

6 Diskussion

Das vorrangige Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Effekte von simulierter Schwerelosigkeit mittels Klinorotation auf humane Schilddrüsenzellen zu untersuchen.

Unter Schwerelosigkeit sedimentieren Zellen nicht. Sie werden also weder Gravitationskräften, noch durch eventuelles Aufrühren verursachten Zentrifugalkräften (wie sie bei der Spinner-Flask-Methode auftreten) ausgesetzt, die sie in unnatürlicher Weise aneinander stoßen lassen. Außerdem wirken keine Scherkräfte, die natürliche Zell-Zell-Interaktionen verhindern oder verzögern können. Nur im Weltraum werden die bei der Sphäroidbildung nötigen Zell-Zell-Interaktionen allein durch Kräfte verursacht, welche auf den genetisch vorgegebenen und aktuell exprimierten Oberflächenkomponenten und Oberflächenstrukturen der Zellen basieren. Sie werden kaum durch unphysiologische Stoß- und Scherkräfte beeinflusst. Dies lässt erwarten, dass die Zell-Zell-Interaktion unter Schwerelosigkeit *in vitro* ähnlich der natürlichen Situation in einem Organ oder Organismus *in vivo* abläuft und deshalb die resultierenden Sphäroide in anschließenden molekular- und zellbiologischen, klinischen oder pharmakologischen Tests noch sehr viel treffender *in vivo* Situationen widerspiegeln, als normale, unter Laborbedingungen kultivierte Sphäroide.

Zukünftig könnten Tierversuche eingespart werden, wenn beispielsweise die Wirkung eines neuen Pharmakons untersucht wird. Darüber hinaus lassen sich aussagekräftige *in vitro* Tumorstudien z.B. bezüglich ihrer Hormonausschüttung durchführen. Ihre Etablierung kann für die Anzucht von Sphäroiden anderer Tumorarten wegweisend sein und erscheint auf lange Sicht hilfreich, um neue therapeutische Ansätze für die Bekämpfung unterschiedlicher Malignome zu finden.

Da es sich bei diesen Versuchen um die ersten in dieser Art mit Schilddrüsenzellen handelte, war das primäre Ziel eine grundsätzliche Charakterisierung der Effekte simulierter Schwerelosigkeit durch Klinorotation auf diese Zellen. Aufgrund vorhergehender Literaturrecherche wurde dabei besonderes Augenmerk auf die Aspekte Sphäroidbildung, extrazelluläre Matrix (EZM), Apoptose, Morphologie und das Zytoskelett gerichtet. Es stellte sich die Frage, ob sich aufgrund der Ergebnisse neue Erklärungsansätze für die Auswirkungen von Aufhalten im Weltraum finden lassen.

6.1 Tumorzellen und Schwerelosigkeit

Vor mehr als 12 Jahren wurden die ersten flugtauglichen Weltraumbioreaktoren konstruiert (Gmunder et al., 1988). Seit dieser Zeit wurden schon bei einer erheblichen Anzahl von Missionen Zellkulturen mitgeführt und während des bzw. nach dem Flug analysiert, ob

zelluläre Eigenschaften sich in der Schwerelosigkeit veränderten. Zunächst richtete sich das Interesse auf nicht adhärente immunkompetente Zellen. Man versuchte zu lernen, wie Gravitation die Funktion von Lymphozyten beeinflusst (Pippia et al., 1996, Cogoli-Greuter et al., 1996). Erst vor ungefähr zehn Jahren begann man, auch Einzelzellsuspensionen aus Gewebszellen oder davon abgeleiteten Zelllinien auf Weltraumflügen mitzunehmen. Die Untersuchungen, die entweder bereits während der Mission oder nach der Landung durchgeführt wurden, verfolgten zwei Ziele. Man wollte erstens wissen, wie die kosmische Strahlung Gewebszellen schädigt und ob es Möglichkeiten gibt, die Schäden zu verhindern bzw. zu minimieren (Meli et al., 1998). Zweitens bestand ein Interesse daran, ob Schwerelosigkeit Einfluss auf die Expression von Genen hat (Stein et al., 1999; Ohnishi et al., 2000). Die bisher bedeutendsten Ergebnisse wurden erzielt, als während der STS-90 und STS-86 Flüge Ratten-Nierenzellen als dreidimensionale Kulturen für jeweils 6 Tage inkubiert, dann fixiert und nach der Landung hinsichtlich ihrer intrazellulären mRNA Zusammensetzung analysiert wurden. Dabei wurde festgestellt, dass während der sechstägigen Inkubation im Space Shuttle im Vergleich zu Laborkontrollkulturen mehr als 1600 Gene in ihrer Expression gehemmt bzw. stimuliert wurden (Hammond et al., 2000). Diese Dissertation untersucht zum ersten Mal das Verhalten von Schilddrüsenzellen unter simulierter Schwerelosigkeit. Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass es bereits nach 12 Stunden zur Bildung von Multizellulären Sphäroiden kommt (Grimm et al., 2002, Kossmehl et al., 2003).

6.2 Dreidimensionale multizelluläre Tumorsphäroide

In vivo sind Gewebszellen in dreidimensionale Strukturen eingebunden. Um *in vitro* eine ähnliche Situation zu schaffen, wurde die Technik der Kultivierung von multizellulären (Tumor-) Sphäroiden entwickelt (Sutherland, 1988). In diesem Verfahren werden aus Einzelzellen verschiedener Tumore dreidimensionale Zellaggregate herangezüchtet (Sutherland et al., 1986; Bauer et al., 1992; Nicolai et al., 1994; Grimm et al., 1995; Knuechel et al., 1996). Dafür stehen aktuell zwei verschiedene Methoden zur Verfügung:

1. Zellsuspensionen werden auf nicht adhäsiven Oberflächen, z.B. auf Agarose, inkubiert (Liquid-overlayer-Technik) (Yuhas et al., 1977).
2. Zellsuspensionen werden in so genannten "Spinner flasks" inkubiert, welche mit einem magnetischen Rührsystem ausgestattet sind, damit durch permanentes Rühren des Mediums die Zellen in Schwebelage gehalten werden können (Mueller-Klieser, 1984).

Das erste Verfahren hat den Nachteil, dass Sedimentationskräfte großen Einfluss auf die Zell-Zell-Interaktionen haben. Das zweite Verfahren ist problematisch, da beim Rühren der

Inkubationsflüssigkeit relativ hohe Scherkräfte entstehen, welche Zell-Zell-Interaktionen verhindern oder verzögern. Aus diesen Gründen ist man seit längerer Zeit daran interessiert, die Zellen in Schwerelosigkeit zu inkubieren, damit sie sich langsam und ohne Einwirkung nicht biologischer Kräfte zu dreidimensionalen Aggregaten zusammensetzen. Bisher wurde Sphäroidbildung unter Bedingungen studiert, die Schwerelosigkeit (0 g) mit Hilfe verschiedener Geräte in Laboratorien simulieren (Ingram et al., 1997; Yoffe et al., 1999; Hedlund et al., 1999; Khaoustov et al., 1999; Battle et al., 1999). Die erzielten Ergebnisse waren so vielversprechend, dass weitere Untersuchungen mit dem Ziel der Sphäroidkultivierung im Weltraum wünschenswert erscheinen.

Beim derzeitigen Stand der Technologie bieten Sphäroide mit konzentrischen Zelllagen bereits die Möglichkeit, *in vitro* Fragen zu studieren, die sich auf die Diffusion von Luft, Nährstoffen, Proteinen (Antikörper) etc. durch das dreidimensionale Gewebe beziehen (Gorlach et al. 1994). Wenn nun nach weiterem Studium der für die Sphäroidbildung verantwortlichen Genprodukte, welche zurzeit noch nicht identifiziert sind, Sphäroide zur Verfügung gestellt werden können, deren dreidimensionaler Zellaufbau dem Ursprungstumor (oder Organ) ähnlich ist, werden *in vitro* Studien möglich, aus denen noch zutreffendere Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation gezogen werden können. Dies wird sicherlich dazu führen, dass weitere Tierversuche eingespart und einfachere, billigere, schnellere, aber trotzdem biologisch und medizinisch relevante Tests an isolierten Zellen durchgeführt werden können.

Diese dreidimensionalen Aggregate empfinden die Verhältnisse, die in Mikrotumoren *in vivo* vorliegen, viel eher nach als zweidimensionale Monolayerkulturen der gleichen Zellen. Dies ist auf die Effekte von Zell-Zell-Kontakt, Zell-Matrix-Kontakt und den radialen Gradienten von Sauerstoff, Metaboliten und Nährstoffen begründet, die hier vorherrschen.

ML-1 und ONCO-DG 1 Zellen haben schon in der Vergangenheit gezeigt, dass sie in der Lage sind, mit herkömmlichen Techniken MCTS zu bilden (Grimm et al., 1992, Schönberger et al., 2000). Beide Zelllinien bilden bereits nach 12 Stunden Kultivierung in simulierter Schwerelosigkeit multizelluläre Sphäroide (Grimm et al., 2002; Kossmehl et al., 2003). Die Fähigkeit, MCTS zu bilden, ist unter Tumorzellen und Fibroblasten weit verbreitet (Ingram et al., 1997).

Wir konnten zeigen, dass alle verwendeten Zelllinien MCTS bilden, wenn sie auf dem Klinostaten kultiviert werden. Dies bedeutet zunächst einmal, dass die Kultivierung unter simulierter Schwerelosigkeit eine neue Möglichkeit darstellt, dreidimensionale Zellaggregate zu produzieren. Es bleibt zu erforschen, wie sich diese Zellaggregate bei Langzeitkultivierung unter Schwerelosigkeit entwickeln. Es gibt Hinweise darauf, dass Zellen, die unter simulierter Schwerelosigkeit gezüchtet werden, sich umdifferenzieren, d.h. wieder

morphologische und funktionelle Eigenschaften ihrer Ursprungsgewebe annehmen. Dies bewiesen Khaoustov et al., 1999 und Yoffe et al., 1999 für Leberzellen. Diese wuchsen zu bis zu 3 cm großen Aggregaten heran und bildeten die für die Leber spezifischen Gallenkanälchen aus. Ähnliches stellten auch Martin et al., 2000 bei Schilddrüsenzellen fest. Hier wird von schilddrüsenähnlichen Strukturen mit Follikeln und auch von aktiver Sekretion berichtet. Auch Tumorzellen zeigen, wenn sie unter solchen Bedingungen wachsen, eine Tendenz zur Differenzierung, deren Grad abhängig von ihrem Ursprungsgewebe und ihrem Entartungsgrad ist (Ingram et al., 1997). Möglicherweise ließen sich hier auch Zellen zu dreidimensionalem Wachstum anregen, die mit den herkömmlichen Methoden nicht dazu in der Lage sind. Der Vorteil dieser Methode ist das Nichtvorhandensein einwirkender Sedimentations- und Scherkräfte. Bei der Spinner-Flask-Technik werden die Zellen oft nicht unerheblichen Scherkräften ausgesetzt, da die Sedimentation der Zellen hier nur durch ständiges Aufrühren des Mediums verhindert wird. Die Liquid-Overlay-Methode hat den Nachteil, dass die Zellen ständig den Schwerkraften ausgesetzt sind, sodass die Zellen im Sphäroid verschiedenen Druckzuständen standhalten müssen. Außerdem wachsen diese Zellaggregate häufig nicht zu runden Sphäroiden heran, sondern bilden vielmehr abgeflachte Halbkugeln. Werden die Zellen auf dem dreidimensionalen Klinostaten (Random Positioning Machine, RPM) kultiviert, so schweben sie frei von jeglichen Schwer- oder Scherkräften im Medium. Dies gewährleistet, dass die Zelladhäsion zwischen den Zellen, die zur Bildung der Sphäroide nötig ist, vor allem durch die Kräfte zustande kommt, die von den auf der Zelloberfläche exprimierten biochemischen Komponenten ausgehen.

Die Tatsache, dass Zellen unter simulierter Mikrogravitation MCTS bilden, wurde bereits bei Versuchen mit verschiedenen Zellen in einem sogenannten HARV (high aspect ratio vessel) NASA rotary Zellkultursystem demonstriert (Khaoustov et al., 1999, Yoffe et al., 1999, Martin et al., 2000). Die Simulation der Schwerelosigkeit wird hier auf einem anderen Weg erreicht. Beide Methoden erzeugen einen permanenten Schwebезustand der Zellen im Medium und verhindern so Scher- und Sedimentationskräfte.

6.3 Veränderungen des Zytoskeletts der Schilddrüsenzellen unter simulierter Schwerelosigkeit

Unter simulierter Schwerelosigkeit wurde ein Anstieg von Vimentin festgestellt. Hierbei handelt es sich um ein Intermediärfilament des Zytoskeletts. Die Funktionen des Zytoskeletts im Zusammenhang mit Apoptose sind noch nicht völlig geklärt. Grundsätzlich ist anzunehmen, dass eine Stabilisation antiapoptotisch wirkt und eine Zerstörung Apoptose begünstigt oder sogar auslösen kann (Matylevich, 1991, Martin, 1990).

Vimentin spielt bei den oben genannten Vorgängen häufig eine eigene Rolle. So wird ihm eine Beteiligung an der metastatischen Transformation verschiedener Tumore (Chen et al., 1996), der Zellbeweglichkeit (Eckes et al., 1998) und der Apoptose (Belichenko et al., 2001) zugesprochen. Chen et al., haben 1996 in einer Studie bewiesen, dass die erhöhte Expression von Vimentin die Wahrscheinlichkeit für eine Metastasierung von Tumorzellen steigert. Eckes et al., zeigten 1998, dass die Zellen, die von Mäuseembryos mit Vimentinmangel gewonnen wurden, im Vergleich zu normalen Zellen eine geringere Beweglichkeit und Festigkeit aufwiesen. Während der Apoptose wird Vimentin normalerweise durch die Caspasen 3 und 8 gespalten und in Fragmente zerlegt. Modifiziert man Vimentin, sodass es nicht mehr als Substrat für Caspase 3 und 8 dienen kann, so wird Apoptose reduziert oder verhindert (Belichenko et al., 2001). Dies bedeutet, dass dieses modifizierte Vimentin nicht nur nicht gespalten wurde, sondern auch weitere Apoptoseschritte verhindert hat. Die Mechanismen hierfür sind noch nicht genau geklärt. Die Verbindung von Vimentin mit dem Zellkern scheint während der Apoptose eine Rolle zu spielen, da Vimentinfragmentation mit der Kernfragmentation zusammenfällt (Dinsdale et al., 2004).

Schwerelosigkeit löst Veränderungen im Zytoskelett aus. Dies ist zu erwarten, ruft man sich nochmals ins Gedächtnis, dass das Zytoskelett als Sensor jedes mechanischen Stresses, also auch der Gravitation angesehen wird. Die Veränderungen in der Vimentinmenge, die in diesen Versuchen gefunden wurden, stehen in einer Reihe mit Veränderungen des Zytoskeletts aus anderen Experimenten. So wurden Abweichungen in der Vimentinstruktur bei Versuchen mit Jurkatzellen bei Parabelflügen gefunden (Sciola et al., 1999). Weiterhin wird von Unregelmäßigkeiten der Aktinfilamente von Osteoblasten, die unter simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden (Hughes-Fulford et al., 1996), und von Mikrotubuli bei Weltraumexperimenten mit Jurkatzellen berichtet (Lewis et al., 1998, 2001). Carlsson et al., die 2003 finden eine Ausdünnung der Mikrofilamente und gehen davon aus, dass dies ein Weg der Zelle ist, überflüssige Fasern zu vermeiden. Überflüssig wohl in dem Sinne, dass ohne Schwerkraft weniger Fasern benötigt werden, um Zellorganellen und die gesamte Zelle in Form zu halten, ein ähnliches Prinzip also, das dem Auf- und Abbau und der Strukturierung unserer Knochen zugrunde liegt.

An ONCO-DG 1 Karzinomzellen ließen sich bereits nach 30 min Veränderungen an den intermediären Filamenten Vimentin und Zytokeratin nachweisen. Mikrotubuli (Alpha-Tubulin) erschienen verklumpt und verloren ihre radiale Anordnung. Nach 48 h kam es zu einer Reorganisation des Zytoskeletts bei papillären Schilddrüsenkarzinomzellen. Analoge Resultate erhielten Uva et al. (2002) nach der Kultivierung von Gliazellen unter simulierter Schwerelosigkeit.

6.4 Rolle der Extrazellulärmatrix bei Tumoren

Gewebszellen sind eingebettet in extrazelluläre Matrix (EZM). Deren proteinäre Hauptbestandteile sind verschiedene reichlich glykolysierte Typen von Kollagen, Laminin und Fibronectin. Im gesunden Gewebe unterliegt die EZM einem exakt kontrollierten Ablauf von Neusynthese und proteolytischem Abbau (Blobel, 2000). Dieser EZM-Metabolismus erlaubt der Zelle trotz Einbindung in ein Stützgewebe mit ihrer Umgebung zu kommunizieren und so im Gewebsverbund zu leben. Transformation einer gesunden Zelle zu einer Krebszelle hat in der Regel eine Störung des EZM-Metabolismus zur Folge. Ähnlich haben auch Entzündungsvorgänge, die zur Einwanderung von proteaseabgebenden Phagozyten führen, dysregulierende Effekte auf den EZM-Haushalt. Schon die geringsten Veränderungen in Quantität und/oder Aktivitäten einer Protease wie der Matrix Metalloproteinase kann folgenschwere Auswirkung auf die Kommunikation der Zellen im Gewebsverbund haben. Ein erhöhter Abbau der EZM führt zu Inaktivierung wichtiger Rezeptoren der Zell-Zell-Interaktion und damit zum Zerfall des Gewebes, was oft eine Metastasierung zur Folge hat (Coussens et al., 2000; Taipale et al., 1998). Verzögerter Abbau führt zur EZM Überproduktion und Fibrose mit Gewebsverhärtung und Zerstörung der natürlichen Zell-Zell-Interaktionen (Grimm et al., 1998).

Wenn Tumorzellen sich bereits im Gefäßsystem befinden und dort an bestimmten Stellen mit den Gefäßwänden in Kontakt kommen, können sie mit Hilfe ihrer EZM abbauenden Proteasen die Gefäßwand durchlässig machen, und über die Gefäßwand ins Gewebe eindringen, und dort neue Metastasen bilden (Crowe et al., 1999).

Die exakten Mechanismen des EZM-Haushaltes in gesunden und malignen Organismen werden immer noch wenig verstanden. Die Forschungsarbeiten der letzten Jahre haben aber gezeigt, dass multizelluläre Sphäroide gute Modelle sind, um derartige komplexe Vorgänge zu studieren (Santini et al., 2000).

Es zeigte sich unter Bedingungen von 0 g ein Anstieg sämtlicher untersuchter EZM-Proteine. Dieser Anstieg lässt sich durchgehend bei allen Zelllinien feststellen und wurde sowohl im Westernblot als auch in der Durchflusszytometrie aufgezeigt. Der höchste Anstieg ist bei den MCTS gemessen worden. Aus früheren Untersuchungen und der Literatur ist bekannt, dass MCTS eine größere Menge an EZM-Proteinen produzieren, als Monolayerkulturen der gleichen Zellen. Zum Beispiel haben Nedermann et al. schon 1984 gezeigt, dass die MCTS der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie Hth-7, gewonnen aus einem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom, viel mehr EZM, bestehend aus Fibronectin, Laminin, Kollagen und Glykosaminoglykanen, exprimierten als Monolayerkulturen der gleichen Zellen. Außerdem wurden auch Vergleiche angestellt zwischen der Menge und Zusammensetzung der EZM

von *in vivo* Tumoren, gezüchteten MCTS und Monolayerkulturen. Es zeigte sich, dass sowohl bei Gliom-Sphäroiden (Nederman et al., 1984, Paulus et al., 1994) als auch bei Osteosarkom- und Melanomsphäroiden die Organisation der EZM in MCTS viel näher an den *in vivo* gefundenen Verhältnissen ist. Neben der Erhöhung der EZM in den MCTS zeigte sich aber, dass auch bei Einzelzellen, die simulierter Schwerelosigkeit ausgesetzt waren, diese Proteine in höherer Menge vorkamen. Aufgrund dieser Tatsache kann man davon ausgehen, dass dies eine Reaktion auf die Schwerelosigkeit ist. Die zugrunde liegenden Ursachen und Mechanismen müssen noch weiter erforscht werden. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Reaktion um einen Versuch der Zelle, sich an die neuen „Umstände“ anzupassen. Dies scheint sinnvoll geht man davon aus, dass eine höhere Menge EZM eine Möglichkeit der Zelle darstellt ihre Überlebenschancen zu erhöhen (Rozzo, 1997, Aoshiba, 1997, Scott, 1997, Fukai, 1998). Dies könnte ein Mechanismus sein, der Apoptose entgegenzuwirken, die verstärkt bei klinorierten Zellen gefunden wurde. Man kann das als eine Anpassungsmaßnahme der Zellen an die veränderten Umweltbedingungen ansehen. Eine Veränderung einzelner EZM-Proteine ist an mehreren Stellen in der Literatur zu finden. So hat man bei der Kultivierung von Rattenosteoklasten im Rotating Wall Vessel, einem bereits am Anfang erwähnten weiteren Gerät zur Simulation von Schwerelosigkeit, eine vermehrte Expression von Osteopontin gefunden (Rucci et al., 2002). Bei Kollagenen wurde eine verminderte Produktion unter Schwerelosigkeit bei Knochengewebe gefunden (Cavolina et al., 1997).

6.5 Thyreoglobulin und Schwerelosigkeit

In der Durchflusszytometrie von 15.000 Zellen erwiesen sich 99 % der ML-1 Inkubator kontrollzellen und Bodenkontrollzellen als Thyreoglobulin-positiv, das heißt sie akkumulierten dieses Protein intrazellulär. Unter dem Einfluss von Schwerelosigkeit sank dieser Wert auf 63 % nach 24 Stunden, beziehungsweise 59 % nach 72 Stunden. Thyreoglobulin stellt die Speicherform und den Syntheseort der Schilddrüsenhormone dar. Es wird wie alle Proteine in der Zelle produziert, aber unter physiologischen Umständen in den Follikeln der Schilddrüse gelagert, bis Schilddrüsenhormone benötigt werden. Es wird dann wieder in die Zelle aufgenommen, und die Schilddrüsenhormone werden durch seinen Abbau in Lysosomen freigesetzt. Es kann hier als Differenzierungsmarker angesehen werden, da seine Produktion ausschließlich in Schilddrüsenzellen stattfindet. Die Abnahme der Konzentration an Thyreoglobulin in der Zelle kann allerdings auch andere Ursachen haben. Eine Erklärung hierfür könnte in der gleichzeitigen Akkumulation von p53 liegen, das die Proteinsynthese in den Zellen stoppt. Somit könnte auch die Thyreoglobulinsynthese

zum Stillstand gekommen sein, was die erniedrigten Werte in klinorotierten Zellen erklären könnte.

Veränderte Plasmaspiegel von T3, T4 und TSH wurden sowohl bei Menschen als auch Tieren nach Aufenthalt im Weltraum gemessen (Strollo, 1999, Gunga, 1994), was bedeutet, dass Schwerelosigkeit direkt oder indirekt Auswirkungen auf die Schilddrüsenfunktion hat. Allerdings ist noch nicht völlig geklärt, worauf diese Veränderungen im Plasmahormonspiegel beruhen. Einige Autoren machen erhöhte Cortisolspiegel (Leach et al., 1977) verantwortlich, andere eine verminderte Aktivität der Jodthyronin-5-Deiodinase, die verantwortlich ist für die Umwandlung von T4 zu T3 (Leach et al., 1977). Sollte die Reaktion der Schilddrüsenzellen auf Schwerelosigkeit *in vivo* denen unter simulierter Schwerelosigkeit *in vitro* ähneln, ergibt sich die weitere Möglichkeit, die bei längeren Weltraumaufenthalten gefundene Hypothyreose durch die stattfindende Apoptose zu erklären.

Die Proben waren vor dem Beginn des Experiments nicht unwesentlichem Stress ausgesetzt, da sie vom Labor in Berlin in das Labor in Zürich transportiert werden mussten. Hier lässt sich hinterfragen, ob nicht einige der Effekte durch diesen Stress induziert worden sind, statt durch die Kultivierung auf dem Klinostaten. Um dies auszuschließen, wurden alle Proben gleichbehandelt und Inkubatorkontrollen und Bodenkontrollen parallel während des Experiments gezüchtet. Außerdem wurden Vergleiche mit in Berlin verbliebenen Zellen angestellt, um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob der Transport weit reichende Veränderungen bezüglich der Eigenschaften der Zellen mit sich bringt. Es fanden sich zwischen den Inkubator- oder Bodenkontrollen und auch mit den Zellen in Berlin keine Unterschiede.

6.6 Apoptose und Malignität

Schon vor langer Zeit wurde erkannt, dass ein ausgewogenes Gleichgewicht von Zellvermehrung, Wachstumsstillstand und Zelltod unbedingte Voraussetzung ist, sowohl für embryonale und postembryonale Entwicklung als auch für die Homöostase eines erwachsenen Organismus. Allerdings konnten erst in den letzten 20 Jahren genetische und biochemische Mechanismen identifiziert werden, die diesem Gleichgewicht zugrunde liegen. Dabei stellte sich heraus, dass das Absterben von Zellen nicht nur im gesunden, sondern auch im tumorösen Gewebe ein wichtiger Vorgang ist. Dies führte zu der Idee, dass ein Tumor dadurch entfernt werden könnte, dass man das Gleichgewicht von Zellvermehrung und Zelltod in Richtung Zelltod verschiebt. Nachdem erkannt wurde, dass Apoptose durch

bestimmte Oncogene, durch Bestrahlung und Hypoxie, durch Chemotherapie und durch immunkompetente Zellen initiiert werden kann, versucht man im Bereich der Onkologie Apoptose von Tumorzellen zu stimulieren. Bei hämatologischen Tumoren war der Erfolg überwältigend. So konnte die Überlebenschance von Kindern, die an akuter lymphoblastischer Leukämie litten, zwischen 1972 und 1999 von 34% auf 75% erhöht werden. Bei Gewebstumoren dagegen griff der Ansatz nicht (Lowe et al., 2000, Makin et al., 2000). Vor allem ein Grund führte zum Scheitern. Wenn Apoptose initiiert wird, entstehen immer wieder Zellen, die ihre biochemische Fähigkeit zur Apoptose verloren haben. Diese bilden dann neue sehr resistente Tumoren. Außerdem wird bei der Apoptose ein Mechanismus in Gang gesetzt, der absterbende Zellen entfernt, ohne dass das Immunsystem durch Zelldebris aktiviert wird. Dieser Vorgang ist im gesunden Organismus sehr wichtig, um chronische Entzündungen zu vermeiden. Bei Malignomen funktioniert dieser Mechanismus nicht mehr, das heißt der Tumor wird vom Wirt toleriert (Melcher et al., 1999). Das Apoptosegeschehen ist heute eines der bedeutendsten Themen der biologisch-medizinischen Forschung. Man will einerseits weiterhin die biologischen Grundlagen der Apoptose genauer kennen lernen und andererseits versucht man trotz der bisherigen Misserfolge die Initiation der Apoptose als Mittel der Krebstherapie weiterzuentwickeln (LaCasse et al., 1998). Gerade bei letzteren Bemühungen spielen multizelluläre Tumorspäroide mit ihrem lebensnäheren Aufbau eine immer bedeutendere Rolle als Testmodelle bei verschiedenen Tumorerkrankungen.

Die Untersuchung der auf dem Klinostat kultivierten Zellen zeigte eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in allen Zelllinien. Vergleiche mit den Kontrollzellen erwiesen eindeutig, dass es sich hierbei um Auswirkungen der Schwerelosigkeit handelt, da bei diesen keine Apoptose entdeckt werden konnte. Neben den positiven Befunden durch die TUNEL-Färbung, die DAPI-Färbung, die Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop, der Vitalfärbung und dem DNA-Laddering ergab die Untersuchung weiterer für die Apoptose bedeutsamer Proteine schlüssige Beweise für ein apoptotisches Geschehen. So waren auch Fas, Bax, Caspase 3, p53 und PARP erhöht, während Bcl-2 bis auf die gutartige HTU-5-Zelllinie vermindert war. Dies alles sind Ergebnisse, die schlüssig für Apoptose sprechen. Diese Fülle von Informationen zur Auswirkung simulierter Schwerelosigkeit auf Schilddrüsenzellen bezüglich Apoptose ist neu.

Zahlreiche Untersuchungen ergaben, dass Apoptose definitiv eine Reaktion von Zellen auf simulierte oder wirkliche Schwerelosigkeit ist (Schatten et al., 2001, Sakar et al., 2000, Cubano et al., 2000, Maccarone et al., 2003, Uva et al., 2002). Es fand sich eine erhöhte Expression von Fas. Dies zeigten vor allem Experimente mit Jurkat Zellen (Cubano et al.,

2000), einer Lymphozytenzelllinie, deren Reaktionen sowohl auf simulierte als auch auf tatsächliche Schwerelosigkeit untersucht wurden. Sie zeigten eine Erhöhung an Fas, eine Veränderung des Zytoskeletts und eine erhöhte Apoptoserate (Lewis et al., 1998, Schatten et al., 2001). Gerade im Bereich von Tumoren und speziell Schilddrüsentumoren ist eine Untersuchung der Reaktion von Fas interessant. Dieser Rezeptor ist im Zusammenhang mit Schilddrüsenerkrankungen gut erforscht (Arscott et al., 1999, Tanimoto et al., 1995). Das Fas/FasL System wird als einer der Abwehrmechanismen des Körpers gegen Tumorzellen angesehen. Zwar wird die Bedeutung, die dieses System bei Schilddrüsentumoren spielt, kontrovers diskutiert (Chappel et al., 1999), doch gibt es Studien, die darauf hinweisen, dass Tumore in der Lage sind, sich dieses System zunutze zu machen, um der Immunantwort des Körpers zu entgehen (Hahne et al., 1996). Eine erhöhte Expression von Fas könnte die Zellen wieder empfänglich für Apoptose machen und damit ein Ziel zur Tumorthherapie bieten. Solche Therapieansätze sind *in vitro* schon erfolgreich durchgeführt worden (Buechner et al., 1997, Mizutani et al., 1997).

Bax, ein weiteres proapoptotisches Protein, war vermehrt in den Zellen zu finden, die simulierter Schwerelosigkeit ausgesetzt waren. Dieses Ergebnis passt zum apoptotischen Geschehen. Auch Nomura et al. fanden 2002 erhöhte Mengen an Bax und p53 im Zusammenhang mit Apoptose bei Versuchen mit der Zelllinie GSA-1 unter veränderten Gravitationsbedingungen.

Eine Akkumulation von p53, wie sie durchgängig in allen Zelllinien stattfand, wurde sowohl in Hautzellen als auch Muskelzellen von Ratten gefunden, die längere Zeit Schwerelosigkeit ausgesetzt waren (Ohnishi et al., 2000, 2001). Möglicherweise sind die erhöhte Expression von Bax und Fas eine Folge des p53 Anstiegs, da p53 in der Lage ist, die Expression dieser Proteine zu induzieren. Neben Apoptose löst p53 auch einen Wachstumsstopp der Zelle aus. Dies könnte der Grund für die in vielen Studien gefundene verringerte Proliferationsrate sein. Ähnliche Veränderungen der Mitochondrien bei ONCO-DG1, die mit der Elektronenmikroskopie gefunden wurden, fanden Schatten et al., 2001. Bei diesem Experiment wurden die Ergebnisse von Jurkat Zellen, die auf einer Weltraummission kultiviert wurden, mit denen von Insektenzellen, die auf einem Klinostaten kultiviert wurden, verglichen. Beide zeigten im Hinblick auf die Veränderungen des Zytoskeletts, der Apoptose und den Veränderungen der Mitochondrien ein einheitliches Bild. Diese Übereinstimmungen mit den in vorliegender Doktorarbeit gefundenen Ergebnissen lassen vermuten, dass diese Reaktion für die meisten Zellen zutrifft und dass die Ergebnisse, die bei Klinostatversuchen erzielt werden, als gute Kontrolle zu den im Weltraum erbrachten dienen können.

Ein weiteres Zeichen für programmierten Zelltod stellt der vermehrte Abbau von 116-kDa PARP zu 85-kDa PARP-Fragmenten unter simulierter Schwerelosigkeit dar. Dieser Effekt trat durchgehend bei allen Zelllinien auf. PARP hat eine Fülle von Aufgaben in der Zelle. So ist es unter anderem verantwortlich für DNA-Reparatur und Erhalt der Integrität des Genoms, Regulierung der Transkription, Regulierung der Replikation und Differenzierung, Regulierung der Organisation des Zytoskeletts und einige andere Aufgaben (Bouchard et al., 2003). PARP zeigt DNA-Schädigungen an, indem es selbst an die Bruchstellen in der DNA bindet und dann in seiner Eigenschaft als Enzym verschiedene Faktoren modifiziert, die dann das Signal weitergeben. Dies kann einerseits über p53 zum Stillstand des Zellzyklus führen, was Zeit für eine Zellreparatur ergibt, kann aber auf demselben Weg auch Apoptose auslösen. Neben der Stabilisierung von p53 kann PARP bei massiven DNA-Schädigungen über AIF (apoptosis-inducing factor) Apoptose induzieren. Man hat herausgefunden, dass die Hemmung von PARP Zellen anfälliger für DNA-schädigende Stoffe macht, wie sie zum Beispiel in der Chemotherapie verwendet werden (Tentori et al., 2002). Die Verstärkung der Effekte von Chemotherapie oder Radiotherapie könnten solche PARP-Hemmer zu einem wirksamen Mittel im Kampf gegen Krebs machen.

In der frühen Phase der Apoptose wird 116 kDa PARP durch die Caspasen 3 und 7 gespalten. Dies hat mehrere Folgen. Zunächst wird die DNA-Reparatur durch PARP selbst gestoppt. Der ATP-Verbrauch intakten PARPs wird gestoppt. Dieses ATP wird zur Apoptose, die ein energieintensiver Prozess ist, benötigt. Anderenfalls würde die Zelle durch Nekrose zugrunde gehen. PARP-Fragmente binden an DNA-Bruchstellen, können sich aber nicht mehr von diesen lösen und verhindern so deren Reparatur durch andere Mechanismen.

PARP löst also Apoptose aus und amplifiziert deren Ablauf in der Anfangsphase. In der vorliegenden Studie stellt sich die Frage, ob PARP selbst eine aktive Rolle in der Induktion der vorgefundenen Apoptose spielt, ob also simulierte Schwerelosigkeit eine DNA-Schädigung verursacht, die PARP aktivieren könnte, oder ob PARP generell an der Reaktion oder der Adaption an veränderte Gravitationsbedingungen beteiligt sein könnte. Diese Theorie wird von einigen Wissenschaftlern vertreten und untersucht (Cesarone et al., 2001, Degan et al., 2001).

Neben den hier aufgeführten und gefundenen Auslösern und Erklärungen für Apoptose gibt es möglicherweise noch andere Wege, wie Schwerelosigkeit diese auslösen kann, da in einer Studie von Rucci et al., 2002, bei der die Zelllinie ROS.SMER#14 im RWV kultiviert wurde, die Zellen zwar apoptotisch wurden, aber weder Bax noch Bcl-2, p53 oder Caspasen verändert waren.

Auch wenn die Literatur fast einstimmig Apoptose als Reaktion auf simulierte Schwerelosigkeit beschreibt, so gibt es auch eine kontroverse Studie. Risin et al. haben

2001 eine Studie publiziert, in der die antiapoptotische Wirkung von Schwerelosigkeit auf Lymphozyten aufgezeigt wird.

HTU-5 und ONCO-DG1 wurden unter anderem auf Caspase 3 untersucht. Diese wurde in ihrer aktiven Form nur in Zellen gefunden, die simulierter Schwerelosigkeit ausgesetzt waren. Die Aktivierung von Caspase 3 kann sowohl über Todesrezeptoren als auch über die Veränderungen an den Mitochondrien ausgelöst werden (Pan et al., 2001). Auch hier könnte ein Auslöser für Apoptose liegen, wenn man davon ausgeht, dass Mitochondrien Zellorganellen sind, die ein größeres spezifisches Gewicht besitzen, als das umliegende Zytoplasma, also durch die veränderten Schwerkraftbedingungen betroffen sein könnten.

6.7 Der Klinostat als Research-Tool

Wie in der Einleitung bemerkt, ist der Klinostat nicht in der Lage, die im Weltraum angetroffene Veränderung der Schwerkraft in allen Aspekten zu simulieren. Wie sinnvoll ist dann aber die Durchführung von Experimenten auf diesem Gerät und wie sind die darauf erbrachten Ergebnisse zu bewerten? Der Klinostat ist in der Lage, die Sedimentations- und Scherkräfte auszuschalten und damit das „Empfinden“ der Zelle für die eigentliche Schwerelosigkeit zu simulieren. Er kann jedoch weder die kosmische Strahlung nachahmen noch die veränderten Diffusionsverhältnisse. Beides sind Faktoren, die eine nicht unwesentliche Rolle spielen. Kosmische Strahlung selbst ist in der Lage, Apoptose und Mutation auszulösen. Wie auch in der Krebstherapie scheinen vor allem proliferierende Zellen besonders strahlungssensitiv zu sein. So haben Del Terra et al., 2003 gezeigt, dass die Schilddrüsenzelllinie FRTL-5 bei Wachstumsstimulation mittels TSH und Bestrahlung mit Apoptose reagiert. Wird die gleiche Zelllinie hingegen ohne TSH kultiviert, was sie in einem ruhenden Zustand lässt, sind bei gleicher Bestrahlung keine Anzeichen für Apoptose zu finden (Del Terra et al., 2003). Auch in anderen Zellen und Organismen wurden Effekte der kosmischen Strahlung beschrieben, so fand man DNS-Brüche, Mutationen, Veränderungen in der Zelldifferenzierung und die vermehrte Expression von p53 (Ohnishi et al., 2001). Es gibt auch Hinweise darauf, dass Zellen, die der Schwerelosigkeit ausgesetzt sind, strahlungsempfindlicher sind, bzw. beide Einflüsse einen synergistischen Effekt haben (Morrison, 1994).

Der Einfluss der Diffusion ist ganz offensichtlich. Der Austausch von Nährstoffen und Metaboliten verläuft viel langsamer in der Schwerelosigkeit und damit ist die Zelle in ihrem Wachstum und auch in ihrer Differenzierung beeinflusst. Die Frage ist aber immer noch: Ist das Fehlen dieser Aspekte ein Nachteil? Dies ist nicht unbedingt der Fall. Zwar lassen sich

die Ergebnisse aus diesen Experimenten nicht eins zu eins auf die „Wirklichkeit“ übertragen, es handelt sich nach wie vor um eine Simulation, aber vielleicht liegt gerade hier eine Stärke. Durch die Eliminierung verschiedener Einflüsse ist es möglich, Schlüsse zu ziehen, welche Veränderung auf Grund welcher der vielen verschiedenen im Orbit veränderten Bedingungen resultiert. Während diese Eliminierung im Weltraum nur schwierig zu gewährleisten ist, liegt sie beim Klinostaten selbstverständlich vor.

Neben diesem Punkt zeigen Vergleiche mit tatsächlich im Weltraum stattgefundenen Experimenten und den Experimenten unter simulierter Schwerelosigkeit oft gute Übereinstimmung (Schwarzenberg et al., 1999, Ayed et al., 1992, Hoson et al., 1997). Dies macht den Klinostaten zu einem geeigneten Werkzeug zur vorherigen Evaluierung von Experimenten, die für einen Flug in den Weltraum vorgesehen sind. Das ist billiger und vor allem nahezu beliebig oft reproduzierbar. Es lässt sich mit dem Klinostaten wertvolle Grundlagenforschung betreiben. Auch sein Einsatz als zusätzliche Kultivierungsmethode gewinnt immer größere Bedeutung.