

***Paramecium biaurelia* im niederfrequenten Magnetfeld:  
Auswirkungen auf das Schwimmverhalten, die cAMP-,  
cGMP- und 5`-Methoxytryptamin-Konzentrationen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Manuela Wilczek

aus

Berlin

Bonn 2001

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referentin: PD Dr. Ruth Hemmersbach  
2. Referent: Prof. Dr. Wolfgang Alt  
Tag der Promotion: 20.08.2001

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	Was sind elektromagnetische Felder?	3
1.2	Wirkung von elektromagnetischen Feldern auf Lebewesen	6
1.2.1	Epidemiologische Untersuchungen und Tierversuche	7
1.2.2	Zelluläre Ebene	9
1.2.3	Melatonin	10
1.3	Der Einzeller <i>Paramecium</i> als Modellsystem – Ziele der Arbeit	12
1.3.1	Elektromotorische Kopplung	13
1.3.2	cAMP und cGMP	15
1.3.3	Melatonin und 5`-Methoxytryptamin	16
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>18</b>
2.1	Versuchsaufbau und Erzeugung des Magnetfeldes	18
2.2	Darstellung von durch ein Magnetfeld induzierten Strömungen	20
2.3	Versuchsorganismen, Haltungsbedingungen und Anreicherung	22
2.3.1	<i>Paramecium biaurelia</i>	22
2.3.2	Pawn-Mutante	22
2.3.3	Anreicherung	23
2.4	Versuchsdurchführung Verhalten	23
2.5	Versuchsauswertung Verhalten	24
2.6	Versuchsdurchführung Biochemie	26
2.7	Versuchsauswertung Biochemie	27
2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentrationen	28
2.7.2	Durchführung des cAMP Assays (FIA)	29
2.7.3	Durchführung des cGMP Assays (RIA)	29
2.7.4	Auswertung der FIA- und RIA-Daten	30
2.7.5	Durchführung des cGMP Assays (EIA)	31
2.8	Einsatz von Blockern und mechanische Reizung	32
2.8.1	Vortexen	32
2.8.2	IBMX	32
2.8.3	Koffein	33
2.9	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	33
2.9.1	Versuchsdurchführung	33
2.9.2	Aufbau der HPLC-Apparatur	35
2.9.3	Kalibrierung und Auswertung	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Verhalten	37
3.2	cGMP	40
3.3	cAMP	42
3.3.1	cAMP ohne Blocker	42

3.3.2	Positivkontrolle .....	44
3.3.3	IBMX.....	45
3.3.3.1	Verschiedene Konzentrationen und Einwirkzeiten von IBMX .....	45
3.3.3.2	Toxizität.....	46
3.3.4	cAMP mit IBMX.....	48
3.3.5	cAMP mit Koffein .....	52
3.4	Pawn-Mutante .....	53
3.4.1	Verhalten .....	53
3.4.2	cAMP .....	55
3.5	Melatonin und 5`-Methoxytryptamin .....	57
3.6	Abhängigkeit einer Reaktion vom Grundzustand .....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1	Verhalten .....	64
4.1.1	Linearitätsindex und Schimmgeschwindigkeit.....	64
4.1.2	Mögliche Ursachen der Verhaltensänderung durch das Magnetfeld .....	65
4.1.2.1	Änderung der Membranpermeabilität durch das Magnetfeld .....	65
4.1.2.2	Aktivierung intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Speicher .....	66
4.1.2.3	ATPasen und Proteinkinasen .....	68
4.2	Sekundäre Botenstoffe .....	70
4.2.1	cGMP .....	70
4.2.2	cAMP .....	71
4.2.3	Regulation des Kraftschlages durch cAMP/cGMP .....	73
4.2.4	cAMP/cGMP Grundlevel .....	74
4.2.5	cAMP und IBMX.....	75
4.2.6	cAMP und Koffein .....	78
4.2.7	Warum hängt eine Reaktion vom cAMP/cGMP Grundlevel ab?.....	78
4.3	Pawn-Mutante .....	79
4.4	Melatonin und 5`-Methoxytryptamin .....	80
4.4.1	Melatonin interagiert mit Ca <sup>2+</sup> und cAMP .....	82
4.4.2	Melatonin reguliert Calmodulin, Proteinkinase C und Ionenkanäle .....	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>89</b>
	Abkürzungen .....	109
	Abbildungsverzeichnis.....	110

# 1 Einleitung

Bioeffekte von elektromagnetischen Feldern sind seit den Versuchen von Galvani (1737-1798) in der Mitte des 18. Jahrhunderts eine ständige Quelle des Interesses von Wissenschaftlern. Natürliche elektrische und magnetische Felder, wie die Wärmestrahlung, das sichtbare Licht, ultraviolette Strahlung oder die Gamma-Strahlung, sind seit jeher Bestandteil der Umwelt des Menschen. Die technisch erzeugten Felder dagegen gehören erst seit kurzem zu den Einflüssen, denen der Mensch ausgesetzt ist, so daß eine Anpassung des Organismus nicht möglich war. Die öffentlichen Diskussionen gehen in Richtung möglicher schädlicher Auswirkungen von elektromagnetischen Feldern (= EMF), die durch unsere elektrische Stromversorgung und verschiedene Kommunikations- und Übertragungssysteme produziert werden.

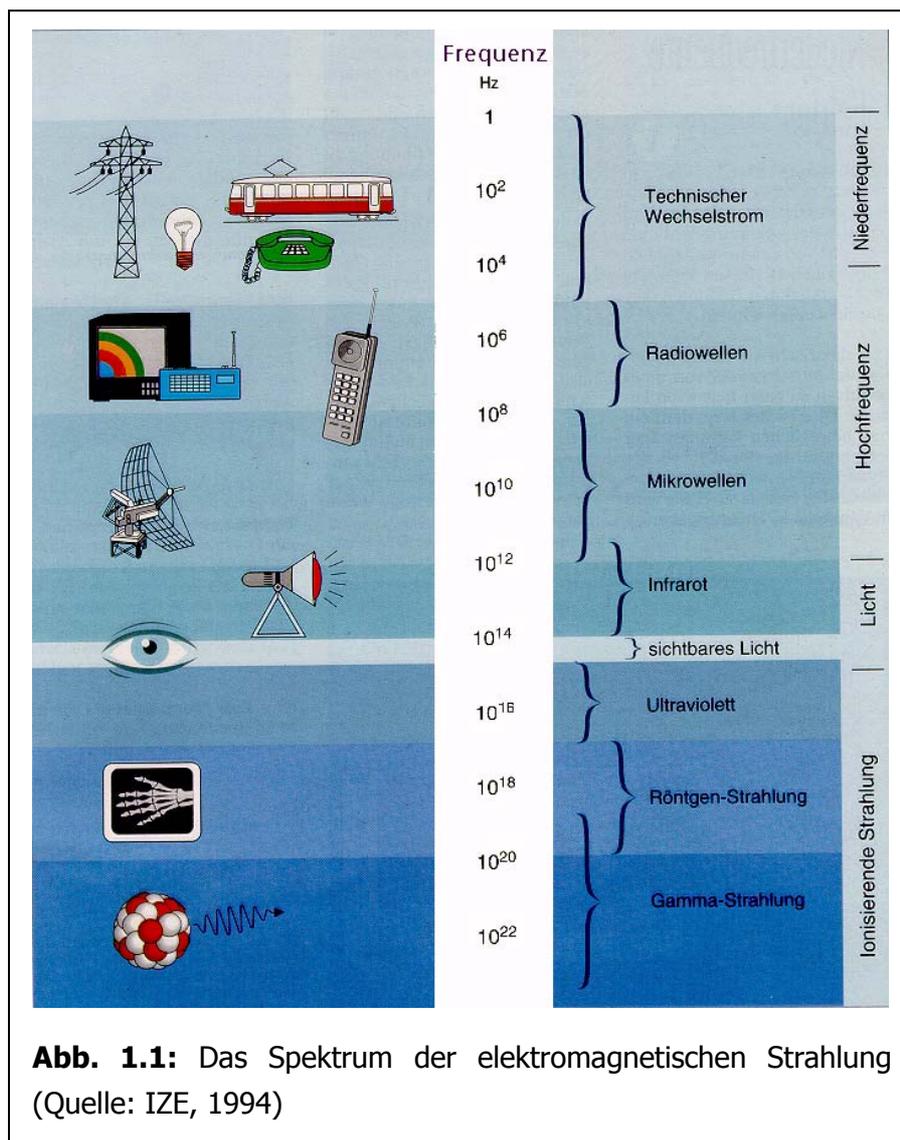
In dieser Arbeit soll am Modellsystem *Paramecium biaurelia* gezeigt werden, wo mögliche Ansatzpunkte für die Wirkung von Magnetfeldern auf zellulärer Ebene zu suchen sind. Versuche, die in den vergangenen zwei Jahrzehnten mit Zellen und Organismen durchgeführt wurden, dokumentieren die unterschiedlichsten Antworten auf EMF. Einerseits können EMF positive Auswirkungen auf den Menschen haben; stärkere nieder- und mittelfrequente Felder werden therapeutisch unter anderem zur Knochenheilung (Cané et al., 1993; Otter et al., 1998) oder in der medizinischen Diagnostik, z. B. bei der MRI (= Magnetic Resonance Imaging), genutzt. Doch andererseits weisen vor allem epidemiologische Studien, die den Zusammenhang zwischen schwachen EMF und geringer Zunahme von verschiedenen Krebsarten aufzeigen, auf ein Gesundheitsrisiko durch diese Felder hin (Savitz et al., 1988; London et al., 1991; Feychting und Ahlbom, 1993). Auch die Politik hat diese Gefahrenquelle erkannt und - beruhend auf empirischen und experimentellen Erkenntnissen - den Immissionsschutz gesetzlich geregelt (Verordnung über elektromagnetische Felder 26. BImSchV, 1.1.1997).

## 1.1 Was sind elektromagnetische Felder?

Im 19. Jahrhundert entwickelte James Clerk Maxwell (1831-1879) die sogenannten Maxwell'schen Gleichungen, die die Entstehung und Wirkung von elektromagnetischen Feldern erklären. Die Gleichung verknüpft elektrische und magnetische Phänomene miteinander und ermöglicht eine genaue Bestimmung der Stärke und Richtung dieser Kraft. Eine wichtige Aussage dieser Gleichungen ist: ein sich zeitlich änderndes elektrisches Feld erzeugt ein magnetisches Wirbelfeld, deren geschlossene Feldlinien die Ströme umkreisen und ein zeitlich änderndes magnetisches Feld erzeugt ein elektrisches Feld. Allerdings ist dieser Zusammenhang bei sich periodisch ändernden

Feldern der Frequenz proportional. Maxwell vermutete, daß sich diese gegenseitig induzierenden Felder in Wellenform ausbreiten können, ähnlich wie eine Kompression in einem Gas einen Druck erzeugt, der dann die Umgebung deformiert (elastische Wellen). Da es sich um elektrische und magnetische Felder handelt, nannte er diese Wellen "elektromagnetische Wellen". Die Ausbreitung dieser Transversalwellen ist nicht an ein Trägermedium gebunden. 1888 konnte Heinrich Hertz (1857-1894) erstmals diese elektromagnetischen Wellen experimentell nachweisen.

Bewertungskriterium für die Stärke der Felder ist die elektrische Feldstärke [V/m] und die magnetische Feldstärke [A/m] oder die magnetische Induktion (Magnetfeldflußdichte) in Tesla [T]. Die Einteilung der elektromagnetischen Wellen erfolgt nach der Frequenz und der Wellenlänge, deren Produkt die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle ergibt. Das Spektrum der elektromagnetischen Wellen erstreckt sich von  $10^{-3}$  Hz bis  $10^{25}$  Hz und  $10^7$  km bis  $10^{-17}$  m (**Abbildung 1.1**). EMF mit Frequenzen höher als



**Abb. 1.1:** Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung (Quelle: IZE, 1994)

3 Hz und weniger als 3000 Hz und der Wellenlänge  $10^{-7}$  km bis  $10^3$  km werden als extrem niederfrequente Felder bezeichnet (Leitgeb, 1990; ELF EMF = extremely low frequency electromagnetic fields), wobei diese Einteilung durch verschiedene Autoren uneinheitlich sein kann. In diesen Bereich fallen auch die Wechselfelder, die durch das öffentliche Wechselstromnetz erzeugt werden, dessen Frequenz in Europa 50 Hz beträgt sowie die Frequenzen des Wechselstroms von Bahnen mit  $16\frac{2}{3}$  Hz.

Die wichtigsten Quellen von niederfrequenten Feldern sind:

- Induktionsöfen, maximal 70 mT
- Schweißmaschinen, maximal 13 mT
- Freileitungen, maximal 10-50  $\mu$ T
- Kabel, maximal ca. 20  $\mu$ T
- Transformatoren, z. T. über 20 mT (hängt stark von der Leistung und Konstruktion der Stromleiter ab)
- Bildschirmarbeitsplatz (30 cm Entfernung), maximal einige  $\mu$ T
- Elektrogeräte im Haushalt, direkt an der Oberfläche: bis 1 mT, in 1 m Entfernung maximal 0,01–0,1  $\mu$ T
- Eisenbahn (beim Anfahren), 30–300  $\mu$ T
- Elektrodynamische Schwebesysteme ohne Abschirmung (bis 100 Hz), 1–10 mT
- EAS (Electronic Article Surveillance, 218 Hz), bis 1 mT, inhomogene Felder

Die magnetische Flußdichte direkt unter einer Freileitung beträgt bei halber Maximalleistung etwa 30  $\mu$ T (höchster zulässiger Wert nach der Bundesimmissionschutz-Verordnung von 1997 sind 100  $\mu$ T). In seitlicher Entfernung von 50 m zur Leitung fallen die Flußdichten auf nur noch 2-3  $\mu$ T ab. Bei Erdkabeln liegen die magnetischen Flußdichten im Abstand von 1 m je nach Strombelastung zwischen 5-10  $\mu$ T. Im Abstand von 5 m ist der Wert geringer als 1  $\mu$ T. Bei Haushaltsgeräten sind die Felder stark inhomogen, doch in 30 cm Abstand weist fast kein Gerät eine größere Flußdichte als 30  $\mu$ T auf (Gerthsen, 1974; Haas, 1988; Brinkmann, 1995; Brinkmann und Schaefer, 1996).

Biologische Systeme können stark von elektromagnetischen Feldern beeinflusst werden, wenn es sich um ionisierende Strahlung handelt. Die Energie dieser Strahlung ist so groß, daß sie die Abspaltung eines oder mehrerer Elektronen aus Atomen oder Molekülen bewirken können. Bei allen Feldern über  $10^6$  Hz findet eine solche Ionisierung der Materie statt, es ist hierfür eine Quantenenergie von ungefähr 5 bis 100 eV nötig. Strahlungen unterhalb dieser Frequenz bezeichnet man als nicht-ionisierende Strahlung. Nicht-ionisierende Strahlung enthält so wenig Energie, daß ihre

biologische Wirkung davon abhängt, wie viele Strahlenquanten pro Fläche gleichzeitig auftreffen (Leitgeb, 1990). Ein 50 Hz Wechselfeld besitzt nur eine Quantenenergie von  $2 \cdot 10^{-13}$  eV und liegt damit um etwa 13 Zehnerpotenzen unter dem zur Ionisierung nötigen Mindestwert. Die Auswirkungen dieser Felder auf biologische Systeme müssen also völlig anderer Natur als die der ionisierenden Strahlung sein. Durch die zeitliche Änderung eines magnetischen Flußes werden, wie oben beschrieben, elektrische Ströme induziert (auch in unserem Körper), die in geschlossenen Strombahnen verlaufen und als Wirbelströme bezeichnet werden. Die Wirbelströme sind um so stärker, je rascher die zeitliche Flußänderung erfolgt, sie nehmen daher mit steigender Frequenz zu. Das magnetische Feld ist ein quellenfreies Wirbelfeld, dessen Stärke mit dem Abstand zum Leiter abnimmt. Magnetische Felder ändern sich je nach Verbrauch von elektrischer Energie und sind daher starken Schwankungen unterworfen. Magnetische Feldlinien durchdringen bis auf Eisen oder eisenhaltige Metalle alle Materialien ungehindert und lassen sich daher nur schwer abschirmen. Anhand von Eisen kann auch nur dann effektiv abgeschirmt werden, wenn eine komplette Umschließung erfolgen kann, was daher nur mit erheblichem technischen Aufwand möglich ist (Genrich, 1984; Haas, 1988).

## **1.2 Wirkung von elektromagnetischen Feldern auf Lebewesen**

Niederfrequente Magnetfelder könnten geringe Änderungen in der Frequenz von Ereignissen von dynamischen biochemischen und biomechanischen Prozessen bewirken. Insbesondere Substanzen, die zwischen Zellen und Umgebung sowie innerhalb der Zelle durch Kanäle oszillieren, können hierfür anfällig sein (Grundler et al., 1992; Eichwald und Kaiser, 1995; Eichwald und Walleczek, 1996). Sowohl theoretische (Bezrukov und Vodyanoy, 1997; Galvanovskis und Sandblom, 1997) als auch biologische (Douglass et al., 1993; Collins et al., 1996) Studien unterstützen diese Hypothese der stochastischen Resonanz. Bei Versuchen zur Wirkungen von niederfrequenten EMF ( $< 100$  Hz) auf biologische Systeme treten im wesentlichen zwei Schwierigkeiten bei der Interpretation auf: erstens gibt es keine allgemein anerkannte biophysikalische Erklärung für die Wirkung von schwachen niederfrequenten EMF (Valberg et al., 1997) und zweitens ist die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Effekte schwierig. Es konnte bisher beobachtet werden, daß die Reaktion der Zellen auf einer Kombination der verschiedenen, nicht beeinflussbaren, internen biochemischen Parameter beruht, so daß bei gleicher Versuchsanordnung unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden können. Bei der Interpretation der Versuche ist zu beachten, daß Zustand und Alter der Zellkultur einen entscheidenden Einfluß auf die Reaktion auf das EMF haben (Cadossi et al., 1992). Die beobachteten Phänomene ließen außerdem keine einfache Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennen. Lineare

Abhängigkeiten der Reaktionen von der Intensität oder der Dauer der Exposition wurden selten gefunden. In einigen Versuchen wurden Fenstereffekte für Intensitäten oder Frequenzen beobachtet: die gefundenen Effekte sind bei höherer oder niedrigerer Stärke der Parameter nicht mehr zu erkennen (Grandolfo et al., 1991; Blackman et al., 1993a, b).

### **1.2.1 Epidemiologische Untersuchungen und Tierversuche**

Erste Hinweise auf eine Beeinflussung der Gesundheit durch niederfrequente EMF lieferten die Untersuchungen von Asanova und Rakov (1966), die bei Arbeitern in Hochspannungsanlagen Schlafstörungen und Schwindelanfälle feststellten. Wertheim und Leeper veröffentlichten aber erst 1979 und 1982 ausführliche epidemiologische Studien über die Wirkung von 60 Hz Feldern von Hochspannungsleitungen auf die Krebsentstehung besonders bei Kindern und Jugendlichen. Die Studien gaben Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Krebserkrankungen, besonders Leukämie, und der Exposition der 60 Hz EMF. Savitz et al. (1988) konnten diese Ergebnisse zwar im Grundsatz bestätigen, fanden aber weniger deutliche Hinweise auf die Leukämie verstärkende Wirkung der Felder. Feychting und Ahlbom (1993, 1994), die die bisher umfangreichsten Studien zum Zusammenhang zwischen Magnetfeldexposition und Krebsentstehung durchführten, konnten eine Tendenz zur vermehrten Krebsentstehung nachweisen. Nach neuen Berechnungen von Kaune et al. (1998) sollten die Studien von Feychting und Ahlbom (1993, 1994) allerdings erneut interpretiert werden, da es zu Schwankungen der Magnetfeldexposition zwischen Wochentagen im Gegensatz zum Wochenende kommt. Studien von Olsen et al. (1993) und Verkasalo et al. (1993) zeigten ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Leukämie durch Magnetfeldexposition. Eine Analyse von verschiedenen Studien (Meta-Studie) von Wartenberg (1998) führte zu dem Ergebnis, daß es Hinweise für ein erhöhtes Krebsrisiko gibt. Dagegen konnten Linet et al. (1997) und McBride et al. (1999) keinen Zusammenhang zwischen EMF und Krebsentstehung nachweisen. Die Daten zur Entstehung von chronischer lymphotischer Leukämie sind ebenfalls nicht eindeutig; in zwei Studien aus den USA konnte kein Effekt nachgewiesen werden (London et al., 1994; Savitz und Loomis, 1995), während Floderus et al. (1993), Thériault et al. (1994) und Feychting et al. (1997) einen Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und EMF finden konnten, wobei das Krebsrisiko mit steigender EMF Exposition zunimmt. Ebenso zeigten Studien von Minder und Pfluger (2001) einen signifikanten Anstieg der Todesfälle durch Leukämie bei Schweizer Bahnangestellten. Eine Studie von Schüz et al. (2001) demonstrierte nicht nur einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Leukämie bei Kindern in Deutschland und Magnetfeldexposition, sondern zeigte auch, daß hauptsächlich eine Beziehung zwischen der Krebsentstehung und einer nächtlichen Exposition besteht.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die epidemiologischen Studien Hinweise auf ein erhöhtes Krebsrisiko für den Menschen durch Magnetfeldexposition geben. Savitz (2001) gibt zu bedenken, daß weitere Studien ähnlicher Art, angesichts der großen Anzahl und hohen Qualität der bisher durchgeführten Studien zur EMF Exposition und Krebsentstehung, wahrscheinlich keine neuen Erkenntnisse bringen. Die stärksten Anzeichen für eine Gesundheitsschädigung durch niederfrequente EMF geben Beobachtungen, die zeigen, daß durch verstärkte Magnetfeldexposition zwei Formen von Krebs vermehrt in der Bevölkerung auftreten können: Leukämie bei Kindern und chronische lymphatische Leukämie bei Erwachsenen.

In den epidemiologischen Studien zeigen sich also Anhaltspunkte auf eine mögliche Beteiligung von EMF an der Entstehung von Krebserkrankungen, daher wurden zur Verifizierung dieser Effekte Versuchsreihen mit Mäusen und Ratten durchgeführt (Sasser et al., 1996; Shen et al., 1997), die 50 und 60 Hz Magnetfeldern von 1 mT ausgesetzt wurden. Es ließ sich keine Korrelation zwischen der Krebsentstehung und dem Feld nachweisen. Die umfangreichste Studie wurde von Babbitt et al. (1998) mit 2000 Mäusen über 30 Monate (bei 1400  $\mu$ T, 60 Hz) durchgeführt, auch hier ergab sich kein promotorischer Effekt des Magnetfeldes. Auch genetisch veränderte Mäuse, die eher zur Entwicklung von Leukämie neigen, zeigten keinen Zusammenhang zwischen niederfrequenten EMF und Leukämie auf (McCormick et al., 1998; Harris et al., 1998). In einer sehr großen Studie über 2 Jahre des National Toxicology Program (USA, 1998) konnte ebenfalls bei keiner der Gruppen von Ratten und Mäusen (2, 200 und 1000  $\mu$ T für 18,5 Stunden täglich ausgesetzt) eine krebserregende Wirkung von 60 Hz Feldern festgestellt werden. Mandeville et al. (1997) setzte weibliche Ratten schon 2 Tage vor ihrer Geburt kontinuierlich einem 60 Hz Magnetfeld (2, 20, 200, 2000  $\mu$ T) aus und ließ die neugeborenen Tiere dann noch weitere 20 Tage exponiert, auch hier zeigte sich keine karzinogene Wirkung des EMF auf die Jungtiere. Die gleichen Ergebnisse erzielten auch Yasui et al. (1997), die für 2 Jahre lang männliche und weibliche Ratten einem 50 Hz Magnetfeld von 500 und 5000  $\mu$ T für 22 Stunden pro Tag aussetzten und ebenfalls keine Unterschiede in der Krebsrate von exponierten und Kontrolltieren fanden. De Seze et al. (2000) fanden sogar eine Verminderung des Tumorstwachstums bei Mäusen durch Exposition eines Magnetfeldes von 0,8 Hz, 100 mT für 8 Stunden am Tag. Bei den Tierversuchen zeigt sich somit durchgehend keine karzinogene Wirkung der niederfrequenten Magnetfelder.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der epidemiologischen Studien und der Tierversuche lassen keine Aussage darüber zu, inwieweit niederfrequente EMF bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen. Nach dem heutigen Kenntnisstand kann davon ausgegangen werden, daß niederfrequente Magnetfelder keine Krebs initierende

Wirkung haben. Inwieweit die Magnetfelder aber bei der Krebs-Promovierung oder Co-Promovierung eine Rolle spielen ist noch offen. Um diese Frage zu klären, muß erforscht werden, inwiefern ein Magnetfeld zelluläre Vorgänge beeinflussen kann.

### **1.2.2 Zelluläre Ebene**

Am unmittelbarsten wäre ein Einfluß des Feldes auf das Erbgut. Die Daten zur Wirkung von EMF auf die DNS Replikation sind allerdings inhomogen. Es scheint aber, daß die DNS nicht signifikant verändert wird. Wenn EMF Exposition mit einer Erhöhung des Krebsrisikos verbunden ist, so zeigen die fehlenden genotoxischen Wirkungen, daß es sich eher um Tumor promovierende und nicht um Tumor initiiierende Prozesse handelt (Simkó et al., 1998; Trosko, 2000).

Daten aus verschiedenen Untersuchungen zu erhöhtem Transkriptionslevel für Heat-Shock-Proteine durch niederfrequente EMF (Goodman und Henderson, 1991; Pipkin et al., 1999; Junkersdorf et al., 2000) lassen vermuten, daß die Zelle EMF als einen Umweltstress erfährt, der biosynthetische Stressantworten stimulieren kann (Blank, 1995; Golfert et al., 2001). Goodman et al. (1993a, b) vermuten, daß direkte Transkriptionsänderungen innerhalb der ersten 4 Minuten der EMF Exposition stattfinden; die Transkripte, die auf das Feld reagieren, sind solche, die schon vor der Exposition in der Zelle expremiert wurden. Man kann also davon ausgehen, daß die Transkription an denjenigen Loci verstärkt wird, die schon bei Anfang der Einwirkung des EMF aktiv waren (Goodman et al. , 1983; Tuinstra et al., 1998; Heermeier et al., 1998). Auch Miyakoshi et al. (1999) und Walleczek et al. (1999) zeigten, daß bei menschlichen Zellen sowohl ein 50 Hz als auch ein 60 Hz Magnetfeld (400 mT) nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung zu einem Anstieg der Mutationsrate führte. Eine Einwirkung des EMF allein hatte dagegen keinen Effekt. Da es viele Wechselwirkungen zwischen Signaltransduktion und Onkogenen gibt, kann jeder Umwelteinfluß, der die Signaltransduktion in normalen Zellen verändert, in dafür anfälligen Zellen zu einer Interaktion mit krebspromovierenden Ereignissen führen (Luben, 1995).

Viele Theorien gehen davon aus, daß der primäre Wirkungsort des elektromagnetischen Feldes die Plasmamembran ist. Wichtig ist hierbei, ob sich die Zelle während der Magnetfeldexposition in einem aktivierten Zustand befindet, denn dann ist die Auswirkung des Feldes auf die Signaltransduktion stärker (Lindström et al., 1993; Löschinger et al., 1999). Es gibt hierbei verschiedene Möglichkeiten, wo das EMF eingreifen könnte (Luben, 1995):

1. Verstärkung und Weiterleitung des Signals ins Zellinnere durch **Sekundäre Botenstoffe**: Wegen der wichtigen physiologischen Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  und dessen Beziehung zu Membranpotentialänderungen war  $\text{Ca}^{2+}$  schon früh ein Gegenstand der Untersuchungen im Hinblick auf den Effekt von EMF. Änderungen der intra- und extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen konnten auch bei vielen EMF-Versuchen festgestellt werden (Lin-Liu und Adey, 1982; Blackman et al., 1985; Lindström et al., 1993; Ikehara et al., 1998).
2. Veränderung der Transporteigenschaften der **Membran**: Eine Abnahme der Membranfluidität und Durchlässigkeit der Membran (Aoki et al., 1990; Grandolfo et al.; 1991; Paradisi et al., 1993; Santoro et al., 1997; Ikehara et al., 1998), eine erniedrigte Hydrophobizität (Marron et al., 1988) und die Anhäufung von Intramembranproteinen (Bersani et al., 1997; z. B. Rezeptoren und Ionenkanäle) konnten unter der Einwirkung von EMF festgestellt werden. Viele Versuche dokumentieren Leitfähigkeitsänderungen bei Magnetfeldexposition durch Änderung der Transportraten für verschiedene Ionen (Conti et al., 1985; Lyle et al., 1991; Cadossi et al., 1992). García-Sancho et al. (1994) fanden dagegen bei fünf verschiedenen Zelltypen keine Effekte eines 50 Hz Magnetfeldes von 100-2000  $\mu\text{T}$  auf den Ionentransport. Es wird vermutet, daß diese Ergebnisse auf unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Zelltypen und Co-Faktoren) im Verhältnis zu den anderen Untersuchungen beruhen.
3. Veränderung von **Enzymaktivität**: Santoro et al. (1997) stellten eine Verstärkung der Aktivität von Proteinkinasen bei Einwirkung eines 50 Hz Magnetfeldes von 2 mT fest.
4. Verringerung des **Melatoninspiegels**: Diese Erklärungen zum Mechanismus der Krebs-Promovierung durch niederfrequente EMF kristallisierte sich in den letzten Jahren immer mehr als überzeugendste Hypothese heraus. Die sogenannte Melatonin-Hypothese nach Stevens (1987) wird daher im folgenden Abschnitt ausführlicher behandelt.

### 1.2.3 Melatonin

Melatonin wurde erstmals 1958 von Lerner et al. als Hormon der Zirbeldrüse des Menschen identifiziert. Melatonin kommt aber nicht nur bei Vertebraten vor; als fast ubiquitäre Substanz wurde Melatonin unter anderem auch in verschiedenen Taxa von Invertebraten (Vivien-Rodels und Pévet, 1993), Dinoflagellaten (Poeggler et al., 1991), Trypanosomen (Poeggler et al. 1989), Rhodophyceanen (Balzer und Hardeland, 1996)

und Angiospermen (Hattori et al., 1995) nachgewiesen (Übersicht: Hardeland und Fuhrberg, 1996; Hardeland, 1999).

Bisher sind folgende Funktionen von Melatonin bekannt:

- **Zeitgeber:** Die Melatoninkonzentration in der Zirbeldrüse des Menschen liegt tagsüber bei 25 pg/ml und nachts bei maximal 125 pg/ml. Die Produktion von Melatonin wird durch Licht (400-800 nm) oder Streß verringert. Der Melatoninspiegel variiert nicht nur im Tag-Nacht-Wechsel, sondern auch jahreszeitlich, je länger die Nacht ist, desto länger dauert der Melatoninanstieg (Reiter et al., 1991; Reiter, 1993a).
- **Antioxidativer Schutz:** Da Melatonin ein sehr effektiver Radikalfänger ist, wird vermutet, daß eine ursprüngliche Funktion von Melatonin ein Schutz vor Sauerstoffradikalen war (Hardeland et al., 1993; Reiter et al., 1995; Hardeland et al., 1995; Poeggeler et al., 1996).
- **Altern und altersbedingte Krankheiten:** Die Reduktion des Melatoninspiegels im Laufe des Lebens könnte zum Alterungsprozeß und zum Entstehen von altersbedingten Schäden beitragen, wobei über die Kausalität und den genauen Prozeß noch wenig bekannt ist (Waldhauser et al., 1988; Pierpaoli et al., 1991; Reiter, 1992; Poeggeler et al., 1993). Interessanterweise findet die hauptsächliche Reduktion der Melatoninproduktion im Alter zwischen 20 und 30 Jahren statt (Kennaway, 1999). Der Reduktion der Melatoninkonzentration kommt möglicherweise eine große Bedeutung zu, da Melatonin in seiner Funktion als bisher wirksamster bekannter Hydroxyl-Radikal-Fänger die DNS vor Schäden durch Radikale bewahren könnte (Reiter et al., 1998; Morioka et al., 1999). Außerdem fördert Melatonin die Aktivität des Enzyms Glutathion-Peroxidase, das oxidative Schäden, unter anderem im Gehirn, beseitigt (Poeggeler et al., 1993).
- **Signaltransduktion:** Regulation von Calmodulin-abhängigen Funktionen, wobei die physiologische Bedeutung noch nicht klar ist (Benitez-King et al., 1993; Pozo et al., 1997).
- **Schlafkontrolle** (Dijk et al., 1999; Van Someren, 2000).
- **Kontrolle der Körpertemperatur** (Gilbert et al., 1999; Dijk et al., 1999).

- **Kontrolle des Immunsystems:** Unter Einwirkung von Melatonin wird die Anzahl der Bindungsstellen auf den Leukozyten erhöht (Finocchiaro et al., 1988).

Die krebshemmende Wirkung von Melatonin beruht eventuell auf seiner Funktion als Radikalfänger (Reiter und Lerchl, 1992). Ein Magnetfeld könnte die nächtliche Melatoninkonzentration erniedrigen und so zu erhöhtem Krebsrisiko führen (Stevens, 1987; Baldwin und Barrett, 1998). Denn falls Magnetfelder die Produktion von Melatonin herabsetzen, könnte hierdurch die krebshemmende Wirkung reduziert werden (Reiter, 1993b, c). Denkbar ist hierbei ein erhöhtes Krebsrisiko für Hormonvermittelte Krebsarten (besonders Brustkrebs, für ein Review siehe Brainard et al., 1999) durch eine Erhöhung des Östrogen- und Prolaktin-Gehalts.

Klinische Studien am Menschen zur Auswirkung von EMF auf den Melatoninspiegel (Graham et al., 1996, 1997; Wood et al., 1998) konnten bisher keinen eindeutigen Zusammenhang aufzeigen. Im Gegensatz dazu zeigen einige epidemiologische Studien wieder recht deutliche Effekte: Kaune et al. (1997) konnten bei der Untersuchung der Melatoninkonzentrationen von Frauen, die während des Schlafes einem Magnetfeld von 60 Hz ausgesetzt waren, eine dosisabhängige Verringerung des Melatoningehaltes im Urin feststellen. Verschiedene Autoren fanden bei Bahnarbeitern und Arbeitern in Hochspannungsanlagen eine Reduktion von Melatonin-Metaboliten im Urin, was auf eine Abnahme der Melatoninkonzentration im Körper hinweist (Wilson et al., 1990; Arnetz und Berg, 1996; Pfluger und Minder, 1996; Burch et al., 1998).

### **1.3 Der Einzeller *Paramecium* als Modellsystem – Ziele der Arbeit**

*Paramecium* ist zur Untersuchung von Auswirkungen der EMF auf zellulärer Ebene besonders geeignet, weil sich Reizaufnahme, Reizverarbeitung und Reizreaktion in einer einzigen Zelle abspielen. Daher wird *Paramecium* von Pech (1995) als etabliertes Modellsystem "zur Studie von Signaltransduktionsmechanismen" beschrieben. Ein modifizierter Cilienschlag läßt auf eine Änderung des Membranpotentials durch die sogenannte elektromotorische Kopplung (siehe 1.3.2) und der Second Messenger Konzentrationen (siehe 1.3.3) schließen (Bonini et al., 1986; Schultz und Klumpp, 1993; Walczak und Nelson, 1994). Diese Einzeller reagieren adäquat auf präsentierte Reize (Hinrichsen und Schultz, 1988; Machemer und Teunis, 1996), ähnlich hoch entwickelten vielzelligen Organismen, weshalb sie auch als "schwimmende sensorische Zelle" (Machemer und de Peyer, 1977) oder als "schwimmendes Neuron" (Naitoh, 1982) bezeichnet werden.

### 1.3.1 Elektromotorische Kopplung

Modifikationen des Membranpotentials, wobei Änderungen der intraciliären  $[Ca^{2+}]$  eine besondere Rolle spielen, sind bei *Paramecium* mit Änderungen der Frequenz und der Richtung des Cilienschlages verknüpft (Machemer, 1974, 1975; Machemer und de Peyer, 1977); dies bezeichnet man als elektromotorische Kopplung (Machemer, 1974, 1986). Befindet sich *Paramecium* im Ruhepotential, so bewegt es sich mit konstanter Geschwindigkeit auf einer links-helikalen Bahn vorwärts.  $Ca^{2+}$ - und  $K^{+}$ -Pumpen halten einen Ionengradienten aufrecht (Elwess und Van Houten, 1997). Eine Depolarisation oder Hyperpolarisation der Zellmembran kann unter anderem durch Mechanostimulation, durch chemische Reize oder veränderte extrazelluläre Ionenkonzentration ausgelöst werden (Naitoh und Eckert, 1968; Eckert, 1972).

Kommt es z. B. zu einer mechanischen Reizung am posterioren Pol der *Paramecium*-Zelle, wo vermehrt mechanosensitive Kaliumionenkanäle zu finden sind, so führt dies zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran durch eine Leitwertänderung zugunsten des Kaliumionen-Efflux. Die Hyperpolarisation reduziert über einen unbekanntenen Mechanismus die  $[Ca^{2+}]$  im Cilieninnenraum. Es erfolgt eine Erhöhung der Cilienschlagfrequenz und eine Änderung der Cilienschlagrichtung weiter nach posterior, dadurch wird der Durchmesser der Helix der Schwimmbahn geringer, was ebenfalls zur Erhöhung der Schwimgeschwindigkeit beiträgt (Naitoh und Eckert, 1969; Machemer, 1974) und somit insgesamt zu einem schnelleren Vorwärtsschwimmen.

Erfolgt dagegen eine geringe Depolarisation von *Paramecium*, z. B. durch mechanische Reizung am anterioren Teil der Zelle, wo sich vermehrt mechanosensitive  $Ca^{2+}$ -Kanäle in der Somamembran befinden (Eckert, 1972; Brehm et al., 1980), so wird aufgrund der Kanalverteilung der Leitwert der Membran zugunsten des  $Ca^{2+}$ -Influx verschoben (Eckert, 1972; Naitoh und Eckert, 1974). Dieser lokale somatische  $Ca^{2+}$ -Influx führt zu einer Öffnung von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen in der Cilienmembran (Brehm und Eckert, 1978; Hennessey und Kung, 1985; Krüppel und Wissing, 1996) und  $Ca^{2+}$  gelangt in den Cilieninnenraum.  $Ca^{2+}$  wirkt über noch unbekannte Mechanismen auf die axonemalen Mikrotubuli (Naitoh und Kaneko, 1972; Satow und Kung, 1979; Naitoh und Sugino, 1984) und führt zu einer Abnahme der Cilienschlagfrequenz und zu einer Verlagerung des effektiven Cilienschlages nach anterior, so daß die Zelle mit verringerter Geschwindigkeit weiter vorwärts schwimmt. Nimmt die Depolarisation und damit die  $[Ca^{2+}]$  weiter zu, so kommt es zu einer Inaktivierung der Cilienschlagbewegung und zu ungerichteter Fortbewegung von *Paramecium*. Eine weiter zunehmende Depolarisation resultiert in einem schnellen Rückwärtsschwimmen (Eckert, 1972; Naitoh und Kaneko, 1972; Machemer, 1988a, b). Hierbei bindet  $Ca^{2+}$  wahrscheinlich an  $Ca^{2+}$ -sensitive Bindungsstellen am ciliären Axonem und moduliert so

die chemomechanische Transduktion über Dynein (Machemer, 1988b). In der Nähe des Axonems kommt es innerhalb von Millisekunden zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]$  von  $10^{-7}$  M auf bis zu  $10^{-4}$  M (Machemer, 1988b). Je nach Grad der Depolarisation erfolgt also ein Abweichen von der linearen Schwimmbahn bis hin zu einem Rückwärtsschwimmen (Eckert, 1972; Naitoh und Eckert, 1974; Machemer und Ogura, 1979; Machemer, 1988a, b).

Bei einer Depolarisation von *Paramecium* gelangt also  $Ca^{2+}$  durch die Cilienmembran in den intraciliären Raum. Dieses  $Ca^{2+}$  muß dann gebunden und/oder aus der Zelle transportiert werden, z. B. durch Calmodulin und ATPasen. Der Ciliat *Paramecium* ist daher ein gutes Modell, um  $Ca^{2+}$ -regulierte Systeme zu untersuchen. Cilienschlagausrichtung und Cilienschlagfrequenz werden offensichtlich über getrennte Mechanismen über  $Ca^{2+}$  reguliert, denn Versuche mit permeabilisierten Zellen zeigten, daß  $Ca^{2+}$  die Cilienschlagrichtung unabhängig von der Schlagfrequenz regulieren kann (Naitoh, 1972; Nakaoka, 1984).  $Ca^{2+}$  hat allerdings direkt keinen Einfluß auf die ciliäre ATPase und die Phosphorylierung von Dynein (Travis und Nelson, 1988). Die Wirkung könnte aber durch  $Ca^{2+}$ -bindende Proteine wie Calmodulin (Blum et al., 1980) und  $Ca^{2+}$ -abhängige Enzyme wie Proteinkinasen vermittelt werden (Preston, 1990; Bonini, 1991; Noguchi et al., 2001). Maihle et al. (1981) und Evans und Nelson (1989) wiesen Calmodulin in hoher Konzentration in den Cilien (bis zu 50  $\mu$ g) und Walter und Schultz (1981) im Soma (75  $\mu$ g/g) nach. Calmodulin ist das am besten untersuchte  $Ca^{2+}$ -Bindungsprotein in Ciliaten und hat verschiedenste Funktionen, wie die Aktivierung von Pumpen und Ionenkanälen. Hinrichsen et al. (1992) zeigten sogar, daß eine Blockierung der Calmodulinfunktion durch Antikörper eine Cilienschlagumkehr verhindert.

Aufgrund dieser Zusammenhänge ist es möglich, das Schwimmverhalten bei *Paramecium* als Indikator für Veränderungen des Membranpotentials heranzuziehen. In verschiedenen Versuchen konnte festgestellt werden, daß ein 50 Hz Magnetfeld von 2 mT eine Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen verursacht (Becker, 1994; Becker et al., 1996; Hemmersbach, 1997; Wilczek, 1998), was auf eine Depolarisation hinweist und somit auf eine Beteiligung von  $Ca^{2+}$ . Im Rahmen dieser Arbeit soll der genaue Zeitverlauf der Reaktion untersucht werden und die Beteiligung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen durch den Einsatz der Pawn-Mutante, die defekte  $Ca^{2+}$ -Kanäle besitzt, geklärt werden.

### 1.3.2 cAMP und cGMP

Einige Fragen in der Signaltransduktionskette von Ciliaten sind zwar noch offen, aber Sekundäre Botenstoffe spielen offensichtlich eine große Rolle. Außer  $\text{Ca}^{2+}$  wird ebenfalls eine Funktion von cAMP und cGMP bei der Regulation des Cilienschlages vermutet (Majima et al., 1986; Schultz et al., 1986; Bonini et al., 1986, 1991). Etliche Versuche zeigen, daß cAMP und cGMP das Schwimmverhalten beeinflussen. Setzt man permeabilisierte Paramecien-Zellen unterschiedlichen Konzentrationen von cGMP oder cAMP aus, erhöht sich dosisabhängig und reversibel die Schwimgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle (Nakaoka und Ooi, 1985; Bonini et al., 1986; Bonini und Nelson, 1988). Die Wirkung von cAMP/cGMP wird hauptsächlich durch eine cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinase vermittelt. Dieses Enzym überträgt endständige Phosphatgruppen von ATP auf spezifische Serin- oder Threoninreste von Proteinen. Die Phosphorylierung von Cilienproteinen durch cAMP- und cGMP-aktivierten Proteinkinasen erfolgt schnell und ist stabil (Lewis und Nelson, 1980; Bonini und Nelson, 1990). Die phosphorylierten Proteine werden dann durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase 2B (Calcineurin) in den Cilien dephosphoryliert und so wieder in den inaktiven Zustand überführt (Klumpp et al., 1983; Momayezi et al., 2000).

Cyclisches AMP wird durch das Plasmamembran-gebundene Enzym Adenylatcyclase aus ATP gebildet und ständig durch cAMP-Phosphodiesterasen zu Adenosin-5`-Monophosphat hydrolysiert. Eine steigende intrazelluläre cAMP Konzentration soll mit einer Hyperpolarisierung des Membranpotentials korrelieren, darauf weisen verschiedene Versuche hin (Hennessey et al., 1985; Bonini, 1986; Schultz et al., 1992). Adenylatcyclasen konnten in der Cilienmembran von *Paramecium* an verschiedenen Stellen festgestellt werden, wobei sich 50 % der Adenylatcyclasen in der Membran befinden, wo auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle lokalisiert sind (Schultz et al., 1985), dies deutet auf eine Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Regulation der Adenylatcyclase hin. Tatsächlich reguliert  $\text{Ca}^{2+}$  nicht nur den Cilienkraftschlag und Proteinkinasen, sondern auch die cAMP und cGMP Konzentrationen durch die Hemmung oder Aktivierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Adenylatcyclase (Gustin und Nelson, 1987) und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Guanylatcyclase (Klumpp und Schultz, 1982).

Im Zusammenhang mit der Diskussion über die Wirkung von EMF stellt sich die Frage, ob Signaltransduktionsprozesse der Zellen verändert werden. Es zeigen sich viele Effekte in dieser Hinsicht, unter anderem auch cAMP Konzentrationserhöhungen durch niederfrequente Magnetfelder von 50 Hz und einer Flußdichte von 2 mT (Schimmelpfeng und Dertinger, 1993; Schimmelpfeng und Dertinger, 1997; Schimmelpfeng, 1997). Im Rahmen meiner Diplomarbeit zeigten sich ähnliche Effekte

auf den cAMP Spiegel (Wilczek, 1998), die in dieser Arbeit näher untersucht werden sollen.

Auch cyclisches GMP spielt bei Einzellern eine wichtige Rolle, es ist z. B. beim Zellzyklus, beim Metabolismus und bei der Cilienschlagkontrolle in Ciliaten relevant (Graves et al., 1976; Schultz und Klumpp, 1984, 1993; Bonini und Nelson, 1988; Umeki und Nozawa, 1996). Eine Plasmamembran-gebundene Guanylatcyclase (=GC) synthetisiert cGMP aus GTP. Dieses cGMP wird ständig schnell durch eine cGMP-Phosphodiesterase zu Guanosin-5'-Monophosphat hydrolysiert. Die Guanylatcyclase bei *Paramecium* befindet sich hauptsächlich in der Cilienmembran in der gleichen Region wie spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert (Schultz und Klumpp, 1980; Satir et al., 1980; Linder et al., 1999). Eine Depolarisation ( $\text{Ca}^{2+}$ -Influx) kann demnach mit einem Anstieg des cGMP Levels korreliert werden (Schultz et al., 1985, 1987, 1997, Knoll et al., 1992). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der GC wird durch Calmodulin vermittelt (Schultz und Klumpp, 1982; Schultz et al., 1985). Die GC könnte ein intraciliärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor sein, der  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderungen in eine biochemische Reaktion durch cGMP umsetzt, welches wiederum Proteinphosphorylierung stimuliert.

Die Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen durch ein 50 Hz Magnetfeld mit einer Flußdichte von 2 mT (Becker, 1994; Becker et al., 1996; Hemmersbach, 1997; Wilczek, 1998) weist auf eine Depolarisation hin; daher soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob sich Änderungen im cGMP Gehalt der magnetfeldexponierten Paramecien zeigen.

### **1.3.3 Melatonin und 5'-Methoxytryptamin**

Vielen Forschern (Poeggeler et al., 1989, 1991; Hardeland et al., 1995; Hardeland und Fuhrberg, 1996; Fuhrberg et al., 1997) gelang es, bei Einzellern Melatonin und das Melatonin-Analogon 5'-Methoxytryptamin (=5MT) nachzuweisen. In Einzellern findet man die höchsten bekannten Konzentrationen von Melatonin; Maxima liegen im mM Bereich, die untere Grenze der Konzentration wurde bei 0,04  $\mu\text{M}$  gemessen. Diese Angaben sind möglicherweise sogar noch unterschätzt, denn durch die Aufarbeitung der Zellen entstehen freie Radikale, die Melatonin "wegfangen" können (Hardeland, 1999).

Der Dinoflagellat *Gonyaulax polyedra* war der erste Organismus außerhalb der Metazoen, bei dem Melatonin nachgewiesen wurde (Poeggeler et al., 1989, 1991). Auch hier haben die Melatoninkonzentrationen circadiane Rhythmen; jedoch ist nur bei einem Dinoflagellaten ein Zusammenhang dieses Rhythmus mit der photoperiodischen Zeitmessung bekannt (Poeggeler et al., 1991; Balzer und Hardeland, 1991a, b;

Hardeland et al., 1995; Hardeland, 1999). Melatonin und andere Indolamine könnten bei Einzellern als Schutz vor Schäden durch freie Radikale und andere Oxidantien dienen. Dafür spricht auch, daß große Mengen Melatonin und 5'-Methoxytryptamin vorhanden sind und so ein effektiver Schutz möglich wäre. Melatonin kommt außerdem besonders im Zellkern vor, dies könnte als Schutz vor Radikalen für die DNS dienen. Besonders wahrscheinlich ist dies bei Zellen, bei denen die Melatoninkonzentration keinen circadianen Rhythmus durchläuft und somit andere Funktionen des Indols zu vermuten sind. Bei Dinoflagellaten wird durch Melatonin Cystenbildung induziert. Viele Dinoflagellaten reagieren auf das Melatonin-Analogon 5'-Methoxytryptamin stärker als auf Melatonin (Balzer und Hardeland, 1991a, b; Hardeland et al., 1993). Es wird vermutet, daß 5MT das aktive Metabolit von Melatonin in Dinoflagellaten ist. Dies könnte auch auf *Paramecium* zutreffen und soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Desweiteren soll überprüft werden, ob *Paramecium* sich als Modellsystem eignet, um möglicherweise auftretende Indolaminveränderungen darzustellen.

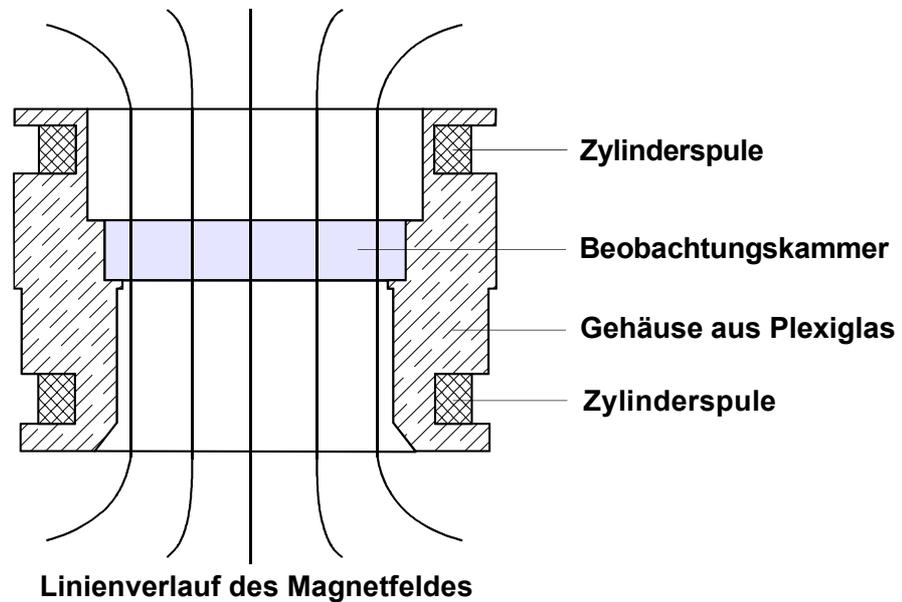
## 2 Material und Methode

### 2.1 Versuchsaufbau und Erzeugung des Magnetfeldes

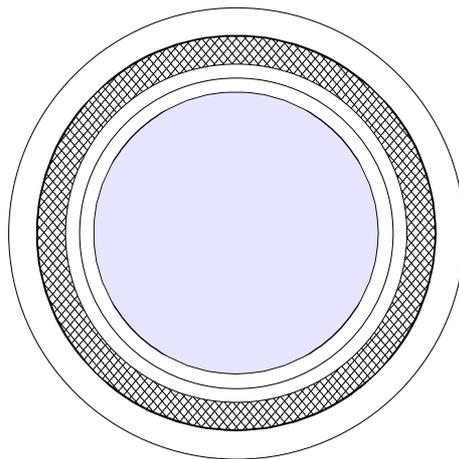
Die Beobachtung der Paramecien erfolgte über eine Stereolupe (Wild M5, Heerburg, Schweiz), an deren Tubus eine schwarz/weiß CCD Kamera (Panasonic F15) montiert war. Diese Kamera übertrug das Bild auf einen Videorekorder und einen RGB Monitor. Um einen guten Kontrast zu erzielen, wurde eine Dunkelfeldbeleuchtung benutzt. Die Beobachtungen von *Paramecium biaurelia* und der Pawn-Mutante erfolgten bei 12facher Objektivvergrößerung. Das Beobachtungsfeld der Lupe befand sich in der Mitte der Kammer, um Randeffekte auszuschließen. Das Magnetfeld wurde durch ein Helmholtzspulenpaar erzeugt, wobei das Magnetfeld zwischen den Spulen additiv war (**Abbildung 2.1** und **Abbildung 2.2**). Im dem Bereich zwischen den Spulen entstand ein relativ homogenes Magnetfeld, wobei die Magnetfeldstärke in der Expositionsregion nur um +/- 5 % oder weniger schwankte (Bell und Marino, 1992; Schneider et al. 1994; Valberg, 1995). Die magnetischen Feldlinien verliefen bei der verwendeten Anordnung parallel zur optischen Achse. In diesem Bereich befand sich auch die Halterung für die Beobachtungskammer. Die Ciliaten in der Kammer wurden dort einem annähernd homogenen Magnetfeld ausgesetzt. An die Spulen wurde ein 50 Hz Wechselstrom eingespeist, dieser erzeugte ein magnetisches Feld. Durch das angelegte Magnetfeld wurde in der Kammer und den Zellen ein elektrisches Feld induziert, das jedoch sehr gering (siehe Berechnungen) und somit zu vernachlässigen ist. Die Spulen wurden über ein Netzgerät (SAEL R-55 Class 2,5; Frequenzform Sinus) mit einem Strom von 0,8 A gespeist, das entsprach einer magnetischen Flußdichte B von 2 mT (rms). Mit einem Magnetfeldmeßgerät (SAEL FDM-1) konnte die magnetische Flußdichte überprüft werden.

Bei Anschalten des Magnetfeldes kam es zu einer Temperaturerhöhung um 2,2 °C, der genaue Zeitverlauf dieser Erwärmung ist in der Diplomarbeit dargestellt (Wilczek, 1998). Eine Luftkühlung (Ventilator) hielt die Temperatur des Mediums in der Kammer konstant (20 °C +/- 0,4 °C). Temperaturmessungen am Rand und in der Mitte der Kammer zeigten, daß die Kühlung gleichmäßig erfolgte und kein Temperaturgradient existierte. Es stellte sich die Frage, ob die Ursachen der Temperaturerhöhung im Medium durch das magnetische Wechselfeld oder durch die Erwärmung der Spule zustande kam. Die beschriebene Elektrolytlösung brachte eine Leistung von 0,5 mW; die Wärmekapazität von Wasser beträgt 4,1 J/g°C, danach wären ca. 8000 Sekunden nötig, um das Wasser um 1 °C zu erwärmen. Hierbei dürfte kein Wärmeaustausch mit der Umgebung stattfinden. Es ist also anzunehmen, daß nicht das magnetische Wechselfeld für die Erwärmung des Mediums verantwortlich war. Dafür spricht auch,

daß deionisiertes Wasser sich in der Mitte der Spule ebenfalls erwärmt. Setzte man die Ventilator Kühlung ein, so konnte die Temperaturschwankung so gut wie kompensiert werden ( $\pm 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Auch dies weist darauf hin, daß die Erwärmung des Mediums nicht durch das Magnetfeld zustande kam.



**Abb. 2.1:** Die Anordnung der Spulen nach Helmholtz im Querschnitt (nicht maßstabsgetreu)



**Abb. 2.2:** Aufsicht auf die Expositionseinrichtung

## 2.2 Darstellung von durch ein Magnetfeld induzierten Strömungen

Bei der Erzeugung elektromagnetischer Felder muß immer auch berücksichtigt werden, daß Ströme und somit Partikelströmungen im Medium entstehen können. Diese Strömungen könnten vielleicht in Bereichen liegen, die freischwimmende Organismen wie *Paramecium* in ihrem Schwimmverhalten beeinflussen. Um diese Partikelströme zu quantifizieren, können verschiedene Techniken verwendet werden: verfolgt man im Medium gelöste Schwebeteilchen und trägt sie als Vektorbilder in Datenmatrizen ein, so können z. B. Strömungsfelder schwimmender Zellen oder durch elektromagnetische Felder entstehende Strömungen sichtbar gemacht werden (Kamphuis, 1999). Als Schwebeteilchen kommen Tuschepartikel, Latexkügelchen oder verschiedene gelöste Farbstoffe in Frage. Wichtig bei diesem Versuchsansatz ist, daß die Brownsche Molekularbewegung bei den Partikeln zu beobachten ist. Diese Methode ist aber bei dem vorhandenen Versuchsaufbau nicht zu verwenden, da die Vergrößerung der fest montierten Lupe nicht ausreicht und so ein kompletter Umbau der Versuchsanordnung zur Durchführung dieses Nachweises nötig gewesen wäre.

Eine weitere Möglichkeit, Partikelströme im Medium sichtbar zu machen, ist die Polarisationsmethode. Hierbei wird zur Untersuchung anisotroper Materialien das zur Beleuchtung verwendete Licht durch einen Polarisator linear polarisiert. Nach Durchgang des Lichts durch das Medium wird es mit einem zweiten Polarisator (=Analysator), der hinter dem Objekt im Mikroskoptubus liegt, analysiert. Polarisator und Analysator sind drehbar angeordnet. Die anisotropen Objekte erscheinen in Polarisationsfarben, deren Stärke und Charakter von der Orientierung und den optischen Eigenschaften abhängen. Die Farbfolge ist durch die Dicke und die Doppelbrechung des Präparates bestimmt. Zwar konnte durch Induktion von Strömungen im Medium durch Bewegen der Versuchskammer nachgewiesen werden, daß die Polarisationsmethode an sich funktioniert, bei Einschalten des Feldes konnten allerdings keine Polarisationseffekte beobachtet werden. Daraus könnte man schließen, daß durch das Feld keine Strömungen im Medium induziert werden. Da aber auch bei Einsetzen von Paramecien in die Kammer kein Polarisationseffekt beobachtet werden konnte, obwohl auf jeden Fall Strömungen durch die Schwimmbewegungen der Tiere im Medium entstehen, ist davon auszugehen, daß diese Methode zur Darstellung so geringer und wahrscheinlich ungeordneter Strömungen in der verwendeten Weise nicht geeignet ist.

Als theoretische Annäherung an dieses Problem wurde errechnet, um wieviel höher die Geschwindigkeit von Ionen im Medium in der verwendeten Versuchskammer im magnetischen Feld mit einer Flußdichte von 2 mT und 50 Hz im Verhältnis zur

Geschwindigkeit von Ionen ohne induziertes Feld ist. Bei den Berechnungen wurde die größere Biochemiekammer (Tiefe 4 mm, Durchmesser  $r = 27$  mm) betrachtet.

Die induzierte Spannung ist

$$U = -A_1 \dot{B}$$

dabei ist

$$A_1 = \pi r^2 = 0,00057 \text{ m}^2$$

und

$$\dot{B} = \frac{dB}{dt} = -B_0 \omega \sin(\omega t)$$

mit der magnetischen Feldstärke

$$B_0 = 2 \text{ mT}$$

daraus folgt

$$U = 0,00057 \text{ m}^2 \cdot 2 \text{ mT} \cdot 314,2 \text{ Hz} \cdot \sin(\omega t) \\ = U_0 \cdot \sin(\omega t)$$

also ist die Spannungsamplitude

$$U_0 = 400 \text{ } \mu\text{V}$$

Es wird eine elektrische Spannung von  $400 \text{ } \mu\text{V}$  in dem elektrisch leitfähigen Medium induziert. Der spezifische Widerstand  $\rho$  des Mediums beträgt  $0,45 \text{ } \Omega\text{m}$  (Hemmersbach et al., 1997), der Umfang der Versuchskammer  $L$  ist gleich  $0,09 \text{ m}$  (mit  $2\pi r$ ) und die Fläche  $A_2$  ist die Kammertiefe zum Quadrat ( $0,004 \text{ m}^2$ ). Davon ausgehend, daß die Stromdichte in den Außenbereichen der Versuchskammer am größten ist, wird die dort auftretende Stromstärke berechnet:

$$I = \frac{U}{R} = \frac{400 \text{ } \mu\text{V}}{2,5 \text{ k}\Omega} = 160 \text{ nA}$$

mit

$$R = \frac{\rho L}{A_2} = 2,5 \text{ k}\Omega$$

Die Beweglichkeit  $\beta$  für frei bewegliche Ionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ) beträgt  $6,7 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$ . Daraus läßt sich unter Zuhilfenahme der oben berechneten induzierten Spannung  $U_0$  die Beweglichkeitserhöhung  $v$  der frei beweglichen Ionen aufgrund der Induktionswirkung des applizierten Magnetfeldes berechnen:

$$v = \beta U_0 = 2,68 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$$

(Rechnung durchgeführt durch C. Bühner, persönliche Kommunikation, 1998)

Da der Einfluß von elektrischen Feldern auf Ionen größer ist als auf ungeladene Teilchen, ist die oben berechnete Beweglichkeitserhöhung als die größtmögliche anzusehen. Im Vergleich mit dem Diffusionskoeffizienten ungeladener Teilchen (z. B. Glucose, Harnstoff oder Methanol), der zwischen  $0,6 \cdot 10^{-9}$  und  $1,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  liegt, ist die Beweglichkeitserhöhung der Ionen durch das  $2 \text{ mT}$  Feld somit als sehr gering einzuschätzen. Daher ist davon auszugehen, daß die durch das Magnetfeld induzierten Strömungen keinen unmittelbaren Effekt auf das Schwimmverhalten von *Paramecium* haben.

## 2.3 Versuchsorganismen, Haltungsbedingungen und Anreicherung

### 2.3.1 *Paramecium biaurelia*

Die Kultivierung von *Paramecium biaurelia* (CCAP 1660/3C, Culture Collection of Algae and Protozoa, Ambleside, England) erfolgte in einer nicht sterilen Kultur, die Bakterien als Futter enthielt. Das Kulturmedium wurde durch Abkochen von 15 g Stroh in 1 l Aqua Bidest für 15 Minuten hergestellt. So wurden im Medium enthaltene Dauerstadien von Protozoen abgetötet und die organischen Bestandteile des Strohs in Lösung gebracht. Die Kulturflüssigkeit wurde abgegossen und das Stroh nochmals mit 1 l Aqua Bidest für 15 Minuten aufgekocht. Das so erhaltene Kulturmedium (pH 7,2) wurde auf zwei sterile Kunststoffaquarien (5 Liter Weithalsflaschen aus Low Density Polyethylen, Qualilab) aufgeteilt und mit Kunststoffdeckeln bedeckt. Dabei war darauf zu achten, daß die Gefäße nicht luftdicht verschlossen wurden, so daß der Sauerstoffgehalt im Medium nicht zu sehr absank. Nach Abkühlen des Mediums wurden die Becken mittels 5 ml dichter Paramecienlösung aus einer Stammkultur beimpft. Bei diesem Vorgang gelangten auch nicht definierte Futterbakterien in die Kulturlösung. Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln in einer Klimakammer (Weiss Technik, 20 °C +/- 0,5 °C). Die Leitfähigkeit des Mediums (Meßapparatur: LF 530, WTW = Wissenschaftlich Technische Werkstätte, Weilheim, Deutschland) beträgt 0,229 mS/cm (Hemmersbach et al., 1997).

### 2.3.2 Pawn-Mutante

Pawn ist eine Mutante von *Paramecium tetraurelia*, hier wurde die Zelllinie d4-500r (Pawn B) verwendet, die mir freundlicherweise von Dr. C. Kung (Laboratory of Molecular Biology, University of Wisconsin, Madison 53706, USA) über Prof. Dr. H. Plattner (Universität Konstanz, Fakultät für Biologie, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Die Kultivierung erfolgte unter axenischen Bedingungen in Salatmedium. Hierfür wurden 2 l Aqua Bidest mit 0,2 g Yeast Extract (Difco), 3 g Cerophyll und 1,12 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O kurz aufgekocht und 800 µl Stigmasterol (Sigma: 0,12 g auf 50 ml Ethanol) als Sterolquelle zugegeben. Die Lösung wurde filtriert und jeweils ungefähr 150 ml des Mediums in Rundkolben autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde es mit 5 ml dichter Pawn-Kultur beimpft. Die Kulturen wurden einmal in der Woche kontrolliert und umgesetzt. Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln in einer Klimakammer (Weiss Technik, 20 °C +/- 0,5 °C). Eine Stammkultur in Röhrchen (25 ml) wurde bei 7 °C im Kühlschrank gehalten. Um zu testen, ob die Mutanten noch den Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Defekt hatten, wurde eine 40 mM KCl-Lösung angesetzt und tropfenweise auf die Einzeller gegeben; wenn es sich um die mutierte Form der Tiere handelte, schwammen sie im Kreis statt rückwärts, da sie aufgrund ihres Defekts nicht

depolarisieren konnten. Diese Überprüfung wurde regelmäßig beim Umsetzen durchgeführt.

### **2.3.3 Anreicherung**

Die Anreicherung der Zellen für die Verhaltensversuche und die biochemischen Versuche erfolgte in 250 ml Meßkolben, in die ein Stopfen aus Aquariumwatte, befestigt an einer Perlonschnur, eingeführt wurde. Dann wurde durch einen mit Filterwatte (= Aquariumwatte) ausgelegten Glastrichter Kulturmedium in den Kolben gegossen, wodurch Kahlhautstücke und Stroh zurückgehalten wurden. Die Kolben wurden bis zum Kolbenhals mit Kultur befüllt und der Stopfen bis dorthin hochgezogen. Der Kolbenhals wurde mit ca. 10 ml MOPS-Puffer (1 mM, pH 7,2) mit 1 mM K<sup>+</sup> und 1 mM Ca<sup>2+</sup> gefüllt, da ein definiertes Medium wichtig war, um den reaktiven Zustand der Zellen über alle Versuche hin vergleichbar zu halten. Es war nach dem Befüllen des Meßkolbens darauf zu achten, daß sich keine Sauerstoffblasen am Rand des Kolbens oder am Wattestopfen festsetzten, weil sich Paramecien dort aufgrund ihrer positiven Aerotaxis vorzugsweise ansammelten. Die Paramecien wanderten nun infolge ihrer positiven Gravitaxis (Review: Hemmersbach und Häder, 1999; Hemmersbach et al., 1999) in den MOPS-Puffer im oberen Teil des Kolbenhalses und konnten dort nach 1-2 Stunden entnommen werden. Die Pawn-Mutante konnte wegen der hohen Zelldichte direkt aus der Kultur entnommen werden.

Für die biochemischen Versuche wurde eine große Zelldichte benötigt. Die Anreicherung erfolgte durch Zentrifugation von *Paramecium biaurelia* und der Pawn-Mutante bei 250 x g (= 1264 Upm, für 2 Minuten). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet wurde in 2 ml MOPS-Puffer aufgenommen und in die Versuchskammern überführt.

## **2.4 Versuchsdurchführung Verhalten**

Aus dem Kolbenhals wurden Paramecien mit einer Pasteurpipette in ein tiefes Blockschälchen überführt und mit MOPS-Puffer (1 mM mit 1 mM K<sup>+</sup> und 1 mM Ca<sup>2+</sup>) verdünnt. Die Verdünnung erfolgte soweit, daß in die Versuchskammer von 1 ml Volumen insgesamt 280-380 Versuchstiere gelangten. Diese Dichte der Versuchstiere wurde gewählt, da sie sich in Vorversuchen hinsichtlich der Vitalität der Zellen in den Kammern über die Versuchsdauer und der Auswertbarkeit durch die computerunterstützte Bildverarbeitung als geeignet erwiesen hat. Die Kammer zur Untersuchung des Schwimmverhaltens der Ciliaten bestand aus einem Plexiglasring von 1,75 mm Tiefe mit einer Aussparung von 27 mm Durchmesser in der Mitte. Von unten wurde die Kammer mit einer an den Ring angepaßten Glasplatte und Paraffin

verschlossen. Von oben erfolgte der Verschluss nach dem Befüllen der Kammer mit einem Deckglas (34 x 34 mm<sup>2</sup>) und Silikonpaste. Die Silikonpaste verhinderte ein Verrutschen des Deckglases und ermöglichte ein luftblasenfreies Verschließen der Kammer. Silikonpaste (Wacker-Chemie, München) ist als nicht toxisch für *Paramecium* einzustufen und hat keinen Einfluß auf das Verhalten der Einzeller, falls etwas von der Paste in den Kammerinnenraum gelangt sein sollte. Beim Verschließen waren Luftblasen in der Kammer zu vermeiden, um eine Ansammlung der Ciliaten an diesen zu verhindern. Die Kammer wurde in die Versuchsanordnung bei eingeschaltetem Grünlicht (Iwatsuki und Naitoh, 1982, 1983) und aktivierter Luftkühlung eingesetzt. Es folgte eine vierstündige Adaptationsphase, denn erst nach dieser Zeit war gewährleistet, daß *Paramecium* an die veränderten Ionenbedingungen angepaßt war (Oka et al., 1986; Machemer, 1990; Machemer et al., 1991;). Ein Ring aus 48 grünen Leuchtdioden unter der Versuchskammer erzeugte das Licht (Wellenlänge 565 nm, ca. 320 Lux in der Kammerebene, Lichtenergie: 1,43 W/m<sup>2</sup>) und bewirkte eine gleichmäßige Dunkelfeldausleuchtung im Aufnahmefeld. Nach der Adaptationszeit in der Versuchsanordnung begann die Videoaufzeichnung, wobei der gesamte Versuch auf Videoband festgehalten wurde. Der Versuchsablauf gliederte sich in drei aufeinander folgende Abschnitte:

1. Kontrollaufnahme ohne Magnetfeldexposition
2. Magnetfeldexposition (2 mT) der Ciliaten
3. Aufnahme nach Ausschalten des Magnetfeldes

Außerdem wurden Kontrollversuche über 90 Minuten ohne Magnetfeldexposition durchgeführt, um mögliche Effekte der Versuchsanordnung auf die Einzeller quantifizieren zu können, dabei zeigte sich kein Einfluß der Apparatur auf das Verhalten (Wilczek, 1998). Mit der Pawn-Mutante wurde gleich verfahren, aufgrund der hohen Zelldichte mußte die Kultur jedoch vor Befüllen der Kammern mit sterilem Cerophyll-Medium verdünnt werden.

## **2.5 Versuchsauswertung Verhalten**

Bei der Auswertung wurden die Parameter Schwimgeschwindigkeit und Geradlinigkeit der Schwimmbahnen bewertet. Die Bildverarbeitung und Bildauswertung erfolgte in Echtzeit. Das Grundprinzip der hier verwendeten Software zur Bewegungsanalyse von Mikroorganismen entwickelten Häder und Lebert (1985) und Häder und Vogel (1991), wobei die verwendete Version von Media AV Multimedia und Software GmbH (Erlangen) programmiert wurde. Die über dieses Programm ermittelten Ergebnisse sind von hoher statistischer Aussagekraft, da pro Zeiteinheit von 10 Minuten mindestens

1000 Tracks erfaßt wurden. Nach Auswertung liegen die Schwimmggeschwindigkeiten als Pixel pro Sekunde vor. Um diese in  $\mu\text{m/s}$ , also absolute Strecken, umrechnen zu können, wurde das Bildverarbeitungssystem für die 12 x Objektivvergrößerung der Stereolupe kalibriert. Zu diesem Zweck nahm man ein in der Ebene der Versuchskammer liegendes Objektmikrometer auf Video auf und kalibrierte im Analyseprogramm mit Hilfe dieser Bezugsgröße die Daten. Aus dieser Messung ergab sich: 1 Pixel = 6,13  $\mu\text{m}$ . Es wurde eine Echtzeit-Videobildverarbeitungskarte vom Typ Matrox Meteor und ein Pentium Computer mit MGA Grafikkarte verwendet. Die Bildverarbeitungskarte digitalisiert das S/W Videosignal mit 256 Graustufen und einer Auflösung von 768 x 576 Pixel (=Bildpunkte). Durch asynchrone Verarbeitung mit 2 Bildpuffern, die eine gleichzeitige Digitalisierung eines Videobildes und Verarbeitung des vorherigen Bildes erlaubt, erreicht man Echtzeitverarbeitung mit 25 Bildern/s. Die Bewegung eines Objektes nimmt die Kamera als Grauwertänderung wahr. Ihre Position, die Hauptachse, die Ausmaße und Größe des Organismus wird über einen Schlüsselcode festgestellt (Freeman, 1980). Außerdem wird das Objekt bei ständiger Überprüfung der Formparameter über die aufgenommene Bildfolge hin verfolgt. Ist die Schwimmrichtung von der vorhergegangenen Sequenz bekannt, erfolgt eine Verwertung dieser Information vom Suchalgorhythmus. Abhängig vom Prozessor können im Beobachtungsfeld bis zu 20 Organismen zufällig ausgewählt und in Echtzeit verfolgt werden. Ein Objekt kann durchaus mehrmals hintereinander bearbeitet werden; wie oft ein *Paramecium* registriert wird, hängt von dessen Geschwindigkeit und der gewählten Vergrößerung ab. Die durchschnittlichen Zellgröße von *Paramecium* beträgt ungefähr 200  $\mu\text{m}$  und die Zellen haben eine mittlere Schwimmggeschwindigkeit von 500  $\mu\text{m/s}$ . Bei einem Kammerdurchmesser von 27 mm bräuchte theoretisch eine Zelle bei genau linearer Schwimmbahn 54 Sekunden vom Meßbereich in der Kammermitte bis zum Rand der Kammer und zurück in den Meßbereich. Bei Messungen unter 1 Minute und linearer Schwimmbahn ist somit davon auszugehen, daß keine Zelle zweimal gemessen wird. Weichen die Zellen stark von der geraden Schwimmbahn ab, nimmt die Wahrscheinlichkeit einer wiederholten Messung derselben Zelle zu. Bei den vorliegenden Messungen sind die Abweichungen von der linearen Schwimmbahn jedoch meist nicht so extrem.

Die Auswertungsmethode und die flache Kammer (Hemmersbach, 1997) ermöglicht eine zweidimensionale Analyse der Bewegungen der Zellen. Die Schwimmbahnen werden so lange registriert, bis ein Verfolgen der Organismen nicht mehr möglich ist; dies trifft beim Verlassen des Bildfensters und beim Zusammenstoß mit anderen Zellen zu. Beim Zusammenstoß mit anderen Zellen kann keine eindeutige Objektzuordnung mehr erfolgen. Das Bildverarbeitungsprogramm bietet die Möglichkeit, zu kurze Spuren oder Artefakte (z. B. ausgewertete Schmutzpartikel) zu löschen und so aus der

Bewertung auszuklammern. Alle Dateien wurden manuell einzeln auf diesen Aspekt hin überprüft. Die Einteilung der Schwimmbahnen erfolgt in Abschnitte definierter Länge; hierbei wird der Anfangspunkt der Bahnverfolgung markiert. Das Programm hat den Vorteil, lange Spuren, sogenannte "Longtracks", aufzeichnen zu können, so daß eine 1:1 Wiedergabe der realen Schwimmbahnen möglich ist. Durch Richtungsänderungen zwischen zwei Spurabschnitten werden Richtungswechsel ermittelt. Mit Hilfe des direkten Abstandes vom Startpunkt bis zum Endpunkt der Bahn läßt sich der Linearitätsindex berechnen (Batschelet, 1981). Der Linearitätsindex ist ein Maß für die Geradlinigkeit der Schwimmbahnen. Er kann zwischen 0 und 1 liegen, wobei ein Linearitätsindex von 1 eine exakt gerade Bahn und ein Index von 0 ein Kreiselschwimmen definiert. Der Index ist also um so kleiner, je gekrümmter die Schwimmbahn ist. Die Linearität der Schwimmbahn wird durch die "Netto-Ortsveränderung"  $|S|$  zwischen Spurbeginn und Spurende sowie der Wegstrecke  $w$  über alle Spurpositionen bestimmt. Aus allen bestimmten Linearitätsindices innerhalb einer Messung wird der Mittelwert berechnet (= mittlerer Linearitätsindex).

## **2.6 Versuchsdurchführung Biochemie**

Da der Gehalt der Sekundären Botenstoffe der Zellen stark vom physiologischen Zustand abhängt, wurden nur Kulturen ungefähr gleichen Alters in der stationären Wachstumsphase (15-30 Tage) verwendet und die Untersuchungen zur gleichen Tageszeit (zwischen 16.00 Uhr und 17.30 Uhr) durchgeführt. Für die biochemischen Untersuchungen waren die Versuchskammern 4 x so tief wie die Kammern für die Verhaltensuntersuchungen (4 mm tief, Durchmesser 27 mm, 4 ml Volumen), da für die Bestimmung der Sekundären Botenstoffe mehr Zellen nötig waren. Zur Bestimmung eines cAMP oder cGMP Meßwertes wurden 2 ml MOPS-Puffer mit einer hohen Parameciendichte (200-500  $\mu\text{g}$  Protein) benötigt. Nach Überführung der im MOPS-Puffer befindlichen Einzeller (= 2 ml) in die Versuchskammern, folgte eine Adaptationsphase für 4 Stunden (nach Schultz et al., 1992) in den Kammern bei Raumtemperatur im Versuchsraum und bei Grünlicht, bei dem auch der Versuch durchgeführt wurde. Anders als bei den Verhaltensversuchen wurden die Deckgläser nicht mit Paste befestigt, sondern nur auf die Kammer aufgelegt, um einen schnellen und erschütterungsfreien Zugang bei der Fixierung zu ermöglichen. Nach der vierstündigen Adaptationszeit setzte man die beiden Kammern willkürlich in eins von zwei identischen Spulenpaaren und ließ sie nochmals 20 Minuten ohne Erschütterung stehen, damit eventuell auftretende Veränderungen im Gehalt der Sekundären Botenstoffe durch die mechanische Reizung wieder abklingen konnten. An eins der beiden Spulenpaare wurde dann für eine definierte Zeit ein Spulenstrom von 0.8 A angelegt, das entspricht

einer Flußdichte B von 2 mT des induzierten Magnetfeldes. An das zweite Spulenpaar wurde kein Strom angelegt; die Ciliaten in dieser Kammer dienten als Kontrolle.

Es wurden folgende Expositionszeiten gewählt, bevor die Fixierung der Zellen erfolgte:

- 1 Sekunde Magnetfeldexposition
- 2 Sekunden Magnetfeldexposition
- 4 Sekunden Magnetfeldexposition
- 6 Sekunden Magnetfeldexposition
- 8 Sekunden Magnetfeldexposition
- 10 Sekunden Magnetfeldexposition
- 20 Sekunden Magnetfeldexposition
- 30 Sekunden Magnetfeldexposition
- 40 Sekunden Magnetfeldexposition
- 50 Sekunden Magnetfeldexposition
- 60 Sekunden Magnetfeldexposition
- 2 Minuten Magnetfeldexposition
- 5 Minuten Magnetfeldexposition
- 10 Minuten Magnetfeldexposition
- 20 Minuten Magnetfeldexposition
- 15 Minuten Magnetfeldexposition
- 30 Minuten Magnetfeldexposition

Nach Ablauf der definierten Expositionsdauer wurden die magnetfeldexponierten Proben und die Kontrollen mit 2 M Perchlorsäure (= 13.2 %) fixiert. Diese starke Säure tötet die Versuchstiere sofort, so daß keine weitere Reizaufnahme erfolgte. Nach Zugabe der Perchlorsäure wurden die Zellen in zwei 2 ml Eppendorf Caps überführt. Zur cAMP Extraktion inkubierten diese Caps für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurden sie bei  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bis zur Auswertung dort aufbewahrt.

## **2.7 Versuchsauswertung Biochemie**

Zum Homogenisieren wurden die Proben aufgetaut, in einen Glashomogenisator (5 ml) überführt und für mindestens 2 Minuten mit einem elektrischen Homogenisator (B. Braun, Melsungen) bei 1200 U/min homogenisiert. Diese Lösung wurde in zwei neue Eppendorf Caps (2 ml) überführt und bei 15000 U/min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten zentrifugiert (Heraeus-Megafuge 1R). Der unbedingt klare Überstand, der das cAMP/cGMP-Extrakt enthielt, wurde in kleine (10 ml) Bechergläser überführt und mit ca. 300  $\mu\text{l}$  NaOH (32 %) und 600  $\mu\text{l}$  1N NaOH neutralisiert. Anschließend gab man 1 ml

des Überstands in Polyesterl rhrchen (10 ml) und verschloß diese fest mit Parafilm. Der Parafilm wurde einige Male mit einer Nadel eingestochen, um die spätere Trocknung zu ermöglichen. Die Aufbewahrung des restlichen Überstandes konnte bei  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  erfolgen und für weitere Bestimmungen der Sekundären Botenstoffe verwendet werden. Die portionierten cAMP/cGMP Extrakte wurden zur Vorbereitung auf die Gefriertrocknung über Nacht bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend in der Lyophylle für ca. 28 Stunden getrocknet. Danach wurden die gefriergetrockneten Proben in  $350\text{ }\mu\text{l}$  cAMP/cGMP Probenpuffer aufgenommen.  $100\text{ }\mu\text{l}$  dienten zur cAMP/cGMP Bestimmung, der Rest konnte bei  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden, falls noch zusätzliche cAMP/cGMP Bestimmungen nötig waren.

### 2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Das Proteinpellet wurde in  $1\text{ ml}$   $1\text{ N}$  NaOH gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur hydrolysiert. Anschließend konnte es bei  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden. Die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) wurde für Microtiterplatten und in NaOH gelöste Proteinproben modifiziert (Ivanova, 1997, mündliche Mitteilung). Das Ansetzen der Eichkurve erfolgte mit nachstehenden BSA (Bovine Serum Albumin) Konzentrationen, wobei die BSA Stammlösung mit  $0.8\text{ N}$  NaOH verdünnt wurde:

[ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	50	100	150	250	500	750	1000
----------------------	---	----	-----	-----	-----	-----	-----	------

Die in  $1\text{ N}$  NaOH gelösten Proteinproben konnten bei zu hoher Proteinkonzentration (d. h. Proteinkonzentrationen, die aus dem Eichbereich fielen) mit  $0.8\text{ N}$  NaOH verdünnt werden (z. B. 1:2).  $20\text{ }\mu\text{l}$  BSA-Standard oder Proteinprobe,  $30\text{ }\mu\text{l}$   $0.8\text{ N}$  NaOH und  $150\text{ }\mu\text{l}$  Kupferreagenz wurden pro Well in die Microtiterplatte gegeben. Die Platte inkubierte für 10 Minuten bei Raumtemperatur, in dieser Zeit erfolgte die Bildung eines Kupfer-Proteinkomplexes. Durch Zugabe des Folinreagenz wurde die Farbreaktion mit dem gebundenen Kupfer ausgelöst, eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur war hierbei erforderlich. Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Proben erfolgte photometrisch, d.h. die Extinktion der Einzelproben wurde im Verhältnis zu der Eichkurve bestimmt. Die Extinktion ist definiert als  $E = \log(I_0/I)$ , hierbei ist  $I_0$  die Intensität des einfallenden und  $I$  die des austretenden Lichts. Es galt: je größer die Proteinmenge in der Probe, desto stärker war die Lösung gefärbt, da mehr Protein-Kupfer-Komplexe vorlagen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei  $620\text{ nm}$  im Photometer Anthos 2000 (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland). Proteinkonzentrationen unterhalb von  $0,1\text{ mg/ml}$  wurden nicht in die Auswertungen mit einbezogen, da bei so geringen Zellkonzentrationen eine genaue Bestimmung der cAMP-Konzentrationen nicht möglich war.

### **2.7.2 Durchführung des cAMP Assays (FIA)**

Es handelt sich hierbei um ein Fluoreszenz-Immuno-Assay, der von Ivanova (1997, mündliche Mitteilung) nach Dressendörfer et al. (1995) modifiziert wurde. Zuerst wurde der 2. unspezifische Antikörper (Kaninchen-Anti-Ziege) an die Microtiterplatte (NUNC: F96 Maxisorp, Nunc-Immuno plate, 4-42404, batch 008027) gebunden (Festphasenimmuno-assay). Es folgten drei Waschschriffe und das Abblocken der Reaktion durch Absättigungspuffer. Nach dreimaligem Waschen der Platten erfolgte die Bindung des spezifischen 1. Antikörpers (Anti-cAMP Ziege) und die Zugabe der Proben bzw. der Standards und des Tracers. Vorher wurden alle Proben und Standards mit Bernsteinsäureanhydrid (in Triethylamin gelöst) succinyliert. Die Reaktion der nucleophilen Gruppe an der 2`-O Position führt zu einer negativeren Nettoladung des Proteins und einer Erhöhung der Löslichkeit (Steiner et al., 1970), so daß die Wahrscheinlichkeit der Bindung des succinylierten cAMP an den Antikörper steigt. Der 2. Antikörper band an den auf der Matrix gebundenen 1. Antikörper. Dabei erfolgte die spezifische Bindung des in den Proben enthaltenen cAMP an den 1. Antikörper. Nach erneutem Waschen wurde eine Europium-Streptavidin (Delfia Eu-labelled Streptavidin) Lösung zugegeben, die für die Fluoreszenz verantwortlich war. Hierbei konnte die Bindung nur mit noch ungebundenen unspezifischen 1. Antikörpern erfolgen, d.h. je mehr cAMP in einer Probe vorhanden war, desto geringer war die Menge des gebundenen Europiums. Je größer also die cAMP Konzentration in der Probe, desto schwächer war der Fluoreszenzwert des Wells. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Europiums fand die Messung der Fluoreszenz mit einem Fluorometer (Wallac, 1234 Delfia Research, Wallac, Turku, Finland) statt. Die Messung der Werte erfolgte mittels Normierung über die Eichkurve/Standards auf der Microtiterplatte. Durch die relativ hohe Absorptionsrate von Streptavidin bei 280 nm erzielt die direkte spektroskopische Quantifizierung der Streptavidin-Konjugate unbefriedigende Ergebnisse, daher wurden die Proteinkonzentrationen nach der Methode von Lowry (1951) ermittelt (Suonpää et al., 1992). Die cAMP Konzentrationen konnten mit Hilfe der Lowry-Proteinbestimmung und Verrechnung der benutzten Flüssigkeitsvolumina normiert werden => Einheit [pM cAMP/mg Protein]. Die Auswertung erfolgte im Triplett.

### **2.7.3 Durchführung des cGMP Assays (RIA)**

Die zur cGMP Bestimmung ausgesuchten Proben wurden in cGMP-Probenpuffer (Natriumacetat-Puffer 50 mM, pH 4,0) gelöst und mit einem Radioactive-Immunoassay (Ivanova et al., 1990) bestimmt. Der Radioimmunoassay von cyklischen Nukleotiden basiert auf den Konzepten von Yalow und Berson (1960) für die Messung von Peptidhormonen. Markierte und unmarkierte Antigene konkurrieren um die Bindungsstellen von spezifischen Antikörpern (=AK), was zu einer Mischung von AK-

gebundenen markierten Antigenen, freien markierten Antigenen, AK-gebundene unmarkierte Antigene und freien unmarkierten Antigenen führt. Die Anzahl von markierten Antigenen, die an den Antikörper gebunden ist, nimmt ab, wenn die Zahl der unmarkierten Antigene erhöht wird. Es wird die Menge oder die Rate des gebundenen im Verhältnis zum freien Antigen bestimmt (Steiner et al., 1970). Hohe cGMP Konzentrationen werden durch geringe Radioaktivität, niedrige cGMP Konzentrationen durch hohe Radioaktivität wiedergegeben. Die jeweiligen Konzentrationen konnten anhand einer Standardkurve ermittelt werden. Die Standards wurden in folgenden Konzentrationen angesetzt: 32 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM. Anschließend pipettiert man je 50 µl der Standardkurve, der Kontrollen (1,5 nM und 5,5 nM), NSB (= nicht spezifische Bindung, 100 µM), Bo (nur NaAC-Puffer, maximale Bindung) und der Proben in Triplets in Immuno-Röhrchen (PP, Sarstedt 73.1055) und führt sie in eine Aluminiumhalterung (Sarstedt: 95.1012) ein. In die Röhrchen für die Bestimmung der Totalaktivität (=Totals) wurde nur 50 µl Tracer pipettiert. In alle anderen Röhrchen kamen 50 µl Tracer (cGMP-Iod<sup>125</sup>, Du-Pont-Deutschland GmbH (NEN), Bad Homburg) und 50 µl Antikörpergemisch (außer in die Totals). Die Röhrchen wurden mit Eindrückstopfen verschlossen (Sarstedt 651375) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Herstellung der Gebrauchslösung des Tracers erfolgte durch 1:400 Verdünnung mit Natriumacetat-Puffer, die Total-Counts sollten bei 5000 bis 10000 liegen. Das Antikörpergemisch bestand aus Natriumacetat-Puffer mit 0,5 % BSA (Rinderalbumin, SIGMA: A7906), 0,9 % NaCl, γ-Globulin 5 mg/ml (SIGMA, Kaninchen, G 0261) und dem 2. Antikörper (Ziege (a) Kaninchen pur, DIANOVA). Nach der Inkubation über Nacht, bei der radioaktiv markiertes und unmarkiertes cGMP um die Bindung an den Antikörper konkurrierten, wurde in alle Röhrchen, außer den Totals, 250 µl NaCl pipettiert und bei 2000 g (=3600 U/min) für 10 Minuten bei 10 °C zentrifugiert. Dann wurden die Lösungen mit dem Absaugrechen entfernt und die Waschprozedur nochmals wiederholt. Nach Überführen der Röhrchen in die Zähl-Racks wurde die Radioaktivität im Gamma-Counter (Wallac, 1470 Wizard, Automatic Gamma Counter, Wallac, Turku, Finland) gemessen und die Probenkonzentration aus der Standardkurve ermittelt. Die cGMP Konzentrationen konnten mit Hilfe der Lowry-Proteinbestimmung und Verrechnung der benutzten Flüssigkeitsvolumina normiert werden, somit ergibt sich die Einheit [pM cGMP/mg Protein]. Die Auswertung erfolgte im Triplett.

#### **2.7.4 Auswertung der FIA- und RIA-Daten**

Da die Zellzahl in den Kammern bei der Aufteilung nicht exakt definiert war, kam es hier zu Differenzen. Diese Unterschiede konnten durch die Normierung der cAMP/cGMP Werte auf die Proteinkonzentrationen ausgeglichen werden. Es besteht keine Korrelation zwischen der cAMP/cGMP Konzentration und der Zelldichte in der Kammer (siehe Diplomarbeit Wilczek, 1998). Ebenso zeigte sich bei den Kontrollen keine

Korrelation zwischen Verweildauer im Rotlicht (4-8 Lux, 1,9 W/m<sup>2</sup>) und der cAMP Konzentration in der Zelle. Es ist anzunehmen, daß auch das verwendete Grünlicht (Wellenlänge 565 nm, ca. 320 Lux in der Kammerebene, Lichtenergie: 1,43 W/m<sup>2</sup>) keine Auswirkung hat, denn nach Iwatsuki und Naitoh (1982, 1983) hat Licht > 500 nm keinen Effekt auf *Paramecium*.

Da die Stichprobenzahl bei den biochemischen Versuchen oft nicht mehr als  $n = 7$  betrug, konnten meist keine Konfidenzbereiche berechnet werden. Statt der Differenzen zwischen Kontrollen und Magnetfeldmessungen wurden die prozentualen Veränderungen aufgetragen, da zwischen Grundzustand und Reaktion ein linearer Zusammenhang besteht (siehe 3.6); dieser wurde statistisch anhand einer Korrelationsanalyse abgesichert. Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte daher anhand der prozentualen Abweichungen der magnetfeldexponierten Proben von den Kontrollen. Anstelle von Mittelwerten wurden grundsätzlich Mediane berechnet, da die Daten pro Zeiteinheit keine Normalverteilung aufwiesen (Sachs, 1984). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des U-Tests (nach Mann-Whitney) für die einzelnen Datenpunkte und des t-Tests nach Student für den gesamten Datensatz (bei der Darstellung der prozentualen Änderung). Die Nullhypothese, daß kein Unterschied zwischen den getesteten Datensätzen besteht, wird verworfen, wenn  $p$  kleiner als 0,05 ist.

### **2.7.5 Durchführung des cGMP Assays (EIA)**

Es sollte eine Alternative zur radioaktiven Markierung von cGMP mit einem kommerziell erhältlichen Kit getestet werden. Bei dem Assay handelte es sich um ein kompetitives Immunoassay für die quantitative Bestimmung von cGMP in Proben. Der Kit verwendet polyklonale Antikörper (Ziegen-Anti-Kaninchen IgG) gegen cGMP, um das cGMP in der Probe oder ein alkalisches Phosphatasemolekül, daß kovalent an cGMP gebunden ist, kompetitiv zu binden. Nach einer gleichzeitigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die überschüssigen Reagentien ausgewaschen und das Substrat zugegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde die Enzymreaktion gestoppt und die gelbe Farbe, die entstanden war, von einem Mikrotiterplatten-Leser bei 405 nm (geeicht auf das Blank Well) gelesen. Die Intensität der gebundenen gelben Farbe war umgekehrt proportional zu der Konzentration von cGMP in den Proben und den Kontrollen. Die gemessene optische Dichte wurde zur Berechnung der cGMP Konzentration benutzt. Auch hier wurden die Proben und Standards mit 0.5 ml Bernsteinsäureanhydrid (gelöst in 1 ml Triethylamin) succinyliert. Succinyliert wurden alle Standards und Proben, indem man 10 µl (bzw. 50 µl zu Zero Standard und NSB) des Succinylierungsreagenz zu je 200 µl Standard oder Probe zugab und für 2 s vortexte. Die cGMP Konzentrationen der Standards waren 100, 20, 4, 0,8 und 0,16 pM/ml. Alle Standards

und Proben wurden als Dupletts ausgewertet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Gebrauchsanweisung. Auf Logit-Log Papier wurde die prozentuale Bindung (B/Bo) gegen die cGMP Konzentration für die Standards aufgetragen. Dies ergab eine annähernd gerade Linie durch die Punkte. Die cGMP Konzentration der Unbekannten hätte durch Interpolation bestimmt werden können. Die Werte der untersuchten Proben lagen allerdings immer weit unter der geringsten zu messenden Konzentration; die Bindungaffinität scheint für das cGMP in unseren Proben mit diesem Assay nicht ausreichend zu sein. Durch Modifikation der Probenaufbereitung wäre eventuell ein besseres Ergebnis zu erzielen.

## **2.8 Einsatz von Blockern und mechanische Reizung**

### **2.8.1 Vortexen**

Um die Zellen mechanisch zu reizen, wurden sie für 5 Sekunden einer horizontalen und kreisförmigen Schüttelbewegung auf einem Schüttler von Janke und Kunkel (IKA Labortechnik, Staufen) ausgesetzt. Der Schüttler war auf die maximale Leistung von 2500 U/min eingestellt. Vorher adaptierten die Zellen 4 Stunden in Zentrifugenröhrchen in MOPS-Lösung (1 mM mit 1 mM K<sup>+</sup> und 1 mM Ca<sup>2+</sup>).

### **2.8.2 IBMX**

Um IBMX in kleinen Mengen zugeben zu können, wurde eine hoch konzentrierte Stammlösung von 20 mM in 50 mM NaOH angesetzt. Die Lösung von IBMX in NaOH ermöglichte eine höhere Konzentration der Lösung, da es sich darin besser als in MOPS-Puffer löst. Durch Zugabe geringerer Volumina konnten Verwirbelungen und mechanische Reizung vermieden werden. Wichtig war es festzustellen, ob IBMX in NaOH gelöst werden kann oder ob sich dann Probleme bei der FIA Durchführung ergeben. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß es für die cAMP Bestimmung keinen Unterschied machte, ob IBMX in NaOH oder MOPS-Puffer gelöst wurde.

Die Verhaltenskammer wurde für diese Versuche modifiziert, indem an zwei Seiten Löcher in die Plexiglasscheibe gebohrt wurden (Durchmesser 0,5 mm). In eines der Löcher wurde ein Tygonschlauch (Durchmesser 0,25 mm), an dessen Ende eine Spritze angebracht war, eingeführt. In der Spritze befand sich die gewünschte Lösungsmenge plus das Volumen, das bei Zugabe im Schlauch verblieb. Das zweite Loch in der Plexischeibe diente zum Druckausgleich. Die Effizienz der Durchmischung wurde durch Zugabe von Karminrot-gefärbtem Wasser getestet; es zeigte sich hierbei, daß die Durchmischung der Lösungen innerhalb weniger Sekunden stattfand. Gerade bei den Verhaltensversuchen war es wichtig, auch in der ersten Minute eine Analyse mittels Bildverarbeitung durchführen zu können, die bei Verwirbelungen nicht zuverlässig

arbeitet. In den Biochemie-Kammern konnte die Lösung von der Seite zugegeben werden. Mit wieviel Druck die Zugabe erfolgen mußte, wurde vorher ebenfalls mit Karminrot-gefärbtem Wasser untersucht. Die Zugabe der Lösungen erfolgte so, daß die Einwirkungszeit einen absoluten Wert darstellte. So wurden z. B. bei einer 30minütigen Einwirkung und einer 10minütigen Applikation des Feldes die IBMX-Lösung 20 Minuten vor Anschalten des Feldes zugegeben. Dabei wurden folgende Konzentrationen und Einwirkzeiten in verschiedenen Kombinationen verwendet: 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM; 1 Minute, 5 Minuten, 10 Minuten, 30 Minuten.

### **2.8.3 Koffein**

Außer IBMX wurde auch der Phosphodiesterase Hemmer Koffein auf seine Wirksamkeit hin getestet. Der Versuchsverlauf entsprach dem für die Applikation von IBMX beim Vortexen. Koffein wurde in einer Konzentration von 20 mM in MOPS-Puffer gelöst eingesetzt und für 5 oder 10 Minuten inkubiert, bevor die Proben fixiert wurden. Die Fixierungen fanden entsprechend der IBMX-Versuche sofort nach der Reizung statt.

## **2.9 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Mittels HPLC können auch sehr geringe Substanzmengen mit großer Genauigkeit detektiert und mehrere Indole aus derselben Probe bestimmt werden. Die Messungen wurden in Kooperation mit Frau PD Dr. Yvonne Balzer (Universität Göttingen) durchgeführt.

### **2.9.1 Versuchsdurchführung**

Die Zellen wurden im Kolben angereichert (2.2.3), dann abzentrifugiert und adaptierten 4 Stunden im MOPS-Puffer (1 mM mit 1 mM K<sup>+</sup> und 1 mM Ca<sup>2+</sup>) in. Alle Schritte der Proben-Aufbereitung wurden unter schwachen Rotlicht durchgeführt. Die magnetfeldexponierte Proben erfuhren eine Lichtintensität von ca. 4 Lux, die Kontrollen, die etwas näher an der Lampe standen, ca. 8 Lux. Melatonin und verwandte Indole wie 5`-Methoxytryptamin sind lichtempfindliche Substanzen und zerfallen unter normaler Lichteinwirkung rasch, im Rotlicht dagegen erfolgt dieser Zerfall wesentlich langsamer (Frowein und Lapin, 1979). Die geringe Lichtintensität im Versuchsraum trug ebenfalls zum möglichst langen Erhalt der Substanzen bei. Die Wanderung der Zellen erfolgte ebenfalls in Rotlicht, um schon zu diesem Zeitpunkt eine Zersetzung der Indole zu verhindern. Für jede Probe wurde 1 Kolben Paramecienkultur verwendet und wie oben beschrieben in die Kammern für biochemische Versuche überführt.

Das Magnetfeld wurde für folgende Zeiten appliziert:

- 1 Sekunde
- 5 Sekunden
- 10 Sekunden
- 20 Sekunden
- 30 Sekunden
- 40 Sekunden
- 50 Sekunden
- 60 Sekunden
- 120 Sekunden
- 300 Sekunden
- 600 Sekunden
- 900 Sekunden
- 1200 Sekunden
- 1800 Sekunden

Anschließend überführte man die Proben mit einer Pasteurpipette in einen Mörser mit flüssigem Stickstoff. Im Verhältnis 1:1 wurde 0,6 M Tris-HCl Puffer pH 8,6 zugegeben und solange gemörsert, bis ein weißes Pulver entstand. Dieses wurde mit einem Metallspatel in Plastikröhrchen überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterbearbeitung aufbewahrt. Die Proben tauten bei Raumtemperatur auf und wurden dann in Reagenzgläser umgefüllt. Dann erfolgte die Zugabe von 3 ml kaltem Diethyläther, den man mit den Proben durchmischte. Bei  $4^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (Klimakammer, Weiss Technik) wurden die Proben ca. 30 Minuten bis 1 Stunde leicht geschüttelt (Schüttler GFL 3016, mittlere Stufe) und anschließend 5 min bei 3000 U/min (Heraeus Labofuge 400e) zentrifugiert. Die Proben lagen nun in zwei Phasen vor: dem Pellet mit der wäßrigen Phase und der Ätherphase. Zur Trennung stellte man das Röhrchen in flüssigen Stickstoff. Das Pellet und die wäßrige Phase froren schneller als die Ätherphase, so daß diese nach einer bestimmten Zeit einfach in neue Röhrchen umgefüllt werden konnten. Die Ätherphase enthielt das Melatonin oder 5`-Methoxytryptamin. Alle Röhrchen dampften unter dem Abzug, mit durchlöcherter Aluminiumfolie bedeckt, über Nacht ab. Das Pellet wurde in 2 ml Eppendorfcaps überführt und konnte so für die Proteinbestimmung nach Lowry (1951) benutzt werden. Die Proben konnten bei  $-40^{\circ}\text{C}$  bis zur Proteinbestimmung aufbewahrt werden. Die abgedampften Überstände wurden in 100  $\mu\text{l}$  des Laufmittels Acetonitril (Aldrich, 99,93 %, HPLC grade) gelöst und in 0,5 ml Eppendorfcaps überführt. Die Herstellung des Laufmittel erfolgte durch Verdünnung im Verhältnis von 4:6 mit Aqua Bidest. Der Überstand konnte bis zur Bestimmung mittels HPLC bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Alufolie verpackt eingefroren werden.

### 2.9.2 Aufbau der HPLC-Apparatur

Melatonin und strukturverwandte Indole können mittels HPLC aufgetrennt werden. Die HPLC-Anlage der Firma LKB (LKB Biotechnology, Bromma, Schweden) umfaßte folgende Komponenten: eine HPLC-Pumpe (LKB Bromma, 2150 HPLC Pump), die über einen HPLC Controller (LKB Bromma, 2152 LC Controller) gesteuert wurde. Die Pumpe sorgte für einen kontinuierlichen Durchfluß des Acetonitril-Bidest-Gemisches durch die Säule. Die Flußrate für den Probendurchlauf wurde auf 0,25 ml/s eingestellt. Erfolgte keine Messung, betrug die Flußrate 0,01 ml/s. Ein Entgaser (DEGASYS DG-1310, uniflows) zwischen der Flasche mit Acetonitril und der Pumpe sorgte für luftblasenfreie Weiterleitung der Lösung. Durch einen Ultrograd Mixer Driver (LKB Bromma, 11300) wurde die Acetonitril-Lösung noch einmal vermischt, um eine homogene Lösung zu erhalten. Die Probe wurde über ein manuelles Proben-Aufnahmesystem (Syringe Loading Sample Injector, Modell 7125, Rheodyne, Cotati, California, USA) mit einer Spritze (100 µl, Glas) in das System gebracht. Die Proben liefen nun durch eine HPLC-Säule (Phenomenex, Typ: Luna 5u C18(2), Größe: 250 x 4.60 mm, 5u micron) und wurden dann mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda=280$  analysiert. Hierfür setzte man einen variablen HPLC-UV Detektor (LKB 2141, Variable Wavelength Monitor) ein. Der Detektor maß mit einer konstanten Frequenz von  $100\text{ s}^{-1}$ . Bevor das Säuleneluat in die Meßzelle gelangte, durchlief es einen Wärmetauscher, damit die Temperatur ausgeglichen wurde. Der Lichtweg war 6 mm lang. Die Lampe brauchte ca. 3 Stunden, bis eine stabile Nulllinie (Aqua Bidest wurde eingespritzt) zu erkennen war. Nach jedem Probenlauf mußte diese Prozedur wiederholt werden und die nächste Probe konnte erst eingespritzt werden, wenn wieder eine stabile Nulllinie erreicht war. Die Berechnung und der Ausdruck der Werte erfolgte durch einen Integrator C-R3A BASIC (Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Plant, Kyoto, Japan).

### 2.9.3 Kalibrierung und Auswertung

Die Berechnung der Menge an 5'-Methoxytryptamin erfolgte durch Integration der Peakfläche nach vorheriger Kalibrierung der Meßapparatur durch externe Standards. Die Konzentrationen wurden dann auf die Proteinmenge in der jeweiligen Probe umgerechnet. Die Messung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Für die grafische Darstellung und die statistische Auswertung der Daten gelten die gleichen Voraussetzungen wie unter 2.7.4 für RIA- und FIA-Werte beschrieben. Eine Ausnahme bildet die Darstellung des gesamten 5'-Methoxytryptamin-Datensatzes, der als Differenzen statt als prozentuale Änderung dargestellt wurde, da zwischen Grundzustand und Reaktion keine lineare Abhängigkeit besteht.

Standardherstellung: 3 mg 5'-Methoxytryptamin oder Melatonin wurden in 50 µl Methanol gelöst und dann mit Acetonitril/Bidest auf 1 ml aufgefüllt. Aus dieser Lösung wurde die Stammlösung angesetzt, indem sie 1:10 (100 µl Ursprungslösung plus 900 µl Acetonitril/Bidest) mit Acetonitril/Bidest verdünnt wurde. Aus der Stammlösung stellte man dann durch 1:10 Verdünnung Standardlösung A her. Verdünnte man diese Lösung wiederum 1:10, erhielt man Standardlösung B, die hier verwendet wurde.

Konzentrationen:

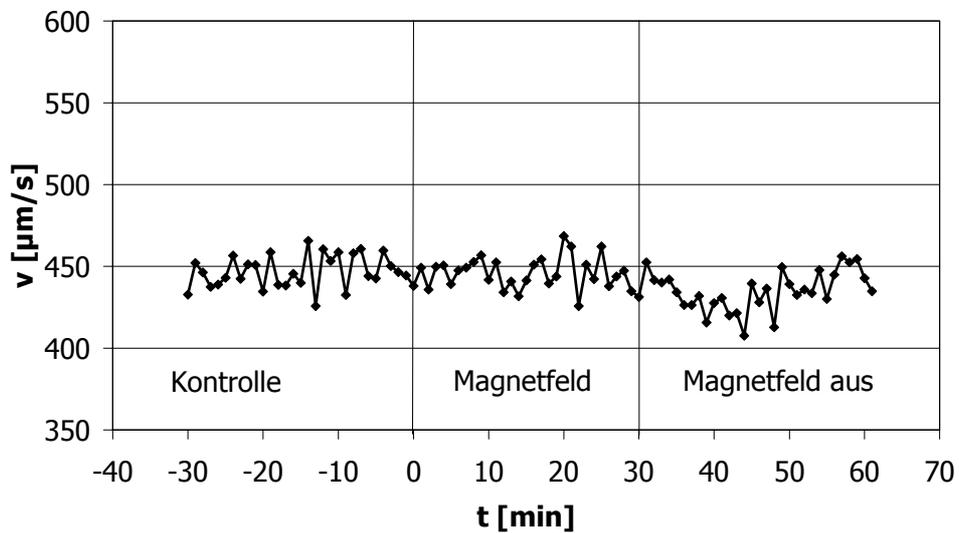
Ausgangslösung:	300 µg/100 µl
Stammlösung:	30 µg/100 µl
Standard A:	3000 ng/100 µl
Standard B:	300 ng/100 µl

## 3 Ergebnisse

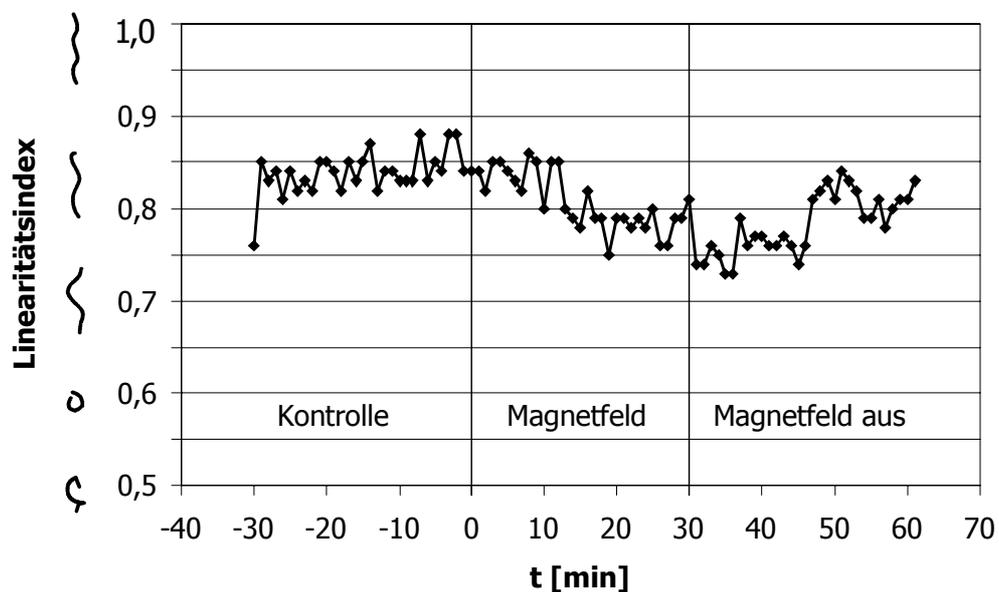
### 3.1 Verhalten

*Paramecium biaurelia* wurde für 30 Minuten einem Magnetfeld von 2 mT und 50 Hz ausgesetzt. Die Auswertung erfolgte in Minutenintervallen, um die Ergebnisse der Diplomarbeit (Wilczek, 1998) zeitlich detaillierter darzustellen und den Verlauf der Reaktion mit den biochemischen Analysen vergleichen zu können. Je nach Länge des Versuchs wurden durch die Auswertung maximal 92 einzelne Datenpunkte über Geschwindigkeit und Linearität der Schwimmbahnen gewonnen. In den meisten Versuchen (drei) nahm die Linearität ab, während die Geschwindigkeit relativ konstant blieb. In einem Versuch nahmen Linearität und Geschwindigkeit ab, in einem weiteren Versuch blieb die Linearität allerdings konstant und nur die Geschwindigkeit sank. In vier von den fünf Versuchen ist also eine Abnahme der Linearität zu beobachten, was die Ergebnisse meiner Diplomarbeit bestätigt. **Abbildung 3.1** zeigt den Verlauf der mittleren Geschwindigkeit eines exemplarischen Versuchs; die Geschwindigkeit zeigt während der Magnetfeldexposition keine signifikante Änderung im Verhältnis zur Kontrollmessung (U-Test:  $z = -0,37$ ,  $p = 0,355$ ), nimmt aber nach Abschalten des Feldes für ca. 20 Minuten leicht ab (U-Test:  $z = -3,53$ ,  $p = 0,0002$ ) und kehrt dann wieder auf den Kontrolllevel zurück. Der Linearitätsindex dagegen nimmt bei Applikation des Feldes sofort signifikant ab und wird während der 30minütigen Exposition kontinuierlich kleiner, wie **Abbildung 3.2** beispielhaft zeigt (U-Test:  $z = -3,2$ ,  $p = 0,00069$ ). An der y-Achse sind schematisch Schwimmspuren dargestellt, die in ihrer Form ungefähr dem nebenstehenden Wert des Linearitätsindex entsprechen und ein Maß für den Grad der Depolarisation der Zellen darstellen. Schaltet man das Feld ab, so sinkt der Linearitätsindex noch für einige Minuten signifikant ab (U-Test:  $z = -2,68$ ,  $p = 0,0037$ ) kehrt dann aber nach etwa 20 Minuten wieder auf die Ausgangswerte zurück.

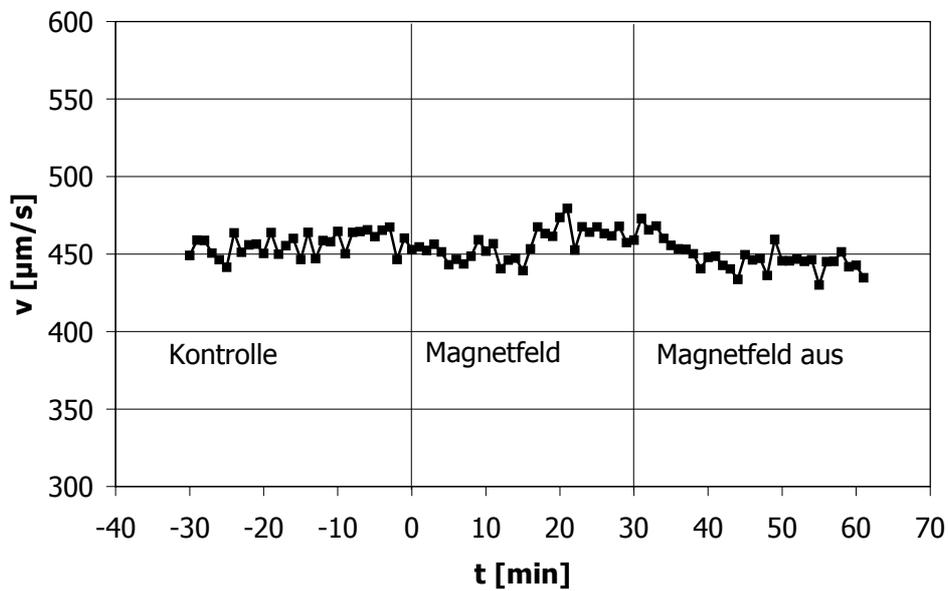
Trägt man die Mediane aller fünf Versuche in einer Grafik ab, so erkennt man keine deutliche Änderung der Geschwindigkeit bei Magnetfeldapplikation gegenüber der Kontrolle (**Abbildung 3.3**, U-Test:  $z = 0,087$ ,  $p = 0,47$ ). Der Linearitätsindex (**Abbildung 3.4**) dagegen nimmt bei Anschalten des Feldes nach ungefähr 5 Minuten signifikant ab (U-Test:  $z = -4,75$ ,  $p = 1,01 \cdot 10^{-6}$ ), wobei sich dieser Trend auch über die weitere Expositionszeit fortsetzt. Nach Abschalten des Feldes bleibt der Linearitätsindex erst einmal erniedrigt, kehrt aber 17 Minuten nach Reizende auf das Kontrollniveau zurück. Aus den gesamten Versuchen kann man also schließen, daß die Linearität der Schwimmbahnen durch das Feld abnimmt, während die Schwimmgeschwindigkeit weitgehend unbeeinflusst bleibt.



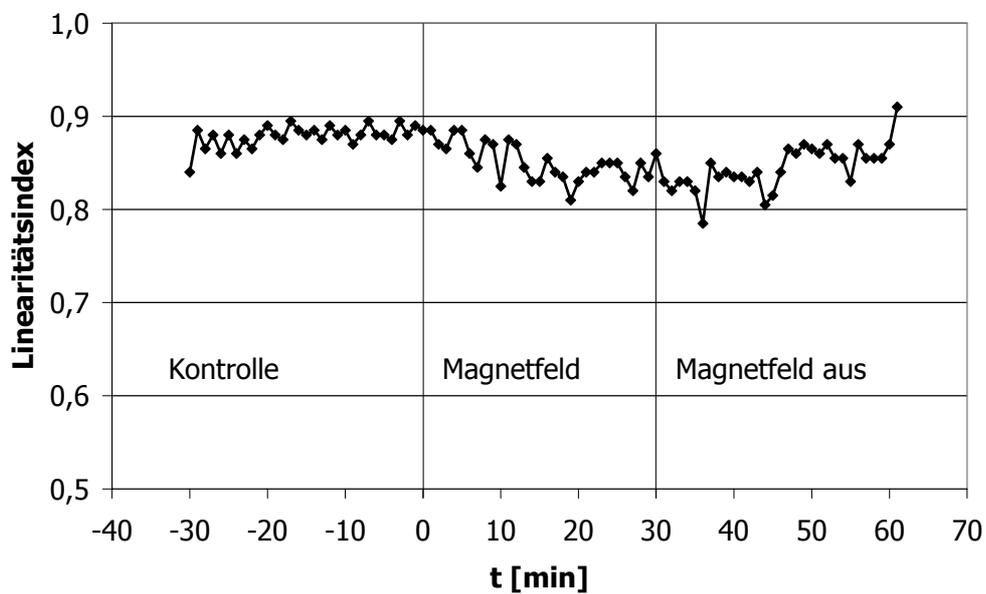
**Abb. 3.1:** Keine deutliche Änderung der mittleren Schwimgeschwindigkeit von *Paramecium biaurelia* während des Magnetfeldes ( $n = 300\text{-}400$  Spuren/Punkt).



**Abb. 3.2:** Abnehmender Linearitätsindex von *Paramecium biaurelia* bei Magnetfeldeinwirkung (50 Hz, 2 mT). Neben dem Linearitätsindex ist die in etwa der Spur entsprechende Form angegeben ( $n = 300\text{-}400$  Spuren/Punkt).



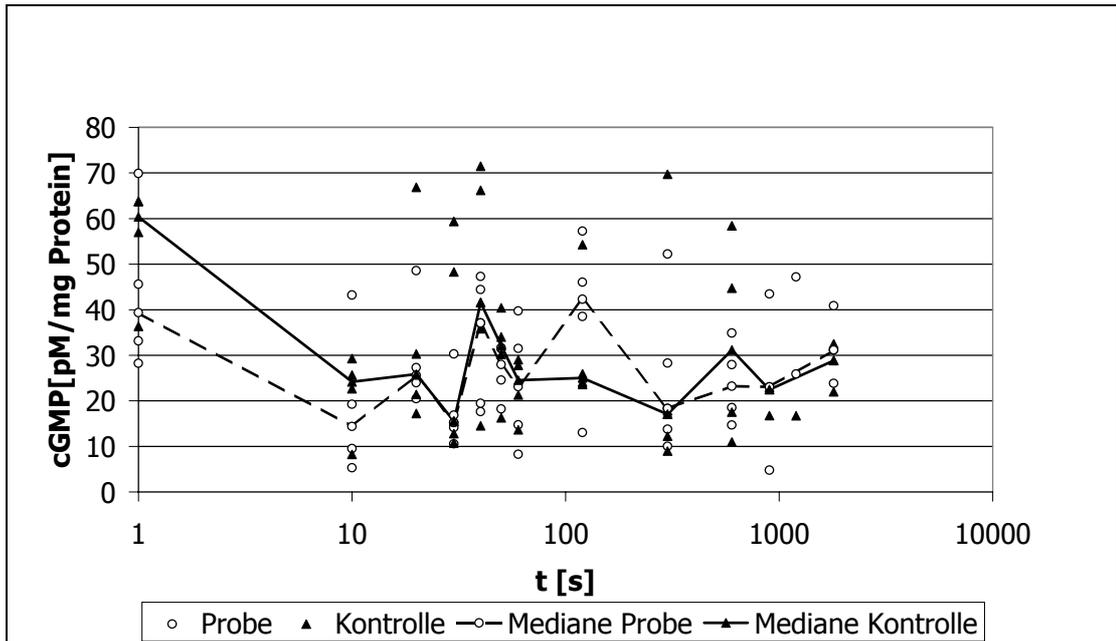
**Abb. 3.3:** Mediane Schwimmgeschwindigkeiten aus fünf Versuchen von *Paramecium biaurelia* vor, während und nach Magnetfeldeinwirkung (50 Hz, 2 mT,  $n$  = mindestens 2000 Spuren/Datenpunkt).



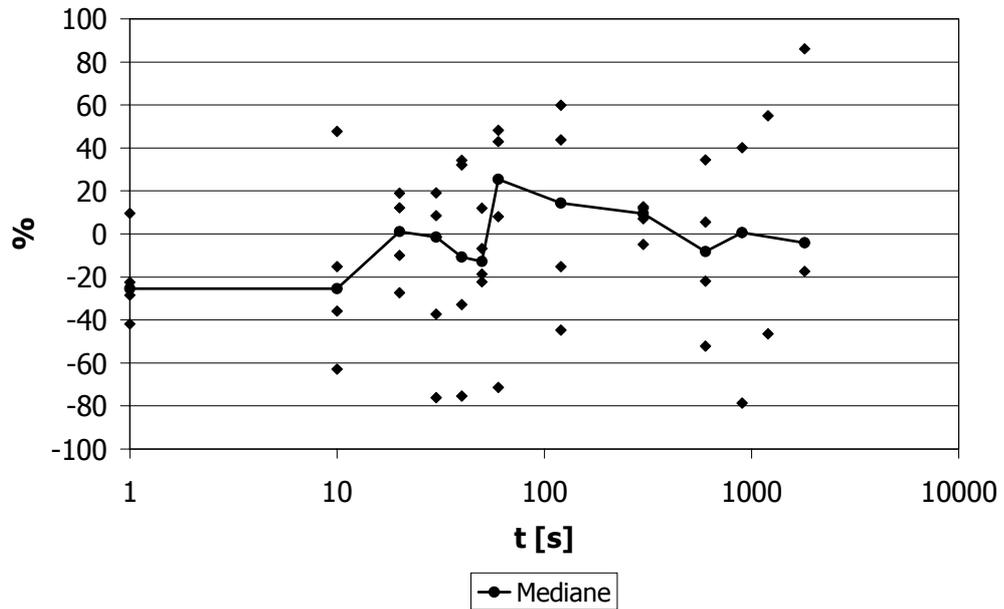
**Abb. 3.4:** Linearitätsindex von *Paramecium biaurelia* vor, während und nach Magnetfeldeinwirkung. Dargestellt sind die Mediane aus fünf Versuchen ( $n$  = mindestens 2000 Spuren/Datenpunkt).

### 3.2 cGMP

In allen Versuchen konnte eine deutliche Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen gezeigt werden, dies deutet auf eine Depolarisation der Zellen hin. Eine Depolarisation soll nach Schultz et al. (1985) mit einer cGMP Erhöhung verbunden sein, daher wurden die cGMP Konzentrationen nach Magnetfeldexposition bestimmt. **Abbildung 3.5** zeigt die absoluten cGMP Werte von magnetfeldexponierten Proben und Kontrollen. Die Zeitskala gibt im Fall der exponierten Proben die Dauer der Magnetfeldeinwirkung an. Ein Datenpunkt setzt sich aus verschiedenen unabhängigen Messungen zusammen. Diese Graphik stellt die absoluten Werte und ihre Mediane der cGMP Konzentrationen dar; es ist zu erkennen, daß die Werte der Kontrollen ungefähr zwischen 10 und 70 pM/mg Protein liegen. Es zeigt sich bei dieser Abbildung keine signifikante Reaktion auf die Magnetfeldapplikation (U-Test:  $z = -0,46$ ,  $p = 0,32$ ). Die Abnahme der cGMP Konzentration in den ersten 10 Sekunden ist ebenfalls nicht signifikant (U-Test:  $z = -0,52$ ,  $p = 0,30$ ). Auch bei Darstellung der prozentualen Änderung (**Abbildung 3.6**) sind keine signifikanten Differenzen der cGMP Konzentrationen von magnetfeldexponierten Zellen und den entsprechenden Kontrollpopulationen zu erkennen (t-Test:  $t = -0,71$ ,  $p = 0,49$ ). Ein negativer Wert bedeutet in dieser Art der Abbildung, daß die cGMP Konzentration der magnetfeldexponierten Probe niedriger als die der Kontrolle ist.



**Abb. 3.5:** Keine Änderung der cGMP Konzentrationen von *Paramecium biaurelia* nach verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung (50 Hz, 2 mT, n = 3-5)



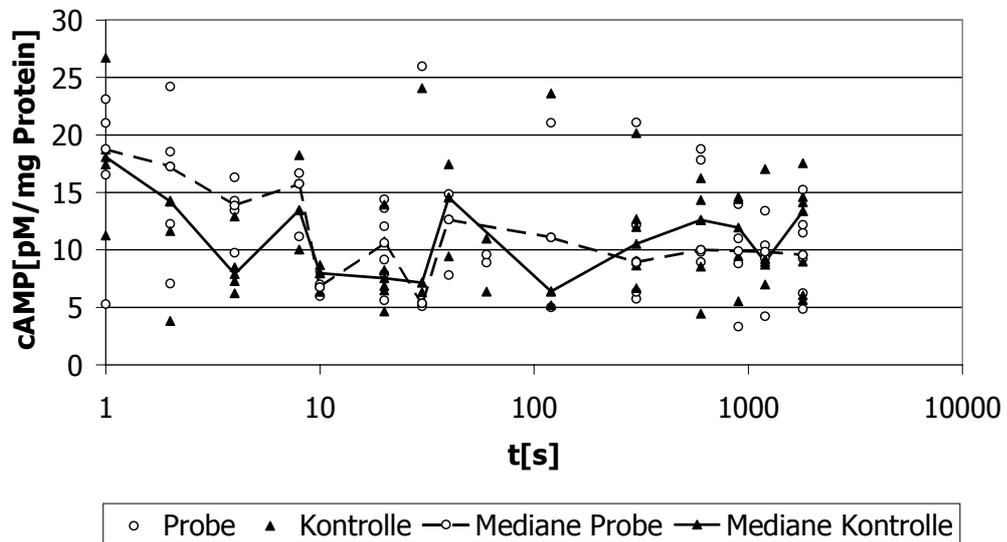
**Abb. 3.6:** Prozentuale Änderung der cGMP Konzentrationen von *Paramecium biaurelia* bei Magnetfeldeinwirkung (50 Hz, 2 mT, n = 3-5)

### 3.3 cAMP

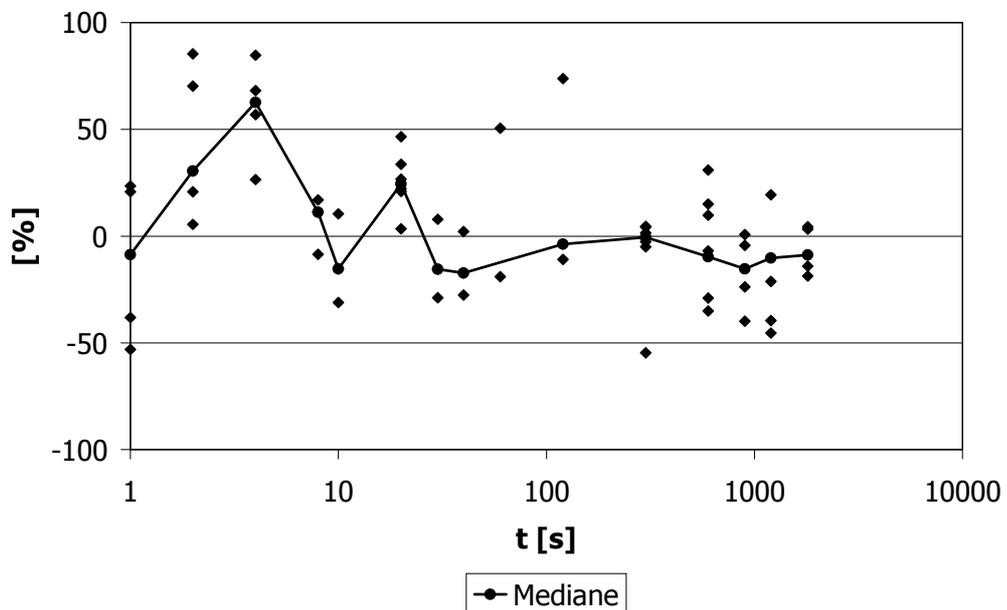
cAMP kann nicht nur die Schlagfrequenz, sondern auch Orientierung des Kraftschlages und damit die Form des Schwimmweges regulieren (Noguchi, 1991). Daher wurde auch dieser Sekundäre Botenstoff untersucht.

#### 3.3.1 cAMP ohne Blocker

**Abbildung 3.7** zeigt die absoluten cAMP Werte von magnetfeldexponierten Proben und Kontrollen. Die Zeitskala gibt im Fall der exponierten Proben die Dauer der Magnetfeldeinwirkung an. Besonders auffällig ist die signifikante Erhöhung der cAMP Konzentration in den ersten 2 bis 8 Sekunden der Magnetfeldexposition (U-Test:  $z = -1,76$ ,  $p = 0,039$ ). In der restlichen Expositionszeit zeigen sich keine weiteren signifikanten Änderungen der cAMP Konzentrationen (U-Test:  $z = -0,31$ ,  $p = 0,38$ ). Die cAMP Werte der Kontrollen liegen ungefähr zwischen 5 und 25 pM/mg Protein; der Mittelwert liegt bei 11,39 pM/mg Protein. Trägt man die prozentuale Änderung der cAMP Konzentration im Verhältnis zur Kontrolle (= 100%) auf (**Abbildung 3.8**), so erkennt man auch hier die gleichen zeitlichen Abfolgen wie bei **Abbildung 3.7**. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der cAMP Konzentration nach 1 Sekunde Magnetfeldapplikation (t-Test:  $t = 4,16$ ,  $p = 0,0016$ ), während bei weiterer Magnetfeldeinwirkung keine signifikanten Änderungen der cAMP Konzentration auftreten (t-Test:  $t = -0,90$ ,  $p = 0,37$ ).



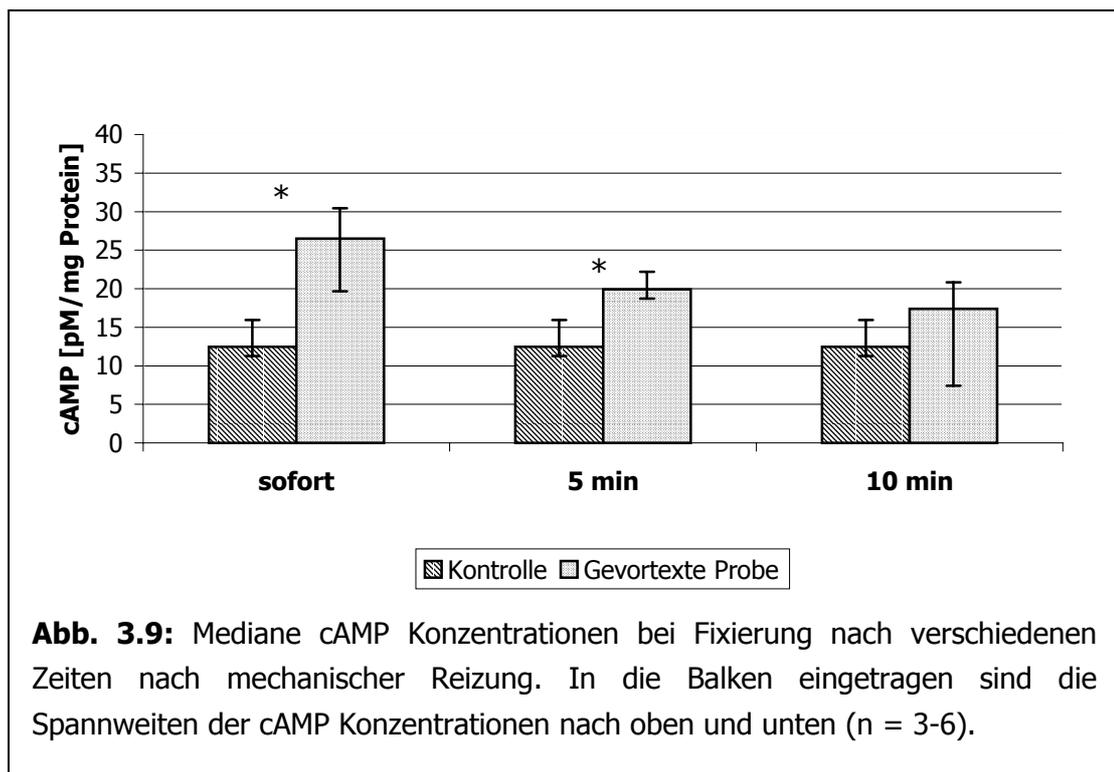
**Abb. 3.7:** Absolute cAMP Werte und Mediane von *Paramecium biaurelia* zu verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung (50 Hz, 2 mT, n = 3-5).



**Abb. 3.8:** Prozentuale Änderung der cAMP Konzentrationen von *Paramecium biaurelia* durch ein Magnetfeld (50 Hz, 2 mT, n = 3-5).

### 3.3.2 Positivkontrolle

Da sich nicht die erwartete Verringerung der cAMP Konzentrationen ergeben hat, stellte sich die Frage, wie die Erhöhung der cAMP Konzentration in den ersten Sekunden zu bewerten ist und ob das Modellsystem deutlich mit Änderungen von cAMP auf andere Reize reagieren kann. Deshalb wurden die Zellen einer Positivkontrolle unterzogen, indem ein Reiz appliziert wurde, der bekanntermaßen eine Hyperpolarisation und somit eine cAMP Erhöhung hervorruft (Hennessey et al., 1985; Bonini et al., 1986; Schultz et al., 1992). Dafür wurde *Paramecium* durch Vortexen mechanisch gereizt. Fixiert man die Zellen direkt nach der Reizung, so zeigt sich fast eine Verdopplung der cAMP Konzentration auf 26,52 pM/mg Protein gegenüber der Kontrolle von 12,48 pM/mg Protein (**Abbildung 3.9**; U-Test:  $z = 2,24$ ,  $p = 0,013$ ). 5 Minuten nach der Reizung ist die cAMP Konzentration zwar schon wieder auf 19,90 pM/mg Protein zurückgegangen, ist aber noch signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (U-Test:  $z = 2,12$ ,  $p = 0,017$ ) Nach 10 Minuten befindet sich der cAMP Spiegel bei 17,38 pM/mg Protein, also fast schon wieder auf dem Grundlevel (U-Test:  $z = 1,04$ ,  $p = 0,15$ ). Prozentual gesehen zeigt sich ein cAMP Anstieg um 187 % gegenüber der Kontrolle, fixiert man die Zellen direkt nach der Reizung. Nach 5 Minuten ist der cAMP Spiegel auf 140 % und nach 10 Minuten auf 120 % des unstimulierten Levels abgefallen. Auch Schultz et al. (1992) zeigten, daß nach einer cAMP Stimulation die cAMP Konzentration erhöht blieb und nur auf 175 % des unstimulierten Levels zurückging. Das System reagiert also eindeutig mit cAMP Erhöhung auf mechanische Reizung, die auf eine Hyperpolarisation hindeutet. Daher ist auch die cAMP Erhöhung durch das Magnetfeld als spezifisch einzustufen, da das Modellsystem differenziert auf Stimuli reagiert.

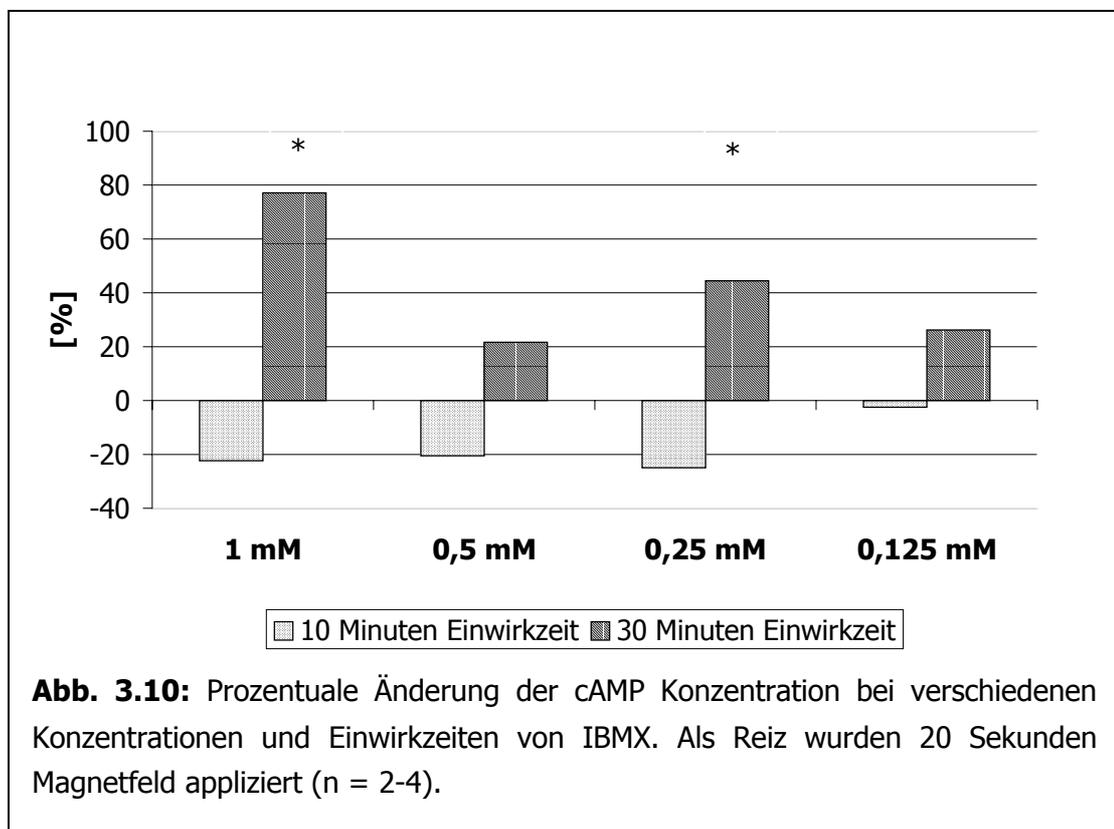


### 3.3.3 IBMX

Worauf beruht die cAMP Erhöhung in den ersten Sekunden der Magnetfeldexposition (siehe **Abbildungen 3.7** und **3.8**): auf einer Aktivierung der Adenylatcyclase oder einer Inaktivierung der Phosphodiesterase? Um dies zu überprüfen, wurde IBMX (Isobutylmethylxanthin) eingesetzt, damit die Phosphodiesterase gehemmt wird.

#### 3.3.3.1 Verschiedene Konzentrationen und Einwirkzeiten von IBMX

Zunächst wurden Konzentrationen und Einwirkzeiten von IBMX bei *Paramecium* für die Versuchsreihen in verschiedenen Vorversuchen getestet. **Tabelle 3.1** zeigt einige cAMP Konzentrationen für verschiedene Magnetfeldexpositionen und IBMX Konzentrationen und Einwirkzeiten. **Abbildung 3.10** zeigt die prozentualen Änderungen gegenüber der Kontrolle (=100 %) für 10 und 30 Minuten Einwirkzeiten und verschiedene IBMX Konzentrationen. Als Kontrollen galten die nur mit IBMX behandelten Proben, während die anderen Proben außerdem noch jeweils 20 Sekunden dem Magnetfeld ausgesetzt wurden. Es zeigte sich, daß 30 Minuten Einwirkzeit zur stärksten cAMP Erhöhung führt. Bei Konzentrationen von 0,25 mM und 1 mM IBMX konnten signifikante cAMP Erhöhungen festgestellt werden (U-Test:  $z = -1,96$ ,  $p = 0,02$ ). Die größten prozentualen Änderungen wurden allerdings bei 1 mM erreicht, daher wurde für die folgenden Versuche eine Einwirkzeit von 30 Minuten mit einer Konzentration von 1 mM IBMX gewählt.

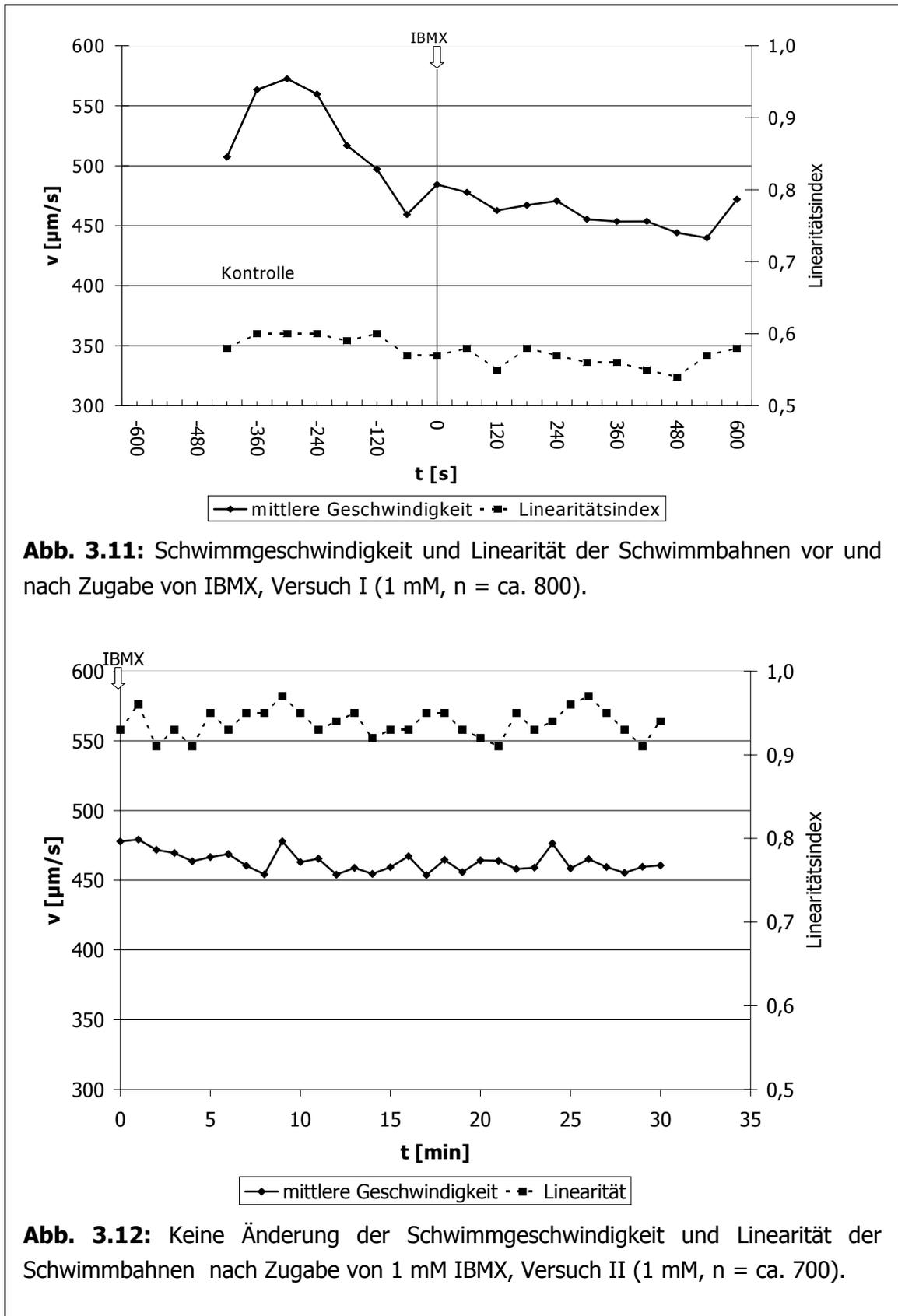


Konzentration IBMX [mM]	Einwirkzeit IBMX [min]	Magnetfeld- expositions- dauer [s]	Kontrolle cAMP [pM/mg Protein]	Exponierte Probe cAMP [pM/mg Protein]	n
1,000	5	20	6,62	9,93	3
1,000	10	20	15,31	11,89	3
0,500	10	20	25,42	20,20	3
0,250	10	20	28,19	21,14	3
0,125	10	20	13,94	13,59	2
1,000	10	10	19,00	18,63	3
0,250	10	8	11,45	13,14	4
1,000	30	20	6,35	11,25	4
0,500	30	20	9,86	11,99	4
0,250	30	20	9,15	13,22	4
0,125	30	20	7,07	8,92	4

**Tabelle 3.1:** cAMP Konzentrationen verschiedener Einwirkzeiten und Konzentrationen von IBMX nach unterschiedlich langer Magnetfeldexposition von *Paramecium biaurelia*.

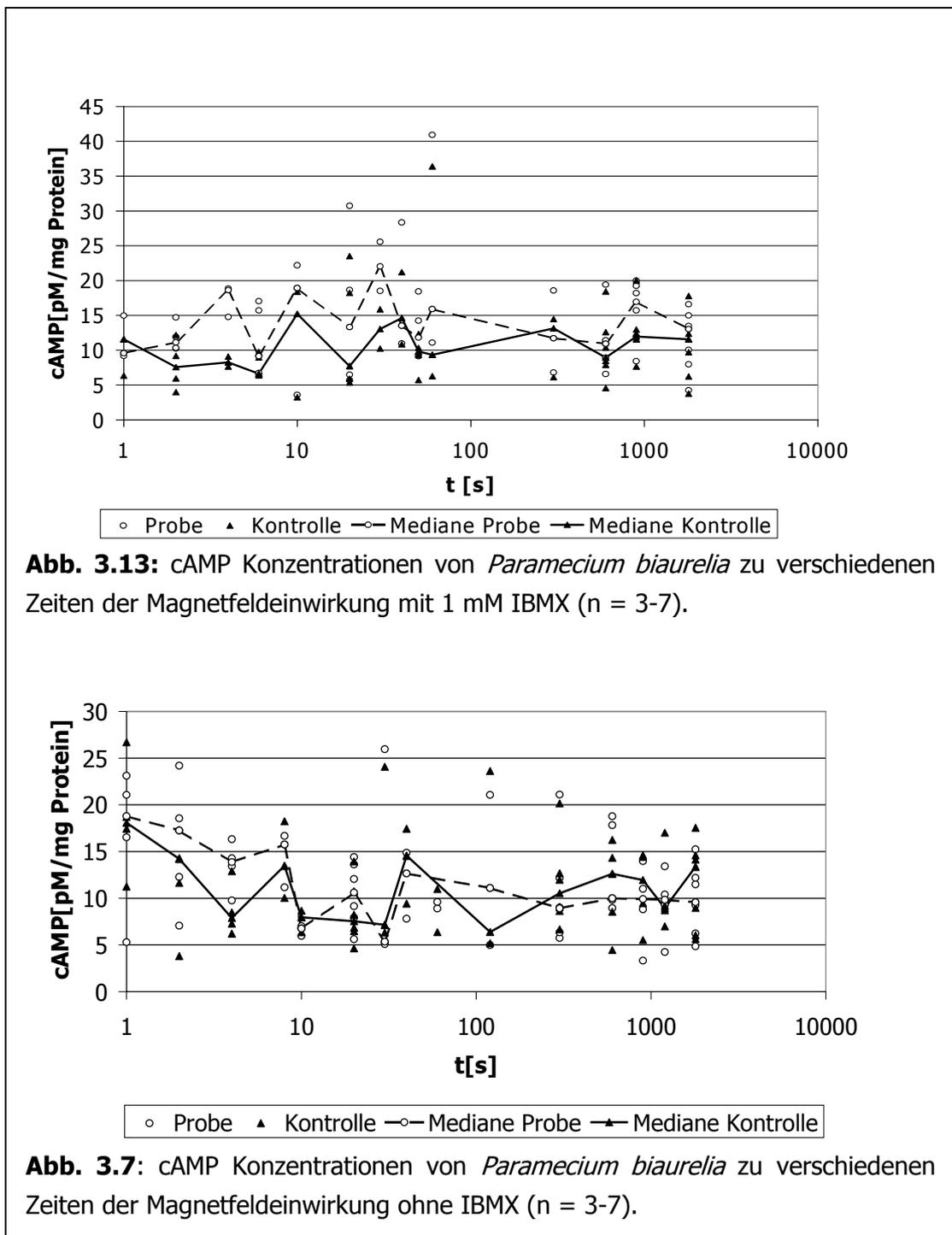
### 3.3.3.2 Toxizität

Ob IBMX in der verwendeten Konzentration und Einwirkzeit toxisch auf die Zellen wirkt, wurde in zwei Verhaltensversuchen getestet. Beide Versuche erwiesen, daß IBMX keinen Effekt auf das Verhalten der Zellen hat (**Abbildung 3.11 und 3.12**). Im ersten Versuch zeigt sich nach der Zugabe von IBMX, trotz ansteigender Geschwindigkeit in den ersten 120 s der Kontrollmessung, keine Fortsetzung dieses Trends.

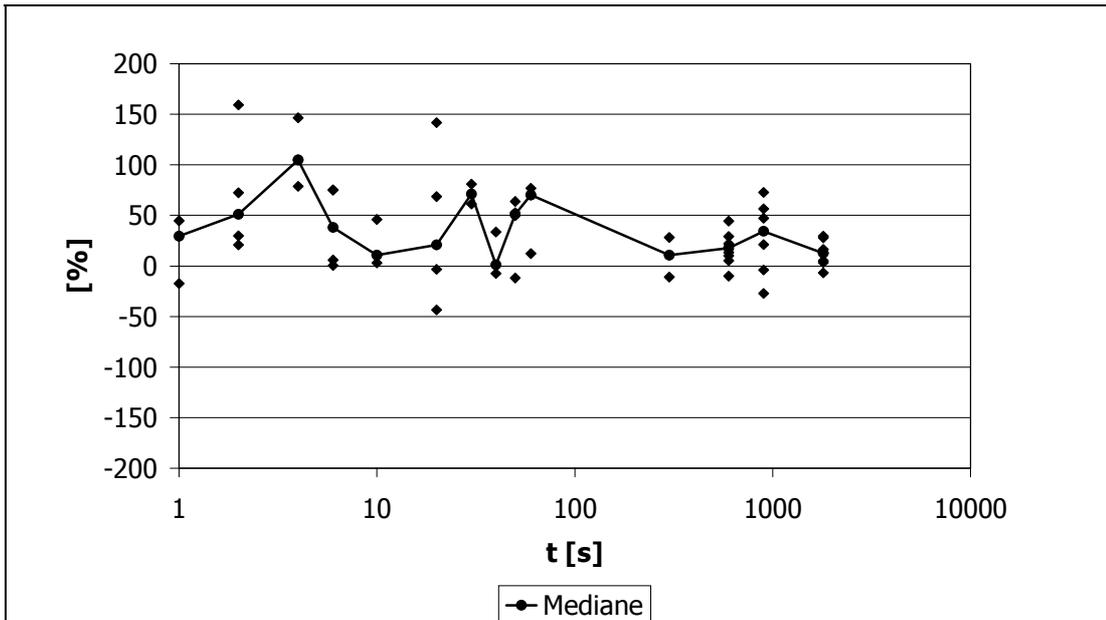


### 3.3.4 cAMP mit IBMX

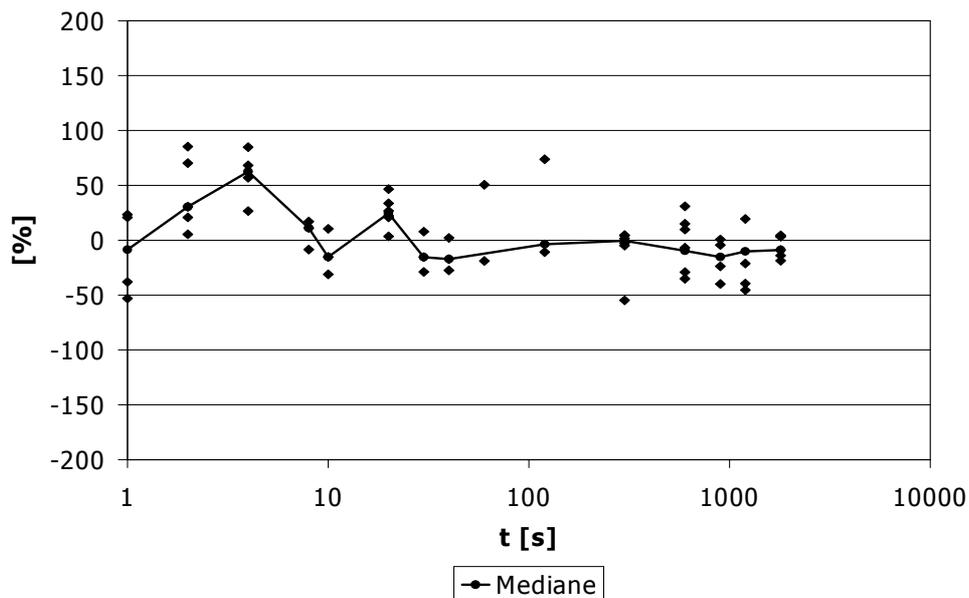
**Abbildung 3.13** zeigt die absoluten cAMP Werte und die Mediane von magnetfeldexponierten Proben und Kontrollen, die mit IBMX behandelt wurden. Die Zeitskala gibt im Fall der exponierten Proben die Dauer der Magnetfeldeinwirkung an. Es zeigt sich bereits nach 1 s eine signifikante Erhöhung der cAMP Konzentration (U-Test:  $z = 2,95$ ,  $p = 0,0016$ ), die über die gesamte Exposition, mit Ausnahme von 40 Sekunden und 300 Sekunden Magnetfeldeinwirkung, anhält. Bei den beiden genannten Zeiten kommt es zu einem leichten, nicht signifikanten (U-Test:  $z = -0,22$ ,  $p = 0,41$ ) Rückgang der Konzentration gegenüber den Kontrollen. Zum direkten Vergleich ist **Abbildung 3.7** eingefügt; bei diesen Versuchen wurde kein IBMX eingesetzt.



**Abbildung 3.14** zeigt die prozentuale Änderung der cAMP Konzentration mit appliziertem IBMX im Verhältnis zur Kontrolle. Bei dieser Darstellung wird deutlich, daß es zu einer ständigen signifikanten Erhöhung der magnetfeldexponierten Proben gegenüber den Kontrollen kommt (t-Test:  $t = 6,28$ ,  $p = 5,03 \cdot 10^{-8}$ ). Die Kontrollen sind ebenfalls mit IBMX behandelt. Zum direkten Vergleich ist **Abbildung 3.8** dargestellt, die die prozentuale Änderung der cAMP Konzentrationen ohne IBMX darstellt. Zum besseren Vergleich wurde die gleiche Skalierung der y-Achse gewählt.

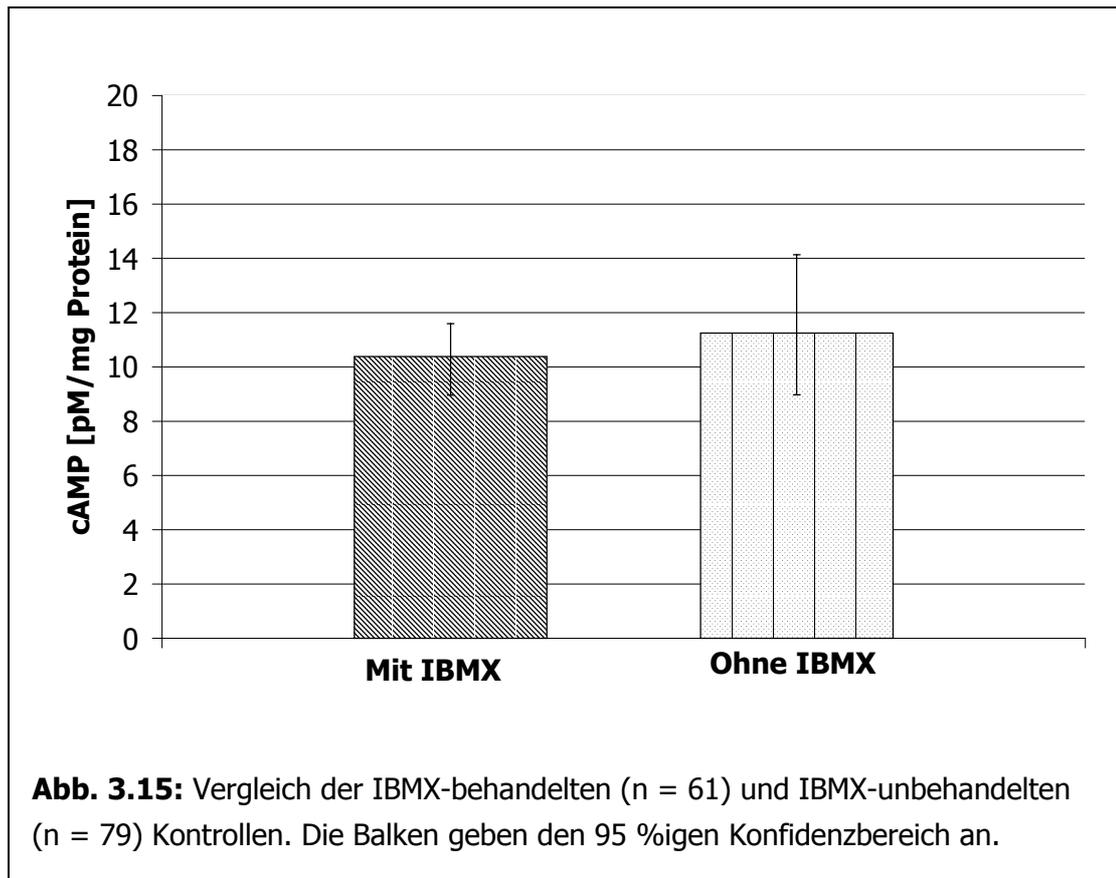


**Abb. 3.14:** Prozentuale Änderung der cAMP Konzentrationen zu verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung mit 1 mM IBMX (n = 3-7).

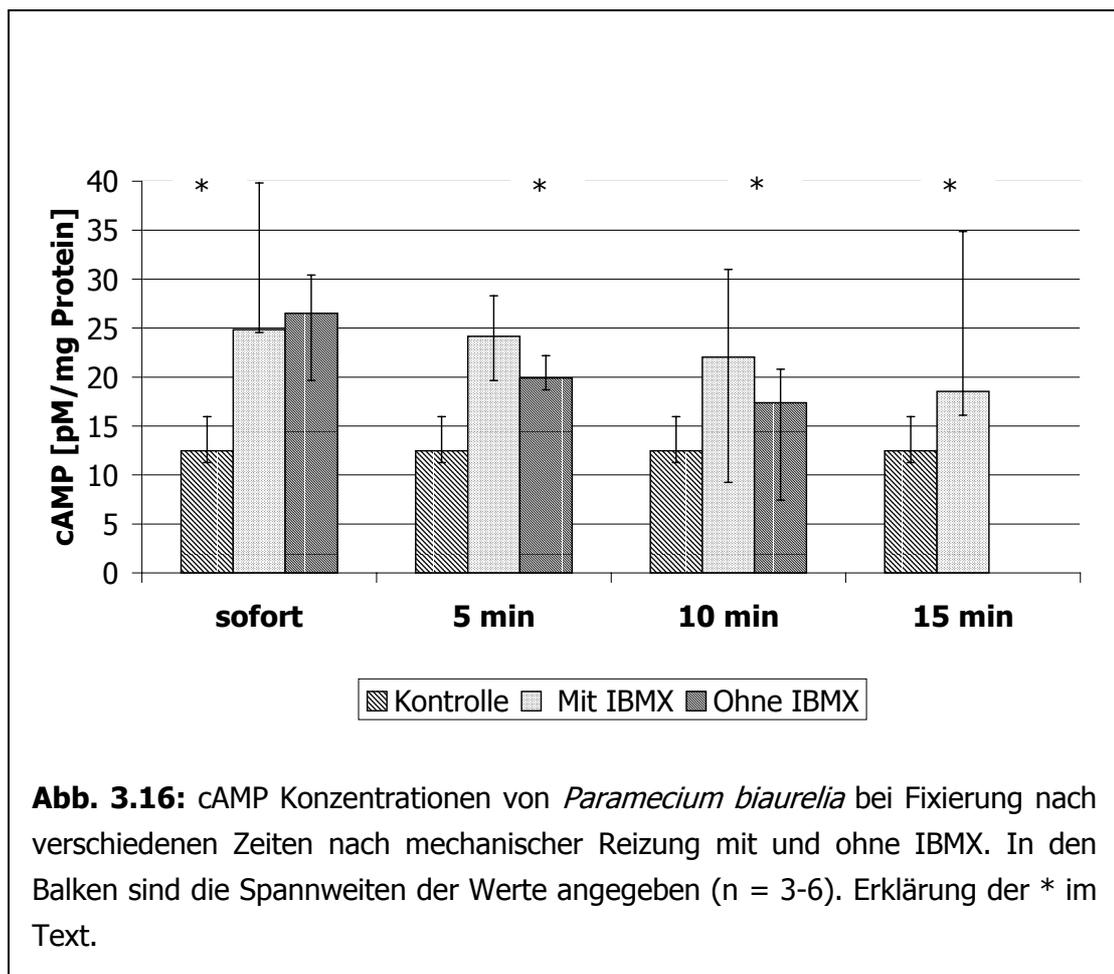


**Abb. 3.8:** Prozentuale Änderung der cAMP Konzentrationen zu verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung ohne IBMX (n = 3-5).

**Abbildung 3.15** zeigt den Vergleich aller IBMX-behandelten und IBMX-unbehandelten Kontrollen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (U-Test:  $z = -0,68$ ,  $p = 0,25$ ) zwischen den Kontrollen mit IBMX (10,61 pM cAMP/mg Protein) und den Kontrollen ohne IBMX (11,45 pM cAMP/mg Protein). IBMX erhöht also nicht per se die cAMP Konzentration. Kommt jedoch das Magnetfeld hinzu, ergibt sich eine deutliche cAMP Konzentrationserhöhung (siehe **Abbildung 3.14**).

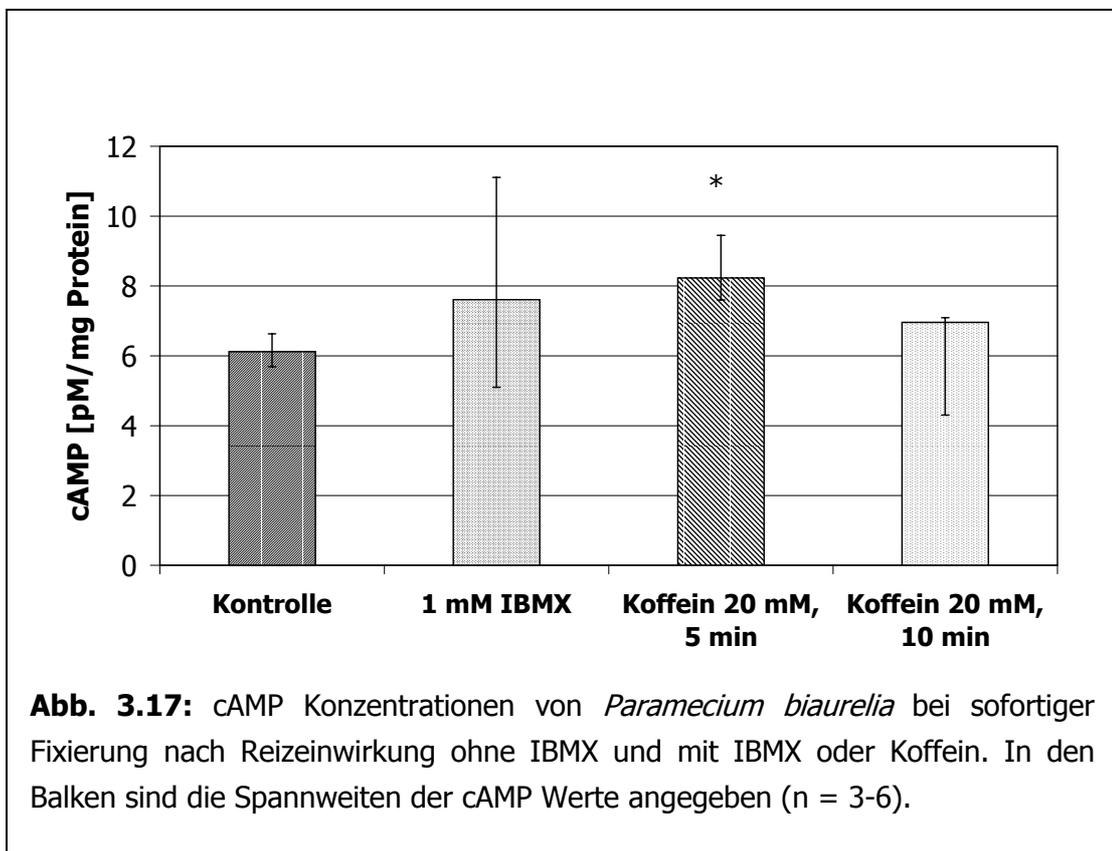


Da Vortexen die cAMP Konzentration erhöht (siehe **Abbildung 3.10**), wurde getestet, ob es wirklich von einer Reizapplikation abhängt, ob IBMX eine Erhöhung des cAMP Spiegels bewirkt. Die mit IBMX behandelten Proben zeigen bei sofortigem Fixieren keinen signifikanten Unterschied im cAMP-Level zu nicht IBMX behandelten Proben (U-Test:  $z = -0,15$ ,  $p = 0,44$ ) ; jedoch ebenfalls eine signifikante cAMP Erhöhung im Verhältnis zur Kontrolle (U-Test:  $z = -1,96$ ,  $p = 0,025$ ). Bei der 5 Minuten Fixierung ergibt sich desweiteren eine signifikante Erhöhung von cAMP auf 24,16 pM/mg Protein der IBMX behandelten gegenüber der nicht behandelten Probe (19,90 pM/mg Protein). Dies zeigt auch die statistische Auswertung durch den U-Test:  $z = -1,73$  und  $p = 0,042$ . Ebenso ist die Erhöhung der cAMP Konzentration der IBMX-behandelten Probe im Verhältnis zur Kontrollmessung signifikant (U-Test:  $z = -2,12$ ,  $p = 0,017$ ). Auch der Rückgang von cAMP auf den Grundlevel erfolgt bei der Probe mit IBMX wesentlich langsamer; auch nach 15 Minuten ist der cAMP Level (18,54 pM/mg Protein) gegenüber der Kontrolle (12,48 pM/mg Protein) noch signifikant erhöht (**Abbildung 3.16**, U-Test:  $z = -2,45$ ,  $p = 0,0072$ ).



### 3.3.5 cAMP mit Koffein

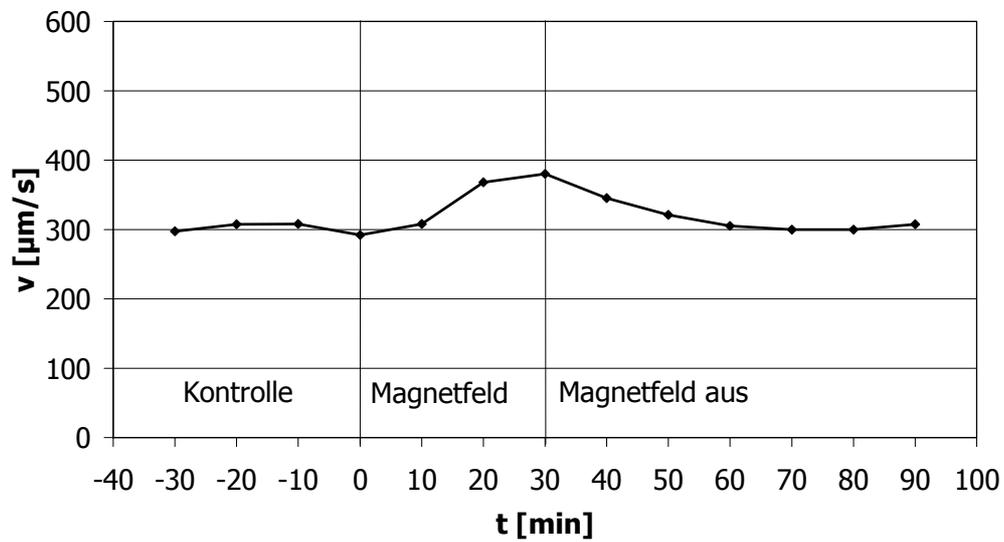
Um bei folgenden Versuchen einen effizienteren Phosphodiesterase-Hemmer als IBMX zur Verfügung zu haben, wurde das ebenfalls als Phosphodiesterase-Inhibitor bekannte Koffein getestet. **Abbildung 3.17** zeigt die cAMP Konzentrationen nach mechanischer Reizung (Vortexen) im Gegensatz zur Kontrolle (6,12 pM/mg Protein). Bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten und einer Konzentration von 20 mM ergibt sich für Koffein keine bessere Wirksamkeit als für IBMX (7,61 pM/mg Protein). Der U-Test zeigt hier weder für IBMX noch für Koffein eine signifikante Erhöhung der cAMP Konzentrationen gegenüber der Kontrolle: IBMX:  $z = -0,48$  und  $p = 0,31$ ; Koffein:  $z = -1,15$  und  $p = 0,12$ ). Allerdings erzielt Koffein bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten (8,23 pM/mg Protein) einen besseren Effekt (U-Test:  $z = -2,31$ ,  $p = 0,01$ ) als die Einwirkzeit von 10 Minuten (6,96 pM/mg Protein).



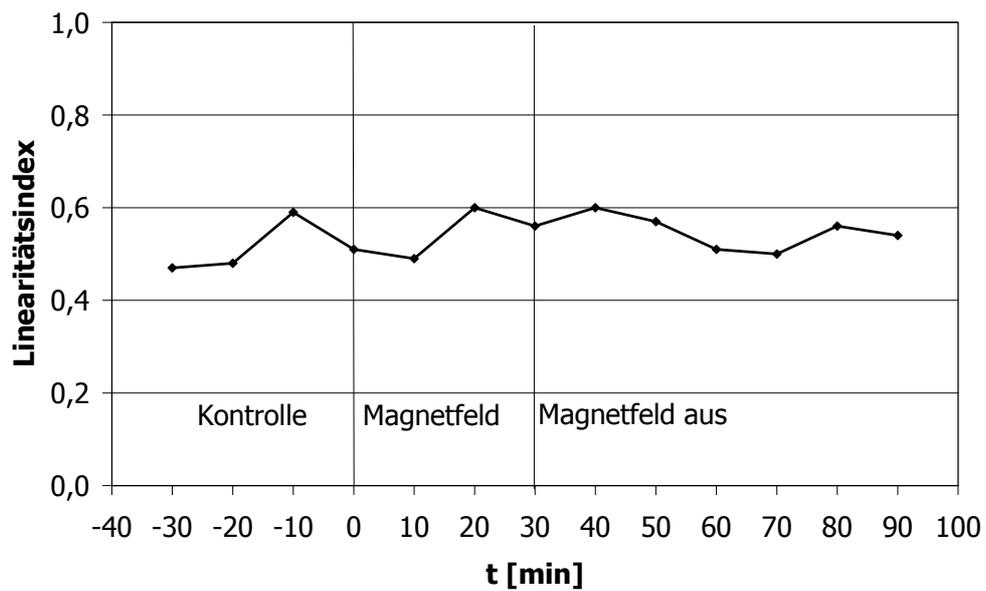
## 3.4 Pawn-Mutante

### 3.4.1 Verhalten

Setzt man die Pawn-Mutante, die defekte Calciumkanäle hat, dem Magnetfeld aus, zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Schwimgeschwindigkeit schon einige Minuten nach Anschalten des Feldes (**Abbildung 3.18**, die Auswertung erfolgte in 10 Minuten Intervallen, U-Test:  $z = -2,49$ ,  $p = 0,006$ ). Diese Erhöhung hält für die gesamte Expositionsdauer von 30 Minuten an und fällt erst allmählich innerhalb von 30 Minuten nach Ausschalten des Magnetfeldes auf den Kontrollevel zurück. Die Linearität der Schwimmbahnen nimmt signifikant nach 10minütiger Magnetfeldeinwirkung zu (U-Test:  $z = -1,97$ ,  $p = 0,02$ ), bleibt nach Ausschalten des Feldes noch erhöht und fällt dann innerhalb von 30 Minuten ungefähr auf den Grundlevel zurück (**Abbildung 3.19**). Ein großes Problem bei den Verhaltensversuchen war, daß die Pawn-Mutante, wenn sie sich in den Kammern befanden, zum größten Teil immobil waren und dann keine Verhaltensanalysen möglich waren. Nur in einem Versuch waren die Zellen mobil und konnten im Hinblick auf Linearität der Schwimmbahnen und Schwimgeschwindigkeit im Magnetfeld untersucht werden. Dieser Versuch ist jedoch sehr aussagekräftig, da mindestens 2000 Spuren pro Zeitpunkt erfaßt wurden.



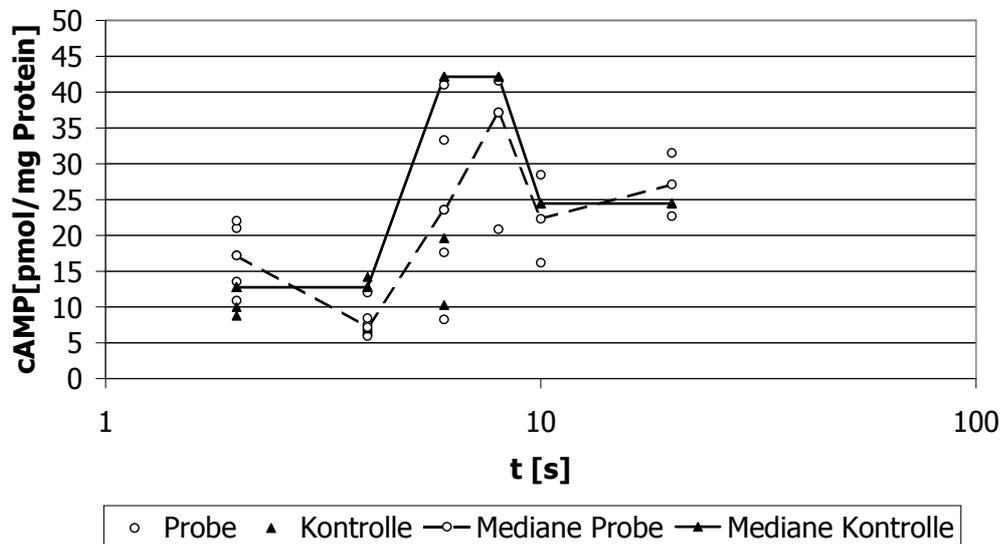
**Abb. 3.18:** Mittlere Geschwindigkeit der Pawn-Mutante vor, während und nach Magnetfeldeinwirkung (n = 2000 Spuren/Punkt).



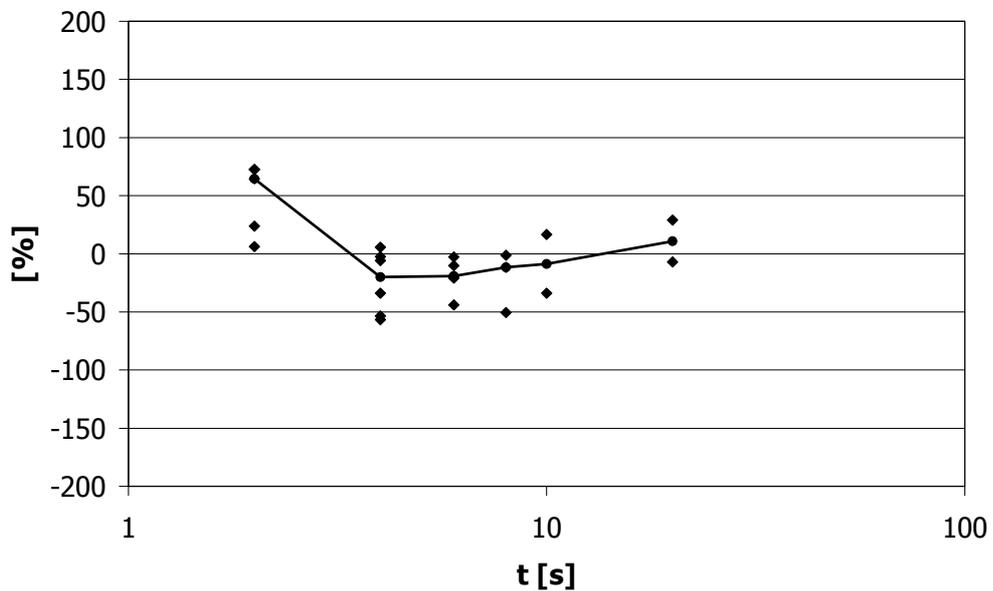
**Abb. 3.19:** Linearitätsindex der Pawn-Mutante vor, während und nach Magnetfeldeinwirkung (n = 2000 Spuren pro Datenpunkt).

### 3.4.2 cAMP

Um die Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bei der Erhöhung der cAMP Konzentration zu untersuchen, wurden auch bei Pawn cAMP Messungen durchgeführt. **Abbildung 3.20** zeigt die absoluten Werte; auffällig ist, daß der Grundlevel von Pawn schwankt und teilweise über 40 pM/mg Protein liegt (beim Wildtyp maximal ca. 25 pM/mg Protein). Nach 2 Sekunden Magnetfeldeinwirkung kommt es zu einer signifikanten cAMP Erhöhung (U-Test:  $z = -2,01$ ,  $p = 0,02$ ). Zwischen 4 und 8 Sekunden Magnetfeldeinwirkung folgt dann eine geringe Abnahme der cAMP Konzentration gegenüber der Kontrolle (U-Test:  $z = -1,57$ ,  $p = 0,058$ ). Bei 10 und 20 Sekunden Magnetfeldapplikation zeigt sich keine deutliche Reaktion der Paramecien. Zu berücksichtigen ist, daß für 10 Sekunden und 20 Sekunden Magnetfeldexposition nur zwei Datenpunkte bestimmt wurden. Stellt man die cAMP Änderungen prozentual dar (**Abbildung 3.21**), zeigt sich die Erhöhung der cAMP Konzentration nach 2 Sekunden Magnetfeldexposition deutlich (t-Test:  $t = 3,47$ ,  $p = 0,026$ ) und außerdem erfolgt eine Verringerung der cAMP Level (t-Test:  $t = -2,94$ ,  $p = 0,009$ ).



**Abb. 3.20:** cAMP Konzentrationen der Pawn-Mutante zu verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung (n = 2-6).

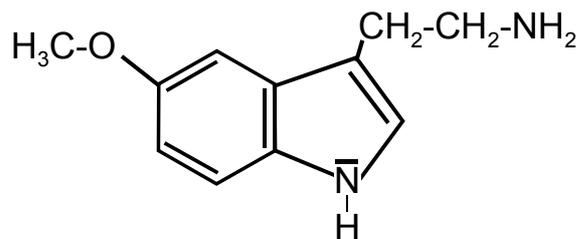


**Abb. 3.21:** Prozentuale Änderung der cAMP Konzentrationen der Pawn-Mutante zu verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung (n = 2-6).

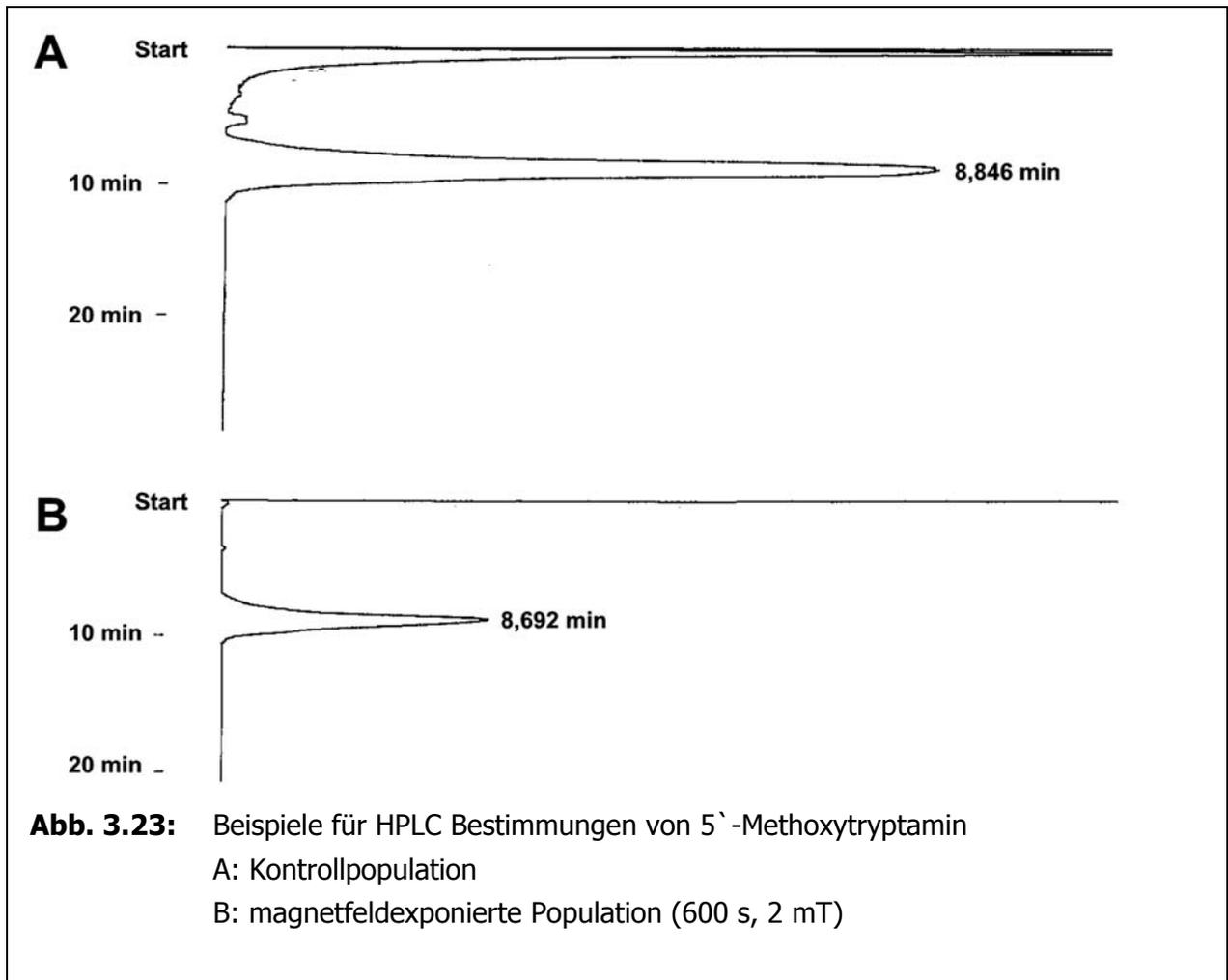
### 3.5 Melatonin und 5`-Methoxytryptamin

Da die kurzfristigen cAMP Änderungen keine Erklärung für die lang andauernden Verhaltensantworten auf das Magnetfeld liefern, wurde ein Botenstoff gesucht, der mit langfristigen Reaktionen korreliert ist. Außerdem gilt die sogenannte "Melatonin-Hypothese" zur Zeit als beste Erklärung für die krebspromovierende Wirkung von niederfrequenten Magnetfeldern (siehe 1.2.4). Melatonin und seine Analoga wie 5`-Methoxytryptamin sind Botenstoffe, die auch schon in vielen einzellern nachgewiesen werden konnten.

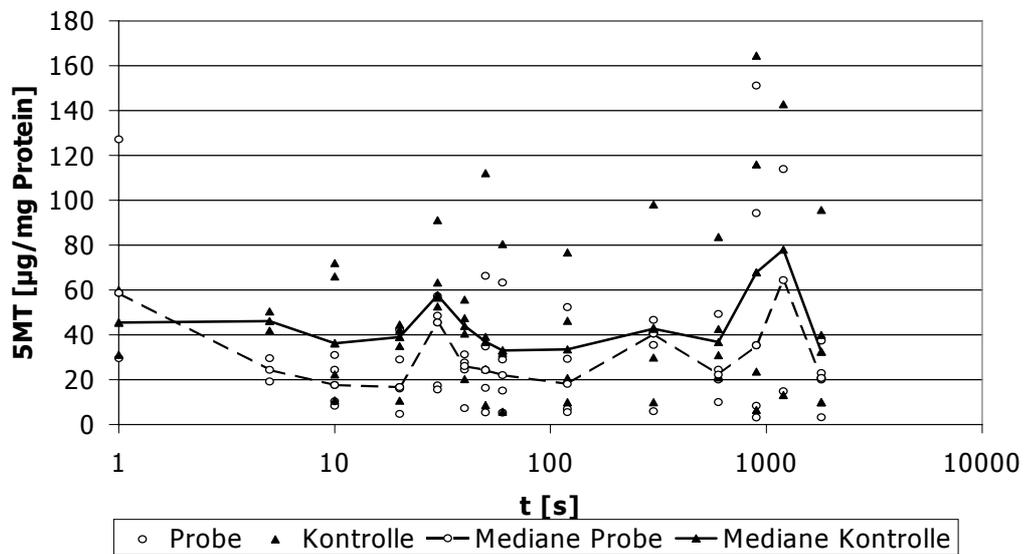
Es konnte kein Melatonin in *Paramecium bicaurelia* nachgewiesen werden. Der Melatoninstandard zeigt einen Peak bei ungefähr 22 Minuten, während alle untersuchten Proben einen Peak bei ca. 9 Minuten aufweisen. Es stellte sich nun die Frage, um welchen Stoff es sich handelt. Dafür in Betracht kommen diverse Stoffwechselprodukte von Melatonin. Aus der Literatur kann man ersehen, daß das aktive Metabolit in einzellern häufig 5`-Methoxytryptamin ist, daher wurden damit Standards gefahren. Diese zeigen ebenfalls einen Peak bei ca. 9 Minuten. Der in den Proben vorkommende Stoff konnte also eindeutig als 5`-Methoxytryptamin identifiziert werden (**Abbildung 3.22**). Es zeigt sich bei den magnetfeldexponierten Zellen eine deutliche Abnahme der 5`-Methoxytryptamin Konzentration (**Abbildung 3.23**).



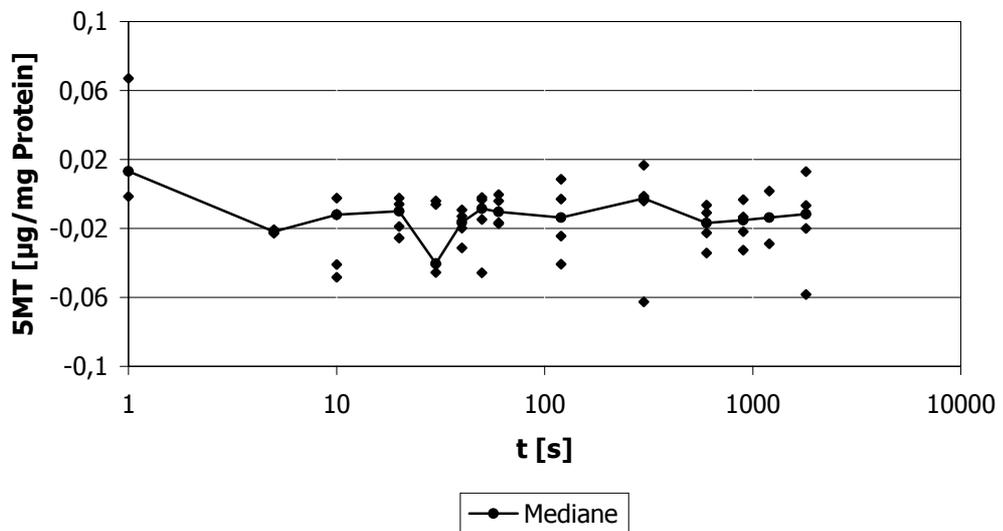
**Abb. 3.22:** Strukturformel von 5`-Methoxytryptamin



Trägt man die absoluten Werte in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf (**Abbildung 3.24**), so erkennt man deutlich, daß nach der ersten Sekunde der Magnetfeldexposition eine signifikante Abnahme der 5`-Methoxytryptamin-Konzentration in den Zellen erfolgt (U-Test:  $z = -2,48$ ,  $p = 0,0065$ ). Diese Abnahme nimmt mit der Expositionsdauer nicht zu, sondern bleibt relativ konstant, klingt aber auch nicht ab. Der Anstieg der 5MT-Konzentration ist nicht signifikant:  $z = -0,22$  und  $p = 0,41$  (U-Test). Die 5`-Methoxytryptamin-Konzentrationen der Kontrollen liegen zwischen 5 und 75  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein, der Median liegt bei 32  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein. Das Magnetfeld dezimiert also eindeutig die 5`-Methoxytryptamin-Konzentration in den Zellen. Trägt man die Differenzen der Einzelwerte und Mediane gegen die Expositionszeit ab, ergibt sich das gleiche Bild (**Abbildung 3.25**, t-Test:  $t = -5,45$ ,  $p = 1,13 \cdot 10^{-6}$ ). Hier ist eine Darstellung der prozentualen Änderung nicht sinnvoll, da keine lineare Abhängigkeit zwischen dem Grundzustand der Zellen und der Reaktion besteht (siehe 3.6).



**Abb. 3.24:** 5`-Methoxytryptamin-Konzentrationen von *Paramecium biaurelia* zu verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung (n = 3-5).



**Abb. 3.25:** Differenzen der 5`-Methoxytryptamin-Konzentrationen von Kontrollmessungen und magnetfeldexponierten Proben von *Paramecium biaurelia* zu verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung (n = 3-5).

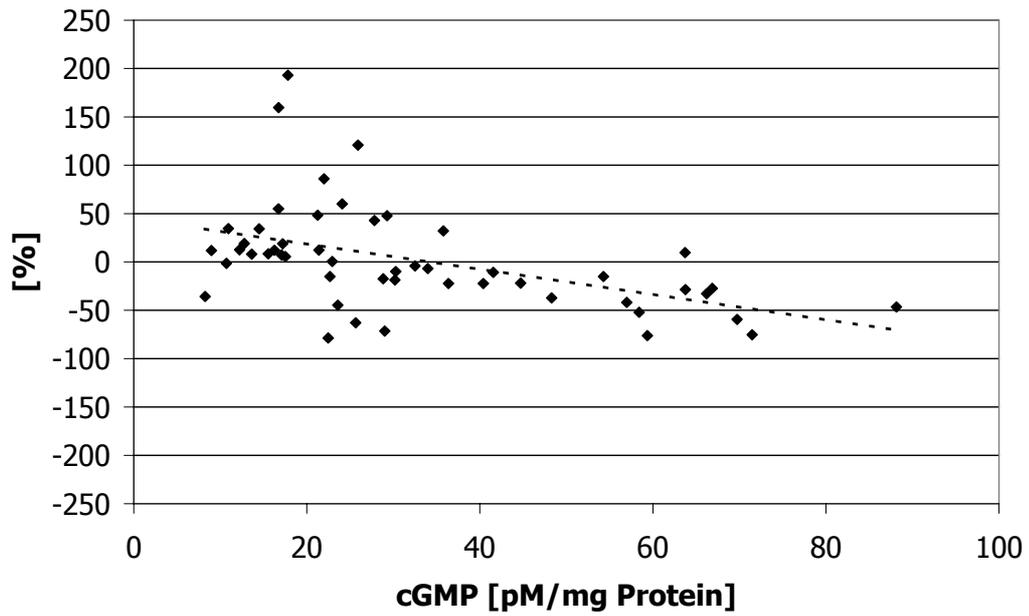
### 3.6 Abhängigkeit einer Reaktion vom Grundzustand

Ist die Reaktion vom Grundzustand der Zellen abhängig? Um diese Frage zu beantworten, wurde die prozentuale Änderung bei Magnetfeldapplikation im Verhältnis zum Grundzustand der Zellen, also dem cGMP/cAMP oder 5'-Methoxytryptamin Gehalt der Kontrollen, dargestellt (**Abbildungen 3.26-3.30**). **Tabelle 3.2** zeigt, daß es bei den cAMP und cGMP Werten zu einer signifikanten graduellen Abhängigkeit kommt. Eine Ausnahme bilden die Daten der Pawn-Mutante, die keinen signifikanten Zusammenhang aufweisen. Man kann dies auf die geringe Datenmenge zurückführen; daher wurden die cAMP Werte der Mutante wie die anderen Daten ausgewertet (siehe 3.4.2). Für die cGMP sowie die cAMP Level gilt: je höher der Grundzustand der Zellen, desto eher kommt es zu einer Dezimierung oder keiner Änderung der cGMP/cAMP Level bei Magnetfeldexposition. Je niedriger der Grundzustand der Zellen ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, daß es zu einer Erhöhung der cGMP/cAMP Konzentration durch das Magnetfeld kommt. Wie **Abbildung 3.30** zeigt, gibt es bei 5'-Methoxytryptamin, anders als bei cAMP und cGMP, keine Abhängigkeit der Reaktion vom Grundzustand der Zellen.

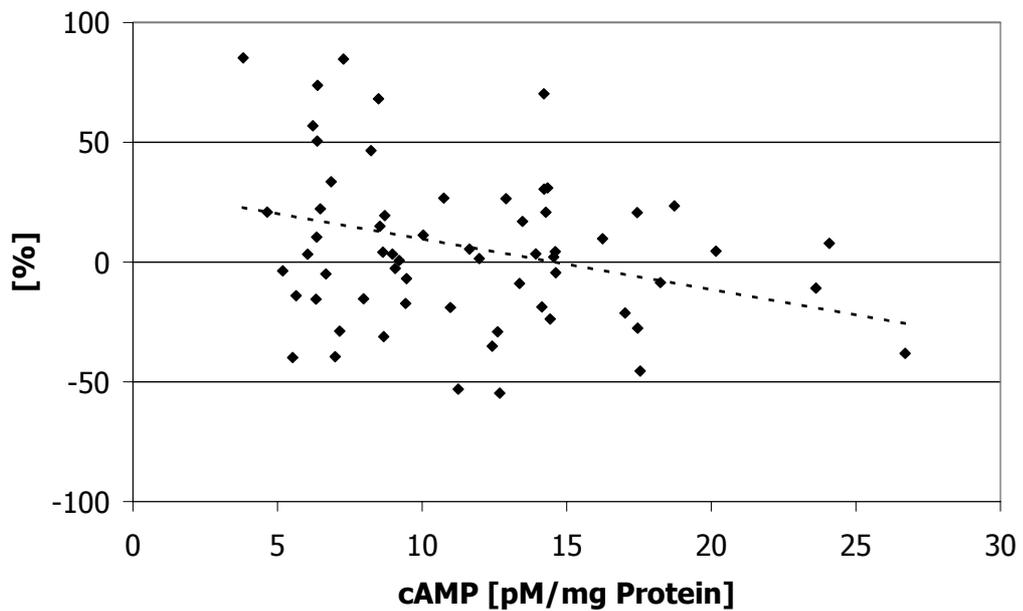
Anhand der Korrelationskoeffizienten wird eine Regressionsanalyse durchgeführt:

	cGMP	cAMP	cAMP+IBMX	cAMP Pawn	5MT
Korrelationskoeffizient	-0,49	-0,30	-0,32	-0,33	-0,09
t	7,95	2,31	2,53	1,52	0,676
p	0,0005	0,02	0,02	0,2	0,5
Signifikant	ja	ja	ja	nein	nein
Schnittpunkt mit y-Achse	37,02 %	30,90 %	59,83 %	17,48 %	-23,78 %

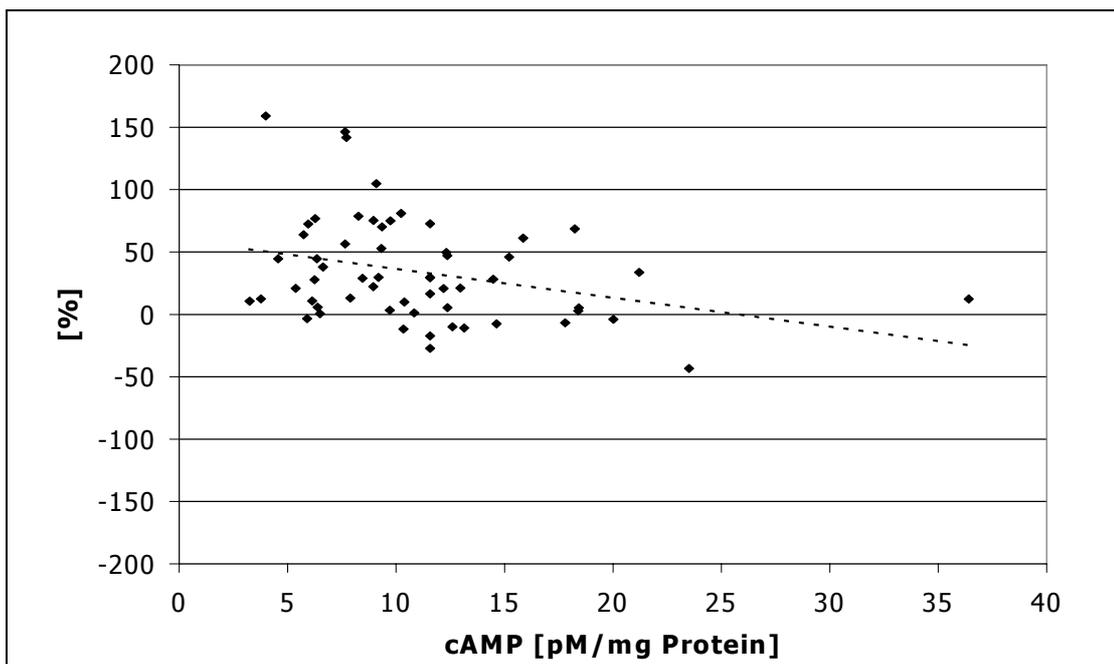
**Tabelle 3.2:** Regressionsanalyse der cGMP, cAMP und 5MT Daten



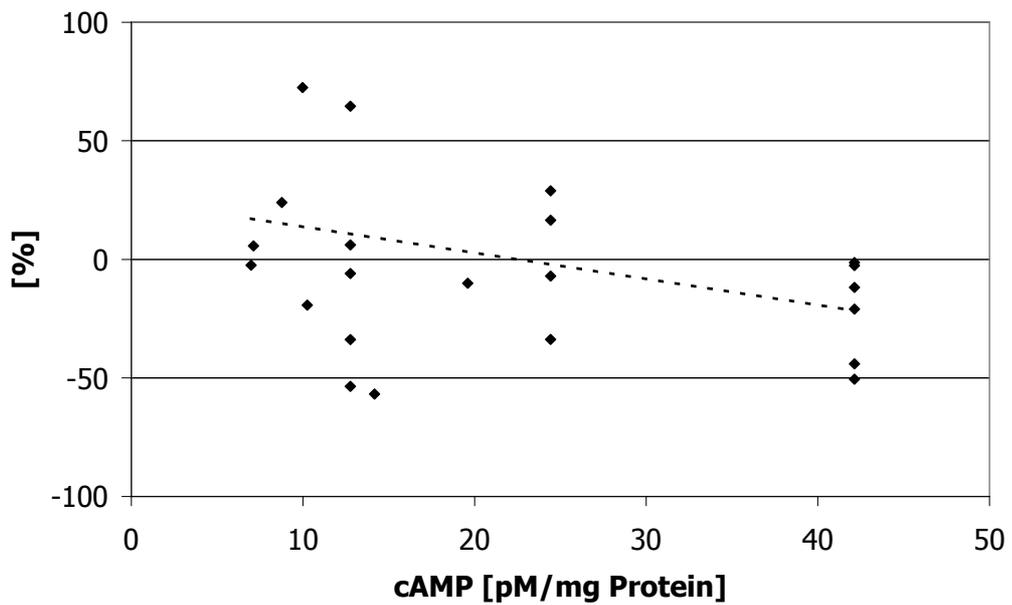
**Abb. 3.26:** Prozentuale Änderung der cGMP Konzentrationen von *Paramecium biaurelia* in Abhängigkeit vom Grundzustand der Zellen (n = 50).



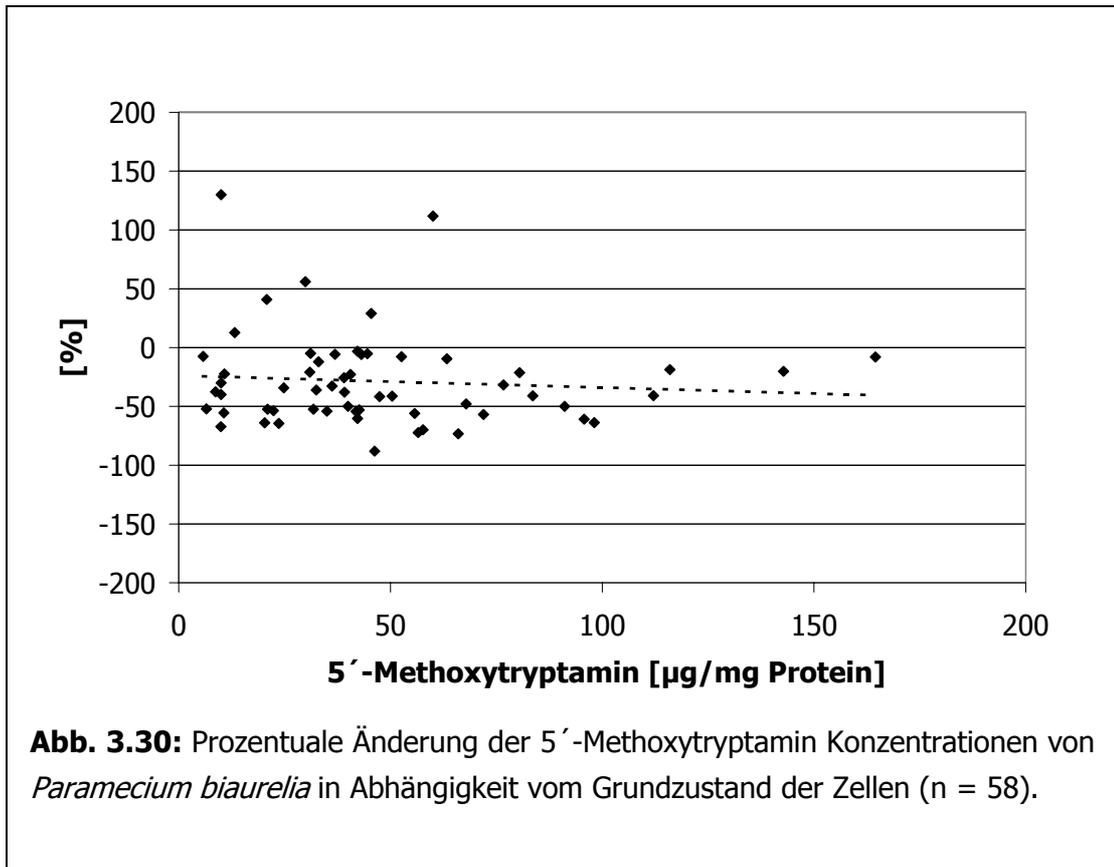
**Abb. 3.27:** Prozentuale Änderung der cAMP Konzentrationen von *Paramecium biaurelia* in Abhängigkeit vom Grundzustand der Zellen (n = 63).



**Abb. 3.28:** Prozentuale Änderung von cAMP mit 1 mM IBMX von *Paramecium biaurelia* in Abhängigkeit vom Grundzustand der Zellen (n = 58).



**Abb. 3.29:** Prozentuale Änderung der cAMP Konzentrationen der Pawn-Mutante in Abhängigkeit vom Grundzustand der Zellen (n = 22).



## 4 Diskussion

*Paramecium biaurelia* wurde als Modellsystem eingesetzt, um einen Wirkungsmechanismus für ein 50 Hz Magnetfeld auf der Signaltransduktionsebene der Zelle zu erforschen. Da schwache Magnetfelder nicht in der Lage sind, chemische Bindungen zu brechen (Valberg et al., 1997) oder Temperatureffekte in Zellen zu induzieren (Weaver et al., 1999), können Effekte dieser Felder nur auf Änderungen von laufenden biochemischen Reaktionen oder Transportprozessen beruhen (Astumian et al., 1995; Weaver et al. 1998).

### 4.1 Verhalten

Das Bewegungsverhalten von *Paramecium* hängt von der Cilienschlagrichtung und der Cilienschlagfrequenz ab. Wirkt ein externer Stimulus auf *Paramecium*, so wird die Membranpermeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{K}^+$  verändert (Naitoh und Eckert, 1968; Machemer, 1976; Machemer und Ogura, 1979). Die Schlagrichtung wird durch die intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Naitoh und Kaneko, 1972; Nakaoka et al., 1984) und wahrscheinlich durch zyklische Nukleotid-Konzentrationen (Nakaoka und Ooi, 1985; Majima et al., 1986; Bonini und Nelson, 1988) reguliert.

#### 4.1.1 Linearitätsindex und Schwinggeschwindigkeit

Bei den Verhaltensversuchen konnte gezeigt werden, daß die Linearität der Schwimmbahnen unter Einfluß eines 50 Hz Magnetfeldes von 2 mT abnimmt. Dies weist auf eine Depolarisation und somit eine  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung in den Cilien hin. Durch die Minutenauswertungen konnte ergänzend zu meiner Diplomarbeit (Wilczek, 1998) gezeigt werden, daß die Abnahme der Linearität sukzessive innerhalb der ersten 10-15 Minuten der Magnetfeldeinwirkung und nicht plötzlich erfolgt. Somit liegt nahe, daß das Feld keinen Alles-oder-Nichts Mechanismus aktiviert, sondern eine kontinuierliche Reizung der Zellen bewirkt, die sogar noch nach Ausschalten des Magnetfeldes für etwa 20 Minuten nachwirkt. Auch Löschinger et al. (1999) fanden einen "Nachwirkungseffekt" bei humanen Fibroblasten, bei denen Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation nach Einwirkung eines EMF (20 Hz, 8 mT) auftraten: innerhalb der ersten 20 Minuten der Exposition stieg die Anzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes an und klang erst ungefähr 20 Minuten nach Ausschalten des Feldes wieder ab. Die EMF exponierten Zellen erreichten nicht wieder die Stabilität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation wie die Kontrollzellen. Bei den hier durchgeführten Versuchen wird *Paramecium* offensichtlich ebenfalls aus dem biochemischen Gleichgewicht gebracht, denn nach Magnetfeldexposition sind mehr Schwankungen im Linearitätsindex und zum Teil in der Schwinggeschwindigkeit zu erkennen als in den Kontrollmessungen.

Auch verschiedene andere Autoren konnten eine Wirkung von Magnetfeldern auf das Schwimmverhalten von *Paramecium* nachweisen. Rosen und Rosen (1990) setzten *Paramecium bursaria* einem statischen Magnetfeld mit der Flußdichte 0.126 mT aus und stellten dabei eine Verringerung der Schwimmgeschwindigkeit und eine Erhöhung der Richtungswechsel und Kreiselbewegungen im Gegensatz zur Kontrollgruppe fest. In Versuchen von Becker (1994) und Hemmersbach et al. (1997) konnte unter dem Einfluß von niederfrequenten schwachen Magnetfeldern (50 Hz, 2 mT) eine Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit und eine Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen festgestellt werden. Die Erhöhung der Geschwindigkeit könnte auf Co-Faktoren, wie z. B. höhere Zelldichten zurückzuführen sein (siehe Diskussion Diplomarbeit Wilczek, 1998). Nakaoka et al. (2000) zeigten, daß ein 60 Hz Magnetfeld von 0,6 T nach einer Minute Expositionsdauer bei *Paramecium multimicronucleatum* die negative Gravitaxis verstärkt.

Fazit: Die Verhaltensantworten von *Paramecium* lassen darauf schließen, daß Ereignisse auf der Signaltransduktionsebene, insbesondere die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, durch das Magnetfeld beeinflusst werden.

#### **4.1.2 Mögliche Ursachen der Verhaltensänderung durch das Magnetfeld**

Das Magnetfeld könnte einen Einfluß auf die Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, ATPasen und Proteinkinasen haben, wobei auch eine Kombination verschiedener Mechanismen denkbar ist. Wie diese Wirkung im einzelnen aussehen kann, soll im Folgenden dargelegt werden.

##### **4.1.2.1 Änderung der Membranpermeabilität durch das Magnetfeld**

Da das Magnetfeld zu einer Verringerung des Linearitätsindex und somit einer Depolarisation von *Paramecium* führt, sollte es zu einer  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung in den Cilien gekommen sein, wenn das Feld nicht direkt auf entsprechende Enzyme wirkt. Wenn auch einige Versuche keine Effekte von niederfrequenten Magnetfeldern auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt zeigen (Shahidain et al., 2001; Walleczek, 1992), treten doch bei vielen anderen Zellsystemen ähnliche Reaktionen auf. Carson et al. (1990) stellten eine Erhöhung der cytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  um 28 % bei HL-60 Zellen im Magnetfeld fest (bis 100 Hz, 0,1 mT); ebenso wie Lindström et al. (1995) in Lymphozyten, wenn man sie verschiedenen Flußdichten (0.04 mT bis 0.15 mT) und Frequenzen (5 bis 100 Hz) exponierte, wobei eine maximale Reaktion bei 50 Hz erfolgte. Desweiteren wiesen 30 % einer Population von humanen Fibroblasten eine Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation nach Einwirkung eines EMF auf (20 Hz, 8 mT, Löschinger et al., 1999).

Ein möglicher Ansatzpunkt für die Wirkung des Feldes sind die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der Soma- und der Cilienmembran von *Paramecium*, wobei es bei Aktivierung der Kanäle zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx kommt. Auch Versuche von Lindström et al. (1993) zeigten, daß an der Reaktion von Jurkat Zellen (Leukozyten) auf ein Magnetfeld (50 Hz, 0,1 mT)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beteiligt sind und ein rein intrazellulärer Mechanismus z. B. über Calmodulin, auszuschließen ist. Innerhalb von 15 bis 200 Sekunden erfolgte ein Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels von 50-100 nM auf 200-400 nM in 86 % der Zellen, jedoch nur, wenn  $\text{Ca}^{2+}$  im Medium enthalten war. Auch Klavinsh et al. (1991) bestätigten diese Annahme; sie setzten Hühner-Epithelzellen einem EMF von 80 Hz und 1,14 mT aus und stellten während der Applikation des Feldes eine 60-70 %ige reversible Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmerate fest. Am stärksten war die Wirkung des Feldes, wenn die Zellen ohnehin gerade  $\text{Ca}^{2+}$  aufnahmen. Dies könnte die Variabilität in der Reaktion von *Paramecium* auch in den vorliegenden Versuchen erklären, denn der Grundzustand der Zelle spielt offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der Reaktion auf das Magnetfeld. Leicht depolarisierte Zellen werden somit stärker auf das Feld reagieren als Zellen im Ruhepotential.

Einen Hinweis darauf, daß besonders spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine Rolle spielen, lieferten Kenny et al. (1997). Bei Applikation eines EMF (16 Hz) war eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei Tumor-Knochenzellen und Glioma-Neuroblastomzellen zu beobachten. Interessanterweise waren die  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderungen in den Nervenzellen, die mehr spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle besitzen, größer. Denkbar ist also vor allem eine Wirkung des Magnetfeldes auf die spannungssensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle von *Paramecium biaurelia*. Diese Hypothese wird durch die Versuche von Dihel et al. (1985) unterstützt, die zeigten, daß sich die Zellteilungsrate von *Paramecium tetraurelia* während Magnetfeldexposition (72 Hz, 1,18 mT) erhöhte; gab man jedoch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker Verapamil zu, so verschwand der Effekt des Proliferationsanstiegs. Die Autoren schlossen daraus, daß das Feld direkt oder indirekt die Plasmamembran verändert, dadurch Änderungen im Ionentransport (möglicherweise  $\text{Ca}^{2+}$ ) hervorruft und so die Zellteilungsrate erhöht.

Fazit: Das Magnetfeld könnte zur Öffnung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führen, so daß es zu einer Erhöhung der intraciliären  $[\text{Ca}^{2+}]$  kommt und damit zu einer Verringerung des Linearitätsindex.

#### **4.1.2.2 Aktivierung intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher**

Durch die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen kann es zu einer Aktivierung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern kommen, die für die lang anhaltende Verhaltensreaktion von *Paramecium* auf das Magnetfeld verantwortlich sein könnten.

Außer dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) konnten in *Paramecium* ausgedehnte, flache subplasmalemmale Kompartimente, die sogenannten Alveolarsäcke (AS), als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher identifiziert werden (Plattner et al., 1999; Hauser et al., 2000). Die  $[\text{Ca}^{2+}]$  in nicht aktivierten Zellen beträgt im Cytosol 3 mM und in den AS 43 mM (Hardt und Plattner, 1999, 2000). Diese hohen Speicherkapazitäten werden bei Stimulation der Zellen ausgeschüttet und durch  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Medium ersetzt. Der interne  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg ist also auch von der externen  $[\text{Ca}^{2+}]$  abhängig (Plattner et al., 1997). Da bei den vorliegenden Versuchen relativ hohe extrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$  (1 mM) eingesetzt wurden, kann man davon ausgehen, daß dies kein limitierender Faktor für die Reaktion auf das Magnetfeld war.

AS spielen bei der Exocytose eine wesentliche Rolle (Klauke et al., 1998, Klauke et al., 2000). Trichocysten-Exocytose beinhaltet die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den AS und  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch Kanäle, wobei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx der Mobilisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher vorangeht (Plattner et al. 1997; Klauke et al., 1998). Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verursacht eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, wie es auch bei Kontraktion von Herzmuskelzellen vorkommt (Meissner, 1994), mit der parallel eine schnelle Diffusion und Verringerung der subplasmalemalen  $[\text{Ca}^{2+}]$  einhergeht (Hardt und Plattner, 1999, 2000). Diese  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung kann zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]$  von  $10^{-7}$  M auf bis zu einigen 100  $\mu\text{M}$  führen. Die genauen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle konnten bisher nur indirekt durch Hemmung mit Koffein nachgewiesen werden (Länge et al., 1995, 1996; Klauke und Plattner, 1998). Es ist denkbar, daß die Magnetfeldexposition eine ähnliche Wirkung hat und zunächst eine Aktivierung von wahrscheinlich spannungssensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Cilienmembran von *Paramecium* bewirkt, dieser  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg wiederum zu einer Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den AS führt und somit eine Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen erfolgt. Klauke et al. (2000) postulieren sogar die Existenz eines extrazellulären Rezeptors, der an  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gekoppelt ist. Dieser Rezeptor ist ein möglicher Angriffspunkt für das Magnetfeld, das so die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher aktivieren könnte. Solch ein Rezeptor für intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher existiert auch in höheren eukaryotischen Systemen (Shorte und Shofield, 1996), daher ist über diesen Mechanismus auch eine Wirkung auf den Menschen denkbar.

Die AS säumen fast die ganze Zellmembran, umgeben die Trichocysten und sind direkt mit der Plasmamembran verbunden (Allen, 1988; Plattner, et al., 1991; Plattner et al., 1999), die Regulation sollte somit über das Membranpotential stattfinden. Für eine direkte Kopplung an die Zellmembran (Erxleben und Plattner, 1994; Erxleben et al., 1997) spricht auch, daß keine der bekannten Sekundären Botenstoffe außer  $\text{Ca}^{2+}$  einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux aus den AS auslöst (Länge et al., 1995). Bei einer Depolarisation oder Hyperpolarisation der Zellmembran konnte allerdings bisher ebenfalls keine  $\text{Ca}^{2+}$ -

Freisetzung aus den AS nachgewiesen werden; daraus müßte folgen, daß die AS bei der Regulation der Cilien keine Rolle spielen (Erleben und Plattner, 1994; Plattner und Klauke, 2001). Andererseits wird von Wasserberg et al. (1997) und Clark et al. (1997) berichtet, daß bei depolarisierenden Reizen wie GTP oder Barium, eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den AS, eventuell über die Aktivierung von Kanälen, erfolgte. Dieser Mechanismus könnte auch durch das Magnetfeld aktiviert werden.

Fazit: Vermutet werden kann, daß es durch die Aktivierung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch das Magnetfeld zu einem  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg in *Paramecium* kommt, der wiederum zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den AS führt und somit zum Abweichen von der linearen Schwimmbahn der Paramecien.

#### **4.1.2.3 ATPasen und Proteinkinasen**

Eine wichtige Frage ist, ob ein Effekt des Magnetfeldes an der äußeren Membran auftreten muß oder auch Wirkungen auf z. B. Enzyme im Zellinnere möglich sind. Eine direkte Wirkung auf ATPasen in der Membran oder Proteinkinasen sind dabei eine Möglichkeit.

*Paramecium* besitzt **ATPasen**, die wahrscheinlich im ciliären Lumen lokalisiert sind und  $\text{Ca}^{2+}$  aktiv aus der Zelle oder in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher pumpen.  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin bindet an die Plasmamembran- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die dadurch aktiviert wird (Elwess und Van Houten, 1997, Blum et al., 1980 für *Tetrahymena*). In den AS konnten ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Pumpen (= SERCA-Pumpen, Calmodulin-unabhängig) identifiziert werden (Stelly et al., 1991; Plattner et al., 1997; Hauser et al., 1998). Elektronenmikroskopisch wurde gezeigt, daß die SERCA-Pumpen im Teil der AS zu finden sind, die dem Zellinneren zugewandt ist (Plattner et al., 1999; Hauser et al., 2000); sie werden folglich  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cilieninnenraum in die AS pumpen. Durch die Änderung der Ionenbindungskapazität der ATPase ist ein Einfluß auf die intrazelluläre Ionenzusammensetzung möglich (Blank, 1992), denn in Kombination mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch das EMF und verlangsamtem Abpumpen von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem intraciliären Raum, reichert sich  $\text{Ca}^{2+}$  an. Wie Stagg et al. (1992) zeigten, ist dies durchaus ein möglicher Wirkungsmechanismus. Sie verwendeten  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -beladene Mikrosomen als Modellsysteme und applizierten ein 60 Hz Feld der Stärke 0,1 mT, um die ATP-abhängige Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  zu untersuchen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme nahm nach 3, 5 und 10minütiger Exposition um 20 % ab, was entweder auf eine Hemmung der membrangebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase oder Änderung der Durchlässigkeit der Mikrosomenvesikel zurückgeführt wurde. Sogar direkte Effekte eines Magnetfeldes auf die Myosin-ATPasen konnte Bolognani (1993) demonstrieren: es erfolgte eine sofortige Reaktivierung der ATPasen durch Applikation eines 80 Hz EMF von 2 mT für

10 Minuten. Blank und Soo (1993) und Blank (1992) zeigten desweiteren, daß die Aktivität der ATPase je nach Konzentration der Kalium- oder Natriumionen durch ein Feld zwischen 60–100 Hz beeinflusst wird. Bei optimaler Aktivität des Enzyms wird durch das Feld eine Inhibition bewirkt; ist die Enzymaktivität aber unter dem optimalen Level, so stimuliert das EMF die ATPase. Eine Erhöhung der Ionenkonzentration hatte den gleichen Effekt; dies weist darauf hin, daß durch das EMF eine Ionenkonzentrationserhöhung induziert wurde. Die Verhaltensänderungen von *Paramecium* im Magnetfeld in den vorliegenden Untersuchungen weisen ebenfalls auf eine intrazelluläre Ionenkonzentrationserhöhung ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hin, somit ist eine Inhibition der ATPase durch das Feld durchaus denkbar.

Als weitere Möglichkeit kommt eine Wirkung auf **Proteinkinasen** in Frage. Hochstrasser et al. (1996) konnten zwei unterschiedliche Formen der Proteinkinase A in den Cilien nachweisen, die vermutlich für unterschiedliche ciliäre cAMP-abhängige Prozesse zuständig sind (Bonini und Nelson, 1988; Mason und Nelson, 1989a, b). Einerseits erhöht cAMP-induzierte Thio-Phosphorylierung von bestimmten Polypeptiden signifikant die Geschwindigkeit mit der Dynein die Mikrotubuli in vitro gleiten lässt, andererseits findet diese Reaktion bei hoher  $[\text{Ca}^{2+}]$  nicht statt (Hamasaki et al., 1991). Wenn also das Magnetfeld auf die Proteinkinase A wirkt, so sollte dies eher zu einer Schwimmgeschwindigkeitserhöhung als einer Linearitätsabnahme führen. Jedoch stellten Noguchi et al. (2000) fest, daß cAMP nicht nur die Schlagfrequenz, sondern auch die Cilienschlagorientierung durch Phosphorylierung von Dynein Untereinheiten in *Paramecium* reguliert. Die Aktivierung der Proteinkinase könnte also durchaus auch mit einer Depolarisation verbunden sein. Löschinger et al. (1998) und Thumm et al. (1999) berichteten, daß ein Magnetfeld von 20 Hz und 7-8 mT die cAMP-Proteinkinase Aktivität in humanen Fibroblasten sofort stimuliert. Monti et al. (1991) stellten eine verstärkte Aktivität der Proteinkinase C in HL-60 Zellen fest, nachdem sie mit einem gepulsten Magnetfeld (8 mT) 10 bis 20 Minuten bestrahlt wurden. In Anwesenheit von dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator EGTA verschwindet diese Reaktion, was für eine Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  und dadurch regulierte Proteinkinasen an der EMF Wirkung spricht. Da außer der Proteinkinase A wahrscheinlich auch  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierte Proteinkinasen (Son et al., 1993; Kim et al., 1998) und  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibierte Proteinkinasen (Kissmehl et al., 1997) in *Paramecium* existieren, könnte eine Änderung der Aktivität der Proteinkinasen A oder C für den modulierten Cilienschlag im Magnetfeld verantwortlich sein.

Fazit: Eine direkte Wirkung des Magnetfeldes auf ATPasen und/oder Proteinkinasen ist denkbar. Die Verhaltensänderungen von *Paramecium* im Magnetfeld weisen auf eine intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung hin; somit ist eine Inhibition der ATPase vorstellbar. Durch diese Inhibition käme es zu einer Verstärkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anreicherung und daher

zu einer Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen. Desweiteren kann ebenfalls eine Aktivierung von Proteinkinasen durch das Magnetfeld stattfinden, die direkt den Cilienschlag modulieren.

## 4.2 Sekundäre Botenstoffe

Da bei den magnetfeldexponierten Zellen eine Depolarisation und somit ein Einfluß auf die Signaltransduktion zu erkennen ist, sollte geklärt werden, ob cAMP oder cGMP an der Reaktion beteiligt sind. Ergebnisse von Hennessey et al. (1985), sowie von Nakaoka und Machemer (1990) zeigten, daß cyclische Nukleotide eine Rolle bei der Regulation des Cilienschlages spielen und einen oder mehrere Ionenkanäle steuern könnten.

### 4.2.1 cGMP

Die Hypothese ist, daß  $\text{Ca}^{2+}$  bei *Paramecium*, das durch die spannungssensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Cilien gelangt, eine Cilienschlagumkehr bewirkt und eine  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM abhängige Guanylatcyclase aktiviert. Der cGMP Level steigt an und führt zu einem Abklingen der Cilienschlagumkehr (Schultz et al., 1986). Die cGMP Änderung könnte zur Stabilisierung der Zelle bei veränderten Umweltbedingungen, wie der Magnetfeldeinwirkung, dienen (Schultz et al., 1997). Setzt man einen depolarisierenden Stimulus, z. B. Barium ein, der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalschließung hemmt, so steigt die cGMP Konzentration in *Paramecium* innerhalb von 10 s von 5 pM/mg Protein auf 40 pM/mg Protein an und sinkt nach 5-15 s wieder ab, was auf eine schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalaktivierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung schließen läßt. Dann wird cGMP durch eine Phosphodiesterase in den Cilien abgebaut (Klumpp et al., 1983; Schultz et al., 1985; Schultz und Schade, 1989a, b). Folglich kann cGMP als Indikator für  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalaktivität von *Paramecium* verwendet werden. Unterstützt wird diese Überlegung durch Schultz et al. (1985), die zeigten, daß die Guanylatcyclase durch steigende  $[\text{Ca}^{2+}]$  aktiviert wird. Calmodulin könnte hierbei der ciliäre Sensor für das erregende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal sein, das die Cilien während des  $\text{Ca}^{2+}$ /  $\text{K}^+$ -Aktionspotentials erreicht, da es eine feste Komponente der Cilien-Guanylatcyclase in *Paramecium* darstellt (Schultz und Klumpp, 1982).

Da durch das Magnetfeld eine Depolarisation induziert und eine Wirkung auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und/oder intrazelluläre Speicher vermutet wird, könnte man eine cGMP Erhöhung über den Verlauf der Feldapplikation erwarten. Dies konnte in meinen Untersuchungen nicht gezeigt werden; es kommt zu keinen deutlichen Veränderungen der cGMP Konzentration in *Paramecium* bei Magnetfeldeinfluß. Auch Schultz et al. (1997) sehen Hinweise, daß das Verhalten bei einer Depolarisation nicht unbedingt mit

cGMP Bildung gekoppelt sein muß und cGMP nicht direkt die Schwimmrichtung kontrolliert (Schultz et al., 1986). Das Verhalten wird durch geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx mehr beeinflusst, als durch Bildung von intrazellulärem cGMP.

Fazit: cGMP spielt bei der Reaktion auf das Magnetfeld keine Rolle.

#### **4.2.2 cAMP**

Es zeigt sich eine deutliche Erhöhung der cAMP Konzentration bei *Paramecium* um maximal 84 % während der ersten Sekunden der Magnetfeldexposition. Diese Veränderung läßt auf eine Störung der Homöostase in der Zelle schließen, die wahrscheinlich mit der Regulation der Adenylatcyclase oder der Phosphodiesterase zu tun hat. Diesen Punkt gilt es noch genauer zu untersuchen. Eine direkte Wirkung des Feldes auf die Adenylatcyclase ist generell denkbar, jedoch zeigten Luben et al. (1982) und Luben (1991), daß ein gepulstes Magnetfeld bei Osteoblasten den cAMP Level reduziert, das Feld aber nicht direkt auf die Adenylatcyclase wirkte. Sie vermuten, daß die Wirkung entweder über Störung der Hormon-Rezeptor Interaktion oder durch Rezeptor-Adenylatcyclase Interaktion in der Plasmamembran zustande kommt. Schimmelpfeng und Dertinger (1993), Schimmelpfeng et al. (1995) und Schimmelpfeng (1997) stellten bei Untersuchungen verschiedener Zellarten (Mausfibroblasten Zellen oder HL-60 Leukämiezellen) in magnetischen Feldern von 50 Hz (2 mT) ebenfalls erhöhte cAMP Level um bis zu 120 % fest, allerdings erst nach 5minütiger Exposition. Schimmelpfeng et al. (1995) nahmen an, daß die Wirkung des Magnetfeldes über Sekundäre Botenstoff-abhängige Prozesse vermittelt werden, ausgelöst durch Signale an der Zellmembran. Diese Ergebnisse konnten von Schimmelpfeng und Dertinger (1997) bestätigt werden; es zeigte sich, daß die Reaktion  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und am deutlichsten bei 2 mT zu messen war, was auf einen Fenstereffekt hindeutet. Hierbei wurde eine direkte Wirkung auf  $\text{Ca}^{2+}$  oder dessen Transmembran-Transport in Betracht gezogen. Bei *Paramecium* erhöht sich bei den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls die cAMP Konzentration, allerdings innerhalb von Sekunden statt Minuten. Auch hier wird eine Wirkung auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt vermutet, diese Annahme wird von den Verhaltensversuchen unterstützt, die auf eine Depolarisation der Zellen und somit ebenfalls auf eine  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung hinweisen.

Bonini et al. (1986) fanden bei Zugabe eines membranpermeablen cAMP Analogons eine erhöhte Schwimmgeschwindigkeit und ein hyperpolarisiertes Membranpotential. Die Autoren schlossen daraus, daß bei intrazellulärer cAMP Erhöhung eine Hyperpolarisation stattfindet. Schultz et al. (1987, 1992) zeigten, daß die Aktivität der Adenylatcyclase durch Veränderungen der extrazellulären Ionenkonzentration, die eine Hyperpolarisation hervorrufen, gesteuert wird. Eine Hyperpolarisation erhöht die

Möglichkeit des Kaliumionenausstroms, der wiederum mit der cAMP Produktion gekoppelt ist. Dieses Phänomen läßt sich dadurch erklären, daß die Adenylatcyclase Eigenschaften einer Ionenpore für einwertige Ionen mit Präferenz für  $K^+$  hat. Bei geringer Enzymaktivität findet man auch geringe Porenbildungsaktivität. Die Adenylatcyclase wird nicht nur durch das Ruhepotential gesteuert, sondern ist auch selbst daran beteiligt (Schultz et al., 1992). Es ist noch unklar, ob das Membranpotential an sich oder ein Ionenstrom, der durch die Hyperpolarisation ausgelöst wird, die Adenylatcyclase beeinflusst. Aufgrund der cAMP-Konzentrationserhöhung in den ersten Sekunden hätte man in den vorliegenden Versuchen also eine Schwimmgeschwindigkeitserhöhung in diesem Zeitrahmen erwarten können. Es zeigt sich jedoch keine solche Reaktion; zu vermuten ist, daß die starke Depolarisation die Hyperpolarisation überdeckt hat oder die Änderung der Schwimmgeschwindigkeit so kurz war, daß sie in den Minutenauswertungen nicht zu erkennen gewesen ist. Desweiteren ändert cAMP an sich nicht unmittelbar die Schlagfrequenz (Hennessey et al., 1985; Schultz und Klumpp, 1993), so daß durch die cAMP Erhöhung nicht unbedingt eine Änderung der Schwimmgeschwindigkeit erfolgen muß.

Die Regulation der Adenylatcyclase von *Paramecium* durch das Membranpotential erfolgt hauptsächlich durch  $Ca^{2+}$ , wahrscheinlich über Calmodulin als Sensor.  $K^+$  aktiviert die Adenylatcyclase zwar schon in geringen Konzentrationen im mM Bereich, da die normale intrazelluläre  $[K^+]$  aber schon 20-30 mM beträgt, wird die Adenylatcyclase in vivo wahrscheinlich nicht durch  $K^+$  reguliert. Daher kann man davon ausgehen, daß die cAMP Erhöhung durch das EMF nicht durch Wirkung auf Kaliumionenkanäle induziert wird.  $Ca^{2+}$  (im  $\mu$ m Bereich) dagegen inhibiert die Adenylatcyclase in nicht kompetitiver und reversibler Weise. Geht man davon aus, daß es bei der Magnetfeldexposition von *Paramecium* zu einer  $[Ca^{2+}]$ -Erhöhung kommt, erwartet man aufgrund der inhibierenden Wirkung von  $Ca^{2+}$  eine Abnahme der cAMP Konzentration, dies bestätigte sich nicht in den vorliegenden Experimenten. Die Regulation der Adenylatcyclase durch  $Ca^{2+}$  ist jedoch ebenfalls abhängig vom freien  $Mg^{2+}$ . Es findet ein Wettbewerb von  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  um die Bindungsstelle statt. In dem von mir verwendeten Puffer ist kein  $Mg^{2+}$  enthalten, doch durch die Methode der Anreicherung im Kolben ist sicher  $Mg^{2+}$  in die Lösung gelangt. Verschiedene Autoren (Schultz et al., 1987; Preston und Hammond, 1998) vermuten zwar, daß  $Mg^{2+}$  bei der Kontrolle der Cilien keine große Rolle spielt, da es im Medium im allgemeinen ausreichend zwischen 0,4 und 1 mM vorhanden ist, doch wird die Adenylatcyclase durch  $Mg^{2+}$  aktiviert. Die beiden Ionenbindungsstellen für  $Mg^{2+}$  liegen separat von der Substratbindungsstelle. Wenn man  $Mg^{2+}$  zugibt, kommt es bei *Paramecium* zu einer Erhöhung von cAMP von 4,8 auf 9,7 pM/mg Protein in 3-10 s (Schultz und Klumpp,

1993). Denkbar ist also auch eine Wirkung des Feldes auf die  $Mg^{2+}$ -Homöostase und dadurch ein Einfluß auf die cAMP Konzentration. Diese Vermutung unterstützen Walleczek (1992), der Jurkat-Zellen einem 50 Hz Feld aussetzte und zeigte, daß der intrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Level nach einer vierminütigen Exposition signifikant anstieg. Da es für  $Mg^{2+}$  in *Paramecium* wahrscheinlich keine spezifischen Kanäle gibt, aber  $Mg^{2+}$ -Ströme vorhanden sind (Preston, 1998), ist anzunehmen, daß es aufgrund seiner ähnlichen Ladungseigenschaften durch  $Ca^{2+}$ -Kanäle transportiert wird. Diese Ähnlichkeiten werden auch deutlich, wenn man bedenkt, daß  $Mg^{2+}$  an Calmodulin bindet (Potter et al., 1983), wobei aber wenig  $Mg^{2+}$  bei hoher intrazellulärer  $[Ca^{2+}]$  gebunden ist (Malmendal et al., 1999). Da davon auszugehen ist, daß durch das EMF  $Ca^{2+}$ -Kanäle aktiviert werden,  $Ca^{2+}$  einströmt und somit  $Mg^{2+}$  von Calmodulin freigesetzt wird, ist so eine Erhöhung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration zu erklären.

Fazit: Durch das Magnetfeld wird in den ersten Sekunden der Exposition eine Erhöhung der cAMP Konzentration in *Paramecium* bewirkt. Eine durch das Magnetfeld induzierte Anreicherung von  $Mg^{2+}$  durch Öffnung ciliärer  $Ca^{2+}$ -Kanäle könnte bei der Aktivierung der Adenylatcyclase eine Rolle spielen. cAMP wird von Bonini et al. (1986) und Schultz et al. (1987,1992) mit einer Hyperpolarisation und somit einer Schwimmgeschwindigkeitserhöhung in Verbindung gebracht. Es gibt in meinen Versuchen keine direkte Korrelation zwischen der Verhaltensantwort und dem cAMP Anstieg durch das EMF, wobei eine Hyperpolarisation von einer Depolarisation überdeckt sein könnte oder die Auswertung in Minutenabständen die innerhalb von Sekunden auftretende Reaktion nicht darstellen konnte. Außerdem kann der Zusammenhang zwischen cAMP Konzentrationsänderungen und Verhaltensantworten noch nicht als eindeutig geklärt angesehen werden: die cAMP Erhöhung muß nicht unbedingt eine Verhaltensänderung und/oder Hyperpolarisation zur Folge haben (Hennessey et al., 1985; Schultz und Klumpp, 1993). Auf jeden Fall wird durch direkte oder indirekte Wirkung des Feldes auf die Adenylatcyclase oder die Phosphodiesterase eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration bewirkt.

#### **4.2.3 Regulation des Kraftschlages durch cAMP/cGMP**

cAMP und cGMP sind auch in der Lage, den Kraftschlag der Zellen unterschiedlich zu modulieren: cAMP induziert eine rechts gerichtete Helix, während cGMP zu einer links drehenden Helix führt (Bonini und Nelson, 1988). cAMP hat hierbei einen stärkeren Effekt auf den Cilienschlag als cGMP, wenn beide zugleich zugegeben werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß cAMP und cGMP nicht nur Schlagfrequenz, sondern auch Orientierung des Kraftschlages und damit die Form des Schwimmweges regulieren (Noguchi, 1991). Cilien im linken Bereich der Zelle ändern die Orientierung des Kraftschlages bei geringeren Konzentrationen von cAMP und cGMP als Cilien auf der

rechten Seite. Im Falle eines cGMP Anstiegs entsteht dieses bevorzugt in der rechten Hälfte der Cilien (Schultz et al., 1985). Noguchi et al. (1991) unterstützten diese Ergebnisse und zeigten, daß die Empfindlichkeit der Cilien für cAMP und cGMP abhängig von ihrer Lokalisation auf der Zelloberfläche ist. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in einer unterschiedlichen Verteilung von cAMP/cGMP-abhängigen Proteinkinasen (Schultz und Jantzen, 1980; Hochstrasser et al., 1996).

Fazit: Da sich keine Änderungen der cGMP Konzentrationen bei Magnetfeldeinwirkung ergeben haben und die Änderungen der cAMP Konzentration in den vorliegenden Untersuchungen nicht direkt mit den Verhaltensänderungen korreliert werden können, spielen hier Membranpotential-Änderungen wohl eine größere Rolle. Änderungen der intrazellulären Konzentrationen der Sekundären Botenstoffe können auf keinen Fall Effekte des Membranpotentials außer Kraft setzen (Bonini et al., 1986).

#### **4.2.4 cAMP/cGMP Grundlevel**

Der cAMP Grundlevel bei *Paramecium* konnte von Schultz et al. (1984) mit  $5,2 \pm 0,2$  pM/mg Protein bestimmt werden. Doch bei späteren Versuchen ergab sich ein höherer Basiswert von cAMP mit 10-12 pM/mg Protein (Schultz und Klumpp, 1993). Yang et al. (1997) zeigten an intakten Paramecien-Zellen, daß cAMP bei Zugabe von 5 mM Glutamat, das an spezifische Zelloberflächenrezeptoren bindet, von ca. 4 pM/mg Protein auf maximal 20 pM/mg Protein anstieg. Maß man die Änderungen der cAMP Konzentration im ms Bereich bei Glutamatreizung, stieg der cAMP Level innerhalb von 200 ms auf 50-120 pM/mg Protein an. In den hier durchgeführten Versuchen lag die maximale cAMP Konzentration bei ca. 27 pM/mg Protein. Die Werte der Kontrollen schwanken hier zwischen 5–15 pM cAMP/mg Protein. Der Mittelwert liegt bei 10 pM/mg Protein, dies entspricht den von Schultz und Klumpp (1993) publizierten Werten.

In *Paramecium* existiert ein hoher cGMP Turnover und der Grundlevel von cGMP liegt nach Schultz et al. (1984, 1985) bei 2,3 pM/mg Protein. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde ein zehnfach höherer cGMP Grundlevel von im Schnitt 30 pM cGMP/mg Protein gefunden. Um die Schwankungen, die in den hier durchgeführten Versuchen auftreten, zu erklären, muß man wissen, daß die Konzentrationen der Sekundären Botenstoffe in *Paramecium* stark vom physiologischen Zustand, genauer gesagt der intrazellulären  $[Ca^{2+}]$ , abhängen (Hasegawa et al., 1997, 1999). Quantitative Unterschiede im Ruhemembranpotential sind durch unterschiedliche basale cAMP/cGMP Level wiedergegeben (Schultz und Klumpp, 1993). Auch die extrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  spielt eine große Rolle, denn bei höherer  $[Ca^{2+}]$  liegen auch die cAMP/cGMP Konzentrationen bei *Paramecium* höher (Hasegawa et al., 1999), wobei 1 mM  $Ca^{2+}$ , wie in meinen Untersuchungen verwendet, von Hasegawa et al. (1999) als

hoch eingestuft wurde und so der hohe cGMP Grundlevel zu erklären ist. Da *Paramecium* desweiteren in meinen Versuchsbedingungen in den Kolben nach oben in den Puffer wanderten und so auch etwas Medium mit nach oben zogen, ist es möglich, daß die  $[Ca^{2+}]$  dadurch leicht variierte. Verursacht durch  $[Ca^{2+}]$ -Schwankungen können nach Hasegawa et al. (1999) die cAMP Werte bei *Paramecium* zwischen 10-40 pM/mg Protein und die cGMP Werte zwischen 0-65 pM/mg Protein liegen. Es zeigte sich bei den Versuchen von Hasegawa et al. (1999), daß cGMP wesentlich stärker auf  $[Ca^{2+}]$ -Änderungen reagierte als cAMP. Durch die hohe extrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  erklären sich also die hohen cGMP Grundlevel.

Das Schwimmverhalten, das Ruhemembranpotential und die cAMP/cGMP Konzentrationen unterliegen außerdem einem circadianen Rhythmus (Hasegawa et al., 1997, 1998); *Paramecium* ist während des Tages oder des subjektiven Tages in Dunkelkultur (wie in den vorliegenden Untersuchungen) stärker hyperpolarisiert und die intrazellulären cAMP/cGMP Konzentrationen sind höher. In der subjektiven Nacht schwimmt *Paramecium* dagegen langsamer, mit häufigen Richtungswechseln und die cAMP/cGMP Konzentrationen sind niedriger. Bei geringen  $[Ca^{2+}]$  verläuft die circadiane Oszillation von cGMP und cAMP parallel, bei hohen  $[Ca^{2+}]$  jedoch phasenverschoben. Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden während des subjektiven Tages durchgeführt, da relativ hohe Konzentrationen Sekundärer Botenstoffe festgestellt wurden.

Fazit: Die cAMP Werte in den vorliegenden Versuchen entsprechen in der Größenordnung den Werten in der Literatur (Schultz et al., 1984; Schultz und Klumpp, 1993; Yang et al., 1997). Die cGMP Wert liegen, wahrscheinlich aufgrund der verwendeten  $[Ca^{2+}]$ , höher als die von Schultz et al. (1984, 1985) angegebenen Werte, entsprechen jedoch in der Größendordnung den von Hasegawa et al. (1999) bestimmten cGMP Konzentrationen bei *Paramecium*.

#### **4.2.5 cAMP und IBMX**

Um zu testen, ob die kurze deutliche cAMP Erhöhung in den ersten Sekunden der Magnetfeldexposition auf der Inaktivierung der Phosphodiesterase oder auf Aktivierung der Adenylatcyclase beruht, wurde der Phosphodiesterasehemmer IBMX (Isobutylmethylxanthin) eingesetzt. Wenn die Erhöhung auf Aktivierung der Adenylatcyclase zurückzuführen ist, so müßte bei Einsatz von IBMX der cAMP Spiegel in den Zellen kontinuierlich ansteigen.

Beavo et al. (1970) testeten verschiedene Xanthine als PDE-Hemmer an Zellhomogenaten, wobei 1-Methyl-3-Isobutylxanthin am wirksamsten war.

Unterschiedliche Charakteristika vorhandener PDE (z. B. in Fettzellen von Ratten, Rattenherzen- und Rattenleberzellen) bewirkten verschieden starke Effekte von IBMX (Beavo et al., 1971). Parsons et al. (1988) konnten zeigen, daß IBMX eine 34 %ige Erhöhung der cAMP Produktion in Ratten-Membranmodellen zur Folge hatte. Die Autoren vermuten, daß dieser Effekt von der Hemmung eines inhibitorischen G-Proteins abhängt. Statt der allgemein angenommenen Wirkung von Methylxanthenen eine Hemmung der PDE herbeizuführen und so die cAMP Konzentration zu erhöhen, könnte IBMX die Adenylatcyclase-Aktivität direkt stimulieren, indem es die Funktion des inhibitorischen Regulationsproteins blockt. Eine Differenzierung, ob eine cAMP Erhöhung aufgrund einer Adenylatcyclase-Aktivierung vorliegt, könnte dann also nicht getroffen werden. Wenn das die alleinige Wirkung von IBMX wäre, müßte man bei *Paramecium* davon ausgehen, daß keine Wirkung auftritt, da die Adenylatcyclase nicht durch G-Proteine reguliert wird (Schultz et al. 1987, 1992) und trimere G-Proteine in *Paramecium* bisher nicht festgestellt werden konnten (Forney und Rodkey, 1992; Fraga und Hinrichsen, 1994). IBMX-sensitive PDE dagegen konnten von Gustin und Nelson (1987) in Cilienpräparaten von *Paramecium* nachgewiesen werden, somit kann man bei Einsatz von IBMX von einem Effekt auf PDE ausgehen.

Zwar wurde IBMX schon wiederholt bei *Paramecium* verwendet, aber die Angaben über Konzentration, Einwirkzeit und Wirkung der Reagenz sind sehr unterschiedlich. Yang et al. (1997) zeigte an intakten Paramecien mit 1 mM IBMX und einer Einwirkzeit von 30 Minuten, daß die intrazelluläre cAMP Konzentration bei Zugabe von 5 mM Glutamat auf maximal 20 pM/mg Protein anstieg. Allerdings ist bei diesen Versuchen zu berücksichtigen, daß keine Gegenversuche ohne IBMX gemacht wurden. 1 mM IBMX führte bei intakten Paramecien außerdem zu einer Erhöhung des Cilienschlages und Hyperpolarisation (Hennessey et al., 1985; Bonini et al., 1986). Desweiteren stieg der interne cAMP Level um das 4fache gegenüber den Kontrollen in weniger als 30 Sekunden. Der Effekt von IBMX hielt mindestens 30 min an. Es gibt also vor allem von Hennessey et al. (1985) und Bonini et al. (1986) Hinweise, daß IBMX nicht nur die Schwimgeschwindigkeit, sondern auch den cAMP Level in den Zellen durch PDE Hemmung erhöht. Die Wirkung von IBMX hängt aber auch von den vorhandenen Konzentrationen von cAMP und cGMP und somit von der Aktivität der PDE ab. Bei geringer cAMP Konzentration (0,5 µM-2,5 µM) erhöht sich die Aktivität der PDE durch IBMX. Bei höheren cAMP Konzentrationen, wie sie in den vorliegenden Untersuchungen vorgefunden wurden, wirkt IBMX wiederum inhibitorisch auf die PDE (Yamamoto et al., 1983), somit ist hier beim Einsatz von IBMX eine Anreicherung von cAMP zu erwarten. Bonini et al. (1988) vermuten zwar, daß IBMX auf die cGMP-abhängige PDE keinen Effekt hat, doch Schultz et al. (1989a) fanden eine IBMX sensitive cGMP-abhängige PDE in intakten Paramecien. In Verhaltensversuchen kann die gleichzeitige Hemmung

der cAMP- und cGMP-abhängigen PDE dazu führen, daß sich durch die Anreicherung von cAMP und cGMP die physiologischen Effekte aufheben. So kommt es dann auch in den hier durchgeführten Verhaltensversuchen zu keiner Änderung der Schwimmgeschwindigkeit oder der Linearität durch 1 mM IBMX.

Bei den cAMP Konzentrationen mit IBMX Applikation (10,61 pM/mg Protein) zeigt sich außerdem kein Unterschied zu den cAMP Konzentrationen in IBMX-unbehandelten Proben (11,45 pM/mg Protein). Auch Smith et al. (1987) stellte bei Untersuchungen zu der Frage, ob cAMP als Chemoattraktant in *Paramecium* wirken kann, bei externer Applikation von 1 mM IBMX keine Effekte, außer einem Anschwellen der Zellen nach 30 Minuten, fest. Ein Anschwellen der Zellen konnte in den vorliegenden Versuchen nicht bestätigt werden. Daten von Schultz et al. (1984) zeigten ebenfalls, daß IBMX ohne Reiz wenig Effekt auf den cAMP Spiegel in vivo und die cAMP-PDE in vitro haben. Schultz et al. (1989a) induzierten allerdings eine cGMP Anreicherung in intakten Paramecien-Zellen durch gleichzeitige Stimulation mit Barium als depolarisierenden Reiz und 5 mM IBMX. In den ersten 30 Sekunden reicherten sich 500 pM cGMP/mg Protein an; dann folgte ein langsamer Abfall, der auf eine kompetitive Hemmung der cGMP-PDE durch IBMX hinweist. Ohne IBMX war der maximale Level von cGMP bei Bariumreizung 40-50 pM cGMP/mg Protein. Auch Bonini et al. (1988) zeigten an Triton-X permeabilisierten Paramecien, daß die Wahrscheinlichkeit steigt, daß die Zellen auf cAMP Änderungen mit Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit reagierten, wenn sie gleichzeitig IBMX (1 mM) ausgesetzt waren. Aus den Versuchen von Schultz et al. und Bonini et al. kann man schließen, daß IBMX nur in Verbindung mit einem Reiz wirkt. Schultz et al. (1989a) zeigten dies deutlich, indem sie IBMX erst 5 Minuten nach Bariumzugabe applizierten und bei diesem Versuchsansatz keinen großen Effekt auf die cGMP Konzentration fanden.

Aufgrund der Ergebnisse von Schultz et al. (1989a) und Bonini et al. (1988) wurde IBMX in den vorliegenden Untersuchungen als potentieller PDE Hemmer bei Magnetfeldapplikation eingesetzt. Es zeigte sich bei IBMX-Einsatz (1 mM) eine ständige cAMP Konzentrations-erhöhung gegenüber der Kontrolle, die ebenfalls mit IBMX behandelt war. Eigentlich wäre ein kontinuierlicher Anstieg der cAMP Konzentration bei Feldeinwirkung durch die Hemmung der PDE zu erwarten gewesen, da eine Erhöhung der Aktivität der Adenylatcyclase durch das Feld vermutet wurde. Die Hemmung der PDE kann also nicht vollständig erfolgt sein. Da IBMX nicht sehr spezifisch wirkt, könnten andere, nicht geblockte, PDE die Inhibition ausgeglichen haben. Das Ergebnis der vorliegenden Versuche zeigt somit deutlich, daß das Magnetfeld eine Erhöhung der Adenylatcyclase-Aktivität induziert.

Fazit: Die Ergebnisse durch den Einsatz von IBMX weisen klar darauf hin, daß durch das Magnetfeld eine Aktivierung der cAMP-Adenylatcyclase stattgefunden hat. Diese Aktivierung hält über die gesamte Expositionsdauer von 30 Minuten an. Das Magnetfeld wirkt also direkt oder indirekt auf die Adenylatcyclase, doch ohne den Einsatz des PDE-Inhibitors IBMX wurde diese Aktivierung der AC über die gesamte Expositionszeit nicht deutlich, da anscheinend Kompensationsmechanismen (z. B. Aktivierung der PDE) die Anreicherung von cAMP verhinderten. Zu vermuten ist eine antagonistische Wirkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung (Depolarisation), bei der es zu einer cAMP Erniedrigung kommen kann (Nakaoka und Machemer, 1990; Schultz et al., 1992) und der Hemmung der PDE, wodurch es zu einer cAMP Erhöhung kommt. Bei dem Einsatz von IBMX und der Interpretation der Effekte sollte aber generell bedacht werden, daß die Wirkung von verschiedenen Faktoren, wie dem physiologischen Zustand der Zellen und dem Vorhandensein bestimmter G-Proteine, abhängt.

#### **4.2.6 cAMP und Koffein**

Beavo et al. (1970) testete verschiedene Xanthine als PDE-Hemmer an Zellhomogenaten, unter anderem auch Koffein, wobei er dieses Substrat als nicht so wirksam einstufte. Da IBMX bei *Paramecium* aber ohne Reiz keine Hemmung der PDE auslöste, sollte überprüft werden, ob nicht Koffein in *Paramecium* einen eindeutigeren Effekt hat. Es ist bekannt, daß Koffein membranpermeabel ist und innerhalb von Sekunden wirken kann (Bianchi, 1962; Toescu et al., 1992), dennoch ist eine mindestens 10 mM Konzentration für die Wirkung nötig (Cheek et al., 1993).

Fazit: Koffein zeigte bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten und einer Konzentration von 20 mM eine bessere Wirksamkeit als IBMX; es kommt daher als Alternative für die Inhibition der PDE von *Paramecium* in Frage.

#### **4.2.7 Warum hängt eine Reaktion vom cAMP/cGMP Grundlevel ab?**

In den vorliegenden Versuchen reagiert *Paramecium* bei geringerem Ausgangslevel an cAMP oder cGMP eher auf einen externen Reiz, der die Konzentration der Sekundären Botenstoffe erhöht. Bei hohem Grundlevel verhält es sich genau umgekehrt, es erfolgt eher eine Verringerung der Level und die Reaktion auf das Magnetfeld ist schwächer. Diese Verhältnisse weisen auf das Zusammenspiel der Adenylatcyclasen und der Phosphodiesterasen hin, denn bei geringem cAMP/cGMP Level ist die PDE nicht ausgelastet und baut soviel cyclische Nukleotide ab, daß ein niedriger Grundlevel gehalten wird. Die Guanylatcyclase oder Adenylatcyclase hat somit noch Kapazitäten, so daß bei einer Reizeinwirkung eine starke Reaktion, d.h. eine große Veränderung der Konzentration möglich ist. Sind beide Enzyme, wie bei hohem Grundlevel, schon ausgelastet, ist auch eine theoretisch induzierte Steigerung der Aktivität nicht

unbedingt in einer Änderung der cAMP/cGMP Konzentrationen zu bemerken. Blank und Blank (1992) und Blank und Soo (1993) zeigten ebenfalls, daß bei optimaler Aktivität einer ATPase durch das Feld eine Inhibition bewirkt wird; ist aber die Enzymaktivität unter dem optimalen Level, so stimuliert ein EMF das Enzym.

Fazit: Ein Umweltreiz, wie das Magnetfeld, der bei ausgelasteten Cyklasen und Phosphodiesterasen auf *Paramecium* einwirkt, kann eher physiologisch relevante (eventuell sogar schädigende) Auswirkungen haben, als wenn eine Kompensation des Reizes durch Steigerung der Enzymaktivität möglich ist.

### 4.3 Pawn-Mutante

Die hier durchgeführten Verhaltensversuche mit *Paramecium biaurelia* lassen einen Einfluß des Feldes auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und/oder intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher vermuten (siehe 4.1.2). Dies sollte mit Hilfe der Pawn-Mutante überprüft werden. Diese Mutante von *Paramecium tetraurelia* kann sich wie die Schachfigur des "Bauern" nicht rückwärts bewegen, weil sie defekte spannungssensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle besitzt, die sich bei einer Depolarisation nicht öffnen (Kung, 1971). Der Defekt betrifft ausschließlich die spannungssensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und nicht die Mechanismen, die erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]$  durch Öffnung somatischer Kanäle und Umkehrung des Cilienkraftschlages bewirken (Kung und Naitoh, 1973).

Setzt man diese Mutante einem Magnetfeld von 2 mT für 30 Minuten aus, so zeigt sich schon nach wenigen Minuten ein Anstieg der Schwimgeschwindigkeit, was auf eine Hyperpolarisation schließen läßt. Der Zeitverlauf dieser Reaktion entspricht ungefähr dem der Depolarisation beim Wildtyp. Die Linearität der Schwimmbahnen nimmt im Gegensatz zur Reaktion des Wildtyps im Laufe der Magnetfeldeinwirkung zu. Die bei der Pawn-Mutante defekten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind daher entscheidend für die Wirkung des Feldes beim Wildtyp, folglich sind an der Depolarisation von *Paramecium biaurelia* durch das Magnetfeld  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beteiligt. Das Magnetfeld induziert bei der Pawn-Mutante eine Hyperpolarisation; es könnte also durchaus sein, daß auch beim Wildtyp eine Hyperpolarisation der Zellen stattfindet, die durch die stärkere Depolarisation überdeckt wird. Ein Hinweis darauf ist der ähnliche Verlauf der cAMP-Level bei Magnetfeld-Einwirkung, denn bei Pawn zeigt sich ebenfalls eine Erhöhung der cAMP Konzentration innerhalb der ersten Sekunden.

Schultz und Schade (1989a) zeigten, daß Veratridin die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in *Paramecium tetraurelia* und auch in der Pawn-Mutante öffnet und so zu einem cGMP Anstieg in den Zellen führte. Ohne Veratridin kommt es bei Depolarisation der Zellen nicht zu einem

cGMP Anstieg bei der Pawn-Mutante (Schultz et al., 1986). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalproteine in Pawn sind demzufolge intakt und nur die Aktivierung oder die Inaktivierung der Kanäle gestört (Schultz und Schade, 1989b). Eine Wirkung des Feldes auf den Aktivierungsmechanismus bei Pawn findet hier also nicht statt, da die Zellen ansonsten depolarisieren müßten.

Fazit: Versuche mit der Pawn-Mutante ergeben, daß an der Reaktion von *Paramecium biaurelia* auf das Magnetfeld wahrscheinlich spannungssensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beteiligt sind. Die Wirkung des Feldes auf die Aktivität der Adenylatcyclase ist unabhängig von der Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle.

#### **4.4 Melatonin und 5`-Methoxytryptamin**

Melatonin ist evolutionär stark konserviert; die Bildung von Melatonin und anderen methoxylierten Indolaminen (wie 5`-Methoxytryptamin) konnte in Einzellern (Balzer und Hardeland, 1996), Invertebraten und Vertebraten nachgewiesen werden. Melatonin kann als onkostatisch angesehen werden, und es verstärkt die Anti-Krebs Effekte von chemotherapeutischen Substanzen, während es ihre toxischen Effekte verringert (Panzer und Vijoen, 1997). Melatonin verhindert Tumorwachstum von Mammakarzinomen in vitro (Tamarkin et al., 1981) und könnte auch auf andere Arten von Krebszellen onkostatische Effekte haben (Reiter, 1997). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß geringe Änderungen im Melatoningehalt, möglicherweise induziert durch niederfrequente EMF, physiologisch relevant sein können. Die sogenannte Melatonin-Hypothese von Stevens (1987) hat sich in den letzten Jahren als wahrscheinlichster Mechanismus für die krebspromovierende Wirkung von EMF, besonders für Brustkrebs (Löscher et al., 1993; Mevissen et al., 1993), herauskristallisiert. Es wird vermutet, daß EMF die nächtliche Melatoninproduktion unterdrücken (Juutilainen et al., 2000). Reduzierte Melatonin-Level wiederum können zu erhöhtem Brustkrebsrisiko führen (Stevens und Davis, 1996).

Einige Tierversuche (Kato und Shigemitsu, 1997; Yellon, 1997), aber nicht alle (Heikkinen et al., 1998), zeigen, daß die nächtliche Melatoninproduktion durch Magnetfelder gehemmt wird. In Versuchen mit Hamstern konnte eine Reduktion der pinealen Melatonin-Level und Plasmamelatonin-Level durch 60 Hz Magnetfelder festgestellt werden (Yellon, 1994). Einige Untersuchungen an Ratten bestätigten in Langzeitversuchen eine Reduktion des nächtlichen Melatoningehaltes oder des Melatonins im Blut (Löscher et al., 1994; Kato et al., 1994; Selmaoui et al., 1995); andere Wissenschaftler fanden jedoch keine Effekte (Mevissen et al., 1996; John et al., 1998). In Hamstern wurde nach Exposition für 15 Minuten von einem Magnetfeld von

60 Hz (0,1 mT) eine Verringerung des pinealen Melatoningehaltes gemessen, die nach 42 Tagen Magnetfeldexposition nicht mehr nachweisbar war (Wilson et al., 1999). Kurzzeitexpositionen von Menschen unter Laborbedingungen konnten die Melatonin-Hypothese bisher nicht unterstützen (Selmaoui et al., 1996; Graham et al., 1996), doch epidemiologische Studien geben Hinweise, daß eine Melatoninreduktion auch bei Menschen, die Magnetfeldern im Alltag ausgesetzt sind, auftritt (Pfluger und Minder, 1996; Burch et al., 1998).

In *Paramecium* konnte kein Melatonin, dafür aber zum ersten Mal das Melatonin-Analogon 5'-Methoxytryptamin (=5MT) nachgewiesen werden. 5MT ist häufig in Einzellern viel wirksamer als Melatonin, wie z. B. bei der Cystenbildung, Biolumineszenz und cytoplasmatischer Ansäuerung (Balzer und Hardeland, 1991b). Folglich wird auch bei *Paramecium*, da hier kein Melatonin gefunden wurde, angenommen, daß 5MT das aktive Metabolit ist und mit den Ergebnissen aus anderen Versuchen bezüglich Melatonin-Reduktion durch EMF verglichen. Nach einer Sekunde Magnetfeldeinwirkung, bei der die 5MT Konzentration zwar nicht signifikant, aber doch um 30 % gegenüber der Kontrolle erhöht war, zeigte sich über die gesamte restliche Expositionsdauer von 30 Minuten eine deutliche, im Mittel 40 %ige, Abnahme der 5MT Konzentration gegenüber den Kontrollen. Die 5MT Bildung ist bei Einzellern auf zwei Wegen möglich: direkt aus Serotonin oder aus Melatonin durch das Enzym Aryl-Acyl-Amidase (AAA). 5MT hat bei verschiedenen Einzellern (z. B. *Gonyaulax polyedra*) einen circadianen Rhythmus mit einem kleinen Maximum am Tag. Tagsüber wird 5MT aus Serotonin synthetisiert, da dann wenig AAA vorhanden ist (Hardeland und Fuhrberg, 1996). Alle innerhalb dieser Untersuchungen durchgeführten Versuche haben tagsüber stattgefunden, somit kann davon ausgegangen werden, daß 5MT aus Serotonin gewonnen wurde. Es könnte also durch das Magnetfeld entweder der Syntheseweg für Serotonin oder die Umwandlung von Serotonin in 5MT gehemmt werden.

Die meisten untersuchten Nicht-Metazoen weisen hohe Konzentration an 5MT auf (Hardeland, 1999). Hardeland und Fuhrberg (1996) bestimmten die Konzentration von 5MT in *Gonyaulax polyedra* (einem Dinoflagellaten) mit 1-2,5 ng/mg Protein. Wurde Cystenbildung induziert, so stieg die Melatoninkonzentration innerhalb von drei Stunden um das 25fache an. Bei Cystenbildung stieg der Melatoninspiegel sogar auf ein noch höheres Niveau, einige 100 ng oder sogar µg/mg Protein. Die Schwelle für die Wirksamkeit extern applizierten 5MT lag sehr niedrig bei  $2 \cdot 10^{-8}$  M; der physiologisch wirksame Level in der Zelle wird folglich auch sehr niedrig sein (Balzer und Hardeland 1991a, b). In den vorliegenden Untersuchungen wurden sehr hohe Konzentrationen zwischen 5 und 75 µg 5MT pro mg Protein gefunden.

Fazit: 5'-Methoxytryptamin konnte erstmals in *Paramecium biaurelia* nachgewiesen werden, wobei in den vorliegenden Untersuchungen der Syntheseweg über Serotonin anzunehmen ist. Die hohen gefundenen Konzentrationen weisen auf eine wichtige Rolle von 5MT in dem Einzeller hin; zu vermuten ist vor allem eine Funktion als Radikalfänger.

#### **4.4.1 Melatonin interagiert mit Ca<sup>2+</sup> und cAMP**

Exponiert man Zirbeldrüsenzellen von Hühnern, die eine Zeit lang in Dunkelheit kultiviert wurden, Weißlicht oder Substanzen, die eine Steigerung des Ca<sup>2+</sup>-Influx (z. B. Bay K 8644) oder cAMP Erhöhung (z. B. 8BrcAMP) zur Folge haben, bewirkt dies einen Anstieg der Melatoninproduktion (Zatz, 1989; Faillace et al. 1996). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß Melatonin und 5MT im Dinoflagellaten *Cryptothecodinium cohnii* dosisabhängig Ca<sup>2+</sup>-Influx stimulieren (Tsim et al., 1997, 1998). Bei den vorliegenden Versuchen erhöht sich der 5MT-Spiegel in der ersten Sekunde der Magnetfeld-einwirkung; als Konsequenz sollte sich eine cAMP Erhöhung ergeben. Änderungen der 5MT Konzentrationen können aber auch cAMP-unabhängig stattfinden, wobei Versuche mit Substanzen, die einen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg bewirken, dramatische Erhöhungen des Melatonin-Levels im Pinealorgan von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) bewirkten, ohne daß sich der cAMP Spiegel änderte (Nikaido und Takahashi, 1996). Bei den vorliegenden Untersuchungen konnte jedoch eine cAMP Erhöhung in *Paramecium*, wenn sie auch verzögert erfolgt, nachgewiesen werden.

Nachdem eine Erhöhung der intrazellulären [Ca<sup>2+</sup>] bei EMF Exposition vermutet werden kann, dürfte nach den oben beschriebenen Untersuchungen eine Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung mit einer Erhöhung von 5MT korrelieren; dies trifft jedoch nicht zu. Trotz der erfolgten Depolarisation und der damit verbundenen [Ca<sup>2+</sup>]-Erhöhung bei *Paramecium* durch das Magnetfeld kommt es zu keiner Erhöhung der 5MT Konzentration, sondern sogar zu einer Reduktion von 5MT in *Paramecium*. Andererseits könnten Effekte von Melatonin auf den Ca<sup>2+</sup>-Level auf eine Hyperpolarisation und somit Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Influx durch spannungssensitive Kanäle zurückzuführen sein (Vaněček und Klein, 1992). Damit könnte die Verbindung zu der Depolarisation der Zellen hergestellt werden: indem der Rückgang von 5MT die Repolarisierung verhindert, bleibt der Ca<sup>2+</sup>-Spiegel kontinuierlich erhöht. Diese Vermutung wird auch durch die Versuche von Zhang und Zhang (1999) unterstützt, die in adulten Mäusegehirnzellen durch Einsatz von Fura-2 zeigten, daß eine Konzentration von 100 nmol/l Melatonin den Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Levels um 40 % verringerte. Das läßt darauf schließen, daß sich Melatonin auch hemmend auf den Ca<sup>2+</sup>-Influx auswirken kann. Es wäre also auch eine direkte Interaktion von 5MT mit den Ca<sup>2+</sup>-Kanälen denkbar. Bisher gibt es allerdings keinen direkten Hinweis auf die Rolle von Melatonin / 5MT bei der Regulation von

Ca<sup>2+</sup>-Kanälen. Die Verbindung von 5MT und Ca<sup>2+</sup>-Influx ist auch im Zusammenhang mit der physiologischen Bedeutung der hier gefundenen EMF Wirkungen besonders interessant, da intrazelluläre [Ca<sup>2+</sup>]-Überlastungen der Zelle zu irreversiblen Schäden führt und ein normaler Weg für die Apoptose ist. Die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>] macht die Entstehung freier Radikale wahrscheinlicher; die Akkumulation von freien Radikalen wiederum fördert den Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]. Eine Theorie besagt, daß das Altern von dem gehäuften Auftreten von Schäden der freien Radikale abhängt (Sandyk, 1990; Jayaraman und Marks, 1998), folglich kann eine Dezimierung der 5MT Konzentration oder der Melatoninkonzentration den Alterungsprozeß fördern.

Abgesehen von der kurzzeitigen stimulierenden Wirkung von Ca<sup>2+</sup> auf die Melatoninproduktion, hat eine längere Exposition eines erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Spiegels eine Hemmung der Aktivität der HIOMT (Hydroxyindol-O-Methyltransferase, synthetisiert aus Serotonin 5MT) zur Folge (Morton, 1987). Außerdem könnte die hohe [Ca<sup>2+</sup>] die Produktion eines Enzym-hemmenden Moleküls induzieren, wie es für NAT gezeigt werden konnte (Chan und Ebadi, 1981; Khoory und Schloot, 1986). In verschiedenen Studien wurde außerdem eine Reduktion von NAT und HIOMT durch EMF festgestellt, was dann in der Folge zu reduzierten Melatonin oder 5MT-Konzentrationen führt (Reiter et al., 1993c). Eine [Ca<sup>2+</sup>]-Erhöhung kann also auch, statt 5MT zu erhöhen, zu der in den vorliegenden Versuchen gemessenen 5MT Reduktion führen.

Fazit: Die Erhöhung der 5MT Konzentration in *Paramecium* in der ersten Sekunde der Magnetfeldexposition ist möglicherweise mit der cAMP Erhöhung in den ersten Sekunden korreliert. Denkbar ist, daß die durch die Verhaltensanalysen belegten [Ca<sup>2+</sup>]-Änderungen bei Applikation des Feldes in einer Hemmung der HIOMT-Aktivität resultieren und so zu dem reduzierten 5MT-Level führen. Die verringerte 5MT Konzentration wiederum könnte durch den Wegfall der inhibierenden Wirkung von 5MT auf Ca<sup>2+</sup>-Kanäle einen weiteren Ca<sup>2+</sup>-Influx bewirken.

#### **4.4.2 Melatonin reguliert Calmodulin, Proteinkinase C und Ionenkanäle**

Benitez-King et al. (1993) beschreiben die spezifische Bindung von Melatonin an Calmodulin und die Hemmung von Ca<sup>2+</sup>-CaM abhängigen Kinasen und PDE-Aktivität durch Melatonin in vitro. Ouyang und Vogel (1998) konnten diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen. Als wahrscheinlicher wurde von ihnen angenommen, daß die Interaktion zwischen Melatonin und CaM durch einen indirekten Weg verbunden sind. Andererseits bestätigten sich die Ergebnisse von Benitez-King et al. bei Versuchen von Pozo (1997) und Romero et al. (1998). Die Bindung von Melatonin an CaM wurde als reversibel, Ca<sup>2+</sup>-abhängig und von hoher Affinität beschrieben (Benitez-King et al., 1993a, b; Romero et al., 1998). Kultivierte MDCK Zellen zeigten in Anwesenheit von

1 nM Melatonin erhöhte CaM-Synthese. Es erhärteten sich die Hinweise, daß die 5'-Methoxygruppe, die Melatonin hydrophob macht, für die Bindung an CaM verantwortlich ist (Benitez-King et al., 1993, 1994). Die hohe Bindungsaffinität deutet darauf hin, daß Melatonin die Zellaktivität durch intrazelluläres Binden an CaM in physiologischen Konzentrationen reguliert. Durch Bindung an Calmodulin könnte es direkt an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion beteiligt sein. Also ist auch denkbar, daß durch eine 5MT bedingte Konformationsänderung oder Konzentrationsänderung von CaM eine Wirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase erfolgt. Bei *Paramecium* zeigte sich in den vorliegenden Versuchen eine Reduktion der 5MT Konzentration durch das EMF, was bei Übertragung der oben beschriebenen Zusammenhänge eine Drosselung der CaM Synthese und daher einen Eingriff in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt bedeutet. Mißt man  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-abhängige PDE-Aktivität in Anwesenheit von verschiedenen Melatoninkonzentrationen, so wird die Enzymaktivierung durch CaM dosisabhängig gehemmt (Benitez-King et al., 1993a).

In *Paramecium* dagegen hat Calmodulin die Fähigkeit, in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  eine CaM-abhängige Phosphodiesterase zu aktivieren (Walter und Schultz, 1981). Nimmt man also an, daß die CaM-Syntheserate durch das EMF vermindert wird, sollte dies zu einer Erhöhung der cAMP Konzentration durch Inaktivierung der Phosphodiesterase kommen. Zwar kommt es zu einer cAMP Erhöhung durch das Feld, doch beruht diese, wie durch IBMX gezeigt, auf einer Aktivierung der Adenylatcyclase. Folglich ist anzunehmen, daß diese Funktion von CaM bei der Wirkung des Feldes keine Rolle spielt. Weiterhin denkbar ist, daß CaM auch bei der Repolarisation in *Paramecium* ein physiologisch kritischer Faktor ist, der für die Ionenkanal-Aktivierung benötigt wird. CaM wird von verschiedenen Autoren (Preston et al., 1990a, b; Saimi und Ling, 1995) als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor für  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kanäle wie den  $\text{Na}^{2+}$ -Kanal (Saimi und Kung, 1987; Preston et al., 1991) oder  $\text{K}^{+}$ -Kanal (Saimi, 1988; Preston et al., 1991) bei *Paramecium* angesehen. Jaren et al. (2000) untermauerten diese Theorie, indem sie zeigten, daß Mutanten, die Defekte in den CaM Genen besitzen, defekte Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^{+}$ - und  $\text{Na}^{2+}$ -Kanälen aufweisen. Wird durch die Verringerung des 5MT-Levels also eine Reduzierung der CaM-Synthese erreicht, so wird diese sich auch in einer Störung der Repolarisation von *Paramecium* bemerkbar machen. Genau darauf weisen die Verhaltensversuche hin, da sich die Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen sogar noch nach Abschalten des Magnetfeldes fortsetzt.

Ergebnisse von Antón-Tay et al. (1998) zeigten, daß Melatonin nicht nur an CaM bindet, sondern auch mit der Proteinkinase C über die 5'-Methoxygruppe direkt interagiert, aber nur in der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ . Melatonin induziert direkt Veränderungen in der Konformation der PKC, was sich in einer Verringerung der

Aktivität und Autophosphorylierung niederschlägt (Benitez-King et al., 1994, 1998). Proteinkinasen bei *Paramecium* könnten für die Übertragung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals zum Axonem verantwortlich sein (Preston et al., 1990a, b; Bonini et al., 1991; Noguchi et al., 2001). Durch das Magnetfeld kommt es zu einer  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung und gleichzeitiger Verringerung der 5MT Konzentration, dadurch kann die PKC aktiviert werden. Die Aktivierung schlägt sich möglicherweise in einer Verhaltensänderung, wie der Abnahme des Linearitätsindex, nieder.

Fazit: Bei Magnetfeldexposition zeigt sich bei *Paramecium* eine deutliche Dezimierung der 5MT Konzentration. Dies kann zu einer Reduzierung der CaM Synthese und daraus folgend zu einer Modifikation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase führen. Außerdem ist CaM wahrscheinlich in die Regulation von Ionenkanälen involviert, so daß eine CaM Verringerung eine Störung der Repolarisation von *Paramecium* bedeutet. Eine entscheidende Auswirkung des 5MT Rückgangs kann desweiteren eine Aktivierung von Proteinkinasen sein.

All diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß diese Verknüpfungen (siehe 4.4.1 und 4.4.2) im Resultat zu der Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen während und nach der Magnetfeldexposition führen können.

## 5 Zusammenfassung

Signalsysteme in Säugerzellen werden schon seit Jahren im Hinblick auf die Wirkungen von Magnetfeldern untersucht, wobei viele Experimentatoren transformierte Zellen verwenden; diese reagieren oft völlig anders auf EMF als nicht transformierte Zellen (Simkò et al., 1998). Es ist daher fraglich, ob abnormale Zellen ein gutes Modell darstellen. In den letzten Jahren stellten Forscher, die mit niederen Eukaryoten, wie Flagellaten, Schleimpilzen, Ciliaten und Hefezellen arbeiteten, fest, daß viele Konzepte und Kontrollmechanismen, die bei Metazoen bekannt sind, sich auch auf Einzeller übertragen lassen. Dies trifft auf regulatorische Signaltransduktionssysteme zu, die mit fundamentalen Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose zu tun haben. Besonders Ciliaten, vor allem *Paramecium*, sind wegen der gut verstandenen Vorgänge auf zellulärer Ebene geeignete Modellsysteme. Daher wurden in dieser Arbeit anhand von *Paramecium biaurelia* die Effekte eines 50 Hz Magnetfeldes der Flußdichte 2 mT auf die Signaltransduktion untersucht. Als Ausgangspunkt dienten Verhaltensanalysen mittels computerunterstützter Bildverarbeitung, die Hinweise auf die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  an der Magnetfeldreaktion gaben. Desweiteren wurden die Einflüsse des Feldes auf das cAMP- und cGMP-System der Zelle durch Fluoroimmuno- und Radioimmuno-Assays erforscht. Anhand der Pawn-Mutante, die defekte spannungssensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle besitzt, konnte die Beteiligung dieser Kanäle an der Reaktion auf das Magnetfeld von *Paramecium* untersucht werden. Zur weiteren Klärung der beobachteten cAMP Erhöhungen wurde außerdem der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX eingesetzt. Da die sogenannte Melatonin-Hypothese nach Stevens (1987), die von einer Reduzierung der Melatoninproduktion durch das Feld ausgeht, zur Zeit als plausibelste Erklärung zur möglichen krebspromovierenden Wirkung von Magnetfeldern angesehen wird, sollte diese anhand des Modellsystems *Paramecium* überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Während der Einwirkung eines 50 Hz Magnetfeldes für 30 Minuten kommt es bei *Paramecium biaurelia* zu einer sukzessiven Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen, während sich keine wesentliche Veränderung in der Schwimmgeschwindigkeit zeigt. Die graduelle Abnahme der Linearität konnte durch Auswertungen der Schwimmbahnen in Minutenintervallen anschaulich gemacht werden. Nach Ausschalten des Feldes hält die Reaktion des Abweichens von der linearen Schwimmbahn für etwa 20 Minuten an, wobei in diesem Zeitrahmen in einigen Versuchen auch die Schwimmgeschwindigkeit abnimmt. Die Abnahme der Linearität der Schwimmbahnen und die

Verringerung der Schwimgeschwindigkeit weisen deutlich auf eine Depolarisation der Zellen hin. Möglicherweise kommt es durch das Feld zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in den Cilien und so zu einem  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg, der wiederum zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den Alveolarsäcken führen kann und somit zu einem Abweichen von der linearen Schwimmbahn der Paramecien.

2. Versuche mit der Pawn-Mutante, die defekte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle besitzt, können diese Hypothese untermauern, da die Mutante im Magnetfeld einen Anstieg der Schwimgeschwindigkeit zeigt, was auf eine Hyperpolarisation schließen läßt. Der Zeitverlauf dieser Reaktion entspricht ungefähr dem der Depolarisation beim Wildtyp. Die Linearität der Schwimmbahnen nimmt im Gegensatz zur Reaktion des Wildtyps im Laufe der Magnetfeldeinwirkung zu. Daher ist davon auszugehen, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle für eine Reaktion auf das Magnetfeld nötig sind.
3. Es zeigen sich keine Veränderungen der cGMP Konzentration bei *Paramecium biaurelia* durch die Magnetfeldexposition.
4. In den ersten Sekunden der Exposition wird durch das Magnetfeld eine Erhöhung der cAMP Konzentration in *Paramecium biaurelia* bewirkt. Dies läßt auf eine direkte oder indirekte Aktivierung der Adenylatcyclase oder Hemmung der Phosphodiesterase durch das Feld schließen. Der Einsatz von IBMX bewirkt bei Magnetfeldexposition eine ständige Erhöhung der cAMP Konzentration im Verhältnis zur Kontrolle. Es ist daher eine direkte oder indirekte Aktivierung der cAMP-Adenylatcyclase anzunehmen. Diese Aktivierung hält über die gesamte Expositionsdauer von 30 Minuten an.
5. Bei der Pawn-Mutante zeigt sich ebenfalls eine Erhöhung von cAMP innerhalb der ersten Sekunden. Die Wirkung des Feldes auf die Aktivität der Adenylatcyclase ist somit unabhängig von der Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle.
6. Bei geringerem zellulärem Ausgangslevel an cAMP oder cGMP reagiert *Paramecium biaurelia* eher auf einen externen Reiz, der die Konzentration der Sekundären Botenstoffe erhöht. Bei hohem Grundlevel verhält es sich genau umgekehrt; es erfolgt eher eine Verringerung der Level und die Reaktion auf das Magnetfeld ist schwächer. Ein Umweltreiz, wie das Magnetfeld, der bei ausgelasteten Cyklasen und Phosphodiesterasen auf *Paramecium* einwirkt, kann daher eher störend auf die Zellhomöostase wirken, als wenn eine Kompensation durch Steigerung der Enzymaktivität möglich ist.

7. Zum ersten Mal konnte in *Paramecium biaurelia* 5'-Methoxytryptamin (5MT) nachgewiesen werden. Im Median wurden 32 µg/mg Protein gefunden. Diese hohe Konzentration weist auf eine wichtige Rolle, wahrscheinlich als Radikalfänger, von 5MT in dem Einzeller hin.
8. In der ersten Sekunde der Magnetfeldexposition kommt es zu einer Erhöhung der 5MT Konzentration in *Paramecium*. Diese korreliert möglicherweise mit der cAMP Erhöhung in den ersten Sekunden.
9. Nach einer Sekunde Magnetfeldapplikation kommt es zu einer, über die gesamte Expositionszeit von 30 Minuten andauernden, Verringerung der 5MT Konzentration in *Paramecium biaurelia*. Denkbar ist, daß die  $[Ca^{2+}]$ -Erhöhung während der Applikation des Feldes in einer Hemmung der HIOMT-Aktivität resultiert und so zu dem reduzierten 5MT-Level führt. Die verringerte 5MT-Konzentration wiederum könnte durch den Wegfall der inhibierenden Wirkung von 5MT auf  $Ca^{2+}$ -Kanäle einen weiteren  $Ca^{2+}$ -Influx bewirken. Diese Verknüpfung könnte die Depolarisation von *Paramecium biaurelia* bei Magnetfeldexposition erklären.

Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen einen deutlichen Einfluß eines 50 Hz Magnetfeldes der Flußdichte von 2 mT auf das Schwimmverhalten und das Signaltransduktionssystem von *Paramecium biaurelia* und der Pawn-Mutante. Die Verhaltensversuche mit *Paramecium biaurelia* und der Pawn-Mutante weisen auf einen Einfluß des Feldes auf die spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle hin. Das cAMP-Signalsystem wird ebenfalls gestört, wobei durch IBMX gezeigt werden konnte, daß das Magnetfeld die Adenylatcyclase direkt oder indirekt aktiviert. Die Melatonin-Hypothese von Stevens (1987) wird durch die vorliegenden Untersuchungen unterstützt; das Magnetfeld induziert eine deutliche Abnahme der 5'-Methoxytryptamin Konzentration in *Paramecium biaurelia*. Diese Ergebnisse belegen, daß Störungen, die in humanen Zellen durch Magnetfelder induziert werden, äquivalent in *Paramecium* auftreten können. Eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen als Gesamtorganismus ist sicher nicht gegeben, dennoch sind die grundlegenden Signaltransduktionssysteme soweit vergleichbar, daß ein möglicher Ansatzpunkt der Magnetfeldwirkung durch diese Untersuchungen gegeben wird.

## 6 Literatur

- Allen, R.D.: Cytology. In: *Paramecium*, Görtz, H.-D. (ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 4-40 (1988)
- Antón-Tay, F.; Martinez, I.; Tovar, R.; Benitez-King, G.: Modulation of the subcellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells, *Journal of Pineal Research* 24, S. 35-42 (1998)
- Aoki, H.; Yamazaki, H.; Yoshino, T.; Akagi, T.: Effects of static magnetic fields on membrane permeability of a cultured cell line; *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 69, S. 103-106 (1990)
- Arnetz, B.B.; Berg, M.: Melatonin and adrenocorticotrophic hormone levels in video display unit workers during work and leisure, *Journal of Occupational Medicine* 38, S. 1108-1110 (1996)
- Asanova, T.P.; Rakov, A.N.: The health status of people working in the electric field of open 400-500 kV switching structures, *Gigiena truda i professionalnye zabojevanija* 10, S. 50-52 (1966)
- Babbitt, J.T.; Kharazi, A.I.; Taylor, J.M.G.; Rafferty, C.N.; Kovatch, R.; Bonds, C.B.; Mirell, S.G.; Frumkin, E.; Dietrich, F.; Zhuang, D.; Hahn, T.J.M.: Leukemia/lymphoma in mice exposed to 60-Hz magnetic fields: Results of the chronic exposure study TR-110338, Los Angeles: EPRI (1998)
- Baldwin, W.S.; Barrett, J.C.: Melatonin: Receptor-mediated events that may affect breast and other steroid hormone-dependent cancers, *Carcinogenesis* 21, S. 149-155 (1998)
- Balzer, I.; Hardeland, R.: Circadian rhythmicity in the stimulation of bioluminescence by biogenic amines and MAO inhibitors in *Gonyaulax polyedra*, *International Journal of Biometeorology* 34, S. 231-234 (1991a)
- Balzer, I.; Hardeland, R.: Photoperiodism and effects of indolamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*, *Science* 253, S. 795-797 (1991b)
- Balzer, I.; Hardeland, R.: Melatonin in algae and higher plants, possible new roles as a phytohormone and antioxidant, *Botanica Acta* 109, S. 180-183 (1996)
- Batschelet, E.: Circular statistics in Biology, In: *Mathematics in Biology*, Sibson, R.; Cohen, J.E. (eds), London, New York, Academic Press (1981)
- Beavo, J.A.; Rogers, N.L.; Crofford, O.B.; Hardman, J.G.; Sutherland, E.W.; Newman, E.V.: Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3`5`-monophosphat phosphodiesterase activity, *Molecular Pharmacology* 6, S. 597-603 (1970)
- Beavo, J.A.; Rogers, N.L.; Crofford, O.B.; Baird, C.E.; Hardman, J.G.; Sutherland, E.W.; Newman, E.V.: Effects of phosphodiesterase inhibitors on cyclic AMP levels and on lipolysis, *Annals New York Academy of Sciences*, S. 129-136 (1971)
- Becker, E.; Hemmersbach, R.; Stockem, W.: Einfluß niederfrequenter Magnetfelder auf das Orientierungsverhalten von Einzellern, *DLR-Nachrichten* 81, S. 22-26 (1996)
- Becker, E.: Untersuchungen zum Einfluß niederfrequenter Magnetfelder auf verschiedene Ciliaten, Diplomarbeit, Universität Bonn (1994)
- Bell, G.B.; Marino, A.A.; Chesson, A.L.: Alterations in brain electrical activity caused by magnetic fields: detecting the detection process; *Electroencephalography and clinical Neurophysiology* 83, S. 389-397 (1992)

- Benitez-King, G.; Huerto-Delgadillo, L.; Anton-Tay, F.: Binding of  $^3\text{H}$ -melatonin to calmodulin, *Life Sciences* 53, S. 201-207 (1993a)
- Benitez-King, G.; Anton-Tay, F.: Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects, *Experientia* 49, S. 635-641 (1993b)
- Bersani, F.; Marinelli, F.; Ognibene, A.; Matteucci, A.; Cecchi, S.; Santi, S.; Squarzone, S.; Maraldi, N.: Intramembrane protein distribution in cell cultures is affected by 50 Hz pulsed magnetic fields; *Bioelectromagnetics* 18, S. 463-469 (1997)
- Bezrukov, S.M.; Vodyanoy, I.: Stochastic resonance at the single-cell level, *Nature* 388, S. 632-633 (1997)
- Bianchi, C.P.: Kinetics of radiocaffeine uptake and release in frog sartorius, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 138, S. 41-47 (1962)
- Blackman, C.F.; Benane, S.G.; Rabinowitz, J.R.; House, D.E.; Joines, W.T.: A role for the magnetic field in the radiation-induced efflux of calcium ions from brain tissue in vivo, *Bioelectromagnetics* 6, S. 327-337 (1985)
- Blackman, C.F.; Benane, S.G.; House, D.E.; Pollock, M.M.: Action of 50 Hz magnetic fields on neurite outgrowth in pheochromocytoma cells, *Bioelectromagnetics* 14, S. 273-286 (1993a)
- Blackman, C.F.; Benane, S.G.; House, D.E.: Evidence for direct effect of magnetic fields on neurite outgrowth, *FASEB Journal* 7, S. 801-806 (1993b)
- Blank, M.: Biological effects of environmental electromagnetic fields: molecular mechanisms, *Biosystems* 35, S. 175-178 (1995)
- Blank, M.: Na,K-ATPase function in alternating electric fields, *FASEB Journal* 6, S. 2434-2438 (1992)
- Blank, M.; Soo, L.: The Na,K-ATPase as a model for electromagnetic field effects on cells, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 30, S. 85-92 (1993)
- Blum, J.J.; Hayes, A.; Jamieson, G.; Vanaman, T.: Effect of calmodulin on dynein ATPase of *Tetrahymena* cilia, *Journal of Cell Biology* 87, S. 386-397 (1980)
- Bolognani, L.: ATPase and ATPsynthetase activity in myosin exposed to low power laser and pulsed electromagnetic fields; *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 32, S. 155-164 (1993)
- Bonini, N.M.; Gustin, M.C.; Nelson, D.L.: Regulation of ciliary motility by membrane potential in *Paramecium*: a role of cyclic AMP, *Cell Motility and the Cytoskeleton* 6, S. 256-272 (1986)
- Bonini, N.M.; Nelson, D.L.: Differential regulation of *Paramecium* ciliary motility by cAMP and cGMP, *Journal of Cell Biology* 106, S.1615-1623 (1988)
- Bonini, N.M.; Nelson, D.L.: Phosphoproteins associated with cyclic nucleotide stimulation of ciliary motility in *Paramecium*, *Journal of Cell Science* 95, S. 219-230 (1990)
- Bonini, N.M.; Evand, T.C.; Miglietta, L.A.P.; Nelson, D.L.: The regulation of ciliary motility in *Paramecium* by  $\text{Ca}^{2+}$  and cyclic nucleotides, *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 23, S. 227-272 (1991)
- Brainard, G.C.; Kavet, R.; Leeka, I.K.: The relationship between electromagnetic field and light exposures to melatonin and breast cancer risk: a review of the relevant literature, *Journal of Pineal Research* 26, S. 65-100 (1999)
- Brehm, P.; Eckert, R.: Calcium entry lead to inactivation of calcium channel in *Paramecium*, *Science* 202, S. 1203-1206 (1978)

- Brinkmann, K.; Kärner, H.C.; Schaefer, H. (eds): Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme in schwachen 50-Hz Magnetfeldern, Band 4, Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, vde Verlag, Berlin, Offenbach (1995)
- Brinkmann, K.; Schaefer, H. (eds): Untersuchungen zur Magnetfeldexposition der Bevölkerung im Niederfrequenzbereich, Band 3, Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, vde Verlag, Berlin, Offenbach (1996)
- Bührer, C.: Berechnung der durch das Magnetfeld induzierten Strömungen, persönliche Kommunikation (1998)
- Burch, J.B.; Reif, J.S.; Yost, M.G.; Keffe, T.J.; Pitrat, C.A.: Nocturnal excretion of a urinary melatonin metabolite in electric utility workers, *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 24, S. 183-189 (1998)
- Cadossi, R.; Bersani, F.; Cossarizza, A.; Zucchini, P.; Emilia, G.; Torelli, G.; Franceschi, C.: Lymphocytes and low frequency electromagnetic fields, *FASEB Journal* 6, S. 2667-2674 (1992)
- Cané, V.; Botti, P.; Soana, S.: Pulsed magnetic fields improve osteoblast activity during the repair of an experimental osseous defect, *Journal of Orthopaedic Research* 11, S. 664-670 (1993)
- Carson, J.J.L.; Prato, F.S.; Drost, D.J.; Diesbourg, L.D.; Dixon: Time-varying magnetic fields increase cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in HL-60 cells, *American Journal of Physiology C* 259, S. 687-692 (1990)
- Chan, A.; Ebadi, M.: Evidence for existence of a serotonin N-acetyltransferase inactivating substance in rat pineal gland, *Endocrine Research Communications* 8, S. 205-227 (1981)
- Cheek, T.R.; Moreton, R.B.; Berridge, M.J.; Stauderman, K.A.; Murawsky, M.M.; Bootman, M.D.: Quantal  $\text{Ca}^{2+}$ -release from caffeine-sensitive stores in adrenal chromaffin cells, *Journal of Biological Chemistry* 268, S. 27076-27083 (1993)
- Clark, K.D., Hennessey, T.M., Nelson, D.L., Preston, R.R., Extracellular GTP causes membrane-potential oscillations through the parallel activation of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  currents in *Paramecium tetraurelia*, *Journal of Membrane Biology* 157, S. 159-167, (1997)
- Collins, J.J.; Imhoff, T.T.; Grigg, P.: Noise-enhanced information transmission in rat SA1 cutaneous mechanoreceptors via aperiodic stochastic resonance, *Journal of Neurophysiology* 76, S. 642-645 (1996)
- Conti, P.; Gigante, G.E.; Alesse, E.; Cifonte, M.G.; Fieschi, C.; Reale, M.; Angeletti, P.U.: A role for  $\text{Ca}^{2+}$  in the effect of very low frequency electromagnetic field on blastogenesis of human lymphocytes, *FEBS Letters* 181, S. 28-32 (1985)
- De Seze, R.; Tuffet, S.; Moreau, J.-M.; Veyret, B.: Effects of 100 mT time varying magnetic fields on the growth of tumors in mice, *Bioelectromagnetics* 21, S. 107-111 (2000)
- Dihel, L.E.; Smith-Sonneborn, J.; Middauth, C.R.: Effects of an extremely low frequency electromagnetic field on the cell division rate and plasma membrane of *Paramecium tetraurelia*, *Bioelectromagnetics* 6, S. 61-71 (1985)
- Dijk, D.J.; Duffy, J.F.; Riel, E.; Shanahan, T.L.; Czeisler, C.A.: Ageing and the circadian and homeostatic regulation of human sleep during forced desynchrony of rest, melatonin and temperature rhythms, *Journal of Physiology* 516, S. 611-627 (1999)
- Douglass, J.K.; Wilkens, L.; Pantazidou, E.; Moss, F.: Noise enhancement of information transfer in crayfish mechanoreceptors by stochastic resonance, *Nature* 365, S. 337-340 (1993)

- Dressendörfer, R.A.; Heim, J.-M.; Gerzer, R.; Strasburger, C.J.: A non-isotopic immunoassay for guanosine 3':5'-cyclic monophosphate using a cyclic GMP-biotin conjugate as tracer, *Journal of Immunoassay* 16, S. 37-53 (1995)
- Eckert, R.: Bioelectric control of the ciliary activity, *Science* 176, S. 473-481 (1972)
- Eichwald, C.; Kaiser, F.: Model for external influence on cellular signal transduction pathways including cytosolic calcium, *Bioelectromagnetics* 16, S. 75-85 (1995)
- Eichwald, C.; Kaiser, F.: Model for receptor-controlled cytosolic calcium oscillations an for external influences on the signal pathway, *Biophysical Journal* 65, S. 2047-2058 (1993)
- Eichwald, C.; Walleczek, J.: Activation-dependent and biphasic electromagnetic field effects: Model based on cooperative enzyme kinetics in cellular signalling, *Bioelectromagnetics* 17, S. 427-435 (1996)
- Elwess, N.L.; Van Houten, J.L.: Cloning and molecular analysis of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gene in *Paramecium tetraurelia*, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44, S. 250-257 (1997)
- Erxleben, C.; Plattner, H.:  $\text{Ca}^{2+}$ -release from subplasmalemmal stores as a primary event during exocytosis in *Paramecium* cells, *Journal of Cell Biology* 127, S. 935-945 (1994)
- Erxleben, C.; Klauke, N.; Flötenmeyer, M.; Blanchard, M.-P.; Braun, C.; Plattner, H.: Microdomain  $\text{Ca}^{2+}$  activation during exocytosis in *Paramecium* cells. Superposition of local subplasmalemmal calcium store activation by local  $\text{Ca}^{2+}$  influx, *Journal of Cell Biology* 136, S. 597-607 (1997)
- Faillace, M.P.; Sarmiento, M.I.K.; Rosenstein, R.E.: Melatonin effect on [ $^3\text{H}$ ]glutamate uptake and release in the golden hamster retina, *Journal of Neurochemistry* 67, S. 623-628 (1996)
- Feychting, M.; Ahlbom, A.: Magnetic fields and cancer in children residing near Swedish high-voltage power lines, *American Journal of Epidemiology* 111, S. 467-481 (1993)
- Feychting, M.; Ahlbom, A.: Magnetic fields, leukemia, and central nervous system tumors in Swedish adults residing near high-voltage power lines, *Epidemiology* 5, S. 501-509 (1994)
- Feychting, M.; Forssen, U.; Floderus, B.: Occupational and residential magnetic field exposure and leukemia and central nervous system tumors, *Epidemiology* 8, S. 384-389 (1997)
- Finocchiaro, L.M.E.; Arzt, E.S.; Fernández-Castelo, C.; Criscuolo, M.; Finkelmann, S.; Nahmod, V.: Serotonin and melatonin synthesis in peripheral mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway, *Journal of Interferon Research* 8, S. 705-716 (1988)
- Floderus, B.; Persson, T.; Stenlund, C.; Wennberg, A.; Ost, A.; Knave, B.: Occupational exposure to electromagnetic fields in relation to leukemia and brain tumors: A case-control study in Sweden, *Cancer Causes and Control* 4, S. 465-476 (1993)
- Forney, J.; Rodkey, K.: A repetitive DNA sequence in *Paramecium* macronuclei is related to the  $\beta$  subunit G proteins, *Nucleic Acids Research* 20, S. 5387-5402 (1992)
- Fraga, D.; Hinrichsen, R.: The identification of a complex family of low-molecular-weight GTP-binding protein homologues from *Paramecium tetraurelia* by PCR cloning, *Gene* 147, S. 145-148 (1994)
- Freeman, H.: Analysis and manipulation of lineal map data; In: *Map Data Processing*, Academic Press, New York, S. 151 (1980)

- Frowein, A.; Lapin, V.: Effects of sham-pinealectomy, performed under white and red light, on the melatonin content of rat pineal glands, *Experientia* 35, S. 1681 (1979)
- Fuhrberg, B.; Hardeland, R.; Poeggeler, B.; Behrmann, G.: Dramatic rises of melatonin and 5-methoxytryptamine in *Gonyaulax* exposed to decreased temperature, *Biological Rhythm Research* 28, S. 144-150 (1997)
- Galvanovskis, J.; Sandblom, J.: Amplification of electromagnetic signals by ion channels, *Biophysical Journal* 73, S. 3056-3065 (1997)
- García-Sancho, J.; Montero, M.; Alvarez, J.; Fonteriz, R.I.; Sanchez, A.: Effects of extremely-low-frequency electromagnetic fields on ion transport in several mammalian cells, *Bioelectromagnetics* 15, S. 579-588 (1994)
- Genrich, V.: Elektromagnetischer Smog, *Funkschau* 5, S. 39-41 (1984)
- Gerthsen, C.; Kneser, H.O.; Vogel, H. (eds): Physik; Kapitel "Elektrodynamik", Springer-Verlag Berlin, S. 355-424 (1974)
- Gilbert, S.S.; Van den Heuvel, C.J.; Dawson, D.: Daytime melatonin and temazepam in young adult humans: equivalent effects on sleep latency and body temperature, *Journal of Physiology* 514, S. 905-914 (1999)
- Golfert, F.; Hofer, A.; Thummler, M.; Bauer, H.; Funk, R.H.: Extremely low frequency electromagnetic fields and heat shock can increase microvesicle motility in astrocytes, *Bioelectromagnetics* 22, S. 71-78 (2001)
- Görtz, H.-D. (ed): *Paramecium*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo (1988)
- Goodman, R.; Bassett, C.A.L.; Henderson, A.S.: Pulsing electromagnetic fields induce cellular transcription, *Science* 220, S. 1283-1285 (1983)
- Goodman, R.; Henderson, A.S.: Transcription and translation in cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 25, S. 335-355 (1991)
- Goodman, R.; Chizmadzhev, Y.; Shirley-Henderson, A.: Electromagnetic fields and cells; *Journal of Cellular Biochemistry* 51, S. 436-441 (1993a)
- Goodman, E.M.; Greenebaum, B.; Marron, M.T.: Altered protein synthesis in a cell-free system exposed to a sinusoidal magnetic field; *Biochimica et Biophysica Acta* 1202, S. 107-112 (1993b)
- Graham, C.; Cook, M.R.; Riffle, D.W.; Gerkovich, M.M.; Cohen, H.D.: Nocturnal melatonin levels in human volunteers exposed to intermittent 60 Hz magnetic fields, *Bioelectromagnetics* 17, S. 263-273 (1996)
- Grandolfo, M.; Santini, M.T.; Vecchia, P.; Bonincontro, A.; Cametti, C.; Indovina, P.L.: Non-linear dependence of the dielectric properties of chick embryo myoblast membranes exposed to a sinusoidal 50 Hz magnetic field, *International Journal of Radiation Biology* 60, S. 877-890 (1991)
- Graves, M.G.; Dickinson, J.R.; Swoboda, B.E.: Cyclic GMP and cyclic GMP phosphodiesterase in the cell cycle of *Tetrahymena pyriformis*, *FEBS Letters* 69, S. 165-166 (1976)
- Grundler, W.; Kaiser, F.; Keilmann, F.; Walleczek, J.: Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems; *Naturwissenschaften* 79, S. 551-559 (1992)
- Gustin, M.C.; Nelson, D.L.: Regulation of ciliary adenylate cyclase by  $Ca^{2+}$  in *Paramecium*, *Biochemical Journal* 246, S. 337-345 (1987)

- Haas, U. (ed): Physik für Pharmazeuten und Mediziner, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 266-387 (1988)
- Häder, D.-P.; Lebert, M.: Real time computer-controlled tracking of motile microorganisms, *Photochemistry and Photobiology* 42, S. 509-514 (1985)
- Häder, D.-P.; Vogel, K.: Simultaneous tracking of flagellates in real time by image analysis, *Journal of Mathematical Biology* 30, S. 63-72 (1991)
- Hamasaki, T.; Barkalow, K.; Richmond, J.; Satir, P.: cAMP-stimulated phosphorylation on an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in *Paramecium*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, S. 7918-7922 (1991)
- Hardeland, R.; Reiter, R.J.; Poeggeler, B.; Tan, B.-X.: The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 17, S. 347-357 (1993)
- Hardeland, R.; Balzer, I.; Poeggeler, B.; Fuhrberg, B.; Uria, H.; Behrmann, G.; Wolf, R.; Meyer, T.J.; Reiter, R.J.: On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals, *Journal of Pineal Research* 18, S. 104-111 (1995)
- Hardeland, R.; Fuhrberg, B.: Ubiquitous melatonin - presence and effects in unicells, plants and animals, *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* 2, S. 25-45 (1996)
- Hardeland, R.: Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans, *Reproduction, Nutrition, Development* 39, S. 399-408 (1999)
- Hardeland, R.; Burkhardt, S.; Antolin, I.; Fuhrberg, B.; Coto-Montes, A.: Melatonin and 5-methoxytryptamine in the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 460, S. 387-390 (1999)
- Hardt, M.; Plattner, H.: Quantitative energy-dispersive X-ray microanalysis of calcium dynamics in cell suspensions during stimulation on a subsecond time scale: Preparative and analytical aspects as exemplified with *Paramecium* cells, *Journal of Structural Biology* 128, S. 187-199 (1999)
- Hardt, M.; Plattner, H.: Sub-second quenched-flow/x-ray microanalysis shows rapid  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from cortical stores paralleled by  $\text{Ca}^{2+}$  influx during synchronous exocytosis in *Paramecium* cells, *European Journal of Cell Biology* 79, S. 642-652 (2000)
- Harris, A.W.; Basten, A.; Gebiski, V.; Noonan, D.; Finnie, F.; Bath, M.L.; Bangay, M.J.; Repalochi, M.H.: A test of lymphoma induction by long-term exposure of E $\mu$ -Pim 1 transgenic mice to 50 Hz magnetic fields, *Radiation Research* 149, S. 300-307 (1998)
- Hasegawa, K.; Tsukahara, Y.; Shimamoto, M.; Matsumoto, K.; Nakaoka, Y.; Sato, T.: The *Paramecium* circadian clock: Synchrony of changes in motility, membrane potential, cyclic AMP and cyclic GMP, *Journal of Comparative Physiology A* 181, S. 41-46 (1997)
- Hasegawa, K.; Kikuchi, H.; Ishizaki, S.; Tamura, A.; Tsukahara, Y.; Nakaoka, Y.; Iwai, E.; Sato, T.: Simple fluctuation of  $\text{Ca}^{2+}$  elicits the complex circadian dynamics of cyclic AMP and cyclic GMP in *Paramecium*, *Journal of Cell Science* 112, S. 201-207 (1999)
- Hattori, A.; Migitaka, H.; Iigo, M.; Itoh, M.; Yamamoto, K.; Ohtani-Kaneko, R.; Hara, M.; Suzuki, T.; Reiter, R.J.: Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates, *Biochemistry and Molecular Biology International* 35, S. 627-634 (1995)

- Hauser, K.; Pavlovic, N.; Klauke, N.; Geissinger, D.; Plattner, H.: Green fluorescent protein-tagged sarco(endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase overexpression in *Paramecium* cells: isoforms, subcellular localization, biogenesis of corical calcium stores and functional aspects, *Molecular Microbiology* 37, S. 773-787 (2000)
- Heermeier, K.; Spanner, M.; Träger, J.; Gradinger, R.; Strauss, P.G.; Kraus, W.; Schmidt, J.: Effects of extremely low frequency electromagnetic field (EMF) on collagen type I mRNA expression and extracellular matrix synthesis of human osteoblastic cells, *Bioelectromagnetics* 19, S. 222-231 (1998)
- Heikkinen, P.; Kumlin, T.; Laitinen, J.T.; Komulainen, H.; Juutilainen, J.: Chronic exposure to 50 Hz magnetic fields or 900 MHz electromagnetic fields does not alter nocturnal 6-hydroxymelatonin sulphate secretion in CBA/S mice, *Electro- and Magnetobiology* 18, S. 33-42 (1998)
- Hemmersbach, R.: *Schwerkraftinduziertes Verhalten bei Protozoen und Perzeptionshypthesen*, Habilitationsschrift für das Fach Zoologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn (1997)
- Hemmersbach, R.; Becker, E.; Stockem, W.: Influence of extremely low frequency electromagnetic fields on the swimming behavior of ciliates, *Bioelectromagnetics* 18, S. 491-498 (1997)
- Hemmersbach, R.; Häder, D.-P.: Gravidresponses of certain ciliates and flagellates, *FASEB Journal* 13, Supplement 1999, S. 69-75 (1999)
- Hemmersbach, R.; Volkmann, D.; Häder, D.-P.: Graviorientation in protists and plants, *Journal of Plant Physiology* 154, S. 1-15 (1999)
- Hennessey, T., Machemer, H., Nelson, D.L., Injected cyclic AMP increases ciliary beat frequency in conjunction with membrane hyperpolarisation, *European Journal of Cell Biology* 36, S. 153-156 (1985)
- Hinrichsen, R.; Schultz, J.E.: *Paramecium*: a model system for the study of excitable cells, *Trends in Neurosciences* 11, S. 27-32 (1988)
- Hochstrasser, M.; Carlson, G.L.; Walczak, C.E.; Nelson, D.L.: *Paramecium* has two regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase, one unique to cilia, *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 43, S. 356-362 (1996)
- Ikehara, T.; Yamaguchi, H.; Miyamoto, H.: Effects of electromagnetic fields on membrane ion transport of cultured cells, *The Journal of Medical Investigation* 45, S. 47-56 (1998)
- Informationszentrale der Elektrizitätswirtschaft e.V.: *Elektrische und Magnetische Felder, Strom im Alltag*, Frankfurt/Main, S. 9 (1994)
- Ivanova, K.; Heim, J.-M.; Gerzer, R.: Kinetic characterization of atrial natriuretic factor-sensitive particulate guanylate cyclase, *European Journal of Pharmacology* 189, S. 317-326 (1990)
- Ivanova, K.: Durchführung des cAMP Assays (FIA); modifiziert für *Paramecium*, persönliche Kommunikation (1997)
- Iwatsuki, K.; Naitoh, Y.: Photoresponses in colourless *Paramecium*, *Experientia* 38, S. 1453-1454 (1982)
- Iwatsuki, K.; Naitoh, Y.: Behavioral responses in *Paramecium multimicronucleatum* to visible light, *Photochemistry and Photobiology* 37, S. 415-419 (1983)

- Jaren, O.R.; Harmon, S.; Chen, A.F.; Shea, M.A.: *Paramecium* calmodulin mutants defective in ion channel regulation can bind calcium and undergo calcium-induced conformational switching, *Biochemistry* 39, S. 6881-6890 (2000)
- John, T.M.; Liu, G.-Y.; Brown, G.M.: 60 Hz magnetic field exposure and urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in rats, *Bioelectromagnetics* 19, S. 172-180 (1998)
- Junkersdorf, B.; Bauer, H.; Gutzeit, H.O.: Electromagnetic fields enhance the stress response at elevated temperatures in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Bioelectromagnetics* 21, S. 100-106 (2000)
- Jutilainen, J.; Lang, S.; Rytömaa, T.: Possible cocarcinogenic effects of ELF electromagnetic fields may require repeated long-term interaction with known carcinogenic factors, *Bioelectromagnetics* 21, S. 122-128 (2000)
- Kamphuis, A.: Digitale Pfadanalyse am Beispiel der Schwerkraftausrichtung von *Euglena gracilis* in Flachküvetten, Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1999)
- Kato, M.; Honma, K.; Shigemitsu, T.; Shiga, Y.: Horizontal or vertical 50-Hz, 1- $\mu$ T magnetic fields have no effects on pineal gland or plasma melatonin concentration of albino rats: *Neuroscience Letters* 168, S. 205-208 (1994)
- Kato, M.; Shigemitsu, T.: Effects of 50-Hz magnetic fields on pineal function in rat. In: Stevens, R.G.; Wilson, B.W.; Anderson, L.E. (eds): *The melatonin hypothesis: Breast cancer and use of electric power*, Columbus, OH: Battelle Press, S. 337-376 (1997)
- Kaune, W.T.; Davis, S.; Stevens, R.: Relation between residential magnetic fields, light-at-night and nocturnal urine melatonin levels in women, TR-107242-V1, Palo Alto: EPRI, Fred Hutchinson Research Center (1997)
- Kaune, W.T.; Feychting, M.; Ahlbom, A.; Ulrich, R.M.; Savitz, D.A.: Temporal characteristics of transmission-line loadings in the Swedish childhood cancer study, *Bioelectromagnetics* 19 (6), S. 354-365 (1998)
- Kennaway, D.J.; Lushington, K.; Dawson, D.; Lack, L.; Van den Heuvel, C.; Rogers, N.: Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and aging: new results and a critical review of literature, *Journal of Pineal Research* 27, S. 210-220 (1999)
- Kenny, J.S.; Kisaalita, W.S.; Rowland, G.; Thai, C.; Foutz, T.: Quantitative study of calcium uptake by tumorigenic bone (TE-85) and neuroblastoma x glioma (NG108-15) cells exposed to extremely-low-frequency (ELF) electric fields, *FEBS Letters* 414, S. 343-348 (1997)
- Khoory, R., Schloot, W.: Inhibition of night time, but not isoproterenol-stimulated pineal N-acetyltransferase activity by an unidentified pineal compound, *Journal of Neural Transmission* 66, S. 211-219 (1986)
- Kim, K.; Messinger, L.A.; Nelson, D.L.:  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases of *Paramecium*: Cloning provides evidence of a multigene family, *European Journal of Biochemistry* 251, S. 605-612 (1998)
- Kissmehl, R.; Treptau, T.; Hauser, K.; Plattner, H.: A novel, calcium-inhibitable casein kinase in *Paramecium* cells, *FEBS Letters* 402, S. 227-335 (1997)
- Klauke, N.; Kissmehl, R.; Plattner, H.; Haga, N.; Watanabe, T.: An exocytotic mutant of *Paramecium caudatum*: membrane fusion without secretory contents release, *Cell Calcium* 23, S. 349-360 (1998)

- Klauke, N.; Plattner, H.: Caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transients and exocytosis in *Paramecium* cells. A correlated  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and quenched-flow/freeze-fracture analysis, *Journal of Membrane Biology* 161, S. 65-81 (1998)
- Klauke, N.; Blanchard, M.-P.; Plattner, H.: Polyamine triggering of exocytosis in *Paramecium* involves an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ /(Polyvalent Cation)-sensing receptor, subplasmalemmal Ca-store mobilization and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -influx via unspecific cation channels, *Journal of Membrane Biology* 174, S. 141-156 (2000)
- Klavinsh, I.E.; Galvanovsky, Y.Y.; Dreimanis, A.P.: Low-frequency electromagnetic pulses enhance  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by chick small intestine in vitro, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 25, S. 437-445 (1991)
- Klumpp, S.; Schultz, J.E.: Characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane from *Paramecium*, *European Journal of Biochemistry* 120, S. 317-324 (1982)
- Klumpp, S.; Steiner, A.L.; Schultz, J.E.: Immunocytochemical localization of cyclic GMP, cGMP-dependent protein kinase, calmodulin and calcineurin in *Paramecium tetraurelia*, *European Journal of Cell Biology* 32, S. 164-170 (1983)
- Knoll, G.; Kerboeuf, D.; Plattner, H.: A rapid calcium influx during exocytosis in *Paramecium* cells is followed by a rise in cyclic GMP within 1 s, *FEBS Letters* 304, S. 265-268 (1992)
- Krüppel, T.; Wissing, F.: Characterisation of the voltage-activated calcium current in the marine ciliate *Euplotes vannus*, *Cell Calcium* 19, S. 229-241 (1996)
- Kung, C.: Genic mutants with altered system of excitation in *Paramecium tetraurelia*. II. Mutagenesis, screening and genetic analysis of the mutants, *Genetics* 69, S. 29-45 (1971)
- Kung, C.; Naitoh, Y.: Calcium-induced ciliary reversal in the extracted models of "Pawn", a behavioral mutant of *Paramecium*, *Science* 179, S. 195-196 (1973)
- Länge, S.; Klauke, N.; Plattner, H.: Subplasmalemmal  $\text{Ca}^{2+}$  stores of probable relevance for exocytosis in *Paramecium*. Alveolar sacs share some but not all characteristics with sarcoplasmic reticulum, *Cell Calcium* 17, S. 335-344 (1995)
- Länge, S.; Wissmann, J.-D.; Plattner, H.: Caffeine inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by subplasmalemmal calcium stores (alveolar sacs) isolated from *Paramecium* cells, *Biochimica et Biophysica Acta* 1278, S. 191-196 (1996)
- Leitgeb, N.: *Strahlen, Wellen, Felder*; dtv Wissen und Praxis, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1990)
- Lewis, R.M.; Nelson, D.L.: Biochemical studies of the excitable membrane of *Paramecium tetraurelia*. IV. Protein kinase activities in cilia and ciliary membrane, *Biochimica et Biophysica Acta* 61, S. 341-345 (1980)
- Lerner, A.B.; Chase, J.D.; Takahashi, Y.; Lee, T.H.; Mori, W.: Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes, *Journal of the American Chemical Society* 81, S. 2587 (1958)
- Linder, J.U.; Engel, P.; Reimer, A.; Krüger, T.; Plattner, H.; Schultz, A.; Schlutz, J.E.: Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*, *The EMBO Journal* 18, S. 4222-4232 (1999)

- Lindström, E.; Lindström, P.; Berglund, A.; Mild, K.H.; Lundgren, E.: Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by weak 50 Hz magnetic field, *Journal of Cell Physiology* 156, S. 395-398 (1993)
- Lindström, E.; Lindström, P.; Berglund, A.; Lundgren, E.; Mild, K.H.: Intracellular calcium oscillation in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities, *Bioelectromagnetic* 16, S. 41-47 (1995)
- Linnet, M.S.; Hatch, E.E.; Kleinermann, R.A.; Robinson, L.L.; Kaune, W.T.; Friedmann, D.R.; Severson, R.K.; Haines, C.M.; Hartsock, C.T.; Niwa, S.; Wacholder, S.; Tarone, R.E.: Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children, *New England Journal of Medicine* 337, S. 1-7 (1997)
- Lin-Liu, S.; Adey, W.R.: Low frequency amplitude modulated microwave fields change calcium efflux rates from synaptosomes, *Bioelectromagnetics* 3, S. 309-322 (1982)
- Löscher, W.; Mevissen, M.; Lehmacher, W.; Stamm, A.: Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field, *Cancer Letters* 71, S. 75-81 (1993)
- Löscher, W.; Wahnschaffe, U.; Mevissen, M.; Lerchl, A.; Stamm, A.: Effects of weak alternating magnetic fields on nocturnal melatonin production and mammary carcinogenesis in rats, *Oncology* 51, S. 288-295 (1994)
- Löschinger, M.; Thumm, S.; Hämmerle, H.; Rodemann, H.P.: Stimulation of protein kinase A activity and induced terminal differentiation of human skin fibroblasts in culture by low-frequency electromagnetic fields, *Toxicology Letters* 96-97, S. 369-376 (1998)
- Löschinger, M.; Thumm, S.; Hämmerle, H.; Rodemann, H.P.: Induction of intracellular calcium oscillations in human skin fibroblasts populations by sinusoidal extremely low-frequency magnetic fields (20 Hz, 8 mT) is dependent on the differentiation state of the single cell, *Radiation Research* 151, S.195-200 (1999)
- London, S.J., Thomas, D.C., Bowman, J.D., Sobel, E., Cheng, T.-C., Peters, J.M., Exposure to residential electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia, *American Journal of Epidemiology* 134, S.923-937, (1991)
- London, S.J.; Bowman, J.D.; Sobel, E.; Thomas, D.C.; Garabrant, D.H.; Pearce, N.; Bernstein, L.; Peters, J.M.: Exposure to magnetic fields among electrical workers in relation to leukemia risk in Los Angeles County, *American Journal of Industrial Medicine* 26, S. 47-60 (1994)
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L.A.; Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* 193, S. 265-275 (1951)
- Luben, R.A.; Cain, C.D.; Chen, M.C.Y.; Rosen, D.M.; Adey, W.R.: Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: Inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, S. 4180-4184 (1982)
- Luben, R.A.: Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems, *Health Physics* 61, S.15-28 (1991)
- Luben, R.A.: Membrane signal transduction as a site of electromagnetic field actions in bone and other tissues, In: *On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems*; Frey, A.H. (ed), R.G. Landes Company Austin, Medical Intelligence Unit, Springer Verlag, 2. Auflage, S. 83-98 (1995)
- Lyle, D.B.; Wang, X.; Ayotte, R.D.; Sheppard, A.S.; Adey, W.R.: Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields, *Bioelectromagnetics* 12, S. 145-156 (1991)

- Machemer, H.: Frequency and directional responses in cilia to membrane potential changes in *Paramecium*, *Journal of Comparative Physiology A* 92, S. 293-316 (1974)
- Machemer, H.: Modification of ciliary activity by the rate of membrane potential changes in *Paramecium*, *Journal of Experimental Biology* 65, S. 427-448 (1975)
- Machemer, H.: Interactions of membrane potential and cations in regulation of ciliary activity in *Paramecium*, *Journal of Experimental Biology* 65, S. 427-448 (1976)
- Machemer, H., Electrophysiology, In: *Paramecium*, Görtz, H.-D. (ed), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, S. 185-215, (1988a)
- Machemer, H.: Motor control of cilia, In: *Paramecium*, Görtz, H.-D. (ed), Berlin, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, S. 216-235 (1988b)
- Machemer, H.: Cellular behaviour modulated by ions: electrophysiological implications, *Journal of Protozoology* 36, S. 463-487 (1990)
- Machemer, H.; de Peyer, J.E.: Swimming sensory cells: electrical membrane parameters, receptor properties and motor control in ciliated protozoa, *Verh. Deutsche Zoologische Gesellschaft Erlangen*, S. 86-110 (1977)
- Machemer, H.; Ogura, A.: Ionic conductance of membranes in ciliated and deciliated *Paramecium*, *Journal of Physiology* 296, S. 49-60 (1979)
- Machemer, H.; Machemer-Röhnisch, S.; Bräucker, R.; Takahashi, K.: Gravikinesis in *Paramecium*: theory and isolation of a physiological response to the natural gravity vector, *Journal of Comparative Physiology A* 168, S. 1-12 (1991)
- Machemer, H.; Teunis, P.F.M.: Sensory-motor coupling and motor responses. In: *Ciliates: Cells as Organisms*, Hausmann, K.; Bradbury, X. (eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, S. 379-398 (1996)
- Maihle, N.J.; Dedman, J.R.; Means, A.R.; Chafouleas, J.G.; Satir, B.H.: Presence and indirect immunofluorescent localization of calmodulin in *Paramecium tetraurelia*, *Journal of Cell Biology* 89, S. 695-699 (1981)
- Majima, T.; Hamasaki, T.; Arai, T.: Increase in cellular cyclic GMP levels by potassium stimulation and its relation to ciliary orientation in *Paramecium*, *Experientia* 42, S. 62-63 (1986)
- Malmendal, A.; Linse, S.; Evenäs, J.; Forsén, S.; Drakenberg, T.: Battle for the EF-hands: magnesium-calcium interference in calmodulin, *Biochemistry* 38, S. 11844-11850 (1999)
- Mandeville, R.; Franco, E.; Sidrac-Ghali, S.; Paris-Nadon, L.; Rocheleau, N.; Mercier, G.; Desy, M.; Gaboury, L.: Evaluation of the potential carcinogenicity of 60 Hz linear sinusoidal continuous-wave magnetic fields in Fischer F344 rats, *FASEB Journal* 11, S. 1127-1136 (1997)
- Marron, M.T.; Goodman, E.M.; Sharpe, P.T.; Greenebaum, B.: Low frequency electric and magnetic fields have different effects on the cell surface, *FEBS Letters* 230, S.13-16 (1988)
- Mason, P.A.; Nelson, D.L.: Cyclic AMP-dependent protein kinases of *Paramecium*. I. Chromatographic and physical properties of enzymes from cilia, *Biochimica et Biophysica Acta* 1010, S. 108-115 (1989a)
- Mason, P.A.; Nelson, D.L.: Cyclic AMP-dependent protein kinases of *Paramecium*. II. Catalytic and regulatory properties of type II kinases from cilia, *Biochimica et Biophysica Acta* 1010, S. 116-121 (1989b)

- McBride, M.L.; Gallagher, R.P.; Thériault, G.; Armstrong, B.G.; Tamaro, S.; Spinelli, J.J.; Deadman, J.E.; Fincham, B.; Robson, D.; Chaoi, W.: Power-frequency electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia in Canada, *American Journal of Epidemiology* 149, S. 831-842 (1999)
- McCormick, D.L.; Ryan, B.M.; Findlay, J.C.; Gauger, J.R.; Johnson, T.R.; Morrissey, R.L.; Boorman, G.A.: Exposure to 60 Hz magnetic fields and risk of lymphoma in PIM transgenic and TSG-p53 (p53 knockout) mice, *Carcinogenesis* 19, S. 1649-1653 (1998)
- Meissner, G.: Ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effects, *Annual Review of Physiology* 56, S. 485-508 (1994)
- Mevissen, M.; Stamm, A.; Buntenkötter, S.; Zwingelberg, R.; Wahnschaffe, U.; Löscher, W.: Effects of magnetic fields on mammary tumor development induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rats, *Bioelectromagnetics* 14, S. 131-143 (1993)
- Mevissen, M.; Lerchl, A.; Löscher, W.: Study on pineal function and DMBA-induced breast cancer formation in rats during exposure to a 100-mT, 50-Hz magnetic field, *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48, S. 169-185 (1996)
- Minder, C.E.; Pfluger, D.H.: Leukemia, brain tumors, and exposure to extremely low frequency electromagnetic fields in Swiss railway employees, *American Journal of Epidemiology* 153, S. 825-835 (2001)
- Miyakoshi, J.; Koji, Y.; Wakasa, T.; Takebe, H.: Long-term exposure to a magnetic field (5 mT at 60 Hz) increases x-ray-induced mutations, *Radiation Research* 40, S. 13-21 (1999)
- Momayezi, M.; Kissmehl, R.; Plattner, H.: Quantitative immunogold localization of protein phosphatase 2B (Calcineurin) in *Paramecium* cells, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48, S. 1269-1281 (2000)
- Monti, M.G.; Pernecco, L.; Moruzzi, M.S.; Battini, R.; Zaniol, P.; Barbiroli, B.: Effect of ELF pulsed electromagnetic fields on protein kinase C activation processes in HL-60 leukemia cells, *Journal of Bioelectricity* 12, S. 119-130 (1991)
- Morioka, N.; Okatani, Y.; Wakatsuki, A.: Melatonin protects against age-related DNA damage in the brains of female senescence-accelerated mice, *Journal of Pineal Research* 27, S. 202-209 (1999)
- Morton, D.J.: Effect of various cations on the activity of pineal gland N-acetyltransferase (EC 2.3.1.5) and hydroxyindole-O-methyltransferase (EC 2.1.1.4) in vitro, *Journal of Pineal Research* 4, S. 161-167 (1987)
- Naitoh, Y.: Protozoa, In: *Electrical conduction and behaviour in "simple" invertebrates*, Shelton, G.A.B. (ed), Clarendon Press, Oxford, S. 1-48 (1982)
- Naitoh, Y.; Eckert, R.: Electrical properties of *Paramecium caudatum*: modification by bound and free cations, *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 61, S. 427-452 (1968)
- Naitoh, Y.; Eckert, R.: Ionic mechanisms controlling behavioral responses in *Paramecium* to mechanical stimulation, *Science* 164, S. 963-965 (1969)
- Naitoh, Y.; Eckert, R.: The control of ciliary activity in Protozoa; In: *Cilia and flagella*; Sleigh, M.A. (ed), Academic Press, London, New York, S. 305-352 (1974)
- Naitoh, Y.; Kaneko, H.: Reactivated triton-extracted models of *Paramecium*: Modification of ciliary movement by calcium ions, *Science* 176, S. 523-524 (1972)
- Nakaoka, Y.; Shimizu, K.; Hasegawa, K.; Yamamoto, T.: Effect of a 60 Hz magnetic field on the behavior of *Paramecium*, *Bioelectromagnetics* 21, S. 584-588 (2000)

- Nakaoka, Y.; Tanaka, H.; Oosawa, F.: Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of beat frequency of cilia in *Paramecium*, *Journal of Cell Science* 65, S. 223-231 (1984)
- Nakaoka, Y.; Macheiner, H.: Effects of cyclic nucleotides and intracellular Ca on voltage-activated ciliary beating in *Paramecium*, *Journal of Comparative Physiology A* 166, S. 401-406 (1990)
- Nakaoka, Y.; Ooi, H.: Regulation of ciliary reversal in Triton-extracted *Paramecium* by calcium and cyclic adenosine monophosphate, *Journal of Cell Science* 77, S. 185-195 (1985)
- Nikaido, S.S.; Takahashi, J.S.: Calcium modulates circadian variation in cAMP-stimulated melatonin in chick pineal cells, *Brain Research* 716, S. 1-10 (1996)
- Noguchi, M.; Nakamura, Y.; Okamoto, K.-I.: Control of ciliary orientation in ciliated sheets from *Paramecium* - Differential distribution of sensitivity to cyclic nucleotides, *Cell Motility and the Cytoskeleton* 20, S.38-46 (1991)
- Noguchi, M.; Ogawa, T.; Taneyama, T.: Control of ciliary orientation through cAMP-dependent phosphorylation of axonemal proteins in *Paramecium caudatum*, *Cell Motility and the Cytoskeleton* 45, S. 263-271 (2000)
- Noguchi, M.; Sawada, T.; Akazawa, T.: ATP-regenerating system in cilia of *Paramecium caudatum*, *Journal of Experimental Biology* 204, S. 1063-1071 (2001)
- NTP, Toxicology and Carcinogenesis Studies of 60-Hz Magnetic Fields in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Whole Body Exposure Studies), Technical Report Series No. 488 NIH Publication No. 98-3978, Research Triangle Park: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, National Toxicology Program (1998)
- Oka, T.; Nakaoka, Y.; Oosawa, F.: Changes in membrane potential during adaptation to external potassium ions in *Paramecium caudatum*, *Journal of Experimental Biology* 126, S. 111-117 (1986)
- Olsen, J.H.; Nielsen, A.; Schulgen, G.: Residence near high-voltage facilities and the risk of cancer in children, *British Medical Journal* 307, S. 891-895 (1993)
- Otter, M.W.; McLeod, K.J.; Rubin, C.T.: Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair, *Clinical Orthopaedics* 355, S. 90S-104S (1998)
- Ouyang, H.; Vogel, H.J.: Melatonin and serotonin interactions with calmodulin: NMR, spectroscopic and biochemical studies, *Biochimica et Biophysica Acta* 1383, S. 37-47 (1998)
- Panzer, A.; Vijoien, M.: The validity of melatonin as an oncostatic agent, *Journal of Pineal Research* 22, S. 184-202 (1997)
- Paradisi, S.; Donelli, G.; Santini, M.T.; Straface, E.; Malorni, W.: A 50-Hz magnetic field induces structural and biophysical changes in membranes, *Bioelectromagnetics* 14, S. 247-255 (1993)
- Parsons, W.J.; Ramkumar, V.; Stiles, G.L.: Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, G<sub>i</sub>, *Molecular Pharmacology* 34, S. 37-41 (1988)
- Pech, L.L.: Regulation of ciliary motility in *Paramecium* by cAMP and cGMP, *Comparative Biochemistry and Physiology A* 111, S. 31-37 (1995)
- Pfluger, D.H.; Minder, C.E.: Effects of exposure to 16.7 Hz magnetic fields on urinary 6-hydroxymelatonin sulfate excretion of Swiss railway workers, *Journal of Pineal Research* 21, S. 91-100 (1996)

- Pierpaoli, W.; A.-Dall'Ara, A.; Pedrino, E.; Regelson, W.: The pineal gland and aging: the effects of melatonin and pineal grafting on the survival of older mice, *Annals of the New York Academy of Sciences* 621, S. 291-313 (1991)
- Pipkin, J.L.; Hinson, W.G.; Young, K.L.; Rowland, J.G.; Shaddock, J.G.; Tolleson, W.H.; Duffy, P.H.; Casciano, D.A.: Induction of stress proteins by electromagnetic fields in cultured HL-60 cells, *Bioelectromagnetics* 20, S. 347-357 (1999)
- Plattner, H.; Lumpert, C.J.; Knoll, G.; Kissmehl, R.; Höhne, B.; Momayezi, M.; Glas-Albrecht, R.: Stimulus-secretion coupling in *Paramecium* cells, *European Journal of Cell Biology* 55, S. 3-16 (1991)
- Plattner, H.; Habermann, A.; Kissmehl, R.; Klauke, N.; Majoul, I.; Söling, H.-D.: Differential distribution of calcium stores in *Paramecium* cells. Occurrence of a subplasmalemmal store with a calsequestrin-like protein, *European Journal of Cell Biology* 72, S. 297-306 (1997)
- Plattner, H.; Flötenmeyer, M.; Kissmehl, R.; Pavlovic, N.; Hauser, K.; Momayezi, M.; Braun, N.; Tack, J.; Bachmann, L.: Microdomain arrangement of the SERCA-type  $\text{Ca}^{2+}$  Pump ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) in subplasmalemmal calcium stores of *Paramecium* cells, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47, S. 841-853 (1999)
- Plattner, H.; Klauke, N.: Calcium in ciliated protozoa: sources, regulation, and calcium-regulated cell functions, *International Review of Cytology* 201, S. 115-208 (2001)
- Poeggeler, B.; Balzer, I.; Fischer, J.; Behrmann, G.; Hardeland, R.: A role of melatonin in dinoflagellates?, *Acta Endocrinologica* 120 (Supplement 1), S. 97 (1989)
- Poeggeler, B.; Balzer, I.; Hardeland, R.; Lerchl, A.: Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*, *Naturwissenschaften* 78, S. 268-269 (1991)
- Poeggeler, B.; Reiter, R.J.; Tan, D.-X.; Chen, D.-L.; Manchester, L.C.: Melatonin, hydroxyl radical mediated oxidative damage and aging: a hypothesis, *Journal of Pineal Research* 14, S. 151-168 (1993)
- Poeggeler, B.; Reiter, R.J.; Hardeland, R.; Tan, D.-X.; Barlow-Walden, L.R.: Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro, *Redox Reports* 2, S. 179-184 (1996)
- Potter, J.D.; Strang-Brown, P.; Walker, P.L.; Iida, S.:  $\text{Ca}^{2+}$  binding to calmodulin, *Methods in Enzymology* 102, S. 135-143 (1983)
- Pozo, D.; Reizter, R.J.; Calvo, J.R.; Guerrero, J.M.: Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic cGMP production by melatonin via complex formation with calmodulin, *Journal of Cellular Biochemistry* 65, S. 430-442 (1997)
- Preston, R.R.; Hammond, J.A.: Long-term adaptation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent behaviour in *Paramecium tetraurelia*, *The Journal of Experimental Biology* 201, S. 1835-1846 (1998)
- Preston, R.R.; Saimi, Y.; Kung, C.: Evidence for two  $\text{K}^+$  currents activated upon hyperpolarization of *Paramecium tetraurelia*, *Journal of Membrane Biology* 115, S. 41-50 (1990a)
- Preston, R.R.; Wallen-Friedman, M.A.; Saimi, Y.; Kung, C.: Calmodulin defects cause the loss of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  currents in two pantophobiac mutants of *Paramecium tetraurelia*, *Journal of Membrane Biology* 115, S. 51-60 (1990b)
- Preston, R.R.; Kink, J.A.; Hinrichsen, R.D.; Saimi, Y.; Kung, C.: Calmodulin mutants and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent channels in *Paramecium*, *Annual Review of Physiology* 53, S. 309-319 (1991)

- Preston, R.R.; Hammond, J.A.: Long-term adaptation of Ca<sup>2+</sup>-dependent behaviour in *Paramecium tetraurelia*, *The Journal of Experimental Biology* 201, S. 1835-1846 (1998)
- Reiter, R.J.: The ageing pineal gland and its physiological consequences, *BioEssays* 14, S. 169-175 (1992)
- Reiter, R.J.; Lerchl, A.: Regulation of mammalian pineal melatonin production by the electromagnetic spectrum, In: *Melatonin, Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications*, Yu, H.-S.; Reiter, R.J. (eds), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, S. 108-127 (1992)
- Reiter, R.J.: The melatonin rhythm: both a clock and a calendar, *Experientia* 49, S. 654-664 (1993a)
- Reiter, R.J.: Possible biological effects of electric and magnetic parameters in the environment, *Experientia* 49, S. 769-774 (1993b)
- Reiter, R.J.: Electromagnetic fields and melatonin production, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 47, S. 439-444 (1993c)
- Reiter, R.J.; Melchiorri, D.; Sewerynek, E.; Poeggeler, B.; Barlow-Walden, L.; Chuang, J.-I.; Ortiz, G.G.; Acuña-Castroviejo, D.: A review of the evidence supporting melatonin`s role as an antioxidant, *Journal of Pineal Research* 18, S. 1-11 (1995)
- Reiter, R.J.: Melatonin biosynthesis, regulation, and effects. In: *The melatonin hypothesis: Breast cancer and use of electric power*, Stevens, R.G.; Wilson, B.W.; Anderson, L.E. (eds), Columbus, OH: Battelle Press, S. 45-48 (1997)
- Reiter, R.J.; Guerrero, J.M.; Garcia, J.J.; Acuna-Castroviejo, D.: Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin, *Annals of the New York Academy of Sciences* 854, S. 410-424 (1998)
- Romero, M.P.; Garcia-Perganeda, A.; Guerrero, J.M.: Membrane-bound calmodulin in *Xenopus laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin, *The FASEB Journal* 12, S. 1401-1408 (1998)
- Rosen, M.S.; Rosen, A.D.: Magnetic field influence on *Paramecium* motility, *Life Sciences* 46, S. 1509-1515 (1990)
- Sachs, L.: *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, Tokyo, 6. Auflage (1984)
- Saimi, Y.; Kung, C.: Behavioral genetics of *Paramecium*, *Annual Review of Genetics* 21, S. 47-65 (1987)
- Saimi, Y.; Martinac, B.; Gustin, M.C.; Culbertson, M.R.; Adler, J.; Kung, C.: Ion channels in *Paramecium*, yeast and *Escherichia coli*, *Trends in Biochemical Sciences* 13, S. 304-309 (1988)
- Saimi, Y.; Ling, K.-Y.: *Paramecium* Na<sup>+</sup> Channels activated by Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin: Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor in the channel gating mechanism, *Journal of Membrane Biology* 144, S. 257-265 (1995)
- Sandyk, R.: Possible role of pineal melatonin in the mechanisms of aging, *International Journal of Neuroscience* 52, S. 85-92 (1990)
- Santoro, N.; Lisi, A.; Pozzi, D.; Pasquali, E.; Serafino, A.; Grim, S.: Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cells (Raji), *Biochimica et Biophysica Acta* 1357, S. 281-290 (1997)

- Sasser, L.B.; Morris, J.E.; Miller, D.L.; Rafferty, C.N.; Ebi, K.L.; Anderson, L.E.: Exposure to 60 Hz magnetic fields does not alter clinical progression of LGL leukemia in Fischer rats, *Carcinogenesis* 17, S. 2681-2687 (1996)
- Satir, B.H.; Garofalo, R.S.; Gilligan, D.M.; Maihle, N.J.: Possible functions of calmodulin in protozoa, *Annals of the New York Academy of Sciences* 356, S. 83-91 (1980)
- Savitz, D.A.: Invited commentary: electromagnetic fields and cancer in railway workers, *American Journal of Epidemiology* 53, S. 836-838 (2001)
- Savitz, D.A.; Wachtel, H.; Barnes, F.A.; John, E.M.; Tvrdik, J.G.: Case-control study of childhood cancer and exposure to 60-Hz magnetic fields, *American Journal of Epidemiology* 128, S. 21-38 (1988)
- Savitz, D.A.; Loomis, D.P.: Magnetic field exposure in relation to leukemia and brain cancer mortality among electric utility workers, *American Journal of Epidemiology* 141, S. 123-134 (1995)
- Schimmelpfeng, J.; Dertinger, H.: The action of 50 Hz magnetic and electric fields upon cell proliferation and cyclic AMP content of cultured mammalian cells, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 30, S.143-150 (1993)
- Schimmelpfeng, J.; Stein, J.-C.; Dertinger, H.: Action of 50 Hz magnetic fields on cyclic AMP and intercellular communication in monolayer and spheroids of mammalian cells; *Bioelectromagnetics* 16, S. 381-386 (1995)
- Schimmelpfeng, J.: Cyclic AMP-levels of retinoic acid primed HL-60 cells in serum-free medium influenced by a 50 Hz magnetic field alone and as cofactor to prostaglandin E-2; *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43, S. 55-59 (1997)
- Schimmelpfeng, J.; Dertinger, H.: Action of 50 Hz magnetic fields on cAMP content in SV40-3T3 cells: dependence on flux density and extracellular calcium, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43, S. 51-54 (1997)
- Schneider, T.; Thalau, H.-P.; Semm, P.: Effects of light or different earth-strength magnetic fields on the nocturnal melatonin concentration in a migratory bird; *Neuroscience Letters* 168, S. 73.-75 (1994)
- Schüz, J.; Grigat, J.-P.; Brinkmann, K.; Michaelis, J.: Residential magnetic fields as a risk factor for childhood acute leukaemia: results from a german population-based case-control study, *International Journal of Cancer* 91, S. 728-735 (2001)
- Schultz, E.J.; Klumpp, S.: Guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane of *Paramecium*, *FEBS Letters* 122, S. 64-66 (1980)
- Schultz, J.E.; Jantzen, H.-M.: Cyclic nucleotides-dependent protein kinases from cilia of *Paramecium tetraurelia*: partial purification and characterization, *FEBS Letters* 116, S. 75-78 (1980)
- Schultz, J.E.; Klumpp, S.: Lanthanum dissociates calmodulin from the guanylate cyclase of the excitable ciliary membrane from *Paramecium*, *FEMS Microbiology Letters* 13, S. 303-306 (1982)
- Schultz, J.E.; Klumpp, S.: Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclases in the ciliary membranes from *Paramecium* and *Tetrahymena*, *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* 17, S. 275-284 (1984)
- Schultz, J.E.; Grünemund, R.; Hirschhausen, v.R.; Schönefeld, U.: Ionic regulation of cyclic AMP levels in *Paramecium tetraurelia* in vivo, *FEBS Letters* 167, S. 113-116 (1984)

- Schultz, J.E.; Klumpp, S.; Gierlich, D.: Involvement of cyclic nucleotides in sensing and response in *Paramecium tetraurelia*, *Sensing and Response in Microorganisms*, S. 159-173 (1985)
- Schultz, J.E.; Pohl, T.; Klumpp, S.: Voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  entry into *Paramecium* linked to intraciliary increase in cyclic GMP, *Nature* 322, S. 271-273 (1986)
- Schultz, J.E.; Gierlich, D.G.; Klumpp, S.: Characterization of an ionically regulated adenylate cyclase from the excitable ciliary membrane of *Paramecium*, *Biochemical Journal* 246, S. 187-192 (1987)
- Schultz, J.E.; Schade, U.: Calcium channel activation and inactivation in *Paramecium* biochemically measured by cyclic GMP production, *Journal of Membrane Biology* 109, S. 259-267 (1989a)
- Schultz, J.E.; Schade, U.: Veratridine induces a  $\text{Ca}^{2+}$  influx, cyclic GMP formation, and backward swimming in *Paramecium tetraurelia* wildtype cells and a  $\text{Ca}^{2+}$  current-deficient pawn mutant cells, *Journal of Membrane Biology* 109, S. 251-268 (1989b)
- Schultz, J.E.; Klumpp, S.; Benz, R.; Schürhoff-Goerts, W.J.C.; Schmid, A.: Regulation of adenylyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance, *Science* 255, S. 600-603 (1992)
- Schultz, E.J.; Klumpp, S.: Cyclic nucleotids and calcium signaling in *Paramecium*, *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 27, S. 25-46 (1993)
- Schultz, J.E., Guo, Y.-L., Kleefeld, G., Völkel, H., Hyperpolarization- and depolarisation-activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents in *Paramecium* trigger behavioral changes and cGMP formation independently, *Journal of Membrane Biology* 156, S.251-259 (1997)
- Selmaoui, B.; Touitou, Y.: Sinusoidal 50-Hz magnetic fields depress rat pineal NAT activity and serum melatonin. Role of duration and intensity of exposure, *Life Science* 57, S. 1351-1358 (1995)
- Selmaoui, B.; Bogdan, A.; Auzéby, A.; Lambrozo, J.; Touitou, Y.: Acute exposure to 50 Hz magnetic field does not affect hematologic or immunologic functions in healthy young men: A circadian study, *Bioelectromagnetics* 17, S. 364-372 (1996)
- Shahidain, R.; Mullins, R.D.; Siskin, J.E.: 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, S. 241-248 (2001)
- Shen, Y.H.; Shao, B.J.; Chiang, H.; Fu, Y.D.; Yu, M.: The effects of 50 Hz magnetic field exposure on dimethylbenz(alpha)anthracene induced thymic lymphoma/leukemia in mice, *Bioelectromagnetics* 18, S. 360-364 (1997)
- Shorte, S.L.; Schofield, J.G.: The effect of extracellular polyvalent cations on bovine anterior pituitary cells. Evidence for a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor coupled to release of intracellular calcium stores, *Cell Calcium* 19, S. 43-57 (1996)
- Simkò, M.; Kriehuber, R.; Weiss, D.G.; Luben, R.A.: Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and nontransformed human cell lines, *Bioelectromagnetics* 19, S. 85-91 (1998)
- Smith, R.; Preston, R.R.; Schulz, S.; Gagnon, M.L.; Van Houten, J.: Correlations between cyclic AMP binding and chemoreception in *Paramecium*, *Biochimica et Biophysica Acta* 928, S. 171-178 (1987)

- Son, M.; Gundersen, R.E.; Nelson, D.L.: A second member of the novel Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase family from *Paramecium tetraurelia*. Purification and characterization, *Journal of Biological Chemistry* 268, S. 5940-5948 (1993)
- Stagg, R.B.; Hardy, P.T.; MacMurray, A.; Adey, W.R.: Electric and magnetic field interactions with microsomal membranes: A novel system for studying calcium flux across membranes, 1<sup>st</sup> World Cong. Elect. Magn. Biol. Med., Orlando FL, 1992, S. 12 (1992)
- Steiner, A.L.; Parker, C.W.; Kipnis, D.M.: The measurement of cyclic nucleotides by radioimmunoassay, *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 3, S. 89-111 (1970)
- Stelly, N.; Mauger, J.P.; Kéryer, G.; Claret, M.; Adoutte, A.: Cortical alveoli of *Paramecium*: a vast submembraneous calcium compartment, *Journal of Cell Biology* 113, S. 103-112 (1991)
- Stevens, R.G.: Electric power use and breast cancer: A hypothesis, *American Journal of Epidemiology* 125, S. 556-561 (1987)
- Stevens, R.G.: Electric power and the risk of breast cancer, *Radiation Research* 133, S. 132-134 (1993a)
- Stevens, R.G.: Breast cancer and electric power, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 47, S. 435-438 (1993b)
- Stevens, R.G.; Davis, S.: The melatonin hypothesis: electric power and breast cancer, *Environmental Health Perspectives* 104 (Supplement 1); S. 135-140 (1996)
- Suonpää, M.; Markela, E.; Stahlberg, T.; Hemmilä, I.: Europium-labelled streptavidin as a highly sensitive universal label, indirect time-resolved immunofluorometry of FSH and TSH; *Journal of Immunological Methods* 149, S. 247-253 (1992)
- Tamarkin, L.; Cohen, M.; Roselle, D.; Reichter, C.; Lippman, M.; Chabner, B.: Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat, *Cancer Research* 41, S. 4432-4436 (1981)
- Thériault, G.; Miller, A.; Goldberg, M.: Cancer risks associated with occupational exposure to magnetic fields among utility workers in Ontario and Québec, Canada and France: 1970-1989, *American Journal of Epidemiology* 139, S. 550-572 (1994)
- Thumm, S.; Löschinger, M.; Glock, S.; Hämmerle, H.; Rodemann, H.P.: Induction of cAMP-dependent protein kinase A activity in human skin fibroblasts and rat osteoblasts by extremely low-frequency electromagnetic fields, *Radiation and Environmental Biophysics* 38, S. 195-199 (1999)
- Toescu, E.C.; O'Neill, S.C.; Petersen, O.H.; Eisner, D.A.: Caffeine inhibits the agonist evoked cytosolic Ca<sup>2+</sup> signal in mouse pancreatic acinar cells by blocking inositol triphosphate production, *Journal of Biological Chemistry* 267, S. 23467-23470 (1992)
- Travis, S.M.; Nelson, D.L.: Regulation of axonemal Mg<sup>2+</sup>-ATPase from *Paramecium* cilia: effects of Ca<sup>2+</sup> and cyclic nucleotides, *Biochimica et Biophysica Acta* 966, S. 84-93 (1988)
- Trosko, J.E.: Human health consequences of environmentally-modulated gene expression: potential roles of ELF-EMF induced epigenetic versus mutagenic mechanisms of disease, *Bioelectromagnetics* 21, S. 402-406 (2000)
- Tsim, S.-T.; Wong, J.T.Y.; Wong, Y.H.: Calcium ion dependency and the role of inositol phosphates in melatonin-induced encystment of dinoflagellates, *Journal of Cell Science* 110, S. 1387-1393 (1997)

- Tsim, S.-T.; Wong, J.T.Y.; Wong, Y.H.: Regulation of calcium influx and phospholipase C activity by indoleamines in dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*, *Journal of Pineal Research* 24, S. 152-161 (1998)
- Tuinstra, R.; Goodman, E.; Greenebaum, B.: Protein kinase C activity following exposure to magnetic field and phorbol ester, *Bioelectromagnetics* 19, S. 469-476 (1998)
- Umeki, S.; Nozawa, Y.: Adenylate and guanylate cyclases in *Tetrahymena*, *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 17, S. 40-60 (1996)
- Valberg, P.A.: Designing EMF experiments: What is required to characterize "exposure"?; *Bioelectromagnetics* 16, S. 396-401 (1995)
- Valberg, P.A.; Kavet, R.; Rafferty, C.N.: Can low-level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects?, *Radiation Research* 148, S. 2-21 (1997)
- Van Someren, E.J.: Circadian and sleep disturbance in the elderly, *Experimental Gerontology* 35, S. 1229-1239 (2000)
- Vaněček, J.; Klein, D.C.: Sodium-dependent effects of melatonin on membrane potential of neonatal rat pituitary cells, *Endocrinology* 131, S. 939-946 (1992)
- Verkasalo, P.; Pukkala, E.; Hongisto, M.; Valjus, J.; Jörvinen, P.; Heikkilü, K.; Koskenvuo, M.: Risk of cancer in Finnish children living close to power lines, *British Medical Journal* 307, S. 895-899 (1993)
- Vivien-Roels, B.; Pévet, P.: Melatonin: Presence and formation in invertebrates, *Experientia* 49, S. 642-647 (1993)
- Verordnung über elektromagnetische Felder, 26. BImSchV vom 01.01.1997
- Walczak, C.; Nelson, D.L.: Regulation of dynein-driven motility in cilia and flagella. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 27, S. 101-107 (1994)
- Walleczek, J.: Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling, *FASEB Journal* 6, S. 3177-3185 (1992)
- Walleczek, J.; Shiu, E.; Hahn, G.M.: Increase in radiation-induced HPRT gene mutation frequency from nonthermal exposure to non-ionizing 60-Hz electromagnetic fields, *Radiation Research* 151, S. 489-497 (1999)
- Waldhauser, F.; Weissenbacher, G.; Tatzler, E.; Gisinger, B.; Waldhauser, M.; Schemper, M.; Frisch, H.: Alterations in nocturnal melatonin levels in humans with growth and aging, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 66, S. 648-652 (1988)
- Walter, M.F.; Schultz, J.E.: Calcium receptor protein calmodulin isolated from cilia and cells of *Paramecium tetraurelia*, *European Journal of Cell Biology* 24, S. 97-100 (1981)
- Wartenberg, D.; Dietrich, F.; Goldberg, R.; Poole, C.; Savitz, D.: A meta-analysis of studies of childhood cancer and residential exposure to magnetic fields, PR-702871, Research Triangle Park: Report for the National Institute of Environmental Health Sciences (1998)
- Wasserberg, J.J.; Clark, K.D.; Nelson, D.L.: Effect of SERCA pump inhibitors on chemoresponses in *Paramecium*, *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 44, S. 574-581 (1997)
- Weaver, J.C.; Vaughan, T.E.; Adair, R.K.; Astumian, R.D.: Theoretical limits on the threshold for the response of long cells to weak ELF electric fields due to ionic and molecular flux rectification, *Biophysical Journal* 75, S. 2251-2254 (1998)

- Weaver, J.C.; Vaughan, T.E.; Martin, G.T.: Biological effects due to weak electric and magnetic fields: The temperature variation threshold, *Biophysical Journal* 76, S. 3026-3030 (1999)
- Wertheimer, N.; Leeper, E.: Adult cancer related to electrical wires near the home, *International Journal of Epidemiology* 11, S. 345-355 (1982)
- Wertheimer, N.; Leeper, E.: Electrical wiring configurations and childhood cancer, *American Journal of Epidemiology* 109, S. 273-284 (1979)
- Wilczek, M.: Untersuchungen zum Einfluß schwacher magnetischer 50Hz Wechselfelder auf das Schwimmverhalten und das Signaltransduktionssystem von *Paramecium biaurelia*, Diplomarbeit an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1998)
- Wilson, B.W.; Wright, C.W.; Morris, J.E.; Buschbom, R.L.; Brown, D.P.; Miller, D.L.; Sommers-Flannigan, R.; Anderson, L.E.: Evidence for an effect of ELF electromagnetic fields on human pineal gland function, *Journal of Pineal. Research* 9, S. 259-269 (1990)
- Wilson, B.W.; Matt, K.S.; Morris, J.E.; Sasser, L.B.; Miller, D.L.; Anderson, L.E.: Effects of 60 Hz magnetic fields exposure on the pineal and hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*), *Bioelectromagnetics* 20, S. 224-232 (1999)
- Wood, A.W.; Armstrong, S.M.; Sait, M.L.; Devine, L.; Martin, M.J.: Changes in human plasma melatonin profiles in response to 50 Hz magnetic field exposure, *Journal of Pineal Research* 25, S.116-127 (1998)
- Yalow, R.S.; Berson, S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, *Journal of Clinical Investigation* 39, S. 1157 (1960)
- Yamamoto, T.; Yamamoto, S.; Osborne, J.C.; Manganiello, V.C.; Vaughan, M.: Complex effects of inhibitors on cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase, *The Journal of Biological Chemistry* 258, S. 14273-14177 (1983)
- Yang, W.Q.; Braun, C.; Plattner, H.; Purvee, J.; Van Houten, J.L.: Cyclic nucleotides in glutamate chemosensory signal transduction of *Paramecium*, *Journal of Cell Science* 110, S. 2567-2572 (1997)
- Yasui, M.; Kikuchi, T.; Ogawa, M.; Otaka, Y.; Tsuchitani, M.; Iwata, H.: Carcinogenicity test of 50 Hz sinusoidal magnetic fields in rats, *Bioelectromagnetics* 18, S. 531-540 (1997)
- Yellon, S.M.: Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster, *Journal of Pineal Research* 22, S. 177-183 (1994)
- Zatz, M.: Relationship between light, calcium influx and cAMP in the acute regulation of melatonin production by cultured chick pineal cells, *Brain Research* 477, S. 14-18 (1989)
- Zhang, Q.-Z.; Zhang, J.-T.: Inhibitory effects of melatonin on free intracellular calcium in mouse brain cells, *Acta Pharmacologica Sinica* 20, S. 206-210 (1999)

## Abkürzungen

AAA	Aryl-Acyl-Amidase
AC	Adenylatcyclase
A/D-Wandler	Analog/Digital-Wandler
AS	Alveolarsäcke
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BImSchV	Bundesimmissionsschutz-Verordnung
BSA	Bovine Serum Albumin
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyklisches Adenosin 3'5'-Monophosphat
cGMP	Cyklisches Guanosin 3'5'-Monophosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
[Ca <sup>2+</sup> ]	Calciumionenkonzentration
CCAP	Culture Collection Of Algae And Protozoa
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglykol-Bis(Beta-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELF	Extremely low frequency
EMF	Elektromagnetisches Feld
GC	Guanylatcyclase
HIOMT	Hydroxyindol-O-Methyltransferase
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IBMX	Isobutylmethylxanthin
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
MOPS	3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure
n	Anzahl der Proben/Spuren
Na <sup>2+</sup>	Natriumionen
NAT	N-Acetyltransferase
PDE	Phosphodiesterase
PK	Proteinkinase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
v	mittlere Schwimmggeschwindigkeit

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung .....	4
<b>Abb. 2.1:</b> Die Anordnung der Spulen nach Helmholtz im Querschnitt .....	19
<b>Abb. 2.2:</b> Aufsicht auf die Expositionseinrichtung.....	19
<b>Abb. 3.1:</b> Mittlere Schwimmgeschwindigkeit bei Magnetfeldexposition .....	38
<b>Abb. 3.2:</b> Linearitätsindex bei Magnetfeldeinwirkung.....	38
<b>Abb. 3.3:</b> Mediane Schwimmgeschwindigkeit bei Magnetfeldexposition (5 Versuche)	39
<b>Abb. 3.4:</b> Medianer Linearitätsindex bei Magnetfeldexposition (5 Versuche). .....	39
<b>Abb. 3.5:</b> cGMP Konzentration nach verschiedenen Zeiten Magnetfeldeinwirkung .....	41
<b>Abb. 3.6:</b> Prozentuale Änderung der cGMP Konzentrationen mit Magnetfeld .....	41
<b>Abb. 3.7:</b> cAMP Werte zu verschiedenen Zeiten der Magnetfeldeinwirkung.....	43
<b>Abb. 3.8:</b> Prozentuale Änderung der cAMP Konzentrationen mit Magnetfeld .....	43
<b>Abb. 3.9:</b> cAMP Konzentrationen nach mechanischer Reizung.....	44
<b>Abb. 3.10:</b> Prozentuale Änderung von cAMP mit IBMX und Magnetfeld .....	45
<b>Abb. 3.11:</b> Schwimmgeschwindigkeit und Linearitätsindex mit IBMX (I).....	47
<b>Abb. 3.12:</b> Schwimmgeschwindigkeit und Linearitätsindex mit IBMX (II).....	47
<b>Abb. 3.13:</b> cAMP Konzentrationen mit IBMX und Magnetfeld .....	48
<b>Abb. 3.14:</b> Prozentuale Änderung von cAMP mit IBMX und Magnetfeld .....	49
<b>Abb. 3.15:</b> cAMP bei Kontrollen mit und ohne IBMX.....	50
<b>Abb. 3.16:</b> cAMP nach mechanischer Reizung mit und ohne IBMX .....	51
<b>Abb. 3.17:</b> cAMP nach mechanischer Reizung mit IBMX oder Koffein .....	52
<b>Abb. 3.18:</b> Schwimmgeschwindigkeit von Pawn bei Magnetfeldeinwirkung.....	54
<b>Abb. 3.19:</b> Linearitätsindex von Pawn bei Magnetfeldexposition .....	54
<b>Abb. 3.20:</b> cAMP Konzentrationen von Pawn bei Magnetfeldeinwirkung. ....	56
<b>Abb. 3.21:</b> Prozentuale cAMP Änderung von Pawn mit Magnetfeld. ....	56
<b>Abb. 3.22:</b> Strukturformel von 5´-Methoxytryptamin .....	57
<b>Abb. 3.23:</b> Beispiele für HPLC Bestimmungen von 5`-Methoxytryptamin .....	58
<b>Abb. 3.24:</b> 5`-Methoxytryptamin-Konzentrationen bei Magnetfeldeinwirkung. ....	59
<b>Abb. 3.25:</b> Differenzen Kontrolle/Magnetfeld-Probe von 5`-Methoxytryptamin .....	59
<b>Abb. 3.26:</b> Abhängigkeit der prozentualen Änderung von cGMP vom Grundzustand ..	61
<b>Abb. 3.27:</b> Abhängigkeit der prozentualen Änderung von cAMP vom Grundzustand ..	61
<b>Abb. 3.28:</b> Abhängigkeit der cAMP-Änderung mit IBMX vom Grundzustand.....	62
<b>Abb. 3.29:</b> Abhängigkeit der cAMP-Änderung von Pawn vom Grundzustand. ....	62
<b>Abb. 3.30:</b> Abhängigkeit der 5´-Methoxytryptamin-Änderung vom Grundzustand. ....	63