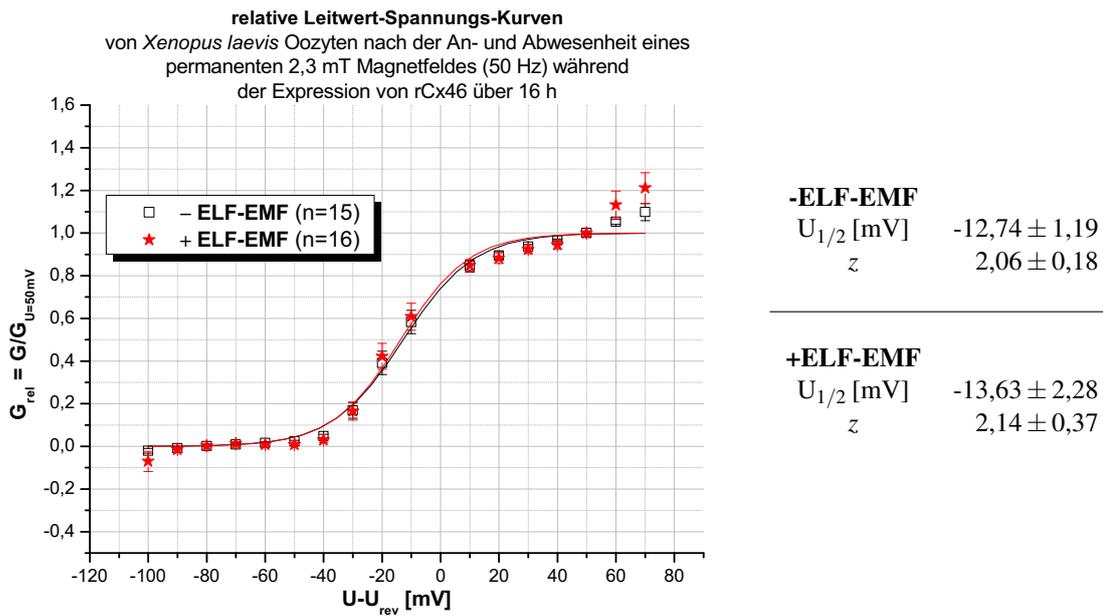
**Abbildung 3.1.25:** Mittelwert  $\pm$  sem der Umkehrpotentiale von rCx46-exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten, die während der Translation über 16 h keinem (-ELF-EMF) oder einem EMF (+ELF-EMF) ausgesetzt waren (2,3 mT, 50 Hz, unterbrochen (5 min an / 10 min aus)). (n := Anzahl der Oozyten)

### Leitfähigkeit von rCx46 Halbkanälen nach ELF-EMF Exposition

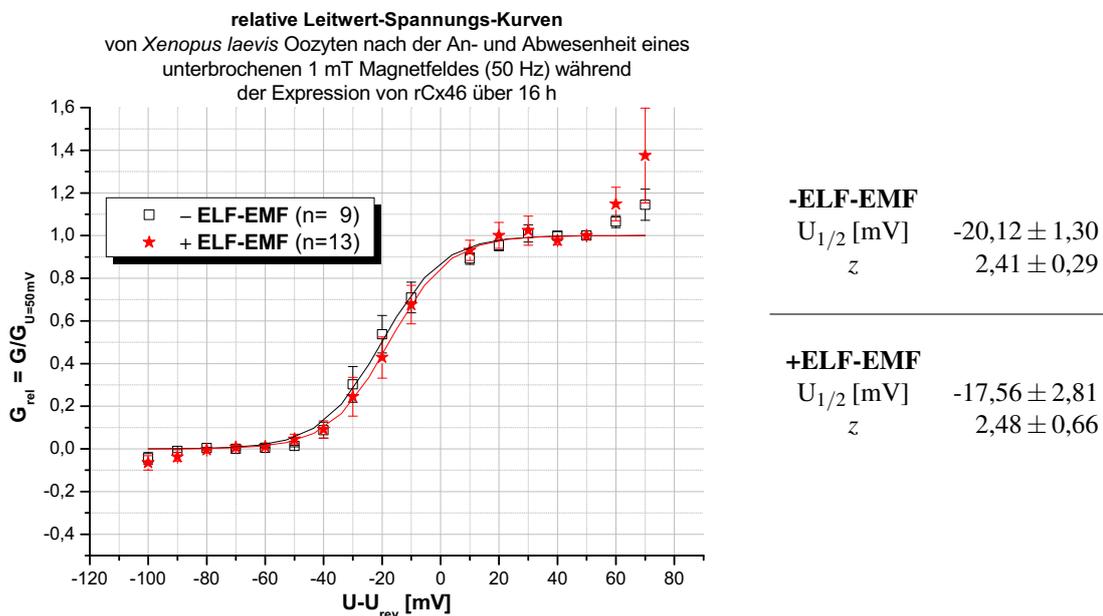
Nach den Analysemethoden, die im Methodenteil (S. 34) dieser Arbeit näher beschrieben wurden, sind die Leitfähigkeiten zu den oben dargestellten Strom-Spannungs-Kennlinien berechnet worden. Die dazugehörigen relativen Leitfähigkeitswerte sowie die angepasste Boltzmannfunktion mit den zugehörigen ermittelten Parametern sind in den Abbildungen 3.1.26 bis 3.1.28 dargestellt. Die einzelnen Abbildungen zeigen wie in den vorangegangenen Abschnitten einen Vergleich der nicht- und exponierten Oozyten zu den drei verschiedenen ELF-EMF Parametereinstellungen.

Ein Vergleich der nicht- mit den exponierten Oozyten in Abbildung 3.1.26 zeigt keinen signifikanten Effekt der Oozyten auf eine permanente Feldexposition von 50 Hz bei 2,3 mT. Die Parameter der halbmaximalen Aktivierungsspannung ( $U_{1/2}$ ) sind für die nicht- und feldexponierten rCx46 Oozyten bei einer permanenten ELF-EMF Exposition (2,5 mT, 50 Hz) nahezu gleich und zeigen auch keinen Unterschied in der Gating Charge (Abb. 3.1.26). Für die Gating Charge nach einer unterbrochenen 50 Hz ELF-EMF Exposition mit 1 mT ist ebenfalls kein Unterschied festzustellen (Abb. 3.1.27). Bei der unterbrochenen ELF-EMF Applikation (2,3 mT, 50 Hz) ist die Gating Charge der nichtexponierten rCx46 Oozyten höher als bei den exponierten rCx46 Oozyten (Abb. 3.1.28). Jedoch liegt die Gating Charge der exponierten rCx46 Oozyten zu dieser ELF-EMF Applikation im Vergleich mit der Gating Charge aus den anderen Versuchen innerhalb der Abweichungen.

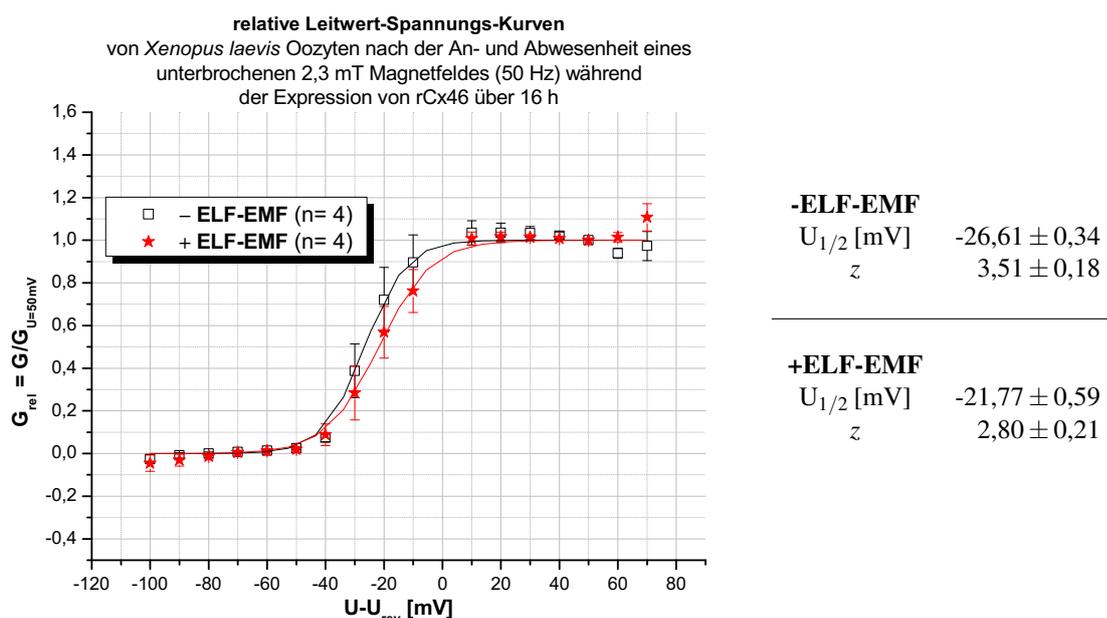
Die halbmaximalen Aktivierungsspannungen ( $U_{1/2}$ ) sind bei den Versuchen nach einer unterbrochenen ELF-EMF Exposition (1 mT und 2,3 mT) für die exponierten kleiner als für die nichtexponierten rCx46 Oozyten. Dieser Effekt (die Differenz) ist für die ELF-EMF Exposition bei 2,3 mT deutlicher ausgeprägt. Dies könnte eine mögliche Beeinflussung des elektromagnetischen Feldes auf die Spannungssensitivität der rCx46 Halbkanäle hindeuten. Allerdings sind die halbmaximalen Aktivierungsspannung  $U_{1/2}$  und die Gating Charge  $z$  nicht signifikant unterschiedlich und liegen innerhalb der Standardfehler der normierten Leitfähigkeitskurven der nichtexponierten Oozyten.



**Abbildung 3.1.26:** Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem der Leitfähigkeitskurven, die bei  $(U-U_{rev})=+50$  mV normiert wurden. Die durchgehenden Linien repräsentieren an die Mittelwertskurven genäherte Boltzmannfunktionen ( $y_{Boltz} = 1/(1 + e^{(U_{1/2}-U)*z/0,025})$ ). Die berechneten Parameter der Boltzmann-Kurven sind in der Tabelle dargestellt. ELF-EMF-Exposition: 2,3 mT; 50 Hz, 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)



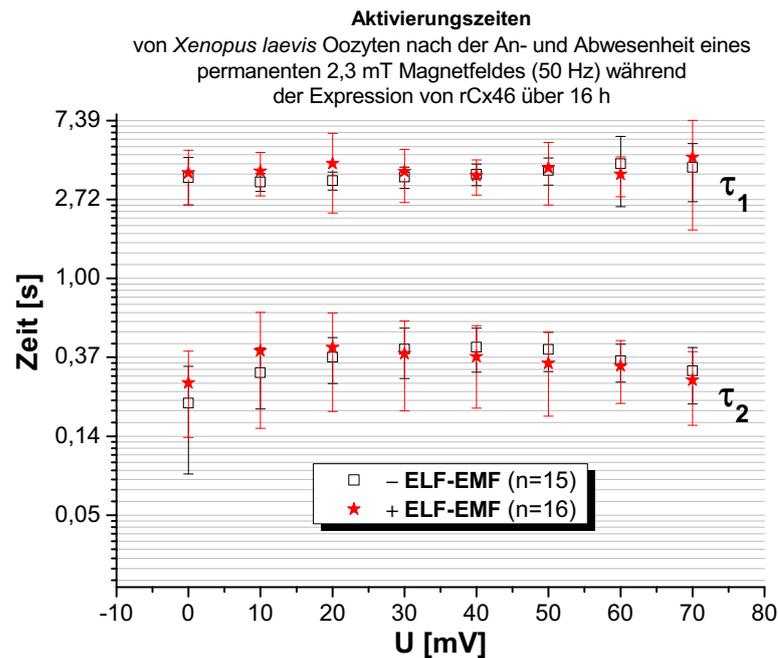
**Abbildung 3.1.27:** Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem von Leitfähigkeitskurven, die bei  $(U-U_{rev})=+50$  mV normiert wurden. Die durchgehenden Linien repräsentieren an die Mittelwertskurven genäherte Boltzmannfunktionen ( $y_{Boltz} = 1/(1 + e^{(U_{1/2}-U)*z/0,025})$ ). Die berechneten Parameter der Boltzmann-Kurven sind in der Tabelle dargestellt. ELF-EMF-Exposition: 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)



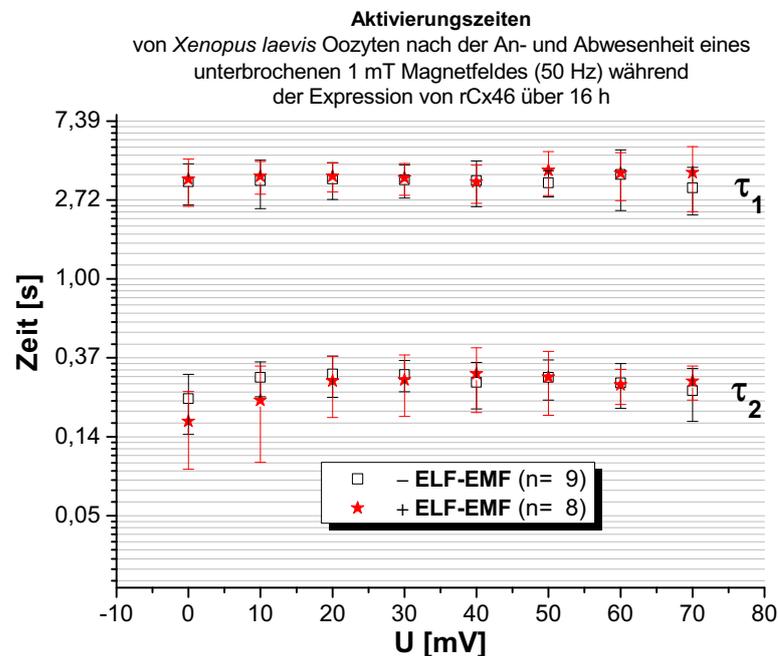
**Abbildung 3.1.28:** Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem von Leitfähigkeitskurven, die bei  $(U-U_{rev})=+50$  mV normiert wurden. Die durchgehenden Linien repräsentieren an die Mittelwertskurven genäherte Boltzmannfunktionen ( $y_{Boltz} = 1/(1 + e^{(U_{1/2}-U)*z/0.025})$ ). Die Parameter aus diesen Boltzmann-Kurven sind in der Tabelle dargestellt. ELF-EMF-Exposition: 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus) 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)

### Einfluss ELF-EMF auf die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von rCx46 in Oozyten exprimierten Halbkanälen

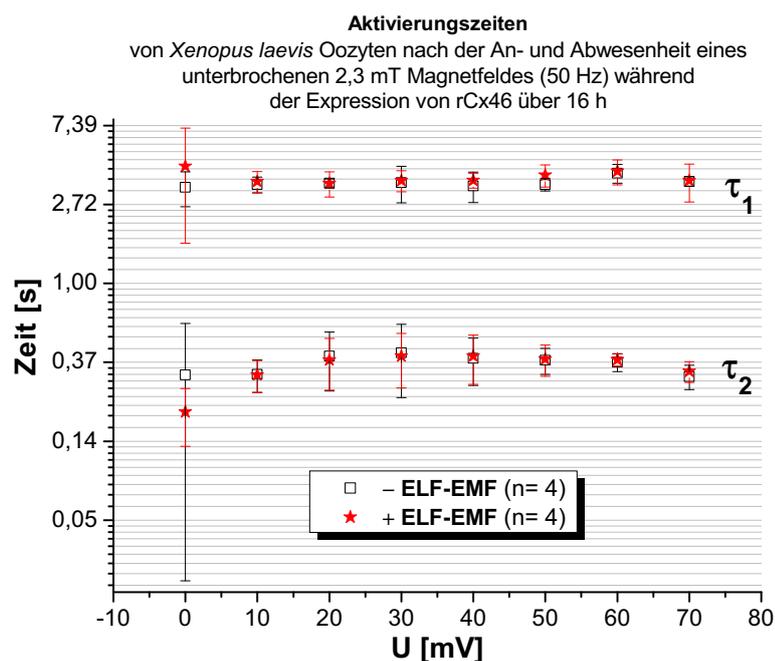
Um genauer zu untersuchen, ob die elektromagnetischen Feldexpositionen während des Einbaus vom Membranprotein rCx46 in die Oozytenmembran eine Auswirkung auf dessen späteren Funktion als Halbkanal hatten, wurden die Aktivierung und die Deaktivierung der einzelnen Stromamplituden untersucht. Die Aktivierungskurven, ausgelöst durch die Applikation verschiedener Spannungspulse, wurden mit der Summe zweier Exponentialfunktionen angepasst (ausführliche Beschreibung im Methodenteil dieser Arbeit, S. 34) und die resultierenden gemittelten Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit ihren Standardabweichungen (sd) in den Abbildungen 3.1.29 bis 3.1.31 halblogarithmisch als Funktion über die Zeit aufgetragen. Zu allen drei Expositionen konnte kein Unterschied in beiden Zeitkonstanten festgestellt werden.



**Abbildung 3.1.29:** Aktivierungszeiten ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sd der langsamen ( $\tau_1$ ) und der schnelleren ( $\tau_2$ ) Aktivierungszeit zu verschiedenen Aktivierungspulsen. Die Aktivierungszeiten wurden mit einer Exponentialfunktion ( $I(t) = a_0 + A_1 * (1 - e^{-x/\tau_1}) + A_2 * (1 - e^{-x/\tau_2})$ ) für die einzelnen Stromkurven ermittelt. ELF-EMF-Exposition: 50 Hz, 2,3 mT, 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)

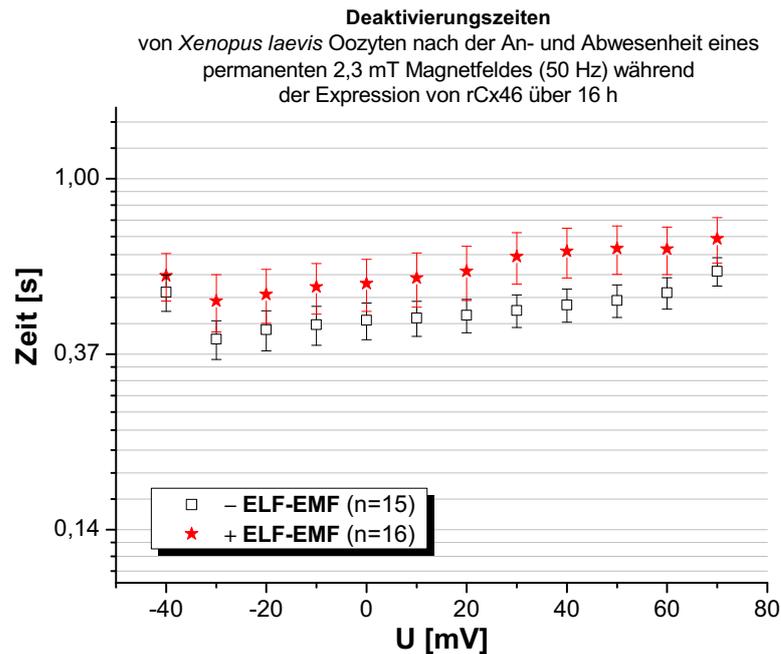


**Abbildung 3.1.30:** Aktivierungszeiten ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sd der langsamen ( $\tau_1$ ) und der schnelleren ( $\tau_2$ ) Aktivierungszeit zu verschiedenen Aktivierungspulsen. Die Aktivierungszeiten wurden mit einer Exponentialfunktion ( $I(t) = a_0 + A_1 * (1 - e^{-x/\tau_1}) + A_2 * (1 - e^{-x/\tau_2})$ ) für die einzelnen Stromkurven ermittelt. ELF-EMF-Exposition: 50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)

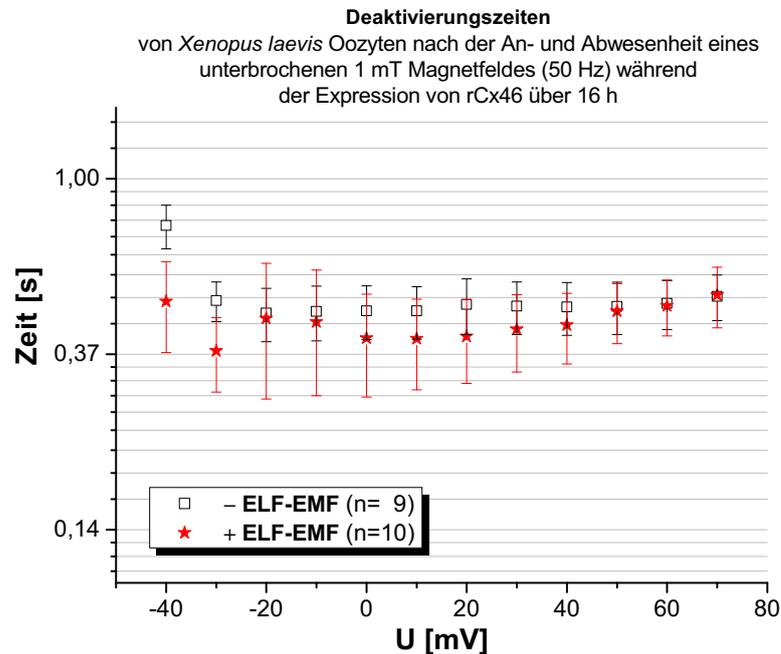


**Abbildung 3.1.31:** Aktivierungszeiten ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sd der langsamen ( $\tau_1$ ) und der schnelleren ( $\tau_2$ ) Aktivierungszeit zu verschiedenen Aktivierungspulsen. Die Aktivierungszeiten wurden mit einer Exponentialfunktion ( $I(t) = a_0 + A_1 * (1 - e^{-x/\tau_1}) + A_2 * (1 - e^{-x/\tau_2})$ ) für die einzelnen Stromkurven ermittelt. ELF-EMF-Exposition: 50 Hz, 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)

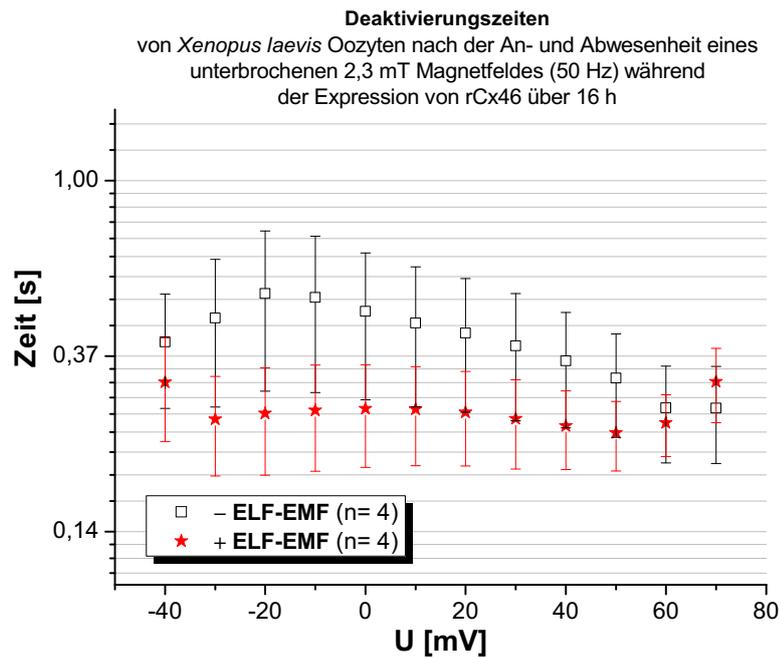
Die Deaktivierungskurven, durch die die Repolarisation eines Spannungspulses erfolgte, wurden mit einer einfachen Exponentialfunktion und dem Software Programm Origin 7.0 angepasst (s. Methoden, S. 34). Aus der resultierenden Zeitkonstante  $\tau$  wurde der Mittelwert gebildet und in den Abbildungen 3.1.32 - 3.1.34 halblogarithmisch als Funktion über die Spannung zu den verschiedenen Expositionen dargestellt. In Abbildung 3.1.32 konnte keine Beeinflussung der Zeitkonstante nach Exposition eines permanenten elektromagnetischen Feldes von 50 Hz und 2,3 mT festgestellt werden. Die Beobachtung der Deaktivierungsunterschiede in den Stromamplituden (Abb. 3.1.18 a)) zwischen nicht- und exponierten Oozyten bei einer erfolgten ELF-EMF Applikation (1 mT, 50 Hz, intermittierend) spiegeln sich nicht in einer Veränderung der Zeitkonstanten  $\tau$  in halblogarithmischen Darstellung wider (Abb. 3.1.32). Der Unterschied der Zeitkonstanten in Abbildung 3.1.19 a) nach einer Exposition von einem unterbrochenen ELF-EM Feld bei 2,3 mT und 50 Hz liegt innerhalb der Standardfehler.



**Abbildung 3.1.32:** Deaktivierungszeit ( $\tau$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem der Deaktivierungszeit zu den verschiedenen Aktivierungspulsen. Die Deaktivierung wurde über mit einer Exponentialfunktion ( $I(t) = a_0 + A_1 * (1 - e^{-x/\tau})$ ) für die einzelnen Stromkurven ermittelt. ELF-EMF-Exposition: 50 Hz, 2,3 mT, 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)



**Abbildung 3.1.33:** Deaktivierungszeit ( $\tau$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem der Deaktivierungszeit zu den verschiedenen Aktivierungspulsen. Die Deaktivierung wurde mit einer Exponentialfunktion ( $I(t) = a_0 + A_1 * (1 - e^{-x/\tau})$ ) für die einzelnen Stromkurven ermittelt. ELF-EMF-Exposition: 50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)



**Abbildung 3.1.34:** Deaktivierungszeit ( $\tau$ ) von nicht- und exponierten rCx46-exprimierten-Oozyten: Mittelwert  $\pm$  sem der Deaktivierungszeit zu den verschiedenen Aktivierungspulsen. Die Deaktivierung wurde mit einer Exponentialfunktion ( $I(t) = a_0 + A_1 * (1 - e^{-x/\tau})$ ) für die einzelnen Stromkurven ermittelt. ELF-EMF-Exposition: 50 Hz, 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h. (n := Anzahl der Oozyten)

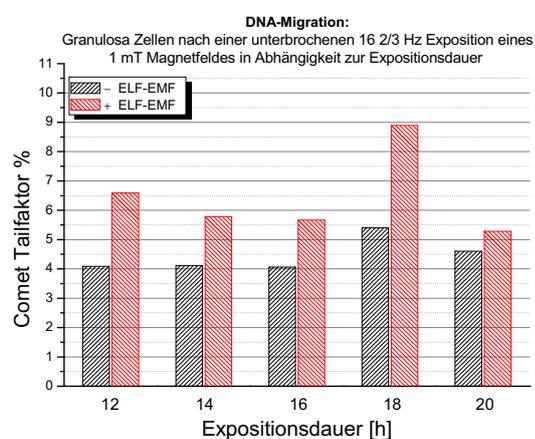
## **3.2 Einfluss elektromagnetischer Felder auf die DNA-Migration im Comet Assay**

Im Rahmen des Projektes REFLEX (Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards from Low Energy Electromagnetic Field Exposure Using Sensitive *in vitro* Methods) wurden die Auswirkungen von nieder- und hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf unterschiedliche zelluläre und subzelluläre Niveaus überprüft. Mittels des Comet Assays, einem sensitiven Tests zum Nachweis von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen, hatten Untersuchungen von der am Projekt REFLEX beteiligten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Rüdiger (Klinische Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinischen Universität Wien / Österreich) ergeben, dass ein unterbrochenes Feld von fünfminütiger Anphase und einer zehnminütigen Ausphase eine Auswirkung auf die DNA-Migration hat (Ivancsits et al., 2002). Diese Auswirkungen sollten darauf hin untersucht werden, ob sie zellspezifisch sind. Des Weiteren wurde untersucht, ob elektromagnetische Felder mit verschiedenen Parametereinstellungen einen Einfluss auf die DNA-Schädigung haben. Da die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Rüdiger unter oben genannten Parametern eine Beeinflussung durch EMF-Exposition festgestellt hatten (Ivancsits et al., 2002, 2003a,b), wurden unterbrochene elektromagnetische Felder von 1 mT untersucht. Die EM-Felder unterschieden sich in der Expositionszeit (12 - 20 h, in 2 h Abständen) und der Frequenz (8, 16 2/3, 30, 50, 300 und 500 Hz bei 1 mT, sowie 1 kHz bei 20 und 600  $\mu$ T). Parallel zu den Untersuchungen der Granulosazellen zu verschiedenen Expositionsdauern wurden unter den gleichen Bedingungen diese Experimente in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Rüdiger durchgeführt, um festzustellen, ob eine Reproduzierbarkeit in unterschiedlichen Laboren möglich ist.

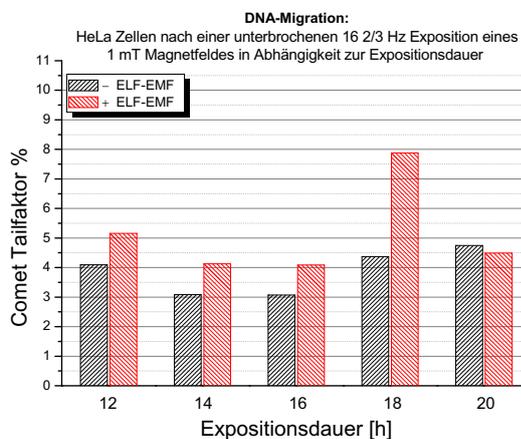
### **3.2.1 Untersuchungen zu DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Alkalischer Comet Assay, pH > 13)**

Mittels der Methode des alkalischen Comet Assays (pH > 13) können DNA Einzel- und Doppelstrangbrüche sichtbar gemacht werden (Singh et al., 1988). Nach einer Exposition mit einem elektromagnetischen 16 2/3 Hz Feld (magnetische Flussdichte: 1 mT) wurden verschiedene Zelllinien 24 Stunden nach der Passage mit der Einzel-Zell-Gel-Elektrophorese (Comet Assay) untersucht. Nach der Exposition und der Durchführung der Comet Assay Methode wurden jeweils zwei der drei präparierten Objektträger angefärbt und mittels der Methode der Klasseneinteilung von Anderson et al. (1994)

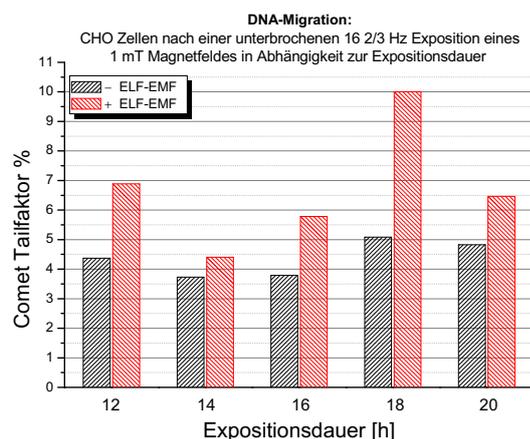
ausgezählt. In Abbildung 3.2.1 ist der Tailfaktor von drei verschiedenen Zelllinien (a): Granulosa (GC-FSHR-17), b): HeLa, c): Chinese Hamster Ovary (CHO)) dargestellt, die dem elektromagnetischen Feld unterschiedlich lang ausgesetzt waren. Alle drei Abbildungen zeigen bei einer Expositionsdauer von 18 Stunden den größten Unterschied zwischen dem Tailfaktor von nicht- zu feldexponierten Zellen. In der Abbildung 3.2.1 d) sind die Tailfaktoren der exponierten auf den zu den Expositionszeiten gehörigen Tailfaktor der nichtexponierten Zellen normiert worden. Der relative Tailfaktor der Zellen nimmt ab einer Expositionszeit des ELF-EMF von 12 Stunden bis zu einer Expositionszeit von 18 Stunden zu und fällt nach 20 Stunden wieder rapide ab.



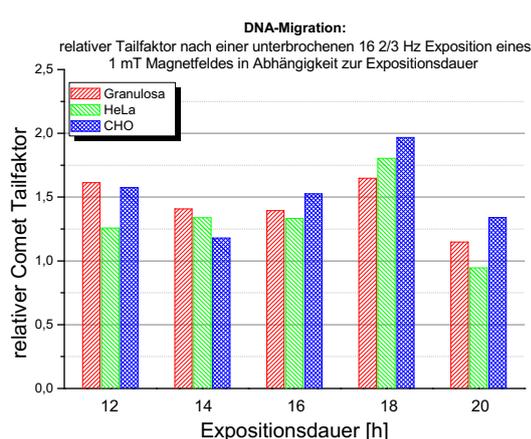
a) Granulosa



b) HeLa



c) CHO

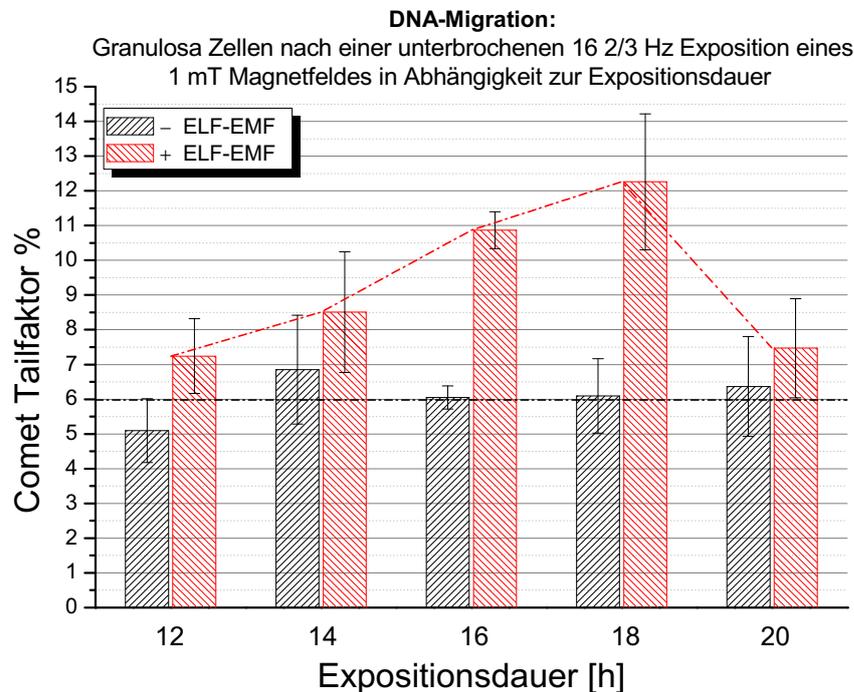


d) Granulosa-HeLa-CHO

**Abbildung 3.2.1:** Analyse der DNA-Migration aus verschiedener im Comet Assay Zelllinien nach Induktion eines ELF-EMF (16 2/3 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus)). Der Comet Tailfaktor ist als Funktion gegen die Expositionsdauer dargestellt mit den Zellen a) Granulosa b) HeLa c) CHO. d) Vergleich der relativen Tailfaktoren der Zelllinien Granulosa, HeLa und CHO.

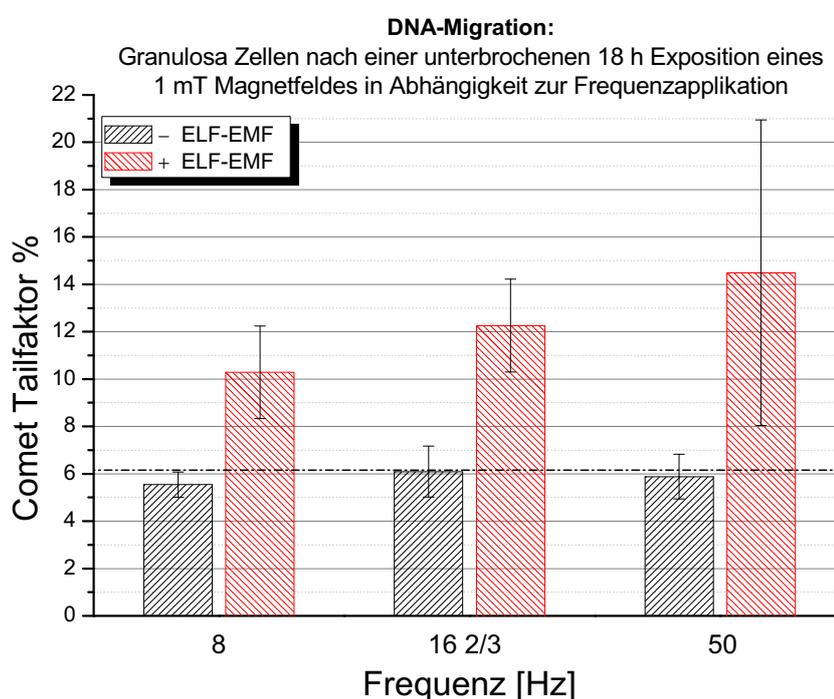
Diese ersten Versuche mit verschiedenen Zelllinien zeigten ein ähnliches Verhalten und mit der Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Rüdiger (Klinische Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinischen Universität Wien / Österreich) wurde für weitere Untersuchungen die Granulosa-Zelllinie verwendet. Für die Quantifizierung der in Abbildung 3.2.1 a) gemessenen Werte wurden weitere Versuche unter den Expositionsbedingungen von  $16\frac{2}{3}$  Hz, 1 mT (5 min an / 10 min aus) mit den Granulosa-Zellen zu verschiedenen Expositionszeiten durchgeführt und nach Anderson et al. (1994) ausgewertet.

Die Abbildung 3.2.2 zeigt den Mittelwert des Tailfaktors mit dem dazugehörigen Standardfehler (sem) in Abhängigkeit zur Expositionsdauer. Mit steigender Expositionszeit steigt auch der Tailfaktor der exponierten Zellen, bis er bei 18 Stunden sein Maximum erreicht und dann wieder mit länger andauernder Einwirkungszeit des Feldes abfällt. Die nichtexponierten Zellen bleiben im Vergleich dazu konstant. Der Maximalwert des Tailfaktors der Zellen, die einem  $16\frac{2}{3}$  Hz EM-Feld (1 mT, (5 min an / 10 min aus) ausgesetzt waren, liegt bei 18 Stunden und damit um ein Zweifaches höher als der Tailfaktor der Kontroll-Zellen.



**Abbildung 3.2.2:** Alkalischer Comet Assay von Granulosa Zellen (GFSHR-17): Mittelwert  $\pm$  sem des Tailfaktors von nicht- und feldexponierten Granulosa Zellen zu verschiedener Expositionsdauer. (ELF-EMF-Exposition:  $16\frac{2}{3}$  Hz; 1 mT; (5 min an / 10 min aus); Expositionsdauer: 12-20 h in Zwei-Stunden-Abständen; mindestens zwei unabhängige Experimente s. Methoden S. 20)

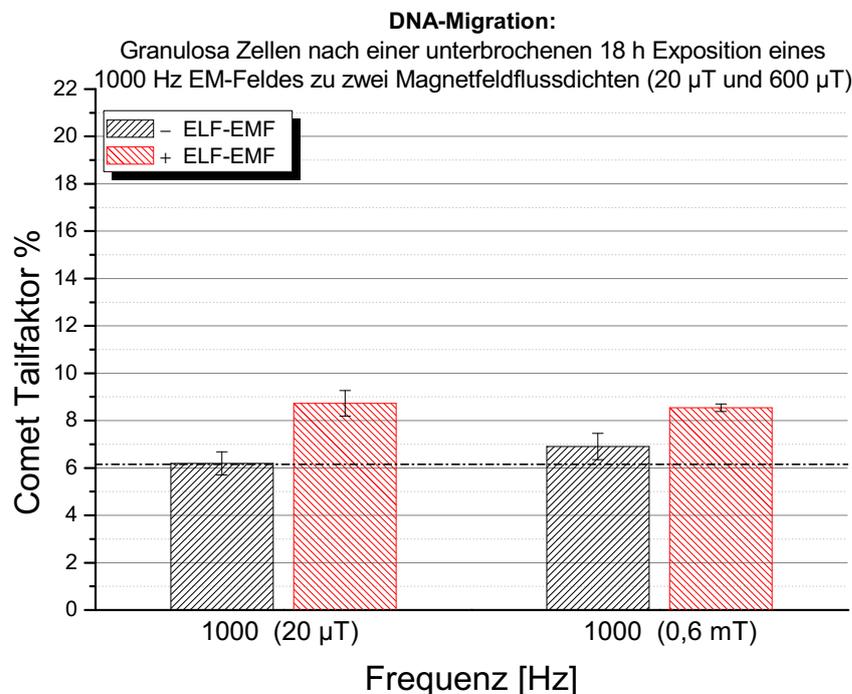
Die folgenden Untersuchungen mit der alkalischen Messmethode des Comet Assays wurden mit der Applikation von intermittierenden elektromagnetischen Feldern (5 min an / 10 min aus) mit einer Flussdichte von 1 mT durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse (s. Abb. 3.2.2) wurde eine Expositionsdauer von 18 Stunden mit verschiedenen Frequenzen gewählt. In Abbildung 3.2.3 ist der Tailfaktor von nicht- und feldexponierten Granulosa-Zellen als Funktion über die applizierte Frequenz dargestellt. Die Mittelwerte des Tailfaktors der ELF-EMF ausgesetzten Zellen steigen mit Zunahme der Frequenz von 8 Hz über 16 2/3 Hz zu 50 Hz an. Die Werte der Kontroll-Zellen bleiben dagegen konstant.



**Abbildung 3.2.3:** Alkalischer Comet Assay von Granulosa Zellen (GFSHR-17): Mittelwert  $\pm$  sem des Tailfaktors von nicht- und feldexponierten Granulosa Zellen zu verschiedenen Frequenzen. (ELF-EMF-Exposition: 1 mT; (5 min an / 10 min aus); Expositionsdauer: 18 h; 8, 16 2/3 und 50 Hz; mindestens zwei unabhängige Experimente s. Methoden S. 20)

Um zu überprüfen, ob die vermutete Tendenz eines steigenden Tailfaktors mit steigender Frequenz aus Abbildung 3.2.3 auch für höhere Frequenzen zutrifft, wurde die mit der ELF-EMF Apparatur (s. Methoden, S. 39) höchst mögliche Frequenzmodulation von 1000 Hz gewählt. Die Möglichkeiten dieser Apparatur waren in diesem Frequenzbereich hinsichtlich der magnetischen Flussdichte begrenzt, sodass mit 600  $\mu$ T die größtmögliche Einstellung gewählt werden konnte. Um einen Vergleich bei dieser Frequenz zu erhalten, wurden zusätzlich Versuche mit der kleinstmöglichen magnetischen Flussdichte 20  $\mu$ T

durchgeführt. Die Resultate aus den Auswertungen der Cometen in Form der Klasseneinteilung nach Anderson et al. (1994) ist in Abbildung 3.2.4 dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu den nichtexponierten Zellen festgestellt werden.

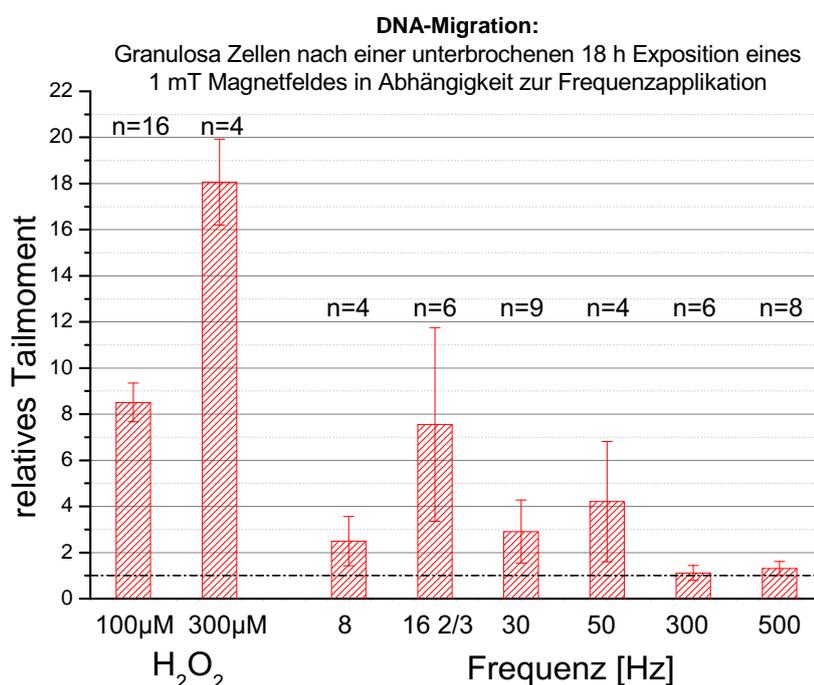


**Abbildung 3.2.4:** Alkalischer Comet Assay von Granulosa Zellen (GFSHR-17): Mittelwert  $\pm$  sem des Tailfaktors von nicht- und feldexponierten Granulosa Zellen zu zwei verschiedenen magnetischen Induktionen. (ELF-EMF-Exposition: 1000 Hz; (5 min an / 10 min aus); Expositionsdauer: 18 h; 20  $\mu$ T und 0,6 mT; mindestens zwei unabhängige Experimente s. Methoden S. 20)

Durch die zur öffentlichen Nutzung zur Verfügung gestellten Software *cometscore* (Tri-Tek Corporation, USA) wurde eine schnellere Auswertung der zu untersuchenden Objektträger ermöglicht. So wurden zur Untersuchung der DNA-Migration nach Einfluss eines 1 mT ELF-EM Feldes weitere Frequenzen über 18 Stunden auf die Granulosa-Zellen appliziert. Um diese mit den Ergebnissen aus vorherigen Experimenten vergleichen zu können, wurde die DNA-Migration dieser Versuche zusätzlich zur Tailfaktorbestimmung mit diesem Bildanalyseprogramm ausgewertet.

In Abbildung 3.2.5 sind die Mittelwerte der relativen Tailmomente von Cometen der Granulosazellen dargestellt, die für 18 Stunden einem unterbrochenen ELF-EM Feld von 1m T zu verschiedenen Frequenzen ausgesetzt waren. Des weiteren sind die Mittelwerte der relativen Tailmomente der Positiv-Kontrollen (Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 Minuten) aufgetragen. Die relativen Tailmomente ergaben sich aus der Normierung auf die dazu-

gehörigen Kontrollwerte. Die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  ausgelösten DNA-Schädigungen zeigten die erwarteten hohen Tailmomente relativ zur Kontrolle. Die Werte für die Frequenzen 8 Hz und 30 Hz lagen zweieinhalb- und dreimal so hoch wie die Kontrollen. Für 16 2/3 Hz und 50 Hz lagen die Werte bei 7,5 und 4 relativ zum Tailmoment der Kontrollen. Bei den höheren Frequenzen von 300 Hz und 500 Hz konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Wie zu erkennen ist, liegt kein linearer Zusammenhang zwischen der Zunahme der Frequenz und einer Zunahme von DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen vor.



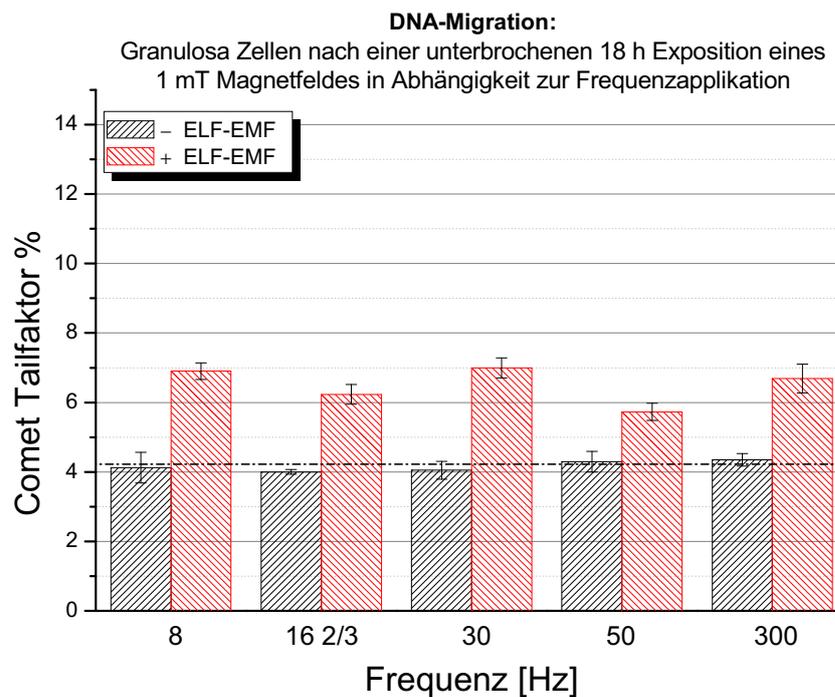
**Abbildung 3.2.5:** Alkalischer Comet Assay von Granulosa Zellen (GFSHR-17): Mittelwert  $\pm$  sem des relativen Tailmoments von nicht- und feldexponierten Granulosa Zellen zu verschiedenen Frequenzen. ELF-EMF-Exposition: 1 mT; (5 min an / 10 min aus); Expositionsdauer: 18 h; 8, 16 2/3, 30, 50, 300 und 500 Hz

### 3.2.2 Untersuchungen zu DNA Doppelstrangbrüchen (Neutraler Comet Assay, pH 8,5)

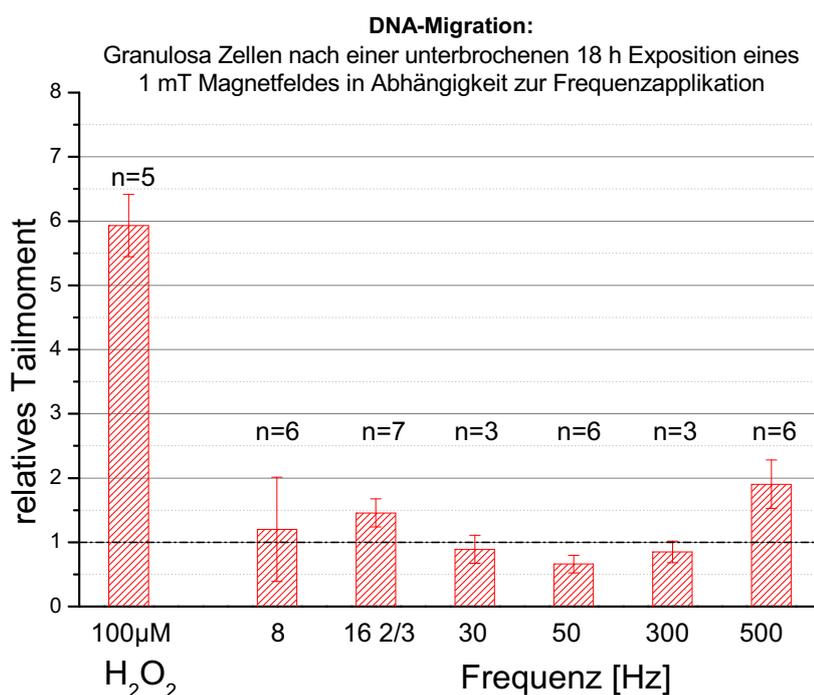
Der neutrale Comet Assay unterscheidet sich zum alkalischen Comet Assay ( $\text{pH} > 13$ ) in der Verwendung eines Tris-Acetat-Puffers (s. Anhang C.3) für die Denaturierung und die Elektrophorese (Singh und Stephens, 1997). Diese Methode eignet sich mit einer guten sensitiven Reproduzierbarkeit zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen. In der optischen Darstellung der später auszuwertenden Zellen zeigt sich eine kompaktere Form der Cometen, weshalb die Tailfaktoren und die relativen Tailmomente geringer ausfallen

als bei einem alkalischen Test. Im alkalischen Test werden die Einzelstrangbrüche und auch die alkalilabilen Stellen zu Doppelstrangbrüchen umgewandelt. Diese tragen dann bei der Elektrophorese zu einer stärkeren DNA-Migration bei.

Wie schon bei den Versuchen mit dem alkalischen Protokoll für den Comet Assay wurden die Granulosa Zellen 18 Stunden lang einem elektromagnetischen Feld mit der magnetischen Flussdichte von 1 mT über unterschiedliche Frequenzen ausgesetzt. Die Auswertung der Cometen nach der Klasseneinteilung von Anderson et al. (1994) (s. Methoden, S. 20) ist in der Abbildung 3.2.6 als Mittelwert des Tailfaktors über die Expositionsfrequenz dargestellt. Die feldexponierten Zellen weisen zu jeder der untersuchten Expositionsfrequenzen einen erhöhten Tailfaktor gegenüber den nichtexponierten Zellen auf. Der Betrag dieser Erhöhung bleibt jedoch unabhängig von einer Veränderung der Frequenz.



**Abbildung 3.2.6:** Neutraler Comet Assay von Granulosa Zellen (GFSHR-17): Mittelwert  $\pm$  sem des Tailfaktors von nicht- und feldexponierten Granulosa Zellen zu verschiedenen Frequenzen. (ELF-EMF-Exposition: 1 mT; (5 min an / 10 min aus); Expositionsdauer: 18 h; 8, 16 2/3, 30, 50 und 300 Hz; mindestens zwei unabhängige Experimente s. Methoden S. 20)



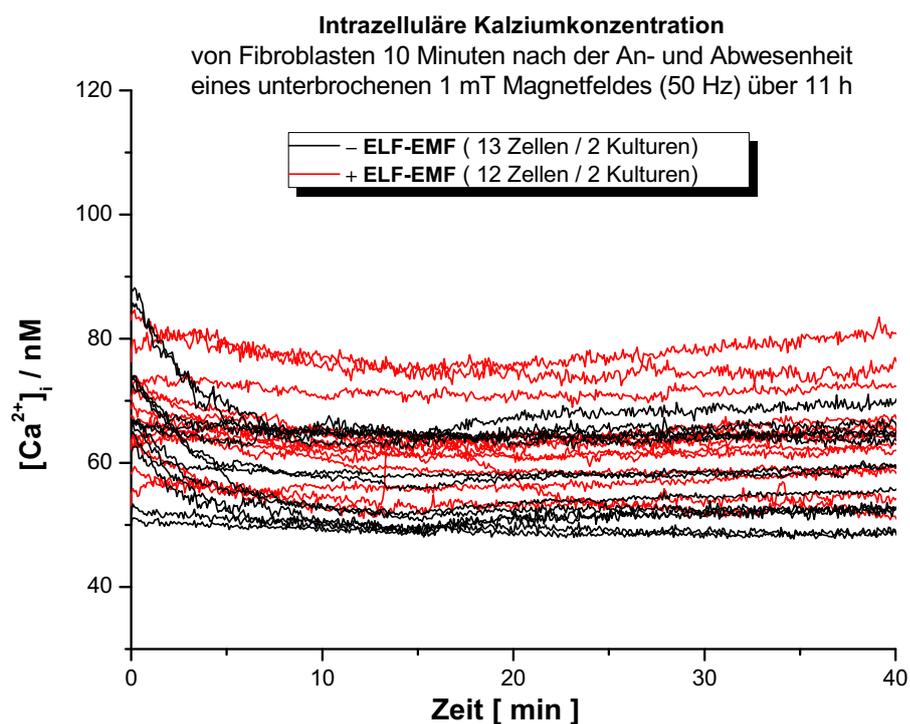
**Abbildung 3.2.7:** Neutraler Comet Assay von Granulosa Zellen (GFSHR-17): Mittelwert  $\pm$  sem des relativen Tailmoment von nicht- und feldexponierten Granulosa Zellen zu verschiedenen Frequenzen. ELF-EMF-Exposition: 1 mT; (5 min an / 10 min aus); Expositionsdauer: 18 h zu den jeweiligen Frequenzen 8, 16 2/3, 30, 50, 300 und 500 Hz

Zu diesen Parametereinstellungen wurden weitere Versuche durchgeführt und mit der Methode der Bildauswertung das relative Tailmoment ermittelt. Das relative Tailmoment der Granulosa Zellen nach der Durchführung des neutralen Comet Assays ist in der Abbildung 3.2.7 dargestellt. Die Positiv-Kontrolle (100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition) zeigt ein hohes Tailmoment relativ zu nicht exponierten Zellen (deren Wert bei 1 liegt). Die relativen Tailmomente der Zellen zu den verschiedenen Frequenzen zeigen außer bei der Frequenz von 500 Hz keine wesentliche Erhöhung. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mittels des alkalischen Comet Assays konnten hier keine signifikanten Veränderungen in der DNA-Migration festgestellt werden, d. h. es wird angenommen, dass hauptsächlich DNA-Einzelstrangbrüche und Crosslinks verursacht werden.

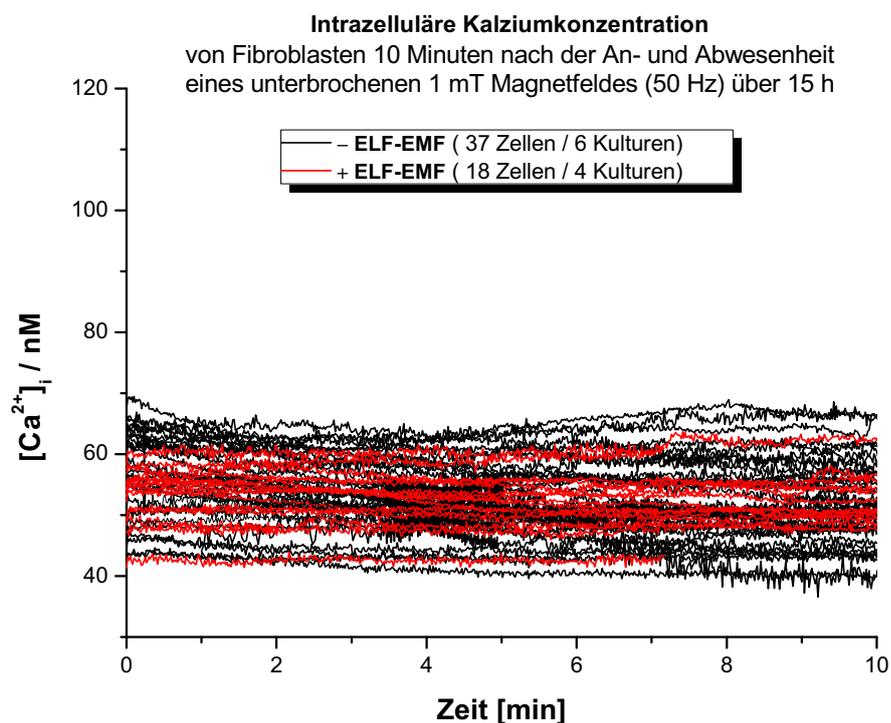
### 3.3 Einfluss von ELF-EMF auf $[Ca^{2+}]_i$

In einer Arbeit von Ivancsits et al. (2002) wurde eine Zunahme von DNA-Brüchen nach einer EMF-Exposition (50 Hz) in menschlichen Fibroblasten festgestellt, die signifikant von den Expositionsunterbrechungszeiten abhängt. Jedoch sind die zellulären Mechanismen für diesen genotoxischen Effekt nicht bekannt, da ionisierende Effekte bei diesen geringen Applikationen nicht auftreten können (Walleczek, 1992). Die durch die elektromagnetischen Felder verursachten DNA-Strangbrüche, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden, könnten Stoffwechselwege beeinflussen, die die DNA direkt beeinflussen oder die DNA-Reparatur unterdrücken. Da die Mitochondrien zahlreiche wichtige Signalwege und intrazelluläre Kalziumkonzentrationen - Regulationsmechanismen beinhalten (Robb-Gaspers et al., 1998, Salvioli et al., 2001), könnte ein Mechanismus, der die genotoxischen Effekte bewirkt, in der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) reflektiert werden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Rüdiger (Klinische Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinischen Universität Wien / Österreich) wurden deshalb die Fibroblasten (AG Prof. Dr. H. W. Rüdiger) und die Granulosazellen (AG Prof. Dr. H.-A. Kolb) für die folgenden Experimente verwendet.

Nach einer elektromagnetischen Feldeinwirkung auf eine menschliche diploide Fibroblasten-Zelllinie, (kultivierte Hautgewebeproben eines gesunden Spenders), wurden die intrazellulären Kalziumkonzentrationen  $[Ca^{2+}]_i$  dieser Zellen mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-AM untersucht (s. Methoden, S. 27). Das elektromagnetische Feld, dem die Zellen über unterschiedlich lange Expositionszeiten ausgesetzt waren, hatte eine magnetische Flussdichte von 1 mT und eine sinusförmige Frequenz von 50 Hz. Es wurde in einem unterbrochenen Rhythmus für fünf Minuten angelegt, danach folgte eine Pause ohne ELF-EMF Einwirkung von zehn Minuten. Eine Stunde vor Beendigung der Exposition wurden die Zellen für 60 Minuten mit Fura-2-AM beladen und die intrazellulären Kalziumkonzentrationen mit dem Programm Aquacosmos (Hamamatsu Photonics KK, Japan) aufgenommen. In Abbildung 3.3.1 wurden zwei repräsentative Aufnahmen des  $[Ca^{2+}]_i$  als Funktion der Zeit untersucht. Abbildung 3.3.1 a) zeigt das  $[Ca^{2+}]_i$  von Fibroblasten, die dem oben beschriebenen ELF-EM Feld über elf Stunden ausgesetzt waren. Der Graph auf der rechten Seite 3.3.1 b) repräsentiert die  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte der gleichen Zelllinie über eine ELF-EMF Expositionszeit von 15 Stunden. Ein Einfluss des elektromagnetischen Feldes konnte nicht beobachtet werden.



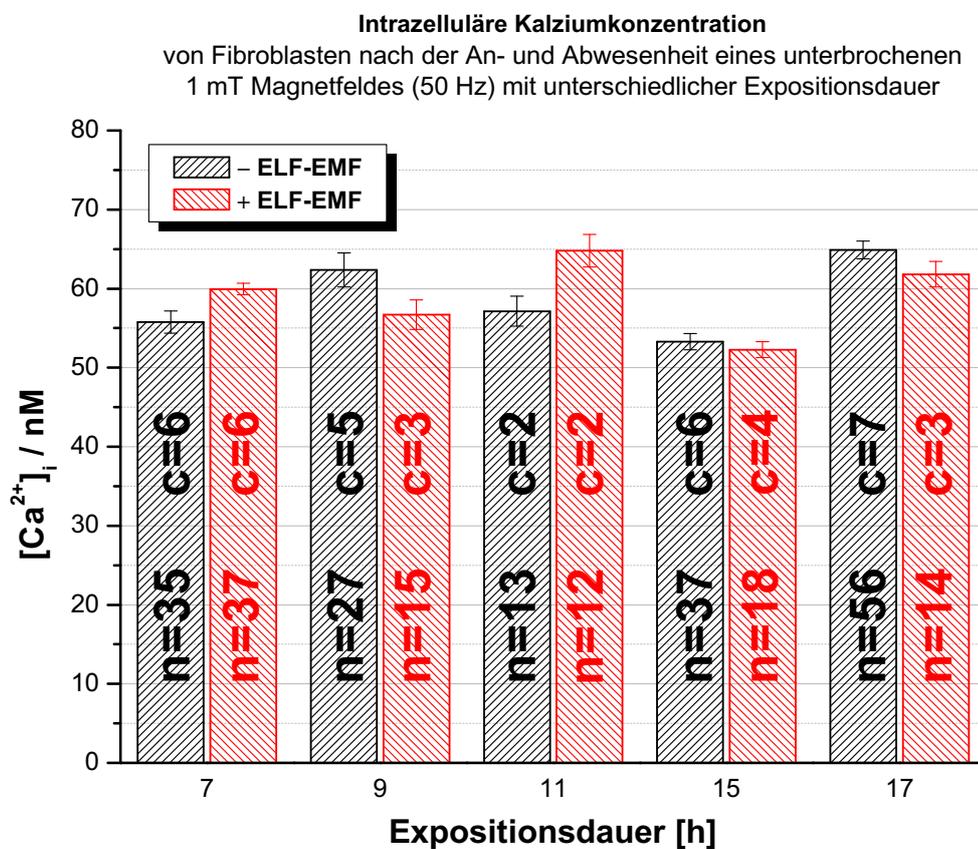
a) 11 Stunden



b) 15 Stunden

**Abbildung 3.3.1:** Zeitlicher Verlauf des  $[Ca^{2+}]_i$  von Fibroblasten nach einer unterbrochenen ELF-EMF-Exposition von 50 Hz (sinus), (5 min an / 10 min aus) über 11 h und 15 h. (Die schwarzen Kurven repräsentieren die nicht- und die roten Kurven die feldexponierten Zellen.)

Diese Versuche wurden ebenfalls für weitere Expositionszeiten von sieben bis 17 Stunden in stündlichen Abständen durchgeführt und die intrazellulären Kalziumkonzentrationen aufgezeichnet. Wie in den repräsentativen Aufnahmen aus der Abbildung 3.3.1 konnte keine Veränderung in den intrazellulären Kalziumkonzentrationen festgestellt werden. Die Mittelwerte der intrazellulären Kalziumkonzentrationen  $[Ca^{2+}]_i$  wurden über zehn Minuten der aufgezeichneten Messwerte ermittelt und sind in Abbildung 3.3.2 als Funktion über die Expositionszeit für die nicht- und die feldexponierten Fibroblasten dargestellt. Eine signifikante Änderung wurde nicht festgestellt.



**Abbildung 3.3.2:** Mittelwert  $\pm$  sem des  $[Ca^{2+}]_i$  aufgenommenen Daten über zehn Minuten von Fibroblasten, die Schein und einem ELF-EM Feld über unterschiedliche Zeiten ausgesetzt waren. (ELF-EMF-Exposition: Dauer: 7, 9, 11, 15 und 17 h bei 50 Hz sinus, 1 mT (5 min an / 10 min aus)) (n := Anzahl der Zellen, c := Anzahl der Kulturen)

Zusammenfassend wurden die gewonnenen Ergebnisse aus den oben beschriebenen Versuchen in der Abbildung 3.3.3 dargestellt. In dieser Abbildung sind auch die Resultate aus Versuchen aufgeführt, die mit einer zweiten Zelllinie (Granulosa) zu den gleichen Expositionsparametern bei verschiedenen Expositionszeiten (4; 5; 6,5 und 7,75 h) durchgeführt

wurden. Der Zusammenfassung ist zu entnehmen, dass bei keiner Expositionsdauer ein signifikanter Effekt in der Änderung vom  $[Ca^{2+}]_i$  feststellbar war.

Zellsystem	Expositionszeit [ h ]	7	9	11	15	17
Fibroblasten	- ELF-EMF	35 Zellen / 6 Kulturen	27 Zellen / 5 Kulturen	13 Zellen / 2 Kulturen	27 Zellen / 6 Kulturen	56 Zellen / 7 Kulturen
	+ ELF-EMF	37 Zellen / 6 Kulturen	15 Zellen / 3 Kulturen	12 Zellen / 2 Kulturen	18 Zellen / 4 Kulturen	14 Zellen / 3 Kulturen
		kein ELF-EMF Effekt				
Granulosa	Expositionszeit [ h ]	4	5	6,5	7,75	
	- ELF-EMF	11 Zellen / 1 Kultur	54 Zellen / 5 Kulturen	60 Zellen / 5 Kulturen	51 Zellen / 3 Kulturen	
	+ ELF-EMF	19 Zellen / 2 Kulturen	57 Zellen / 5 Kulturen	47 Zellen / 3 Kulturen	7 Zellen / 1 Kultur	
		kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	
ELF-EMF Exposition: 50 Hz, sinus , 1 mT, (5 min an / 10 min aus)						

**Abbildung 3.3.3:** Zusammenfassung der aus den Fibroblasten- und Granulosa-Zellen gewonnenen  $[Ca^{2+}]_i$  Daten nach einer ELF-EMF-Exposition bei 50 Hz, 1 mT (5 min an / 10 min aus)

In der Annahme, dass ein zusätzlicher Stressfaktor (Zugabe von 30 mM KCl oder 200  $\mu$ M  $H_2O_2$ ) in Kombination mit der vorherigen Applikation eines elektromagnetischen Feldes eine Auswirkung auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration hat, wurden weitere Experimente zur  $[Ca^{2+}]_i$  Untersuchung mit Granulosa-Zellen und Fibroblasten durchgeführt. Der Versuchsablauf erfolgte wie oben beschrieben mit der Applikation eines unterbrochenen elektromagnetischen Feldes (1 mT, 50 Hz (sinus)) über unterschiedlich lange Expositionszeiten und der 60 minütigen Inkubation mit Fura-2-AM. Anschließend wurden den Zellen 30 mM KCl (bzw. 200  $\mu$ M  $H_2O_2$ ) in Kombination mit dem Spülmedium (s. Anhang C.1) zugeführt. Eine Zusammenfassung der Experimente ist in der Tabelle 3.3.4 dargestellt. Es konnte keine signifikante Auswirkung auf die Kalziumkonzentrationsänderung zwischen den schein- und feldexponierten Zellen bei verschiedenen Expositionszeiten des Feldes unter Einwirkung eines zweiten Stressfaktors festgestellt werden.

Zellsystem	Stimulation	Expositionszeit [ h ]	5	6	8	9	10	18
Fibroblasten	ELF-EMF und 200 $\mu$ M $H_2O_2$	- ELF-EMF	10 Zellen / 1 Kultur	9 Zellen / 1 Kultur	13 Zellen / 1 Kultur	7 Zellen / 1 Kultur	11 Zellen / 1 Kultur	6 Zellen / 1 Kultur
		+ ELF-EMF	6 Zellen / 1 Kultur	8 Zellen / 1 Kultur	7 Zellen / 1 Kultur	14 Zellen / 1 Kultur	11 Zellen / 1 Kultur	5 Zellen / 1 Kultur
			kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt
	ELF-EMF und 30 mM KCl	Expositionszeit [ h ]	6.5	7.5	8.5	9.5		
		- ELF-EMF	7 Zellen / 1 Kultur	7 Zellen / 1 Kultur	6 Zellen / 1 Kultur	7 Zellen / 1 Kultur		
		+ ELF-EMF	5 Zellen / 1 Kultur	5 Zellen / 1 Kultur	10 Zellen / 1 Kultur	8 Zellen / 1 Kultur		
			kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt		
	Granulosa	ELF-EMF und 200 $\mu$ M $H_2O_2$	Expositionszeit [ h ]	5	6	7	8	18
- ELF-EMF			14 Zellen / 1 Kultur	14 Zellen / 1 Kultur	20 Zellen / 2 Kulturen	14 Zellen / 1 Kultur	14 Zellen / 1 Kultur	
+ ELF-EMF			5 Zellen / 1 Kultur	5 Zellen / 1 Kultur	10 Zellen / 1 Kultur	8 Zellen / 1 Kultur	14 Zellen / 1 Kultur	
			kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	kein ELF-EMF Effekt	
ELF-EMF Exposition: 50 Hz, sinus, 1 mT, (5 min an / 10 min aus)								

**Abbildung 3.3.4:** Zusammenfassung der aus den Fibroblasten- und Granulosa-Zellen gewonnenen  $[Ca^{2+}]_i$  Daten nach einer ELF-EMF-Exposition bei 50 Hz sinus, 1 mT (5 min an/10 min aus) und einer direkt erfolgten 30 mM KCl (bzw. 200  $\mu$ M  $H_2O_2$ ) Zugabe über 10 Minuten.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die potentiellen Einflüsse von niederfrequenten elektromagnetischen Feldern (ELF-EMF) auf die intrazelluläre Kommunikation untersucht, da eine Änderung der Signaltransduktion in Zellen zu einer Interaktion mit krebspromovierenden Ereignissen führen kann (Luben, 1995).

Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen wurde betrachtet, ob eine ELF-EMF Exposition sich auf den Transport der Connexone an die Plasmamembran und/oder sich auf das Öffnen und Schließen der Kanäle auswirkt. Dazu wurden zunächst zwei unterschiedliche Connexine in ihre Sensibilität auf einen extrazellulären Einfluss getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die spannungsabhängigen Halbkanäle Connexin 26 (Mensch, hCx26) und Connexin 46 (Ratte, rCx26) auf extrazelluläre Temperaturänderungen unterschiedlich reagieren. Nach einer ELF-EMF Exposition von rCx46 exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten, konnte der Einbau von spannungsabhängigen rCx46 Halbkanälen in die Plasmamembran gezeigt und untersucht werden.

Desweiteren wurde die Wirkung von ELF-EMF auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  im Hinblick eines Effektes von ELF-EMF auf die DNA getestet. Die Ergebnisse der Wirkung von extrazellulären Einflüssen (Temperatur und ELF-EMF) auf die Funktion von hCx26 und rCx46, sowie der Einfluss von ELF-EMF auf DNA und die intrazelluläre Kalziumkonzentration sollen im folgenden näher diskutiert werden.

### 4.1 Elektrophysiologische Untersuchungen von Connexinen

In Arbeiten von Ebihara et al. (1995) und Swenson et al. (1989) konnte gezeigt werden, dass sich Gap Junction Kanäle wie zwei unabhängig voneinander funktionierende Halbkanäle verhalten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die molekularen Komponenten, die für die Kopplung und die Sensitivität eines Gap Junction Kanals verantwortlich sind, für jeden Halbkanal existieren und nicht erst bei der Kopplung zweier Connexone zu einem Kanal entstehen (Makowski et al., 1977). Unter diesen Aspekten ist die Untersuchung der Funktionsweise und das Schaltverhalten von Halbkanälen eine Möglichkeit für das Verständnis der Zell-Zell Kommunikation via Gap Junctions. *In vitro* konnte die Aktivierung von Halbkanälen für unterschiedliche Connexine, wie z. B. Cx46, gezeigt werden (Ebihara, 2003b). Für Cx26 wurden aktive Halbkanäle in Horizontalzellen der Karpfen-

und Schildkrötenretina postuliert. (Janssen-Bienhold et al., 2001, Kamermans et al., 2001, Pottet et al., 2003). Neben der Aktivierung von endogenen *Xenopus* Cx38 Halbkanälen (Ebihara, 1996), wurden auch zahlreiche heterologe Connexine im Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten exprimiert und auf ihre Funktionalität untersucht. Halbkanalströme konnten ebenso in anderen Zellsystemen festgestellt werden (De Vries und Schwartz, 1992, Liu et al., 1995, Malchow et al., 1994). Die biologische Bedeutung des Öffnens von Connexonen, das durch eine niedrige extrazelluläre Kalziumkonzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und depolarisierenden Spannungen veranlasst werden kann (Ebihara und Steiner, 1993, Gupta et al., 1994, Paul et al., 1991, Trexler et al., 1996), wird noch diskutiert. Untersuchungen von physiologischen Funktionen der Halbkanäle zeigten, dass durch geöffnete Connexone, bedingt durch eine niedrige extrazelluläre Kalziumkonzentration, der Austritt von Metaboliten, wie z. B. ATP und NAD, in den Extrazellularraum ermöglicht war (Cotrina et al., 1998, Ebihara, 2003a, Leybaert et al., 2003, Willecke et al., 2002). Die Untersuchung des Verhaltens von Halbkanälen unter Einfluss von extrazellulären Einflüssen, wie Temperatur und ELF-EMF könnte einen Hinweis auf den Einfluss von Temperatur und ELF-EMF auf die Zell-Zell-Kommunikation geben.

#### **4.1.1 Elektrophysiologische Untersuchungen von Connexinen unter Temperatur-Einfluss**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten hCx26 und rCx46 Connexonen untersucht. Mit der Zwei-Elektroden Spannungs-Klemm Methode konnten durch applizierte Spannungen die exprimierten Halbkanäle in der Oozytenmembran in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium aktiviert werden. Diese Ergebnisse, dass hCx26 aktive Gap Junction Halbkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten bildet, stimmen mit den Beobachtungen von Ripps et al. (2004) überein. González et al. (2006) zeigte ein spannungsabhängiges Verhalten von hCx26 Halbkanälen, das in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls mit einer zusätzlich festgestellten Temperaturabhängigkeit der hCx26 Halbkanälen gezeigt werden konnte. Im Unterschied zu González et al. (2006), der bei einer Spannung von 60 mV einen Strom von  $\sim 1 \mu\text{A}$  feststellte, konnte hier gezeigt werden, dass der Strom bei dieser Spannung mit Erwärmung bei  $24,5^\circ\text{C}$   $\sim 4 \mu\text{A}$  und bei  $28,7^\circ\text{C}$   $\sim 7 \mu\text{A}$  beträgt. In Experimenten zur Funktionalitätsanalyse von hCx26 Gap Junction Kanälen an gepaarten Oozyten oder HeLa Zellen wurde der maximale makroskopische Leitwert ( $G_j$ ) der Kanäle bei einer Spannung von  $V_j \leq 40 \text{ mV}$  erreicht und durch Steigerung der Spannung  $V_j$  konnte der Leitwert ( $G_j$ ) um 80 % gesenkt werden

Young und Peracchia (2004) und Rubin et al. (1992). Im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde hier die Aktivierung der hCx26 Halbkanäle bei Spannungen über -40 mV gezeigt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Funktionalität von hCx26 Halbkanälen unter Einfluss verschiedener Temperaturen weisen darauf hin, dass eine Erhöhung der Temperatur von 7,1°C auf 28,7°C zu einer Steigerung der Leitfähigkeit von hCx26 Halbkanälen führt. Dieser durch Erwärmung des umgebenen Mediums hervorgerufene Effekt auf die Leitfähigkeit der Membran ist durch Kühlung reversibel (Abb. 3.1.8). Eine leichte Steigerung der Halbkanalaktivität durch die Erwärmung von 7,1°C auf 28,7°C konnte auch für rCx46 bei 60 mV beobachtet werden. Während die Halbkanäle von rCx46 bei niedrigen Temperaturen (7,1°C) offen sind, kann für hCx26 eine acht- bis neunfache höhere Stromamplitude bei der höchsten Temperatur (28,7°C) gemessen werden. Diese Aktivierung ist nicht allein durch eine höhere Permeabilität zu erklären. Experimente, die an in Lipid-Vesikeln eingebauten hCx26 Kanälen durchgeführt wurden, zeigen, dass eine Abgabe des Farbstoffes Lucifer Yellow über diese hCx26 Kanäle bei einer Temperaturänderung mit den elektrophysiologischen Ergebnissen korreliert (Steffens et al., 2008). Bei diesen Versuchen konnte eine Abgabe des in den Vesikeln eingeschlossenen Farbstoffes über die hCx26 Kanäle mit der Senkung der Temperatur reduziert werden. Dieser temperaturabhängige Gating Effekt der Lucifer Yellow Abgabe über hCx26 Kanäle und der Leitwertänderung der hCx26 Halbkanäle konnte innerhalb eines annähernd gleichen Temperaturbereiches (20 - 25°C) festgestellt werden. Ausserdem wird angenommen, dass für diesen temperaturabhängigen Aktivierungseffekt der hCx26 Halbkanäle im Expressionssystem der Oozyte kein intrazellulärer Mediator verantwortlich ist, das zeigen die Lucifer Yellow Freisetzungsversuche mit hochgereinigtem Protein.

Für die hCx26 Halbkanäle wurde für die beiden Temperaturen 24,5°C und 28,7°C die Leitfähigkeit berechnet und mit einer Boltzmann-Funktion angepasst. Der sich durch die Boltzmann-Funktion errechnete Parameter der halbmaximalen Aktivierungsspannung ( $U_{1/2}$ ) beträgt für 24,5°C  $\sim 20,8$  mV und bei 28,7°C  $\sim 7,8$  mV. Dieser Unterschied könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass nicht nur die Leitfähigkeit der hCx26 Halbkanäle durch die Temperatur beeinflusst wird, sondern auch die Spannungsempfindlichkeit des Connexons. Im Gegensatz zu hCx26 bleibt die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $U_{1/2}$ ) der rCx46 Halbkanäle für alle applizierten Temperaturen (7,1 - 28,7°C) im negativen Spannungsbereich und nimmt mit steigender Temperatur nahezu linear ab. Der Leitwert der rCx46 Halbkanäle zeigt bei der Temperatur 20,2°C eine höhere Leitfähigkeit als bei 28,7°C. Hier könnte vermutet werden, dass bei 20,2°C

eine Temperatur für rCx46 erreicht ist, bei der ein optimaler Einbau und eine optimale Funktion der rCx46 Halbkanäle gewährleistet sind. Der aus der Boltzmann-Funktion errechnete Parameter der Gating charge ( $z$ ) zu diesen Temperaturen wurde für beide Connexone nicht signifikant beeinflusst.

1993 wiesen Chen und DeHaan eine Temperaturabhängigkeit der Leitfähigkeit und der spannungsabhängigen Kinetik der Gap Junctions zwischen den Ventrikelmyocyten von Hühnerembryonen nach. Sie stellten eine unterschiedliche Spannungs- und Temperaturempfindlichkeit fest und schlossen auf unterschiedliche Gap Junction Kanalklassen (Chen und DeHaan, 1993). Der Effekt der Aktivierung des hCx26 Halbkanals durch Spannung und Temperatur ( $> 20^\circ\text{C}$ ), der in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, lässt sich jedoch nicht mit der Annahme von unterschiedlichen Gap Junction Kanalklassen von Chen und DeHaan (1993) vereinbaren. Untersuchungen der Deaktivierung ergaben einen Einfluss der Temperatur auf die Amplitude, jedoch nicht auf die Zeitraten der Deaktivierung.

In Einzelkanalmessungen des Connexins Cx30 konnten niedrige und hohe Leitfähigkeitszustände beobachtet werden (Valiunas et al., 1999, Valiunas und Weingart, 2000). Es wurde festgestellt, dass diese Cx30 Kanäle von zwei unterschiedlichen Schalt-Mechanismen kontrolliert werden: a) einem schnellen  $V_j$  Gating, das für das Schalten zwischen den Offen-Zuständen des Kanals verantwortlich ist und b) einem langsameren Gating, das für die Übergänge zwischen dem geschlossenen und dem offenen Zustand verantwortlich zu sein scheint (Valiunas und Weingart, 2000). Eine genauere Analyse der Einzelkanäle fand fünf unterschiedliche Stufen der gering leitenden Nebenzustände (substates) und einen sechsten leitenden Hauptzustand (mainstate) (Vogel et al., 2006). Für hCx26 könnte möglicherweise eine Temperaturänderung den Übergang von einem Nebenzustand, in dem sich der Kanal befindet, in den leitenden Hauptzustand bewirken und so in einer Zunahme der Einzelkanalleitfähigkeit resultieren. Es ist jedoch unbekannt, ob die Aktivierung / Deaktivierung der einzelnen Nebenzustände durch eine Temperaturänderung beeinflusst werden kann.

Mit dem Zwei-Zustands Modell, das den Gap Junction Halbkanal mit einem geschlossenen und einem offenen Zustand beschreibt, ist es jedoch fraglich, ob sich die Aktivierung durch die Temperatur beschreiben lässt. In diesem Modell müsste die Beschreibung des Übergangs vom geschlossenen Zustand in den offenen Zustand eines Connexons die gleichzeitig benötigte Erwärmung und Depolarisation integrieren. Ebenso müsste die Beschreibung des Übergangs vom leitenden (offenen) Zustand in den nichtleitenden (geschlossenen) Zustand die gleichzeitige Berücksichtigung einer Kühlung und einer Hy-

perpolarisation berücksichtigen. Diese Modellvorstellung könnte durch die erst kürzlich veröffentlichte Struktur von hCx26 unterstützt werden. Mittels der zweidimensionalen (2D)-Kristallisation wurde hCx26 mit einer Auflösung von 5 Å als eine Pore ( $\sim 17$  Å) mit einem sehr großen Propfen in dieser Pore identifiziert (Oshima et al., 2007). Dies könnte ein Grund dafür sein, warum der offene Kanal den Transport von sehr großen Molekülen vermitteln kann, wie z. B. Lucifer Yellow ( $> 13$  Å) (Steffens et al., 2008), ATP oder MHC I Peptiden (Neijssen et al., 2005).

Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Ripps et al. (2004) zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Blockierung der exprimierten hCx26 Halbkanäle durch eine erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration. Die benötigte extrazelluläre freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, als Regulator der Aktivität des Halbkanals, ist nicht spezifisch für die hCx26 Halbkanäle, da eine vergleichbare Konzentration ebenfalls für die rCx46 Halbkanäle beobachtet wurde (Ebihara und Steiner, 1993, Jedamzik et al., 2000, Ngezahayo et al., 1998). Für die blockierende Wirkungsweise von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  auf rCx46 Halbkanäle wurde die Modellvorstellung entwickelt, dass das  $\text{Ca}^{2+}$  mit negativen Ladungen in der Kanalpore eine Wechselwirkung eingeht und somit die Schließung der Pore bewirkt (Jedamzik et al., 2000, Ebihara und Steiner, 1993). Mit der Annahme, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die Pore schwach ist, wären die hohen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen erklärbar. Da die Aminosäuresequenz der transmembranen Domänen und der ersten extrazellulären Schleife von verschiedenen Connexinen hoch konserviert ist, könnte die vorgeschlagene  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle in der extrazellulären Pore von rCx46 Halbkanälen auch in der hCx26 Pore zu finden sein. Bei den hCx26 und den rCx46 Halbkanälen wird diese mögliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung am Halbkanal nicht durch hohe Temperaturen beeinflusst. Für den rCx46 Halbkanal wird auch keine Beeinflussung der Blockierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  bei der niedrigen Temperatur festgestellt. Da der hCx26 Halbkanal bei dieser Temperatur ( $7,1^\circ\text{C}$ ) geschlossen ist, konnte ein möglicher Effekt der Temperatur auf die Beeinflussung der Wechselwirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem Kanal nicht beobachtet werden. Sollte die Bindestelle von  $\text{Ca}^{2+}$  jedoch auf Grund der Homologie mit der rCx46 Bindestelle übereinstimmen, liegt die Annahme nahe, dass die Temperatur keinen Effekt bei niedrigen Temperaturen auf die  $\text{Ca}^{2+}$  Blockierung des hCx26 Halbkanals ausübt.

### 4.1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen von Connexinen unter EMF-Einfluss

In einer Studie von Lohmann et al. (2003) wurde eine Verminderung der Connexin mRNA durch gepulste niederfrequente EM Felder beobachtet. Dies lässt die Annahme zu, dass durch eine ELF-EM Felder induzierte mRNA Reduktion auch eine reduzierte Anzahl an Halbkanälen in die Oozytenmembran eingebaut werden. Eine kleinere Anzahl an eingebauten Kanälen bedeutet für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme, dass ein geringerer Gesamtstrom über die Membran fließt. Bei den Untersuchungen der Connexin Halbkanäle rCx46 und hCx26 zeigte sich hinsichtlich des Temperatureinflusses, dass rCx46 schon bei niedriger Temperatur aktiviert. Somit zeigt rCx46 bei Raumtemperatur (20°C) eine ausreichend große Stromamplitude und damit eine ausreichende Aktivität, um eine eventuelle Reduzierung der Stromamplitude zu registrieren. Durch die kurze Expressionszeit der cRNA von rCx46 können sich außerdem genügend funktionale Connexone innerhalb der 16 Stunden dauernden ELF-EMF Exposition in die Oozytenmembran einbauen (Jedamzik et al., 2000, Ngezahayo et al., 1998).

Die Vitalität der Oozytenmembran wird durch den Einbau und die Funktionsweise von Halbkanälen beeinflusst. Die Vitalität der rCx46 exprimierten Oozyten wurde direkt nach verschiedenen ELF-EMF Expositionen festgestellt (Abb. 3.1.13 - Abb. 3.1.16). Die beobachteten Werte zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen nicht- und exponierten Oozyten. In Experimenten von Ramundo-Orlando et al. (2000) wurde ein möglicher Einfluss niederfrequenter Magnetfelder (4 - 16 Hz, 25 - 75  $\mu$ T) auf die Diffusions-Prozesse bei Enzym-beladenen Liposomen untersucht. Die Studie zeigte Membran-Permeabilitäts-Veränderungen, was die Autoren dazu veranlasste anzunehmen, dass die Ladungen von Lipiden auf der Liposom-Oberfläche durch ELF-EMF Exposition beeinflusst werden und somit diese Änderung bewirken. Im Vergleich zu den Oozyten sind Liposomen sehr klein und bestehen aus einem homogenen Lipid, wohingegen die *Xenopus* Oozyte heterogen ist. So könnte ein möglicher Effekt, dass die Membran-Permeabilität durch das ELF-EMF verändert wird, überlagert werden. Die Aufschlüsselung der Daten nach Messtagen zeigen jedoch keinen Effekt auf die Permeabilität der Membran. Die Oozytenqualität wurde durch das ELF-EMF nicht beeinträchtigt und mit 2/3 der nicht- und der exponierten Oozyten konnten Messungen gestartet werden

Für die kontinuierliche und die unterbrochene ELF-EMF Exposition mit einer Flussdichte von 2,3 mT sind die Strom-Spannungskennlinien der nicht- und der exponierten rCx46 Halbkanäle nahezu identisch. Bei der unterbrochenen Exposition mit einer Fluss-

dichte von 1 mT liegt die Strom-Spannungskennlinie der ELF-EMF exponierten rCx46 Halbkanäle zwar im Standardfehlerbereich, jedoch unter der Kurve der nichtexponierten Halbkanäle. Mit der Annahme, dass der Effekt eines unterbrochenen 50 Hz ELF-EM Feldes (Flussdichte: 1 mT) so gering ist, dass eine schnelle Synthese von rCx46 diesen Effekt überlagert, könnte in der größeren Varianz dieser Ergebnisse eine Wirkung des ELF-EM Feldes auf die rCx46 Halbkanäle angenommen werden. Es könnte angenommen werden, dass eine geringere Menge an Kanälen in die Membran eingebaut wurde oder, dass die Funktionalität der Kanäle durch das ELF-EMF beeinträchtigt wurde. Diese Annahme könnte mit den Beobachtungen von Lohmann et al. (2003) konform gehen, wenn die Reduktion der mRNA bei den Experimenten der Autoren eine geringere Gap Junction Kommunikation bedeuten würde.

In den Umkehrpotentialen und den Leitwerten zu diesen drei ELF-EMF Expositionen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen nicht- und exponierten Oozyten festgestellt werden, einschließlich der aus der Boltzmann-Funktion berechnete Wert der Gating Charge ( $z$ ) zeigt keinen Hinweis auf eine Änderung in der Funktionalität der rCx46 Halbkanäle. Die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $U_{1/2}$ ) zeigt bei beiden unterbrochenen ELF-EMFs eine positivere halbmaximale Aktivierungsspannung für die feldexponierten rCx46 Oozyten. Dies könnte auf eine Beeinflussung der Spannungsempfindlichkeit der rCx46 Halbkanäle durch diese zwei ELF-EMF Expositionen hindeuten. Hu et al. (2001) zeigte in seinen Experimenten, dass ein ELF-EMF die Gap Junction Kommunikation von Connexin 43 in Fibroblasten verringerte. Hu et al. (2001) nehmen an, dass diese Reduzierung der Zell-Zell-Kommunikation, die zusammen mit einem Tumorpromoter (TPA) noch weiter reduziert werden konnte, auf eine stärkere Phosphorylierung der Connexine zurückzuführen ist. Auch die Phosphorylierung von rCx46 zeigt in Versuchen von Ngezahayo et al. (1998) eine Inaktivierung und Verringerung der Leitfähigkeit. Allerdings konnte in dieser Arbeit keine Inaktivierung und keine Abnahme der Leitfähigkeit von rCx46 Halbkanälen nach einer ELF-EMF Exposition festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich keine Unterschiede in der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der rCx46 Halbkanäle. In einer Studie, die die Wirkung von niederfrequenten Magnetfeld-Expositionen auf Cx32 Halbkanälen in Liposomen untersuchte, nehmen Ramundo-Orlando et al. (2005) an, dass die Temperatur die Lipidschicht so beeinflusst, dass sie die ELF-EMF induzierten Effekte auf die Halbkanäle verdeckt. Die Versuche fanden bei verschiedenen Frequenzen, Amplituden und bei verschiedenen Temperaturen (16, 18 und 24°C) statt. Die Ergebnisse, dass nur ein Effekt bei 16°C (niedrigste Temperatur) in Folge einer Erhöhung der Halbkanal-Permeabilität festzustellen war, ließ ihre

frühere Annahme der Veränderung der Membran-Permeabilität zu. Dies könnte bedeuten, dass die Raumtemperatur (20°C), bei der die rCx46 Halbkanäle gemessen wurden, sich auf die Membran-Permeabilität der Oozyten auswirken und damit eine mögliche Erhöhung der Halbkanal-Permeabilität durch die ELF-Exposition verdecken könnte. Jedoch wurde in den Versuchen dieser Arbeit an Kontroll-Oozyten (Temperaturmessungen: Abb. 3.1.9) kein wesentlicher Effekt der Veränderung der Membran-Permeabilität bei unterschiedlicher Temperaturapplikation beobachtet. Eher könnte ein möglicher Effekt des ELF-EMFs durch die Variabilität der natürlichen bioelektrischen Eigenschaften der *Xenopus laevis* Oozyte, wie aus vorangegangenen Experimenten bekannt (Behnsen, 2003, Jedamzik et al., 2000, Ngezahayo et al., 1998), überlagert sein. Durch eine hohe Anzahl an Messungen wurde versucht diese Möglichkeit auszuschließen.

Es gibt wenige Untersuchungen, die sich mit der Wirkung von niederfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Funktionalität von Connexonen beschäftigen und direkt die Zell-Zell-Kommunikation untersuchen.

So vermutete Zeng et al. (2003) im Gegensatz zu Ramundo-Orlando et al. (2005) eine Abnahme der Gap Junction Kommunikation von Cx43 Gap Junction Kanälen in CHL (Chinese hamster lung) Zellen, da nach einer ELF-EMF Exposition (50 Hz, 2  $\mu$ T - 18,5 T) und/oder eine Tumorpromotorbehandlung (TPA) die Cx43 Gap Junctions Plaques in der Zellmembran abnahmen, wohingegen die Cx43 Anzahl im Zytoplasma in der Nähe der Nuklei zunahm. Es wurde jedoch nicht direkt die Gap Junction Aktivität untersucht. Sollte es einen möglichen Effekt auf Connexine bzw. auf ihre Umgebung geben und damit eine Reduzierung der Zell-Zell-Kommunikation bewirken, könnte dies auf eine Schädigung der Zelle hinweisen. In fast allen Tumoren konnte eine Reduzierung der Kommunikation via Gap Junctions beobachtet werden, da sie in Tumorgewebe in geringerer Zahl exprimiert wurden (Mesnil, 2002). Mit den Beobachtungen von Zeng et al. (2003), dass die Anzahl der Connexine nach einer ELF-EMF Exposition in der Nähe des Zellkerns zunahm, begründet sich die Vermutung, dass ein möglicher Einfluss des ELF-EMFs auf die DNA im Nucleolus auch die Connexine beeinträchtigt.

## **4.2 Einfluss elektromagnetischer Felder auf die DNA-Migration im Comet Assay**

Da DNA-Strangbrüche mit Karzinogenität, Zelltod, Alterung und neurodegenerativen Erkrankungen korreliert werden, sollte im Rahmen des REFLEX-Projektes neben eines

möglichen Einflusses von elektromagnetischen Feldern auf Proteinebene ein Einfluss auf der DNA-Ebene untersucht werden.

Zum quantitativen Nachweis von DNA-Schäden, die durch ionisierende Strahlung, toxische Substanzen und oxidativen Stress verursacht werden, wird häufig der Comet Assay verwendet (Collins, 2004, Fairbairn et al., 1995). Mittels des alkalischen und des neutralen Comet Assays können DNA-Doppelstrangbrüche und DNA-Einzelstrangbrüche festgestellt werden (Singh et al., 1988), wobei der neutrale Comet Assay nur Doppelstränge detektiert.

Die verschiedenen DNA-Schäden, die z. B. in Folge zelleigener Prozesse oder störender exogener Einflüsse auftreten können, kommen in unterschiedlicher Häufigkeit vor. So sind z. B. in durch Röntgentherapie geschädigten Zellen häufiger Basenschäden und Einzelstrangbrüche zu finden, wohingegen Crosslinks (DNA-DNA- bzw. DNA-Proteinverknüpfungen) gefolgt von Doppelstrangbrüchen eher selten auftreten (Dahm-Daphi et al., 1998). Diese DNA-Schäden können je nach Stärke der Veränderung durch unterschiedliche Reparatursysteme behoben werden (Hoeijmakers, 2001). Kleinere DNA-Schäden, wie Basenschäden und Einzelstrangbrüche, werden von der Zelle schnell erkannt und repariert, indem das fehlerhafte DNA-Stück herausgeschnitten und die Lücke mittels der Informationen des komplementären DNA-Stranges ergänzt wird. So können die meisten Einzelstrangbrüche korrekt repariert werden. Mutationen sind selten und ein Effekt auf die Zelle gering (Wallace, 1994). Für die Doppelstrangbrüche liegt jedoch keine komplementäre Matrix zur Reparatur vor und die Reparaturmechanismen können zu genetischen Veränderungen führen oder irreparabel sein (Hoeijmakers, 2001).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Rüdiger (Klinische Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinischen Universität Wien / Österreich) sollten im Rahmen des REFLEX Projektes Zellen mittels des Comet Assays auf einen möglichen Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die DNA untersucht werden.

In vorangegangenen Experimenten von Ivancsits et al. (2002) wurden Fibroblasten unterschiedlich extrem niederfrequenten elektromagnetischen Feldern (ELF-EMF) ausgesetzt und auf DNA-Strangbrüche mittels des Comet Assays untersucht. Bei diesen Versuchen wurde festgestellt, dass ein unterbrochenes ELF-EMF (50 Hz) mit einer fünfminütigen An- und einer zehnminütigen Ausphase zu einem Höchstwert an DNA-Schäden führte. In einer weiteren Untersuchung wurde von Ivancsits et al. (2003b) eine Abhängigkeit in der Zunahme an DNA-Strangbrüchen von der Expositionsdauer und der magnetischen Flussdichte ermittelt. Hier wurde die maximale Schädigung bei einer Flussdichte

von 1 mT und einer 15-stündigen Expositionsdauer erreicht. Dieses Ergebnis deckt sich mit Studien, bei denen ein dosisabhängiger Effekt eines 60 Hz Magnetfeldes auf Gehirn-Zellen von Ratten beobachtet wurde. Es wurden DNA-Strangbrüche nach einer zweistündigen Exposition dieser Tiere festgestellt, wobei DNA-Einzelstrang- und DNA-Doppelstrangbrüche zu verschiedenen magnetischen Flussdichten unterschiedlich erhöht auftraten (Lai und Singh, 1997).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, die Parametereinstellungen eines unterbrochenen ELF-EM Feldes (5 min an / 10 min aus) mit einer magnetischen Flussdichte von 1 mT gewählt. Ziel dieser Versuche war es zu untersuchen, ob die Frequenz des ELF-EMF einen Einfluss auf die DNA der Granulosa-Zellen (GFSHR-17) ausübt.

Die Ergebnisse (Abb. 3.2.1) dieser Arbeit zu unterschiedlichen Expositionszeiten bei einer Frequenz von 16 2/3 Hz (Frequenz des Bahnstromnetzes) zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Beobachtungen von Ivancsits et al. (2005) und scheinen zellspezifisch zu sein. Die Ausweitung der Messungen mit den Granulosa-Zellen zeigten im Unterschied zu den Beobachtungen von Ivancsits et al. einen um ~30 % niedrigeren Comet Tailfaktor im Maximum bei einer Expositionszeit des ELF-EMF von 18 Stunden. Dies lässt vermuten, dass die Frequenz einen Einfluss auf die DNA-Migration im Comet Assay haben könnte, da Ivancsits et al. parallel zu den Experimenten dieser Arbeit nicht 16 2/3 Hz sondern eine ELF-EMF Exposition mit 50 Hz verwendete.

Die Untersuchung der DNA-Migration der Granulosa-Zellen nach einer unterbrochenen ELF-EMF Applikation (1 mT, 18 h) zu unterschiedlichen Frequenzen ergab mit der visuellen Auswertung nach Anderson et al. (1994) einen höheren Comet Tailfaktor für 50 Hz im Unterschied zur Frequenz von 16 2/3 Hz. Der Tailfaktor lag jedoch ~20 % unter dem für diese Expositionparameter gemessenen Wert der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Rüdiger. Dies könnte daran liegen, dass sich für das Ausmaß der DNA-Schädigung auch methodische Faktoren auf die Cometen-Struktur auswirken. Der pH-Wert der Pufferlösungen, die Dauer der Entwindung der DNA und der Elektrolyse, die Agarosekonzentration und die Stärke des elektrischen Feldes der Elektrophorese können einen Einfluss auf den Cometen haben (Bauch et al., 1999). Da beide Arbeitsgruppen ein identisches Protokoll eingehalten haben, könnte der Unterschied in der subjektiven Klasseneinteilung der Cometen nach Anderson et al. (1994) durch den Experimentator entstanden sein. Um einen eventuellen subjektiven Einfluss auszuschließen, wurden die Cometen mit dem Bildanalyseprogramm *cometscore* (TriTek Corporation, USA) ausgewertet und weitere Versuche zu verschiedenen ELF-EMF Frequenzen durchgeführt.

Mit der Erhöhung der Fallzahlen und der Auswertung per Bildanalyse ergab sich kein linearer Zusammenhang für die Frequenz des applizierten ELF-EM Feldes und der DNA-Migration im alkalischen Comet Assay. Während die relativen Tailmomente für mit 300 Hz und 500 Hz exponierte Zellen keinen Unterschied zeigten, wurde bei 8 Hz und 30 Hz eine leichte, nicht signifikante Steigerung beobachtet.

Das relative Tailmoment nach einer  $16 \frac{2}{3}$  Hz ELF-EMF Exposition war deutlich erhöht und entsprach näherungsweise dem Wert der Positiv-Kontrolle ( $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ). Das relative Tailmoment bei 50 Hz war um das Vierfache erhöht. Dies lässt die Annahme zu, dass es sich um einen möglichen frequenzspezifischen Fenstereffekt handeln könnte.

Ein Fenstereffekt ist eine Wirkung, die nur in einem bestimmten Bereich der Stärke oder Frequenz von elektromagnetischen Feldern auftritt. Ein Fenstereffekt wurde auch in der beschriebenen Studie von Lai und Singh (1997), die zu verschiedenen Flussdichten erhöhte DNA-Einzel- und / oder DNA-Doppelstrangbrüche beobachteten, festgestellt.

Im Vergleich zu den Fibroblasten Messungen von Ivancsits (REFLEX, 2004) zeigt die DNA-Migration der Granulosa-Zellen zu verschiedenen Frequenz-Expositionen im alkalischen Comet Assay ein unterschiedliches Verhalten. Ein Grund könnte möglicherweise ein Einfluss des ELF-EM Feldes auf den Zellzyklus sein (Sakurai et al., 2007). Bei ionisierender Strahlung zeigten die Zellzykluspositionen einen unterschiedlichen Einfluss auf den DNA-Schaden (Banáth et al., 1998). So wurde für verschiedene Zellarten beim Übergang der G1-Phase zur S-Phase eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber ionisierender Bestrahlung festgestellt (Chapman et al., 1999) und in der S-Phase konnte bei menschlichen Tumor-Zellen sogar eine Strahlenresistenzzunahme beobachtet werden (Biade et al., 1997).

In dieser Arbeit wurden ausschließlich nicht-synchronisierte Zellen verwendet, sodass eine gleichmäßige Verteilung aller Zellphasen angenommen wurde. Untersuchungen von Schlie et al. zu synchronisierten Granulosa-Zellen zeigten unter Zugabe eines toxischen Wirkstoffes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , ODQ) in der Mitosephase eine größere Empfindlichkeit gegenüber DNA-Schäden als nicht-synchronisierte Zellen oder sich in der Interphase befindliche Zellen. Die Zusammenfassung der mit dem alkalischen Comet Assay gemessenen Tailmomente von Zellen in der Mitose und Interphase waren nahezu identisch mit den Werten der nicht synchronisierten Granulosazellen (Schlie et al. (2008), persönliche Mitteilung). Dies könnte, wenn verschiedene Zelllinien im Übergang der G1-Phase zur S-Phase unterschiedliche Sensitivitäten auf applizierte ELF-EMF zeigen, den Unterschied zwischen verschiedenen nicht-synchronisierten Zelllinien in der Stärke der DNA-Migration erklären.

Im Gegensatz zu ionisierender Strahlung besitzen niederfrequente Felder jedoch zu geringe Energien, um diese an die Zelle weitergeben zu können, weshalb es einen anderen Wirkungsmechanismus der ELF-EM Felder geben müsste, der auf den Zellzyklus einwirkt.

In einer Studie von Wolf et al. (2005) werden die Zellproliferation und der DNA-Schaden durch ein ELF-EMF (50 Hz, 0,5 - 1 mT, 24 - 72 h) von verschiedenen Zelllinien erhöht. Durch Zugabe eines Antioxidationsmittels konnte die Wirkung des ELF-EMFs auf die Zellen aufgehoben werden. Dieser Effekt lässt eine Wirkung des ELF-EMFs auf die Zelle durch die Aktivität reaktiver Sauerstoffspezies vermuten. Auch Lai und Singh (2004) kommen in ihren Studien zu der Annahme, dass freie Radikale die Steigerung der DNA-Migration durch ELF-EMF bewirken. Diese Annahme der Wirkungsweise von ELF-EMFs hätte eine weitgreifende Folge, da freie Radikale für die Schädigung bei Hirnerkrankungen, wie z. B. Alzheimer verantwortlich gemacht werden (Shi und Gibson, 2007).

Die Resultate, die sich aus Messungen mit der Methode des neutralen Comet Assays ergaben (Abb. 3.2.7), zeigen keinen signifikanten Einfluss auf das relative Tailmoment in Abhängigkeit zur applizierten Frequenz. Mit diesem Ergebnis kann angenommen werden, dass bei der beobachteten DNA-Migration im alkalischen Comet Assay hauptsächlich Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und/oder Crosslinks beteiligt waren. Es ist möglich, dass die nicht signifikante DNA-Migration im alkalischen Comet Assay (Abb. 3.2.5) für die Frequenzen 8, 30, 300, 500 Hz durch Crosslinks bedingt ist. Die Vermutung beruht auf einer von Singh und Lai (1998) durchgeführten Studie zu Crosslinks. Crosslinks sind DNA-DNA- oder DNA-Protein-Bindungen, wobei die DNA-Protein-Bindungen eine DNA-Migration unterdrücken. In der Studie konnten durch Proteinkinase K die DNA-Protein-Bindungen gelöst werden und die durch ELF-EMF geschädigte DNA migrieren. Dies könnte bedeuten, dass die beim alkalischen Comet Assay ermittelten DNA-Migrationen für die Frequenzen, die nur eine leichte oder keine Steigerung zeigen, durch eine verstärkte Zunahme von Crosslinks in der DNA-Migration unterdrückt wurden (Abb. 3.2.3 - 3.2.5). Diese Annahme würde bedeuten, dass unterschiedlich Frequenzen sich unterschiedlich auf die DNA auswirken und verschiedene DNA-Schäden bewirken könnten. Blank und Goodman (2004) vermuteten, dass die Elektronen in der DNA mit elektromagnetischen Feldern interagieren und damit Wasserstoffbindungen in der DNA destabilisieren könnten. Dagegen spricht, dass die besondere DNA-Struktur äußerst robust ist, wie Experimente von Schultz et al. (2004) zeigten. In diesen Versuchen wurden zwei zusammengefügte Aminopyridin Molekülen, die sich unter Lichtbeschuss wie

die Basenpaare Adenin-Thymin oder Guanin-Cytosin verhalten würden, mit ultrakurzen Laserpulsen Energie zugeführt. Schultz et al. (2004) konnten feststellen, dass dieses Modellbasenpaar die aufgenommene Energie innerhalb von 65 Pikosekunden an die Umgebung abgeben konnte und gerade die Anordnung der Basen in Form der Sprossen der DNA-Helix diese Geschwindigkeiten ermöglicht. Somit wäre gerade die Molekülstruktur und die Molekülbewegung der DNA ein Schutz vor Schäden gegen elektromagnetische Strahlung (z. B. ultraviolette Strahlung). Inwiefern die DNA durch niederenergetische EM Felder direkt beeinflusst werden könnte bleibt unklar. Eine Möglichkeit der indirekten Beeinflussung könnte z. B. durch eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderung  $[Ca^{2+}]_i$  geschehen.

### 4.3 Einfluss von ELF-EMF auf $[Ca^{2+}]_i$

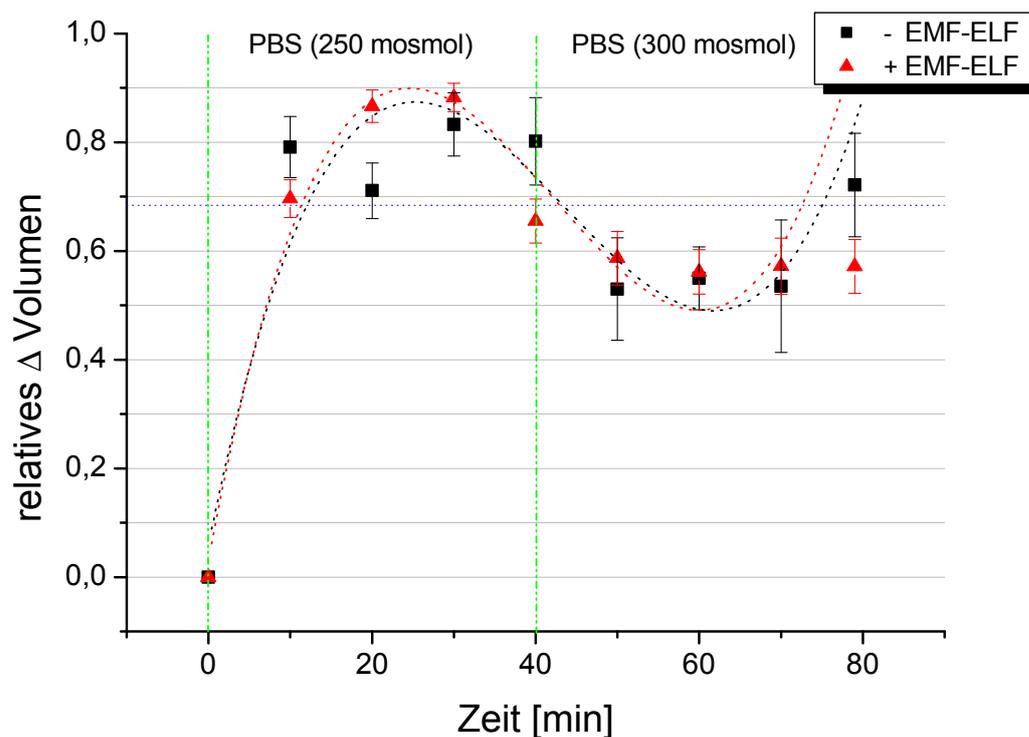
Wie in den Untersuchungen zur Wirkung eines elektromagnetischen Feldes auf DNA-Strangbrüche, ist die Comet Assay Technik ein sensitives Instrument um Unterschiede in nicht- und feldexponierten Zellen festzustellen. Der zugrunde liegende Mechanismus, wie diese DNA-Strangbrüche zustande kommen, ist unbekannt.

Die durch elektromagnetische Felder induzierten DNA Brüche könnten indirekt entstehen, indem die elektromagnetischen Felder einen Einfluss auf Signaltransduktionswege haben, die an der Produktion von intrazellulären Stimuli, wie z. B. Kalziumionen ( $Ca^{2+}$ ), beteiligt sind. Diese Stimuli könnten direkt mit der DNA reagieren oder die DNA-Reparatur beeinträchtigen. Eine indirekte Beeinflussung der DNA durch elektromagnetische Felder könnte sich in einer intrazellulären Kalziumkonzentrationsänderung  $[Ca^{2+}]_i$  widerspiegeln.

In vielen Studien wird die Veränderungen des intrazellulären Kalziums durch die Applikation von niederfrequenten elektromagnetischen Feldern als einer der Hauptgründe angenommen, weshalb ein Zellsystem auf elektromagnetische Einflüsse reagiert (Walleczek, 1992). In Messungen von Lindström et al. (1993) wurde eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderung in einer menschlichen Jurkat-T-Zelllinie bei einer Applikation eines 50 Hz Feldes mit einer magnetischen Flussdichte von 0,1 mT festgestellt. Lindström et al. (1993) konnte einen kurzfristigen Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  15 bis 120 Sekunden nach der Applikation eines Magnetfeldes beobachten. Da diese Beeinflussung des intrazellulären Kalziums (kurzfristiger Anstieg) in Abwesenheit von Kalzium im extrazellulären Medium unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nicht feststellbar war, wurde ein Einfluss

des elektromagnetischen Feldes auf die Kalziumkanäle in der Zellmembran vermutet. Einen weiteren Hinweis darauf, dass insbesondere spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle an den Einflüssen der elektromagnetischen Felder auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration beteiligt sind, stellt Kenny et al. (1997) in seinen Untersuchungen vor. In dieser Arbeit führte die Applikation eines 16 Hz Feldes zu einer erhöhten Kalzium-Aufnahme bei Tumorknochen- und Glioma-Neuroblastoma-Zellen, wobei die  $Ca^{2+}$ -Änderungen in den Zellen mit einer höheren Anzahl von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen stärker waren. Cho et al. (1999) postulierte in einer Studie, dass zwei  $Ca^{2+}$  Zellmembran Signalwege für den Anstieg des intrazellulären Kalziums, infolge einer EMF Applikation, verantwortlich sind. Zunächst sollten mechanosensitive Kationen-Kanäle (stretch activated channels, SACC), die durch die Wirkung des EMFs geöffnet würden, den erhöhten Kalziumeinstrom erlauben. Diese SACC befinden sich u. a. in Mechanorezeptoren, an Haarzellen des Innenohrs und dienen dazu, das Zellvolumen zu registrieren, sodass sie bei einer Zellschwellung regulatorische Vorgänge einzuleiten vermögen (Christensen, 1987, Kirber et al., 1988, Zou et al., 2002). Cho et al. (1999) stützte seine Theorie damit, dass mit Gadoliniumchlorid ( $GdCl_3$ , ein SACC Blocker) der durch die EMF Applikation bewirkte Anstieg des intrazellulären Kalziums um 40 % unterdrückt werden konnte. Mit Kobaltchlorid ( $CoCl_2$ ) gelang es in diesen Experimenten  $Co^{+}$  sensitive Kalziumkanäle zu blocken und den EMF bedingten intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  Anstieg um 40 % zu reduzieren. Gemeinsam vermochten ( $GdCl_3$ ) und ( $CoCl_2$ ) den Anstieg von einer durch EMF induzierten  $[Ca^{2+}]_i$  Konzentration vollständig zu unterdrücken. Dieses Ergebnis lässt die Annahme zu, dass elektromagnetische Felder sich nicht auf die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, sondern auf den Influx über die Zellmembran auswirken. Die Hypothese, dass der Effekt, der sich aus den Untersuchungen zu DNA Brüchen ergab, sich möglicherweise auch in der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) widerspiegelt, konnte in dieser Arbeit weder bei den Granulosa-Zellen noch bei den Fibroblasten festgestellt werden. Weitere Untersuchungen im Rahmen des REFLEX Projektes konnten auch nicht die Annahme bestätigen, dass sich die elektromagnetischen Felder auf die Volumenregulation über SAC-Kanäle von Granulosa-Zellen auswirken (REFLEX, 2004). Nach der Exposition von Granulosa-Zellen in einem ELF-EM Feld wurde die Reaktion der Zellen auf eine hypotonische Lösung anhand ihrer relativen Volumenänderung untersucht (Abb. 4.3.1). Sollten sich die elektromagnetischen Felder auf das Schaltverhalten der mechanosensitiven Kanäle der Zelle auswirken (Cho et al., 1999), so wäre eine Veränderung in der Volumenregulation feststellbar. Durch die Osmolaritätsänderung kann Wasser in die Zelle fließen und vergrößert so ihr Volumen.

Die Zelle kann durch die erhöhte Membrandehnung die mechanosensitiven Ionenkanäle (SACC) aktivieren und dem Wassereinstrom entgegenwirken. Für die Granulosa-Zellen konnten in diesen Experimenten keine Veränderungen in der Reaktion der Zellen auf die Änderung der Osmolarität der extrazellulären Lösung festgestellt werden (Abb. 4.3.1).



**Abbildung 4.3.1:** Zeitabhängiger Mittelwert  $\pm$  sem der relativen Volumenänderung ( $\Delta$  Volumen) von Granulosa-Zellen (GFSHR-17) während der Inkubation in einer hypotonischen Lösung nach einer ELF-EMF Exposition (18 h, 50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus)). (-EMF-EMF: n = 7; +EMF-ELF: n = 24)

Parallel zu den Experimenten der intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  Konzentrationsmessung führte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Rüdiger (Klinische Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinischen Universität Wien / Österreich) Versuche zur Messung des Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) der Fibroblasten durch, da die Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  und/oder  $\Delta\Psi_m$  an der Alterung und der Apoptose von Zellen beteiligt sein soll (Lyng et al., 2000, Salvioli et al., 2001, Satoh et al., 1997, Shigenaga et al., 1994). Es wurde in diesen Experimenten keine durch elektromagnetische Felder bewirkte Membranpotentialänderung beobachtet. Tonini et al. (2001) nimmt in seiner Studie an, dass die Änderung der Kalziumkonzentration differenzierender Neuroblastoma Zellen während einer elektromagnetischen 50 Hz Exposition ein Schutzmechanismus der Zelle ist. Die  $[Ca^{2+}]_i$  Konzentrationsänderung soll der Änderung der durch das EM Feld beeinflussten Membranspannung entgegenwir-

ken. Diese Hypothese könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in dieser Arbeit keine  $[Ca^{2+}]_i$  Konzentrationsänderung festgestellt wurde. Da das Membranpotential nicht verändert wurde, brauchte auch keine Änderung des intrazellulären Kalziums dieser Membranspannungsänderung entgegenwirken.

Die Annahme, dass sich die  $[Ca^{2+}]_i$  Konzentration durch einen weiteren Stressfaktor ändert, beruht auf Studien, in denen eine synergetische Wirkung zwischen oxidativem Stress und niederfrequenten Feldern postuliert wird (Ihrig et al., 1997, 1999). Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den Ergebnissen der Veröffentlichung Pilger et al. (2004) die Zellen in weiteren Experimenten der intrazellulären Kalziummessung nach einer ELF-EMF Exposition einem Stressfaktor unterzogen. Jedoch konnten auch in diesen Ergebnissen dieser Arbeit keine signifikanten intrazellulären Kalziumkonzentrationsänderungen bei humanen Fibroblasten und Granulosa-Zellen (Ratte) festgestellt werden. Dieses Ergebnis geht konform mit der Studie von Shahidain et al. (2001), die keine Änderung des intrazellulären Kalziums bei Osteoblasten-ähnlichen Zellen nach einer ELF-EMF Applikation fanden. Jedoch gibt es neben den Studien, die keinen Effekt von ELF-EMF auf die  $[Ca^{2+}]_i$  Konzentration feststellten, auch Studien die eine Änderung messen konnten (Goodman et al., 1993, Karabakhtsian et al., 1994, Liburdy et al., 1993, Löscher und Liburdy, 1998). Es scheint, dass es für unterschiedliche Zellsysteme und Expositionsparameter sehr variable Messergebnisse und Erklärungsmodelle gibt, die aber nicht alle Beobachtungen erklären können.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein möglicher Einfluss von extrazellulären Temperaturänderungen und elektromagnetischen Feldern auf die Funktionalität von Connexonen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Aktivität von Connexin 26 (Mensch, hCx26) durch Erwärmung bzw. Kühlung beeinflusst werden kann. Ein Organ in dem hCx26 exprimiert wird ist die Haut. Die Haut ist eines der größten Organe des Körpers und formt eine anatomische Abgrenzung zwischen dem Körperinneren und der Umwelt. Neben der wichtigen Funktion des Schutzes vor Umwelteinflüssen, sind in ihr unter anderem Temperatursensoren für Kälte und Hitze lokalisiert, wie z. B. zelluläre Ionenkanäle zu denen die Familie der TRP-Kanäle (transient receptor potential channels) zählt. Die Mitglieder dieser Familie sind bekannt dafür eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von sensorischen Fähigkeiten zu haben, z. B. Geschmack und Wärmeempfinden (Venkatachalam und Montell, 2007). Um Temperatur oder Schmerz zu empfinden werden unterschiedlich Komponenten benötigt, z. B. Natriumkanäle, möglicherweise auch Connexine (Venkatachalam und Montell, 2007, Zimmermann et al., 2007). Das temperaturabhängige Schaltverhalten von hCx26 Halbkanälen könnte auf eine mögliche Beteiligung von hCx26 Gap Junctions bei der Thermoregulation hinweisen und eine wichtige Rolle beim Transport von kleinen Molekülen durch Halbkanäle übernehmen (Santos-Sacchi, 1986). Mutationen oder in ihrer Funktionalität gestörte hCx26 Halbkanäle, die in Zusammenhang mit Hauterkrankungen gebracht werden (Gerido et al., 2007), könnten Veränderungen in diesem temperaturabhängigen Schaltverhalten zeigen. Durch Untersuchungen von Mutationen des Connexins 26 könnten sich temperaturabhängige funktionelle Unterschiede zeigen und somit zur Klärung der Auswirkungen von intrazellulären Kommunikationsstörungen mittels Cx26 Gap Junctions beitragen.

Auch für Connexin 46 konnte eine temperaturabhängige Zunahme in der Leitfähigkeit bei einer Erwärmung festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der rCx46 Halbkanal schon bei niedrigen Temperaturen ( $7,1^{\circ}\text{C}$ ) aktiviert. Diese Eigenschaft scheint unabhängig von der Länge des C-Terminus zu sein (Walter, 2006).

Es wird postuliert, dass spannungsabhängige Mechanismen, die für die Spannungssensitivität von Gap Junctions verantwortlich sind, im Amino-Terminus (N-Terminus) (Oh et al., 1999, Verselis et al., 1994, White et al., 1995), dem ersten extrazellulären Loop (E1) (Rubin et al., 1992, Verselis et al., 1994, White et al., 1995) und der zweiten transmembranen Domäne (M2) (Suchyna et al., 1993, White et al., 1995) des Connexons zu finden sind. Die erste extrazelluläre Schleife E1 soll nicht an der Kopplung beteiligt sein

(White et al., 1995). Da die zweite transmembrane Domäne M2 in der Membran liegt und der N-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist (Evans et al., 1999, Goodenough et al., 1996, Yeager et al., 1998), sind M2 und der N-Terminus ebenfalls nicht an der Zell-Zell Kopplung beteiligt. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Connexin Halbkanäle ein spannungsabhängiges Verhalten zeigen wie die aus ihnen aufgebauten Gap Junction Kanäle. Es stellen sich die Fragen, ob dieses auch für einen möglichen Temperatursensor gilt, wo dieser lokalisiert sein könnte und ob Gap Junction Kanäle ebenfalls ein temperaturabhängiges Verhalten zeigen. Zukünftige elektrophysiologische Messungen an hCx26 Gap Junctions und an Mutationen von hCx26 könnten zur Klärung dieser Fragen beitragen.

In den weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurde ein möglicher Effekt von niederfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Leitfähigkeit und das Schaltverhalten des rCx46 Halbkanals untersucht. Die Funktionalität der rCx46 Halbkanäle nach einer ELF-EMF Exposition zeigte keinen eindeutigen Hinweis auf einen möglichen Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder. Auch die mit der Zwei-Elektroden Spannungsklemme gemessenen Eigenschaften der *Xenopus laevis* Oozytenmembran zeigte keinen Unterschied zwischen nicht- und exponierten Oozyten. Es wird nicht angenommen, dass eine Permeabilitätsänderung der Membran bei Raumtemperatur (20°C) einen möglichen ELF-EMF Effekt auf die Funktionalität des Connexin 46 überlagert. Diese Annahme begründet sich in den Messungen von nichtinjizierten Oozyten während verschiedener Temperaturapplikationen (Abb. 3.1.9).

Die Untersuchungen der Granulosa-Zellen auf DNA-Schäden mittels des Comet Assays ergaben, dass die Stärke der DNA-Migration abhängig von der Expositionsdauer des angelegten Feldes (16 2/3 Hz, (5 min an / 10 min aus), 1 mT) war. Diese Daten gehen konform mit den Daten, die parallel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.W. Rüdiger (Klinischen Abteilung Arbeitsmedizin, Medizinischen Universität Wien / Österreich) an Granulosa-Zellen durchgeführt wurden. Dieser parallele Ansatz (ELF-EMF: 50 Hz, (5 min an / 10 min aus), 1 mT) wurde im Rahmen des REFLEX Projektes durchgeführt, um festzustellen, ob die Messungen in unterschiedlichen Laboren zu ähnlichen Ergebnissen führen. Des Weiteren wurde an den Granulosa-Zellen ein möglicher frequenzabhängiger Einfluss von ELF-EM Feldern untersucht. Die Zellen zeigten eine erhöhte DNA-Migration im alkalischen Comet Assay bei 16 2/3 Hz und 50 Hz. Auch

mit einer unterschiedlichen Auswertungsmethode der Cometen konnte bei 50 Hz eine ähnliche DNA-Migration für die Granulosa-Zellen wie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H.W. Rüdiger ermittelt werden. Der neutrale Comet Assay zeigte keine signifikante DNA-Migration, weshalb vermutet wird, dass es sich bei den frequenzbedingten DNA-Schäden im alkalischen Comet Assay um DNA-Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und Crosslinks handelt (Singh und Lai, 1998). Diese DNA-Schäden können von den Zellen erkannt und repariert werden. Für die Frequenzen (8, 30, 300 oder 500 Hz), bei denen kein oder ein nicht signifikanter relativer Tailmoment gemessen wurde, könnte eine Verminderung der DNA-Migration durch Crosslinks vorliegen (Singh und Lai, 1998). Diese Annahme könnte durch eine Änderung des Comet Assay Protokolls nach Merk und Speit (1999) überprüft werden. Die in dieser Arbeit gemessenen DNA-Schäden müssen nicht zwangsläufig auf eine Tumorgenese hinweisen. Durch Schutzmechanismen des Organismus können DNA-Schäden repariert werden oder durch genetisch gesteuerte Apoptose funktionsuntüchtige Zellen absterben.

Da die DNA-Struktur sehr robust ist (Schultz et al., 2004) wird nicht angenommen, dass niederfrequente elektromagnetische Felder in der Lage sind, die DNA direkt zu beeinflussen, sondern dass DNA-Schäden primär durch Membranprozesse vermittelt werden. Ein durch ELF-EM Felder beeinflussbarer Prozess könnte die intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderung sein (Cho et al., 1999). Für die hier verwendeten Granulosa-Zellen und die Fibroblasten konnten jedoch keine Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration als möglicher Einfluss des ELF-EM Feldes festgestellt werden. Auch die Zugabe eines zusätzlichen Stressfaktors zeigte keine Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Für die Comet Assay Versuche mit den Fibroblasten (Ivancsits et al., 2003b, 2002, REFLEX, 2004) wurde eine Replikationsstudie von Scarfí et al. (2005) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen unter identischen Bedingungen einem unterbrochenen ELF-EM Feld ausgesetzt. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten jedoch keine signifikanten DNA-Schäden bei den Fibroblasten. Eine mögliche Erklärung könnten die zellzyklusabhängigen Eigenschaften der Zelllinien sein, so dass bei Messungen von unsynchronisierten Zellkulturen auf Einzelzellniveau heterogene Resultate gemessen werden (Schlie et al., 2008).

In einer kritischen Anmerkung zur REFLEX-Studie (2004) beanstandete Vijayalaxmi (2005), dass die untersuchten Zellkulturen (Fibroblasten und Granulosa-Zellen) ein anderes Verhalten und andere Eigenschaften aufweisen würden als frisch entnommene Zellen. Diese Annahme ist richtig, jedoch war es das Ziel der Studie, falls diese Zellen

einen durch ELF-EMF bewirkten Effekt aufweisen sollten, eine mögliche Ursache für die Wirkung zu finden, die auch für andere Expressionssysteme oder andere Ergebnisse eine mögliche Erklärung bietet. Jedoch scheint der Wirkungsmechanismen von elektromagnetischen Feldern auf Zellen oder den Organismus zellspezifisch und von mehreren unterschiedlichen Faktoren abhängig zu sein.

Um einen möglichen Wirkungsmechanismus niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf zellulärer Ebene zu finden, könnte durch Vergleiche von Unterschieden und/oder Gemeinsamkeiten der vielen Untersuchungen zu diesem Thema ein Hinweis zu einem gemeinsamen Wirkungsmodell ermittelt werden. Mit der Datenbank des Forschungszentrums für Elektro-Magnetische Umweltverträglichkeit (femu, [www.emf – portal.de](http://www.emf-portal.de)), die die Daten vieler Forschergruppen zusammenstellt, könnte eine gute Möglichkeit gegeben sein, die meist kontroversen Studien zu vergleichen um einen möglichen Wirkungsmechanismus niederfrequenter elektromagnetischer Felder zu finden.



# Literaturverzeichnis

- 26.BImSchV (1996). Sechszwanzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über elektromagnetische Felder - 26. BImSchV).
- Adam, G., Läuger, P. und Stark, G. (1977). *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Alexander, D. B. und Goldberg, G. S. (2003). Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Current Medicinal Chemistry*, 10(19):2045–2058.
- Anderson, D., Yu, T. W., Phillips, B. J. und Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research*, 307(1):261–271.
- Banáth, J. P., Fushiki, M. und Olive, P. L. (1998). Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 73(6):649–660.
- Bassett, C. A. L., Pawluk, R. J. und Becker, R. O. (1964). Effects of Electric Currents on Bone *In Vivo*. *Nature*, 204(4959):652–654.
- Bauch, T., Böcker, W., Mallek, U., Müller, W. U. und Streffer, C. (1999). Optimization and standardization of the "comet assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlentherapie und Onkologie*, 175(7):333–340.
- Beahm, D. L. und Hall, J. E. (2002). Hemichannel and Junctional Properties of Connexin 50. *Biophysical Journal*, 82(4):2016–2031.
- Behnsen, J. G. (2003). Biophysikalische Untersuchungen exprimierter Zell-Zellkanäle und Zell-Halbkanäle in An- und Abwesenheit elektromagnetischer Felder. Diplomarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Biophysik.
- Bennett, M. V., Barrio, L. C., Bargiello, T. A., Spray, D. C., Hertzberg, E. und Sáez, J. C. (1991). Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron*, 6(3):305–320.
- Bersani, F., Marinelli, F., Ognibene, A., Mattecucci, A., Cecchi, S., Santi, S., Squarzo-  
ni, S. und Maraldi, N. (1997). Intramembrane protein distribution in cell cultures is affected by 50 Hz pulsed magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 18(7):463–469.

- Beyer, E. C., Paul, D. L. und Goodenough, D. A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 1):2621–2629.
- Biade, S., Stobbe, C. C. und Chapman, J. D. (1997). The intrinsic radiosensitivity of some human tumor cells throughout their cell cycles. *Radiation Research*, 147(4):416–421.
- Blank, M. und Goodman, R. (2004). Initial interactions in electromagnetic field-induced biosynthesis. *Journal of Cellular Physiology*, 199(3):359–363.
- Bruzzone, R. (2001). Learning the language of cell-cell communication through connexin channels. In *Genome Biol. REPORTS4027*, volume 2, page R4027. A report on the Ninth International Gap Junction Conference, Honolulu, USA, 4-9 August 2001.
- Bruzzone, R., Haefliger, J. A., Gimlich, R. L. und Paul, D. L. (1993). Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Molecular and Cellular Biology*, 4(1):7–20.
- Budunova, I. V. (1994). Alteration of gap junctional intercellular communication during carcinogenesis. *The Cancer Journal*, 7(6):228–237.
- Bukauskas, F. F., Bukauskiene, A., Verselis, V. K. und Bennett, M. V. L. (2002). Coupling asymmetry of heterotypic connexin 45/ connexin 43-EGFP gap junctions: Properties of fast and slow gating mechanisms. *PNAS Neurobiology*, 99(10):7113–7118.
- Bukauskas, F. F., Elfgang, C., Willecke, K. und Weingart, R. (1995). Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. *Pflugers Archiv*, 429(6):870–872.
- Chapman, J. D., Stobbe, C. C., Gales, T., Das, I. J., Zellmer, D. L., Biade, S. und Matsumoto, Y. (1999). Condensed chromatin and cell inactivation by single-hit kinetics. *Radiation Research*, 151(4):433–441.
- Chen, Y.-H. und DeHaan, R. L. (1993). Temperature dependence of embryonic cardiac gap junction conductance and channel kinetics. *Journal of Membrane Biology*, 136(2):125–134.
- Chipman, J. K., Mally, A. und Edwards, G. O. (2003). Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. *The Journal of Toxicological Sciences*, 71(2):146–153.

- Cho, M. R., Thatte, H. S., Silvia, M. T. und Golan, D. E. (1999). Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields. *The FASEB Journal*, 13(6):677–683.
- Christensen, O. (1987). Mediation of cell volume regulation by  $\text{Ca}^{2+}$  influx through stretch-activated channels. *Nature*, 330(6143):66–68.
- Clark, M. L., Burch, J. B., Yost, M. G., Zhai, Y., Bachand, A. M., Fitzpatrick, C. T., Ramaprasad, J., Cragin, L. A. und Reif, J. S. (2007). Biomonitoring of estrogen and melatonin metabolites among women residing near radio and television broadcasting transmitters. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 49(10):1149–1156.
- Cole, K. S. (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Archives des Sciences Physiologiques*, 3(2):253–258.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3):249–261.
- Conti, P., Gigante, G. E., Alesse, E., Cifone, M. G., Fieschi, C., Reale, M. und Angeletti, P. U. (1985). A role for  $\text{Ca}^{2+}$  in the effect of very low frequency electromagnetic field on the blastogenesis of human lymphocyte. *FEBS Letters*, 181(1):28–32.
- Cotrina, M. L., Lin, J. H.-C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C. C. G. und Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *PNAS-Neurobiology*, 95(26):15735–15740.
- Dahm-Daphi, J., Dikomey, E. und Brammer, I. (1998). DNA-repair, cell killing and normal tissue damage. *Strahlentherapie und Onkologie*, 174(Suppl 3):8–11.
- Davis, S., Mirick, D. K., Chen, C. und Stanczyk, F. Z. (2006). Effects of 60-Hz magnetic field exposure on nocturnal 6-sulfatoxymelatonin, estrogens, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy reproductive-age women: results of a crossover trial. *Annals of Epidemiology*, 16(8):622–631.
- De Vries, S. H. und Schwartz, E. A. (1992). Hemi-Gap-Junction Channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *The Journal of Physiology*, 445(1):201–230.
- Dhein, S., Polontchouk, L., Salameh, A. und Haefliger, J.-A. (2002). Review: Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40. *Biology of the Cell*, 94(7-8):409–422.

- Dick, E. G., Dick, D. A. und Bradbury, S. (1970). The effect of surface microvilli on the water permeability of single toad oocytes. *Journal of Cell Science*, 6(2):451–476.
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136(2):153–179.
- Ebihara, L. (1996). *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the non-junctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophysical Journal*, 71(2):742–748.
- Ebihara, L. (2003a). New roles for connexons. *News in Physiological Sciences*, 18(3):100–103.
- Ebihara, L. (2003b). Physiology and biophysics of hemi-gap-junctional channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Acta Physiologica Scandinavica*, 179(1):5–8.
- Ebihara, L., Berthoud, V. M. und Beyer, E. C. (1995). Distinct behavior of connexin56 and connexin46 gap junctional channels can be predicted from the behavior of their hemi-gap-junctional channels. *Biophysical Journal*, 68(5):1796–1803.
- Ebihara, L., Beyer, E. C., Swenson, K. I., Paul, D. L. und Goodenough, D. A. (1998). Cloning and expression of a *Xenopus* embryonic gap junction protein. *Science*, 243(4895):1194–1195.
- Ebihara, L. und Steiner, E. (1993). Properties of a Nonjunctional Current Expressed from a Rat Connexin46 cDNA in *Xenopus* Oocytes. *The Journal of General Physiology*, 102(1):59–74.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Fraté, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R. A., Hülser, D. F. und Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *European Journal of Cell Biology*, 29(13):805–817.
- Evans, W. H., Ahmad, S., Diez, J., George, C. H., Kendall, J. und Martin, P. (1999). Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions. *Novartis Foundation symposium*, 219:44–59.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. und O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339(1):37–39.
- Fraser, S. E., Green, C. R., Bode, H. R. und Gilula, N. B. (1987). Selective disruption of gap junctional communication interferes with a patterning process in hydra. *Science*, 237(4810):49–55.

- Galloni, P. und Marino, C. (2000). Effects of 50 Hz magnetic field exposure on tumor experimental models. *Bioelectromagnetics*, 21(8):608–614.
- Gerido, D. A., DeRosa, A. M., Richard, G. und White, T. W. (2007). Aberrant hemichannel properties of Cx26 mutations causing skin disease and deafness. *American Journal of Physiology -Cell Physiology*, 293(1):C335–345.
- Gilula, N. B. (1987). Topology of gap junction protein and channel function. In Bock, G. und Clark, S., editors, *Ciba Foundation Symposium 125 - Junctional Complexes of Epithelial Cells*, volume 125 of *Novartis Foundation Symposia*, chapter 8, pages 128–139. John Wiley & Sons Canada, Ltd.
- Gimlich, R. L., Kumar, N. M. und Gilula, N. B. (1990). Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *Journal of Cell Biology*, 110(3):597–605.
- Gobba F., Bravo G., Scaringi M. und Roccatto L. (2006). No association between occupational exposure to ELF magnetic field and urinary 6-sulfatoximelatonin in workers. *Bioelectromagnetics*, 27(8):667–73.
- Goldberg, G. S., Lampe, P. D. und Nicholson, B. J. (1999). Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nature Cell Biology*, 1(7):457–459.
- Goldin, A. L. (1992). *Ion channels*, volume 207 of *Methods in Enzymology*, chapter Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection, pages 266–279. Academic Press, Inc., San Diego.
- González, D., Gómez-Hernández, J. und Barrio, L. (2006). Species specificity of mammalian connexin-26 to form open voltage-gated hemichannels. *The FASEB Journal*, 20(13):2329–2338.
- Goodenough, D. A., Goliger, J. A. und Paul, D. I. (1996). Connexins, Connexons, and Intercellular Communication. *Annual Review of Biochemistry*, 65:475–502.
- Goodenough, D. A., Simon, A. M. und Paul, D. L. (1999). Gap junctional intercellular communication in the mouse ovarian follicle. *Novartis Foundation symposium*, 219:226–35.

- Goodman, E., Greenebaum, B. und Marron, M. T. (1993). Altered protein synthesis in a cell-free system exposed to a sinusoidal magnetic field. *Biochimica et Biophysica Acta- Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1202(1):107–112.
- Greenland, S., Sheppard, A. R., Kaune, W. T., Poole, C. und Kelsh, M. A. (2000). A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. childhood leukemia-emf study group. *Epidemiology 2000*, 11(6):624–634.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R. Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6):3440–3450.
- Gupta, V. K., Berthoud, V. M., Atal, N., Jarillo, J. A., Barrio, L. C. und Beyer, E. C. (1994). Bovine connexin44, a lens gap junction protein: molecular cloning, immunologic characterization, and functional expression. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 35(10):3747–3758.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. und Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233(5316):177–182.
- Guthrie, S. C. und Gilula, N. B. (1989). Gap-junctional communication and development. *Trends in Neurosciences*, 12(1):12–16.
- Harris, A. L. (2001). Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 34(3):325–472.
- Heikkinen, P., Kumlin, T., Laitinen, J. T., Komulainen, H. und Juutilainen, J. (1999). Chronic exposure to 50-Hz magnetic fields or 900-MHz electromagnetic fields does not alter nocturnal 6-hydroxymelatonin sulfate secretion in CBA/S mice. *Electro- and Magnetobiology*, 18(1):33–42.
- Hennemann, H., Kozjek, G., Dahl, E., Nicholson, B. und Willecke, K. (1992). Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *European Journal of Cell Biology*, 58(1):81–89.
- Hilken, G., Iglauer, F. und Richter, H.-P. (1997). *Der Krallenfrosch Xenopus laevis als Labortier*. Enke Verlag Stuttgart.

- Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology*, 117(4):500–544.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. und Katz, M. (1949). Ionic current underlying activity in the giant axon of the squid. *Archives des Sciences Physiologiques*, 3(2):129–150.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835):366–374.
- Hu, G. L., Chiang, H., Zeng, Q. L. und Fu, Y. D. (2001). ELF Magnetic Field Inhibits Gap Junctional Intercellular Communication and Induces Hyperphosphorylation of Connexin43 in NIH3T3 Cells. *Bioelectromagnetics*, 22(8):568–573.
- Ihrig, I., Heese, C. und Glaser, R. (1997). Alterations of intracellular calcium concentration in mice neuroblastoma cells by electrical field and UVA. *Bioelectromagnetics*, 18(8):595–597.
- Ihrig, I., Schubert, F., Habel, B., Haberland, L. und Glaser, R. (1999). The UVA light used during the fluorescence microscopy assay affects the level of intracellular calcium being measured in experiments with electric-field exposure. *Radiation Research*, 152(3):303–311.
- Ivancsits, S., Diem, E., Jahn, O. und Rüdiger, H. W. (2003a). Age-related effects on induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to electromagnetic fields. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124(7):847–850.
- Ivancsits, S., Diem, E., Jahn, O. und Rüdiger, H. W. (2003b). Intermittent extremely low frequency electromagnetic fields cause DNA damage in a dose-dependent way. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 76(6):431–436.
- Ivancsits, S., Diem, E., Pilger, A., Rüdiger, H. W. und Jahn, O. (2002). Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutation Research*, 519(1-2):1–13.
- Ivancsits, S., Pilger, A., Diem, E., Jahn, O. und Rüdiger, H. W. (2005). Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutation Research*, 583(2):184–188.

- Janssen-Bienhold, U., Schultz, K., Gellhaus, A., Schmidt, P., Ammermüller, J. und Weiler, R. (2001). Identification and localization of connexin26 within the photoreceptor-horizontal cell synaptic complex. *Visual Neuroscience*, 18(2):169–178.
- Jedamzik, B., Marten, I., Ngezahayo, A., Ernst, A. und Kolb, H.-A. (2000). Regulation of Lens rCx46-formed Hemichannels by Activation of Protein KinaseC, External  $\text{Ca}^{2+}$  and Protons. *The Journal of Membrane Biology*, 173(1):39–46.
- Jiang, J. X. und Gu, S. (2005). Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1711(2):208–214.
- Kamermans, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Bienhold, U., Sjoerdsma, T. und Weiler, R. (2001). Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science*, 292(5519):1178–1780.
- Karabakhtsian, R., Broude, N., Shalts, N., Kochlatyi, S., Goodman, R. und Henderson, A. S. (1994). Calcium is necessary in the cell response to EM fields. *FEBS Letters*, 349(1):1–6.
- Kenny, J. S., Kisaalita, W. S., Rowland, G., Thai, C. und Foutz, T. (1997). Quantitative study of calcium uptake by tumorigenic bone (TE-85) and neuroblastoma  $\times$  glioma (NG108-15) cells exposed to extremely-low-frequency (ELF) electric fields. *FEBS Letters*, 414:343–348.
- Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D. L., Takasaka, T. und Adams, J. C. (2000). Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Research Reviews*, 32(1):163–166.
- Kikuchi, T., S., K. R., Paul, D. L. und Adams, J. C. (1995). Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anatomy and Embryology*, 191(2):101–118.
- Kirber, M. T., Walsh, J. V. J. und Singer, J. J. (1988). Stretch-activated ion channels in smooth muscle: a mechanism for the initiation of stretch-induced contraction. *Pflugers Archive*, 412(4):339–345.
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1984). Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Research*, 12(18):7057–7070.
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1987). *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods in Enzymology*, 155:397–415.

- Kumar, N. M. und Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3):381–388.
- Kwak, B. R. und Jongsma, H. J. (1996). Regulation of cardiac gap junctional channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 157(1-2):93–99.
- Lai, H. und Singh, N. P. (1997). Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics*, 18(2):156–165.
- Lai, H. und Singh, N. P. (2004). Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environmental Health Perspectives*, 112(6):687–694.
- Laird, D. W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal*, 394(Pt 3):527–543.
- Leitgeb, N. (1990). *Strahlen, Wellen, Felder*. Georg Thieme-Verlag.
- Leybaert, L., Braet, K., Vandamme, W., Cabooter, L., Martin, P. E. und Evans, W. H. (2003). Connexin channels, connexin mimetic peptides and ATP release. *Cell Communication & Adhesion*, 10(4-6):251–257.
- Li, G. und Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Trends in Molecular Medicine*, 6(4):163–169.
- Liburdy, R. P., Callahan, D. E., Harland, J., Dunham, E., Sloma, T. R. und Yaswen, P. (1993). Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade (Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction). *FEBS Letters*, 334(3):301–308.
- Liman, E. R., Tytgat, J. und Hess, P. (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron*, 9(5):861–871.
- Lindström, E., Lindström, P., Berglund, A., Mild, K. H. und Lundgren, E. (1993). Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field. *Journal of Cellular Physiology*, 156(2):395–398.
- Liu, T. F., Li, H. Y., Atkinson, M. M. und Johnson, R. G. (1995). Intracellular lucifer yellow leakage from Novikoff cells in the presence of ATP or low extracellular Ca: evidence for hemi-gap junction channels. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 17(1):23–28.

- Loewenstein, W. R. (1979). Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, 560(1):1–65.
- Lohmann, C. H., Schwartz, Z., Liu, Y., Li, Z., Simon, B. J., Sylvia, V. L., Dean, D. D., Bonewald, L. F., Donahue, H. J. und Boyan, B. D. (2003). Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 21(2):326–334.
- Löscher, W. und Liburdy, R. P. (1998). Animal and cellular studies on carcinogenic effects of low frequency (50/60-Hz) magnetic fields. *Mutation Research*, 410(2):185–220.
- Löscher, W., Wahnschaffe, U., Mevissen, M., Lerchl, A. und Stamm, A. (1994). Effects of weak alternating magnetic fields on nocturnal melatonin production and mammary carcinogenesis in rats. *Oncology*, 51(3):288–295.
- Luben, R. (1995). *On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems*, chapter Membrane signal transduction as a site of electromagnetic field actions in bone and other tissues, pages 83–98. Springer-Verlag GmbH.
- Lyng, F. M., Seymour, C. B. und Mothersill, C. (2000). Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. *British Journal of Cancer*, 83(9):1223–1230.
- Makowski, L., Caspar, D. L. D., Phillips, W. C. und Goodenough, D. A. (1977). Gap junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data. *Journal of Cell Biology*, 74(2):629–645.
- Malchow, R. P., Qian, H. und Ripps, H. (1994). A novel action of quinine and quinidine on the membrane conductance of neurons from the vertebrate retina. *The Journal of General Physiology*, 104(6):1039–1055.
- Mandeville, R., Franco, E., Sidrac-Ghali, S., Paris-Nadon, L., Rocheleau, N., Mercier, G., Desy, M., Devaux, C. und Gaboury, L. (2000). Evaluation of the potential promoting effect of 60 Hz magnetic fields on N-ethyl-N-nitrosourea induced neurogenic tumors in female F344 rats. *Bioelectromagnetics*, 21(2):84–93.
- Meşe, G., Richard, G. und White, T. W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(11):2516–2524.

- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M. R. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promotor. *Nucleic Acids Research*, 12(12):7035–7056.
- Merk, O. und Speit, G. (1999). Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33(2):167–172.
- Mesnil, M. (2002). Review: Connexins and cancer. *Biology of the Cell*, 94(7-8):493–500.
- Moreno, A. P. (2004). Biophysical properties of homomeric and heteromultimeric channels formed by cardiac connexins. *Cardiovascular Research*, 62(2):276–286.
- Moreno, A. P. und Lau, A. F. (2007). Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 94(1-2):107–119.
- Negishi, T., Imai, S., Shibuya, K., Nishimura, I. und Shigemitsu, T. (2008). Lack of promotion effects of 50 Hz magnetic fields on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced malignant lymphoma/lymphatic leukemia in mice. *Bioelectromagnetics*, 29(1):29–38.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J., Reits, E., Janssen, L. und Neefjes, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*, 434(7029):83–88. Comment in: *Nature*. 2005 Mar 3;434(7029):27-8.
- Ngezahayo, A., Zeilinger, C., Todt, I., Marten, I. und Kolb, H.-A. (1998). Inactivation of expressed and conducting rCx46 hemichannels by phosphorylation. *Pflugers Archiv*, 436(4):627–629.
- Oh, S., Rubin, J. B., Bennett, M. V. L., Verselis, V. K. und Bargiello, T. A. (1999). Molecular Determinants of Electrical Rectification of Single Channel Conductance in Gap Junctions Formed by Connexins 26 and 32. *The Journal of General Physiology*, 114(3):339–364.
- Okuma, A., Kuraoka, A., Iida, H., Inai, T., Wasano, K. und Shibata, Y. (1996). Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary. *Experimental Cell Research*, 107(2):255–264.

- Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. und Sosinsky, G. E. (2007). Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *PNAS Biophysic*, 104(24):10034–10039.
- Otaka, Y., Chida, T., Yamagishi, Y. und Kitamura, S. (2002). Carcinogenicity test in B6C3F1 mice after parental and prenatal exposure to 50 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 23(3):206–213.
- Patton, W. P., Chakravarthy, U., Davies, R. J. H. und Archer, D. B. (1999). Comet Assay of UV-Induced DNA Damage in retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(13):3268–3275.
- Paul, D. L., Ebihara, L., Takemoto, L. J., Swenson, K. I. und Goodenough, D. A. (1991). Connexin46, a Novel Lens Gap Junction Protein, Induces Voltage-gated Currents in Nonjunctional Plasma Membrane of *Xenopus* Oocytes. *Journal of Cell Biology*, 115(4):1077–1089.
- Perkins, G., Goodenough, D. und Sosinsky, G. (1997). Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophysical Journal*, 72(2 Pt 1):533–544.
- Pfahnl, A. und Dahl, G. (1999). Gating of Cx46 gap junction hemichannels by calcium and voltage. *Pflugers Archiv*, 437(3):345–353.
- Pilger, A., Ivancsits, S., Diem, E., Steffens, M., Kolb, H.-A. und Rüdiger, H. W. (2004). No effects of intermittent 50 Hz EMF on cytoplasmic free calcium and on the mitochondrial membrane potential in human diploid fibroblasts. *Radiation and Environmental Biophysics*, 43:203–207.
- Pottek, M., Hoppenstedt, W., Janssen-Bienhold, U., Schultz, K., Perlman, I. und Weiler, R. (2003). Contribution of connexin26 to electrical feedback inhibition in the turtle retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 466(4):468–477.
- Ramundo-Orlando, A., Morbiducci, U., Mossa, G. und D’Inzeo, G. (2000). Effect of low frequency, low amplitude magnetic fields on the permeability of cationic liposomes entrapping carbonic anhydrase: I. Evidence for charged lipid involvement. *Bioelectromagnetics*, 21(7):491–8.
- Ramundo-Orlando, A., Serafino, A., Schiavo, R., Liberti, M. und D’Inzeo, G. (2005). Permeability changes of connexin32 hemi channels reconstituted in liposomes induced

- by extremely low frequency, low amplitude magnetic fields. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1668(1):33–40.
- REFLEX (2004). *Final Report: Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards From Low Energy Electromagnetic Field Exposure Using Sensitive in vitro Methods (REFLEX)*. European Union, 5<sup>th</sup> framework: quality of life and management of living resources edition.
- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G. G. und Acuña-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18(1):1–11.
- Ripps, H., Qian, H. und Zakevicius, J. (2004). Properties of Connexin26 Hemichannels Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24(5):647–665.
- Robb-Gaspers, L. D., Burnett, P., Rutter, G. A., Denton, R. M., Rizzuto, R. und Thomas, A. P. (1998). Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *The EMBO Journal*, 17(17):4987–5000.
- Rosenstein, B. S. (1988). The Induction of DNA Strand Breaks in Normal Human Skin Fibroblasts Exposed to Solar Ultraviolet Radiation. *Radiation Research*, 116(2):313–319.
- Rubin, J., Verselis, V., Bennett, M. und Bargiello, T. (1992). A domain substitution procedure and its use to analyze voltage dependence of homotypic gap junctions formed by connexins 26 and 32. *PNAS Neurobiology*, 89(9):3820–3824.
- Sakurai, T., Yoshimoto, M., Koyama, S. und Miyakoshi, J. (2007). Exposure to extremely low frequency magnetic fields affects insulin-secreting cells. *Bioelectromagnetics*, 29(2):118–124.
- Salvioli, S., Bonafè, M., Capri, M., Monti, D. und Franceschi, C. (2001). Mitochondria, aging and longevity - a new perspective. *FEBS Letters*, 492(1-2):9–13.
- Santos-Sacchi, J. (1986). The temperature dependence of electrical coupling in the organ of Corti. *Hear Research*, 21(3):205–211.
- Satoh, T., Enokido, Y., Aoshima, H., Uchiyama, Y. und Hatanaka, H. (1997). Changes in mitochondrial membrane potential during oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 50(3):413–420.

- Savitz, D. A., Wachtel, H., Barnes, F. A., John, E. M. und Tvrdik, J. G. (1988). Case-control study of childhood cancer and exposure to 60-Hz magnetic fields. *American Journal of Epidemiology*, 128(1):21–38.
- Scarfí, M. R., Sannino, A., Perrotta, A., Sarti, M., Mesirca, P. und Bersani, F. (2005). Evaluation of genotoxic effects in human fibroblasts after intermittent exposure to 50 Hz electromagnetic fields: a confirmatory study. *Radiation Research*, 164(3):270–276.
- Schlie, S., Chichkov, B. und Ngezahayo, A. (2008). Gap junction and apoptosis by in phases of the cell cycles of GFSHR-17 granulosa cells. submitted.
- Schnurstein, A. (2001). *Untersuchungen zur Genotoxizität in Fischen und Fischzellen mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) - Möglichkeiten und Grenzen im Umweltmonitoring*. Inaugural-dissertation rer. nat., Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Schuderer, J., Oeschand, W., Felber, N., Spät, D. und Kuster, N. (2004). *In vitro* exposure apparatus for ELF magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 25(8):582–591.
- Schultz, T., Samoylova, E., Radloff, W., Hertel, I. V., Sobolewski, A. L. und Domcke, W. (2004). Efficient deactivation of a model base pair via excited-state hydrogen transfer. *Science*, 206(5702):1765–1768.
- Shahidain, R., Mullins, R. D. und Siskin, J. E. (2001). Calcium spiking activity and baseline calcium levels in ROS 17/2.8 cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields (ELF EMF). *International Journal of Radiation Biology*, 77(2):241–248.
- Shi, Q. und Gibson, G. E. (2007). Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders*, 21(4):276–291.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. und Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *PNAS*, 91(23):10771–10778.
- Simpson, I., Rose, B. und Loewenstein, W. R. (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science*, 195(4275):294–296.
- Singh, N. und Lai, H. (1998). 60 Hz magnetic field exposure induces DNA crosslinks in rat brain cells. *Mutation Research*, 400(1-2):313–320.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. und Schneider, E. L. (1988). A simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175:184–191.

- Singh, N. P. und Stephens, R. E. (1997). Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutation Research*, 383(2):167–175.
- Sosinsky, G. (1995). Mixing of connexins in gap junction membrane channels. *PNAS*, 92(20):9210–9214.
- Spray, D. C., Harris, A. L. und Bennett, M. V. (1981). Equilibrium properties of a voltage-dependent junctional conductance. *The Journal of General Physiology*, 77(1):77–93.
- Steffens, M., Göpel, F., Ngezahayo, A., Zeilinger, C., Ernst, A. und Kolb, H.-A. (2008). Regulation of connexons composed of human connexin26 (hCx26) by temperature. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, accepted.
- Steinberg, T. H., Civitelli, R., Geist, S. T., Robertson, A. J. Hick, E., Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Warlow, P. M., Westphale, E. M., Laing, J. G. und andere (1994). Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *The EMBO Journal*, 13(4):744–750.
- Stühmer, W. (1992). *Ion Channels*, volume 207 of *Methods in Enzymology*, chapter Electrophysiological Recording from *Xenopus* Oocytes, pages 319–339. Wiley-Liss, New York.
- Östling, O. und Johanson, K. J. (1984). Microelektrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1):291–298.
- Suchyna, T. M., Xu, L. X., Gao, F., Fournier, C. R. und Nicholson, B. J. (1993). Identification of a proline residue as a transduction element involved in voltage gating of gap junctions. *Nature*, 365(6449):847–849.
- Swenson, K. I., Jordan, J. R., Beyer, E. C. und Paul, D. L. (1989). Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs. *Cell*, 57(1):145–155.
- Todt, I., Ngezahayo, A., Ernst, A. und Kolb, H.-A. (2001). Hydrogen peroxide inhibits gap junctional coupling and modulates intracellular free calcium in cochlear hensen cells. *The Journal of Membrane Biology*, 181(2):107–114.
- Tomenius, L. (1986). 50-Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumors in Stockholm County. *Bioelectromagnetics*, 7(2):191–207.
- Tonini, R., Baroni, M. D., Masala, E., Micheletti, M., Ferroni, A. und Mazzanti, M. (2001). Calcium protects differentiating neuroblastoma cells during 50 Hz electromagnetic radiation. *Biophysical Journal*, 81(5):2580–2589.

- Trexler, E. B., Bennett, M. V., Bargiello, T. A. und Verselis, V. K. (1996). Voltage Gating and Permeation in a Gap Junction Hemichannel. *PNAS*, 93(12):5836–5841.
- Trexler, E. B., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V., Bargiello, T. A. und Verselis, V. K. (1999). Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation. *The Journal of General Physiology*, 113(5):721–742.
- UNSCEAR-Report (2000). Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly. Technical Report Vol I, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.
- Valiunas, V., Niessen, H., Willecke, K. und Weingart, R. (1999). Electrophysiological properties of gap junction channels in hepatocytes isolated from connexin32-deficient and wild-type mice. *Pflugers Archiv*, 437(6):846–856.
- Valiunas, V. und Weingart, R. (2000). Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. *Pflugers Archiv*, 440(3):366–379.
- Venkatachalam, K. und Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76:387–417.
- Verselis, V. K., Ginter, C. S. und Bargiello, T. A. (1994). Opposite voltage gating polarities of two closely related connexin. *Nature*, 368(6469):348–351.
- Vijayalaxmi (2005). Kritische Anmerkungen zur Untersuchung von DNA-Schädigungen im Schlussbericht 2004 der REFLEX-studie. *Newsletter Forschungsgemeinschaft Funktion e.V.*, 2(G 14514):58–62.
- Vogel, R., Valiunas, V. und Weingart, R. (2006). Subconductance States of Cx30 Gap Junction Channels: Data from Transfected HeLa Cells versus Data from a Mathematical Model. *Biophysical Journal*, 91(6):2337–2348.
- Wallace, S. S. (1994). DNA damages processed by base excision repair: biological consequences. *International Journal of Radiation Biology*, 66(5):579–589.
- Walleczek, J. (1992). Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. *The FASEB Journal*, 6:3177–3185.
- Walter, W. (2006). Molekularbiologische und elektrophysiologische Struktur-Funktionsanalyse von Connexin46. Diplomarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Biophysik.

- Wertheimer, N. und Leeper, E. (1979). Electrical wiring configurations and childhood cancer. *American Journal of Epidemiology*, 109:273–284.
- Wertheimer, N. und Leeper, E. (1982). Adult cancer related to electrical wires near the home. *International Journal of Epidemiology*, 11:345–355.
- White, T. W. (2003). Nonredundant gap junction functions. *News in Physiological Sciences*, 18(3):95–99.
- White, T. W., Paul, D. L., Goodenough, D. A. und Bruzzone, R. (1995). Functional Analysis of Selective Interactions among Rodent Connexins. *Molecular Biology of the Cell*, 6(4):459–470.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U. und Söhl, G. (2002). Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. *Biological Chemistry*, 383(5):725–737.
- Wolf, F. I., Torsello, A., Tedesco, B., Fasanella, S., Boninsegna, A., D'Ascenzo, M., Grassi, C., Azzena, G. B. und Cittadini, A. (2005). 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1743(1-2):120–129.
- Yamasaki, H., Omori, Y., Zaidan-Dagli, M. L., Mironov, N., Mesnil, M. und Krutovskikh, V. (1999). Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention*, 23(4):273–279.
- Yeager, M., Unger, V. M. und Falk, M. M. (1998). Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(4):517–524.
- Young, K. C. und Peracchia, C. (2004). Opposite Cx32 and Cx26 Voltage-Gating Response to CO<sub>2</sub> Reflects Opposite Voltage-Gating Polarity. *Journal of Membrane Biology*, 202(3):161–170.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *PNAS Microbiology*, 84(15):5449–5453.
- Zeilinger, C., Steffens, M. und Kolb, H.-A. (2005). Length of C-terminus of rCx46 influences oligomerization and hemichannel properties. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1720:35–43.

- Zeng, Q. L., Chiang, H., Hu, G. L., Mao, G. G., Fu, Y. T. und Lu, D. Q. (2003). ELF magnetic fields induce internalization of gap junction protein connexin 43 in Chinese hamster lung cells. *Bioelectromagnetics*, 24(2):134–138.
- Zhang, J. T. und Nicholson, B. J. (1994). The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions. *Journal of Membrane Biology*, 139(1):15–29.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C. M., Carr, R. W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J. N. und Reeh, P. W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature*, 447(7146):856–859.
- Zou, H., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., Fogarty, K. E. und Singer, J. J. (2002). Visualization of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through single stretch-activated cation channels. *PNAS-Physiology*, 99(9):6404–6409.

# Anhang

## A Chemikalien

Agarose (Normal Melting)	NM-Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen
Agarose (Low Melting)	LM-Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen
D(+) - Glucose monohydrate	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich; München
DMSO	$C_2H_6SO$	Roth; Karlsruhe
DMEM-F12		Sigma-Aldrich; München
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}N_3Br$	Sigma-Aldrich; München
Fetal Calf Serum	FCS	Sigma-Aldrich; München
Fura 2-AM	$C_{44}H_{47}N_3O_{24}$	Merck; Darmstadt
Formamid	$CH_3NO$	Sigma-Aldrich; München
Hepes	$C_8H_{18}N_2O_4S$	
Kaliumchlorid	KCl	Roth; Karlsruhe
Kalziumchlorid-2-hydrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	
Kaliumdihydrogenphosphat	$KH_2PO_4$	Roth; Karlsruhe
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Riedel-de Haën; Seelze
MES	$C_6H_{13}NO_4S$	
Mineralöl	Heavy white oil	Sigma-Aldrich; München
mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit		Ambion, Inc.; USA
mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit		Ambion, Inc.; USA
Natriumacetat (NaAcetat)	$C_2H_3NaO_2$	Roth; Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Roth; Karlsruhe
Natriumhydrogenkarbonat	$NaHCO_3$	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat	$Na_2HPO_4$	Merck; Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Merck; Darmstadt
N-Laurylsarcosin	$C_{15}H_{29}NO_3$	Sigma-Aldrich; München

---

Penicillin-Streptomycin	5000 IU/ml-5000 U $\mu$ g/ml	GIBCO BRL Life Technologies GmbH; Eggenstein
Phenolrot	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> S	Merck; Darmstadt
Salzsäure (rauchende, 35%)	HCl	Merck; Darmstadt
D-Sorbitol (D-Sorbit)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Roth; Karlsruhe
Titriplex (Na <sub>2</sub> EDTA)	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Merck; Darmstadt
Tris	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Roth; Karlsruhe
Triton X-100	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>11</sub>	Sigma-Alderich; München
Trypsin T-4799	1:255	Sigma-Alderich; München

## B Geräte und Materialien

A/D-Wandler	ITC-16	Instrutech Corporation, Port Washington; USA
Axiovert 10		Carl Zeiss AG; Oberkochen
CCD-Kamera	SATISEC SAT-11SP	EHD imaging GmbH; Damme
CCD-Kamera	C4742-95	Hamamatsu Photonics KK; Japan
Deckgläser	( $\varnothing$ 10 mm, 24×60 mm)	Pfeuffer; Hannover
E-cups		Eppendorf AG; Hamburg
Elektrolysegerät	9 V, 1 K $\Omega$	Institut für Biophysik; Hannover
Elektrophoresekammer	Model BM100	Serva Elektrophoresis GmbH; Heidelberg
Elektrophorese Power Supply	1200 V/ 500 mA, E815	Consort; Turnhout, Belgien
Färbeküvette	lichtgeschützt	Roth; Karlsruhe
Färbeküvette	nach Hellendahl	Roth; Karlsruhe
Filter: Sperrfilter	XF1019	Omega Optical; Brattleboro, USA
Filter: Anregungsfilter	XF3016	Omega Optical; Brattleboro, USA
Filter: Dichroicfilter	570DRLP 0325DTM	Omega Optical; Brattleboro, USA
Glaskapillare (Messung)	GB150F-10 (0,86×1,50×100) with filament	Science Products; Hofenheim
Glaskapillare (Injektion)	3,5 Nanoltr. 4878 ONE O7E	World Precision Instruments Inc.; Sarasota, USA
Klima-Brutschrank	B 5060 EK/CO <sub>2</sub>	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Klima-Brutschrank	FR 1500 Automatic CO <sub>2</sub> Incubator	Flow Laboratories; USA
Objektträger (Darkin slides)	sandgestrahlt, 25×75×1,0 mm	VWR International GmbH; Darmstadt

Mikromanipulatoren		Luigs&Neumann; Ratingen
Mikroskop	GZ4	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar
Nahtmaterial	EP3098N Bondek Plus	Teleflex Medical GmbH; Tuttlingen
Nahtmaterial	ES-6158	Teleflex Medical GmbH; Tuttlingen
Osmometer	5500 Vapor Pressure Osmometer	Wescor Inc.; Logan, USA
pH-Meter	691 pH Meter	Metrohm AG; Herisau, Schweiz
Peristaltische Pumpe	LKB Pump P1	Pharmacia; Freiburg
Petrischalen	Ø 90, 50, 35 mm	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
Polychrom II Monochromator		T.I.L.L. Photonics, Planegg
Puller	PP-830	Narishige; Japan
Quadriperm-Schalen	76×26 mm	Renner GmbH; Dannstadt
Schüttler	Unimax 2010	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG; Kelheim
Software	Aquacosmos	Hamamatsu Photonics KK; Japan
Software	Origin 7.0	OriginLab Corporation; Northampton, USA
Software	Pulse 8.09	HEKA Elektronik; Lambrecht/Pfalz
Turbo TEC-10CD		npi electronic GmbH; Tamm
Universal Mikroskop		Carl Zeiss AG; Oberkochen
Xenon Lampe	XBO 75W	Osram; München
<i>Xenopus laevis</i>		Xenopus Express Inc.; France
Zentrifuge	Z 400 K	Hermle Labortechnik GmbH; Wehingen
Zentrifuge	MiniSpin® plus	Eppendorf AG; Hamburg

## C Lösungen, Medien und Puffer

### C.1 Zellkultur- und Spülmedien:

Trypsin-Lösung	2,50 g/l	Trypsin	100 ml	PBS-EDTA-Lösung
	8 g/l	NaCl		
	0,2 g/l	KCl		
	1,4 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		
	0,2 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		
	1 g/l	EDTA		
			pH 7,4	mit NaOH einstellen
			100 ml	
Zellkultur-medium		NaHCO <sub>3</sub>	1,2 g	anwärmen 20°C
		DMEM-F12	1 Flasche	
		Penicilin	100 U/ml	
		Streptomycin	100 µg/ml	
			pH 7,4	mit NaOH einstellen / Phenolrot
			300 mmol/kg	mit Aqua bidest einstellen
			~900-1100 ml	sterile Filtration
		FCS	100 ml	angetaut dazugeben
Spülmedium für Fibroblasten- / Granulosa-Zellen	145 mM	NaCl	1,69476 g	mit NaOH einstellen / Phenolrot
	10 mM	Hepes	4,7662 g	
	5 mM	Glucose H <sub>2</sub> O	1,9817 g	
	5 mM	KCl	0,7456 g	
	2 mM	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,58808 g	
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,6099 g	
			pH 7,4	mit NaOH einstellen / Phenolrot
			300 mmol/kg	mit Aqua bidest einstellen
			1900-2000 ml	

PBS-EDTA Lösung		NaCl	8,0 g	
		KCl	0,2 g	
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4 g	
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	
		EDTA	1,0 g	
			pH 7,4	mit NaOH einstellen
			Aqua bidest	
			1000 ml	steril filtriert
PBS- Lösung	120 mM	NaCl	7,0128 g	
	2,7 mM	KCl	0,2013 g	
	8,0 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,1357 g	
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2041 g	
			pH 7,4	mit NaOH einstellen
				Aqua bidest
		1000 ml		
		250, 300 oder 450 mmol/kg		mit Sorbitol einstellen

### C.2 Oozytenmedien:

I <sub>c</sub> - Lösung	100 mM	KCl	100 ml	1 M KCl - Stocklsg.
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>	2 ml	1 M MgCl <sub>2</sub> - Stocklsg.
	50 mM	Sorbitol	50 ml	1 M Sorbitol - Stocklsg.
	10 mM	MES	10 ml	1 M MES - Stocklsg.
			pH 7,4	mit Tris einstellen Aqua bidest
			1000 ml	
ND96- Lösung	96 mM	NaCl	5,6010 g	
	2 mM	KCl	0,1490 g	
	1,8 mM	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2646 g	
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,2033 g	
	5 mM	Hepes	1,1915 g	
			pH 7,4	mit NaOH einstellen Aqua bidest
			1000 ml	
			5 ml	Penicillin-Streptomycin
			240 mmol/kg	mit Sorbitol einstellen
OR2- Lösung	96 mM	NaCl	5,6010 g	
	2 mM	KCl	0,1490 g	
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,2033 g	
	5 mM	Hepes	1,1915 g	
			pH 7,4	mit NaOH einstellen Aqua bidest
			1000 ml	
			240 mmol/kg	mit Sorbitol einstellen

Modified Barth's Medium	88 mM	NaCl	5,143 g	
	1 mM	KCl	0,075 g	
	2,4 mM	NaHCO <sub>3</sub>	0,202 g	
	15 mM	Hepes	3,570 g	
	0,33 mM	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,078 g	
	0,41 mM	CaCl <sub>2</sub>	0,060 g	
	0,82 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,203 g	
			pH 7,6	
			Aqua bidest	
		1000 ml		
		5 ml	Penicillin-Streptomycin	

### C.3 Comet Assay Medien:

Lyse- Stocklösung (A)	2,5 M	NaCl	146,1 g	mit NaOH einstellen Aqua bidest
	100 mM	Na <sub>2</sub> EDTA	37,2 g	
	10 mM	Tris	1,2 g	
	1 %	N-Lauryl- sarcosin	10,0 g	
			pH 10	
			1000 ml	
Elektrophorese- Stocklösung (B)	10 M	NaOH	400,0 g	Aqua bidest
			1000 ml	
EDTA- Stocklösung (C)	200 mM	Na <sub>2</sub> EDTA	146,1 g	Aqua bidest
			200 ml	
Ethidiumbromid- Stocklösung (D)	0,02 %	Ethidium- bromid	10 mg	Aqua bidest
			Aqua bidest	
			50 ml	
Elektrophorese- Stocklösung (E)	500 mM	Tris	61,0 g	Aqua bidest
	1,5 M	NaAcetat	123,0 g	
	2,5 M	NaCl	146,1 g	
			1000 ml	

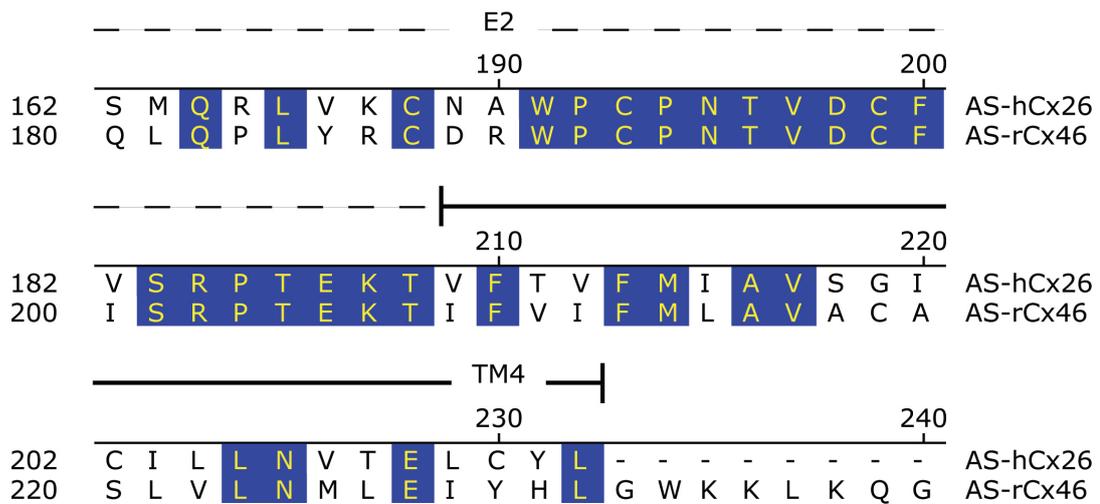
PBS-Lösung		NaCl	8,0 g	mit konz. HCl oder NaOH einstellen Aqua bidest
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 g	
		KCl	0,2 g	
			pH 7,4	
			1000 ml	
Elektrophorese- puffer bei > pH 13	300 mM	NaOH	60 ml	Stocklösung (B)
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA	10 ml	Stocklösung (C)
			2000 ml	Aqua bidest
Elektrophorese- puffer bei pH 8,5	100 mM	Tris	400 ml	Stocklösung (E)
	300 mM	NaAcetat		
	500 mM	NaCl		
		HCl	10 ml	konz. HCl
			2000 ml	Aqua bidest
Lysepuffer	2,5 M	NaCl	4,45 ml	Stocklösung (A)
	100 mM	Na <sub>2</sub> EDTA		
	10 mM	Tris		
	1 %	N-Lauryl- sarcosin		
	10 %	DMSO	0,5 ml	
	1 %	Triton X-100	0,05 ml	
			5 ml	pro Objektträger
Ethidiumbromid- färbelösung	0,002 %	Ethidium- bromid	6 ml	Stocklösung (D)
			60 ml	Aqua bidest

NM-Agarose- PBS-Lösung	1,5 %	NM-Agarose	1,5 g	PBS-Lösung
			100 ml	
			100 ml	80°C
LM-Agarose- PBS-Lösung	0,6 %	LM-Agarose	1,5 g	PBS-Lösung
			100 ml	
			100 ml	37°C

### C.4 Transkriptionsmedien:

mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit	1 µg/7 µl	7 µl	Template
		2 µl	10× Transkriptionspuffer
		2 µl	ATP
		2 µl	CTP
		2 µl	UTP
		1 µl	GTP
		1 µl	CAP
		1 µl	Formamid
		2 µl	Enzym-Mix
		20 µl	Inkubation für 2-6 h, 37°C
mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit	1 µg/7 µl	7 µl	Template
		2 µl	10× Transkriptionspuffer
		2 µl	ATP
		2 µl	CTP
		2 µl	UTP
		1 µl	GTP
		1 µl	CAP
		2 µl	Enzym-Mix
		1 µl	H <sub>2</sub> O RNase-frei
		20 µl	Inkubation für 2-6 h, 37°C





**Abbildung D.1:** ClustalW-Alignment von hCx26 (Homo sapiens, NP\_003995) mit rCx46 (Rattus norvegicus, NP\_077352): Identische Aminosäurereste sind blau unterlegt. Das ClustalW-Alignment wurde mit der DNASTAR Software unter Verwendung der Gonnet 250 Aminosäure-Austausch-Matrix durchgeführt. Die potentiellen Transmembrandomänen (TM1 - TM4) sind als Linie dargestellt, während die extrazellulären Schleifen (E1, E2) und intrazelluläre Schleife mit (CL) gestrichelt dargestellt sind. Die transmembranären Domänen wurden über den Kyte-Doolittle Algorithmus ermittelt. Die extrazellulären Schleifen liegen folglich zwischen M1 und M2 sowie M3 und M4, die intrazelluläre Schleife zwischen M2 und M3, der N-Terminus vor M1, der C-Terminus nach M4 (nicht dargestellt).

## E Auswertungsprotokoll zu einer ELF-EMF Exposition von der IT'IS - Foundation, Zürich

### Reflex ELF Experiment Parameters

Description	Value	Unit
Start Date and Time	2004-04-27 13:10:21	
Stop Date and Time	2004-04-28 07:31:27	
Duration ON	300	[s]
Duration OFF	600	[s]
Total Duration	18	[h]
Number of Cycles	72	[#]
Target B-Field	1	[mT]
Signal Frequency	50	[Hz]
Signal Name	Sine (Arbitrary frequency)	

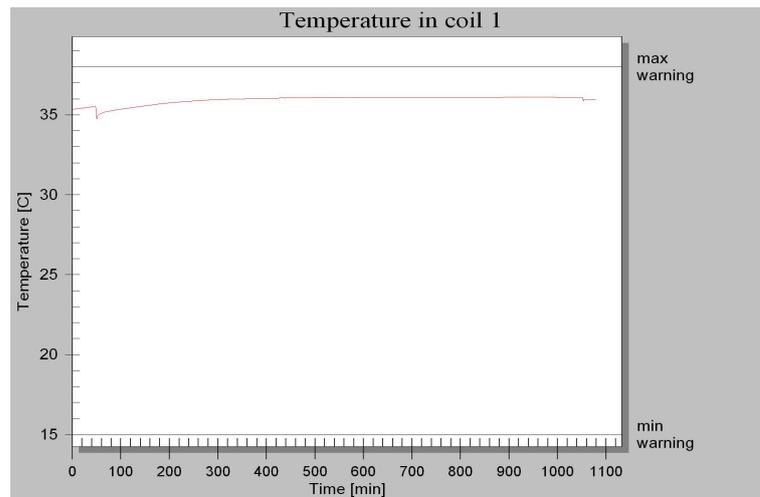
  

Description	Coil 1	Coil 2	Unit
Field	ON	OFF	
B $\pm$ SD (during exposure)	1.002 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	[mT]
B (Min, Max) (during exposure)	1.002 , 1.002	0 , 0	[mT]
T $\pm$ SD	35.9 $\pm$ 0.259	35.63 $\pm$ 0.266	[C°]
T (Min, Max)	34.73 , 36.1	34.57 , 35.84	[C°]
deltaT $\pm$ SD	0.26 $\pm$ 0.018	0.26 $\pm$ 0.018	[C°]
deltaT (Min, Max)	0.04 , 0.39	0.04 , 0.39	[C°]
Fan current $\pm$ SD	0.6 $\pm$ 0.026	0.587 $\pm$ 0.053	[A]

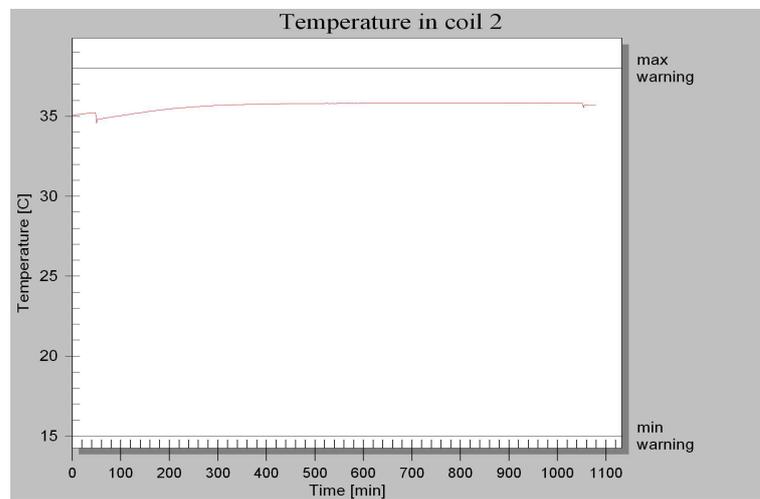
  

Event	#
Warnings	0
Abortion	0

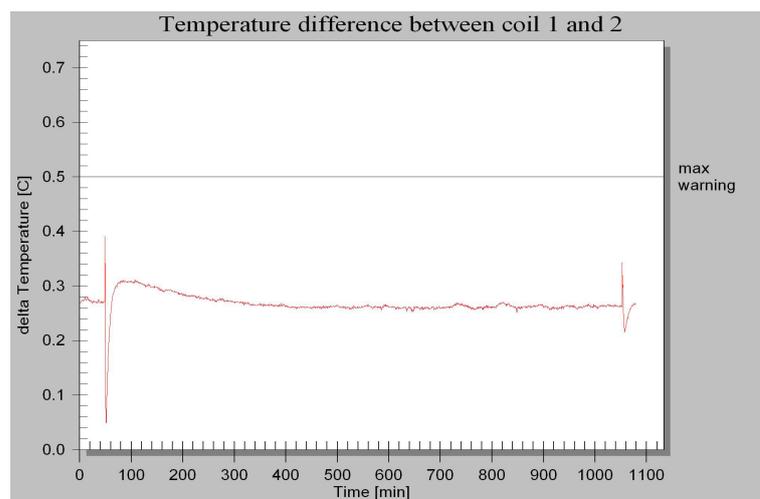
Abbildung E.1: Messparameter der ELF-EMF Exposition



a) Temperatur in Box 1



b) Temperatur in Box 2



c) Temperaturdifferenz zwischen Box 1 und 2

Abbildung E.2: Temperaturverlauf während der ELF-EMF-Applikation

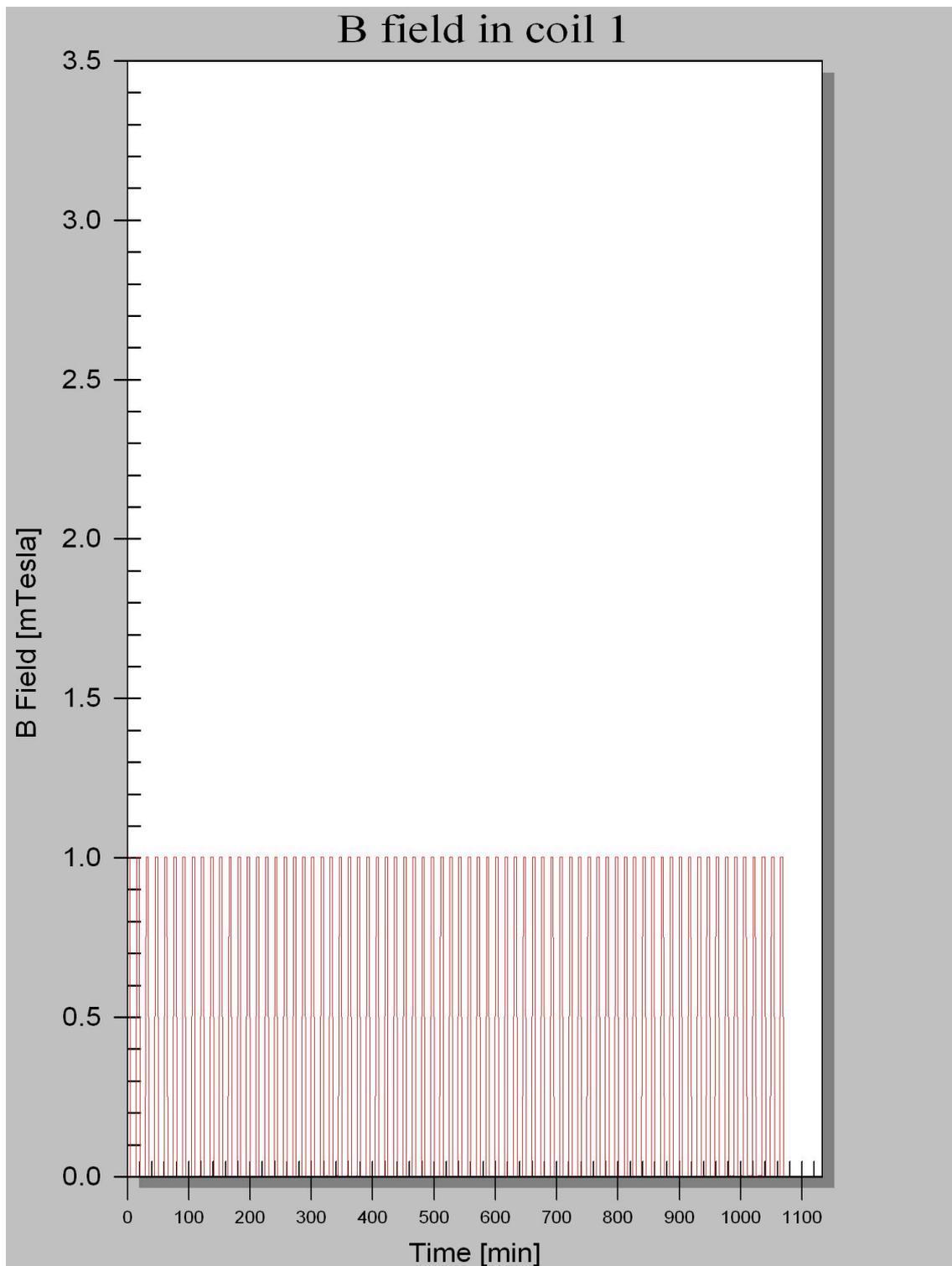
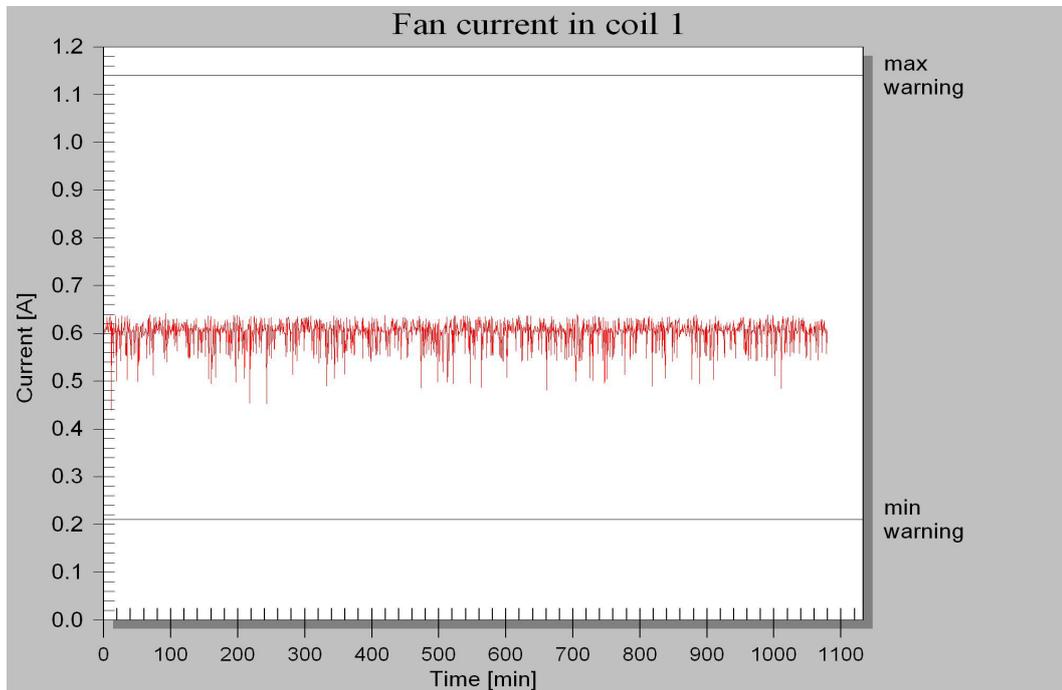
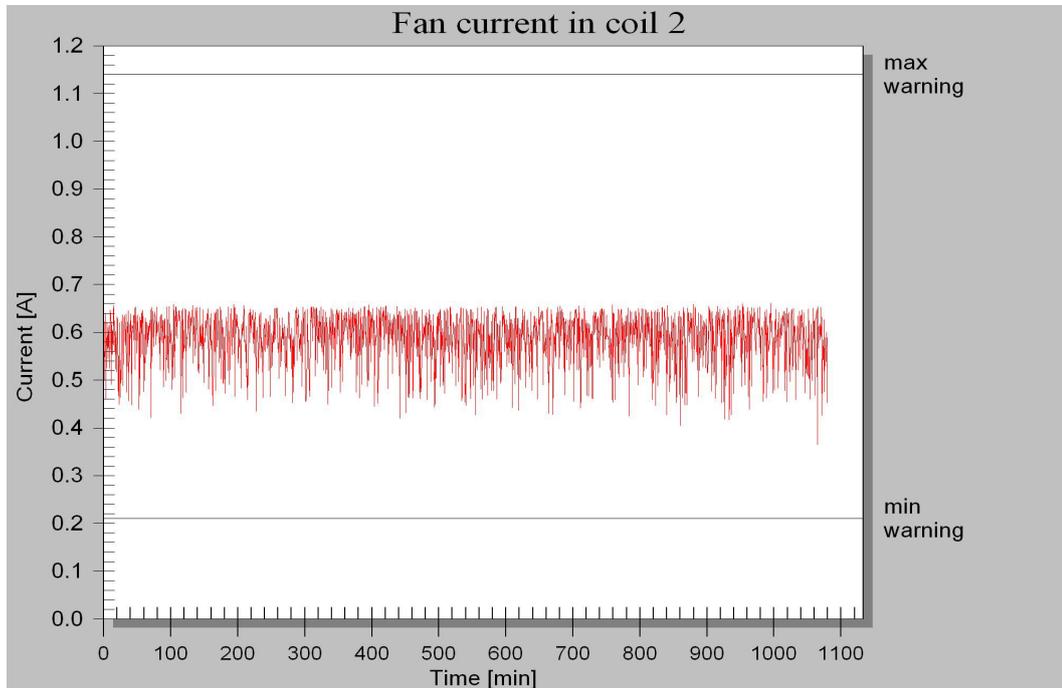


Abbildung E.3: Magnetfeldinduktion in Box 1



a) Strom des Lüfters in Box 1



b) Strom des Lüfters in Box 2

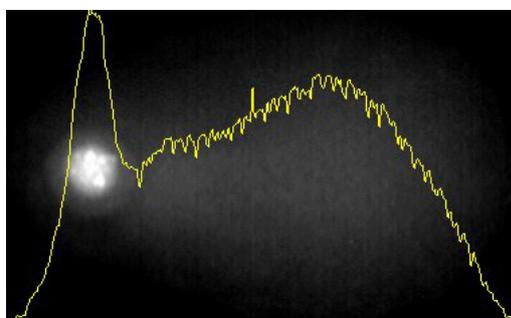
**Abbildung E.4:** Stromverlauf der Lüfter während der ELF-EMF-Applikation

## F Definition der Parameter des Bildanalyseprogramms *CometScore<sup>TM</sup>*

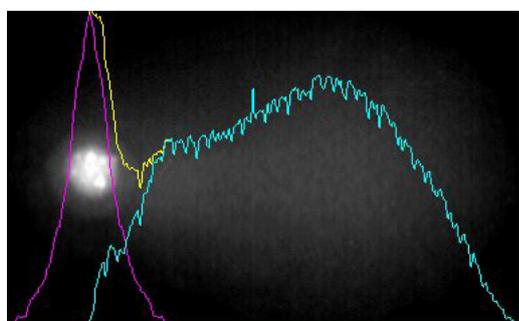
Bei diesem Programm werden die Cometen markiert und der Mittelpunkt seines Kopfes festgelegt (Abb. F.1 a)). Das Profil des Cometen errechnet sich aus der spaltenweisen Summierung der einzelnen Pixelintensitäten des Cometenbildes (gelbe Kurve in Abbildung F.1 b)). Durch die Spiegelung der ansteigenden Flanke des Cometenprofils am Zentrum des Cometen-Kopfes ergibt sich das Kopfprofil (rote Kurve Abb. F.1 c)). Die Subtraktion der Kopfprofilkurve von der Kurve des Cometenprofils ergibt das Tailprofil (blaue Kurve). Mit der Annahme, dass die DNA-Verteilung im Cometen mit den Intensitätswerten der Pixel des Bildes proportional ist, werden die in Abbildung F.1 d) dargestellten Parameter berechnet. Das für diese Arbeit verwendete Tailmoment (TM) ergibt sich aus dem Produkt des prozentualen Anteils der DNA im Tail ( $DNA_T$ ) mit der Länge des Tails ( $L_T$ ) (s. Gleichung F.1)



a) Cometmarkierung



b) Comet-Intensitätsprofil



c) Intensitätsprofile: Comet- (gelb), Kopf- (rot) und Tail-Intensitätsprofil (blau)

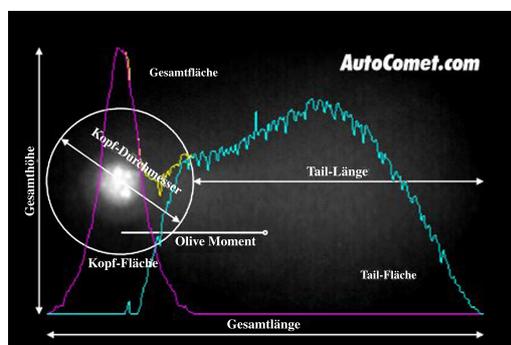
d) Parameterdefinition (*CometScore<sup>TM</sup>*)

Abbildung F.1: *CometScore<sup>TM</sup>*, (www.autocomet.com, ©2006 TriTek Corp.)

$$TM = \% DNA_T \times L_T \quad (F.1)$$

$$L_T = L_C - L_H = N_{C_x} - N_{H_x} \quad (F.2)$$

$$\% DNA_T = 100 \times I_T \div I_C = 100 \times \sum I_{T(x,y)} \div \sum I_{C(x,y)} \quad (F.3)$$

---



---

TM	Tailmoment
DNA <sub>T</sub>	DNA im Tail
L <sub>T</sub>	Tail-Länge des Cometen
L <sub>C</sub>	Länge des Cometen
L <sub>H</sub>	Kopfdurchmesser des Cometen
I <sub>C</sub>	Gesamtintensität des Cometen
I <sub>T</sub>	Gesamtintensität des Tails
I <sub>C(x,y)</sub>	Intensitätswert des Pixels an der Stelle (x,y) des Cometen
I <sub>T(x,y)</sub>	Intensitätswert des Pixels an der Stelle (x,y) des Tails
N <sub>C<sub>x</sub></sub>	Anzahl der Pixel in horizontaler Richtung des Cometen
N <sub>H<sub>x</sub></sub>	Anzahl der Pixel in horizontaler Richtung des Kopfes

---



---

## G Physikalische Einheiten und Konstanten

### Physikalische Einheiten:

Größe	Formelzeichen	Einheit	Einheitenzeichen
Frequenz	$f$	Hertz	Hz
elektrische Kapazität	C	Farad	F
elektrischer Leitwert	G	Siemens	S
elektrische Leitfähigkeit	$\sigma$		S/m
elektrische Feldstärke	E		V/m
elektrische Spannung	U	Volt	V
elektrische Stromstärke	I	Ampère	A
elektrischer Widerstand	R	Ohm	$\Omega$
Energie	E	Elektronenvolt	eV
Länge	l	Meter	m
	s	Ångström	$1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$
magnetische Feldstärke	H		A/m
magnetischer Fluss	$\Phi$	Weber	Wb
magnetische Flussdichte	B	Tesla	T
Masse	m	Kilogramm	kg
	m	unit	u
	m	Dalton	$1 \text{ Da} = 1 \text{ u}$
Stoffmenge	$\eta$	Mol	mol
Temperatur	T	Kelvin	K
Celsius-Temperatur	t	Celsius	$^{\circ}\text{C}$
Zeit	t	Sekunde	s

### Konstanten:

Größe	Formelzeichen	Wert	Einheitenzeichen
Avogadro-Konstante	$N_A$	$6,022\ 141\ 79 \cdot 10^{23}$	$\text{mol}^{-1}$
Boltzmann-Konstante	$k$	$1,380\ 650\ 4 \cdot 10^{23}$	$\text{JK}^{-1}$
Elementarladung	$e$	$1,602\ 176\ 487 \cdot 10^{-19}$	C
Faraday-Konstante	F	96 485,339 9	$\text{Cmol}^{-1}$
Molare Gas-Konstante	R	8,314 472	$\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$
Planck'sches Wirkungs-quantum	$h$	$4,135\ 667\ 43 \cdot 10^{-15}$	eVs
Vakuumlichtgeschwindigkeit	c	299 792 458	ms

### Einheiten-Vorsätze:

Zeichen	Name	Potenz	Zeichen	Name	Potenz
Y	Yotta	$10^{24}$	d	Dezi	$10^{-1}$
Z	Zetta	$10^{21}$	c	Zenti	$10^{-2}$
E	Exa	$10^{18}$	m	Milli	$10^{-3}$
P	Peta	$10^{15}$	$\mu$	Mikro	$10^{-6}$
T	Tera	$10^{12}$	n	Nano	$10^{-9}$
G	Giga	$10^8$	p	Piko	$10^{-12}$
M	Mega	$10^6$	f	Femto	$10^{-15}$
k	Kilo	$10^3$	a	Atto	$10^{-18}$
h	Hekto	$10^2$	z	Zepto	$10^{-21}$
da	Deka	$10^1$	y	Yokto	$10^{-24}$

# Abkürzungsverzeichnis

$\varnothing$	Durchmesser
<i>A/D – Wandler</i>	Analog-Digital-Wandler
<i>Abb.</i>	Abbildung
<i>ATP</i>	Adenosintriphosphat
<i>bzw.</i>	beziehungsweise
<i>ca.</i>	circa
<i>CAP</i>	Catabolite Activator Protein (Katabolit-Aktivatorprotein)
<i>CCD</i>	charge coupled device
<i>CHO</i>	Chinese Hamster Ovary
<i>CTP</i>	Cytidintriphosphat
<i>DEPC</i>	Diethylpyrocarbonat
<i>DMEM – F12</i>	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium F-12 Ham
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>DNA</i>	deoxyribonucleic acid (DNS - Desoxyribonukleinsäure)
<i>DNS</i>	Desoxyribonukleinsäure (DNA - deoxyribonucleic acid)
<i>DSB</i>	double strand break
<i>ELF</i>	extrem niedrige Frequenz (Extremely Low Frequency)
<i>EMF</i>	Elektromagnetisches Feld (Electromagnetic Field)
<i>EtOH.</i>	Ethanol
<i>Fa.</i>	Firma
<i>FCS</i>	fötales Kälber Serum (Fetal Calf Serum)
<i>Fura2 – AM</i>	Fura-2 pentakis[acetoxymethyl)ester
<i>GC – FSHR</i>	granulosa cells-follicle stimulating hormone receptor
<i>Gl.</i>	Gleichung
<i>GTP</i>	Guanosintriphosphat
<i>HeLa</i>	Henrietta Lacks

<i>Hepes</i>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<i>IVT</i>	<i>in vitro</i> Transkription
<i>LM</i>	Low Melting
<i>MES</i>	2 Morpholinoethanesulfonic acid
<i>NM</i>	Normal Melting
<i>nm</i>	Nanometer
<i>PBS</i>	Phosphate Buffered Saline
<i>rpm</i>	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>S.</i>	Seite
<i>s.</i>	siehe
<i>SACC</i>	mechanosensitiver Kationen-Kanal (stretch activated cation channel)
<i>SCGE</i>	Einzel - Zell - Gel - Elektrophorese (single cell gel electrophoresis)
<i>sd</i>	standard deviation (Standardabweichung)
<i>SDS</i>	Natriumdodecylsulfat
<i>sem</i>	standard error of the mean (Standardfehler)
<i>SSB</i>	single strand break
<i>Tab.</i>	Tabelle
<i>TEVC</i>	Two Electrode Voltage Clamp (Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik)
<i>Tris</i>	Trishydroxymethylaminomethan
<i>u. a.</i>	unter anderem, und andere
<i>UTP</i>	Uridintriphosphat
<i>UV</i>	ultraviolett
<i>w/v</i>	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
<i>z. B.</i>	zum Beispiel

# Abbildungsverzeichnis

1.1.1	Elektromagnetische Welle . . . . .	3
1.1.2	Elektromagnetisches Spektrum (Quelle: Bundesamt für Strahlenschutz, Deutschland; <a href="http://www.bfs.de">www.bfs.de</a> ) . . . . .	5
1.2.1	Die Grenzwerte 26. BImSchV für Hoch- und Niederfrequenzanlagen in Deutschland (26.BImSchV, 1996) . . . . .	7
1.3.1	Modell von Gap Junctions in der Plasmamembran (modifiziert nach <a href="http://psyche.knu.ac.kr/notebook/ns/ns_synaptic_transmission.htm">http://psyche.knu.ac.kr/notebook/ns/ns_synaptic_transmission.htm</a> ) 10	
1.4.1	Membrantopologie des Connexins (modifiziert nach Li und Herlyn (2000)) . . . . .	11
1.4.2	Mögliche Connexin-Anordnungen zu Connexonen und Gap Junctions (modifiziert nach (Meşe et al., 2007)) . . . . .	12
1.4.3	Mögliche Mechanismen zur Connexin Veränderung bei Tumorgeneese (modifiziert nach Chipman et al. (2003)) . . . . .	14
2.1.1	Schematischer Ablauf des Comet Assays . . . . .	18
2.1.2	Klasseneinteilung des Comet Assays nach Anderson et al. (1994). ( <a href="http://www.egms.de">www.egms.de</a> ) . . . . .	21
2.1.3	Parameterdefinition <i>CometScore</i> <sup>TM</sup> ( <a href="http://www.autocomet.com">www.autocomet.com</a> , ©2006 Tri-Tek Corp.) . . . . .	22
2.2.1	Schalenanordnung im ELF-EMF Aufbau . . . . .	23
2.2.2	cRNA-Injektion . . . . .	26
2.3.1	Fura-2-AM . . . . .	27
2.3.2	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme . . . . .	29
2.3.3	TEVC - Messplatzaufbau . . . . .	30

2.3.4	Spannungspulsprotokoll A und repräsentative Stromantwort zu A . . . . .	32
2.3.5	Spannungspulsprotokolle B und C . . . . .	33
2.3.6	Repräsentative Stromantworten zu den Spannungspulsprotokollen B und C . . . . .	33
2.3.7	Strom- und relative Leitwert-Spannungs-Kurve zum Spannungspulsprotokoll A . . . . .	35
2.3.8	Aktivierung / Deaktivierung von Halbkanal-Strömen . . . . .	37
2.3.9	Strom- und relative Leitwert-Spannungs-Kurve zum Spannungspulsprotokoll B . . . . .	37
2.3.10	Ansicht der ELF-EMF-Anlage (IT'IS Foundation, ETH Zürich, Schweiz) . . . . .	39
3.1.1	Spannungspulsprotokoll zur Analyse von in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten exprimierten hCx26-ASCx38 Halbkanälen mit der TEVC . . . . .	43
3.1.2	Stromamplituden von hCx26-ASCx38- und ASCx38-Oozyten . . . . .	44
3.1.3	Strom-Spannungs-Kurven von hCx26-ASCx38- und ASCx38-Oozyten . . . . .	45
3.1.4	Vergleich der Stromantworten auf Spannungspulse während der Applikation verschiedener Temperaturen von hCx26-ASCx38- und ASCx38-Oozyten in Ca <sup>2+</sup> -freiem Badmedium . . . . .	46
3.1.5	Leitfähigkeitskurven (G) von hCx26-ASCx38-Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	47
3.1.6	Relative Leitfähigkeitskurven (G <sub>rel</sub> ) von hCx26-ASCx38-Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	48
3.1.7	Strom-Spannungs-Kurven (I <sub>red</sub> (U)) von hCx26-ASCx38-Oozyten in Abwesenheit von Ca <sup>2+</sup> und in Gegenwart von 5 mM Ca <sup>2+</sup> bei zwei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	49

3.1.8	Einfluss von Erwärmungs- und Kühlungszyklen auf die hCx26-ASCx38- und ASCX38-Oozyten in Gegenwart / Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	50
3.1.9	Vergleich der Stromantworten auf Spannungspulse während der Applikation verschiedener Temperaturen von rCx46 exprimierten und nicht-injizierten (Kontroll) Oozyten in $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Badmedium . . . . .	53
3.1.10	Leitfähigkeitskurven (G) von rCx46 exprimierten-Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	54
3.1.11	Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von rCx46 exprimierten-Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	55
3.1.12	Strom-Spannungs-Kurven ( $I_{red}(U)$ ) von rCx46 exprimierten <i>Xenopus laevis</i> Oozyten in Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ und in Gegenwart von 5 mM $\text{Ca}^{2+}$ bei zwei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	56
3.1.13	Leckstrom-Mittelwerte von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition	59
3.1.14	Leckstrom-Mittelwerte von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (mit $-1 \mu\text{A} < I_{Leck} < 0 \mu\text{A}$ ) . . . . .	60
3.1.15	Leckstrom-Mittelwerte von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition an verschiedenen Messtagen . . . . .	62
3.1.16	Leckstrom-Mittelwerte von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition an verschiedenen Messtagen (mit $-1 \mu\text{A} < I_{Leck} < 0 \mu\text{A}$ ) . . . . .	63
3.1.17	Amplitudenmittelwerte von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF-Exposition (50 Hz (powerline), 2,3 mT, 16 h) . . . . .	64
3.1.18	Amplitudenmittelwerte von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF-Exposition (50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . . . . .	65
3.1.19	Amplitudenmittelwerte von rCx46 exprimierten <i>Xenopus laevis</i> Oozyten nach ELF-EMF-Exposition (50 Hz, 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . . . . .	65

3.1.20	Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz (powerline), 2,3 mT, 16 h) . . . . .	66
3.1.21	Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . . .	67
3.1.22	Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . .	67
3.1.23	Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz (powerline), 2,3 mT, 16 h) . . . . .	68
3.1.24	Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . . . . .	69
3.1.25	Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . . . . .	69
3.1.26	Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz (powerline), 2,3 mT, 16 h) . . . . .	71
3.1.27	Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h)) . . . . .	71
3.1.28	Relative Leitfähigkeitskurven ( $G_{rel}$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h)) . . . . .	72
3.1.29	Aktivierungszeiten ( $\tau_1, \tau_2$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz (powerline), 2,3 mT, 16 h)) . . . . .	73
3.1.30	Aktivierungszeiten ( $\tau_1, \tau_2$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h)) . . . . .	73
3.1.31	Aktivierungszeiten ( $\tau_1, \tau_2$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . . . . .	74
3.1.32	Deaktivierungszeiten ( $\tau$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz (powerline), 2,3 mT, 16 h) . . . . .	75

3.1.33	Deaktivierungszeiten ( $\tau$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . . . . .	75
3.1.34	Deaktivierungszeiten ( $\tau$ ) von rCx46-Oozyten nach ELF-EMF Exposition (50 Hz, 2,3 mT, (5 min an / 10 min aus), 16 h) . . . . .	76
3.2.1	Analyse der DNA-Migration aus verschiedener im Comet Assay Zelllinien nach Induktion eines ELF-EMF (16 2/3 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus)) über unterschiedliche Expositionszeiten. . . . .	78
3.2.2	Alkalischer Comet Assay: Tailfaktor von (GFSHR-17)-Zellen, ELF-EMF: 1 mT; 16 2/3 Hz; (5 min an / 10 min aus); 12-20 h . . . . .	79
3.2.3	Alkalischer Comet Assay: Tailfaktor von (GFSHR-17)-Zellen, ELF-EMF: 1 mT; 18 h; (5 min an / 10 min aus); 8, 16 2/3 und 50 Hz, . . . . .	80
3.2.4	Alkalischer Comet Assay: Tailfaktor von (GFSHR-17)-Zellen, ELF-EMF: 1000 Hz; (5 min an / 10 min aus); 18 h; 20 $\mu$ T und 0.6 mT . . . . .	81
3.2.5	Alkalischer Comet Assay: Relatives Tailmoment von (GFSHR-17)-Zellen, ELF-EMF: 1 mT; (5 min an / 10 min aus); 18 h; 8, 16 2/3, 30, 50, 300 und 500 Hz . . . . .	82
3.2.6	Neutraler Comet Assay: Tailfaktor von (GFSHR-17)-Zellen, ELF-EMF: 1 mT, 18 h, 8 - 300 Hz . . . . .	83
3.2.7	Neutraler Comet Assay: Relatives Tailmoment von (GFSHR-17)-Zellen, ELF-EMF: 1 mT, 18 h, 8 - 500 Hz . . . . .	84
3.3.1	Zeitlicher Verlauf des $[Ca^{2+}]_i$ von Fibroblasten nach einer unterbrochenen ELF-EMF-Exposition von 50 Hz (sinus), (5 min an / 10 min aus) über 11 h und 15 h . . . . .	86
3.3.2	$[Ca^{2+}]_i$ Mittelwert über zehn Minuten nach ELF-EMF-Exposition: (50 Hz (5 min an / 10 min aus), 1 mT, 7 - 17 h) . . . . .	87
3.3.3	Zusammenfassung der aus den Fibroblasten- und Granulosa-Zellen gewonnenen $[Ca^{2+}]_i$ Daten nach einer ELF-EMF-Exposition: (50 Hz (5 min an / 10 min aus), 1 mT) . . . . .	88

3.3.4	Zusammenfassung der aus den Fibroblasten- und Granulosa-Zellen gewonnenen $[Ca^{2+}]_i$ Daten nach einer ELF-EMF-Exposition: (50 Hz (5 min an / 10 min aus), 1 mT )und 30 mM KCl (bzw. 200 $\mu$ M $H_2O_2$ ) Applikation . . . . .	89
4.3.1	Relativen Volumenänderung von Granulosa-Zellen (GFSHR-17) während der Inkubation in einer hypotonischen Lösung nach einer ELF-EMF Exposition (18 h, 50 Hz, 1 mT, (5 min an / 10 min aus) . . . . .	104
D.1	ClustalW-Alignment von hCx26 (Homo sapiens, NP_003995) mit rCx46 (Rattus norvegicus, NP_077352) . . . . .	XIII
E.1	Messparameter der ELF-EMF Exposition . . . . .	XIV
E.2	Temperaturverlauf während der ELF-EMF-Applikation . . . . .	XV
E.3	Magnetfeldinduktion in Box 1 . . . . .	XVI
E.4	Stromverlauf der Lüfter während der ELF-EMF-Applikation . . . . .	XVII
F.1	Parameterdefinition <i>CometScore<sup>TM</sup></i> , (www.autocomet.com, ©2006 TriTek Corp.) . . . . .	XVIII

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Albert Kolb danke ich für die hervorragende, freundliche Betreuung, seine richtungsweisenden Ideen und die hilfreiche stets interessierte Begleitung bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Frau Prof. Dr. Angelika Anders danke ich für ihre herzliche und freundliche Unterstützung sowie für ihr großes Interesse am Fortgang und Gelingen dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Carsten Zeilinger danke ich dafür, dass er immer für mich da war und mir bei meiner Arbeit zur Seite stand. Vielen Dank für das Interesse und die Hilfe, die für eine erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit unerlässlich war. Auch danke ich für die Geschichten, die mich zum Schmunzeln gebracht haben, besonders mochte ich die Geschichte über den mobilen *Phocoena phocoena*...

Herrn Prof. Dr. Rolf Michel danke ich für seine Bereitschaft zur Prüfungsübernahme und seine freundliche Unterstützung der Disputation. Insbesondere danke ich für sein Interesse und die fachlichen Anregungen zu dem Thema dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Anaclet Ngezahayo danke ich für die zahlreichen anregenden Diskussionen rund um die Forschung sowie für sein Lachen, das es bestimmt kein zweites Mal gibt.

Allen Mitgliedern des Instituts für Biophysik und des Zentrums für Strahlenschutz und Radioökologie möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft, wertvollen Tipps und Diskussionen danken. Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Lütcke bedanken für seine hilfreiche Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern aus der Werkstatt, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen und eine Lösung für meine Wünsche hatten.

Heidi Bliedung gilt mein Dank für die Hilfe bei den Comet Assay Versuchen, es war wirklich schön dem dunklen Keller zu entfliehen. Auch geht mein Dank an sie für die kleinen „süßen Dinge“, die es bei ihr gibt.

Andrea Lika-Gerbing gilt mein Dank für ihre Hilfe bei manch komplizierten Verwaltungsangelegenheiten und dass sie immer ein liebes Wort und ein freundliches Lächeln für mich hatte.

Ingrid Buchwald danke ich, dass sie jederzeit für meine Anliegen da war und mich bei meiner Arbeit unterstützt hat. Danke für die Hilfe bei so mancher Lösung und den „kleinen“ Fröschen sowie für die lustigen Gespräche, die wir im Büro führten.

Damit möchte ich auch Harald Hake und Ilona Wesoly einschließen, die auch außerhalb des Instituts ein offenes Ohr für mich hatten. Ilona danke ich für das letzte Jahr, es ist wirklich schön mit dir in einer WG. Und Harry: ich vermisse ein wenig Farbe im Büro.

Tobias Gaul und Sabrina Schlie danke ich für die netten Pausen, die ich hatte und die anregenden Gespräche, die wir dabei führten. Nicht unbedingt wissenschaftliche Themen, aber immer interessant.

Mein Dank geht auch an Thilo Reeck, der mich viele Jahre begleitet hat. Ein „Danke schön“ möchte ich ebenfalls an seine Eltern richten, die immer ein nettes Wort oder eine Aufmunterung für mich hatten.

Danke auch an Frank Leisten und Oliver Enders, die mit mir die „letzten ihrer Art“ im IfB sind/waren und gerne ein nettes Gespräch mit mir geführt haben.

Bala möchte ich danken dafür, dass er so herzlich und freundlich ist und immer um mein Wohl besorgt war, außerdem mag ich Flughäfen.

Elke und Janeke Mahr sowie Fenja Wiechmann danke ich für die netten Abende, die ich wirklich genossen habe.

Maike Keuntje und Ralf Pätzold danke ich für die schöne Zeit, in der wir zusammen gearbeitet haben und für die Treffen nach dem „IfB“. Insbesondere Maike für die lieben Aufmerksamkeiten und netten Gespräche.

Thomas Kilian danke ich für die lange Zeit, die wir uns kennen und schon Freunde sind sowie für die Korrekturen in letzter Minute.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie: Meinen Eltern, die jederzeit für mich da waren und immer um mein Wohl bedacht. Meiner „kleinen“ Schwester Sandi, die so lieb war meine Arbeit Korrektur zu lesen und sich stets Sorgen um mich gemacht hat. Rolfi und Gundi sowie Dieter und Kati, möchte ich Danke sagen. Ich glaube ich kenne Keinen, der nicht mit mir tauschen würde, um euch als Tanten und Onkels zu haben. Meinem Freund Mark Winkelaar danke ich für die liebevolle Unterstützung und Zuwendung sowie seiner Familie, die mich so herzlich aufgenommen haben. Dank je wel!

Hiermit sage ich allen Danke, die mich in den letzten Jahren begleitet haben.



# Publikationen

## Publikationen

Ngezahayo, A., Altmann, B., Steffens, M. und Kolb, H.-A. (2005). *Gap junction coupling and apoptosis in GFSHR-17 granulosa cells*. The Journal of Membrane Biology, 204(3):137-144.

Pilger, A., Ivancsits, S., Diem, E., Steffens, M., Kolb, H.-A. und Rüdiger, H. W. (2004). *No effects of intermittent 50 Hz EMF on cytoplasmic free calcium and on the mitochondrial membrane potential in human diploid fibroblasts*. Radiation and Environmental Biophysics, 43(3):203-207.

Steffens, M., Göpel, F., Ngezahayo, A., Zeilinger, C., Ernst, A. und Kolb, H.-A. (2008). *Regulation of connexons composed of human connexin26 (hCx26) by temperature*. submitted to Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.

Zeilinger, C., Steffens, M. und Kolb, H.-A. (2005). *Length of C-Terminus of rCx46 influences oligomerization and hemichannel properties*. Biochimica et Biophysica Acta, 1720(1-2):35-43.

## Poster

Pilger, A., Ivancsits, S., Diem, E., Steffens, M., Kolb, H.-A. und Rüdiger, H. W. *Intermittierende Belastung mit 50 Hz ELF-EMF bewirkt keine Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials und freien Kalziums in humanen Fibroblasten*. Gemeinsame wissenschaftliche Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V., Innsbruck, Österreich (April 21-24, 2004)

Steffens, M., Göpel, F., Ngezahayo, A., Ernst, A., Kolb, H.-A. und Zeilinger, C. *Voltage and temperature trigger gating of the human connexin hCx26*, The GRC Conference on „Ligand recognition and molecular gating“, Gordon Conference Il Ciocco, Lucca (Barga), Italy (Jun. 11.-16. 2006)

Steffens, M., Weninger, G. und Zeilinger, C. *Temperature-dependent modulation of hCx26 -hemichannels*. International Gap Junction Conference 2007, Elsinore, Denmark (August 4-9, 2007)

## **Vorträge**

*Regulation of connexons composed of human connexin26 (hCx26) by temperature*

1. Symposium des Virtuellen Institutes für Biologische Strukturforschung (VIBS), Dortmund, Deutschland (April 27, 2007)

# Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

”Biophysikalische Untersuchungen zur Wirkung von niederfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Modulation und Funktion von Connexonen”

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 22. Januar 2008

Melanie Steffens