

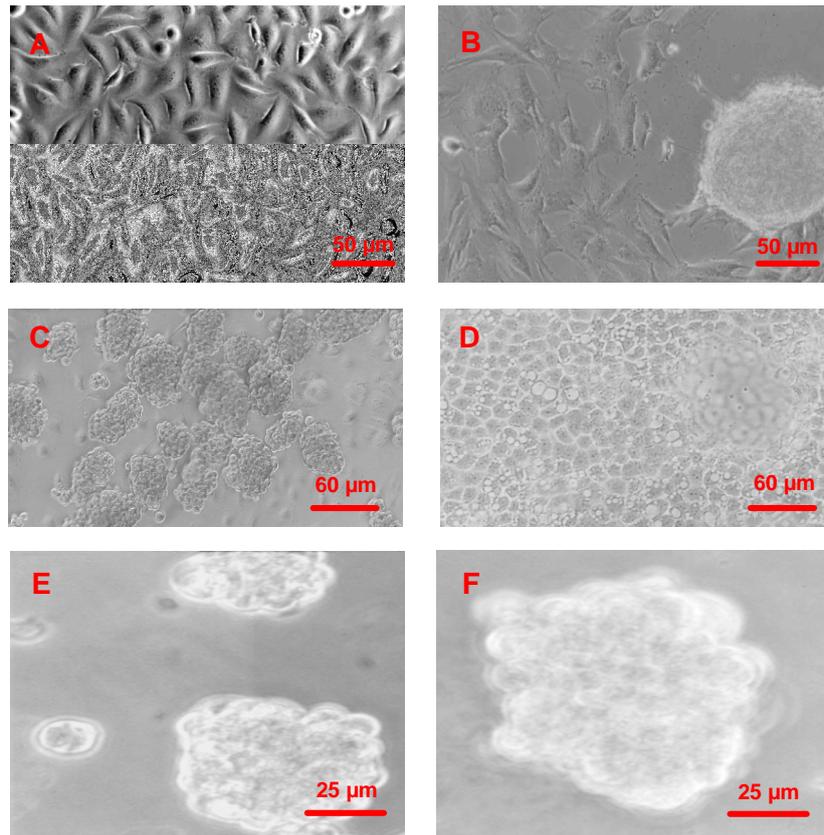
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Simulierte Schwerelosigkeit und Morphologie

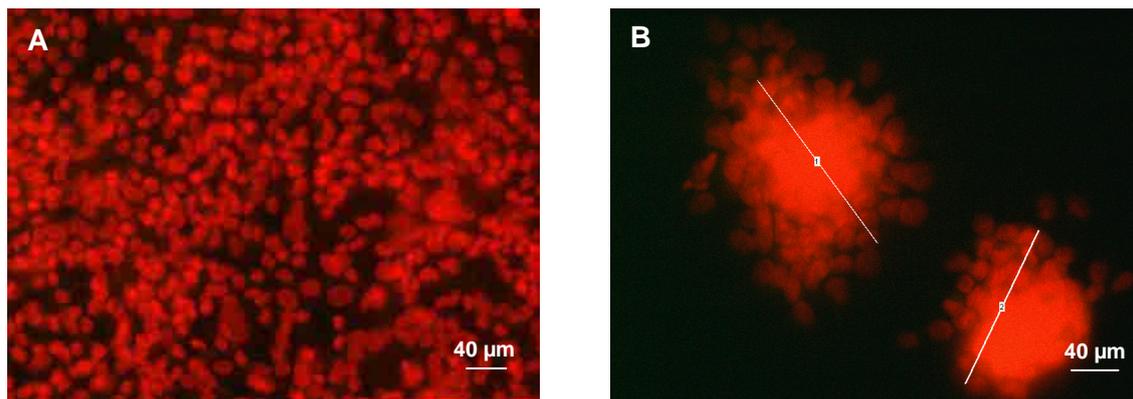
Der Einfluss der Klinorotation auf die Morphologie der Zellen ist bei allen drei Zelllinien einheitlich. Nach 12 Stunden Kultivierung unter simulierter Schwerelosigkeit ließ sich die Bildung kleiner Sphäroide in den Kulturflaschen zu beobachten (Abb. 8 B). Nach 24 Stunden hatten sich bereits sehr viele Zellen vom Boden der Flaschen gelöst und ein Großteil davon schwebte in Form von Sphäroiden (Abb. 8 C) im Kulturmedium. Nach 48 Stunden hatten sich schließlich fast alle Zellen zu dreidimensionalen Verbänden unterschiedlicher Größe verbunden, wobei der maximale Durchmesser  $0,3 \pm 0,01$  mm betrug (Abb. 9 B). Die Propidiumjodidfärbung zeigte die Größe der Sphäroide und das Fehlen von Nekrosezonen im Sphäroidinnern.

Weder konzentrische Zelllagen noch eine andere regelmäßige Form des Wachstums war erkennbar. Die Zellen wuchsen unregelmäßig über das gesamte Sphäroid verteilt.

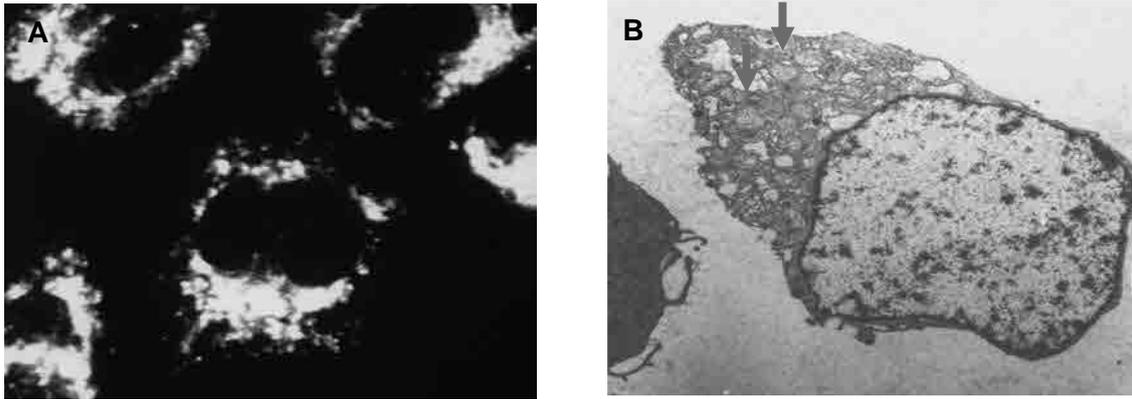
Während der 120 Stunden auf dem Klinostaten bildeten die Zellkugeln keine nekrotischen Zentren aus (Abb. 8 F). Anhand der mitochondrienreichen oxyphilen ONCO-DG 1 Zelllinie konnte erstmals die Wirkung der Schwerelosigkeit auf die Mitochondrien gezeigt werden (Abb. 10). Es zeigte sich nach 24 h eine Ballonierung der Mitochondrien. Sie wurden auf eine Seite gezogen, was auf Veränderungen am Mikrotubuligerüst schließen lässt.



**Abb. 8 Morphologie:** A: Monolayerbodenkultur der ML-1 Zelllinie. B: nach 12 h simulierter 0 g beginnen sich Sphäroide zu bilden und vom Boden zu lösen. C: Nach 24 h schwimmen zahlreiche ML-1 Sphäroide im Medium. D: ONCO-DG 1 Zelllinie als konfluente Monolayerbodenkultur. E und F: MCTS der ONCO-DG 1 Zelllinie nach 24 h und 120 h bei 0 g.



**Abb. 9 Propidiumjodid-Färbung;** ML-1 Bodenkultur (A) und ML-1-MCTS (B) nach 48 h. Die Propidiumjodid-Färbung wurde zur Größenbestimmung der MCTS verwendet.



**Abb. 10 Untersuchung der Mitochondrien:** A: Rhodamin 123 Vitalfärbung der ONCO-DG 1 Bodenkontrollzellen, aufgenommen mit einem Laserscanmikroskop: Die oxyphile onkozytäre Schilddrüsenkarzinomzelllinie ist charakterisiert durch ihren Mitochondrien-reichtum. B: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen, die 24 h bei 0 g im Klinostaten rotiert wurden. Die Mitochondrien sind geschwollen und tendenziell auf einer Seite der Zelle angesammelt, was ein Hinweis auf die Zerreißung der Mikrotubuli ist (Pfeile).

## 5.2 Veränderungen des Zytoskeletts von Schilddrüsentumorzellen durch simulierte Schwerelosigkeit

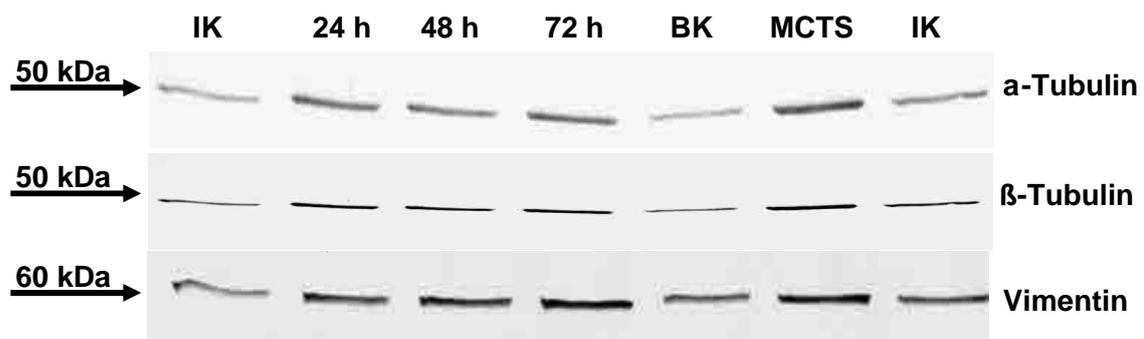
### 5.2.1 ML-1 Zelllinie

Eine Westernblotanalyse für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zeigt einen deutlichen Anstieg für beide Proteine nach 24 h Kultur in Schwerelosigkeit im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Im MCTS ist der Proteingehalt am höchsten (Abb. 11 A).

Auch beim Intermediärfilament Vimentin kommt es durch die Schwerelosigkeit zu einer vermehrten Bildung dieses Proteins (Grimm et al., 2002).

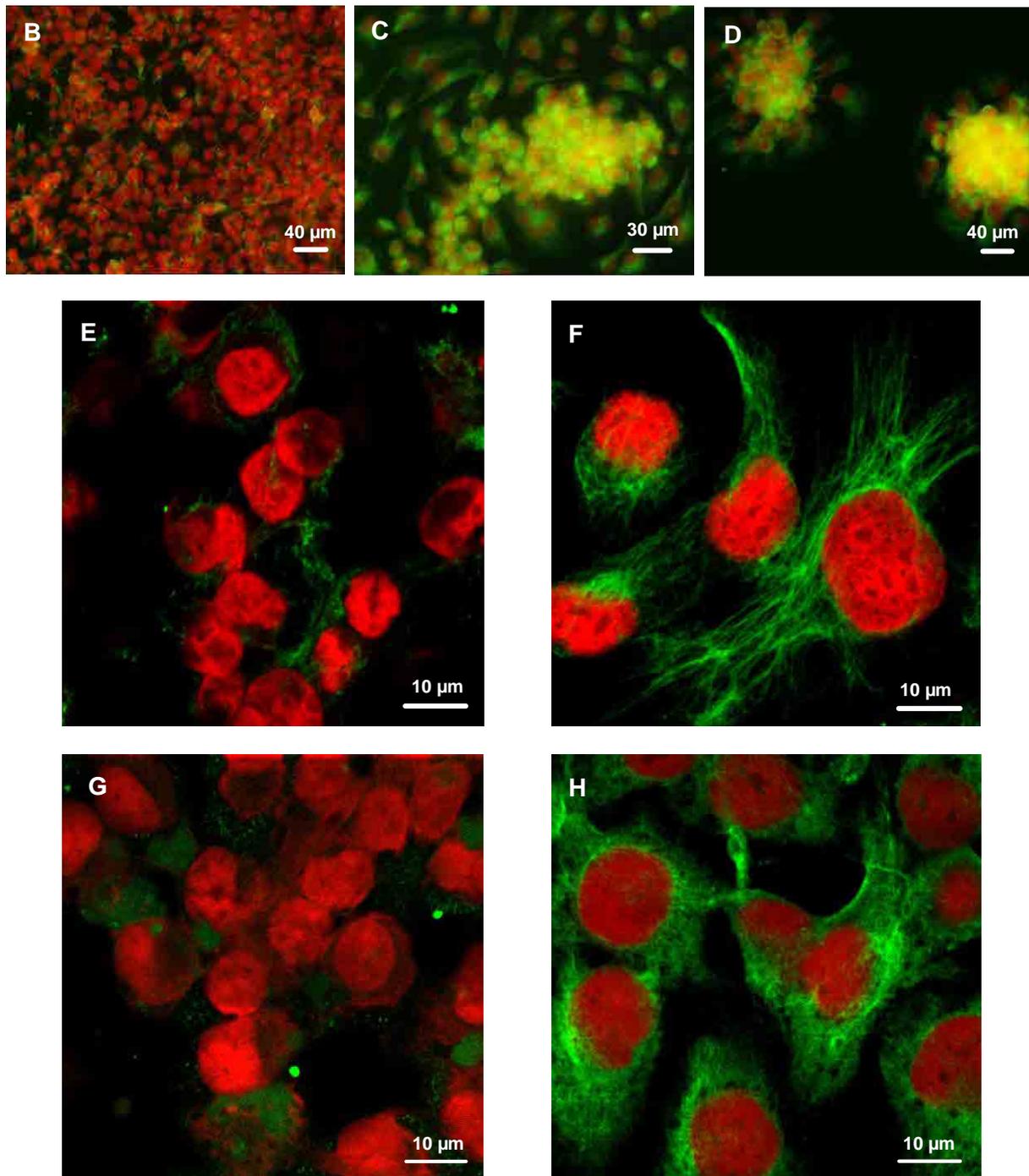
Ein analoges Ergebnis erhält man durch die Immunfluoreszenz. Es kommt durch Mikrogravitation bereits nach 24 h zu einer Vermehrung vimentin-positiver Zellen. Dies deutet auf eine Änderung der Differenzierung der follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen hin. Am deutlichsten wird dies im multizellulären Tumorsphäroid. Hier sind alle Zellen positiv für das Intermediärfilament (Abb. 11 D).

Analoge Ergebnisse werden bei der immunfluoreszenzhistochemischen Untersuchung des Intermediärfilaments Zytokeratin erzielt. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme Zytokeratin-positiver ML-1 Zellen. Die Filamente erscheinen verdickt (Abb. 11 H).



A

**Abb. 11 Zytoskelett der ML-1 Zelllinie:** A:  $\alpha$ -Tubulin,  $\beta$ -Tubulin und Vimentin. Alle drei Proteine sind deutlich bei simulierter Schwerelosigkeit im Vergleich zu BK und IK vermehrt.

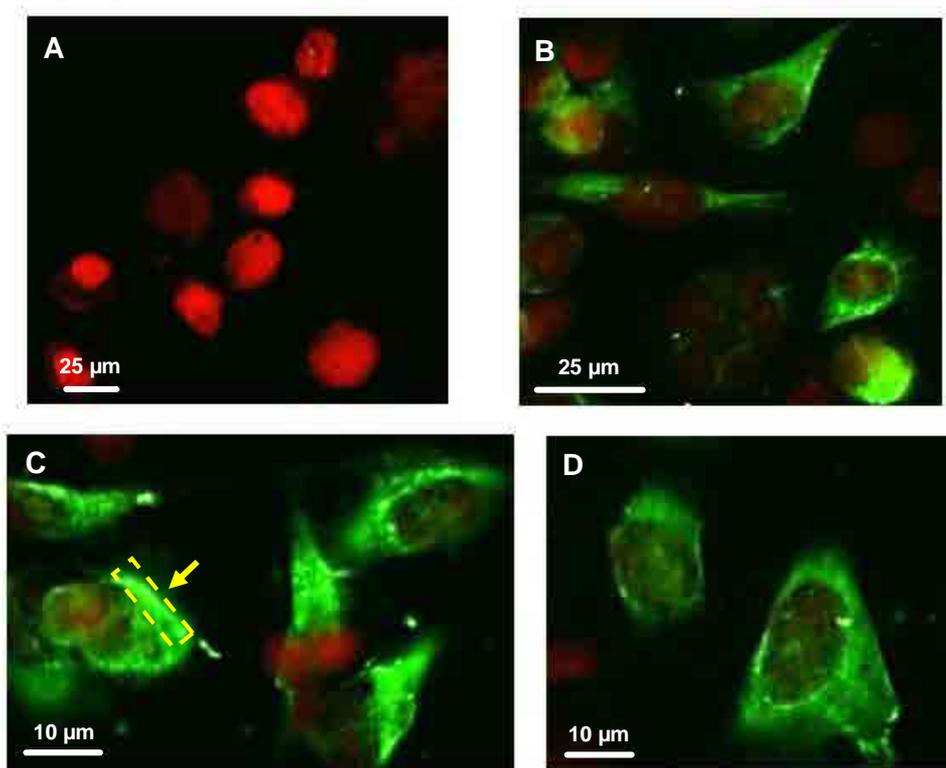


**Abb. 11: Immunfluoreszenz von ML-1 Zellen:** B: Vimentinnachweis bei Bodenkontrollen. C: Nach 24 h Klinorotation zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Gehalts vimentin-positiver Zellen. D: ML-1 MCTS nach 48 h 0 g. Alle Zellen des Sphäroids sind vimentin-positiv. D: Vimentinnachweis, Aufnahmen mit dem Laserscanmikroskop von BK (E) und 48 h 0 g (F). Es sind verdickte Filamente erkennbar. G und H: Nachweis von Zytokeratin, Aufnahmen mit dem Laserscanmikroskop: G: Bei BK sind nur einige Zellen positiv. H: Nach 48 h sind alle ML-1 Zellen positiv für das Intermediärfilament Zytokeratin. Die Zytokeratin-Filamente liegen dicht gepackt im Cytoplasma.

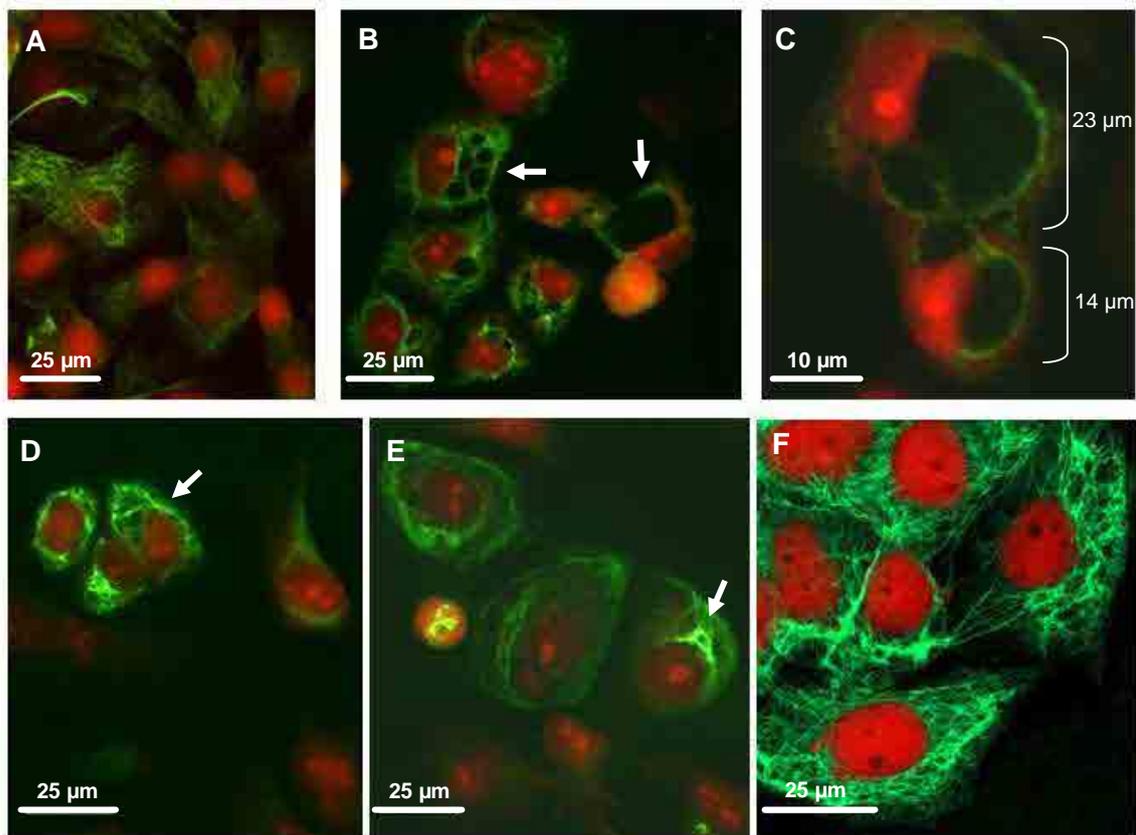
### 5.2.2 ONCO-DG1-Zelllinie

Die Vimentin-Immunfluoreszenz ist bei normalen Bodenkontrollzellen der ONCO-DG1-Zelllinie negativ (Abb.12 A). Bereits nach 30 min Kultivierung der Zellen bei 0 g werden Vimentin-Intermediärfilamente nachweisbar, die zum Teil dicht gepackt in der Nähe des Zellkerns liegen (Abb. 12 B-D).

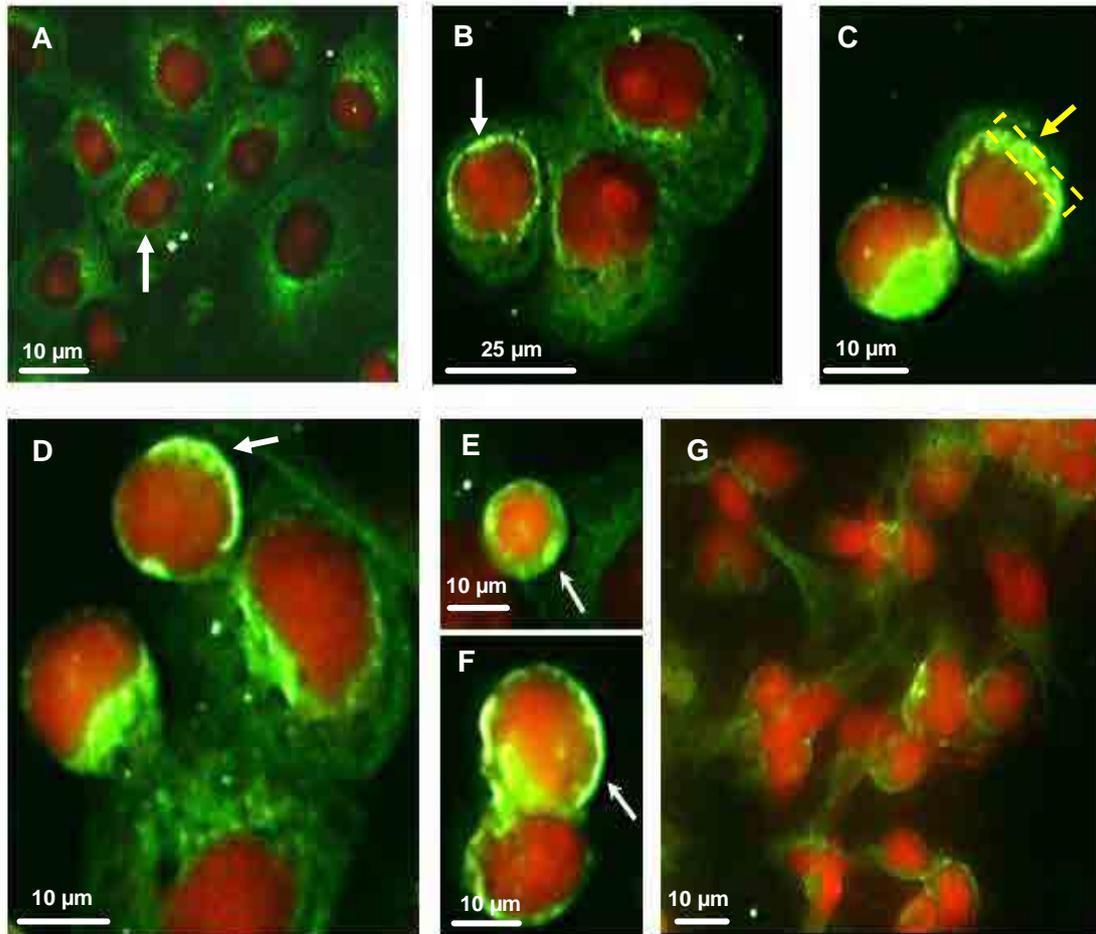
Inkubator- oder Bodenkontrollzellen sind positiv für Zytokeratin, was der Differenzierung der ONCO-DG1-Zelllinie entspricht. Nach 30 min Kultivierung unter simulierter Schwerelosigkeit mittels Klinorotation kommt es zu einer Auflockerung des Filamentnetzwerkes. Es lassen sich bis zu 23  $\mu\text{m}$  große Löcher nachweisen (Abb. 13 C). Nach 48 h Kultivierung der Zellen bei 0 g kommt es zu einer völligen Normalisierung der Zytokeratin-Filamente (Abb. 13 F). Die Immunfluoreszenz für  $\alpha$ -Tubulin zeigt das charakteristische radiäre Mikrotubulin-netzwerk der ONCO-DG1-Zellen. Bereits nach 30 min Kultur in simulierter Schwerelosigkeit kommt es auch hier zu einer Verdickung und Verkürzung der Mikrotubuli und zu einer Anlagerung bzw. Verklumpung im Kernbereich (Abb. 14 C-F). Nach 48 h Kultivierung der Zellen bei simulierter Schwerelosigkeit bilden sich auch hier die Veränderungen zurück (Abb.14 G).



**Abb. 12: Vimentin-Immunfluoreszenz von ONCO-DG1-Zellen:** A: BK-Zellen ohne Vimentin-Positivität. B bis D: Bereits nach 30 min 0 g zeigen sich vimentin-positive ONCO-DG 1 Zellen: Es befinden sich zum Teil dicht gepackte positive Areale in Kernnähe (Pfeil).



**Abb. 13: Zytokeratin-Immunfluoreszenz von ONCO-DG1-Zellen:** A: Normale Verteilung des Intermediärfilaments Zytokeratin in BK-Zellen. B bis E: 0 g für 30 min, B und C: Löcher im Netzwerk sind sichtbar (Pfeile). D und E: Die Intermediärfilamente sind deutlich dicker (Pfeile). F: Nach 48 h 0 g sind alle ONCO-DG 1 Zellen zytokeratin-positiv und zeigen ein nahezu normales Netzwerk.

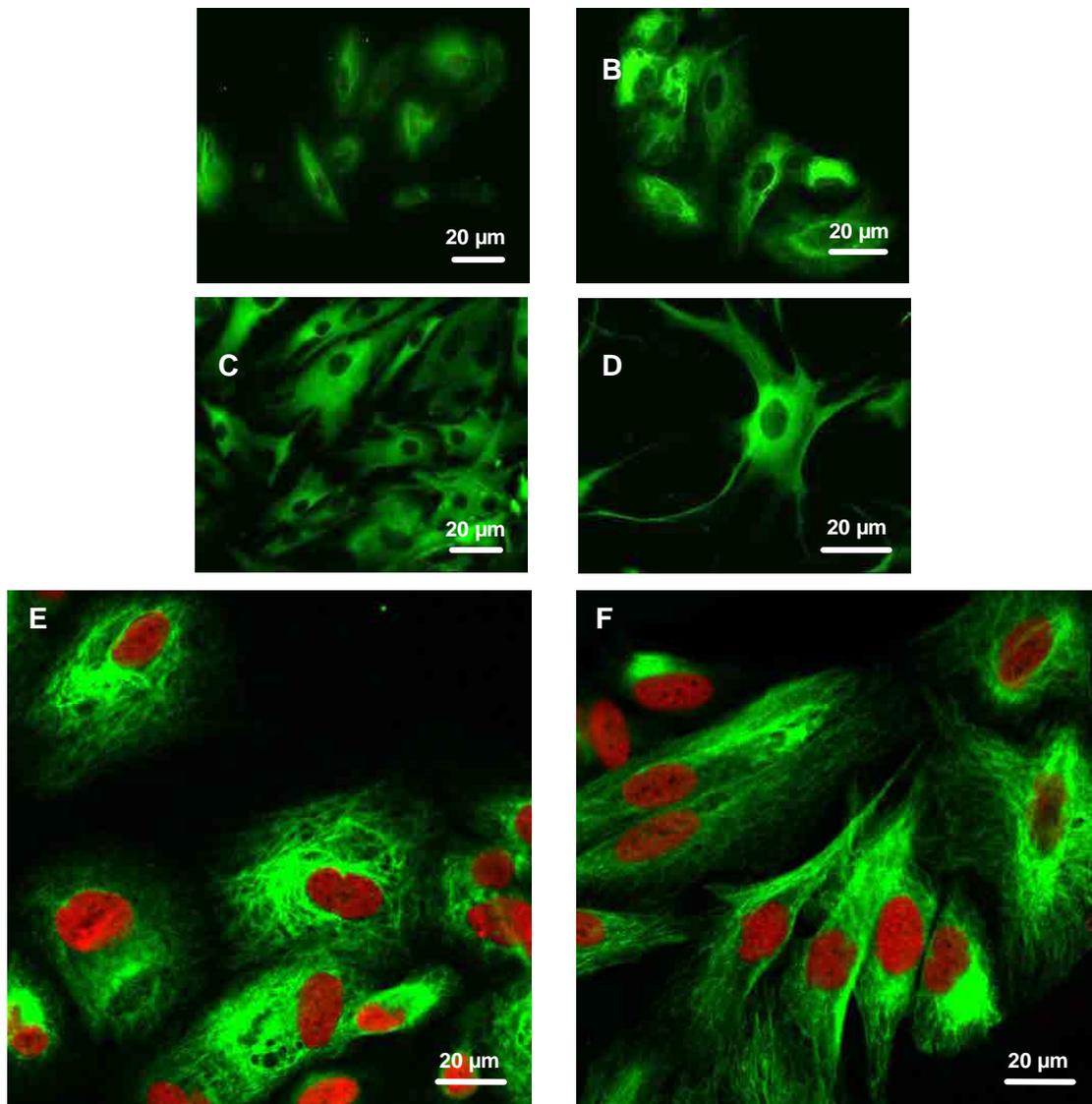


**Abb. 14: a-Tubulin-Immunfluoreszenz von ONCO-DG1-Zellen:** A: BK. Die Mikrotubuli ziehen von einem Zentrum zur Plasmamembran. B bis F: 30 min 0 g. Die Mikrotubuli erscheinen desorganisiert, das radiäre Muster ist verschwunden. Tubulin lagert sich in dicken Arealen um den Kern an (Pfeile). G: Nach 48 h findet sich eine Anpassung der Mikrotubuli an die Schwerelosigkeit.

### 5.2.3 HTU-5 Zelllinie

Alle HTU-5-Zellen sind unter Normalbedingungen vimentin-positiv gemäß der Differenzierung der Zelllinie (Abb. 15 A). Nach 24 h zeigen sich Verklumpungen sowie eine Anlagerung der Vimentinfilamente in Kernnähe (Abb. 15 B). Das radiäre Muster der Intermediärfilamente ist zum Teil aufgehoben. Auch hier zeigt sich nach 48 h ein ähnliches Muster der Filamentanordnung wie bei 1 g. Eine perinukleäre Verdickung ist allerdings auch noch nach 72 h Kultivierung der Zellen bei simulierter Schwerelosigkeit nachzuweisen (Abb. 15 D).

HTU-5 Zellen sind zytokeratin-positiv (Abb. 15 E). Bezüglich des Zytokeratinnetzwerkes ist nach 24 h bei normalen Schilddrüsenzellen keine Veränderung mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen (Abb. 15 F).



**Abb. 15: Zytoskelett von HTU-5-Zellen:** Vimentin-Immuno-fluoreszenz von HTU-5-Zellen. A: Bodenkontrollzellen. B: 24 h 0 g, C: 48 h 0 g, D: 72 h 0 g. Vimentin ist verdickt und lagert sich in der Nähe des Kerns bei HTU-5-Zellen an. Die Zytokeratin-Immuno-fluoreszenz zeigt nach 24 h bei klinorotierten HTU-5-Zellen (F) keine Unterschiede zu Bodenkontrollzellen (E).

### 5.3 Extrazelluläre Matrixproteine und simulierte Schwerelosigkeit

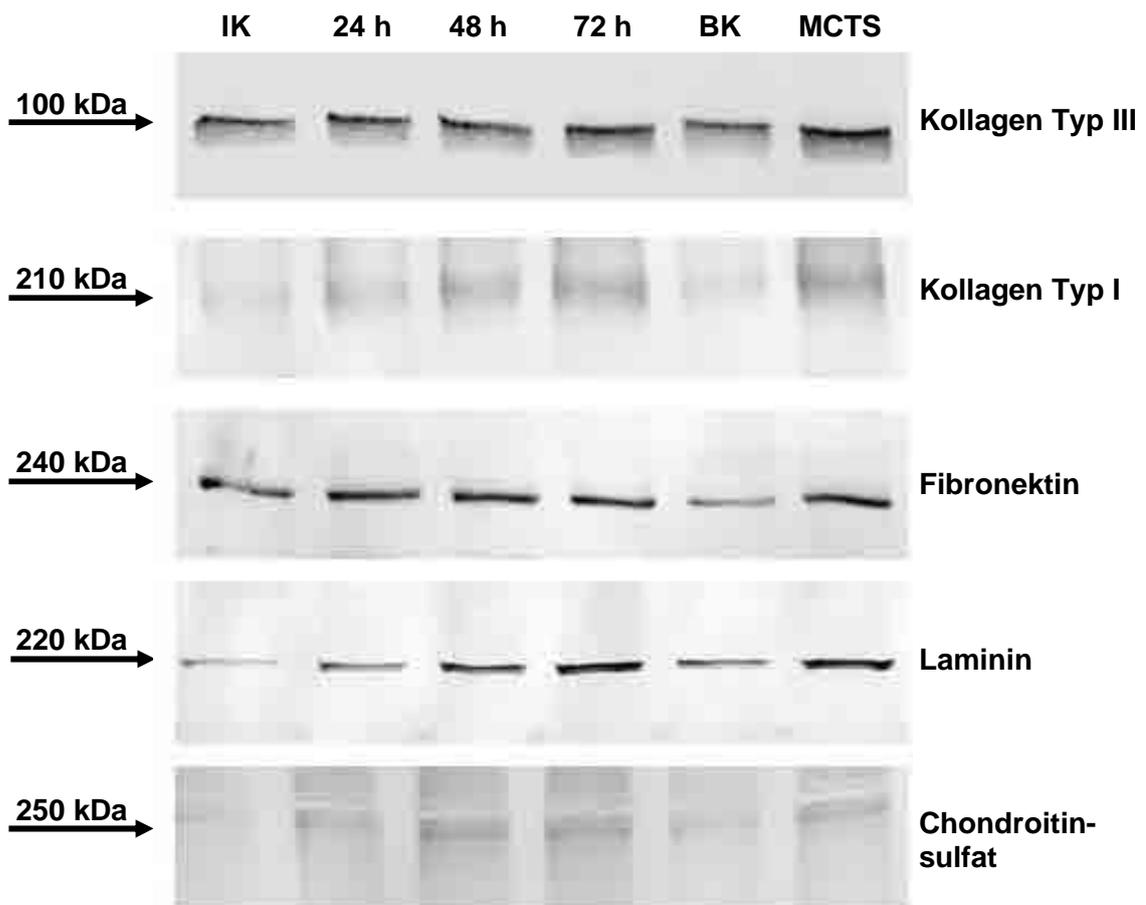
#### 5.3.1 ML-1 Zelllinie

EZM Proteine steigen unter Mikrogravitationsbedingungen stark an. Kollagen Typ I und III, Fibronectin, Laminin und Chondroitinsulfat werden von Kontrollzellen (Inkubator- und Bodenkontrollzellen) gebildet. Es zeigt sich ein zeitabhängiger Anstieg der Proteine bei Kultur unter 0 g Bedingungen (Abb. 16 A).

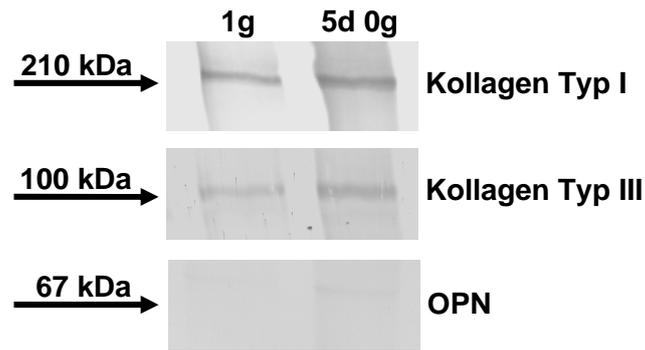
Im Langzeitversuch über 120 h konnte bei ML-1 Zellen eine deutliche Vermehrung des Gehalts an Kollagen Typ I und III mittels Westernblot bewiesen werden. Für Osteopontin war ein leichter Anstieg zu verzeichnen (Abb. 16 B).

Parallel konnte eine Erhöhung des  $\beta$ 1-Integrin Proteins, von Talin und Vinculin durch Mikrogravitation nachgewiesen werden (Abb. 16 D).

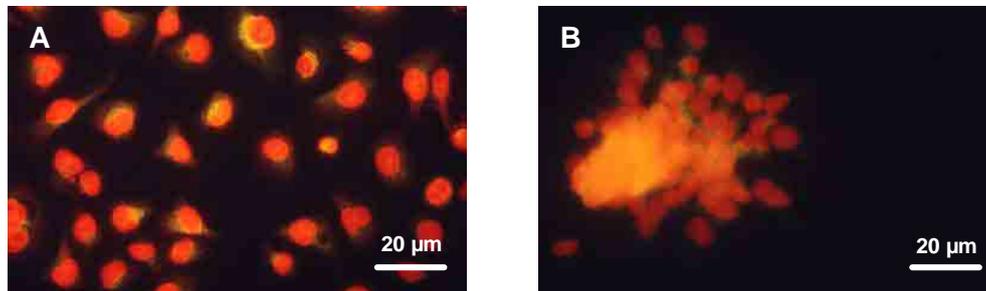
Diese Ergebnisse ließen sich auch mittels Durchflusszytometrie verifizieren (Abb. 17 A-C).



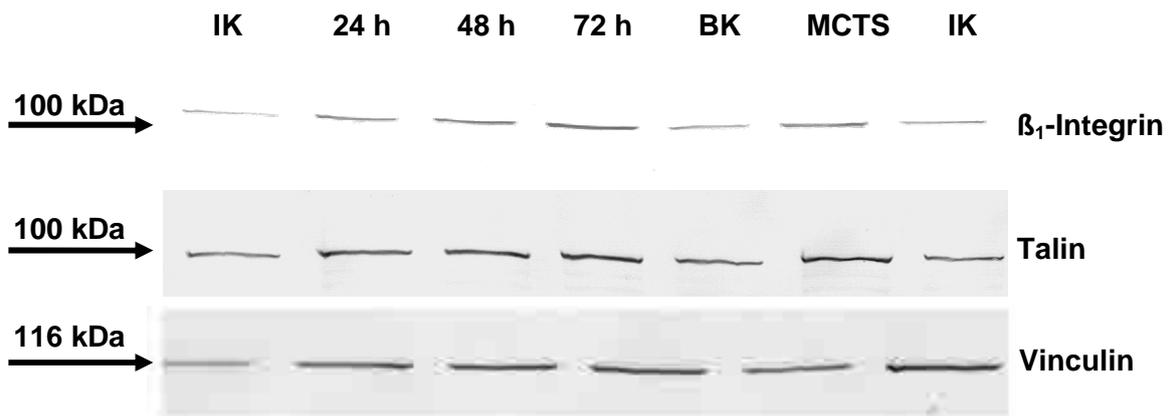
**Abb. 16 Extrazelluläre Matrixproteine von ML-1-Zellen:** A: Westernblotanalyse der Extrazellulären Matrixproteine von ML-1: Nach 24 h, 48 h, 72 h und im MCTS zeigt sich ein deutlicher Anstieg von Kollagen Typ I und III, Fibronectin, Laminin, Chondroitinsulfat und Vinculin im Vergleich zu IK und BK (Grimm et al., 2002).



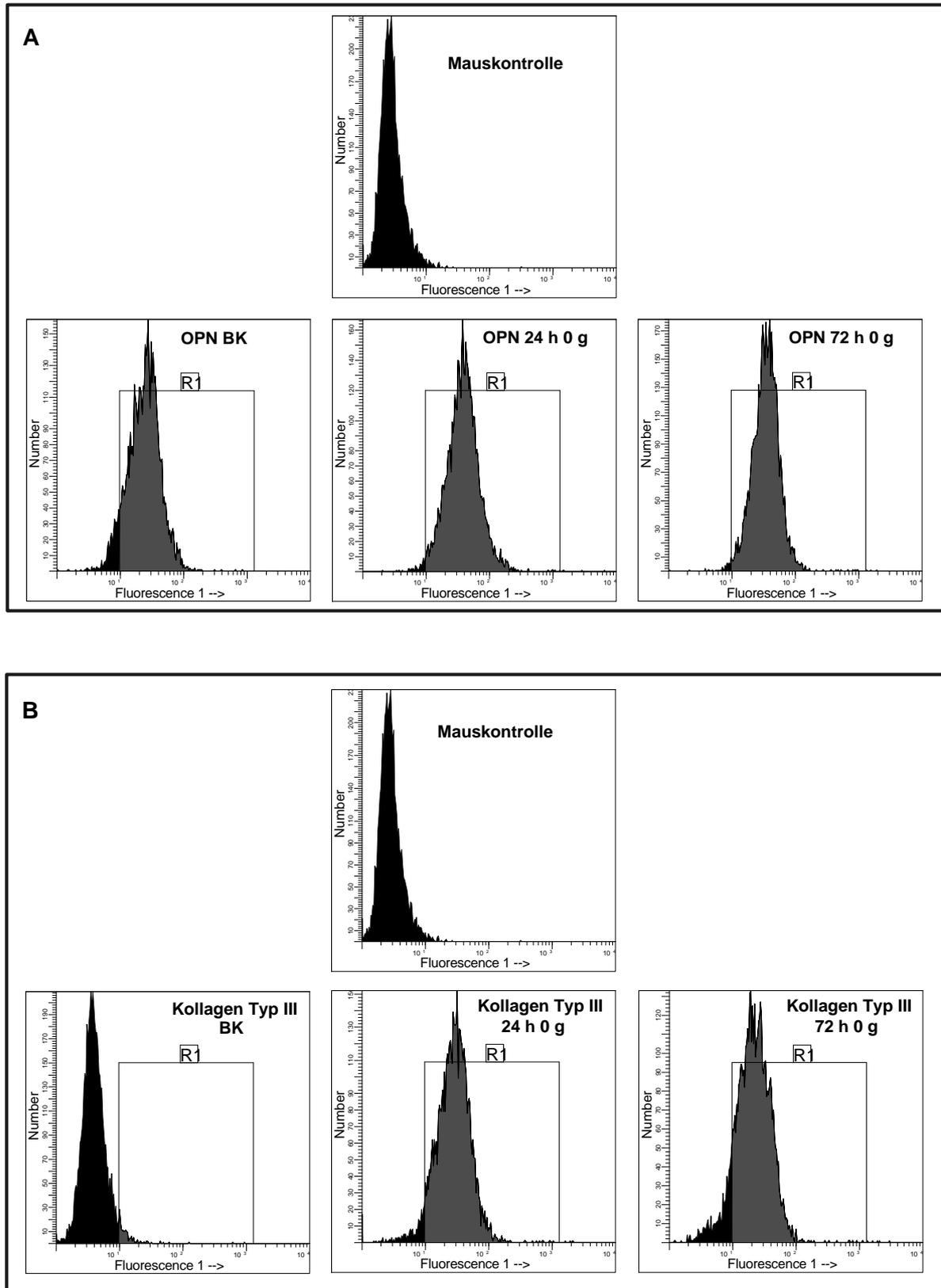
**Abb. 16 B:** Westernblotanalyse von ML-1: Nach fünf Tagen zeigt sich gleichfalls ein deutlicher Anstieg für Kollagen Typ I und III, sowie OPN im Vergleich zu 1 g BK-Zellen.



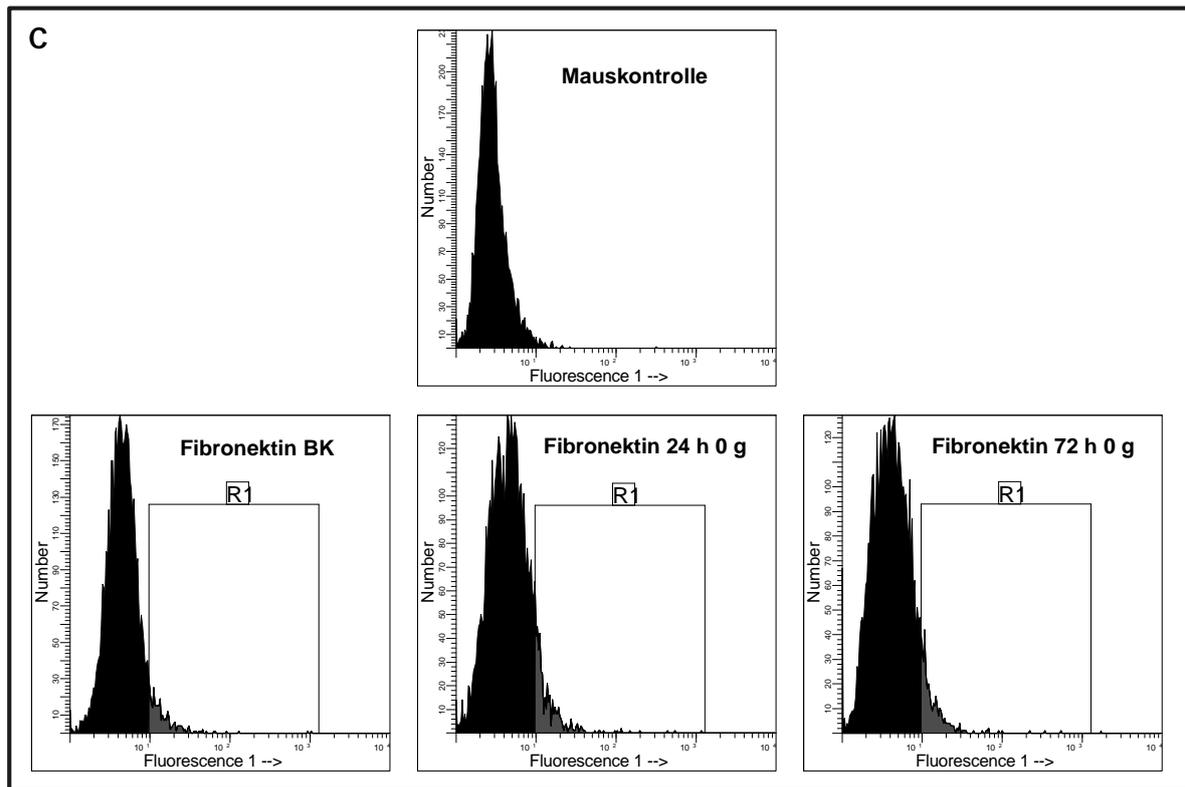
**Abb. 16 C:** Laminin-Immunfluoreszenz von ML-1 bei der BK (A) und nach 24 h 0 g im MCTS (B).



**Abb. 16 D:** Westernblot-Analyse von  $\beta_1$ -Integrin, Talin und Vinculin: Alle Proteine werden durch simulierte Schwerelosigkeit verstärkt gebildet.



**Abb. 17 Durchflusszytometrie der ML-1 Zelllinie:** Durchflusszytometrische Untersuchung von 15.000 Einzelzellen der ML-1 Zelllinie. A: 92 % der ML-Zellen sind positiv für OPN. 24 h und 72 h 0 g Bedingungen erhöhen diesen Prozentsatz auf 99 %. B: Kollagen Typ III. 5 % der BK-Zellen sind positiv für Kollagen Typ III. 0 g führt bereits nach 24 h zu einem deutlichen Anstieg für Kollagen Typ III auf 96 %. Nach 72 h sind 92 % der Zellen positiv.



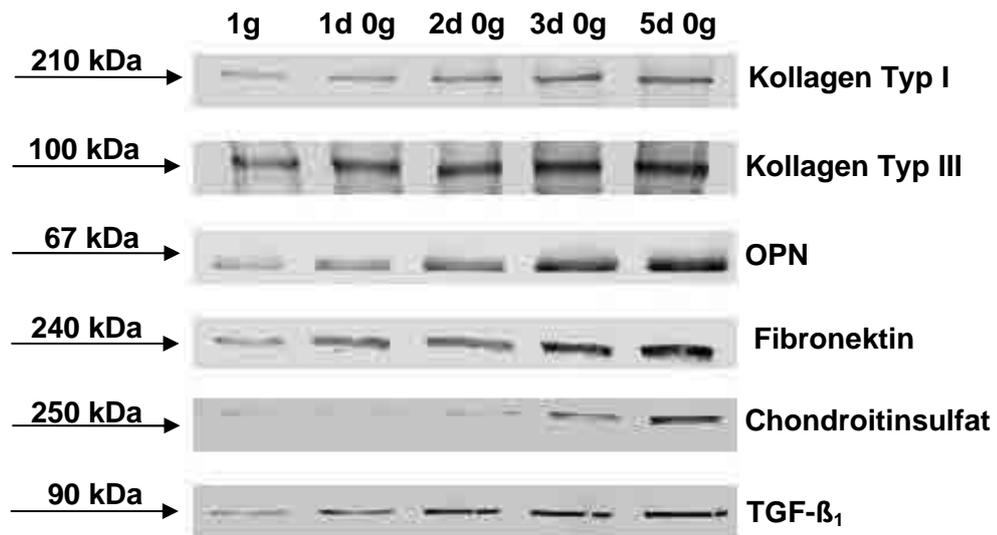
**Abb. 17 C:** Durchflusszytometrische Untersuchung von 15.000 Einzelzellen der ML-1 Zelllinie. 8,6 % der ML-1 Zellen sind positiv für Fibronektin. 0 g führt nur zu einem mäßigen Anstieg von Fibronektin: Für 24 h auf 14 % und für 72 h auf 11 %.

### 5.3.2 ONCO-DG 1 Zelllinie

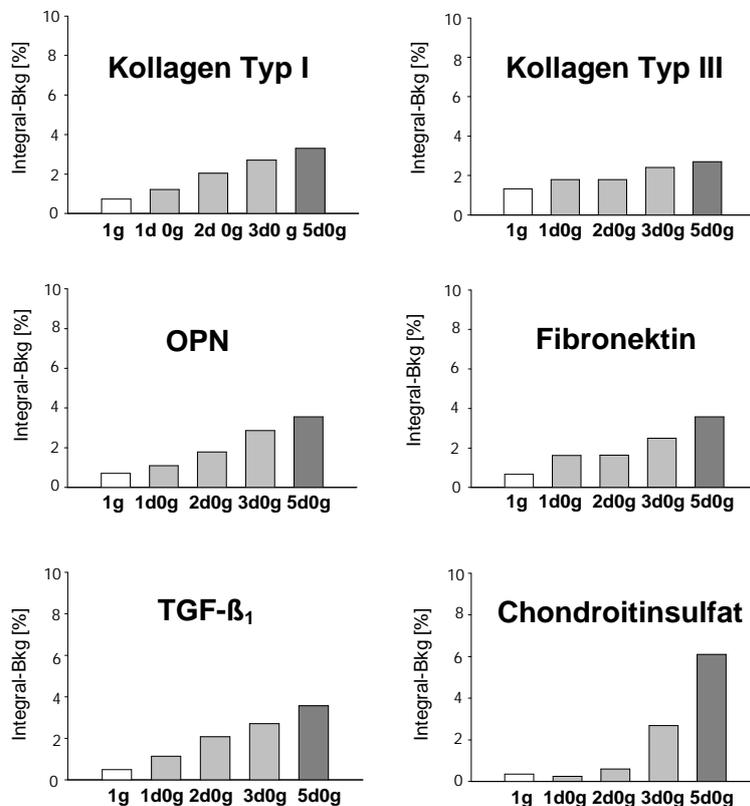
Im Zeitverlauf bis 120 h wurde der Gehalt an EZM-Proteinen mittels Westernblotanalyse gemessen. Es zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg von Kollagen Typ I und III, Osteopontin, Fibronektin, und Chondroitinsulfat. Weiterhin ließ sich auch ein Anstieg des Proteins für Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 nachweisen (Abb. 18 A).

Die immunhistochemische Untersuchung der Zelladhäsionsmoleküle Laminin und Fibronektin zeigte, dass ONCO-DG1 Zellen unter Normalbedingungen bei 1 g kaum Laminin und Fibronektin sezernieren. Nach 48 h sind beide EZM-Proteine bei Zellen, die im Klinostaten gezüchtet wurden, zu 100 % nachweisbar (Abb. 18 D, F).

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Laminin ergab für ONCO-DG1 Zellen, die für 120 h bei 0 g gezüchtet wurden, eine Verdopplung Laminin-positiver Zellen (Abb. 18 G).

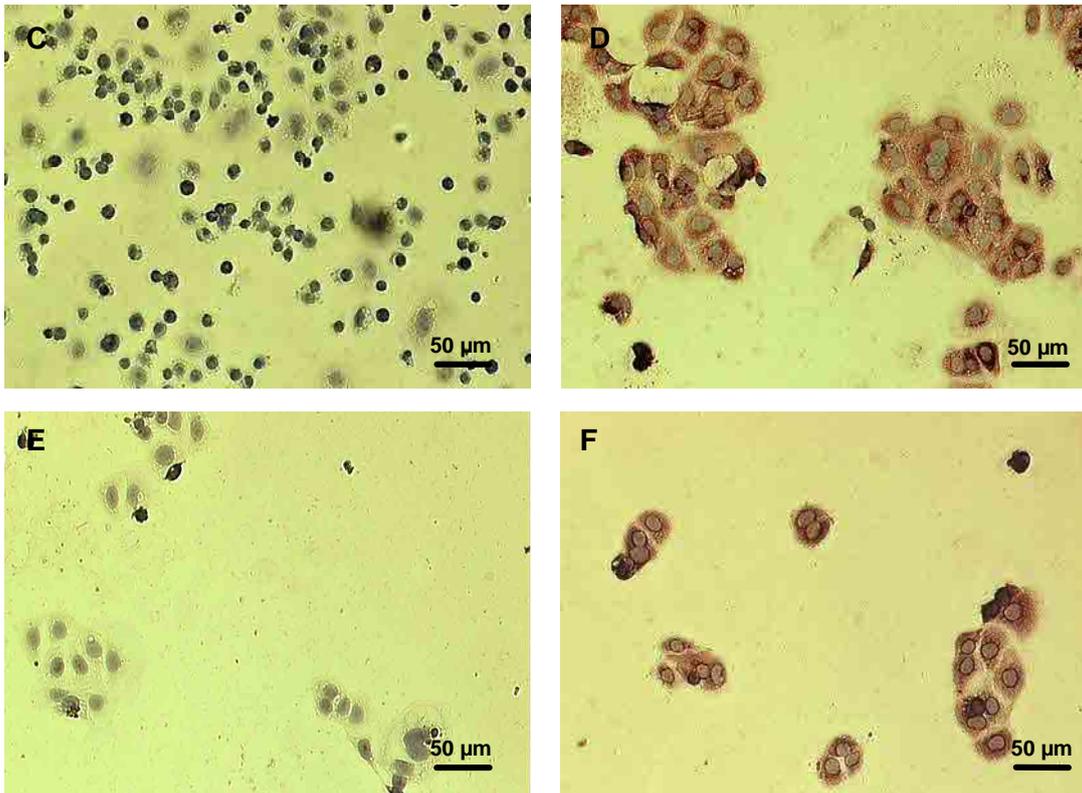


A

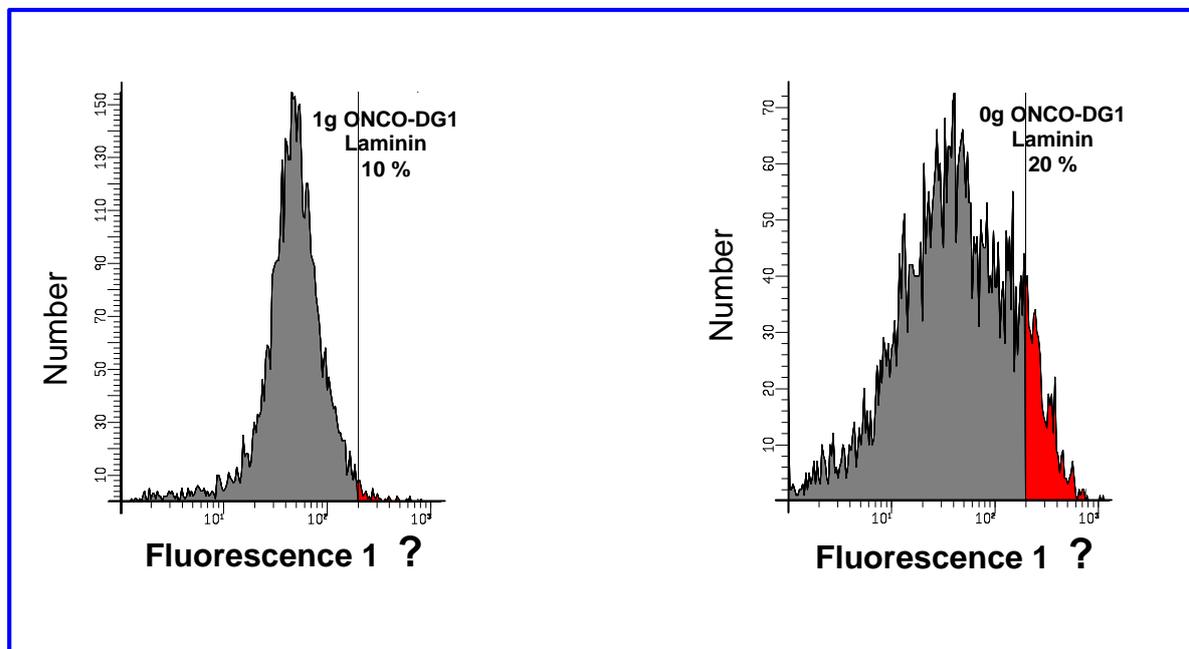


B

**Abb. 18 Extrazelluläre Matrixproteine von ONCO-DG 1 Zellen:** A und B: Veränderungen der EZM-Proteine und TGF- $\beta_1$  von ONCO-DG1-Zellen im Langzeitversuch über 5 Tage. Die Densitometrie zeigt eine zeitabhängige Mehrbildung von Kollagen Typ I und III, OPN, Fibronektin, TGF- $\beta_1$  und Chondroitinsulfat.



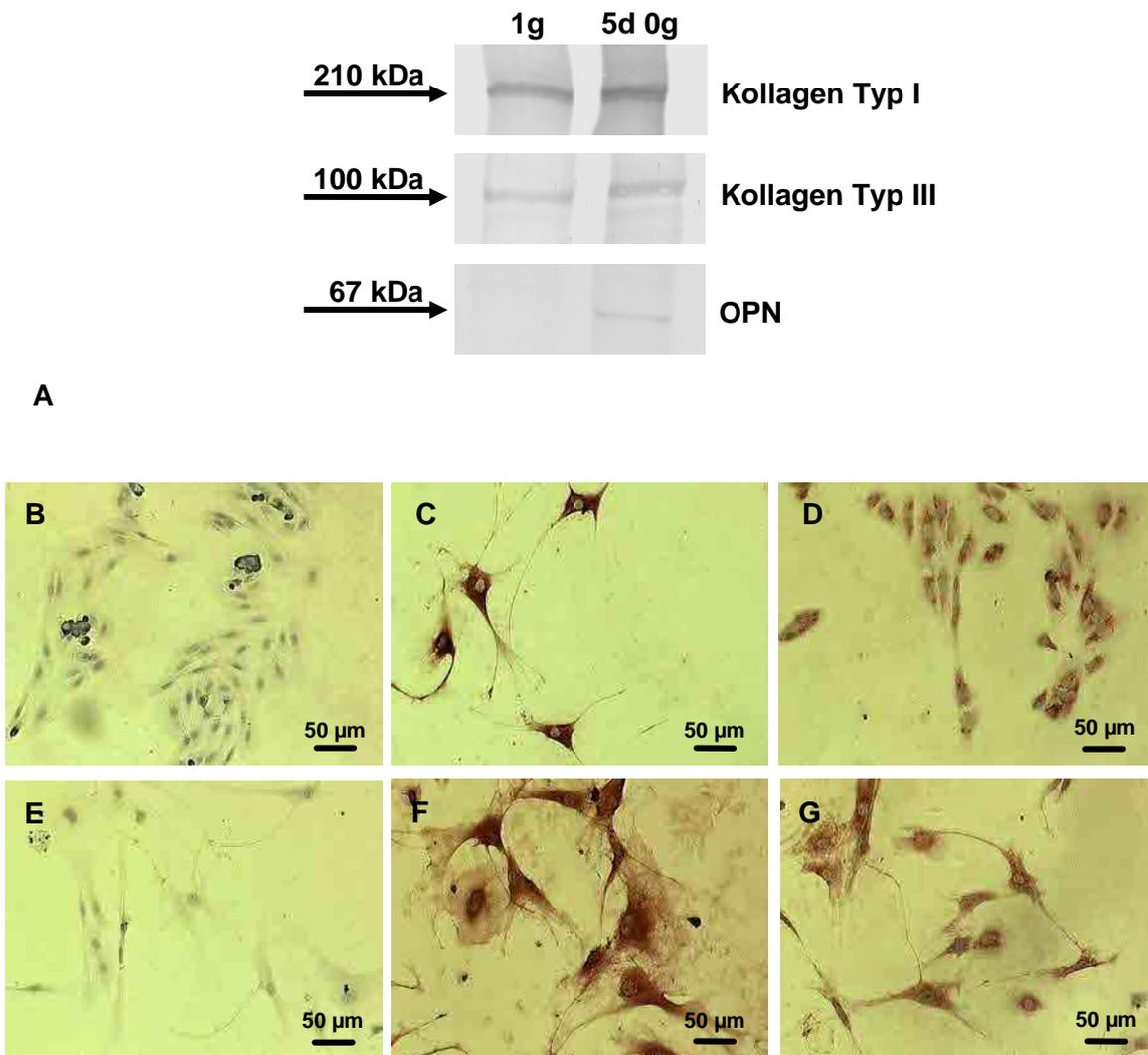
**Abb. 18 C bis F:** Indirekte Immunoperoxidase-Färbung von Laminin. A: BK. B: 48 h 0 g. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg von Laminin-Protein unter 0 g. E und F: Indirekte Immunoperoxidase-Färbung von Fibronectin. E: BK, F: 48 h 0 g. Alle Zellen sind fibronectin-positiv.



**Abb. 18 G:** Durchflusszytometrische Untersuchung von 15.000 Einzelzellen. Nach 5 Tagen Klinorotation zeigt sich ein klarer Anstieg Laminin-positiver Zellen (20 %) im Vergleich zu Bodenkontrollzellen (10 %).

### 5.3.3 Die HTU-5 Zelllinie

Kultiviert man normale HTU-5-Zellen für 120 h bei simulierter Schwerelosigkeit, so findet sich ein starker Anstieg für Kollagen Typ I und III. Daneben kommt es auch zu einer Erhöhung von Osteopontin (Abb. 19 A). Bereits nach 24 h sezernieren alle HTU-5-Zellen Laminin und Fibronectin (Abb. 19 B-G).



**Abb. 19 Extrazelluläre Matrixproteine von HTU-5 Zellen:** A: Westernblotanalyse von HTU-5-Zellen. Hier ist ein deutlicher Anstieg von Kollagen Typ I und III sowie OPN nach 5 Tagen Zellkultur unter 0 g im Vergleich zu 1 g zu messen. B bis D: Indirekte Immunoperoxidase-Reaktion von Laminin: B: HTU-5 BK ohne Nachweis von Laminin. C: 24 h 0g. D: 48 h 0 g: Alle HTU-5 Zellen weisen eine Positivität für Laminin-Protein auf. E bis G: Indirekte Immunoperoxidase-Reaktion von Fibronectin. E: HTU-5 Zellen 1 g. F bis G: 24 h und 48 h 0 g: alle Zellen sind nun Fibronectin-positiv.

## 5.4 Apoptose und simulierte Schwerelosigkeit

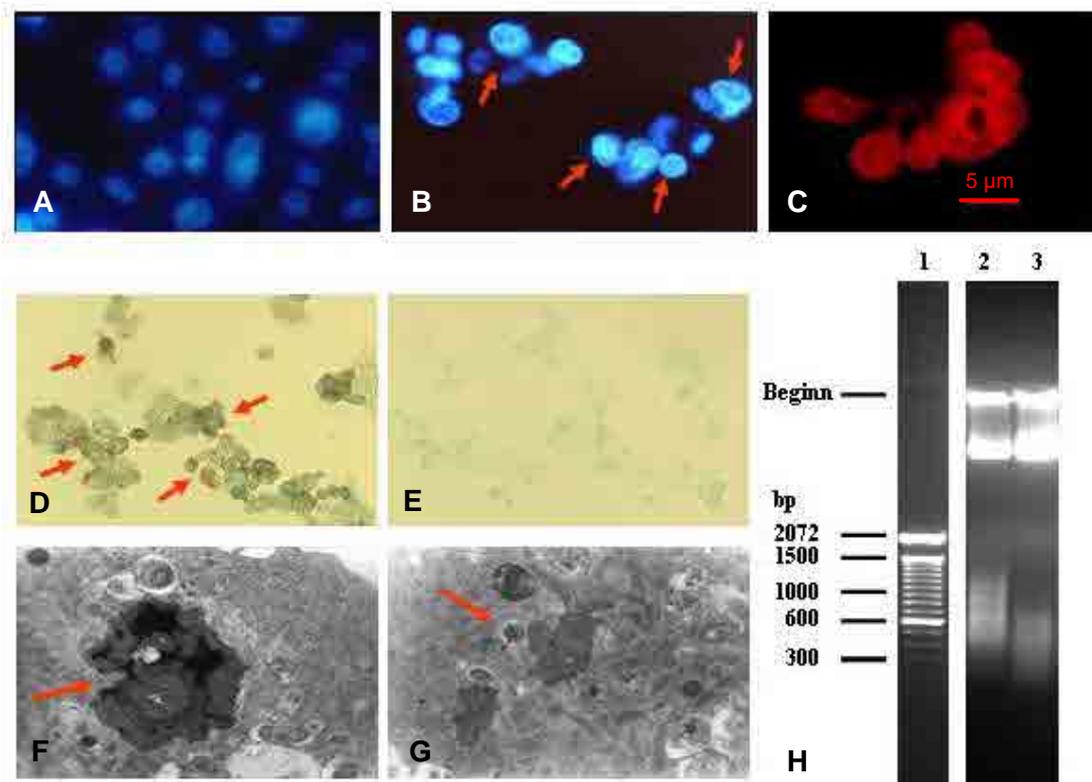
### 5.4.1 ML-1 Zelllinie

Klinorotation führt bei ML-1 Zelllinien zum programmierten Zelltod. Es wurden vermehrt apoptotische ML-1 Zellen, die unter Bedingungen von 0 g gezüchtet wurden, nachgewiesen. Das Auftreten des programmierten Zelltodes wurde mittels verschiedener Techniken anhand der ML-1 Zelllinie bewiesen. Es ließen sich TUNEL-positive und DAPI-positive ML-1 Zellen nachweisen. Elektronenmikroskopisch fanden sich alle Charakteristika für Apoptose. Mittels DNA-Laddering konnte eine Fragmentierung der DNA gezeigt werden (Abb. 20).

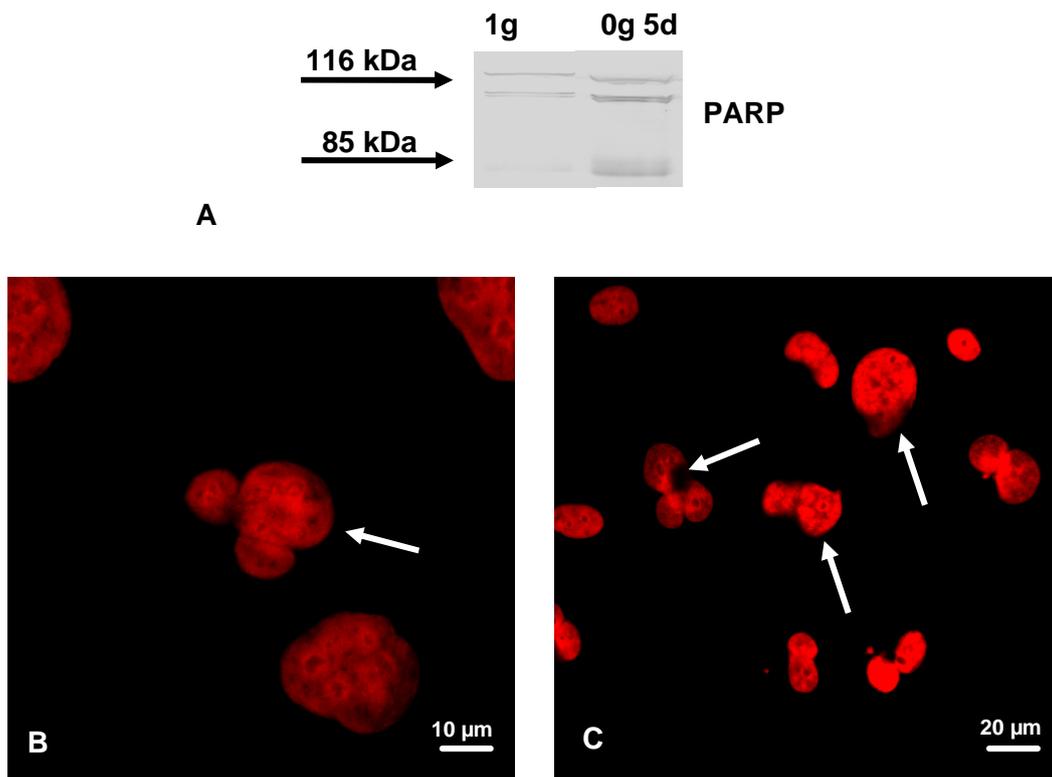
Mittels Westernblotanalyse konnte eine deutliche Erhöhung für PARP nachgewiesen werden (Abb. 21 A). Das 85 kDa Spaltprodukt von PARP, das bei Apoptosevorgängen entsteht, konnte bei allen unter Schwerelosigkeit kultivierten Zellen vermehrt nachgewiesen werden. Besonders ausgeprägt war die Spaltung von PARP nach 120 h Kultur bei 0 g.

Die normale Expression von Fas Protein liegt bei ML-1 Zellen bei 2 %. Nach 24 h und 72 h Kultivierung der Zellen in Schwerelosigkeit steigt der Anteil Fas-positiver Zellen auf 20 % bzw. 15 % (Abb. 22).

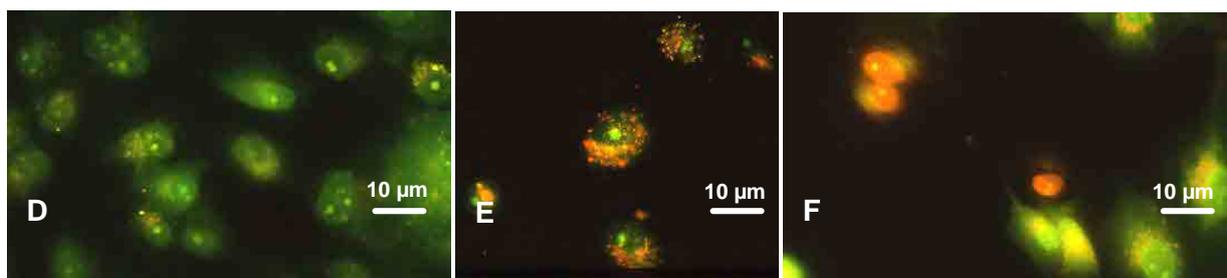
Die basale Expression von p53 liegt bei 1,5 %. Der Anteil der p53-positiven Zellen, die unter Bedingungen von 0 g gezüchtet wurden, betrug nach 24 h 19 % und nach 72 h 25 %. Normalerweise ist die ML-1 Zelllinie zu 18 % positiv für Bcl-2. Nach 24 h Kultivierung der Zellen im Klinostaten sinkt dieser Wert auf 8,1 % und nach 72 h beträgt er nur noch 5,9 % (Abb. 22).



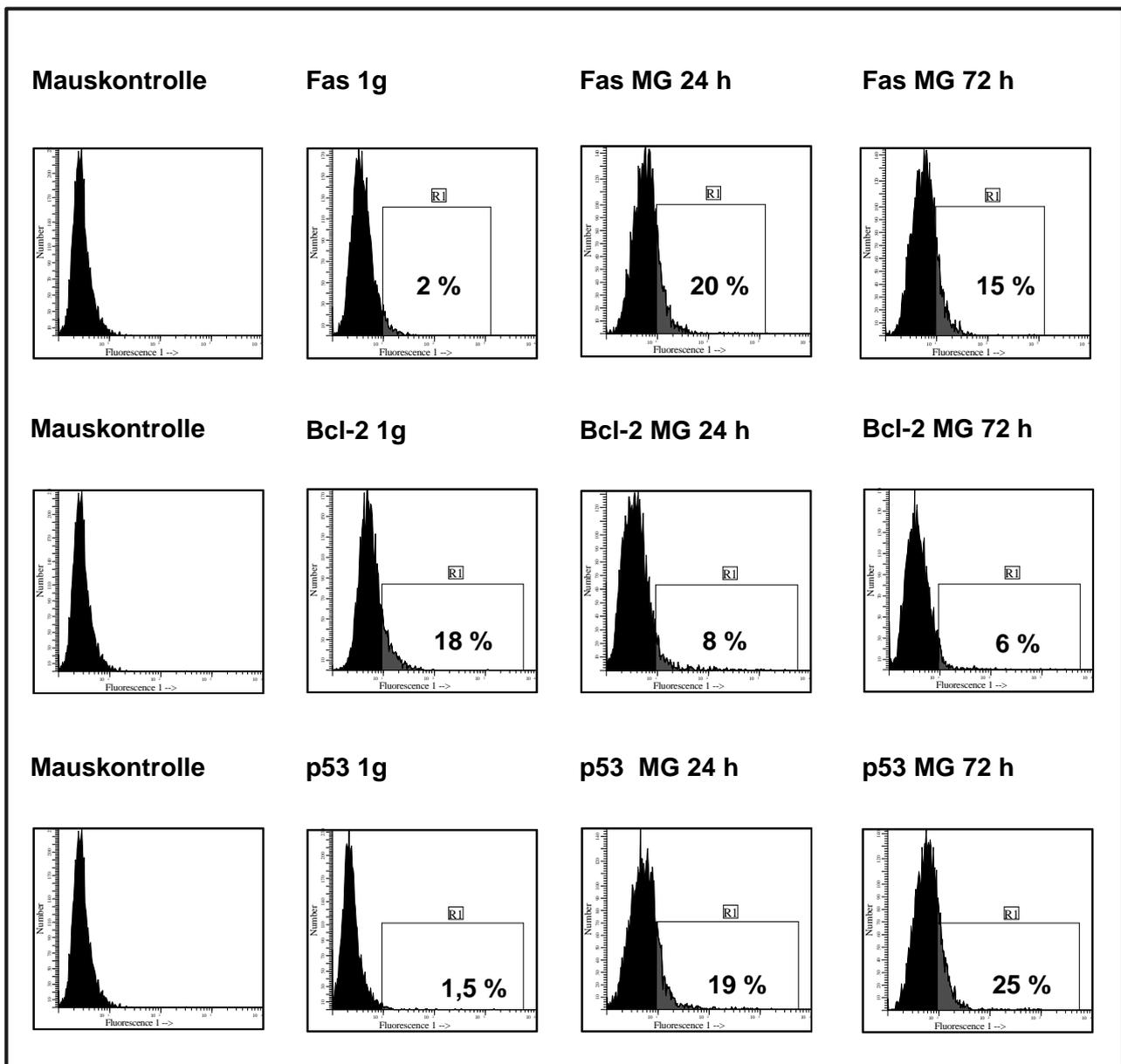
**Abb. 20: Nachweis von Apoptose in ML-1 Zellen:** Die Abbildungen zeigen die charakteristischen Merkmale der Apoptose wie Chromatinkondensation (B), Membraneinstülpungen (B), Apoptosekörperchen, Pfeil (C und G), DNA-Bruchstücke, Pfeile (D und H) sowie eine fingerförmige Kerneinstülpung, Pfeil (F). A: ML-1 BK, DAPI-Färbung. B: ML-1, 24h 0 g, die Pfeile zeigen apoptotische Kerne, DAPI-Färbung. C: Apoptosekörperchen von ML-1, 24 h 0 g, PI-Färbung. D: ML-1, 24h 0 g.TUNEL-Färbung, die Pfeile zeigen apoptotische Kerne. E: ML-1 BK, TUNEL-Färbung. F und G: ML-1 Elektronenmikroskopie, Vergrößerung x 10 000. H: Agarosegelelektrophorese von isolierter ML-1 DNA, nach 24h 0 g (2. Linie), nach 72h 0 g (Linie 3); (Grimm et al., 2002).



**Abb. 21 Nachweis von Apoptose:** A: Westernblotanalyse von PARP für ML-1. Nach 5 Tagen zeigt sich ein deutlicher Anstieg für PARP und für das 85 kDa Spaltungsfragment. B und C: PI-Färbung von ML-1 Zellen. Nach 24 h 0 g und 48 h 0 g zeigen sich Apoptosekörperchen und Chromatinkondensationen sowie Kernmembraneinstülpungen als typische Zeichen für Apoptose (Pfeile).



**Abb. 21 D bis F:** Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung: D: 1 g Kontrollzellen sind undurchlässig für den Farbstoff (= grüne Fluoreszenz). E: 0 g Zellen sind nach 24 h 0 g bereits durchlässig (orange-rote Fluoreszenz). F: nach 48 h 0 g sind tote Zellen zu erkennen.

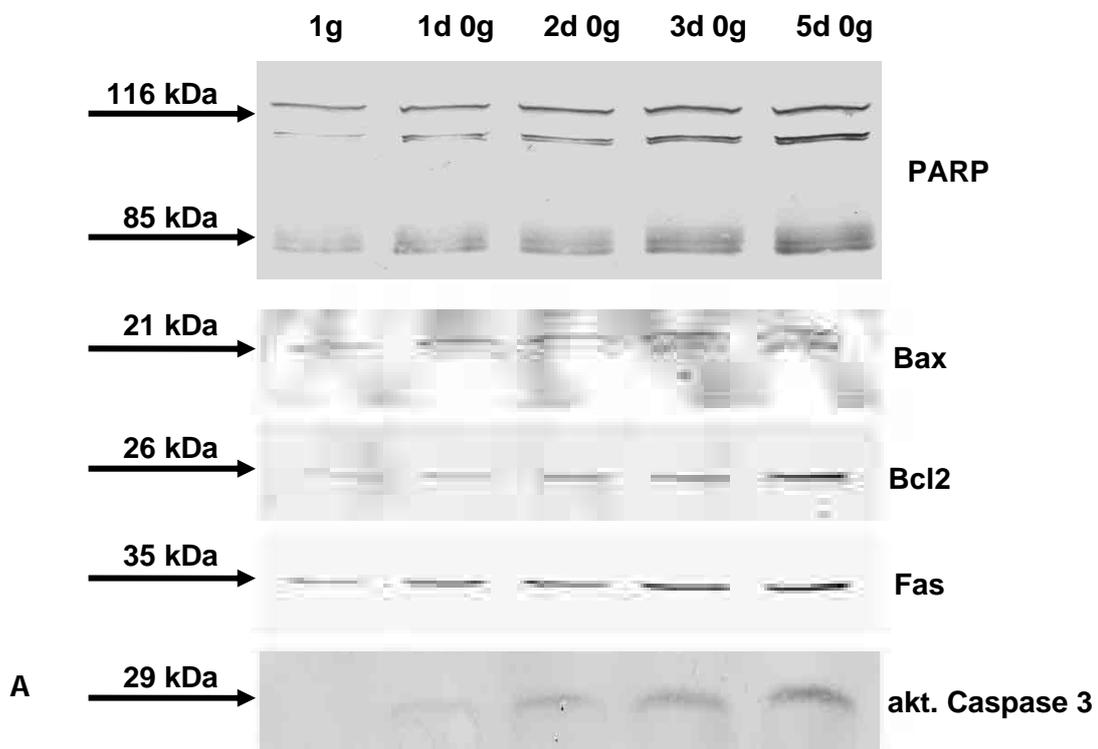


**Abb. 22: Durchflusszytometrische Analyse von Apoptoseparametern: Fas/Apo-1 und p53 steigen unter 0 g an, während sich die Menge an bcl-2 reduziert im Vergleich zu 1 g BK-Zellen (Grimm et al., 2002).**

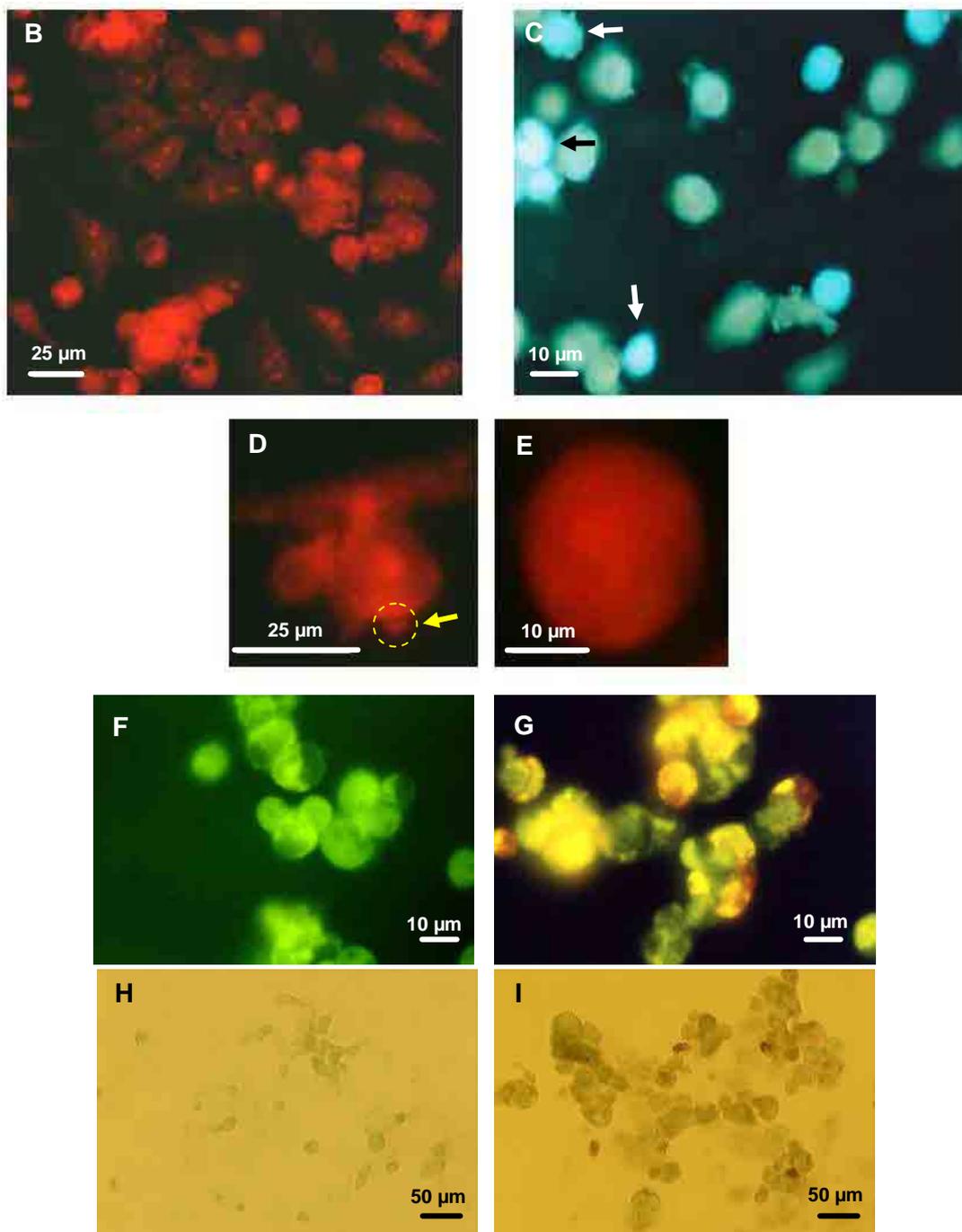
#### 5.4.2 ONCO-DG 1 Zelllinie

Auch hier zeigt sich ein zeitabhängiger deutlicher Anstieg von aktivierter Caspase 3, Bax, p53 und Fas. Ähnlich steigt auch PARP und sein 85 kDa Spaltprodukt im Zeitverlauf an (Abb. 23 A). Bcl-2 steigt nach 72 h bis zu 120 h stetig an, während es in der Frühphase abfällt (Abb. 23 A und 24).

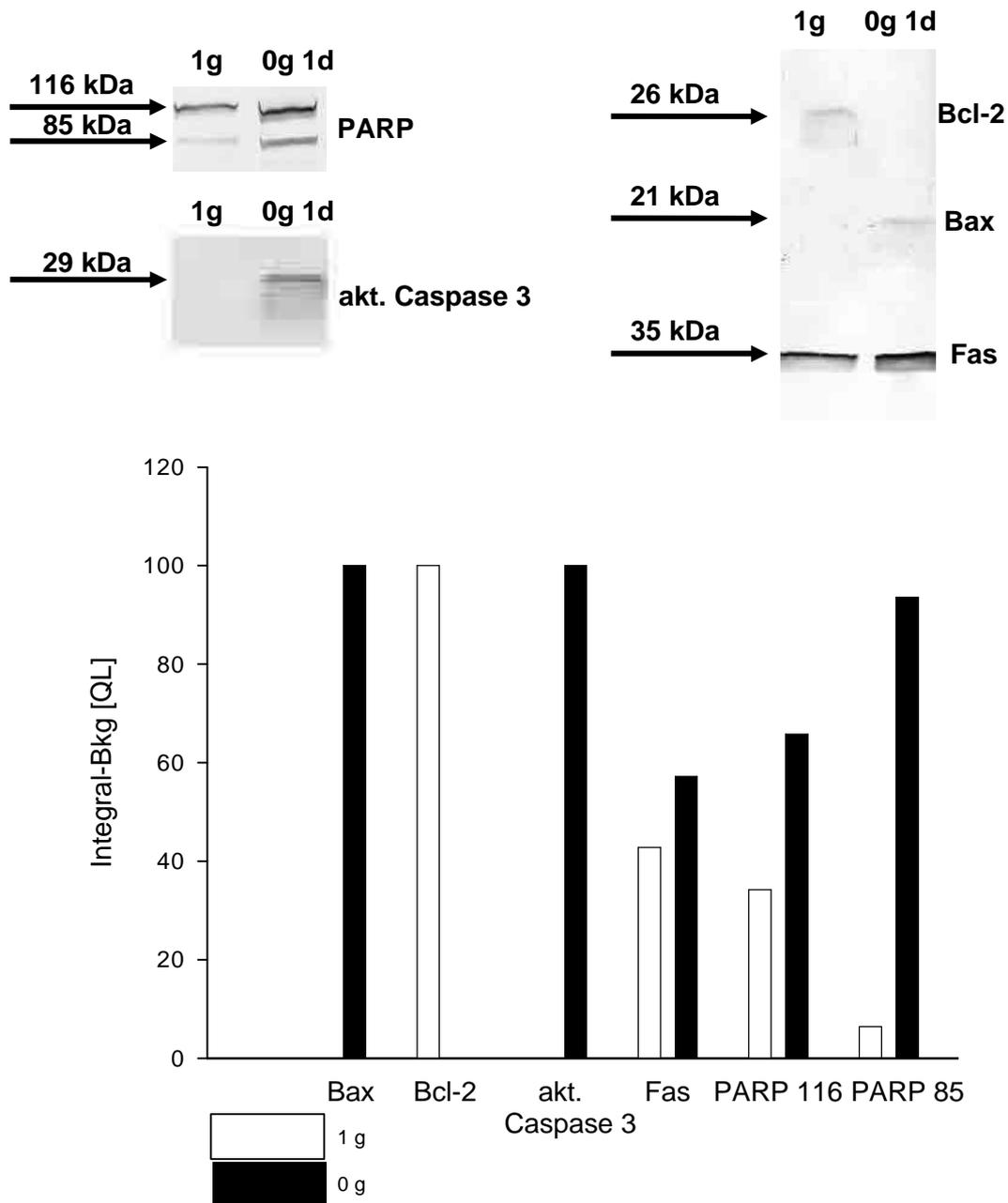
In einem Kurzzeitexperiment über 30 min wurde geprüft, ob Apoptose schon nach sehr kurzer Zeit nachzuweisen ist. Bereits nach 30 min zeigten sich apoptotische Zellen, was mittels Propidiumjodid- und DAPI-Färbung nachzuweisen wurde. Deutlich sind Membraneinstülpungen nach 30 min bei 0g im Vergleich zu Bodenkontrollzellen sichtbar (Abb. 23 D). Die Acridinorange-Ethidiumbromid Färbung zeigte nach 24 h deutlich positive Zellen mit Chromatinkondensation (Phase II) und auch bereits tote Zellen (Phase III). Auch hier wurde das Auftreten von Apoptose nach 24 h mit zahlreichen Methoden bewiesen. (Kossmehl et al., 2003).



**Abb. 23 Nachweis von Apoptose bei ONCO-DG1 Zellen:** A: Westernblotanalyse zum Nachweis von PARP, Bax, Bcl2, Fas und akt. Caspase 3 im Zeitverlauf über 5 Tage. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg aller Apoptosemarker, einschließlich der Vermehrung des 85-kDa Spaltungsfragments von PARP im Vergleich zu 1 g BK-Zellen.



**Abb. 23** B: PI-Färbung (B) und DAPI (C) belegen bereits nach 30 min das Auftreten von Apoptose bei ONCO-DG1 Zellen. D: Ausstülpungen der Kernmembran sind im Vergleich zu BK-Zellen (E) nachweisbar. F: Nach 24 h 1 g sind die BK-Zellen vital (AOEB-Färbung). G: Nach 24 h 0 g zeigen sich unter Einschluss von Farbstoff apoptotische Zellen (gelb-orangefluoreszenz). H und I: TUNEL-Färbung von ONCO-DG1-Zellen: H: BK-Zellen ohne apoptotische Kerne. I: 24 h 0g mit zahlreichen TUNEL-positiven Zellkernen als Zeichen für den programmierten Zelltod (Kossmehl et al., 2003).

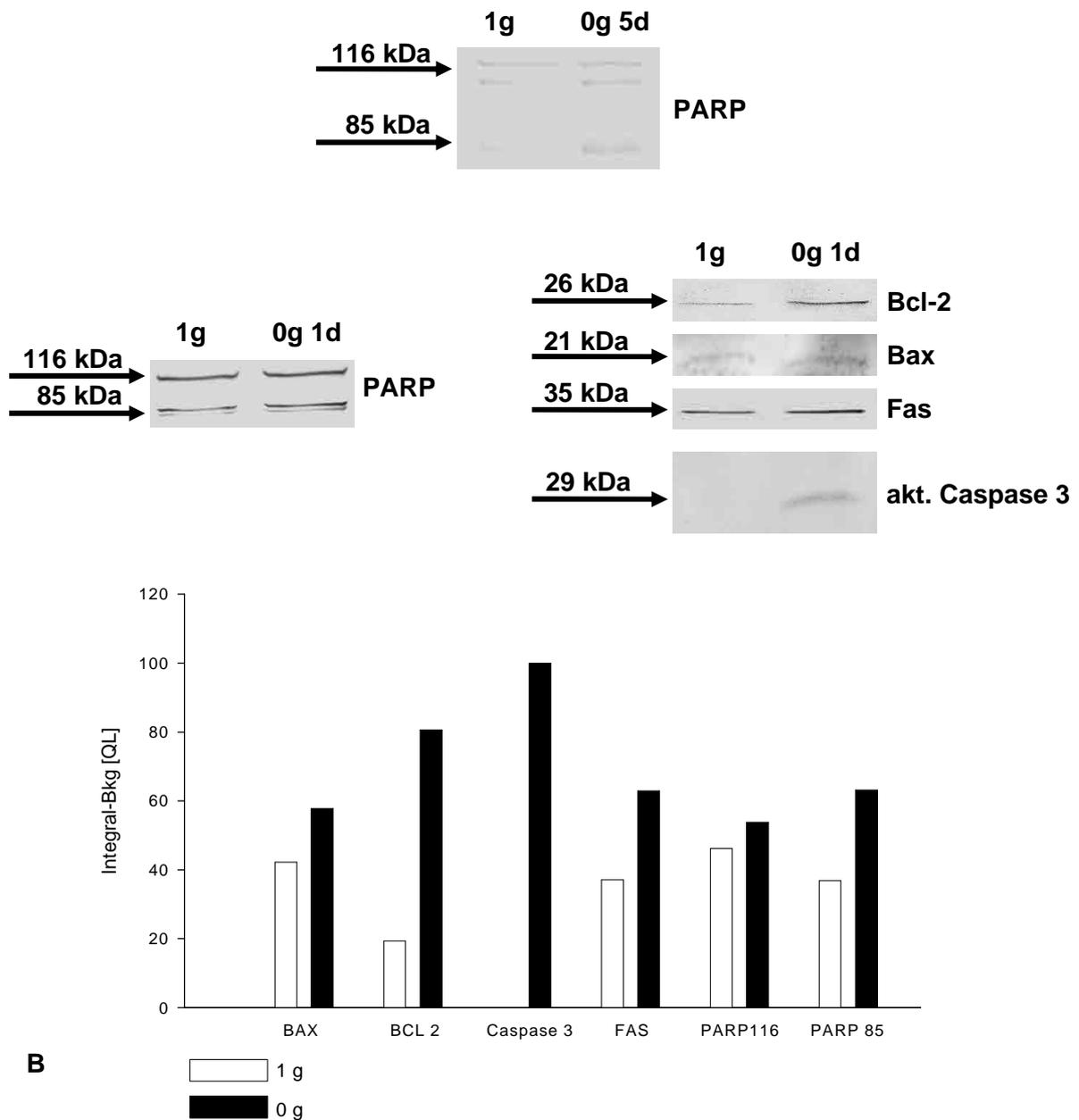


**Abb. 24: Westernblotanalyse von ONCO-DG 1 Zellen:** ONCO-DG1 Zellen nach 24 h 0 g: Es zeigt sich eine vermehrte Spaltung von PARP sowie eine Hochregulation von Bax, Fas, akt. Caspase 3 sowie eine Reduktion von Bcl-2 (Kossmehl et al., 2003).

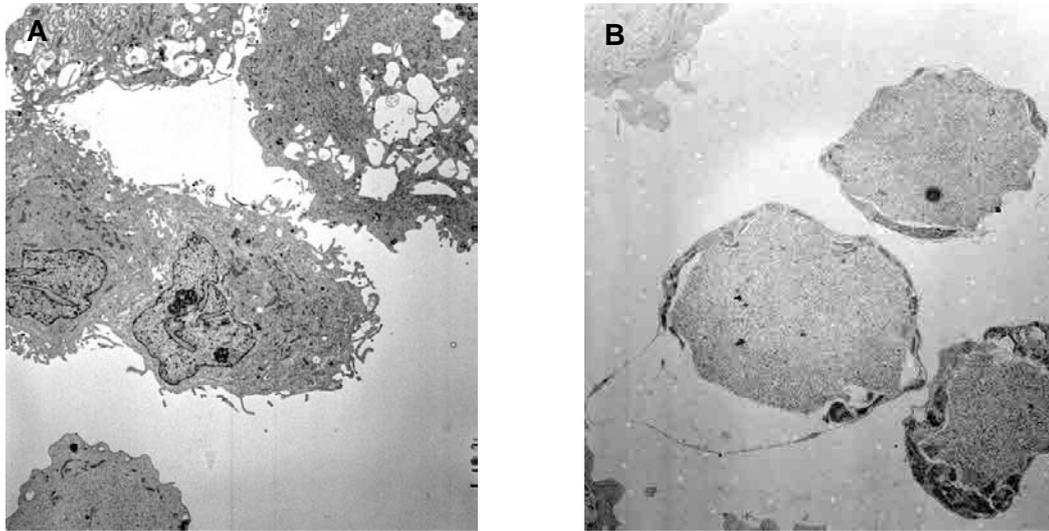
#### 5.4.3 HTU-5-Zelllinie

Wiederum lässt sich nach 24 h Kultivierung von Zellen unter Bedingungen der simulierten Schwerelosigkeit eine Erhöhung von Bax, Fas und aktivierter Caspase 3 nachweisen (Abb. 25). Bcl-2 ist im Gegensatz zu den Schilddrüsentumorzellen deutlich erhöht.

Elektronenmikroskopisch zeigen sich nach 24 h zahlreiche apoptotische HTU-5-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen (Abb. 26).



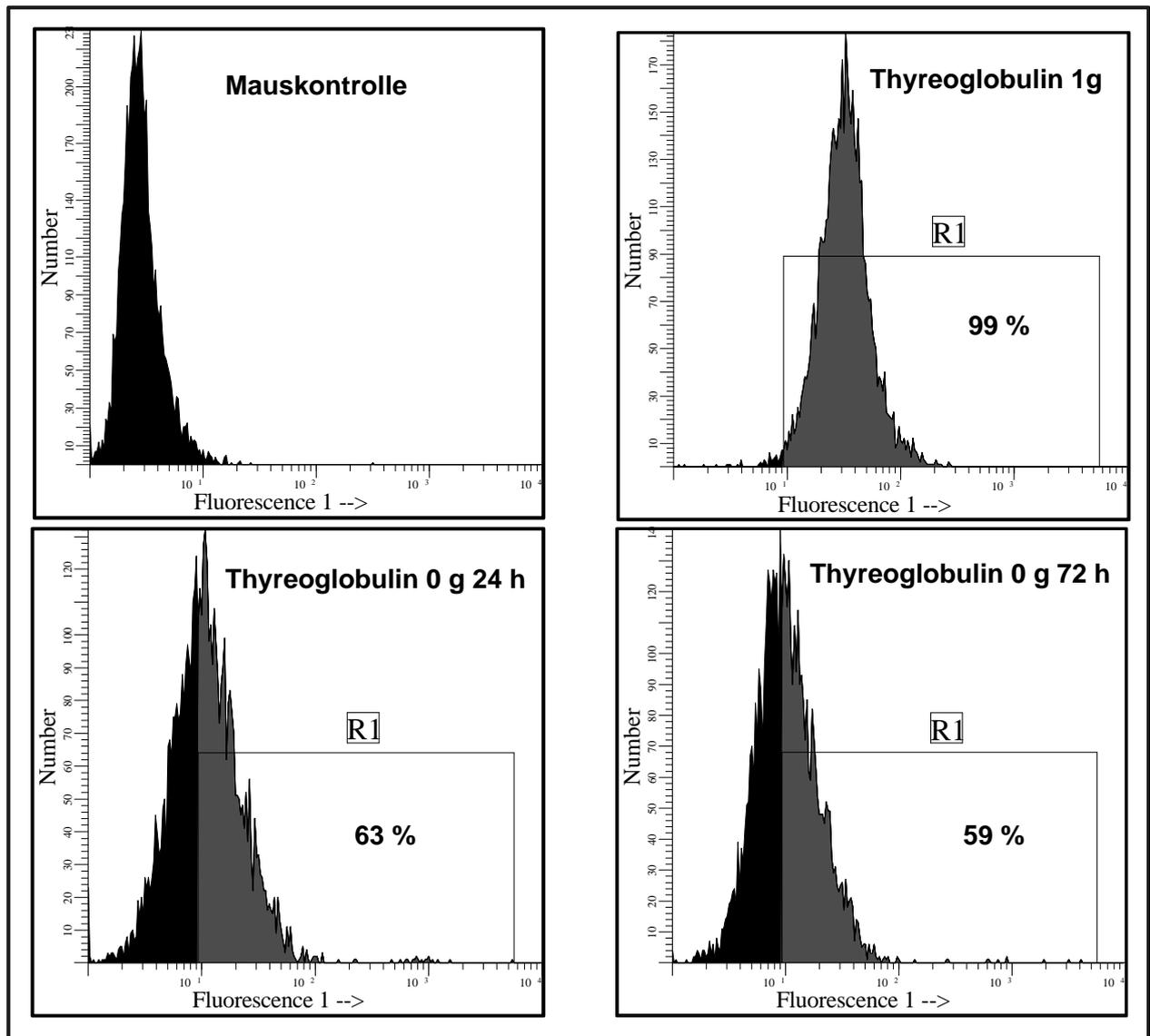
**Abb. 25: Nachweis von Apoptose bei HTU-5 Zellen:** Westernblotanalyse: HTU-5-Zellen im Langzeitversuch (A) nach 5 Tagen zeigt sich eine vermehrte Spaltung von PARP unter 0 g. B: 24 h Versuch; bei 0 g kommt es zu einer Hochregulation von Bcl2, Bax, Fas, akt. Caspase 3 sowie PARP (Kossmehl et al., 2003).



**Abb. 26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HTU-5-Zellen:** A: HTU-5 BK-Zellen und B: HTU-5-Zellen, die 24 h unter 0 g gezüchtet wurden. Es finden sich zahlreiche apoptotische Zellen mit Chromatinkondensation und Membraneinstülpungen, Vergrößerung x 10 000.

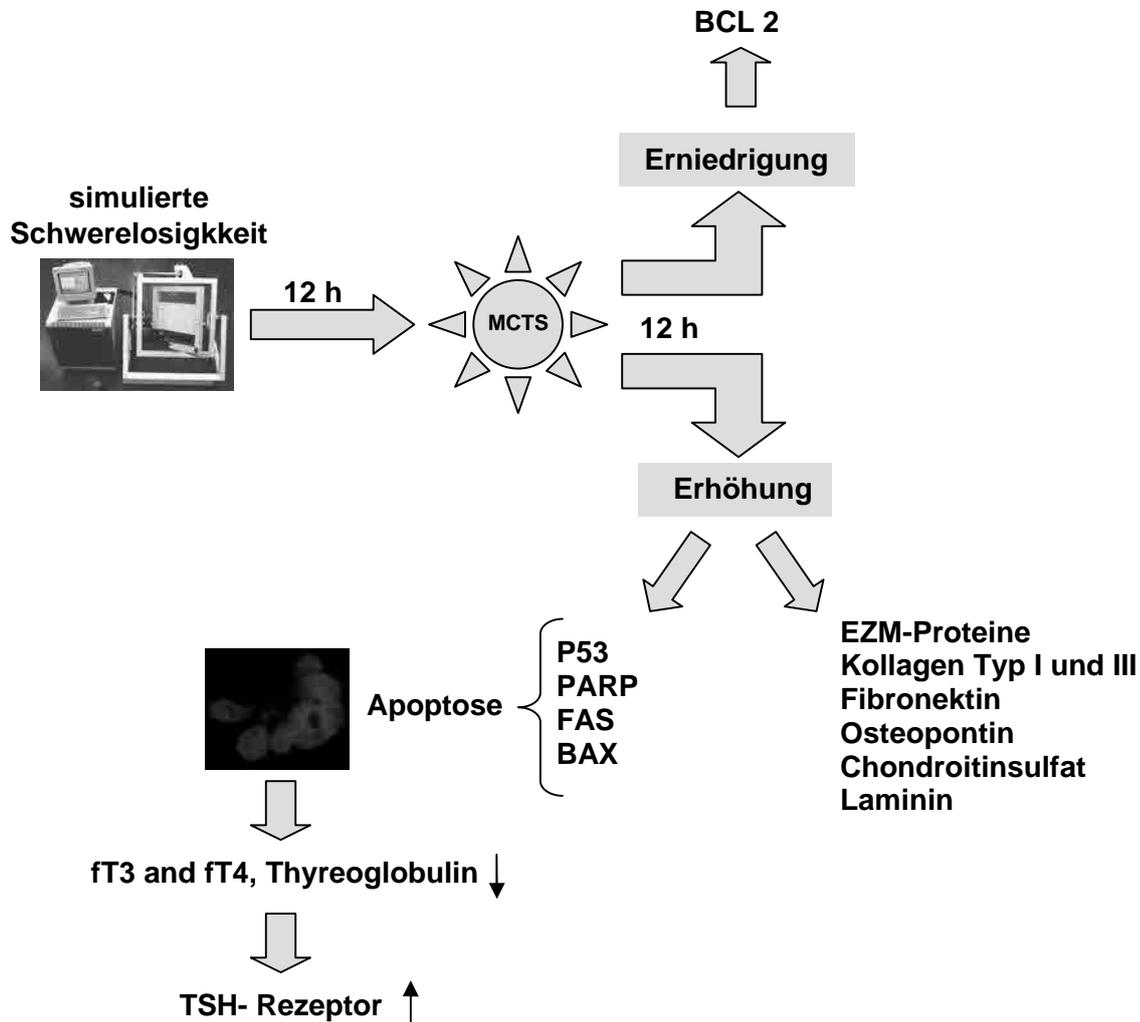
## 5.5 Thyreoglobulin

Die ML-1 Zelllinie ist zu 100 % Thyreoglobulin-positiv und ist dadurch charakterisiert, dass sie Schilddrüsenhormone *in vitro* bildet (fT3 und fT4) (Schönberger et al., 2000, Grimm et al., 2002). Unter Mikrogravitationsbedingungen kommt es nach 24 h zu einer Erniedrigung des Anteils Thyreoglobulin-positiver Zellen. Nach 24 h sind nur noch 63 % und nach 72 h noch 59 % positive Zellen, mittels Durchflusszytometrie ermittelt, nachweisbar (Abb. 27).



**Abb. 27: Durchflusszytometrische Untersuchung von ML-1: Thyreoglobulin-Nachweis.** 0 g führt zu einem klaren Abfall der Thyreoglobulin-Positivität der ML-1 Zellen (Grimm et al., 2002).

## 5.6 Auswirkungen der simulierten Schwerelosigkeit



**Abb. 28: Hypothese:** Die schematische Darstellung zeigt die Hypothese über den Einfluss der simulierten Schwerelosigkeit auf menschliche folliculäre Schilddrüsenkarzinomzellen (ML-1). Nach 12 h simulierter Schwerelosigkeit kommt es zur Bildung von multizellulären Tumorsphäroiden (MCTS). Nach weiteren 12 h simulierter Schwerelosigkeit lassen sich die morphologischen und molekularbiologischen Zeichen der Apoptose nachweisen. Simulierte Schwerelosigkeit induziert die Effektoren der Apoptose und erniedrigt die Expression von apoptose-hemmenden Faktoren. Die Folge ist die reduzierte Bildung von freiem T3 und T4 sowie Thyreoglobulin, die mit einem konsekutiven Anstieg vom TSH-Rezeptor einhergeht (Grimm et al., 2002).