

**PROTEOMANALYSE HUMANER  
SCHILDDRÜSENZELLEN KULTIVIERT  
UNTER EINFLUSS SIMULIRTER  
SCHWERELOSIGKEIT**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin

**Jessica Pietsch**

aus Berlin

September 2011

Angefertigt von April 2007 – September 2011 in der Arbeitsgruppe von

Prof. Dr. med. Daniela Grimm

am

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

1. Gutachterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Knaus

2. Gutachterin/Betreuerin: Frau Prof. Dr. med. Daniela Grimm

Disputation am 13.02.2012

Humor ist der Knopf, der verhindert, dass uns der Kragen platzt.

*Joachim Ringelnatz (\*1883 - † 1934)*

<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1) Einfluss von Schwerelosigkeit auf den Organismus .....</b>	<b>1</b>
1.1.1) Muskel und Knochen .....	2
1.1.2) Flüssigkeitshaushalt und Blutkreislauf .....	4
1.1.3) Immunsystem .....	4
1.1.4) Hormonsystem .....	5
1.1.4.1) Schilddrüse - Struktur und Funktion .....	6
<b>1.2) Einfluss von Schwerelosigkeit auf zellulärer Ebene .....</b>	<b>8</b>
1.2.1) Cytoskelett .....	8
1.2.2) Extrazelluläre Matrix .....	9
1.2.3) Apoptose .....	10
1.2.4) Genexpression .....	12
<b>1.3) Forschung in Schwerelosigkeit .....</b>	<b>12</b>
1.3.1) Reale Schwerelosigkeit .....	13
1.3.2) Simulierte Schwerelosigkeit .....	14
1.3.2.1) Free Fall Machine .....	14
1.3.2.2) Rotating Wall Vessel (RWV) .....	15
1.3.2.3) 2D-Klinostat .....	16
1.3.2.4) Random Positioning Machine (RPM) .....	16
<b>1.4) Ziel der Arbeit.....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1) Zelllinien.....</b>	<b>18</b>
2.1.1) HTU-5 .....	18
2.1.2) CGTH W-1 .....	18
2.1.3) FTC-133 .....	18
2.1.4) ML-1 .....	18
2.1.5) Kulturmedien und Kulturreagenzien .....	19
<b>2.2) Geräte und Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3) Chemikalien.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4) Antikörper .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5) Lösungen .....</b>	<b>23</b>
<b>METHODEN.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1) Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1.1) Kultivierung der Zelllinien .....	25
3.1.2) Passagieren der Zellen .....	25
3.1.3) Herstellung von Zell-Kryokulturen.....	25
3.1.4) Aussaat der Zellen in Kulturflaschen.....	25
3.1.5) Random Positioning Machine (RPM).....	25
3.1.6) Sauerstoffsättigung.....	27
3.1.7) Probenvorbereitung für FF-IEF und Western Blot Analyse.....	27
3.1.8) Durchflusszytometrie .....	28
3.1.8.1) Annexin V-Färbung.....	30

<b>3.2) Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>31</b>
3.2.1) Proteomanalyse.....	31
3.2.1.1) Isoelektrische Fokussierung (Free Flow Isoelectric Focusing, FF-IEF)	31
3.2.1.2) nano-LC-MS/MS.....	34
3.2.2) Western Blot Analyse .....	36
3.2.2.1) Lyse der Zellen .....	36
3.2.2.2) Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäurekomplexes .....	37
3.2.2.3) SDS-PAGE.....	38
3.2.2.4) Western Blot Analyse.....	40
<b>3.3) Statistik</b> .....	<b>41</b>
<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1) Voruntersuchungen</b> .....	<b>43</b>
4.1.1) Sauerstoffsättigung.....	43
4.1.2) Annexin V-FITC/PI-Messung.....	43
<b>4.2) Proteomanalyse</b> .....	<b>47</b>
4.2.1) FF-IEF .....	47
4.2.1.1) SDS-PAGE ausgewählter FF-IEF-Fractionen mit Silberfärbung .....	47
4.2.1.2) SDS-PAGE ausgewählter FF-IEF-Fractionen mit Coomassie Blaufärbung .....	56
4.2.2) Nano-LC-MS/MS-Analyse ausgeschnittener Proteinbanden .....	59
4.2.2.1) Proteomvergleich mit der Literatur .....	60
4.2.2.2) Ergebnisse der Massenspektrometrie - Vergleich 1g und µg.....	61
4.2.2.3) Ergebnisse der Massenspektrometrie von Cytoskelettproteinen .....	64
4.2.2.4) Spaltprodukte .....	72
<b>4.3) Western Blot Analyse</b> .....	<b>75</b>
4.3.1) Vergleich Proteomergebnis mit Western Blot Analyse .....	77
4.3.2) Western Blot Analyse der zeitabhängigen Expression ausgewählter Proteine .....	80
4.3.2.1) Untersuchung von Enzymen der Glycolyse.....	80
4.3.2.2) Untersuchung von Proteinen des Cytoskeletts.....	85
<b>DISKUSSION</b> .....	<b>89</b>
<b>5.1) Proteomanalyse</b> .....	<b>90</b>
5.1.1) FF-IEF .....	90
5.1.2) nano-LC-MS/MS .....	92
5.1.2.1) Proteomvergleich mit der Literatur .....	92
5.1.2.2) µg-Betrachtungen .....	93
5.1.2.3) Spaltprodukte .....	94
<b>5.2) Western Blot Analyse</b> .....	<b>95</b>
5.2.1) Vergleich Proteomergebnis mit Western Blot Analyse .....	95
5.2.1.1) Annexine.....	95
5.2.1.2) Elongation factor 1-alpha 1 .....	97
5.2.1.3) „Heat Schock“ Proteine .....	98
5.2.1.4) Nucleoside diphosphate kinase A.....	100
5.2.1.5) Redoxproteine .....	100
5.2.1.6) Enzyme der Glycolyse.....	102
5.2.2) Western Blot Analyse der zeitabhängigen Expression ausgewählter Proteine .....	103

5.2.2.1) Enzyme der Glycolyse.....	103
5.2.2.2) Proteine des Cytoskeletts .....	108
Vimentin .....	109
Tubulin.....	110
Aktin.....	112
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>118</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>120</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>121</b>
8.1) Abkürzungen .....	121
8.2) Abbildungsverzeichnis.....	124
8.3) Tabellenverzeichnis .....	125
<b>LITERATUR.....</b>	<b>127</b>
<b>WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>142</b>
<b>10.1) Veröffentlichungen .....</b>	<b>142</b>
10.1.1) Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften.....	142
10.1.2) Kongressbeiträge - Poster .....	142
10.1.3) Kongressbeiträge - Vortrag .....	142
<b>10.2) Veröffentlichungen mit der Arbeitsgruppe.....</b>	<b>142</b>
10.2.1) Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften.....	142
10.2.2) Kongressbeiträge - Poster .....	143
10.2.3) Kongressbeiträge - Vortrag .....	144
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>146</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>147</b>
<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>149</b>

---

## Einleitung

---

Der Mond und die Sonne haben seit jeher die Menschen fasziniert. In nahezu jeder Hochkultur der Menschheit sprach man ihnen göttliche Eigenschaften zu. Die älteste bekannte Himmelsdarstellung ist die „Himmelsscheibe von Nebra“, die aus der Zeit um rund 1600 Jahre v. Chr. stammt [LDA]. Auf ihr sind neben dem Mond und der Sonne auch die Plejaden dargestellt. Sie scheint unter anderem dazu genutzt worden zu sein, die Sonnenwenden im Jahr zu bestimmen [Reichert, 2006].

Auch wenn der Mond und die Sonne spirituell an Bedeutung verloren haben, so sind sie heute noch immer von großem wissenschaftlichem und industriellem Interesse [White, 2001]. Mit der Fähigkeit in den Weltraum zu reisen ist der Mond als der nächstgelegene Erdtrabant das am einfachsten zu erreichende Ziel in der Eroberung des Weltalls. Begonnen hat das Abenteuer Weltraum in den 1950/1960er Jahren mit dem Wettlauf zum Mond zwischen den USA und der damaligen UdSSR. 1969 erreichte dieser Wettlauf mit der Landung von Apollo 11 auf der Mondoberfläche seinen Höhepunkt.

Viele technische Hürden mussten gemeistert werden bis es soweit war, denn zum Überleben im Weltraum ist es unumgänglich Raumanzüge zu tragen oder in Raumfahrzeugen mit erdähnlichen Bedingungen Schutz zu suchen. Neben der Sauerstoffatmosphäre und einem Schutz gegen die extremen Temperaturunterschiede zwischen Licht und Schatten gewährleisteten beide eine gewisse Abschirmung gegenüber der kosmischen Strahlung, gegen die uns auf der Erde die Ozonschicht und das Magnetfeld der Erde schützen [Cucinotta, 2006; DLR].

Was Raumanzug und Raumfahrzeug jedoch nicht bieten, ist viel Raum und Erdanziehung. Bei Langzeitaufenthalten im Weltraum, wie z.B. auf der Internationalen Raumstation (International Space Station, ISS), können infolge der beengten Räumlichkeiten psychologische Probleme bei den Astronauten auftreten. Der Einfluss der fehlenden Erdanziehung selbst wurde und wird im Bereich der Molekularbiologie und der Weltraummedizin in vielen Fragestellungen und Versuchen untersucht.

### **1.1) Einfluss von Schwerelosigkeit auf den Organismus**

Seit dem ersten Weltraumflug von Yuri Gagarin hat man Erfahrungen gesammelt, wie der Mensch auf Schwerelosigkeit reagiert [Macias, 2005]. Ein weiterer, nicht außer Acht zu lassender Faktor auf diesen Weltraumflügen ist der Einfluss der kosmischen Strahlung auf den Organismus [Badhwar, 2002; Hellweg, 2007; Kiefer, 1999; Ohnishi, 2004].

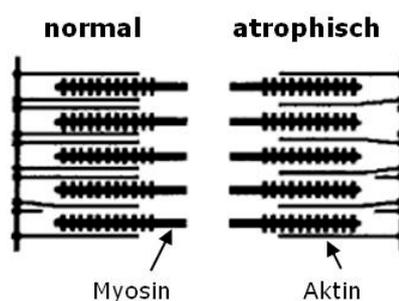
Die amerikanische Nationale Luft- und Raumfahrtbehörde (National Aeronautics and Space Administration, NASA) hat aufgrund der bisherigen Erfahrungen im Hinblick auf zukünftige und vor allem langfristige Raumfahrtmissionen, wie z.B. interplanetare Flüge zum Mars, eine Liste von 27 Risiken formuliert. Diese Risiken umfassen

Fragestellungen bezüglich der Ernährung der Astronauten, der Gesundheitsvorsorge und Behandlungsmöglichkeiten von Krankheiten und Verletzungen, Psychologische Anforderungen an die Astronauten und Schutz vor kosmischer Strahlung, um nur einige zu nennen. Ziel ist es, diese Risiken in ihrer Entstehung zu unterbinden bzw. zumindest deren Einfluss mit Hilfe von Gegenmaßnahmen zu minimieren [NASA].

### 1.1.1) Muskel und Knochen

Zu den wohl bekanntesten Schwierigkeiten von Astronauten nach einem längeren Aufenthalt im All gehören Muskelschwäche und Knochendichteverlust [Fong, 2004; White, 2001]. Die Muskeln adaptieren strukturell und funktionell infolge der geringeren Beanspruchung durch ein gefühlt reduziertes Körpergewicht [Adams, 2003]. Die Wadenmuskulatur ist von der Atrophie stärker betroffen als die Oberschenkel-, Arm- und Oberkörpermuskulatur [Fitts, 2000; LeBlanc, 2007; Trappe, 2009]. Infolge der Atrophie ist sowohl eine Abnahme des Muskelquerschnittes und damit konsekutiv der Muskelkraft zu beobachten. Ein Grund für die Kraftabnahme kann neben dem Querschnittverlust auch eine Veränderung in der Struktur der Muskelfilamente sein [Fitts, 2001].

Für eine strukturelle Veränderung spricht die Faserbeschädigung im Muskelgewebe von Ratten. Es konnte gezeigt werden, dass diese Schädigung nicht während des Weltraumfluges eintrat, sondern erst nach Wiedereintritt in die Erdanziehungskraft [Fitts, 2001]. Der Verlust von Aktin (**Abb. 1**) im kontraktilem Bereich der Muskelfibrillen scheint ein Grund für die Instabilität des Muskels zu sein. Wirkt auf diesen veränderten Muskel eine erhöhte Last oder Anstrengung (auf der Erde), so muss eine Last von weniger Aktin Filamenten getragen werden [Fitts, 2000].



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Hälfte eines normalen und eines atrophischen Sarcomers [nach: Fitts, 2000]**

Gezeigt ist die Anordnung der Aktin und Myosin Filamente innerhalb eines nicht geschädigten (links) und eines atrophischen (rechts) Sarcomers.

Im Muskelgewebe von Menschen konnte diese Gewebeschädigung bisher nicht gezeigt werden. Allerdings klagen Astronauten häufig für längere Zeit nach einem Weltraumflug über Muskelkater [Fitts, 2001].

Die Knochen zeigen unter Schwerelosigkeit einen ähnlichen Abbau wie die Muskulatur. Die Arm- und Oberkörperknochen sind weniger stark bis gar nicht betroffen, wohingegen die unteren Extremitäten einen signifikanten Knochendichteverlust zeigen [LeBlanc, 2007]. Die Veränderungen lassen sich vermutlich auf eine veränderte Calciumhomöostase und einem Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau durch Osteoblasten und Osteoclasten zurückführen [Turner, 2000]. Es hat sich gezeigt, dass während eines Weltraumfluges der Knochenabbau deutlich erhöht ist, wohingegen der Knochenaufbau unverändert bleibt [Smith, 2005].

Muskelschwund und Knochenabbau sind Erscheinungen, die sich längerfristig entwickeln und deren Regeneration Zeit braucht. Landen Astronauten jedoch z.B. auf dem Mond oder dem Mars, wo sie wieder einer Schwerkraft ausgesetzt sind, müssen sie für die Durchführung ihrer Aufgaben einsatzbereit sein. Sie haben nicht die Möglichkeit zu regenerieren [Adams, 2003]. Es ist somit für Astronauten unerlässlich während des Fluges zu trainieren, um dem Muskelschwund und Knochenabbau entgegenzuwirken.

Bisher sind verschiedene Trainingsprogramme für den Muskel- und Knochenerhalt mit mehr oder weniger zufriedenstellendem Erfolg durchgeführt worden [Yoshimitsu, 2010; Trappe, 2009; Shackelford, 2004; Rittweger, 2010]. Neben Training scheint für den Erhalt der Knochendichte zusätzlich eine Behandlung mit Medikamenten, die gegen Osteoporose wirken, vielversprechend für den Erhalt der Knochendichte zu sein [LeBlanc, 2002].

Zur Optimierung der Trainingsprogramme werden Bed Rest Studien durchgeführt, in denen Probanden über einen definierten Zeitraum hinweg waagrecht in einem Bett gelagert werden und Übungen für den Knochen- und/oder Muskelerhalt durchführen [Jost, 2008].

Bettruhe ist in der Behandlung von Patienten eine lange bekannte Therapiemöglichkeit z.B. nach Operationen oder wenn Patienten nicht mehr in der Lage sind sich zu bewegen [Allen, 1999]. Bettruhe ist vergleichbar mit körperlicher Inaktivität, die in der Bevölkerung auf der Erde zur Entstehung von koronaren Herzerkrankungen, Bluthochdruck, Diabetes und Krebs mit beitragen kann. Auch wird oft beobachtet, dass Menschen bei häufigerer Bewegung weniger depressiv oder ängstlich sind, ein stärkeres mentales Wohlbefinden angeben und größere, kognitive Aufnahmefähigkeit zeigen [Lipnicki, 2009; Bleeker, 2005].

Begleiterscheinungen der Bettruhe sind nachteilige Effekte auf die Muskelfunktion, die Knochendichte und den Blutkreislauf [Bleeker, 2005]. Analoge Probleme treten bei Astronauten nach einem Aufenthalt im Weltraum auf. Qualitativ zeigen die Probanden der Bed Rest Studien das gleiche Spektrum an Veränderungen, wobei diese unter Schwerelosigkeit deutlich ausgeprägter sind [LeBlanc, 2007].

### 1.1.2) Flüssigkeitshaushalt und Blutkreislauf

Astronauten in Schwerelosigkeit sehen im Gesicht aufgedunsen aus. Das hat seine Ursache in der Umverteilung der Körperflüssigkeiten aus den unteren Extremitäten in Richtung Kopf („puffy face - bird leg“ Syndrom) [Williams, 2009]. In Bed Rest Studien werden Probanden aufgrund dieses Phänomens in einer Neigung von 6° mit dem Kopf nach unten gelagert [Lipnicki, 2009; Williams, 2009]. Durch diese Lagerung ist es noch besser möglich, auf der Erde die Wirkung der Schwerelosigkeit auf das Muskelsystem und die Knochen sowie das kardiovaskuläre System zu untersuchen [Adams, 2003].

Die Umverteilung der Körperflüssigkeiten führt zu einer zentralen Volumenzunahme im Oberkörper, die wahrscheinlich mit dafür verantwortlich ist, dass Astronauten in Schwerelosigkeit weniger durstig sind und folglich weniger Flüssigkeit zu sich nehmen. Die verminderte Flüssigkeitsaufnahme hat eine Hypovolämie zur Folge [Watenpaugh, 2001]. Insgesamt reduziert sich das Blutvolumen um rund 10-15% innerhalb der ersten ein bis zwei Wochen im All [Lane, 2002; Watenpaugh, 2001; Williams, 2009].

Trotz der Volumenabnahme ist es dem Körper möglich einen Blutkreislauf aufrecht zu erhalten, der auf der Erde im Sitzen erreicht wird [Watenpaugh, 2001]. Allerdings führt dies vermutlich auch dazu, dass Astronauten nach der Rückkehr auf die Erde, bedingt durch das reduzierte Blutvolumen, unter Kreislaufproblemen leiden [Williams, 2009]. Das zeigt sich im Allgemeinen in der Unfähigkeit von vielen Astronauten, nach einem Weltraumflug für einige Minuten ohne Bewegung ruhig stehen zu bleiben [Buckey jr., 1996]. Um die Kreislaufprobleme etwas abzuschwächen, trinken Astronauten vor Wiedereintritt in die Erdanziehungskraft isotonische Getränke [Watenpaugh, 2001].

### 1.1.3) Immunsystem

Ein weiteres wichtiges physiologisches System, das von der Schwerelosigkeit beeinflusst wird, ist das Immunsystem [Sonnenfeld, 2002]. Die unspezifische Immunantwort stellt die erste, angeborene Abwehrmaßnahme des Körpers dar. Dazu zählen physikalische und chemische Barrieren wie Epithelien, antimikrobielle, auf der Oberfläche von Epithelien gebildete Substanzen sowie Phagozyten und natürliche Killerzellen. Makrophagen, die zu den Phagozyten zählen und Fremdstoffe aufnehmen und zersetzen, präsentieren auf ihrer Membranoberfläche Fragmente des Erregers. Diese Fragmente werden von Zellen der spezifischen, erworbenen Immunantwort, den Lymphozyten, erkannt. Bei den Lymphozyten unterscheidet man verschiedene Subtypen, die entweder Antikörper bilden (B-Lymphozyt), andere Zellen des Immunsystems aktivieren (T-Helferzellen, T-Lymphozyten), durch direkten Kontakt körperfremde, mutierte oder fehlerhaft funktionierende körpereigene Zellen zerstören (T-Killerzellen, T-Lymphozyt) oder die Immunantwort hemmen (T-Suppressorzellen,

T-Lymphozyt). Phagozyten und Lymphozyten werden unter dem Oberbegriff Leukozyten zusammengefasst und sind Bestandteile des Blutes [Abbas, 2003; Faller, 1999].

Im Hinblick auf das Krebsrisiko von Astronauten sind insbesondere die T-Lymphozyten von Bedeutung. Wie zuvor beschrieben, können T-Lymphozyten direkt mutierte Körperzellen vernichten. Kommt es infolge der verschiedenen Stressfaktoren während des Weltraumfluges zu erhöhter Mutation in Geweben und somit auch zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass die Mutation bösartig ist, ist der Körper auf eine fehlerfreie Antwort durch die T-Lymphozyten angewiesen [Gridley, 2009].

Untersuchungen von Mäusen nach einem Weltraumflug haben gezeigt, dass die Zahl an T-Lymphozyten, die prozentuale Verteilung der T-Lymphozyten Subpopulationen und die Empfindlichkeit auf Mitogene sowie die Zytokinproduktion deutlich verändert sind [Gridley, 2009]. Auch der Immunstatus von Astronauten zeigt Abweichungen nach einer Weltraummission zu den Werten vor der Mission. So sind die Verteilung der Leukozyten, die Produktion von Zytokinen und die Antikörperkonzentrationen verändert. Sowohl die Aktivität der T-Lymphozyten als auch die der natürlichen Killerzellen sind reduziert [Williams, 2009].

Gründe für die Veränderungen können außer dem Einfluss der Schwerelosigkeit auch physischer und psychologischer Stress, die Wechselwirkung mit anderen Regulationssystemen des Körpers, wie z.B. das Hormonsystem, sowie die Dynamik von Körperflüssigkeiten sein [Gridley, 2009; Sonnenfeld, 2002; Williams, 2009]. Die Auswirkungen dieser Einflüsse sind insbesondere dann zu beachten, wenn isolierte Zellen in Kultur in Schwerelosigkeit untersucht werden. Für die Aktivierung bzw. Reifung von Leukozyten ist die Interaktion von Rezeptoren und Signalstoffen notwendig. Die Interaktion der Signalstoffe mit den Rezeptoren ist ebenfalls durch verschiedene Faktoren beeinflusst [Sonnenfeld, 2002; Long, 2006].

#### **1.1.4) Hormonsystem**

Hormone, die das Immunsystem beeinflussen, sind die Glucocorticoide, zu denen Hydrocortison und Cortison zählen, die in der Nebenniere gebildet werden. Sie bewirken eine Abnahme der Lymphozyten im Blut und wirken auf diese Weise entzündungshemmend. Aus diesem Grund werden sie häufig als Therapie bei Entzündungsreaktionen und bei allergischen Reaktionen eingesetzt [Faller, 1999].

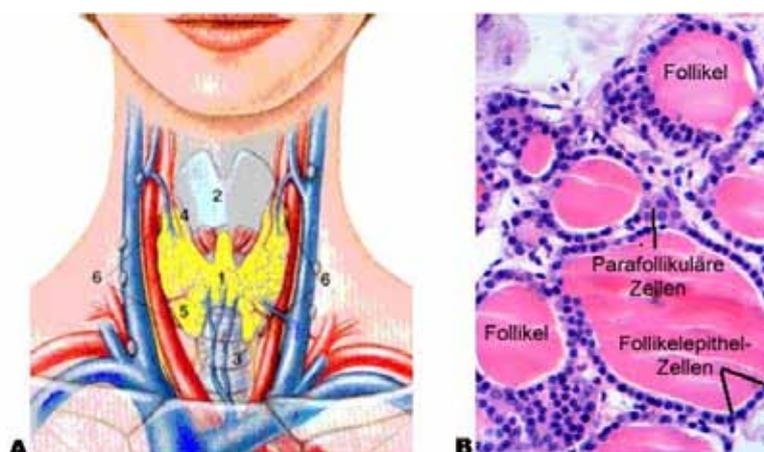
Die Untersuchung von Astronauten hat gezeigt, dass sowohl im Blut als auch im Urin der Hydrocortisonspiegel erhöht ist [Lane, 2002], was eine Erklärung für die veränderten Lymphozytenpopulationen bei Astronauten sein könnte. Die Ausschüttung von Hydrocortison wird über die Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) reguliert. Mit Hilfe dieser Achse reagiert der Körper auf Stressfaktoren, die für ihn potentielle Gefahren darstellen. Die zuvor

erwähnten Studien vergleichen normale Hydrocortisonwerte vor dem Flug mit Werten nach einem Flug. Die Erhöhung könnte somit auch von dem körperlichen Stress infolge der Landung verursacht werden [Strollo, 1999].

Das Hormonsystem, auch als endokrines System bezeichnet, ist mit seinen vielfältigen Regelkreisen an der Regulierung der bisher beschriebenen physiologischen Systeme beteiligt [Strollo, 1999]. Es wird unter anderem durch das zentrale Nervensystem kontrolliert und wirkt häufig über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Die in der Hypophyse freigesetzten Hormone stimulieren entweder das Erfolgsorgan direkt oder durch eine weitere endokrine Drüse, die wiederum Hormone produziert. Zu den nach der Hypophyse stimulierten endokrinen Drüsen zählen beispielsweise die bereits erwähnte Nebenniere (HPAA), die Geschlechtsdrüsen (hypothalamic-pituitary-ganadal axis, HPGA) und die Schilddrüse (hypothalamic-pituitary-thyroid axis, HPTA) [Lüllmann, 2001].

#### 1.1.4.1) Schilddrüse - Struktur und Funktion

Die Schilddrüse (*lat. Glandula thyroidea*) (**Abb. 2A**) ist eine schmetterlingsförmige, endokrine Drüse, die dem unteren Bereich des Kehlkopfes anliegt. Das Drüsengewebe (*gr. Parenchym*) ist in ein Stützgerüst aus Bindegewebe mit Blutgefäßen eingebettet. Das Drüsengewebe bildet Follikel mit Hohlräumen von 0,05-0,5 mm Durchmesser. Im Kolloid wird die Vorstufe der Schilddrüsenhormone produziert und gespeichert. Das Parenchym wird aus zwei Arten Drüsenzellen gebildet, den Follikelzellen, auch Follikelepithelzellen, und den Parafollikulären Zellen. Von den Follikelzellen sind deutlich mehr Zellen im Drüsengewebe zu finden als von den Parafollikulären Zellen. Die Follikelzellen sind nach einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E-Färbung) stärker gefärbt als die Parafollikulären, weshalb letztere auch als C-Zellen („clear cells“) bezeichnet werden (**Abb. 2B**) [Lippert, 2000].



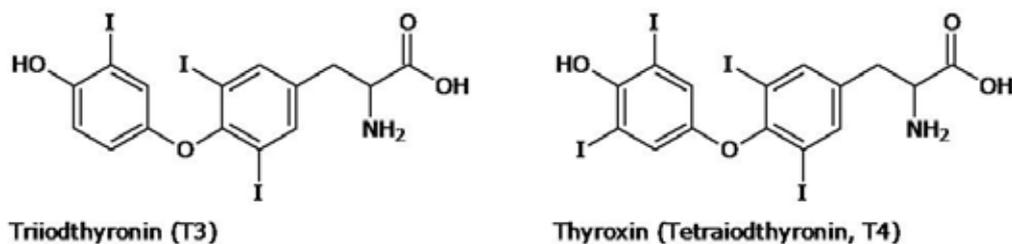
**Abb. 2: Lage und Form der Schilddrüse [nach: PB]**

A: Gezeigt sind die schmetterlingsförmige Schilddrüse in gelb (1), der Kehlkopf in grau oberhalb der Schilddrüse (2), die Luftröhre ebenfalls in grau

unterhalb der Schilddrüse (3), Blutgefäße in rot und blau (4, 5) und die Nebenschilddrüsen (6).

B: H/E-Färbung des Parenchyms. Zellkerne sind blauschwarz bis violett und das Cytoplasma rosa gefärbt. Im Vergleich zeigen die Parafollikulären Zellen nur einen blass violetten Zellkern, wohingegen die Follikelzellen deutlich dunkel-violett erscheinen.

Die Hormone Thyroxin (Tetraiodthyronin, T4) und Triiodthyronin (T3) werden in den Follikelzellen synthetisiert (**Abb. 3**). T3 ist bei weitem das aktivere Hormon. Es wird hauptsächlich intrazellulär in der Zielzelle aus T4 durch für die Organ- bzw. Gewebespezifischen Deiodase-Isoenzyme gebildet. In der Zielzelle bindet T3 an Rezeptoren und wirkt dort direkt auf die Transkription. T4 ist das Hauptprodukt der Schilddrüse und wird nur dort synthetisiert. Beide wirken zusammen mit dem Wachstumshormon Somatotropin (STH) auf das Knochenwachstum und auf die Reifung der Proteine. Zudem sind die Hormone wichtig für die normale Entwicklung und Reifung des Nervensystems. T3 ist außerdem in der Lage, den Grundumsatz zu erhöhen und den Kohlenhydratmetabolismus von der Aufnahme im Darm bis zur Oxidation der Glucose in Leber, Fettgewebe und Muskulatur zu stimulieren [Lippert, 2000; Klinke, 2001].



**Abb. 3: Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (Tetraiodthyronin, T4)**

Reguliert wird die Produktion der Hormone T3/T4 auf drei Ebenen [Klinke, 2001]:

- 1) T4-Feedback-Schleife: eine neuroendokrine Steuerung der HPTA infolge der T4-Konzentration im Blut
- 2) Aktivierung zu T3: der extrathyreoidale Metabolismus von T4 in den Zielzellen vermittelt durch die Deiodase-Isoenzyme
- 3) Autoregulation der Schilddrüse, die von der Iodaufnahme aus der Nahrung und dem Iodhaushalt im Organismus beeinflusst wird.

Bei der Diagnostik von Erkrankungen der Schilddrüse werden u.a. die Hormon- und die Thyreotropin (TSH)-Konzentrationen bestimmt. TSH ist ein Hormon, das in der Hypophyse gebildet wird. In hohen Konzentrationen steigert es die Aktivität der Schilddrüse (Blutversorgung, Hormonproduktion), in niedrigen senkt es sie. Die Produktion von TSH wird durch hohe T4-Konzentrationen in einem negativ-Feedback gehemmt [Klinke, 2001]. Die TSH-Konzentration ist z.B. bei einer Depression erniedrigt. Bedingt durch die niedrige TSH-Konzentration ist die T4-Konzentration erhöht [Fliers, 2006]. Allgemein gehören Schilddrüsenfehlfunktionen, wie Über- und

Unterfunktion, zu den häufigsten Ursachen einer hormonellen Erkrankung. Bei Astronauten konnten während des Weltraumfluges geringfügig erhöhte TSH-Konzentrationen beobachtet werden. Dies könnte auf eine durch die Schwerelosigkeit induzierte Schilddrüsenunterfunktion hindeuten, die der Körper mit einer gesteigerten Hypophysenaktivität auszugleichen versucht [Strollo, 1999].

Die TSH-, T3- und T4-Konzentrationen sind bei einem Schilddrüsenkarzinom nicht verändert. Bei etwa 5.000 Personen wird in Deutschland jährlich ein Schilddrüsenkarzinom diagnostiziert [Reiners, 2008]. Ursprung können entweder die Follikelzellen oder die C-Zellen sein. Bei Ersterem unterscheidet man die follikulären von den papillären Karzinomen. Ausgehend von den C-Zellen sind medulläre Karzinome mit etwa 5% aller Schilddrüsenkarzinome recht selten [Riede, 2004].

Mit 50-80% aller Schilddrüsenkarzinome sind die papillären die häufigsten. Sie metastasieren im Allgemeinen über die Lymphe. Hingegen hämatogen metastasieren die follikulären Karzinome, die etwa zu 20-50% auftreten. Unterschieden werden sie wegen ihrer morphologischen Unterschiede [Riede, 2004].

## **1.2) Einfluss von Schwerelosigkeit auf zellulärer Ebene**

### **1.2.1) Cytoskelett**

Untersuchungen an Lymphozyten während einer Space Shuttle Mission haben gezeigt, dass innerhalb von vier Stunden nach Wachstumsaktivierung unter Schwerelosigkeit die Filamente des Cytoskeletts verkürzt und ineinandergeflossen waren. Weiterhin fehlten die in der Bodenkontrolle zu sehenden Verzweigungen der Filamente an der Zellmembran. Zeitgleich konnte eine deutlich erhöhte Menge an DNA-Kondensation beobachtet werden. Jedoch zeigte sich in beiden Fällen nach 48 Stunden kein nennenswerter Unterschied zwischen Proben im Space Shuttle und den Bodenkontrollen [Lewis, 1998].

Space Shuttle Flüge oder Flüge zur ISS sind teuer und nur begrenzt verfügbar, sodass Geräte entwickelt wurden, um Schwerelosigkeit zu simulieren (vgl. 1.3). Eines dieser Geräte ist die Random Positioning Machine (RPM, vgl. 1.3 und 3.1.5). Daten von T-Lymphozyten haben gezeigt, dass die Bedingungen auf der RPM gut mit den Bedingungen von Weltraumflügen übereinstimmen [Schwarzenberg, 1999]. Der Vergleich von Immunzellen *in vivo* von Astronauten mit *in vitro* kultivierten Immunzellen nach einem Weltraumflug hat jedoch gezeigt, dass *in vitro* gewonnene Erkenntnisse nicht unbedingt mit der Situation *in vivo* übereinstimmen müssen [Sonnenfeld, 2002].

Degenerative Veränderungen im Cytoskelett konnten in einer Vielzahl von Zelllinien, darunter auch papillären und follikulären Schilddrüsenzellen, *in vitro* sowohl nach einem Weltraumflug als auch nach Einfluss simulierter Schwerelosigkeit beobachtet werden [Crawford-Young, 2006; Carmeliet, 1999; Infanger, 2006; Infanger, 2004].

Bei mesenchymalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass die GTPase RhoA unter simulierter Schwerelosigkeit reduziert ist [Meyers, 2005]. RhoA initiiert die Phosphorylierung von Cofilin, einem kleinen Aktin-bindenden Protein, welches unphosphoryliert nach Bindung an Aktin die Depolymerisation des F-Aktin-Gerüsts der Zelle einleitet. Ist Cofilin phosphoryliert, kann es nicht an Aktin binden. Die reduzierte Aktivität von RhoA unter simulierter Schwerelosigkeit und die daraus resultierende, geringere Phosphorylierung von Cofilin könnte somit ein Grund sein, warum das Cytoskelett degeneriert [Meyers, 2005]. Ein weiterer Faktor ist die Selbstorganisation von Mikrotubuli, die durch Schwerkraft bestimmt ist und in Schwerelosigkeit nicht erfolgt [Papaseit, 2000; Glade, 2006; Tabony, 2007].

### 1.2.2) Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) einer Zelle ist für diese charakteristisch. Sie bestimmt unter anderem die Form einer Zelle und verankert sie im jeweiligen Gewebe. Die Struktur des Cytoskeletts ist an der Stabilität der Formgebung beteiligt. Fasst man die Wechselwirkung zwischen Cytoskelett und EZM als ein Gerüst auf, das durch Druck und Spannung zusammengehalten wird, kann man den Einfluss der Schwerelosigkeit mit dem „Tensegrity Modell“ teilweise erklären. Tensegrity ist ein architektonischer Begriff, der sich aus *engl.* „tension“ und „integrity“ zusammensetzt. Er beschreibt eine Struktur, die durch Druck und Spannung in sich selbst stabilisiert ist. Das Cytoskelett von Zellen kann als eine Tensegrity aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediär-Filamenten aufgefasst werden, die unter einer Vorspannung steht. Diese Vorspannung des Cytoskeletts bestimmt die Form des Cytoplasma und des Kerns einer Zelle. Wirkt eine äußere Kraft, ausgeübt über die EZM, oder der Wegfall einer solchen, auf das gespannte Gerüst ein, verformt es sich. Mit diesem gedanklichen Modell stellt die Zelle oder das Gewebe als Ganzes den Schwerkraftsensor dar. Folgen dieser Verformung können z.B. eine Veränderung der Zellform, eine Neuordnung zellulärer Strukturen oder eine veränderte Signalweitergabe innerhalb der Zelle sein [Ingber, 1999; Ingber, 2003a; Ingber, 2003b].

Unter der Neuordnung zellulärer Strukturen ist neben den Veränderungen im Cytoskelett die Umverteilung von Zellorganellen, wie z.B. der Mitochondrien, zu verstehen. Für Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass diese sich unter Einfluss von Schwerelosigkeit auf einer Seite der Zelle zusammenballen und einen teilweisen Verlust der inneren Ordnung der Cristae aufweisen [Morbideilli, 2005; Schatten, 2001]. Neben dem Cytoskelett weist auch die EZM unter Schwerelosigkeit Veränderungen auf. Für Endothelzellen konnte ein Anstieg der Proteinmenge von Laminin und Fibronectin nach 24 Stunden simulierter Schwerelosigkeit beobachtet werden [Ulbrich, 2008]. Gleiches trifft für Laminin, Fibronectin sowie Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Chondroitinsulfat in Schilddrüsenzellen nach einem Tag unter simulierter

Schwerelosigkeit im Vergleich zur Bodenkontrolle zu [Grimm, 2002; Kossmehl, 2002; Infanger, 2006]. In Osteoblasten hingegen konnte während eines Weltraumfluges nach zweieinhalb Stunden sowohl in der Protein- als auch mRNA-Menge für Fibronectin eine Reduktion im Vergleich zur Bodenkontrolle festgestellt werden. Nach 27,5 Stunden bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr [Hughes-Fulford, 1999]. Dies zeigt einmal mehr, dass Zellen und Gewebe komplexe Systeme sind, denen es möglich ist, auf einen Reiz verschieden zu reagieren. Eine allgemein gültige Reaktion auf den Einfluss von Schwerelosigkeit scheint es nicht zu geben.

### 1.2.3) Apoptose

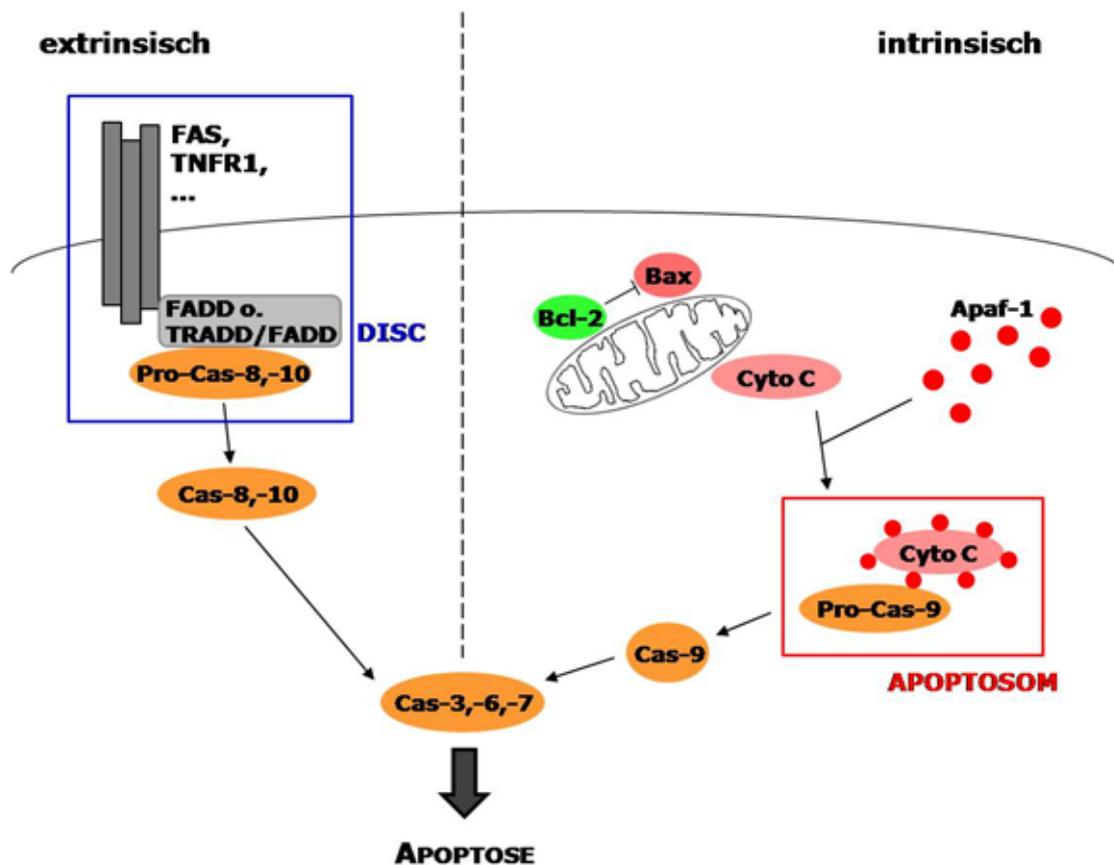
Die Mitochondrien sind neben ihrer Funktion als „Kraftwerke“ der Zelle mit dem Kohlenhydratstoffwechsel und ATP-Synthese auch an einem Apoptosesignalweg (**Abb. 4**) beteiligt. Unterschieden werden der extrinsische, todesrezeptorvermittelte (Typ-I) und der intrinsische, mitochondrienvermittelte (Typ-II) Signalweg.

Die Todesrezeptoren, wie beispielsweise FAS Rezeptor und TNFR1 (TNF Rezeptor 1), gehören zu der NGF-/TNF-Rezeptorsuperfamilie (NGF - nerve growth factor, TNF - tumor necrosis factor). Sie leiten nach Ligandenbindung unter Trimerisierung der Rezeptoren die Bildung des Komplexes ein, der den Tod induziert (death-inducing signaling complex, DISC). Zu dem Komplex gehört neben den Adapterproteinen FADD und TRADD entweder das Protein Pro-Caspase-8 oder das Protein Pro-Caspase-10. Caspasen sind eine Gruppe von Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum, die Proteine spezifisch nach einem Aspartat spalten (**Cystein-Aspartasen** - kurz: Caspasen). Die Adapterproteine sind nach dem Todesrezeptor benannt, an den sie binden. Das Adapterprotein FADD (FAS-associated death domain) lagert sich an den FAS Rezeptor und TRADD (TNF receptor-associated death domain) in Kombination mit FADD an den TNFR1 an. Im DISC wird Pro-Caspase-8 oder -10 autokatalytisch in die aktiven Caspase-8 und -10 gespalten. Die aktivierte Caspase spaltet weitere so genannte Effektorcaspasen (Caspase-3,-6,-7).

Beim intrinsischen Signalweg kommt es infolge von massivem oxidativen Stress, einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Konzentration oder genetischer Schäden zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Dies wird unter anderem durch Bax initiiert, einem Protein der Bcl-2 Familie. Die Bcl-2 Familie umfasst Proteine, die sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken können. Bcl-2 wirkt anti-apoptotisch, in dem es die Wirkung von Bax inhibiert. Aufgrund der permeablen Mitochondrienmembran wird unter anderem Cytochrom C ins Cytoplasma freigesetzt. Cytochrom C bildet mit Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) einen Komplex, das Apoptosom. Dieser bietet der Pro-Caspase-9 eine Plattform, an die sie bindet und dabei selbst zu aktiver Caspase-9 gespalten wird. Die aktivierte Caspase-9 kann im Folgenden ihrerseits

Effektorcaspasen spalten [Krammer, 2000; Gruss, 1996; Karp, 2005; Nagata, 1997; Ledgerwood, 2009; Xu, 2007].

Zwischen beiden Signalwegen gibt es zahlreiche Wechselwirkungen. Zudem ist jedes Signalprotein auf verschiedenen Wegen reguliert. Darüber hinaus sind auch Caspase-unabhängige Apoptosesignalwege bekannt [Xu, 2007; Arya, 2007].



**Abb. 4: Signaltransduktion der Apoptose [nach: Grimm, 2011]**

In der linken Abbildungshälfte ist schematisch vereinfacht der extrinsische Signalweg dargestellt. Nach Bindung des rezeptorspezifischen Liganden werden am trimerisierten Rezeptor (FAS, TNFR1,...) Adapterproteine (FADD, TRADD/FADD) und Pro-Caspasen zum DISC (blau umrandet) versammelt. Es erfolgt die autokatalytische Spaltung der Pro-Caspase in die aktive Caspase (Cas-8,-10), die Effektorcaspasen (Cas-3,-6,-7) aktiviert.

Rechts ist der intrinsische Signalweg gezeigt. Infolge von Stress, hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Konzentrationen oder DNA-Schäden kommt es zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, vermittelt von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (beispielsweise Bax). Bcl-2 wirkt anti-apoptotisch und kann Bax inhibieren. Als Resultat der Permeabilisierung wird unter anderem Cytochrom C (Cyto C) freigesetzt, das mit Apaf-1 das Apoptosom bildet. In dieses Apoptosom wird Pro-Caspase-9 eingebunden und gespalten. Die aktive Caspase-9 aktiviert weitere Effektorcaspasen (Cas-3,-6,-7).

Bei Experimenten mit verschiedenen Zelllinien konnten sowohl unter realer als auch simulierter Schwerelosigkeit in beiden beschriebenen Apoptosesignalwegen Veränderungen im Vergleich zur Bodenkontrolle beobachtet werden. Im Detail betraf dies eine gesteigerte Expression des Todesrezeptors FAS sowie von Bax und Caspase-

3. Daraus resultierend kam es zu für die Apoptose charakteristischen morphologischen Veränderungen wie Chromatinkondensation, Apoptosekörperchen und DNA-Fragmentierung. Für das anti-apoptotisch wirkende Protein Bcl-2 konnte sowohl ein Anstieg als auch eine Reduktion der Proteinmenge beobachtet werden. Für einige dieser Proteine waren in der Untersuchung der Genexpression vergleichbare Veränderungen zu finden [Morbidelli, 2005; Infanger, 2006; Grimm, 2002; Kossmehl, 2002].

#### 1.2.4) Genexpression

Die Genexpression ist wie die Signaltransduktion im Cytosplasma von der strukturellen Integrität des Zellkerns abhängig. In der Literatur wird das Thema einer Kernmatrix kontrovers diskutiert. Die Kernmatrix kann als ein Proteingerüst im Zellkern analog zum Cytoskelett aufgefasst werden. Ob eine solche Matrix existiert, konnte bisher nicht zweifelsfrei erwiesen werden. Demzufolge ist die Frage, ob deren Vorhandensein für die Genexpression erforderlich ist beziehungsweise diese reguliert, nicht eindeutig zu beantworten. Ganz gleich ob eine Kernmatrix vorhanden ist oder nicht, kann infolge von Schwerelosigkeit ein Verlust der Zellkernintegrität erfolgen [Stein, 1999; Pederson, 2000; Mateos-Langerak, 2007; Albrethsen, 2009].

In einer Vielzahl von Versuchen unter simulierter Schwerelosigkeit und nach Weltraumflügen wurden mit Genarrays und PCR-Analysen die Genexpression zahlreicher Gene untersucht [Gridley, 2009; Semov, 2001; Hammond, 2000; Carmeliet, 1999]. In primären humanen, kortikalen Nierenzellen konnten nach einem Weltraumflug eine Zahl von über 1.600 in ihrer Expression veränderten Genen nachgewiesen werden. Dazu zählten u.a. Proteine des Cytoskeletts und Transkriptionsfaktoren [Hammond, 2000].

### 1.3) Forschung in Schwerelosigkeit

Nach der von Isaac Newton gefundenen Gesetzmäßigkeit der Gravitation zweier Körper ist die Anziehungskraft zwischen ihnen abhängig von ihrem Abstand und ihren Massen. Diese vom Körpermittelpunkt aus wirkende Kraft wird als Schwerkraft oder Gewichtskraft ( $F_G$ ), für die Erde auch als Erdanziehungskraft bezeichnet. Sie ist definiert als:

$$(1) \quad F_G = m \cdot g$$

$m$  - Masse auf der Körper-/Erdoberfläche  
 $g$  - Fall-/Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$  auf der Erdoberfläche)

Die Fallbeschleunigung kann als Funktion der Entfernung ( $h$ ) von z.B. der Erdoberfläche beschrieben werden.

$$(2) \quad g = \frac{\gamma \cdot M}{(R+h)^2}$$

$\gamma$  - Gravitationskonstante ( $\gamma = 6,7 \cdot 10^{-11} \text{ Nm}^2 \cdot \text{kg}^{-2}$ )

$M$  - Masse der Erde ( $M = 5,98 \cdot 10^{24}$  kg)

$R$  - Erdradius ( $R = 6,38 \cdot 10^6$  m)

Befindet sich ein Objekt auf einem anderen Himmelskörper, z.B. dem Mond, kann die dort wirkende Fallbeschleunigung unter Kenntnis der Masse und des Radius des Himmelskörpers nach Gleichung (2) berechnet werden. Für den Mond ergibt sich eine Fallbeschleunigung von rund  $1,62 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ , etwa  $1/6$  der Erdbeschleunigung.

Aus Gleichung (2) folgt, dass mit steigendem Abstand zur Erde die Anziehungskraft abnimmt. Der Mond befindet sich im Gravitationsfeld der Erde, da er sich andernfalls kontinuierlich von der Erde entfernen würde.

Schwerelosigkeit stellt sich dann ein, wenn die Anziehungskraft gleich null oder durch eine andere, der Anziehungskraft entgegengesetzt gerichtete Kraft, aufgehoben wird. Im Fall des Mondes, der ISS und der Satelliten, die sich auf einer Kreisbahn um die Erde bewegen, ist dies die Zentrifugalkraft ( $F_Z$ ).

$$(3) \quad F_Z = m \cdot \frac{v^2}{r} \cdot \vec{r}_0 \quad m - \text{Masse des sich bewegenden Körpers}$$

$v^2$  - Bahngeschwindigkeit

$r$  - Radius der Kreisbahn

$\vec{r}_0$  - Einheitsvektor

Die Zentrifugalkraft ist laut Gleichung (3) von der Masse des sich auf der Kreisbahn befindenden Körpers, dem Abstand zur Erde und der Geschwindigkeit abhängig. Die Geschwindigkeit ist hierbei das Kriterium das verhindert, dass der Körper auf die Erde stürzt (Geschwindigkeit zu klein) bzw. aus der Umlaufbahn ausbricht und ins Weltall davon schwebt (Geschwindigkeit zu groß) [Haas, 2002].

Die Bewegung um die Erde kann auch als ein kontinuierlicher, freier Fall aufgefasst werden. Lässt man einen Gegenstand gerade nach unten fallen, nimmt er einen geraden Weg in Richtung Erdoberfläche. Wirft man ihn mit ein wenig Geschwindigkeit von sich weg, fällt er parabolisch hinab. Wird die Geschwindigkeit ausreichend groß, wird die Fallkurve in ihrem Radius so groß, dass der „Aufprall“ auf die Oberfläche mit dem Punkt identisch ist, an dem die Fallkurve begann [Haas, 2002; Fong, 2006].

Selbst in Schwerelosigkeit wirken auf einen Körper Kräfte ein. Er befindet sich nicht in einer absoluten Schwerelosigkeit. Diesen Zustand der „Nahezu-Schwerelosigkeit“ bezeichnet man als Mikrogravitation ( $\mu\text{g}$ ) [Fong, 2004]. Die Anziehungskraft, die auf der Erde auf einen Körper wirkt, beträgt  $1\text{g}$ .

### 1.3.1) Reale Schwerelosigkeit

Für die Forschung in Mikrogravitation ( $\mu\text{g}$ ) basierend auf dem freien Fall (reale  $\mu\text{g}$ ) stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung (**Tab. 1**). Die längste Zeit von  $\mu\text{g}$  kann auf der ISS ungefähr 400 km über der Erdoberfläche erreicht werden (Wochen - Monate). Hier können Versuche durchgeführt werden, die nicht voll-automatisiert sind.

In unbemannten Wiedereintrittssatelliten (FOTON, BION), die für Wochen bis Monaten die Erde in 400 - 500 km Höhe umkreisen, sind nur automatisierte Versuche möglich. Mit den amerikanischen Space Shuttles konnten oder den russischen Soyuz Raketen können für die Dauer der Missionen, meist einige Tage, Experimente wie auf der ISS durchgeführt werden (nicht voll-automatisiert). Für etwa 6 - 15 Minuten kann man reale  $\mu\text{g}$  mit Forschungsraketen (TEXUS, MASER, MAXUS) erreichen, die bis zu einer maximalen Höhe von 250 km steigen. Ein Programm für Studenten gibt diesen die Möglichkeit, mit Raketen- und Ballonexperimenten (REXUS/BEXUS) automatisierte Experimente unter speziellen Atmosphärenbedingungen durchzuführen. Die Raketen steigen auf eine Höhe von knapp 100 km und ermöglichen etwa 1,5 Minuten reale  $\mu\text{g}$ . Mit Parabelflügen in einem Flugzeug (A300 ZERO-G) können je Parabel mit 22 Sekunden lang reale  $\mu\text{g}$  Experimente durchgeführt werden, die einen Experimentator erfordern. Je Flug werden 31 Parabeln geflogen, was einer Gesamtzeit von etwas mehr als elf Minuten reale  $\mu\text{g}$  ergibt. Mit knapp 5 bis 10 Sekunden  $\mu\text{g}$  bieten Falltürme die kürzeste Zeit für Experimente [Cogoli, 1993; ESA; DLR1].

**Tab. 1: Experimentplattformen für reale Schwerelosigkeit [Pietsch, 2011]**

Experimentplattform	Flugprogramm	Zeit in $\mu\text{g}$	Höhe über Erdoberfläche
Weltraumstation	ISS	Wochen - Monate	~400 km
Wiedereintrittsatellit	FOTON BION	bis zu 3 Monate bis zu 30 Tage	400 - 500 km
Weltraumtransport	Space Shuttle Soyuz	einige Tage	bis ~400 km
Forschungsraketen	TEXUS MASER MAXUS	6 - 15 Minuten	bis ~250 km
Raketenexperimente (Ballonexperimente)	REXUS (BEXUS)	~1,5 Minuten	~100 km
Parabelflug	A300 ZERO-G	22 Sekunden	6,1 - 8,5 km
Fallturm	ZARM	5 - 10 Sekunden	~140 m

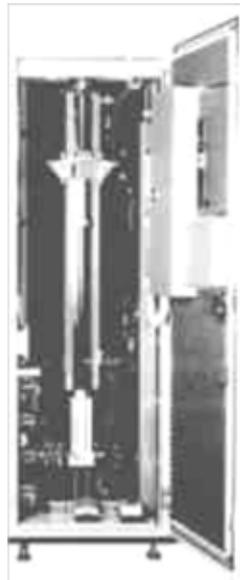
### 1.3.2) Simulierte Schwerelosigkeit

Die Versuchsplätze in den oben beschriebenen Flugmöglichkeiten (1.3.1) sind begrenzt. Aus diesem Grund sind verschiedene Maschinen entwickelt worden, die auf der Erde Schwerelosigkeit simulieren.

#### 1.3.2.1) Free Fall Machine

Die Free Fall Machine (**Abb. 5**) basiert auf dem Prinzip des freien Falls. Wie ein Ball, der fallengelassen wird und zurück springt, ist eine Versuchsanordnung mit Zellkulturmaterial in das Gerät eingebaut. Für maximal 900 ms erfahren die Zellen reale  $\mu\text{g}$ , um anschließend mit 20g innerhalb von 20 - 80 ms wieder auf die

Ausgangshöhe gehoben zu werden. Aufgrund dieser sehr kurzen Hyper-g-Phase wird angenommen, dass eine Zelle nicht die 20g, sondern nur den freien Fall wahrnimmt [Mesland, 1996; van Loon, 1998].



**Abb. 5: Free Fall Machine [aus: van Loon, 1998]**

### 1.3.2.2) Rotating Wall Vessel (RWV)

Die Rotating Wall Vessel (RWV, **Abb. 6**) wurde Anfang der 1990er Jahre von der NASA entwickelt, um Zellen in Kultur entweder ein optimales, dreidimensionales Wachstum zu ermöglichen oder simulierte  $\mu g$  zu erzeugen [Wolf, 1991; Wolf, 1992; Goodwin, 1993; Hammond, 2000; Hammond, 2001].

In einer um eine Achse rotierenden Kammer, die luftblasenfrei mit Medium gefüllt ist, erfahren Zellen einen kontinuierlichen freien Fall. Je nach Einstellung der Rotation kann die Fallgeschwindigkeit der Zellen kontrolliert werden [Wolf, 1992]. Da die Zellen keine Zeit haben an der Oberfläche der Kammer adhären zu werden, ist ein dreidimensionales Wachstum möglich.



**Abb. 6: Rotating Wall Vessel [Hammond, 2001]**

### 1.3.2.3) 2D-Klinostat

Bei dem zweidimensionalen Klinostaten (2D-Klinostat) erfolgt die Rotation um eine Achse, die senkrecht zur Erdanziehungskraft orientiert ist. Bei der so erzeugten Mikrogravitation handelt es sich um eine Mittelung des Schwerkraftvektors der  $<1g$  wird, wenn der Klinostat schnell genug rotiert (40 - 100 rpm). Aufgrund der schnellen Rotation werden die Zellen mittig im Klinostaten zentriert [Briegleb, 1992; van Loon, 1998].

Nachteil des 2D-Klinostaten ist die Rotationsgeschwindigkeit, die nicht zu hoch sein darf, da andernfalls die Zellen zentrifugiert werden. Zudem können nur hinreichend kleine Zellen und Pflanzen rotiert werden, die exakt in der Rotationsachse des Klinostaten zentriert werden können. Ist ein Zelle oder Pflanze zu groß, so dass keine vollständige Zentrierung möglich ist, erfahren die äußeren Bereiche zentrifugale Kräfte [Briegleb, 1992; Dedolph, 1971].

### 1.3.2.4) Random Positioning Machine (RPM)

Die „Random Positioning Machine“ (RPM, **Abb. 7**) wurde in den 90er Jahren entwickelt, um simulierte Mikrogravität zu erzeugen und deren Einfluss auf das Wachstum verschiedener Pflanzen zu untersuchen [Hoson, 1992].

Wie bei dem 2D-Klinostat wird  $\mu g$  durch Mittelung des Schwerkraftvektors erzielt [van Loon, 1998]. Die Mittelung erfolgt über alle drei Raumrichtungen, da die RPM um drei Achsen rotiert. Dies wird mit zwei voneinander unabhängig beweglichen Rahmen ermöglicht [Hoson, 1997; Grimm, 2006]. Gesteuert werden die Rahmen von einem Computer, der die Orientierung bzw. Laufrichtung zufällig relativ zum Schwerkraftvektor steuert und verändert. Diese zufälligen Richtungswechsel resultieren in  $\mu g$ , da Zellen keine Zeit haben, auf den Schwerkraftvektor zu reagieren [Huijser, 2000; Grimm, 2006].

## 1.4) Ziel der Arbeit

In der Erforschung des Einflusses der Mikrogravitation ( $\mu g$ ) auf den Organismus beziehungsweise auf eine Zelle wurden bisher überwiegend konkrete Fragestellungen untersucht. Ausgangspunkt für diese Fragestellungen waren im Allgemeinen beobachtete, systemische Fehlfunktionen bei Astronauten und Versuchstieren während oder nach einem Weltraumflug. Zur Erklärung der Fehlfunktion wurden die Mechanismen genauer betrachtet, die die betreffende Funktion regulieren und steuern. Anschließend wurden gezielt Proteine der Regulation auf Gen- oder Proteinebene untersucht, wobei Untersuchungen zur Genexpression in kultivierten Zellen überwiegen [Nichols, 2006].

Im Gegensatz dazu war es der Ansatz dieser Arbeit, basierend auf einer Proteomanalyse von Zellmaterial, Proteine zu identifizieren, die in ihrer Expression unter  $\mu g$  verändert sind. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten, wenn möglich,

Ideen für Modelle und Mechanismen für eventuell auftretende Schädigungen/Erkrankungen/Fehlfunktionen entwickelt werden.

Untersucht wurden Schilddrüsenzellen (**Tab. 2**) die über verschiedene Zeiträume auf der Random Positioning Machine in simulierter  $\mu$ g und parallel in 1g Kontrollen kultiviert wurden. Für die Zelllinie ML-1 war ein Langzeitversuch über mehr als zehn Tage unter realer Schwerelosigkeit mit der für 2011 geplanten unbemannten chinesischen Weltraummission Shenzhou-8 geplant. Aus diesem Grund wurden für diese Zelllinie deutlich längere Zeiträume untersucht.

**Tab. 2: Zelllinien der Schilddrüse**

Zelllinie	Herkunft	siehe	Zeitpunkte
HTU-5	Schilddrüse, folliculäre Primärzelllinie [Curcio, 1994]	2.1.1	1d, 3d
CGTH W-1	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom, sternale Metastase [Lin, 1996]	2.1.2	1d, 3d
FTC-133	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom, mediastinale Lymphknotenmetastase [Goretzki, 1990]	2.1.3	1d, 3d
ML-1	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom, Schilddrüsentumor [Schönberger, 2000]	2.1.4	4h, 1d, 3d, 7d, 11d, 14d

Name und Herkunft der untersuchten Schilddrüsenzellen. Die dritte Spalte verweist auf das Unterkapitel im Kapitel Materialien und Chemikalien, in dem nähere Informationen zu finden sind. Abkürzungen: h - Stunde, d - Tag.

---

## Materialien und Chemikalien

---

### 2.1) Zelllinien

#### 2.1.1) HTU-5

Hierbei handelt es sich um folliculäre, humane Schilddrüsenzellen.

Die Zellen zeigen je nach Konfluenz verschiedenartige Morphologien, welche von der Proliferationsphase der Zellen abhängig sind. Bei nicht konfluentem Wachstum erscheinen die Zellen gestreckt und vereinzelt. Sobald die Zellen konfluent werden, verbreitern sie sich und zeigen ein dunkleres Cytoplasma und mehr Granula [Curcio, 1994].

Wachstumsbedingungen: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

Die Zelllinie wurde für die Durchführung der Versuche von Prof. Francesco Curcio, Universität Udine, Institut für Pathologie und Experimentelle Medizin, Italien, zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2) CGTH W-1

Die Zellen wurden aus der sternalen (Brustbein) Metastase eines folliculären Schilddrüsenkarzinoms einer 70-jährigen chinesischen Patientin isoliert. Es wurde beschrieben, dass die Zellen den IGF-1 Rezeptor exprimieren [Lin, 1996].

Es handelt sich um adhärenz in Monolayern wachsende große epitheliale Zellen [DSMZ, ACC 360].

Sie sind immunologisch negativ für Cytokeratin, Cytokeratin-7, Cytokeratin-8, Cytokeratin-17, Cytokeratin-18, Desmin, Endothel, EpCAM, GFAP, HMB-45, Neurofilament und Thyreoglobulin und positiv für Vimentin [DSMZ].

Wachstumsbedingungen: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

Die Zelllinie wurde von der DSMZ bezogen.

#### 2.1.3) FTC-133

Die Zellen wurden aus einer mediastinalen Lymphknotenmetastase eines folliculären Schilddrüsenkarzinoms eines 42-jährigen Patienten isoliert. Die Morphologie variiert von breiten, kantigen bis spindelförmigen Zellen. Es konnte Thyreoglobulin-Immunreaktivität im Cytoplasma gezeigt und der EGF Rezeptor auf der Zellmembran nachgewiesen werden [Goretzki, 1990].

Wachstumsbedingungen: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

Die Zelllinie wurde von Dr. Johann Schönberger für die Versuche zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.4) ML-1

Bei der ML-1 Zelllinie handelt es sich um folliculäre, humane Schilddrüsenkarzinomzellen.

Isoliert wurde diese Zelllinie aus einem Tumor einer 50-jährigen Patientin. Klassifiziert nach der „WHO International Histological Classification of thyroid tumors“ handelt es sich um ein niedrig differenziertes Schilddrüsenkarzinom, welches leicht eingekapselte follikuläre Strukturen sowie Bereiche von festen, papillären, wachsenden Schnüren zeigt.

Die Zellen wachsen als Monolayer und exprimieren über die 25. Passage hinaus zu >90 % intrazellulär angereichertes Thyreoglobulin und Chondroitinsulfat sowie zu 90 % Vimentin und >70 % Cytokeratin.

Darüber hinaus scheiden sie Thyreoglobulin, Chondroitinsulfat (s.o.) und Fibronectin sowie FT3 aus und sind in der Lage, Glucose und Iod zu verstoffwechseln.

Nach Implantation in Nacktmäuse bildeten sich im Implantationsbereich Tumore, die jedoch keine Metastasen ausbildeten [Schönberger, 2000].

Wachstumsbedingungen: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

Die Zelllinie stand nach Etablierung innerhalb der Arbeitsgruppe für die Versuche zur Verfügung.

### 2.1.5) Kulturmedien und Kulturreagenzien

#### Basalmedien

RPMI Medium 1640	Roswell Park Memorial Institute Media 1640, GIBCO
HAM's F-12	GIBCO

#### Kulturreagenzien

FCS	Fetal Calf Serum, Biochrom
P/S	Penicillin/Streptomycin, 10.000 E/10.000 µg/ml, Biochrom
Trypsin	Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin with EDTA 4Na), GIBCO
ECGS	bovine hypothalamus extract, 3 µg/µl, Promocell
BPE	bovine pituitary extract, Provitro/Sigma
Transferrin	Provitro/Sigma
Insulin	Provitro/Sigma
T <sub>3</sub>	Provitro

#### Medium für HTU-5

10	%	FCS
1	%	P/S
500	µl	Supplement-Mix
		HAM's F-12

Supplement-Mix: 500 µl ECGS, 500 µl BPE, 125 µl Transferrin, 125 µl Insulin, 90 µl T<sub>3</sub>

Trypsin für HTU-5

100	µl	Collagenase Type II, 10.000 u/ml
1	ml	Chicken Serum
100	ml	Trypsin/EDTA (0,05%)

Medium für ML-1, CTGW und FTC-133

10	%	FCS
1	%	P/S
RPMI Medium 1640		

**2.2) Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bezeichnung
<b>Autoklav</b>	System	5050ELV
<b>Brutschrank</b>	Heraeus	Function Line
<b>Deckgläschen</b>	Menzel-Gläser	Deckgläser 24x60 mm
<b>Eismaschine</b>	Scotsman	AF-20
<b>FACS-Röhrchen</b>	Sarstedt/BD	Röhrchen 5 ml, 75x12 mm, PS
<b>Feinwaage</b>	Sartorius	1602 MF
<b>Flasketten</b>	Nunc	Lab-Tek Flaskette
<b>Gelelektrophorese- kammer</b>	BioRad	Mini-Protean 3 System
<b>Tube</b>	Sarstedt/BD	15 ml, 50 ml
<b>Kryo-Einfrierröhrchen</b>	Simport	Cryovial PK-100
<b>Luminometer</b>	BioRad	Microplate Reader
<b>Magnetrührer</b>	IKA	Combimag Rot
<b>Mikroskop</b>	Olympus	CK2-TRP
<b>Netzgerät</b>	BioRad	Power Pac HC 300W
<b>Nitrozellulose-Membran</b>	Whatman Schleicher & Schuell	Optitran BA 85 NC
<b>Parafilm</b>	Pechiney	Parafilm
<b>Pasteurpipette</b>	VWR	Glaspasteurpipetten
<b>pH-Meter</b>	WTW	pH 526
<b>Photometer</b>	BioRad	Microplate Reader
<b>Pipet boy</b>	Brand	Accujet
<b>Pipetten</b>	Eppendorf	Research 0,1-2,5µl; 2-20 µl; 10-100µl; 100-1000 µl
<b>Pipettenspitzen</b>	Eppendorf	1-1000 µl
<b>Reaktionsgefäße</b>	Eppendorf	0,5 ml; 1,5 ml und 2 ml
<b>Reinstwasseranlage</b>	Membra Pure	OPTILAB Lab Lifescience
<b>Röntgenfilm</b>	GE Health Care	Amersham Hyperfilm™ ECL
<b>Röntgenfilm- Entwicklermaschine</b>	MS Laborgeräte	Optimax
<b>RPM</b>	EADS/Astrium	Desktop RPM
<b>Scanner</b>	Lexmark	X74

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bezeichnung
Schüttler	CAT	RM S
Slides	BD	Culture Slide, 8 Chamber
Sterilbank	Heraeus	Hera Safe
Sterilfilter	Whatman Schleicher & Schuell	FP 30/0,2 CA-S
Stickstofftank	Cryo Solutions	CryoSystem 2000
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer comfort
Vortexer	Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Waage	Sartorius	CF
Wasserbad	Unitherm	WA
Western Blot Kammer	BioRad	Mini Trans-Blot Cell
Whatman Papier	Sartorius	Blotting-Paper Sheets
Zellkultur	Sarstedt  Nunc/BD BD	Zellkultur-Flaschen mit rotem Deckel und Belüftungsfunktion (T25,T75,T175) 96-well Platte Zellschaber
Zentrifugen	Eppendorf Eppendorf	Tischzentrifuge 5417R Centrifuge 5810

### 2.3) Chemikalien

Kurzbezeichnung	Bezeichnung	Hersteller
AA	Acrylamid, >98%, 2x krist., reinst	Carl Roth
Annexin V-Färbung	Annexin V-FITC Detection Kit	BD Pharmingen
APS	Ammonium Persulfat	Carl Roth
b-Mercaptoethanol	b-Mercaptoethanol	Sigma
BC Assay	Protein quantitation kit	uptima
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	Carl Roth
Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Carl Roth
BPB	Bromphenolblau	Biomol
BPE	Bovine pituitary extract	Provitro/Sigma
BSA	Albumin Fraktion V	Carl Roth
Chicken Serum	Chicken Serum	GIBCO
Collagenase	Type II	GIBCO
DMSO	Dimethylsulfoxid	Carl Roth
ECGS	Bovine hypothalamus extract	Promocell
EtOH	Ethanol, vergällt	
EtOH abs	Ethanol 100 %, zur Analyse	Merck
FCS	Fetal Calf Serum	Biochrom AG
Glycin	Glycin	Carl Roth
Glycerin	Glycerin, 86%	Carl Roth
Ham's F-12	Ham's F-12 Basalmedium	GIBCO
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution	GIBCO
Insulin	Insulin	Provitro/Sigma
Isopropanol	2-Propanol	Carl Roth

Kurzbezeichnung	Bezeichnung	Hersteller
Kana	Kanamycin	Biochrom AG
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
MeOH	Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Skim Milk Powder	Fluka
NaCl	Natriumchlorid	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	
Page Ruler	Protein Marker	Fermentas
PBS	w Ca <sup>2+</sup> /w Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG
PBS	w Ca <sup>2+</sup> /w Mg <sup>2+</sup> /w.o. Ca <sup>2+</sup> /w.o. Mg <sup>2+</sup>	GIBCO
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin 10.000 E/10 mg/ml	Biochrom AG
PEP	Pepstatin	Carl Roth
PFA	Paraformaldehyd	Merck
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma
RPMI 1640	Rosswell Park Memorial Institute Media 1640	GIBCO
SDS	Natriumdodecylsulfat	Carl Roth
HRP Reagenz	Super Signal West Pico	PIERCE
T3	Triiodthyronin	Provitro
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Carl Roth
Transferrin	Transferrin	Provitro/Sigma
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Carl Roth
Triton X-100	Octylphenol-polyethylenglycol	Sigma
Trypsin-EDTA	0,05% Trypsin with EDTA 4Na	GIBCO
Tween 20	Polyoxyethylen(20)sorbitan	BioRad/Carl Roth

## 2.4) Antikörper

Die verwendeten Antikörper können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Entsprechend den angegebenen Verdünnungen wurden die Antikörper in der Western Blot Analyse in 5 ml 0,1% TBS-T eingesetzt.

Primäre Antikörper  
ABR: Affinity BioReagents

Antikörper	M/R/G	Verdünnung	Artikel-Nr.	Firma
pan-Aktin	R	1:500	#4968	Cell Signaling
Annexin1	R	1:200	sc-11387	Santa Cruz
Annexin2	R	1:200	sc-9061	Santa Cruz
EF1-α1	R	1:200	sc-28578	Santa Cruz
α-Enolase	G	1:500	sc-7455	Santa Cruz
GAPDH	M	1:1.000	MA1-22670	ABR
GRP78	R	1:200	sc-13968	Santa Cruz
GSTP1	M	1:200	sc-66000	Santa Cruz
HSC70	R	1:200	sc-1059-R	Santa Cruz
Myosin-9	R	1:1.000	M8064	Sigma

nm23-H1	M	1:200	sc-56928	Santa Cruz
PKM2	M	1:200	sc-100538	Santa Cruz
PGK1/2	M	1:2.000	sc-48342	Santa Cruz
PRXI/II	R	1:200	sc-33571	Santa Cruz
TIM	R	1:200	sc-30145	Santa Cruz
$\beta$ -Tubulin	M	1:100	T5293	Sigma
Vimentin	M	1:200	V2258	Sigma

Sekundäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bemerkung</b>
anti mouse (Chemicon)	1:5.000	Erkennt alle Mausantikörper, AP-gekoppelt
anti rabbit (Chemicon)	1:5.000	Erkennt alle Kaninchenantikörper, AP-gekoppelt
anti goat (Chemicon)	1:5.000	Erkennt alle Ziegenantikörper, AP-gekoppelt
anti mouse (Dako)	1:5.000-10.000	Erkennt alle Mausantikörper HRP-gekoppelt
anti rabbit (Dako)	1:5.000-10.000	Erkennt alle Kaninchenantikörper, HRP-gekoppelt
anti goat (Santa Cruz)	1:5.000-10.000	Erkennt alle Ziegenantikörper, HRP-gekoppelt

**2.5) Lösungen**

**AA/BAA Lösung**

Lagerung: 4°C  
500 ml

30	%	Acrylamid (AA)	150	g
1	%	Bis-Acrylamid (BAA)	5	g
ad 500 ml dd H <sub>2</sub> O				

**BCIP/NBT-Lösung**

Lagerung: 4°C, dunkel

208,1	mg	BCIP
417	mg	NBT
30	ml	MeOH
2N NaOH (à pH auf 9,5)		
ad 1 l 1x TBS-T		

**Block-Puffer**

Lagerung: 4°C  
500 ml

3	%	BSA	15	g
ad 500 ml 1x TBS-T				

**Lysepuffer-Stammlösung**

Lagerung: 4°C  
100 ml

1	%	Triton X-100	1	ml
0,1	%	SDS (20% Stock)	500	$\mu$ l
150	mM	NaCl	0,88	g
50	mM	Tris-HCl pH 7,2	5	ml
ad 100 ml dd H <sub>2</sub> O				

**10x PBS**

Lagerung: RT  
1l 2l

1,37	M	NaCl	80,15	g	160,30	g
14,7	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0	g	4,0	g
78,1	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,09	g	22,18	g
26,8	mM	KCl	2,0	g	4,0	g
ad 1l/2l dd H <sub>2</sub> O						

**Probenpuffer**

Lagerung: RT

50 ml

125	mM	Tris-HCl pH 6,8 (1M Stock)	6,25	ml
30	%	Glycerin (86%)	17,4	ml
10	%	SDS w/v	5,0	g
0,012	%	Bromphenolblau	6,0	mg
ad 50 ml dd H <sub>2</sub> O				

**10x Runnig Buffer**

Lagerung: RT

2l

		Tris-HCl	60,0	g
		SDS	20,0	g
		Glycin	288,0	g
ad 2l dd H <sub>2</sub> O				

**Sammelgel-Puffer (UT)**

Lagerung: RT

1l

0,5	M	Tris-HCl	60,57	g
0,4	%	SDS	4,0	g
ad 800 ml dd H <sub>2</sub> O, pH 6,8, ad 1l dd H <sub>2</sub> O				

**10xTBS**

Lagerung: RT

0,5l

1l

		Tris-HCl	30,5	g	61,0	g
		NaCl	45,0	g	90,0	g
ad 400/800 ml dd H <sub>2</sub> O, pH 7,6, ad 0,5/1l dd H <sub>2</sub> O						

**TBS-T**

Lagerung: RT (wash, Block und AK für Blots)

0,5l

1	x	TBS	500	ml
0,1	%	Tween	500	µl

**4x Transfer Puffer**

Lagerung: RT (zur besseren Kühlung bei Blotten: 4°C)

2l

		Tris-HCl	19,38	g
		Glycin	90,0	g
		MeOH	400	ml
ad 2l dd H <sub>2</sub> O				

**Trenngel-Puffer (LT)**

Lagerung: RT

1l

1,5	M	Tris-HCl	181,71	g	
0,5	%	SDS	5,0	g	(oder 25 ml 20% Stocklsg.)
ad 800 ml dd H <sub>2</sub> O, pH 8,8, ad 1l dd H <sub>2</sub> O					

---

## Methoden

---

### 3.1) Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1) Kultivierung der Zelllinien

Die unter Punkt 2.1 genannten Zelllinien sind adhärenz als Monolayer wachsende Zellen. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Passagiert wurden die Zellen bei Konfluenz.

#### 3.1.2) Passagieren der Zellen

Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS (w.o.  $\text{Ca}^{2+}$ /w.o.  $\text{Mg}^{2+}$ ) gespült und anschließend die Zellen je nach Kulturflaschengröße mit 1, 2 oder 3 ml Trypsin für etwa 15 Minuten bei RT, bei sehr langsamen Lösen im Brutschrank bei 37 °C, inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Zellsuspension mit Medium versetzt und ein Teil zur weiteren Kultivierung nach Zentrifugation (5 Minuten, 1.500 rpm) und Resuspension des Zellpellets in frischem Medium in eine neue Kulturflasche (T175 oder T75) mit vorgelegtem Medium überführt.

Der Rest der Zellsuspension wurde zur weiteren Verwendung ausgesät oder als Kryokultur eingefroren.

#### 3.1.3) Herstellung von Zell-Kryokulturen

Die Zellen wurden passagiert und die Zellsuspension 10 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium mit 20 % FCS 10 % DMSO resuspendiert. Je 1,5 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert, die Röhrchen für 2 Stunden bei -20 °C, ÜN bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

#### 3.1.4) Aussaat der Zellen in Kulturflaschen

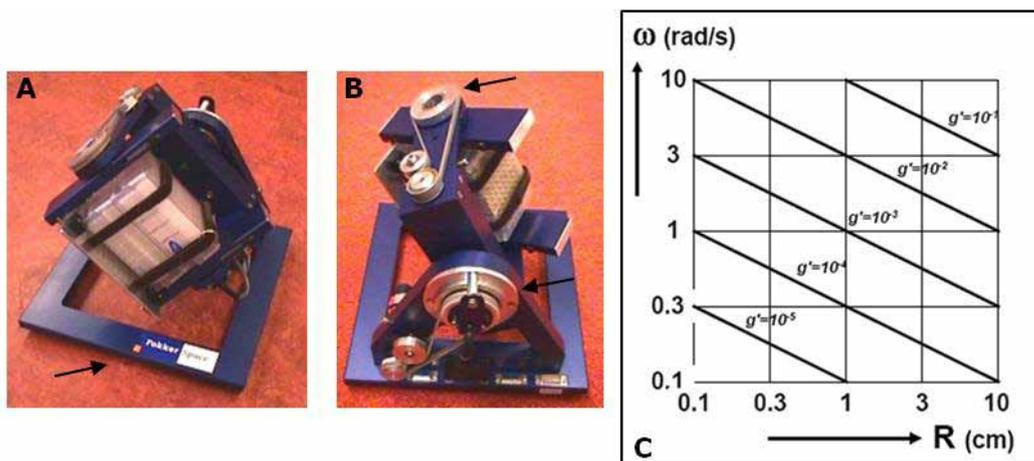
Die Zellen wurden passagiert und die Zellsuspension 10 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und auf die gewünschte Anzahl an Kulturflaschen (T25) für die Versuche aufgeteilt.

#### 3.1.5) Random Positioning Machine (RPM)

Die „Random Positioning Machine“ (RPM) wurde in den 90er Jahren von Hoson et al. entwickelt, um simulierte Schwerelosigkeit zu erzeugen und deren Einfluss auf das Wachstum verschiedener Pflanzen zu untersuchen [Hoson, 1992]. Vertrieben wird die RPM von EADS/Astrium, Leiden, NL. Sie ist ungefähr 100 cm x 100 cm x 100 cm (Breite x Höhe x Tiefe) groß und wird in beheizbaren Räumen, in denen die für die Kultivierung von Zellen notwendige Temperatur von 37 °C gewährleistet ist, betrieben. Ein solches Gerät steht im Labor der Space Biology Group der ETH Zürich [Grimm, 2002].

Seit 2000 ist von EADS/Astrium ein kleineres Gerät (30 cm x 30 cm x 30 cm, Breite x Höhe x Tiefe), die Desktop RPM, erhältlich, die in einem handelsüblichen Brutschrank betrieben werden kann (**Abb. 7**).

Zwei unabhängig voneinander und senkrecht zueinander rotierende Rahmen bewegen ein Versuchsobjekt um den Schwerkraftvektor der Erde herum. Das Versuchsobjekt wird dafür so im inneren Rahmen befestigt, dass es so nahe wie möglich im Rotationszentrum platziert ist. Beide Rahmen werden von einem Computer gesteuert mit konstanter Winkelgeschwindigkeit und zufälligen Richtungswechseln der Rotation bewegt (**Abb. 7A+B**). Infolge dieser Richtungswechsel wirkt auf das Versuchsobjekt eine simulierte Schwerelosigkeit ( $\mu g$ ). Diese ergibt sich als Summe aus den Vektoren der Erdanziehung, die aus unterschiedlichen Richtungen auf das Versuchsobjekt einwirken. Je näher zum Zentrum der Rotation das Versuchsobjekt positioniert ist, desto geringer ist die resultierende Schwerkraft  $g'$ /simulierte Schwerelosigkeit (**Abb. 7C**) [Huijser, 2000].



**Abb. 7: Desktop RPM der Firma Dutch EADS/Astrium, Leiden, NL [nach: Huijser, 2000]**

- Frontansicht der RPM, der Pfeil deutet auf das Gestell.
- Rückansicht der RPM, die Pfeile zeigen auf die Gelenke, mit denen die die zwei Gelenkrahmen bewegt werden.
- Diagramm zur einfachen Bestimmung der relativen Schwerkraft  $g'$  in Abhängigkeit zur Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  und zum Abstand  $R$  zum Zentrum.

Kulturflaschen, in denen am Tag zuvor  $10^6$  Zellen ausgesät wurden, wurden, wenn die Zellen einen subkonfluenten Monolayer bildeten, vollständig mit Medium gefüllt (ungefähr 80 ml) und luftblasenfrei verschlossen.

Die gefüllten Kulturflaschen wurden mit Parafilm abgedichtet, wobei darauf geachtet wurde, dass der Belüftungsdeckel, ausgestattet mit einer unbenetzbaren  $0,2 \mu\text{m}$  hydrophoben Filtermembran für den Gasaustausch, nicht mit Parafilm bedeckt wurde.

Anschließend wurden maximal 15 Kulturflaschen (T25) auf der Experimentplattform im inneren Gelenkrahmen mit Paketklebeband befestigt und die Rotation gestartet.

Für Experimente mit einer Dauer von länger als 5 Tagen wurde das Medium ab dem 5. Tag alle 3 Tage teilweise ausgetauscht. Dazu wurden die Kulturflaschen kurzzeitig von der RPM genommen, gebildeten Sphäroiden etwa 5 Minuten Zeit zum Absinken in der aufrecht gestellten Kulturflasche gegeben und rund 30 ml Medium durch frisches Medium ersetzt. Luftblasenfrei verschlossen und wie zuvor mit Parafilm abgedichtet wurden die Kulturflaschen wieder auf der RPM befestigt und die Rotation fortgesetzt. Parallel zu den Kulturflaschen auf der RPM ( $\mu\text{g}$ ) wurde dieselbe Anzahl an Kulturflaschen als Bodenkontrolle (1g) inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte zeitgleich zum Mediumwechsel der  $\mu\text{g}$ -Proben.

#### Zeitverläufe und Anzahl der Kulturflaschen (T25)

HTU-5/CGTH W-1/FTC-133	1d, 3d
ML-1	4h, 1d, 3d, 7d, 11d, 14d
Jeweils für 1g- und $\mu\text{g}$ -Proben.	
Annexin V u. $\text{O}_2$ -Messung	je Zeitpunkt n=5
Proteomanalyse	je Zeitpunkt n=5, wobei 2 Kulturflaschen in je ein 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß vereinigt wurden
WB	je Zeitpunkt n=5, wobei 2 Kulturflaschen in je ein 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß vereinigt wurden

#### **3.1.6) Sauerstoffsättigung**

Zur Messung des Sauerstoffgehaltes der Zellkulturmedien wurde ein Blutgasanalysator der Firma Radiometer (ABL 555) verwendet.

Zur Messung wurden die Zellkulturflaschen von der RPM ( $\mu\text{g}$ ) genommen und zusammen mit den Kulturflaschen der Bodenkontrolle (1g) ungeöffnet zum Blutgasanalysator gebracht. Dort wurde mit einer Spritze durch den Deckel einer Zellkulturflasche Medium entnommen und unverzüglich in den Blutgasanalysator injiziert. Je Messung/Zellkulturflasche wurde ein Parameterbericht gedruckt, dem unter anderem die Partialdrücke von  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  sowie die berechnete Sauerstoffsättigung zu entnehmen war.

#### **3.1.7) Probenvorbereitung für FF-IEF und Western Blot Analyse**

Die Kulturflaschen der Versuche wurden von der RPM ( $\mu\text{g}$ ) genommen und zusammen mit den Kulturflaschen der Bodenkontrolle (1g) in die Sterilbank gestellt.

Die nach 3 Tagen unter  $\mu\text{g}$  gebildeten Sphäroide wurden nach Absinken auf den Boden der Kulturflaschen und nach Absaugen des Mediums bis auf ungefähr 5 ml in diesem resuspendiert und in einem 50 ml Tube gesammelt. Die adhärenen Zellen der  $\mu\text{g}$ - und der 1g-Proben wurden mit 1 ml Trypsin gelöst und ebenfalls in 50 ml Tubes gesammelt.

Nach Zentrifugieren für 10 Minuten bei 3.000 rpm und RT wurden die Zellpellets in 1,5 ml PBS resuspendiert und in beschriftete Eppendorfreaktionsgefäße überführt.

Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C wurden die Flüssigkeit entfernt, die Eppendorfreaktionsgefäße im Deckel mit einer Kanüle eingestochen und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 3.1.8) Durchfluszytometrie

Trifft Licht auf eine Oberfläche wird es in Abhängigkeit der Oberflächenbeschaffenheit reflektiert. Diese Eigenschaft des Lichtes wird bei der Durchfluszytometrie dazu genutzt, um verschiedene Eigenschaften wie Größe und Granularität von Zellen zu detektieren und zu analysieren.

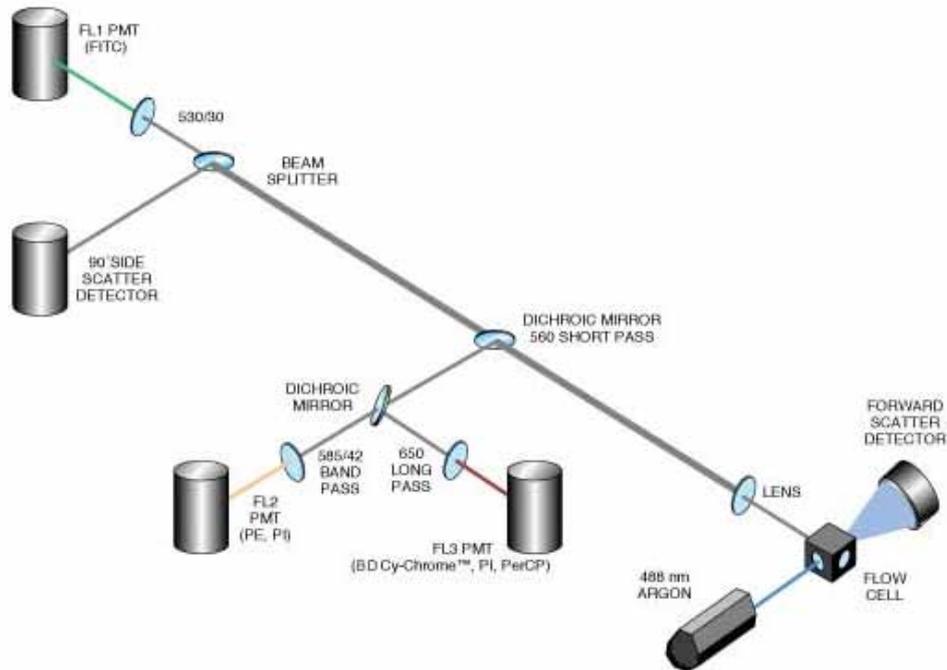
Den schematischen Aufbau eines Durchfluszytometers mit einer Strahlungsquelle zeigt **Abbildung 8**. Als Strahlungsquellen werden Laser verwendet, die monochromatisches Licht einer definierten Wellenlänge abstrahlen.

Trifft der Lichtstrahl auf eine Zelle, wird ein Großteil des Lichts nur geringfügig gebeugt und ist in Richtung des Laserstrahls detektierbar. Dieser Anteil wird Vorwärtsstreulicht („forward scatter“, FSC) genannt und seine Intensität ist proportional zur Größe einer Zelle. Darüber hinaus wird ein weiterer Teil des eingestrahnten Laserlichtes aufgrund der Granularität einer Zelle in einem deutlich größeren Winkel gestreut. Dieses Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC) wird senkrecht zum Strahlengang des Laser detektiert. Mit Hilfe der so gewonnenen Daten ist es möglich, in einem Gemisch aus Zellen einzelne Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden.

Um von Zellgröße und –granularität unabhängige Eigenschaften einer Zelle zu untersuchen, werden mit Fluorochromen gekoppelte Antikörper oder Fluoreszenzfarbstoffe mit besonderen Eigenschaften verwendet. Nach Anregung des Fluorochroms mit dem monochromatischen Laserlicht wird das Emissionsspektrum, das in alle Richtungen abgestrahlt wird, detektiert.

Eingesetzt werden verschiedene Fluorochrome (**Tab. 3**), die entsprechend der Kompatibilität ihrer Absorptionsspektren mit dem verwendeten Laser ausgewählt werden. Ein weiteres Kriterium ist die Unterscheidbarkeit der Emissionsspektren, wenn zwei oder mehr Farbstoffe parallel für eine Probe verwendet werden.

Mit Hilfe von verschiedenen Filtern (Bandpass Filter, Longpass Filter, Shortpass Filter) werden die emittierten Strahlen ihrer Wellenlänge nach sortiert und mit Photomultipliern detektiert (FL1, FL2, FL3), die, wie der Detektor für das Seitwärtsstreulicht, senkrecht zum Strahlengang des Lasers liegen.



**Abb. 8: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers [nach: BD]**

Die Strahlungsquelle ist ein Argonlaser, der Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert.

Entlang der Achse des Lasers wird das Vorwärtsstreulicht (FSC) detektiert.

Senkrecht zum Strahlengang des Lasers trifft das Licht auf einen Shortpass Filter 560, der Licht mit einer Wellenlänge kleiner 560 nm passieren lässt. Dieses trifft auf einen Spiegel, der den Lichtstrahl teilt. Ein Teil wird zur Detektion des Seitwärtsstreulichts (SSC) zum SSC-Detektor geleitet. Der andere Teil trifft auf einen Bandpass Filter 530/30, der Licht mit einer Wellenlänge von  $(530 \pm 30)$  nm passieren lässt, und nachfolgend auf den FL1-Detektor.

Wellenlängen größer 560 nm werden von dem Shortpass Filter 560 reflektiert und treffen auf einen Spiegel, der den Lichtstrahl teilt. Ein Teil trifft auf einen Bandpass Filter 585/42, der Licht mit einer Wellenlänge von  $(585 \pm 42)$  nm passieren lässt. Hinter dem Filter wird der Lichtstrahl mit dem FL2-Detektor gemessen. Der andere Teil des Lichtstrahls trifft auf einen Longpass Filter 650 nm, der alle Wellenlängen größer 650 nm passieren lässt. Diese werden mit dem FL3-Detektor detektiert.

Zur Identifizierung der Zellpopulation werden in einem FSC-SSC-Histogramm alle detektierten Signale von ungefärbten Zellen dargestellt. Die gemessene Fluoreszenz wird in einem FLX-count-Histogramm (ein Farbstoff) oder einem FLX-FLY-Dot Plot (zwei Farbstoffe) angezeigt, wobei FLX und FLY für FL1, FL2 oder FL3 stehen und in Abhängigkeit von den eingesetzten Fluorochromen gewählt werden. Zur Abgrenzung von unspezifischen Bindungen und der Eigenfluoreszenz wird eine Probe von Zellen vermessen, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurde oder unbehandelt ist (Leerprobe).

Der Bereich im FLX-count-Histogramm und FLX-FLY-Dot Plot der Leerprobe wird zur Auswertung markiert („gagatet“). Alle Signale rechts von diesem Gate im

Histogramm/Dot Plot sind positiv in Bezug auf das eingesetzte Fluorochrom. Diese positiven Zellen werden in Prozent angegeben.

**Tab. 3: Beispiele für Fluorochrome**

Abkürzung	Name/Struktur	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	495	519
	Alexa Fluor 350 <small>(Molecular Probes)</small>	343	442
PI	Propidiumiodid	550	650
	Hoechst 33342	343	483
AO	Acridine Orange	503	530/640 <small>(DNA/RNA)</small>

### 3.1.8.1) Annexin V-Färbung

Das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) wird in einer frühen Phase der Apoptose von der inneren auf die äußere Seite der Plasmamembran translokalisiert. Annexin V, das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig in der Lage ist Phospholipide zu binden, kann somit zur Detektion der frühen Apoptose genutzt werden. Ist an Annexin V das Fluochrom FITC gekoppelt, kann die Detektion und Quantifizierung von Zellen, die sich im Stadium der frühen Apoptose befinden, mit einem Durchflusszytometer erfolgen.

In der späten Apoptose und in der Nekrose geht die Integrität der Membran vollständig verloren, sodass diese Zellen mit dem Fluorochrom PI, das in die DNA interkaliert, angefärbt werden können.

Werden beide Fluorochrome zeitgleich eingesetzt, können vier Zellpopulationen in frisch geernteten Zellsuspensionen unterschieden werden: I) lebende Zellen (FITC und PI negativ), II) Zellen in früher Apoptose (FITC positiv und PI negativ), III) Zellen in später Apoptose (FITC und PI positiv), IV) tote Zellen (FITC negativ und PI positiv) (**Abb. 17A**).

#### Durchführung

Zur Durchführung der Färbung wurde das Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit der Firma BD Pharmingen verwendet.

Die Zellen wurden mit Trypsin vom Boden der Kultflaschen (T25) gelöst und mit PBS in 15 ml Tubes überführt. Nach Zentrifugieren für 10 Minuten bei 1.500 rpm und RT wurden die Pellets in je 500  $\mu\text{l}$  1x Binding Buffer resuspendiert und 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension (mehr als  $2 \cdot 10^5$  Zellen je 100  $\mu\text{l}$ ) in FACS-Röhrchen vorgelegt. In jedes FACS-Röhrchen wurden je 5  $\mu\text{l}$  der Annexin V-FITC-Lösung und PI-Lösung des Kits zugefügt. Inkubiert wurde für 15 Minuten im Dunkeln bei RT.

Nach beendeter Inkubation wurden 400  $\mu\text{l}$  1x Binding Buffer je FACS-Röhrchen zugegeben und die Proben mit einem FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson und der Software CellQuest™ Pro gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Cyflogic™, CyFlo Ltd, Finnland. Die gewonnenen Werte wurde im Folgenden statistisch ausgewertet (vgl. 3.3).

## 3.2) Proteinchemische Methoden

### 3.2.1) Proteomanalyse

Im Bereich der Proteomanalyse ist die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie die am häufigsten genutzte Methode. Die mit dieser Methode untersuchten Experimente umfassen mehrere Schritte, in denen ausgehend vom Probenmaterial Proteine isoliert, diese aufgearbeitet und analysiert werden [Cravatt, 2007]. Mit der Einführung und Weiterentwicklung kommerziell erwerblicher Systeme für die Trennung und Reinigung von Proteinen konnte die Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit von Analysen mit dieser Methode gesteigert werden [Krause, 2006].

#### 3.2.1.1) Isoelektrische Fokussierung (Free Flow Isoelectric Focusing, FF-IEF)

Bei der Free Flow Isoelectric Focusing (FF-IEF) Elektrophorese werden Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) getrennt [Burggraf, 1995].

Zwischen zwei Platten im Abstand von 0,1-0,5 mm wird mit einem kontinuierlich laufenden Trennpuffer ein laminarer Strom erzeugt. Senkrecht zu diesem Strom wird mit zwei Elektroden ein elektrisches Feld aufgebaut. Im vorderen Teil wird das Proteingemisch bei horizontaler Lage der Elektrophoresekammer kontinuierlich in den laminaren Strom injiziert. Am Ende der Elektrophoresekammer wird der laminare Strom in 96 Kapillaren geleitet und als einzelne Fraktionen in einer 96-well Platte aufgefangen (**Abb. 9**).

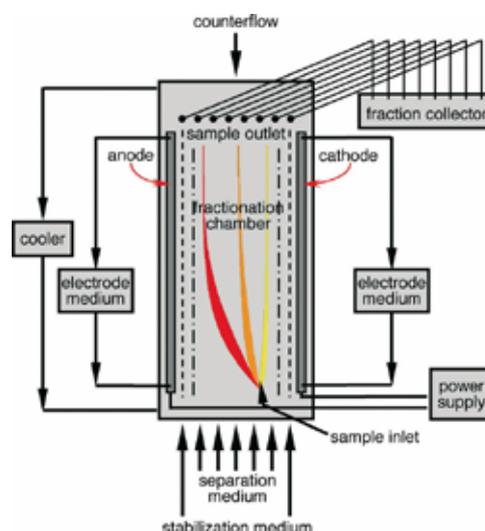
Für die isoelektrische Fokussierung der Proteine ist in der Trennkammer ein pH-Gradient nötig. Um diesen aufzubauen, werden mehrere Trennpuffer mit von der Anode zur Kathode steigendem pH nebeneinander zwischen die zwei Platten geleitet, wobei darauf geachtet wird, dass auch an den Übergängen von einem zum anderen Medium der laminare Fluss des Mediums aufrecht erhalten wird [Bauer, 1996]. Wenn zwischen Anode und Kathode ein elektrischer Gleichstrom angelegt wird, entsteht während des Flusses der unterschiedlichen, aneinander grenzenden Medien durch die Trennkammer aus dem ursprünglichen Stufengradient ein linearer [Fig. 1, Pietsch, 2010]. Wird in den mittleren Puffer bei pH 7 ein Proteingemisch eingebracht, so wandern die Proteine entsprechend ihrer Ladung bei pH 7 zur Anode oder zur Kathode. Auf ihrer Wanderung zu den jeweiligen Elektroden kommen die Proteine in Kammerzonen, wo der pH Wert des Trennmediums ihrem jeweiligen pI ähnlich wird. Dadurch wird die Netto-Ladung der Proteine erniedrigt und ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld verlangsamt. Erreichen die Proteine Kammerzonen, in denen der pH Wert des Trennpuffers ihre Netto-Ladung auf null reduziert (isoelektrischer Punkt, pI), kann elektrischer Strom sie nicht weiter bewegen und sie werden mit dem Trennpuffer ausgespült [BD; Obermaier, 2005]. Damit

möglichst alle Proteine Kammerzonen erreichen, in denen der pH Wert des Trennpuffers ihrem pI entspricht bevor der Puffer die Trennkammer wieder verlässt, werden Spannungen von ca. 50 V/cm angelegt und die Trennmediumgeschwindigkeit optimiert.

Fließt elektrischer Strom durch eine Flüssigkeit wird Wärme erzeugt. Die Menge der erzeugten Wärme ist abhängig von der Stromstärke (I). Wenn elektrischer Strom mit einer Spannung von 500 V über einen 10 cm breiten und 0,5 mm dicken Flüssigkeitsfilm angelegt wird, muss das System gekühlt werden. Die benötigte Kühlleistung kann gering gehalten werden, wenn bei gegebener Spannung der Elektronenfluss niedrig gehalten wird, d.h. wenn ein Trennpuffer verwendet wird, der wenige Ionen enthält und daher einen hohen elektrischen Widerstand hat. Allerdings brauchen viele Proteine Ionen, um in Lösung zu bleiben. Für die FF-IEF wurden daher Trennpuffer entwickelt, die einerseits hohe elektrische Widerstände haben und andererseits auch Membranproteine in Lösung halten können. Ein wichtiger Bestandteil dieser Puffer sind Substanzen, welche den jeweiligen pH Wert gut stabilisieren können, aber gleichzeitig wenig zu der Leitfähigkeit des Puffers beitragen. Die Substanzen wurden ursprünglich von Milan Bier beschrieben [Bier, 1993].

An den Elektroden entstehen häufig Elektrolyseprodukte. Um einen nachteiligen Einfluss der Elektrolyseprodukte auf die Proben zu verhindern, werden Elektrodenkammern und Trennkammer 1.) durch eine Membran und 2.) durch so genannte Randpuffer oder „Stabilization media“ voneinander getrennt. Sie haben den jeweils höchsten, beziehungsweise niedrigsten pH Wert und decken an der Anode und Kathode einen Bereich von ungefähr 25 Fraktionen ab [Fig. 1, Pietsch, 2010]. Diese Puffer weisen auch eine erhöhte Leitfähigkeit auf, um den Strom möglichst nahe an die Proben zu leiten, ohne dass Wärme produziert wird.

Der Counterflow (**Abb. 9**, oben im Bild) dient dazu, ein gleichmäßiges Sammeln der Fraktionen zu gewährleisten und Totvolumina zu vermeiden [Weber, 1996].



**Abb. 9:** BD™ Free Flow Elektrophorese (FFE) System [nach: BD]

### Durchführung

Die Herstellung der Lysate von Zellmaterialien (vgl. 3.1.6) und die Durchführung der FF-IEF erfolgte durch die Mitarbeiter der Firma Becton Dickinson, Martinsried.

Die Zellyse wurde durch Bestrahlung der intakten Zellen mit Ultraschall durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die Zellen aufgeschlossen und die cytosolischen Proteine in den Überstand freigesetzt. Diejenigen Proteine, die mit einer gewissen Festigkeit an Zellmembranen gebunden sind, bleiben an den Zellfragmenten haften. Im Überstand gelöste und an Membranen assoziierte Proteine können mittels Zentrifugation voneinander getrennt werden.

Im ersten Schritt wurden die Zellen in 0,5 ml HEPES Puffer (10 mM HEPES, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,2 % DTT, Proteaseinhibitor (Complete Mini, Roche)) aufgenommen und für 30 sec auf Eis mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (30 Minuten, 15.000 rpm, 4°C) wurde der Überstand gesammelt und das Pellet der Zellfragmente im zweiten Schritt verwendet (s.u.). Mit Ultrafiltration wurde der HEPES Puffer durch Lysepuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 1 % ASB-14, 10 mM DTT) ersetzt.

Für den zweiten Schritt wurden die Zellfragmente mit Lysepuffer, der Detergenzien enthielt, aufgelöst und so die ursprünglich noch gebundenen Proteine in Suspension gebracht. Das jetzt noch ungelöste Material wurde zum Schluss per Zentrifugation (60 Minuten, 15.000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Anschließend lagen das Cytosol-Lysat und das Lysat der Zellfragmente (Pellet-Lysat) getrennt vor.

Die Konzentration für das Cytosol- und das Pellet-Lysat wurde auf 1 mg/ml eingestellt.

In der folgenden FF-IEF wurden je Lysat in unabhängigen Läufen 100 µl eingesetzt.

Zur Durchführung der FF-IEF wurde das BD™ FFE Kit IEF ThUM 4-9 verwendet. Der Trennpuffer enthielt neben Ampholyten zur Einstellung der pH-Werte 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff und 250 mM Mannitol. Der laminare Fluss betrug 60 ml/h und das Lysat wurde mit 1 ml/h injiziert. Die Elektrophorese wurde mit konstant 250 V bei 10 °C durchgeführt. Die Trennung dauerte je Lauf ungefähr 30 Minuten. Gesammelt wurden über den gesamten pH-Bereich 96 Fraktionen für ungefähr 6 Minuten.

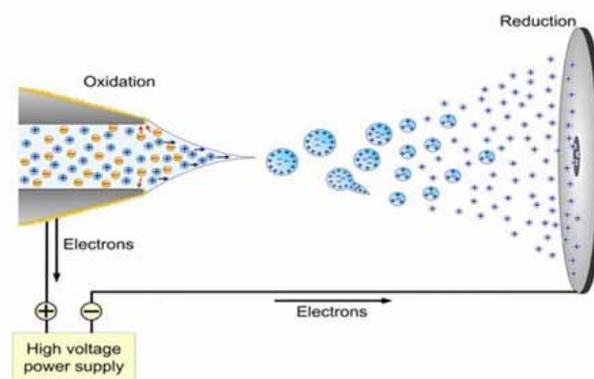
Jede zweite der erhaltenen FF-IEF-Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Xcell SureLock Mini-Cell, Invitrogen) aufgetrennt und mit SilverQuest (Invitrogen) gefärbt. Ausgewählte FF-IEF-Fraktionen wurden in einer weiteren SDS-PAGE erneut aufgetrennt und mit Comassie Brilliant Blau G-250 (Bio-Rad) gefärbt, ausgewählte Banden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

### 3.2.1.2) nano-LC-MS/MS

Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) werden ionisierte, gasförmige Moleküle in einem elektrischen Feld oder Magnetfeld aufgrund ihres Masse-zu-Ladung ( $m/z$ )-Verhältnisses getrennt. Die Ionisierung des Probenmaterials kann durch Beschuss mit Elektronen (EI), schweren Edelgasatomen (FAB), geladenen Molekülen (CI) oder Photonen (APCI, MALDI), sowie aus Lösung durch Oxidation beziehungsweise Reduktion erfolgen [Skoog, 1996].

Größe Moleküle wie Proteine und Peptide konnten lange nur unzureichend massenspektrometrisch analysiert werden. Sie sind aufgrund ihrer Größe nur schwer oder gar nicht flüchtig. Zudem waren die aus den häufig polaren Molekülen erzeugten Ionen instabil. In den 1980er Jahren wurden mit der „Matrix-assisted laser desorption/ionization“ (MALDI)- [Karas, 1988] und der ‚Electrospray ionization‘ (ESI)-Methode [Fenn, 1989] so genannte „sanfte“ Ionisierungen entwickelt, die es ermöglichen, Proteine in die Gasphase zu bringen.

Bei der ESI wird eine Analytlösung durch eine Kapillare geleitet. Zwischen dieser Kapillare und der Gegenelektrode wird eine elektrische Spannung angelegt, die die Analytmoleküle an der Sprühkapillarenspitze oxidiert (im positiven Ionisationsmodus) beziehungsweise reduziert (im negativen Ionisationsmodus). Das elektrische Feld zerstäubt die Analytlösung in geladene Tröpfchen. Aufgrund elektrostatischer Abstoßungskräfte zerplatzen die Tröpfchen und es entstehen desolvatisierte Ionen. Der Desolvatationsprozess kann durch einen Gasgegenstrom zusätzlich unterstützt werden (**Abb. 10**). Die erzeugten Ionen können in verschiedene MS-Analysatoren geleitet und vermessen werden.



**Abb. 10: Schematische Darstellung der Ionenerzeugung im ESI [nach: ESI]**

Liegen die Proteine in einer Lösung mit nichtflüchtigen Puffern und Salzen vor, so kann der oben beschriebene Desolvatationsprozess durch die Bildung von Salzclustern erschwert werden. Zudem ist es möglich, dass eine zu hohe Salzkonzentration die Öffnung zwischen ESI und MS-Analysator verstopft. Daher ist es wichtig, solche

Substanzen vor der Durchführung der ESI zu entfernen. Dies kann durch Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography, LC) auf Umkehrsäulen erfolgen. Als Massenanalytoren stehen verschiedene Geräte zur Verfügung. Seit Mitte der 1990er Jahre werden neben den klassischen Sektorfeldinstrumenten verstärkt Ionenfallen, Flugzeitmassenspektrometer, Orbitrap und FTICR-Massespektrometer verwendet. Allen Analytoren liegt zugrunde, dass sie eine Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ermöglichen. Darüber hinaus ist eine Manipulation (Fragmentierungsreaktionen, Gasphasenchemie) der Ionen in den meisten Geräten möglich.

Die Identifizierung eines Proteins anhand des Massenspektrums erfolgt für Proteingemische mit Hilfe von Datenbanken. Diese Datenbanken vergleichen Sets von gemessenen Peptidmassen (peptide mass fingerprint, PMF), die nach einer Fragmentierung der Proteine zu finden sind. Diese Proteinfragmente entstehen während der Aufarbeitung von Probenmaterial, wie zum Beispiel einer notwendigen Extraktion von Proteinen aus einem SDS-PAGE nach deren Verdau mit Proteasen [Cañas, 2006].

#### Durchführung

Die Aufarbeitung der ausgeschnittenen Gelstücke (vgl. 3.2.1) und die Analyse mit nano-LC-MS/MS erfolgte im Labor von Prof. Dr. Albert Sickmann, ISAS - Institute for Analytical Sciences, Dortmund.

Die Proben wurden zweimal gewaschen (1. 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ACN}$  1:1; 2. 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ACN}$  1:1), im SpeedVac getrocknet und mit 4 ng Trypsin in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  rehydriert. Der Verdau erfolgte ÜN bei 37 °C. Die Peptide wurden mit 15  $\mu\text{l}$  5 % Ameisensäure für 15 Minuten bei 37 °C extrahiert. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt.

Die nano-LC-MS/MS erfolgte mit einem Ultimate 3000 Gerät (Dionex, Idstein, Deutschland) gekoppelt an ein ESI-linear iontrap Spektrometer (LTQ XL, Thermo Electron, Dreieich, Deutschland). Vor der nano-LC-Trennung (Ultimate 3000) wurde die Probe mit einer LC (FLM, Dionex, Idstein, Deutschland) konzentriert (Säulen: Vorsäule - 100  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser x 20 mm Länge, Synergy Hydro-RP C18 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße; Trennsäule - 75  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser x 150 mm Länge, Synergy Hydro-RP C18 3  $\mu\text{m}$  Partikelgröße; beide Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Aufgetragen wurden die Proben auf die Vorsäule mit einer Geschwindigkeit von 6  $\mu\text{l}/\text{Minute}$  in 0,1 % TFA für 5 Minuten. Eluiert wurden die Proben unter Verwendung eines linearen Gradienten von 95 % Lösung A (0,1 % Ameisensäure) zu 50 % Lösung B (84 % ACN, 0,1 % Ameisensäure) in 33 Minuten direkt in das ESI-linear iontrap Spektrometer.

Für das ESI wurde eine distal ummantelte Quarzglasspitze (distal-coated fused silica tip, New Objectives, Woburn, Ma, USA) mit einer Zerstäuber-Spannung von 1.800 V verwendet. Einem Übersichts-Scan (m/z 400-2.000) folgten fünf MS/MS Scans der fünf intensivsten Peptidsignale (1.000 cps, 30 ms). Zweifacher Nachweis einer Masse innerhalb von 30 Sekunden führte zu einem dynamischen Ausschluss für 180 Sekunden.

Die Massenspektren wurden zur Identifizierung der übereinstimmenden Peptide mit dem Mascot™ Algorithmus (Version 2.1.6) genutzt. Die Rohdaten-Konvertierung erfolgte mit LCQ-DTA.EXE per plug-in zu Mascot Daemon mit den folgenden Parametern: a) Minimummasse: 400, b) Maximummasse: 3.000, c) Gruppentoleranz 1,4, d) min. scan/Gruppe: 1, e) Zwischenscans: 1, f) Vorläuferladung: auto. Die Suche wurde gegen die aktuelle FASTA Datenbank von *Homo sapiens* mit folgenden Parametern ausgeführt: a) feste Modifikation: Carbamidomethyl (C), b) variable Modifikation: Oxidation (M), c) Peptide und MS/MS Toleranz: +/- 0,5 Da, d) Ionenquelle cut-off: 35, e) Signifikanzgrenzwert  $p < 0,05$ , f) Enzym Trypsin mit Fehlsplaltung: max. 1. Nach manueller Bewertung wurde ein Protein als identifiziert angenommen, wenn mindestens zwei verschiedene Peptide mit einem Score  $> 35$  gefunden wurden und der kumulative Score  $> 100$  war.

### **3.2.2) Western Blot Analyse**

#### **3.2.2.1) Lyse der Zellen**

Zur Lyse der bei -80 °C gelagerten Proben wurde der Lysepuffer frisch angesetzt. Dazu wurden zu je 1 ml Lysepuffer-Stammlösung 10 µl PMSF und 5 µl PEP gegeben. Das eingesetzte Volumen an Lysepuffer variierte abhängig von der Größe der Pellets zwischen 50 und 150 µl. Bei eher kleinen, stecknadelkopfgroßen Zellpellets wurden 50 µl verwendet und das Volumen bei größeren Pellets entsprechend angepasst.

Die Pellets wurden mit Lysepuffer homogenisiert, in ein neues 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Homogenisierung und Inkubation für 15 Minuten wurden die Proben für 30 Minuten bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein weiteres 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Unlösliche Rückstände wurden verworfen.

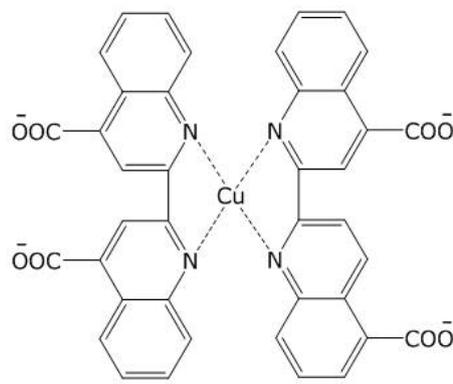
Von dem Lysat wurden Verdünnungen von 1:10-1:100, abhängig von der Größe der Pellets, mit Lysepuffer angesetzt und die Proteinkonzentration bestimmt.

### 3.2.2.2) Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäurekomplexes

Die Bestimmung der Proteinmenge in einem Zelllysate kann unter anderem bei einer quantitativ vergleichenden Analyse verschiedener Proben mittels Western Blot Analyse (vgl. 3.2.5) erforderlich werden.

Bei der Methode wird die Fähigkeit von Proteinen ausgenutzt  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen zu reduzieren.  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violett farbigen Komplex (**Abb. 11**) [Smith, 1985].

Für die Konzentrationsbestimmungen kamen Proteinlysate entweder direkt nach der Lyse von Zellen zum Einsatz oder bereits lysiertes Material, das bei  $-20\text{ °C}$  gelagert wurde.



**Abb. 11: Struktur des Bicinchoninsäurekomplexes (BCA)**

#### Durchführung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden 10  $\mu\text{l}$  der Lysate (pur und verdünnt), der Standardreihe und der Leerprobe je dreimal in eine 96-well-Platte pipettiert (**Tab. 4**).

Je Well wurden anschließend 200  $\mu\text{l}$  einer 49:1-Mischung aus Lösung A und Lösung B (BC Assay, Uptima) zugegeben. Nach Abdecken der Platte wurde sie für 30 Sekunden vorsichtig auf einem Schüttler und weitere 30 Minuten bei  $60\text{ °C}$  inkubiert.

**Tab. 4: Pipettierschema zur Bestimmung der Proteinkonzentration**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	13	13	15	15	15	17	17	17	19	19	19
14	14	14	16	16	16	18	18	18	20	20	20
<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	21	22	23	24	<b>B</b>
<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	21	22	23	24	<b>B</b>
<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	21	22	23	24	<b>B</b>

Belegung der Wells einer 96-well-Platte, B = Blank (Lysepuffer), 1-24 = Proben, S = Standard Albumin, S1 = 2000 µg/ml, S2 = 1000 µg/ml, S3 = 500 µg/ml, S4 = 250 µg/ml, S5 = 125 µg/ml, S6 = 62,5 µg/ml, S7 = 31,25 µg/ml

Vermessen wurde die Extinktion der violett gefärbten Lösungen mit einem Mikroplate Reader der Firma BioRad (Testfilter 540 nm). Die Wells der Standardreihe wurden als solche im Programm des Gerätes definiert und die Konzentrationen der Lysate anhand dieser von dem Programm berechnet.

**3.2.2.3) SDS-PAGE**

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (**Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE**) werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt und können so einzeln identifiziert und analysiert werden.

Die Auftrennung der Proteine im Gel ist einerseits abhängig von der Porengröße des Gels und andererseits von der Größe des Proteins. Die Porengröße des Gels wird durch die Konzentration von Acrylamid und Bis-Acrylamid bestimmt (**Tab. 5**) und richtet sich nach der Proteinzusammensetzung und -größe, die man auftrennen möchte. Das Sammelgel dient dazu, die Proteine entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeiten vor zu sortieren, wodurch die Proteine gestapelt werden (Stapeleffekt) und nacheinander in das Trenngel diffundieren. Durch den Stapeleffekt erhält man im Trenngel schärfere Proteinbanden. Außerdem werden eine Aggregation und eine Präzipitation der Proteine verhindert und es werden schärfere Banden der Proteine im Gel erzielt.

Das anionische Detergenz SDS lagert sich an denaturierte Proteine mit einem konstanten Masseverhältnis mit dem lipophilen Molekülbereich an die Aminosäure (1 SDS-Molekül = 2 Aminosäuren) an und lädt die Proteine proportional zu ihrer Größe negativ auf. Zudem überlagert SDS die Eigenladung der Proteine, weshalb sie in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Spannung ausnahmslos in Richtung Anode wandern. Die Denaturierung erfolgt durch Aufkochen der Proteine auf 95 °C vor dem Auftragen auf das Gel und durch Verwendung denaturierender Reagenzien im Probenpuffer (zum Beispiel β-Mercaptoethanol oder DTT), welche Disulfidbrücken innerhalb der Proteinstruktur reduzierend spalten.

Die nachfolgenden Angaben bezüglich der Apparaturen sowohl für SDS-PAGE als auch Western Blotting (vgl. 3.2.5) beziehen sich auf das Mini-PROTEAN III Cell System und das Mini-V 8.10 System von BioRad.

**Tab. 5: Acrylamidkonzentration in Trenngelen**

in ml	7.5 %	10 %	12.5 %	13.5 %	Sammelgel
<b>AA/BAA</b>	2.5	4.0	5.0	4.5	0.5
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	5.0	5.0	4.0	3.0	2.5
<b>4x LT</b>	2.5	3.0	3.0	2.5	-
<b>4x UT</b>	-	-	-	-	1.0
<b>APS/TEMED</b>	20/20 µl	20/20 µl	20/20 µl	20/20 µl	8/6 µl

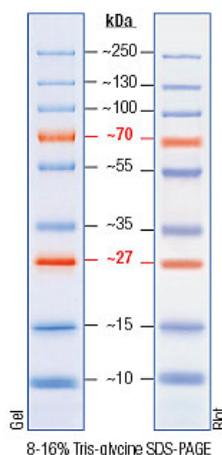
APS/TEMED – Angabe in µl; Angaben für 1 Gel (8x10 cm für 0.75/1.5 mm Spacer); AA/BAA, 4x LT und 4x UT (vgl. 2.5)

APS: Ammoniumpersulfat, TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, APS/TEMED bilden in einer Startreaktion Radikale, die die radikalisch verlaufende Polymerisierung des Acrylamid/Bis-Acrylamids einleiten/beschleunigen.

AA: Acrylamid, BAA: Bis-Acrylamid, LT: Trenngel-Puffer, UT: Sammelgel-Puffer

Durchführung

1,5 ml Proteinlysats (vgl. 3.2.3) wurden mit 150 µl Probenpuffer und 62,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt, entsprechend mehr oder weniger bei abweichendem Volumen an Proteinlysats, 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend entsprechend des Belegschemas in die Taschen des Sammelgels geladen. Zusätzlich wurde ein Marker (Fermentas Page Ruler™ Plus, **Abb. 12**) und eine Positivkontrolle in zwei weitere Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 90 V und für weitere 1-2 h bei 120 V.



**Abb. 12: Banden des Proteinkinases Fermentas Page Ruler™ Plus Prestained [www.fermentas.de]**

### 3.2.2.4) Western Blot Analyse

Die in einem SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können auf spezielle Membranen wie Nitrozellulosemembranen übertragen und auf diesen mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Auf diese Weise ist ein qualitativer, mitunter auch quantitativ vergleichender Nachweis von Proteinen möglich.

Beim Tankblotting wird das Polyacrylamidgel entsprechend **Abbildung 13** in eine Lochkassette eingebaut, in eine senkrechte Position gebracht und eine Spannung angelegt. Die Proteine wandern wie zuvor bei der Trennung im Polyacrylamidgel aufgrund ihrer negativen Ladung, hervorgerufen durch das angelagerte SDS, in Richtung der Anode und werden so auf die Nitrozellulosemembran transferiert.



**Abb. 13: Reihenfolge der Materialien beim Tankblotting**

#### Durchführung

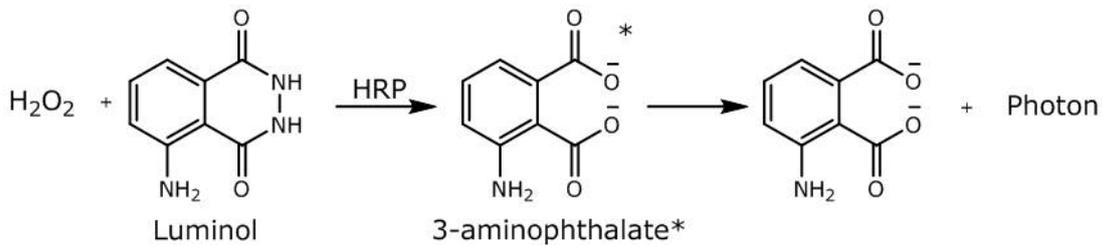
Die Dauer des Blottingvorganges ist abhängig von der angelegten Spannung. Geblottet wurde für 30 Minuten bei 50 V.

Nach dem Blotten wurde die Membran für 1 Stunde bei RT mit Block-Puffer (vgl. 2.5) blockiert, um bei der späteren Inkubation mit einem Antikörper unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers mit der Membran zu verhindern. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte unter Schwenken ÜN bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde der Antikörper verworfen, der Blot 3x 10 Minuten mit TBS-T (vgl. 2.5) gewaschen und für 1 Stunde mit sekundärem Antikörper (vgl. 2.4) inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper katalysierten entweder die Oxidation von Luminol durch die gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) (**Abb. 14**) oder die BCIP/NBT-Reaktion durch die gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) (**Abb. 15**). Erstere Reaktion wird genutzt, um ein spezifisches Protein mittels Belichtung eines Röntgenfilms zu detektieren, letztere um das Protein auf der Membran direkt anzufärben. Überwiegend wurde für die Entwicklung der Western Blots die BCIP/NBT-Reaktion verwendet, da nicht immer eine Röntgenfilm-Entwicklermaschine zur Verfügung stand.

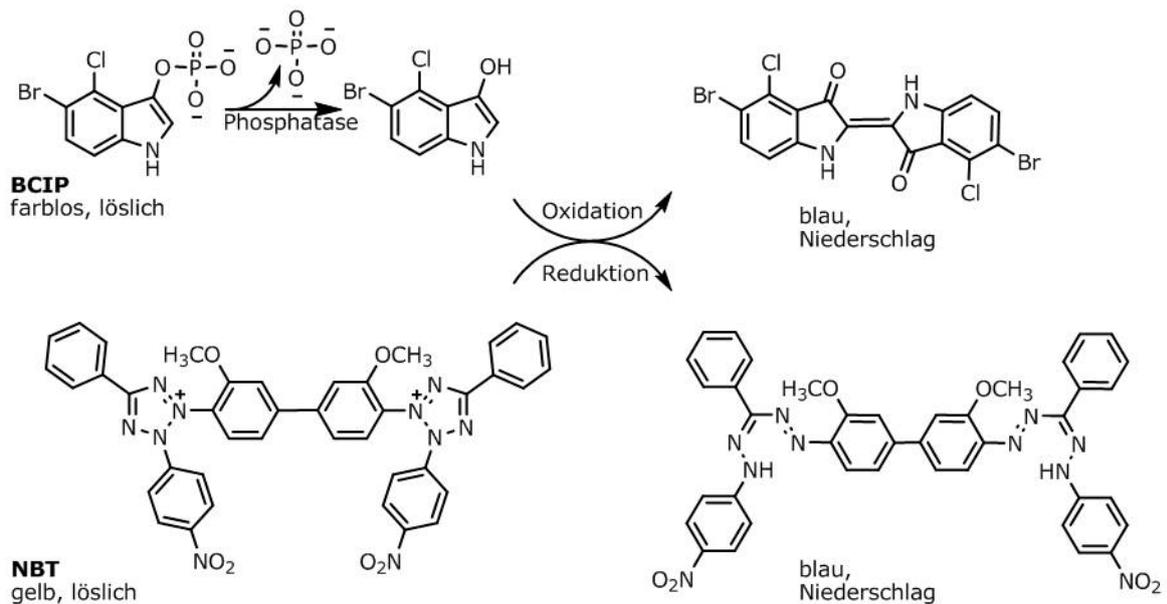
Auswertung des Western Blot

Der entwickelte Blot wurde mit einer Kamera fotografiert und digital densitometrisch mit der Software Aida 2.11 (Advanced Image Data Analyzer, Okt-07-1999) ausgewertet.



**Abb. 14: Schematische Darstellung der Oxidation von Luminol**

Durch die Oxidation von Luminol wird ein energetisch angeregtes Zwischenprodukt gebildet (\*), welches unter Abgabe eines Photons in seinen Grundzustand zurückkehrt.



**Abb. 15: Schematische Darstellung der BCIP/NBT-Reaktion**

Die alkalische Phosphatase (AP) spaltet die Phosphatgruppe von BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) ab. Das gebildete Molekül dimerisiert unter Oxidation und bilden einen blauen Niederschlag (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo), während NBT zeitgleich reduziert wird und ebenfalls einen blauen Niederschlag bildet (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid).

**3.3) Statistik**

Die Analyse von Versuchsergebnissen gibt Aufschluss über den Einfluss der untersuchten Versuchsbedingungen auf die betrachtete Eigenschaft.

Betrachtet werden häufig Mittelwerte von Stichproben. Diese können mit statistischen Verfahren/Tests auf signifikante Unterschiede hin untersucht werden. Bei der Vielzahl an wählbaren Tests ist die Wahl des richtigen sehr wichtig. Dazu gibt es

„Entscheidungsbäume“, die bestimmte Merkmale der Stichproben erfragen und die daraus resultierenden, anwendbaren Tests auflisten [Baum].

Für die quantitative Beurteilung von Mittelwerten, bei denen zwei unabhängige Gruppen, deren Verteilungsform beliebig jedoch gleich ist, untersucht werden sollen, wird unter anderem der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Dieser berechnet ein Signifikanzniveau  $\alpha^*$  (asymptotische Signifikanz), welches mit dem Hypothese-Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  verglichen wird. Für alle  $\alpha^* < 0,05$  ist der Unterschied zwischen den zwei verglichenen Gruppen signifikant [Eckstein, 2008].

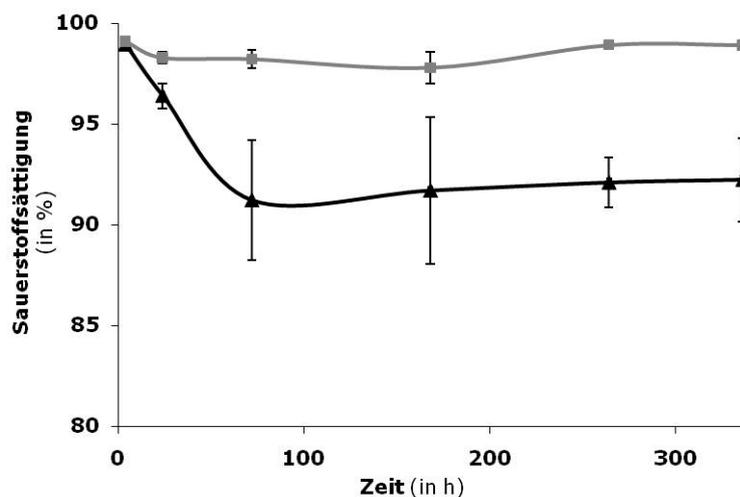
Der Mann-Whitney-U-Test setzt keine Normalverteilung voraus und wird für kleine Stichproben ( $n \leq 6$ ) verwendet. Zu beachten ist, dass die Aussage über eine Signifikanz sich nur auf die Mittelwerte bezieht, die Standardabweichung jedoch nicht berücksichtigt.

## Ergebnisse

### 4.1) Voruntersuchungen

#### 4.1.1) Sauerstoffsättigung

Für die Untersuchung der verschiedenen Zelllinien der Schilddrüsen wurden vollständig mit Medium gefüllte Zellkulturflaschen unter Erdanziehung (1g) und simulierter Mikrogravitation ( $\mu\text{g}$ ) inkubiert. Die Sauerstoffsättigung lag zu jedem Zeitpunkt bei über 90 % (**Abb. 16**) für den längsten Versuchszeitraum für die Zelllinie ML-1 (bis vierzehn Tage). Dabei lag die Sauerstoffsättigung der Kultur unter  $\mu\text{g}$  jeweils über der Sättigung der Bodenkontrolle (1g).



**Abb. 16: Sauerstoffsättigung der Zelllinie ML-1**

Die Sauerstoffsättigung der unter 1g kultivierten Zellen ist in schwarz dargestellt, in grau der unter  $\mu\text{g}$  kultivierten Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte von fünf unabhängig voneinander gemessenen Zellkulturflaschen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Für die Zelllinien CGTH W-1 und FTC-133 wurden analog zu der Zelllinie ML-1 nach einem und drei Tagen die Sauerstoffsättigung der 1g- und der  $\mu\text{g}$ -Kultur gemessen. Auch hier lag die Sättigung bei über 90% (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2) Annexin V-FITC/PI-Messung

Wird an Annexin V das Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt, können bei gleichzeitiger Verwendung des Fluorochroms Propidiumiodid (PI) in einer Zellpopulation lebende, früh und spät apoptotische sowie tote Zellen voneinander unterschieden werden (vgl. 3.1.8.1).

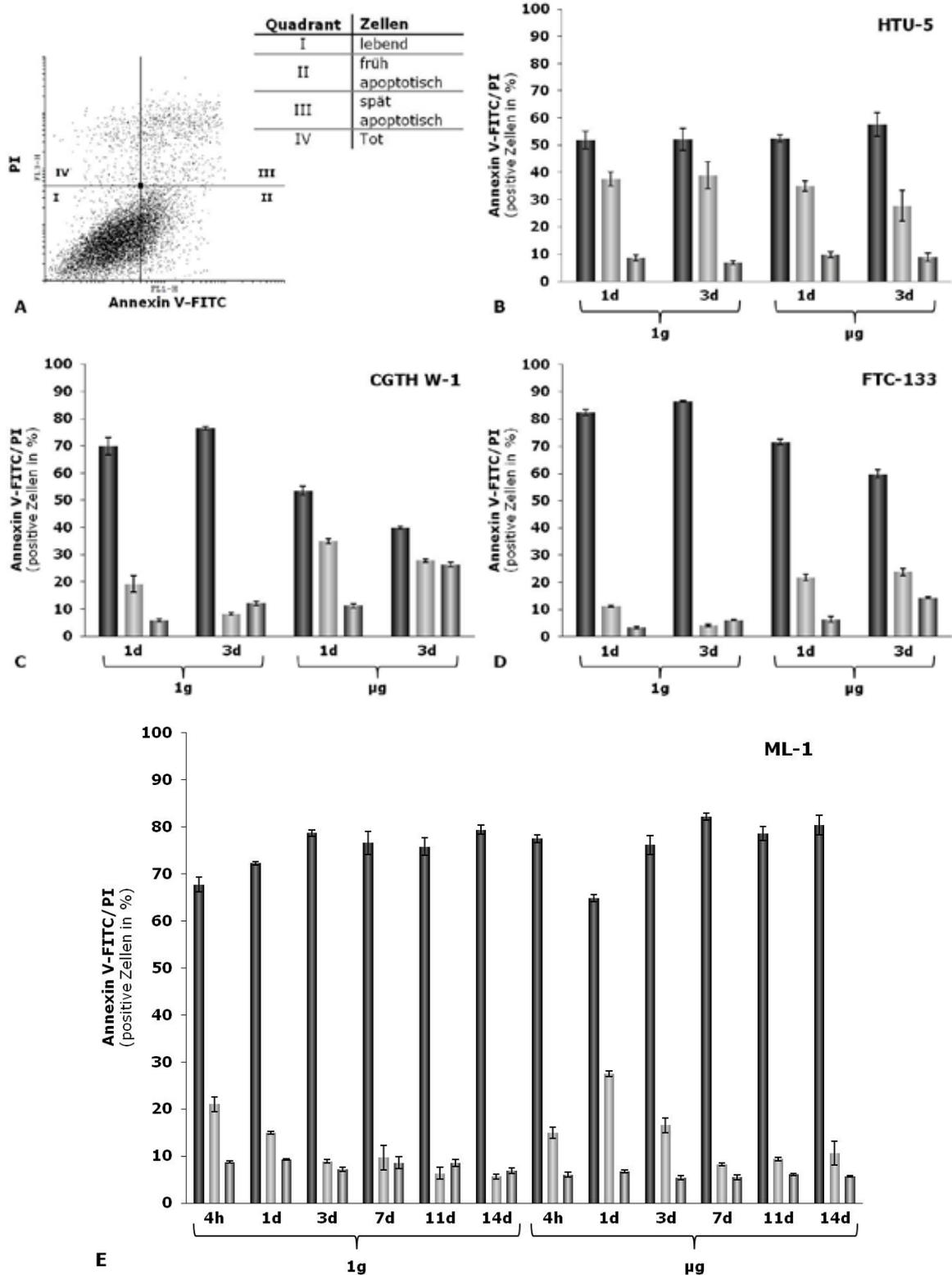
Als Vitalitätstest wurde jeweils eine Annexin V-FITC/PI-Messung der Zelllinien HTU-5 (**Abb. 17B**), CGTH W-1 (**Abb. 17C**), FTC-133 (**Abb. 17D**) und ML-1 (**Abb. 17E**) durchgeführt.

Zur Auswertung erfolgte die Darstellung der mit einem Durchflusszytometer detektierten Zellen in einem Dot-Plot. Auf der x-Achse wurde das Signal von FITC und auf der y-Achse von PI dargestellt (**Abb. 17A**). Nach Abgrenzung der Eigenfluoreszenz der Zellen (ungefärbte Probe) waren in diesem Diagramm vier Quadranten zu unterscheiden. Im ersten Quadranten (links unten, I) konnten lebende Zellen, im zweiten Quadranten (rechts unten, II) Annexin V-FITC positive und somit früh apoptotische Zellen, im dritten Quadranten (rechts oben, III) spät apoptotische Zellen mit einem Signal für Annexin V-FITC und PI und im vierten Quadranten (links oben, IV) nur PI positive, tote Zellen beobachtet werden. Für die Auswertung des Vitalitätstests der untersuchten Zelllinien wurden die spät apoptotischen und die toten Zellen additiv zusammengezählt dargestellt (**Abb. 17B-E**).

**Abbildung 17B-D** zeigt die Ergebnisse der drei Zelllinien HTU-5, CGTH W-1 und FTC-133, die jeweils für einen und drei Tage sowohl unter 1g als auch  $\mu$ g kultiviert wurden. Die Zelllinie ML-1 (**Abb. 17E**) wurde darüber hinaus für vier Stunden sowie sieben, elf und vierzehn Tage unter 1g und  $\mu$ g kultiviert.

Die Primärzelllinie HTU-5 (**Abb. 17B**) zeigte sowohl unter 1g als auch  $\mu$ g nach einem und drei Tagen rund 50 % lebende Zellen, wobei nach drei Tagen unter  $\mu$ g ein nicht signifikanter Anstieg zu beobachten war. 35-40 % apoptotische Zellen waren zu beiden Zeitpunkten unter 1g und nach einem Tag unter  $\mu$ g zu beobachten. Im Vergleich zwischen 1g und  $\mu$ g nach drei Tagen in Kultur war ein signifikantes Absinken auf etwa 28 % unter  $\mu$ g zu verzeichnen. Der Prozentsatz an toten Zellen schwankte zwischen 7 und 10 % ohne signifikante Unterschiede.

Für die Zelllinie CGTH W-1 (**Abb. 17C**) wurden unter 1g nach einem Tag ungefähr 70 % und nach drei Tagen etwa 76 % lebende Zellen beobachtet. Unter  $\mu$ g sanken die Prozentsätze signifikant auf rund 54 % nach einem und auf rund 40 % nach drei Tagen in Kultur. Parallel dazu stieg unter  $\mu$ g der Anteil an apoptotischen und toten Zellen nach einem Tag unter  $\mu$ g im Vergleich zu 1g von etwa 20 % auf ungefähr 35 % und der Prozentsatz von toten Zellen von rund 6 % auf rund 12 % signifikant an. Die Anzahl von apoptotischen und toten Zellen betrug jeweils ungefähr 28 % der Zellen nach drei Tagen unter  $\mu$ g, was einem signifikanten, rund dreifachen Anstieg im Vergleich zu drei Tagen unter 1g entsprach.



**Abb. 17: Annexin V-FITC/PI Messung**

In **A** ist ein Dot-Plot der Auswertung dargestellt. Die lebenden Zellen sind für Annexin V-FITC und PI negativ (dunkelgrauer Balken). Die apoptotischen Zellen binden Annexin V-FITC (hellgrauer Balken). Annexin V-FITC und PI positive Zellen sind abgestorben (mittelgrauer Balken). Die Abbildung zeigt: **B**) HTU-5, **C**) CGTH W-1, **D**) FTC-133 und **E**) ML-1.

Mit etwa 82 % nach einem Tag und rund 87 % nach drei Tagen unter 1g war der Anteil an lebenden Zellen der Zelllinie FTC-133 (**Abb. 17D**) zu den jeweiligen Zeitpunkten signifikant erhöht gegenüber  $\mu\text{g}$  - etwa 70 % nach einem Tag und ungefähr 60 % nach drei Tagen. Zeitgleich zur sinkenden Zahl an lebenden Zellen stieg signifikant die Zahl an apoptotischen und toten Zellen. Sowohl apoptotische wie tote Zellen verdoppelten sich nach einem Tag unter  $\mu\text{g}$  von ungefähr 10 % auf rund 20 % beziehungsweise von ungefähr 3 % auf etwa 5 %. Nach drei Tagen stieg die Zahl an apoptotischen Zellen unter  $\mu\text{g}$  um den Faktor vier im Vergleich zu 1g von circa 5 % auf mehr als 20 %. Auch die toten Zellen stiegen um rund das dreifache von etwa 5 % auf rund 15 % an.

**Abbildung 17E** zeigt für die Zelllinie ML-1 den Verlauf an beobachteten lebenden, apoptotischen und toten Zellen über einen Zeitraum von vier Stunden bis vierzehn Tagen. Unter 1g stieg der Anteil an lebenden Zellen von etwa 68 % nach vier Stunden über rund 72 % nach einem Tag bis auf ungefähr 79 % nach drei Tagen an. Für die Tage sieben bis vierzehn konnten mehr als 75 % lebende Zellen beobachtet werden. Unter  $\mu\text{g}$  hingegen lebten nach vier Stunden mit rund 77 % signifikant mehr Zellen im Vergleich zu 1g. Nach einem Tag unter  $\mu\text{g}$  sank der Anteil an lebenden Zellen auf ungefähr 65 %. Nach drei Tagen stieg die Zahl wieder auf etwa 76 % und blieb für die übrigen Zeitpunkte ebenfalls wie unter 1g bei mehr als 75 %.

Der Vergleich des prozentualen Anteils der Zellpopulation an lebenden Zellen unter 1g zum jeweiligen Zeitpunkt unter  $\mu\text{g}$  ergab für vier Stunden einen signifikanten Anstieg, für einen Tag eine signifikante Minderung und für sieben Tage erneut einen signifikanten Anstieg unter  $\mu\text{g}$ . Für die übrigen Zeitpunkte waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

Im Verlauf von vier Stunden bis vierzehn Tagen sank unter 1g der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen signifikant von rund 20 % nach vier Stunden auf etwa 6 % nach vierzehn Tagen. Parallel dazu stieg die Apoptoserate unter  $\mu\text{g}$  signifikant von ungefähr 15 % nach vier Stunden auf rund 28 % nach einem Tag. Im weiteren Verlauf sank sie kontinuierlich von circa 17 % nach drei Tagen bis auf ungefähr 10 % nach vierzehn Tagen. Die Anteile an apoptotischen Zellen unter  $\mu\text{g}$  waren zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zu einem Tag unter  $\mu\text{g}$  signifikant erniedrigt. Der Vergleich von  $\mu\text{g}$  mit 1g zeigte nach vier Stunden eine signifikante Erniedrigung, nach sieben Tagen keine Veränderung und an allen übrigen Tagen eine signifikante Erhöhung an apoptotischen Zellen unter  $\mu\text{g}$ .

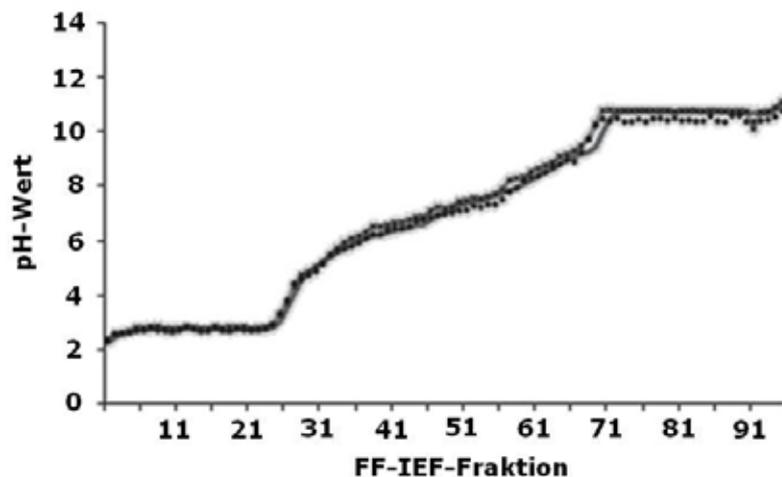
Der prozentuale Anteil an toten Zellen war sowohl unter 1g als auch unter  $\mu\text{g}$  zu jedem Zeitpunkt gleich oder geringer als 10 %. Der Vergleich zwischen 1g und  $\mu\text{g}$  zeigte zu jedem Zeitpunkt signifikante Minderungen unter  $\mu\text{g}$ .

## 4.2) Proteomanalyse

### 4.2.1) FF-IEF

Die Zelllinien HTU-5, CGTH W-1 und FTC-133 wurden unter Erdanziehungskraft (1g) und unter simulierter Mikrogravitation ( $\mu$ g) für einen und drei Tage, die Zelllinie ML-1 für vier Stunden, einen, drei, sieben, elf und vierzehn Tage kultiviert und konserviert. Der Aufschluss der Zellproben erfolgte mit Ultraschall. Das Lysat enthielt die Proteine des Cytosols. Anschließend wurden die Proteine aus den Zellfragmenten isoliert (Pellet).

Sowohl das Lysat des Cytosols als auch des Pellets wurden in einer FF-IEF eingesetzt. Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteintrennung mittels isoelektrischer Fokussierung ist ein pH Gradient zwischen Anode und Kathode. In der FFE wurde dieser mit den oben erwähnten Medien unter Einwirkung von elektrischem Strom hergestellt, bevor eine Probe aufgetragen wurde. **Abbildung 18** zeigt den Verlauf des pH-Gradienten der FF-IEF von mehreren Experimenten. Die gezeigten Graphen veranschaulichen die Reproduzierbarkeit der Trennung von Proteinen mit dieser Methode.



**Abb. 18: FF-IEF pH-Gradient [Pietsch, 2010]**

Die flachen Bereiche der Kurve unterhalb von pH 4 (etwa pH 3) und oberhalb von pH 10 (etwa pH 11) entsprachen den pH-Werten der Anoden- beziehungsweise der Kathodenmedien. Punkte und Kreuze symbolisieren unabhängige Versuche, einen pH Gradienten aufzubauen.

#### 4.2.1.1) SDS-PAGE ausgewählter FF-IEF-Fractionen mit Silberfärbung

Um den Erfolg einer Trennung zu kontrollieren, wurden die in der FF-IEF erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proteine jeder zweiten FF-IEF-Fraktion wurden entsprechend ihrer Größe getrennt und mittels SilverQuest (Invitrogen) Färbung detektiert.

Nachfolgend sind exemplarisch die gefärbten Gele der FF-IEF-Fractionen der Ein-Tageversuche für Cytosol- und Pellet-Lysate der 1g und  $\mu$ g Proben für jede Zelllinie

gezeigt. Für die Zelllinien HTU-5, CGTH W-1 und FTC-133 wurden darüber hinaus SDS-PAGE der Drei-Tageversuche und für die Zelllinie ML-1 der Vier-Stunden-, Drei-Tage-, Sieben-Tage-, Elf-Tage- und Vierzehn-Tageversuche durchgeführt.

Links und rechts der Proben wurden Marker und Standardproteine auf jedes Gel aufgetragen und gefärbt. Dies erlaubte zum einen eine Abschätzung des Molekulargewichtes der angefärbten Proteine und zum anderen den relativen Vergleich zweier Gele miteinander. Je SDS-PAGE wurden identische Volumina aller aufgetragenen FF-IEF-Fractionen eingesetzt. Die FF-IEF-Fractionen enthielten eine undefinierte Konzentration an Protein. Die Proteinkonzentration resultierte aus der FF-IEF, bei der je Durchführung 100 µl der auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellten Cytosol- oder Pellet-Lysate eingesetzt wurden.

### Zelllinie HTU-5

Die Gelbilder der FF-IEF-Fractionen der HTU-5 Zellen zeigt **Abbildung 19**. Mit den oberen beiden SDS-PAGE wurden unter Ultraschallbehandlung freigesetzte Proteine des Cytosols getrennt, die bei 1g (**Abb. 19A**) beziehungsweise µg (**Abb. 19B**) inkubiert worden waren. Die Gele zeigen, dass diese Proteine mittels FF-IEF über den gesamten pH Gradienten von etwa pH 4 bis etwa pH 11 aufgetrennt wurden (von Fraktion 27 bis 71). Gleiches galt auch für die Lysate der Drei-Tageversuche (Daten nicht gezeigt). In den Fraktionen 33 bis 37 und 49 bis 55 wurden erhöhte Mengen an Proteinen beobachtet, unabhängig davon ob die analysierten Zellen unter 1g (**Abb. 19A**) oder unter µg (**Abb. 19B**) inkubiert worden waren. Die jeweilige FF-IEF-Fraktion 33 zeigte die meisten Proteinbanden, wobei die Banden der µg Probe (**Abb. 19B**) noch intensiver waren als die der 1g Probe (**Abb. 19A**). Eine Verschiebung der Intensitäten im Bandenmuster konnte auch für die Fraktion 53 beobachtet werden. Auffallend waren Banden in der 67. Fraktion, die nur bei Analyse der 1g inkubierten Zellen, aber nicht der µg inkubierten Zellen zu beobachten waren.

Die unteren beiden Gele in **Abbildung 19** zeigen Proteine, welche bei Ultraschallbehandlung in abzentrifugierbaren Zellfragmenten zurückblieben. Die Zellfragmente waren bei 1g (**Abb. 19C**) und µg (**Abb. 19D**) inkubiert worden. Hier sind nur Proteinbanden in den Fraktionen 27 (ungefähr pH 3) bis 47/49 (etwa pH 7) zu erkennen. Die Fraktionen 47/49 lagen ungefähr in der Höhe der Injektionsstelle des Lysats in die FFE Kammer. Das Gel der **Abbildung 19D** ist wesentlich weniger stark gefärbt als das Gel der **Abbildung 19C**. Dennoch ist zu erkennen, dass in beiden Fällen in den Gelstreifen 33 und 43 die jeweils meisten Proteine aufgetragen worden waren. Im Drei-Tageversuch konnten für die 1g Probe Proteine bis Fraktion 53, für die µg Probe nur bis Fraktion 37 angefärbt werden. Auch im Drei-Tageversuch trat eine Konzentrierung der Proteine in Fraktion 33 auf, die für 1g und µg voneinander abweichende Bandenmuster zeigten (Daten nicht gezeigt).

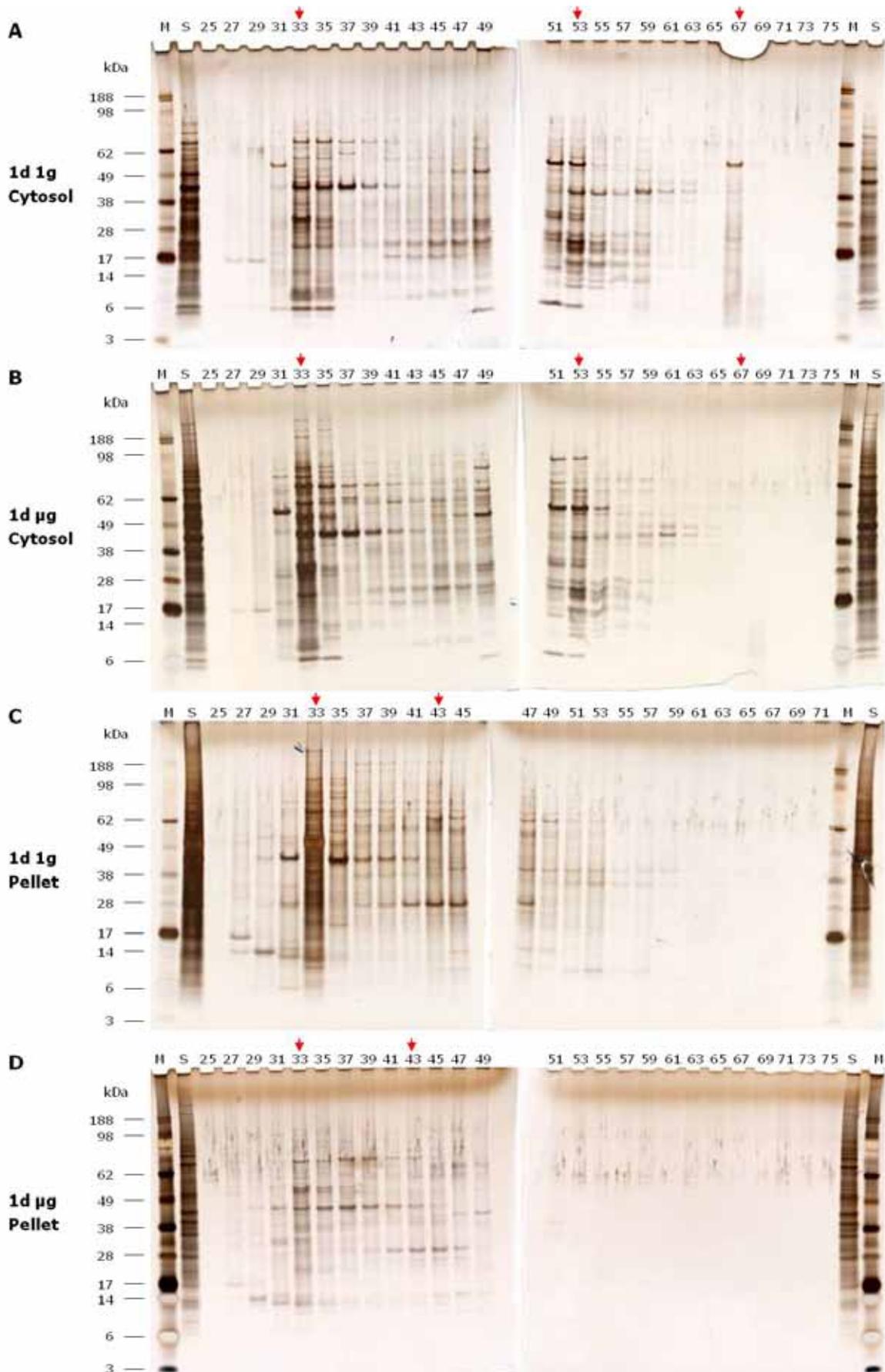


Abb. 19: Silberfärbung der FF-IEF-Fraktionen der HTU-5 Zelllinie - Ein-Tageversuch

Aufgetragen wurde jede zweite FF-IEF-Fraktion der Fraktionen 25-75 (Fraktion 27 rund pH 4,4; Fraktion 71 etwa pH 10,3). Je Fraktion wurden 6,7  $\mu$ l eingesetzt. Rote Pfeile markieren Fraktionen mit Unterschieden zwischen 1g und  $\mu$ g. M: Marker, S: Proteinstandard, 25-75: FF-IEF-Fraktion

### Zelllinie CGTH W-1

**Abbildung 20** zeigt Gelbilder der FF-IEF-Fraktionen der Zelllinie CGTH W-1. Die oberen beiden Bilder zeigen gelelektrophoretische Analysen von Fraktionen von Proteinen des Cytosols von unter 1g (**Abb. 20A**) und  $\mu$ g (**Abb. 20B**) inkubierten Zellen. Auch hier konnten Proteine des Cytosols über den gesamten pH Gradienten der FF-IEF von etwa pH 4 bis pH 10 aufgetrennt werden (von Fraktion 27 bis 69), was auch im Drei-Tageversuch zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Erneut wurden in den Fraktionen 33 bis 37 und 49 bis 55 erhöhte Mengen an Proteinen beobachtet, unabhängig davon, ob die analysierten Zellen unter 1g oder unter  $\mu$ g inkubiert worden waren. Insgesamt ist das Gel der 1g Probe (**Abb. 20A**) intensiver gefärbt als das Gel der  $\mu$ g Probe (**Abb. 20B**). Dies kann zum Teil erklären, warum in **Abbildung 20B** die Fraktionen 31 und 67 nicht zu sehen sind und die Fraktionen 35 und 49 in **Abbildung 20A** anders erscheinen als die entsprechenden Banden in **Abbildung 20B**.

Die unteren beiden Bilder zeigen gelelektrophoretische Analysen von FF-IEF-Fraktionen von Proteinen aus Zellfragmenten von unter 1g (**Abb. 20C**) und  $\mu$ g (**Abb. 20D**) inkubierten Zellen. Auch diese Proteine konnten für die 1g Probe über den gesamten pH Gradienten aufgetrennt werden (**Abb. 20C**), wenn gleich mit weniger intensiven Banden als für die Cytosol-Fraktionen. Für die  $\mu$ g Probe (**Abb. 20D**) waren Proteinbanden nur bis Fraktion 49 deutlich, für Fraktion 63 schwach zu erkennen. Das könnte daran liegen, dass die  $\mu$ g Probe (**Abb. 20D**) weniger stark gefärbt war als die 1g Probe (**Abb. 20C**). In beiden Gelen sind die Proteine der Fraktionen 35 und 37 jeweils am stärksten gefärbt und die Fraktionen 31 und 33 und 51 bis 59 unterscheiden sich in beiden Bildern deutlich. Ob dieser Unterschied ein Färbeeffect ist oder durch die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen der Ursprungszellen bedingt war, konnte nicht geklärt werden. Im Drei-Tageversuch waren bereits ab Fraktion 25 Proteine durchgehend bis Fraktion 69 deutlich sichtbar. Neben den Fraktionen 31 und 33 waren unter 1g auch die Fraktionen 43 bis 47 und unter  $\mu$ g 45 bis 47 deutlich stärker anfärbbar als die übrigen Fraktionen (Daten nicht gezeigt).

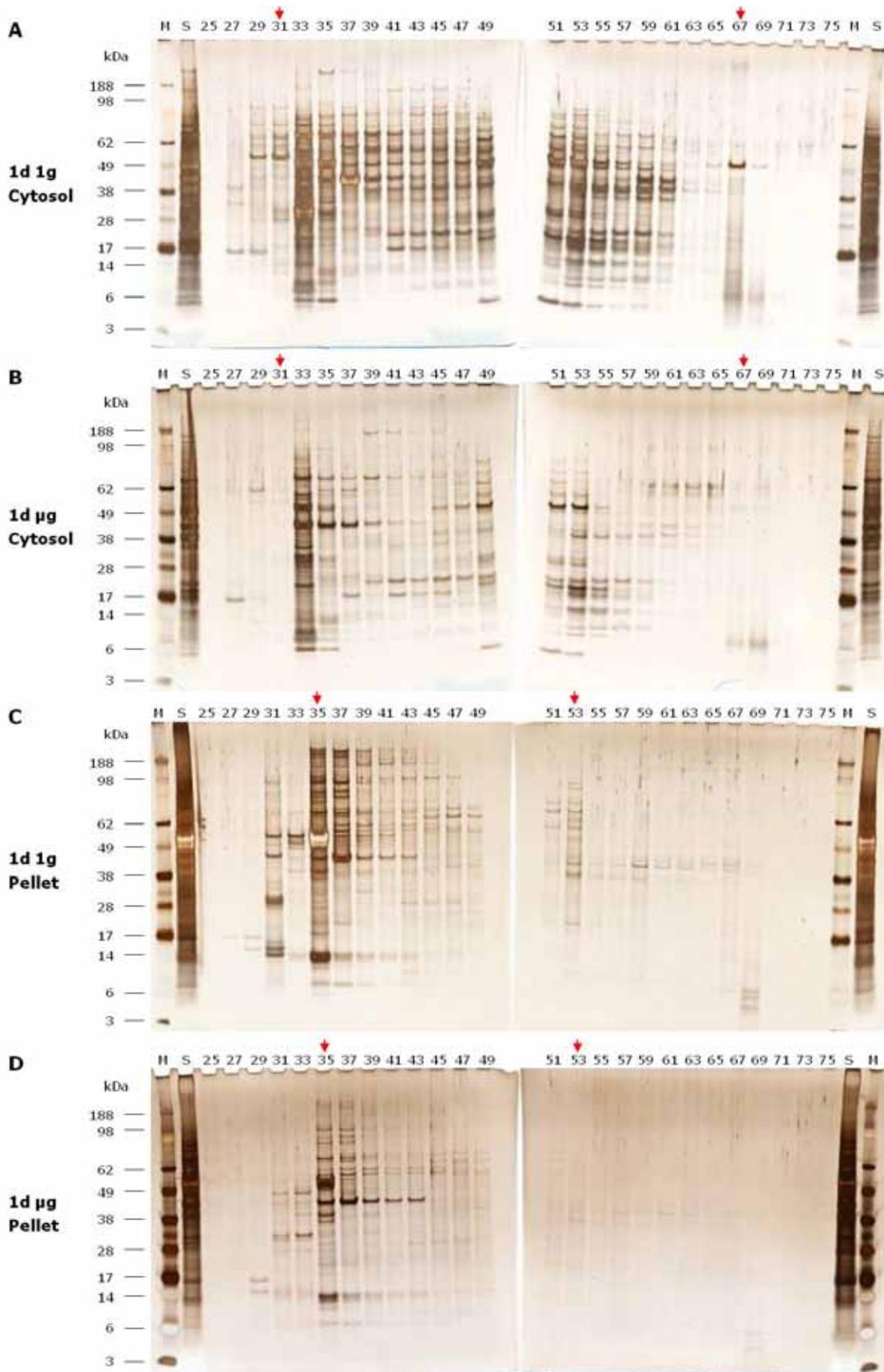


Abb. 20: Silberfärbung der FF-IEF-Fractionen der CGTH W-1 Zelllinie - Ein-Tageversuch

Aufgetragen wurde jede zweite FF-IEF-Fraktion der Fraktionen 25-75 (Fraktion 27 ungefähr pH 4,4; Fraktion 71 etwa pH 10,3). Je Fraktion wurden 6,7  $\mu$ l eingesetzt. Rote Pfeile markieren Fraktionen mit Unterschieden zwischen 1g und  $\mu$ g. M: Marker, S: Proteinstandard, 25-75: FF-IEF-Fraktion

### Zelllinie FTC-133

Für die Zelllinie FTC-133 konnten Proteinbanden in den FF-IEF-Fraktionen 27 bis 69 des Lysats nach Ultraschallaufschluss der 1g Probe (**Abb. 21A**) und nur bis Fraktion 65 der  $\mu$ g Probe (**Abb. 21B**) für den Ein-Tageversuch und somit ebenfalls für den gesamten pH Gradienten beobachtet werden. Die Fraktionen 33 bis 35 und 49 bis 53 (**Abb. 21A+B**) zeigten eine intensivere Färbung. Auffällig war das Fehlen einer Bande in Fraktion 67 unter  $\mu$ g im Ein-Tageversuch (**Abb. 21B**). Im Drei-Tageversuch war diese Bande im Lysat der  $\mu$ g Probe wieder zu beobachten. Interessant war in Fraktion 53 die Intensitätsverschiebung verschiedener Banden im Ein-Tageversuch. So konnte in dieser Fraktion unter  $\mu$ g (**Abb. 21B**) unter anderem eine Bande bei ungefähr 90 kDa beobachtet werden, die im Lysat der 1g Probe (**Abb. 21A**) weniger intensiv war. Die darunter liegenden Proteinbanden, insbesondere drei Proteinbanden zwischen 28 bis 39 kDa und drei Proteinbanden zwischen 17 bis 28 kDa, waren unter  $\mu$ g weniger intensiv gefärbt trotz stärker entwickeltem Proteinstandards. Im Drei-Tageversuch war eine solche Verschiebung ebenfalls auszumachen (Daten nicht gezeigt).

In den Pellet-Lysaten wurden Proteine ab FF-IEF-Fraktion 25 nachgewiesen. Im Ein-Tageversuch waren unter 1g (**Abb. 21C**) deutliche Proteinbanden bis Fraktion 53 und nur schwache bis Fraktion 59 zu erkennen. Das Lysat der  $\mu$ g Probe (**Abb. 21D**) enthielt Proteine nur bis Fraktion 49, was womöglich an einer weniger intensiven Färbung der  $\mu$ g Fraktionen lag. Für den Drei-Tageversuch (Daten nicht gezeigt) konnten in den Pellet-Lysaten Proteine bis Fraktion 69 detektiert werden. Für die Pellet-Lysate war ebenfalls eine Anreicherung der Proteine in Fraktion 33 festzustellen (**Abb. 21C+D**). Interessant war Fraktion 43. Diese zeigte zu beiden Zeitpunkten ein verändertes Bandenmuster und eine geringere Intensität der Banden unter  $\mu$ g.

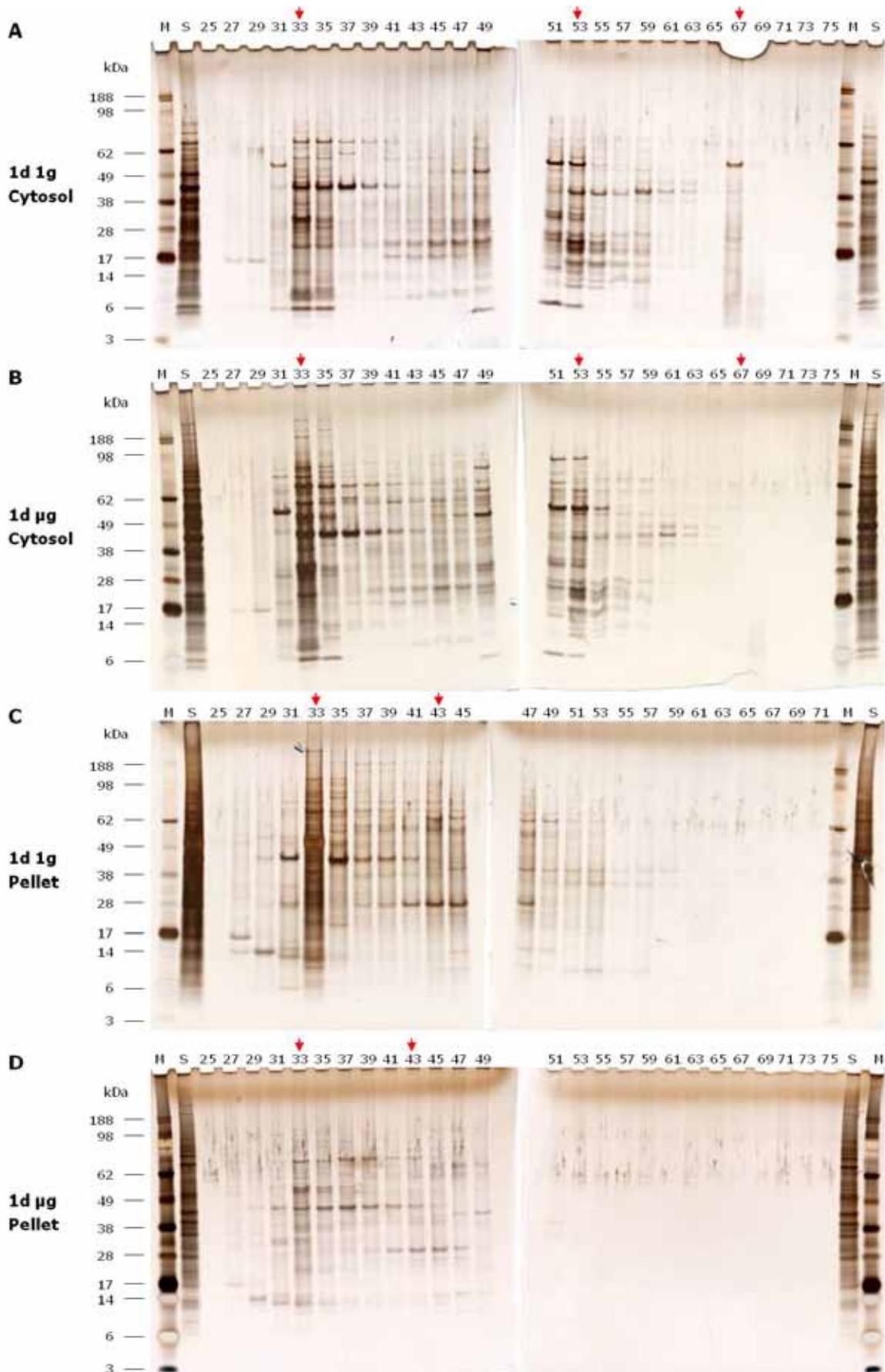


Abb. 21: Silberfärbung der FF-IEF-Fractionen der FTC-133 Zelllinie - Ein-Tageversuch

Aufgetragen wurde jede zweite FF-IEF-Fraktion der Fraktionen 25-75 (Fraktion 27 etwa pH 4,4; Fraktion 71 ungefähr pH 10,3). Je Fraktion wurden 6,7  $\mu$ l eingesetzt. Rote Pfeile markieren Fraktionen mit Unterschieden zwischen 1g und  $\mu$ g. M: Marker, S: Proteinstandard, 25-75: FF-IEF-Fraktion

### Zelllinie ML-1

Die Zelllinie ML-1 wurde für vier Stunden, einen, drei, sieben, elf und vierzehn Tage unter 1g und  $\mu$ g kultiviert. **Abbildung 22** zeigt in den oberen beiden Bildern die gelelektrophoretische Analyse der Proteine des Cytosols (**Abb. 22A+B**) und in den unteren beiden Bildern die Analyse der Proteine des Pellets (**Abb. 22C+D**) des Ein-Tageversuchs.

Für die Lysate des Cytosols waren im gezeigten Ein-Tageversuch Proteine unter 1g in den FF-IEF-Fraktionen 27 bis 67 (**Abb. 22A**) und unter  $\mu$ g in den FF-IEF-Fraktionen 29 bis 63 (**Abb. 22B**) zu detektieren. Im Verlauf der Versuche ließen sich zu den verschiedenen Zeitpunkten unter 1g teilweise ab Fraktion 25 und bis Fraktion 69 Proteine im SDS-PAGE anfärben. Für die  $\mu$ g Proben konnten Proteine zwischen den Fraktionen 25 und 31 als erste Fraktion detektiert werden. Die letzte Fraktion lag zwischen den Fraktionen 63 und 69.

Für die Lysate der Pellets waren Proteinbanden im gezeigten Ein-Tageversuch von Fraktion 25 bis 69 unter 1g (**Abb. 22C**) beziehungsweise unter  $\mu$ g von Fraktion 25 bis 67 (**Abb. 22D**) nachzuweisen. Mit längerer Kultivierung der Zelllinie ML-1 verschob sich die Fraktion, in der erstmalig Proteine detektiert wurden, unabhängig von 1g und  $\mu$ g in den basischen Bereich. So war die erste Proteinfraktion nach vier Stunden und einem Tag Fraktion 25, nach drei und sieben Tagen Fraktion 27, nach elf Tagen Fraktion 31 und nach vierzehn Tagen Fraktion 33.

Eine geringe Anreicherung der Proteine zeigte sich für das in **Abbildung 22A** gezeigte 1g Lysat des Cytosols in den Fraktionen 31 bis 35, in der Fraktion 41 und in den Fraktionen 45 bis 51. Auch unter  $\mu$ g war dies zu beobachten, trotz deutlich schwächerer Signale (**Abb. 22B**). Die geringere Signalintensität des  $\mu$ g Lysats dürfte zum Teil auf das geringere eingesetzte Volumen der FF-IEF-Fraktionen zurückzuführen sein. Der Vergleich zwischen 1g und  $\mu$ g ließ weiterhin erkennen, dass unter  $\mu$ g in Fraktion 27 und 65 bis 69 keine Proteine zu finden waren (**Abb. 22B**).

Die Vergleiche der anderen Zeitpunkte untereinander zeigten sowohl für 1g als auch für  $\mu$ g Anreicherungen der Proteine in den Lysaten des Cytosols um die Fraktionen 35, 41 und 49. Für diese Fraktionen waren Unterschiede in den Intensitäten einzelner Proteinbanden bei Vergleich von 1g und  $\mu$ g zu erkennen. Durchweg konnte für die Proteinbanden in diesen Fraktionen ein intensiveres Signal in den 1g Lysaten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

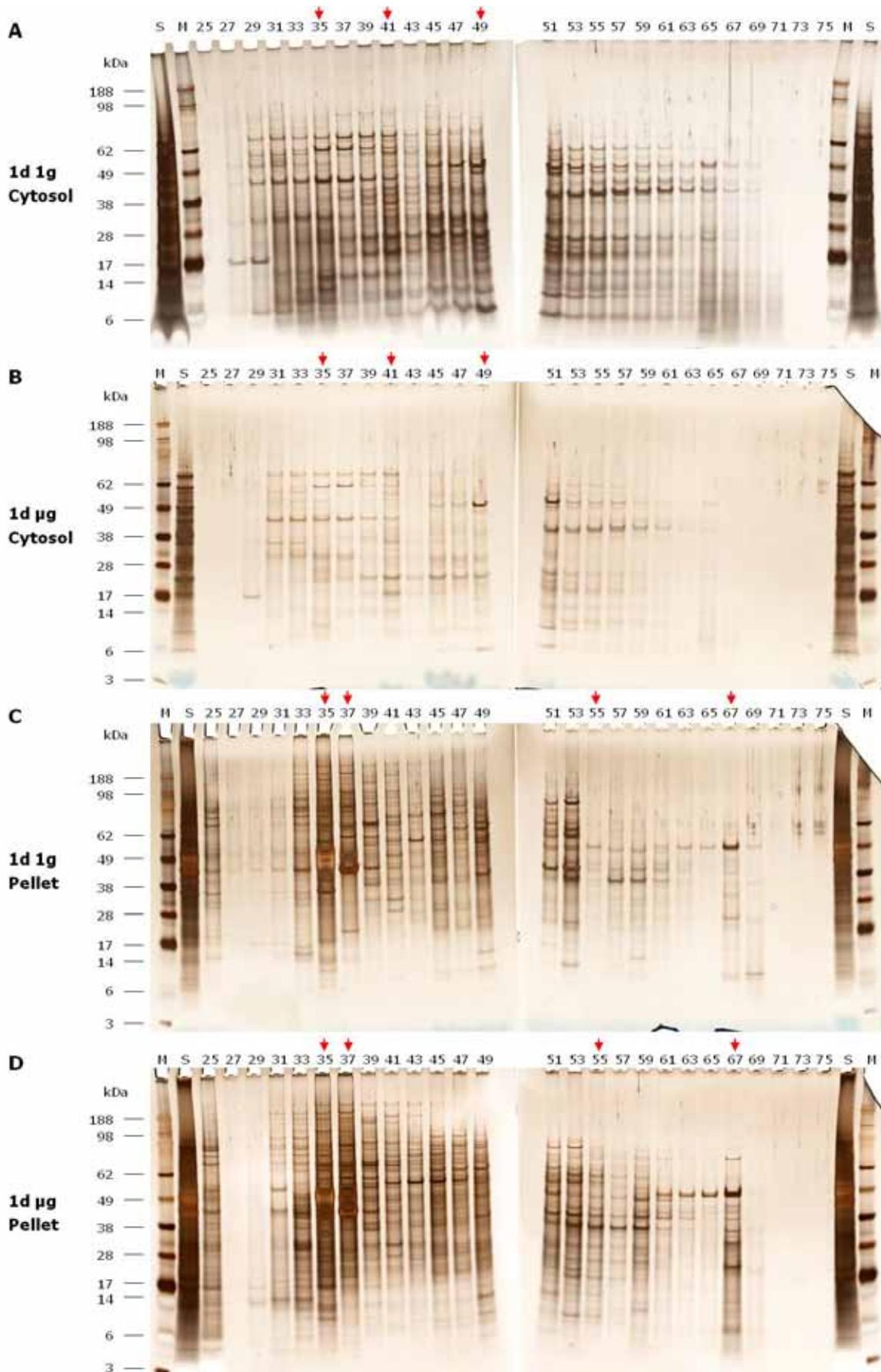


Abb. 22: Silberfärbung der FF-IEF-Fractionen der ML-1 Zelllinie - Ein-Tageversuch

Aufgetragen wurde jede zweite FF-IEF-Fraktion der Fraktionen 25-75 (Fraktion 27 rund pH 4,4; Fraktion 71 ungefähr pH 10,3). Eingesetzt wurde für 1d 1g Cytosol 15  $\mu$ l je Fraktion, für 1d  $\mu$ g Cytosol und Pellet (1g und  $\mu$ g) 10  $\mu$ l je Fraktion. Rote Pfeile markieren Fraktionen mit Unterschieden zwischen 1g und  $\mu$ g. M: Marker, S: Proteinstandard, 25-75: FF-IEF-Fraktion

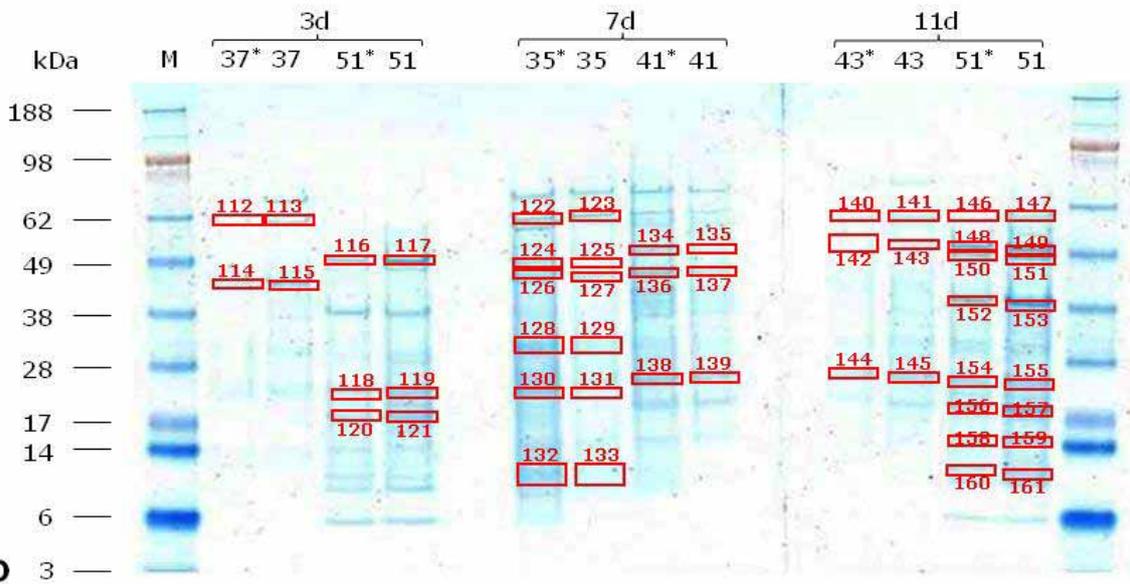
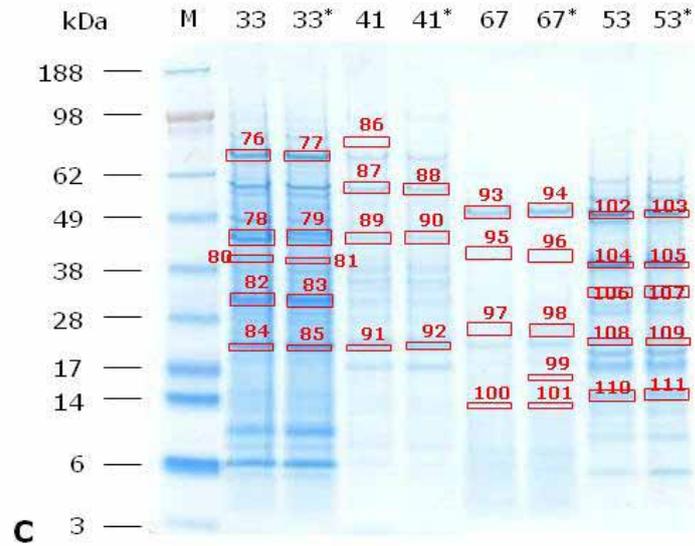
Die Fraktionen 35 bis 37 und 49 bis 53 der Lysate der Pellets zeigten unter 1g und  $\mu$ g zu allen Zeitpunkten eine Konzentrierung intensiv gefärbter Proteinbanden. Im gezeigten Ein-Tageversuch waren Bandenmuster- und Bandenintensitätsunterschiede zwischen 1g (**Abb. 22C**) und  $\mu$ g (**Abb. 22D**) besonders deutlich in den Fraktionen 31 bis 39, 55 und 67, wobei die Intensität der Banden bis zum Sieben-Tageversuch unter 1g geringer ausfiel als unter  $\mu$ g. Nach elf und vierzehn Tagen konnte ein Wechsel zu intensiveren Banden unter 1g beobachtet werden. Auffällig im Ein-Tageversuch war in den Fraktionen 35 und 37 eine Vielzahl an Banden unterhalb von 38 kDa im Lysat der  $\mu$ g Probe (**Abb. 22D**). Dies traf für die übrigen Zeitpunkte vor allem auf Fraktion 35 ebenfalls zu (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ergab sich aus den Silber gefärbten Gelen, dass sie alle ein sehr ähnliches Erscheinungsbild zeigten, unabhängig davon, welche Zelllinie untersucht wurde und ob die Zellen unter 1g oder unter  $\mu$ g kultiviert wurde. Wie erwartet, wurden die Zellen durch die Kultivierung auf einer RPM nicht global verändert. Daher versuchten wir mit Hilfe der Massenspektrometrie mögliche in ihrer Expression veränderte Proteine zu identifizieren und soweit möglich zu quantifizieren.

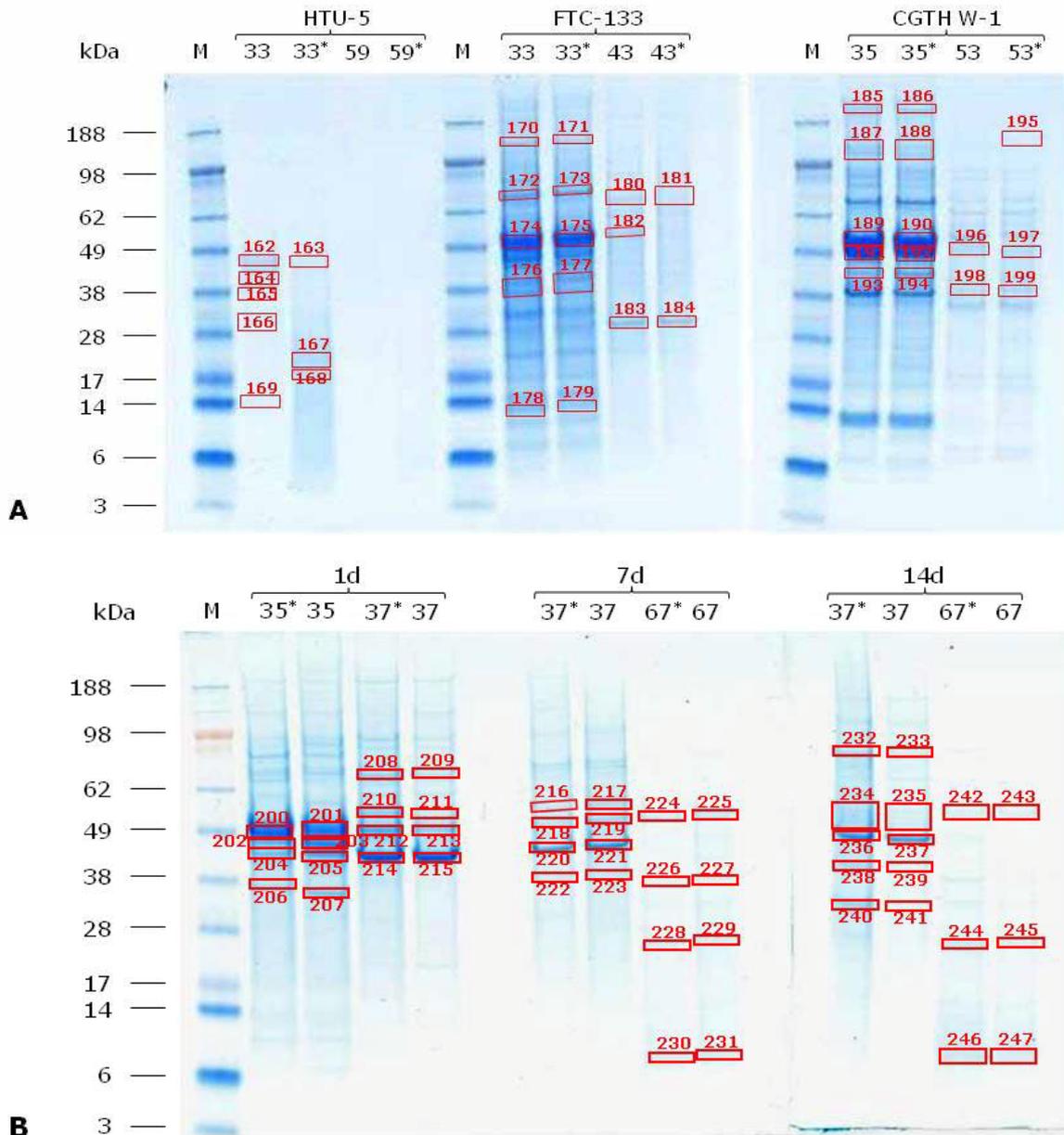
#### **4.2.1.2) SDS-PAGE ausgewählter FF-IEF-Fraktionen mit Coomassie Blaufärbung**

Zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Analyse wurden die nach Betrachtung der Silber gefärbten Gele ausgewählte FF-IEF-Fraktionen erneut in erhöhter Konzentration auf weitere SDS-PAGE aufgetragen. Um eine umfassende Analyse durchzuführen, hätten alle FF-IEF-Fraktionen für die Massenspektrometrie vorbereitet werden müssen. Leider war dies aus technischen, finanziellen und zeitlichen Gründen nicht möglich. Deshalb wurden alle Silber gefärbte Gele miteinander verglichen und die Fraktionen ausgewählt, die interessanteste Ergebnisse versprachen. Auswahlkriterien waren Unterschiede im Bandenmuster zwischen 1g und  $\mu$ g oder Veränderungen unter  $\mu$ g im Verlauf der Zeit (rote Pfeile **Abb. 19-22**, in diesen Abbildungen sind die Fraktionen der Ein-Tageversuche stellvertretend gezeigt). Die ausgewählten Fraktionen wurden in der zweiten SDS-PAGE unter Einsatz eines größeren Volumens der jeweiligen Fraktion nach Molekulargewicht aufgetrennt und die Proteinbanden in dieser zweiten SDS-PAGE mit Coomassie Blau angefärbt, um sie nachfolgend für eine massenspektrometrische Analyse verwenden zu können. In diesen SDS-PAGE liefen die jeweiligen Fraktionen der 1g und  $\mu$ g Cytosol- (**Abb. 23**)





**Abb. 23: Coomassie Blaufärbung von Cytosol-Fraktionen [Pietsch, 2010]**  
 Aufgetragen wurden 25 µl je FF-IEF-Fraktion. Mit \* sind die FF-IEF-Fraktionen der µg Proben markiert. Zelllinien: **A:** HTU-5; **B:** CGTH W-1; **C:** FTC-133; **D:** ML-1. **A-C:** Lysate vom Drei-Tageversuch, M: Marker, die Zahlen über den Proteinbahnen nennen die aufgetragene FF-IEF-Fraktion.



**Abb. 24: Coomassie Blaufärbung von Pellet-Fraktionen [Pietsch, 2010]**

Aufgetragen wurden 25 µl je FF-IEF-Fraktion. Mit \* sind die FF-IEF-Fraktionen der µg Proben markiert. Zelllinien: **A:** HTU-5, FTC-133, CGTH W-1; **B:** ML-1. **A:** Lysate vom Drei-Tageversuch, M: Marker, die Zahlen über den Proteinbahnen nennen die aufgetragene FF-IEF-Fraktion.

Für die Zelllinie HTU-5 wurden 33 Gelstücke der Cytosol- und 8 Gelstücke der Pellet-Fraktionen ausgewählt und untersucht, 42 beziehungsweise 15 Gelstücke für die Zelllinie CGTH W-1, 36 beziehungsweise 15 Gelstücke für die Zelllinie FTC-133 und 50 beziehungsweise 48 Gelstücke für die Zelllinie ML-1. Insgesamt wurden 161 Gelstücke der Cytosol-Fraktionen und 86 Gelstücke der Pellet-Fraktionen untersucht.

#### 4.2.2) Nano-LC-MS/MS-Analyse ausgeschnittener Proteinbanden

In 204 der insgesamt 247 Gelstücke (161 Gelstücke der Cytosol-Fraktionen, 86 Gelstücke der Pellet-Fraktionen, vgl. **Abb. 23** und **Abb. 24**) konnten Proteine und Polypeptide identifiziert werden. Die Anzahl identifizierter Proteine und Polypeptide je

ausgeschnittenem Gelstück variierte von einigen wenigen bis zu mehr als 30. Aus diesem Grund wurde die Lage des Gelstückes im Gel mit der Größe der darin gefundenen Proteine und Polypeptide verglichen. 1210 Proteine stimmten in Lage und Molekulargewicht überein.

Aufgrund der Auswahl der untersuchten FF-IEF-Fractionen und ausgeschnittenen Banden fanden sich in den verschiedenen Zelllinien zum Teil identische Proteine beziehungsweise mehrere Isoformen eines Proteins oder Polypeptids. Insgesamt konnten 235 verschiedene Proteine und Polypeptide in allen untersuchten Gelstücken nachgewiesen werden. Zählt man die verschiedenen Isoformen dazu, belief sich die Zahl auf 356 identifizierte Proteine und Polypeptide.

Der Mascot™ Score stellt einen dimensionslosen Wert für die Wahrscheinlichkeit dar, dass das identifizierte Protein ein richtiges Ereignis ist [Perkins, 1999]. Allgemein üblich gilt ein Protein als sicher identifiziert, wenn der Mascot™ Score >100 ist. Je höher dieser Wert wird, desto sicherer ist die Identifizierung. Von den 1210 nachgewiesenen Proteinen und Polypeptide wiesen 631 einen Mascot™ Score von >500 auf. Nach Zusammenfassen von mehrfach gefundenen Proteinen und Polypeptiden in den vier untersuchten Zelllinien waren es 128 verschiedene Proteine beziehungsweise 193 gefundene Peptide mit einem Mascot™ Score >500. Diese Proteine und Peptide wurden für die spätere Diskussion in drei Gruppen zusammengefasst: 1) gefunden im Lysat nach Ultraschall-Aufschluss (Cytosol-Lysat), 2) gefunden im Lysat nach Lysieren der Zellfragmente des Ultraschall-Aufschlusses (Pellet-Lysat) und 3) gefunden sowohl in Gruppe 1) als auch in Gruppe 2).

#### 4.2.2.1) Proteomvergleich mit der Literatur

Für den Großteil der in der Proteomanalyse gefundenen Proteine ist bereits bekannt, dass sie in der Schilddrüse exprimiert werden [Giusti, 2008; Krause, 2006, 2007; Paron, 2005; Salzano, 2006; Srisomsap, 2002]. 59 der identifizierten Proteine wurden bisher nicht in der Literatur beschrieben. Von diesen 59 Proteinen konnten 35 in mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten FF-IEF Analysen gefunden werden beziehungsweise 24 wiesen einen Mascot™ Score von >500 auf. Zusammengefasst ergab dies 37 Proteine, die zum ersten Mal für das Proteom der Schilddrüse beschrieben wurden. **Tabelle 6** zeigt die gefundenen Proteine. Alle Proteine sind in dieser und den folgenden Tabellen in ihrer englischen Schreibweise genannt.

**Tab. 6: Liste der erstmals in der Schilddrüse gefundenen Proteine [Pietsch, 2010]**

Protein	Anzahl Peptide-Mascot™ Score	Gefunden in Zelllinie
26S protease regulatory subunit 7	4-202, 15-714	FTC-133
CAP-Gly domain-containing linker protein 1	21-693, 35-965	FTC-133, CGTH W-1
Copine-1	10-368, 7-235	FTC-133
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	11-634	ML-1
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	12-431, 12-410	CGTH W-1
Deoxyhypusine synthase	14-1000, 5-309	CGTH W-1
Fumarylacetoacetase	4-121, 8-296	HTU-5
Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	12-839, 10-487	FTC-133
Hypoxia upregulated protein 1	10-304, 15-310	CGTH W-1
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitoch.	10-605, 5-425	FTC-133
Interferon-induced 17 kDa protein precursor	8-955, 8-610	ML-1
Multisynthetase complex auxiliary component p43	10-433, 10-379	CGTH W-1
Nucleolin	7-207, 3-135	CGTH W-1
Nucleophosmin	3-132, 4-112	FTC-133
Nucleoredoxin	12-867, 7-343	CGTH W-1
Plastin-2	18-896, 3-165	FTC-133
Polymerase delta-interacting protein 2	8-234, 7-274	CGTH W-1
Programmed cell-death protein 6	7-170, 7-265	FTC-133
Protein AHNAK2	19-640, 29-1194	FTC-133
Reticulocalbin-1	8-412, 9-711	HTU-5
Ribonuclease UK114	6-307, 4-235	ML-1
Ribosome-binding protein 1	31-1349, 16-353	CGTH W-1
S-formylglutathione hydrolase	6-495, 12-710	FTC-133
Serin-threonine kinase receptor-associated protein	13-708, 19-1062	CGTH W-1
Septin-11	8-285, 10-367	CGTH W-1, HTU-5
Sialic acid synthase	13-785	HTU-5
Sideroflexin-1	5-179, 6-229	ML-1
Single-stranded DNA-binding protein, mitoch.	7-444, 8-434	FTC-133
S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	12-702, 7-508	FTC-133
SUMO-activating enzyme subunit 1	21-2133, 16-1482	CGTH W-1
Transgelin-2	11-548, 14-784	FTC-133, CGTH W-1
Tryptophanyl-tRNA synthase, cytoplasmic	9-329, 19-888	ML-1
Tubulin folding cofactor B	8-555, 8-544	FTC-133
Tubulin-specific chaperone A	10-711, 11-907	CGTH W-1
UMP-CMP kinase	7-716, 6-536	FTC-133
Vacular ATP synthase catalytic subunit A	20-1012, 16-802	ML-1, FTC-133
Xaa-Pro dipeptidase	7-273, 15-1059	FTC-133

Die Tabelle zeigt Proteine, die nach mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten FF-IEF Analysen identifiziert wurden und/oder einen Mascot™ Score >500 aufwiesen. Diese Proteine konnten für die Schilddrüse als in der Literatur bisher nicht bekannt gefunden werden. Die zweite Spalte gibt die Anzahl der beobachteten Peptide für das Protein und die höchsten Mascot™ Scores für diese Peptide an. In der letzten Spalte sind die Zelllinien genannt, in denen das Protein nachgewiesen wurde.

#### 4.2.2.2) Ergebnisse der Massenspektrometrie - Vergleich 1g und µg

Um in komplexen Proteinmischungen den absoluten Inhalt eines Proteins bestimmen zu können, wurde für die massenspektrometrische Analyse der „exponentially modified Protein Abundance Index“ (emPAI) definiert [Ishihama, 2005]. Dieser wurde für den Vergleich der MS Ergebnisse verwendet, um Veränderungen in Proteinkonzentrationen

zu finden. Diese Änderungen könnten ein Hinweis darauf sein, ob die Expression eines Proteins abhängig von der Gravitation ist, die während der Zellkultivierung wirkt. Verglichen wurden Gelstücke der FF-IEF Cytosol- (**Abb. 23**) und Pellet-Fraktionen (**Abb. 24**) nach Möglichkeit paarweise.

**Tabelle 7** listet gefundene Proteine in den Gelstücken der Cytosol-Fraktionen und **Tabelle 8** in den Gelstücken der Pellet-Fraktionen auf. Sortiert sind die Proteine absteigend ihrer emPAI-Werte.

Der Vergleich der emPAI-Werte und Mascot™ Scores von Proteinen in vergleichbaren Gelstücken ergab für verschiedene Proteine deutliche Unterschiede zwischen 1g und µg in der Proteinkonzentration. Zu diesen Proteinen zählten unter anderem die α-Enolase (**Tab. 7, Gelstücke 102/103**), Annexin A2 (**Tab. 7, Gelstücke 104/105**) und Vimentin (**Tab. 8, Gelstücke 189/190**). Es fanden sich allerdings auch Proteine, für die keine oder nur geringe Differenzen der emPAI-Werte und Mascot™ Scores ersichtlich waren. Hierzu zählten beispielsweise Ras-related protein Rab-1B (**Tab. 7, Gelstücke 84/85**), Pyruvat kinase isoenzymes M1/M2 (**Tab. 7, Gelstücke 102/103**) und 78 kDa glucose-regulated protein (**Tab. 8, Gelstücke 172/173**).

**Tab. 7: MS Analyse vergleichender Gelstücke der Cytosol-Fraktionen [Pietsch, 2010]**

1g	emPAI	µg	emPAI
<b>Gelstück 84, Abb. 23C FTC-133</b>		<b>Gelstück 85, Abb. 23C FTC-133</b>	
Translationally controlled tumor protein	15,96	Translationally controlled tumor protein	28,35
Ras-related protein Rab-1B	8,39	Ras-related protein Rab-1B	8,16
Ferritin heavy chain	6,67	Glutathione S-transferase P	5,07
Glutathione S-transferase P	4,63	Ferritin heavy chain	2,16
Sorcin	3,77	Ras-related protein Rab-18	1,89
GRPase NRas	1,76	Ras-related protein Rab-7a	1,44
Ras-related protein Rab-7a	1,52	Programmed cell death protein 6	1,34
Programmed cell death protein 6	1,23	GTPase NRas	1,27
Proteasome subunit β type-9	1,23	Proteasome subunit β type-9	1,13
Ras-related protein Rab-18	0,96	Sorcin	0,90
<b>Gelstück 102, Abb. 23C FTC-133</b>		<b>Gelstück 103, Abb. 23C FTC-133</b>	
α-Enolase	58,70	α-Enolase	34,14
Phosphoglycerate kinase 1	18,13	Phosphoglycerate kinase 1	12,90
Pyruvat kinase isoenzymes M1/M2	4,63	Pyruvat kinase isoenzymes M1/M2	3,97
Fumarate hydratase, mitoch.	2,73	Fumarate hydratase, mitoch.	2,06
Putative elongation factor 1-α-like 3	0,9	Putative elongation factor 1-α-like 3	0,76
<b>Gelstück 104, Abb. 23C FTC-133</b>		<b>Gelstück 105, Abb. 23C FTC-133</b>	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	30,86	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	27,86
Annexin A2	26,70	Annexin A2	14,92
Aldose reductase	5,51	Aldose reductase	4,35
Annexin A1	4,74	Fructose-bisphosphate aldolase	4,05
Fructose-bisphosphate aldolase	3,22	Annexin A1	2,97
Electron transfer flavoprotein	2,36	Electron transfer flavoprotein	4,03

1g	Mascot™ Score	µg	Mascot™ Score
subunit α		subunit α	
Alcohol dehydrogenase [NADP <sup>+</sup> ]	1,39	Alcohol dehydrogenase [NADP <sup>+</sup> ]	1,17
<b>Gelstück 9, Abb. 23A HTU-5</b>		<b>Gelstück 10, Abb. 23A HTU-5</b>	
Triosephosphate isomerase	34,01	Triosephosphate isomerase	25,90
Phosphoglycerate mutase 1	15,87	Phosphoglycerate mutase 1	23,39
Peroxiredoxin-1	1,21	Peroxiredoxin-1	1,58
Proteasome subunit α type-7	1,14	Proteasome subunit α type-7	0,88
<b>Gelstück 59, Abb. 23A CGTH W-1</b>		<b>Gelstück 60, Abb. 23A CGTH W-1</b>	
Tubulin α-1B chain	5966	Tubulin α-1B chain	6569
Tubulin β chain	5388	Tubulin β chain	2348
26S protease regulatory subunit 6A	2137	26S protease regulatory subunit 6A	1623
26S protease regulatory subunit 6B	1711	26S protease regulatory subunit 6B	1358
Elongation factor 1-α1	472	Elongation factor 1-α1	441
α-Enolase	378	α-Enolase	308
<b>Gelstück 145, Abb. 23D ML-1</b>		<b>Gelstück 144, Abb. 23D ML-1</b>	
Transgelin-2	532	Glutathione S-transferase P	510
Peroxiredoxin-1	414	Peroxiredoxin-1	411
Glutathione S-transferase P	254	Transgelin-2	329

1g und µg geben die Bedingung der Kultivierung an. Gezeigt sind Proteine, die entsprechend ihres Molekulargewichtes im jeweiligen Gelstück identifiziert wurden. Nach der Nummer des Gelstücks sind sowohl die Abbildungen (fett) als auch die Zelllinien (kursiv) angegeben. Es handelt sich jeweils um eine Auswahl an gefundenen Proteinen.

Der Vergleich bezog sich für die massenspektrometrische Analyse der Zelllinie ML-1, die als erstes durchgeführt wurde, und zum Teil für die Zelllinie CGTH W-1 nur auf die Mascot™ Scores. Die emPAI-Werte konnten aufgrund einer älteren Software nicht während der früheren Messung bestimmt und auch nicht nachträglich ermittelt werden. Beispiele für Ergebnisse mit Mascot™ Scores zeigen ebenfalls die **Tabelle 7** und **8**. Nur für diese Proteine zeigen die beiden Tabellen Vergleiche von Mascot™ Scores. Wie für die Proteine mit emPAI-Werten sind auch die Proteine mit Mascot™ Scores entsprechend ihrer Scores absteigend sortiert.

Für Proteine, für die emPAI-Werte verglichen werden konnten, war zu beobachten, dass die Reihenfolge nicht identisch war, wenn dieselben Proteine entsprechend ihrer Mascot™ Scores sortiert worden wären.

**Tab. 8: MS Analyse vergleichender Gelstücke der Pellet-Fractionen**

1g	emPAI	µg	emPAI
<b>Gelstück 172, Abb. 24A FTC-133</b>		<b>Gelstück 173, Abb. 24A FTC-133</b>	
78 kDa glucose-regulated protein	12,41	78 kDa glucose-regulated protein	12,41
Heat shock cognate 71 kDa protein	8,37	Heat shock cognate 71 kDa protein	8,86
Lamin-B1	6,04	Lamin B-1	5,66
Protein-glutamine gamma-	1,40	Protein-glutamine gamma-	1,30

glutamyltransferase		glutamyltransferase	
<b>Gelstück 189, Abb. 24A</b> <i>CGTH W-1</i>		<b>Gelstück 190, Abb. 24A</b> <i>CGTH W-1</i>	
<b>1g</b>	<b>Mascot™ Score</b>	<b>µg</b>	<b>Mascot™ Score</b>
Vimentin	298,87	Vimentin	279,41
Tubulin α-1B chain	3,75	ATP synthase subunit beta, mitoch.	14,49
Tubulin β chain	3,20	Tubulin β chain	7,61
ATP synthase subunit beta, mitoch.	2,58	Tubulin α-1B chain	5,77
<b>Gelstück 223, Abb. 24B</b> <i>ML-1</i>		<b>Gelstück 222, Abb. 24B</b> <i>ML-1</i>	
Actin, cytoplasmic 1	1307	Actin, cytoplasmic 1	1352
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β-1	526	Annexin A2	696
F-actin-capping protein subunit α-1	505	F-actin-capping protein subunit α-1	564
Annexin A1	501	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β-1	449
Annexin A2	467	Annexin A1	430

1g und µg geben die Bedingung der Kultivierung an. Gezeigt sind Proteine, die entsprechend ihres Molekulargewichtes im jeweiligen Gelstück identifiziert wurden. Nach der Nummer des Gelstücks sind sowohl die Abbildungen (fett) als auch die Zelllinien (kursiv) angegeben. Es handelt sich jeweils um eine Auswahl an gefundenen Proteinen.

#### 4.2.2.3) Ergebnisse der Massenspektrometrie von Cytoskelettproteinen

##### Vimentin

Vimentin konnte fast nur in Fraktionen der Pellet-Lysate nachgewiesen werden (**Tab. 9**). Ausnahmen waren die untersuchte Gelbande 74 des Cytosol-Lysats der Zelllinie CGTH W-1, in welcher sich Vimentin mit einem sehr geringen Mascot™ Score von 134 fand, und die Gelbanden 124 und 126 des Cytosol-Lysats der Zelllinie ML-1. In diesen beiden Gelstücken betrug die Mascot™ Scores 573 und 413. In den Pellet-Fraktionen konnte Vimentin unabhängig des pH-Wertes in nahezu jeder Fraktion nachgewiesen werden. Die höchsten emPAI-Werte beziehungsweise Mascot™ Scores wiesen jedoch die Fraktionen 33 bis 35 (pH 5,5 bis 5,9) auf.

Die untersuchten Gelstücke mit Molekulargewichten von 50 und 55 kDa lagen niedriger, beziehungsweise höher als das Molekulargewicht von ungefähr 54 kDa von Vimentin. Die Bande bei etwa 55 kDa entsprach stärker dem Molekulargewicht von Vimentin und wies für die Zelllinie CGTH W-1 eine höhere Konzentration an Vimentin auf als die Bande bei rund 50 kD.

Der Vergleich der emPAI-Werte beziehungsweise Mascot™ Scores zwischen den Lysaten der unter 1g mit den unter µg kultivierten Zellen zeigte tendenziell für alle Zelllinien eine Abnahme der Proteinkonzentration unter µg. Für das Gelstück 203 konnten aufgrund von technischen Schwierigkeiten bei der Messung keine Ergebnisse erhalten werden.

**Tab. 9: MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Vimentin [Pietsch, 2011, a]**

		Pellet-Fraktion					
		Mascot™ Score	50 kDa emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	55 kDa emPAI	Gel- stück
<b>HTU-5</b>	1g	8.466	72,28	162	-/-		
	µg	4.500	41,84	163	-/-		
<b>CGTH W-1</b>	1g	21.480	147,08	191	19.542	298,87	189
	µg	18.089	101,49	192	18.651	279,41	190
<b>FTC-133</b>	1g	9.103	77,36	174	-/-		
	µg	10.578	59,66	175	-/-		
<b>ML-1</b>	1g	-/-		203	-/-		201
	µg	5.645		202	-/-		200

Das angegebene Molekulargewicht gibt an, in welcher Höhe die untersuchte Bande im SDS-PAGE lag. Zu jedem untersuchten Gelstück sind die Nummer und Mascot™ Scores sowie, falls vorhanden, die emPAI-Werte angegeben. '-/-' bedeutet, dass in dem vergleichbaren Gelstück das Protein nicht gefunden, eine entsprechende Bande nicht untersucht wurde oder die Analyse keine Ergebnisse lieferte. Ausnahme ML-1: die ausgeschnittenen Banden 200, 201 und 203 konnten aufgrund von technischen Schwierigkeiten nicht massenspektrometrisch untersucht werden. Für die Zelllinien HTU-5, CGTH W-1 und FTC-133 wurden Proben der Dreitageversuche, für die Zelllinie ML-1 Proben des Ein-Tageversuches untersucht.

### Tubulin

Isoformen des Proteins Tubulin fanden sich für alle vier Zelllinien überwiegend in den Pellet-Lysaten (**Tab. 10**). Die am häufigsten zu findenden Isoformen waren  $\alpha$ -1B- und  $\beta$ -Tubulin. Beide wurden in Gelstücken nachgewiesen, die einem Molekulargewicht von 50 kDa entsprachen und in den FF-IEF-Fraktionen 31 bis 35 lagen. In den Pellet-Lysaten war die Menge in Bezug auf die emPAI-Werte oder Mascot™ Scores für  $\beta$ -Tubulin zwei- bis viermal höher als für  $\alpha$ -1B-Tubulin.

Beide Tubulin-Isoformen konnten im Cytosol-Lysat nur für die Zelllinie CGTH W-1 nachgewiesen werden. Für die Zelllinien HTU-5, FTC-133 und ML-1 wurden keine zu den Gelstücken 59 und 60 der Zelllinie CGTH W-1 vergleichbaren Gelstücke untersucht. Die Banden 124 bis 127 der Zelllinie ML-1 entsprachen nahezu in ihrer Lage denen der Zelllinie CGTH W-1. In diesen fand sich jedoch kein Tubulin.

Für die Zelllinien CGTH W-1 zeigte sich unter µg eine Erhöhung der  $\alpha$ -1B-Tubulin Konzentration und für  $\beta$ -Tubulin eine Erniedrigung. Gleichfalls erniedrigt war  $\beta$ -Tubulin für die Zelllinie FTC-133, für die auch eine Abnahme an  $\alpha$ -1B-Tubulin zu verzeichnen war. Die Zelllinie ML-1 zeigte für  $\alpha$ -1B-Tubulin eine mehr als zweifache Erhöhung und für  $\beta$ -Tubulin gleichfalls einen Anstieg.

Tab. 10: MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Tubulin (Isoformen) [Pietsch, 2011, a]

50 kDa		Cytosol-Fraktion				
		Mascot™ Score	$\alpha$ -1B emPAI	Gelstück	Mascot™ Score	$\beta$ emPAI
HTU-5	1g	-/-			-/-	
	$\mu$ g	-/-			-/-	
CGTH W-1	1g	5.966		59	5.388	59
	$\mu$ g	6.569		60	2.348	60
FTC-133	1g	-/-			-/-	
	$\mu$ g	-/-			-/-	
ML-1	1g	-/-			-/-	
	$\mu$ g	-/-			-/-	

50 kDa		Pellet-Fraktion					
		Mascot™ Score	$\alpha$ -1B emPAI	Gelstück	Mascot™ Score	$\beta$ emPAI	Gelstück
HTU-5	1g	-/-			-/-	162	
	$\mu$ g	-/-			107	0,33	163
CGTH W-1	1g	1.066	3,75	189	5.849	23,09	191
	$\mu$ g	1.412	5,77	190	4.625	20,89	192
FTC-133	1g	2.698	10,12	174	7.087	35,18	174
	$\mu$ g	1.739	6,01	175	6.133	17,67	175
ML-1	1g	658		207	1117		207
	$\mu$ g	1.550		206	1460		206

Das angegebene Molekulargewicht gibt an, in welcher Höhe die untersuchte Bande im SDS-PAGE lag. Zu jedem untersuchten Gelstück sind die Nummern und Mascot™ Scores sowie, falls vorhanden, die emPAI-Werte angegeben. '-/-' bedeutet, dass in dem vergleichbaren Gelstück das Protein nicht gefunden oder eine entsprechende Bande nicht untersucht wurde. Cytosol-Lysat: für HTU-5, FTC-133 W-1 und ML-1 entsprechende Banden zu den Gelstücken 59 und 60 nicht untersucht. Pellet-Lysat: für HTU-5 keine Banden untersucht ( $\alpha$ -1B) und in Bande 162 kein Tubulin nachgewiesen. Für die Zelllinien HTU-5, CGTH W-1 und FTC-133 wurden Proben der Drei-Tageversuche, für die Zelllinie ML-1 Proben des Ein-Tageversuches untersucht.

### Aktin

Das Protein Aktin wurde in der FF-IEF zu den Cytosol- und Pellet-Fraktionen 33 bis 35 (pH 5,5 bis 5,9) transportiert und ließ sich in Gelstücken nachweisen, die einem Molekulargewicht von etwa 40 bis 45 kDa entsprachen (Tab. 11-14). Ausgehend von den emPAI-Werten beziehungsweise Mascot™ Scores lag für alle Zelllinien eine höhere Konzentration des Proteins in den Cytosol-Lysaten vor.

Der Vergleich der Ergebnisse der Gelstücke von unter  $\mu$ g mit unter 1g kultivierten Zellen lieferte einen Anstieg der Proteinkonzentration für die Zelllinien HTU-5 und CGTH W-1, jedoch eine Verminderung für die Zelllinien FTC-133 und ML-1 unter  $\mu$ g. Diese Tendenzen trafen sowohl für die Cytosol- als auch für die Pellet-Fraktionen zu.

An Aktin-bindende oder das Aktin-Gerüst regulierende Proteine wurden ebenfalls in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert (**Tab. 11-14**). Erstere fanden sich überwiegend in untersuchten Gelstücken von Pellet-Fraktionen, wohingegen letztere ausschließlich in Cytosol-Fraktionen vorlagen.

Zu den nachgewiesenen Aktin-bindenden Proteinen zählten Myosin-9, Plectin, Filamin A,  $\alpha$ -Actinin-4 und Tropomodulin 3. Der Nachweis von Myosin-9 konnte für die Zelllinien CGTH W-1, FTC-133 und ML-1 in Pellet-Fraktionen erbracht werden. Nur für die Zelllinie CGTH W-1 fand sich dieses Protein auch im Cytosol-Lysat. Plectin war nur für die Zelllinien CGTH W-1 und FTC-133 in Pellet-Fraktionen und für Cytosol-Fraktionen der Zelllinie CGTH W-1 nachweisbar. Tropomodulin 3 fand sich ausschließlich in der Zelllinie CGTH W-1, hier allerdings ebenfalls sowohl in Cytosol- als auch in Pellet-Fraktionen. Ausschließlich in den Pellet-Fraktionen der Zelllinien FTC-133 und ML-1 ließ sich  $\alpha$ -Actinin-4 nachweisen. Filamin A war im Gegensatz zu den anderen Aktin-bindenden Proteinen für alle Zelllinien in Cytosol-Fraktionen nachweisbar. Jedoch konnte es nur für die Zelllinien CGTH W-1 und FTC-133 auch in Pellet-Fraktionen detektiert werden.

Sowohl Proteinkonzentrationsanstiege und -verminderungen als auch unveränderte Proteinmengen unter Einfluss von  $\mu\text{g}$  im Vergleich zu 1g konnten beobachtet werden. Diese stimmten für das Protein Filamin A im Vergleich von Cytosol- und Pellet-Fraktionen der Zelllinie FTC-133 miteinander überein.

Von den Aktin-regulierenden Proteinen konnten die beiden Proteine Moesin und Tropomyosin  $\alpha$ -4 in allen entsprechenden Cytosol-Fraktionen der vier Zelllinien identifiziert werden. Ausschließlich in der Zelllinie CGTH W-1 war das Protein Profilin 2 nachweisbar. Profilin 1, Cofilin 1 und Cofilin 2 fand sich in den Cytosol-Fraktionen sowohl der Zelllinie FTC-133 als auch der Zelllinie ML-1. Ezrin konnte nur in den Cytosol-Fraktionen der Zelllinien HTU-5 und FTC-133 identifiziert werden.

Für Moesin stieg die Proteinkonzentration im Cytosol-Lysat für alle Zelllinien unter Einfluss von  $\mu\text{g}$  an. Die anderen Proteine wiesen sowohl Proteinkonzentrationsanstiege und -erniedrigungen als auch unveränderte Proteinmengen unter  $\mu\text{g}$  auf.

Tab. 11: MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Aktin, zu Aktin-bindenden und Aktin-regulierenden Proteinen - HTU-5

Cytosol-Fraktion							
	kDa	Mascot™ Score	1g emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	µg emPAI	Gel- stück
<i>Protein Aktin</i>							
<b>Aktin</b>	43	5.570	15,71	23	5.500	17,20	24
<i>Aktin-bindende Proteine</i>							
<b>Myosin-9</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Plectin</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Filamin A</b>	>110	263	0,08	19	422	0,18	20
<b>α-Actinin-4</b>	90	-/-			-/-		
<b>Tropomodulin 3</b>	42	-/-			-/-		
<i>Aktin-regulierende Proteine</i>							
<b>Moesin</b>	65	135	0,30	21	270	0,61	22
<b>Tropomyosin α-4</b>	30	1.122	6,30	27	1.421	6,30	28
<b>Profilin 1</b>	17	-/-			510	8,81	31
<b>Profilin 2</b>	17	-/-			-/-		
<b>Cofilin 1</b>	20	-/-			139	1,55	11
<b>Cofilin 2</b>	17	-/-			141	0,75	18
<b>Ezrin</b>	42	101	0,17	2	-/-		
Pellet-Fraktion							
	kDa	Mascot™ Score	1g emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	µg emPAI	Gel- stück
<i>Protein Aktin</i>							
<b>Aktin</b>	43	419	0,98	164	-/-		
<i>Aktin-bindende Proteine</i>							
<b>Myosin-9</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Plectin</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Filamin A</b>	>110	-/-			-/-		
<b>α-Actinin-4</b>	90	-/-			-/-		
<b>Tropomodulin 3</b>	42	-/-			-/-		

Das angegebene Molekulargewicht gibt an, in welcher Höhe die untersuchte Bande im SDS-PAGE lag. Zu jedem untersuchten Gelstück sind die ausgeschnittenen Gelstücke und Mascot™ Scores sowie, falls vorhanden, die emPAI-Werte angegeben. '-/-' bedeutet, dass das Protein nicht gefunden wurde oder eine entsprechende Bande nicht untersucht wurde. Die angegebenen Mascot™ Scores beziehungsweise emPAI-Werte beziehen sich auf Proben des Drei-Tageversuchs.

Tab. 12: MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Aktin, zu Aktin-bindenden und Aktin-regulierenden Proteinen - CGTH W-1 [Pietsch, 2011, a]

Cytosol-Fraktion							
	kDa	Mascot™ Score	1g emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	µg emPAI	Gel- stück
<i>Protein Aktin</i>							
<b>Aktin</b>	43	5.117		61	6.984		62
<i>Aktin-bindende Proteine</i>							
<b>Myosin-9</b>	>110	482		52	204		53
<b>Plectin</b>	>110	-/-			178		53
<b>Filamin A</b>	>110	534		49	400		50
<b>α-Actinin-4</b>	90	-/-			-/-		
<b>Tropomodulin 3</b>	42	399		61	395		62
<i>Aktin-regulierende Proteine</i>							
<b>Moesin</b>	65	2.205		57	2.637		58
<b>Tropomyosin α-4</b>	30	389		75	-/-		
<b>Profilin 1</b>	17	-/-			-/-		
<b>Profilin 2</b>	17	149		65	142		66
<b>Cofilin 1</b>	20	-/-			-/-		
<b>Cofilin 2</b>	17	-/-			-/-		
<b>Ezrin</b>	42	-/-			-/-		

Pellet-Fraktion							
	kDa	Mascot™ Score	1g emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	µg emPAI	Gel- stück
<i>Protein Aktin</i>							
<b>Aktin</b>	43	2.442	7,96	193	4.575	13,09	194
<i>Aktin-bindende Proteine</i>							
<b>Myosin-9</b>	>110	3.666	2,17	187	3.814	2,17	188
<b>Plectin</b>	>110	1.938	0,54	185	3.281	0,73	186
<b>Filamin A</b>	>110	1.720	0,98	187	2.342	1,06	186
<b>α-Actinin-4</b>	90	-/-			-/-		
<b>Tropomodulin 3</b>	42	749	2,59	193	1.036	3,64	194

Das angegebene Molekulargewicht gibt an, in welcher Höhe die untersuchte Bande im SDS-PAGE lag. Zu jedem untersuchten Gelstück sind die ausgeschnittenen Gelstücke und Mascot™ Scores sowie, falls vorhanden, die emPAI-Werte angegeben. '-/-' bedeutet, dass das Protein nicht gefunden wurde oder eine entsprechende Bande nicht untersucht wurde. Die angegebenen Mascot™ Scores beziehungsweise emPAI-Werte beziehen sich auf Proben des Drei-Tageversuchs.

Tab. 13: MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Aktin, zu Aktin-bindenden und Aktin-regulierenden Proteinen - FTC-133 [Pietsch, 2011, a]

		Cytosol-Fraktion					
	kDa	Mascot™ Score	1g emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	µg emPAI	Gel- stück
<i>Protein Aktin</i>							
<b>Aktin</b>	43	5.195		78	3.317		79
<i>Aktin-bindende Proteine</i>							
<b>Myosin-9</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Plectin</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Filamin A</b>	>110	332		76	264		77
<b>α-Actinin-4</b>	90	-/-			-/-		
<b>Tropomodulin 3</b>	42	-/-			-/-		
<i>Aktin-regulierende Proteine</i>							
<b>Moesin</b>	65	2.089	3,94	89	1.711	4,21	90
<b>Tropomyosin α-4</b>	30	1.826		82	2.205	9,08	83
<b>Profilin 1</b>	17	4.151	151,04	110	5.022	239,06	111
<b>Profilin 2</b>	17	-/-			-/-		
<b>Cofilin 1</b>	20	739	6,82	108	1.305	15,51	109
<b>Cofilin 2</b>	17	331	2,05	110	314	2,05	111
<b>Ezrin</b>	42	-/-			245	0,52	96
		Pellet-Fraktion					
	kDa	Mascot™ Score	1g emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	µg emPAI	Gel- stück
<i>Protein Aktin</i>							
<b>Aktin</b>	43	561	2,35	176	213	0,25	177
<i>Aktin-bindende Proteine</i>							
<b>Myosin-9</b>	>110	4.962	3,29	170	3.502	2,12	171
<b>Plectin</b>	>110	441	0,12	170	302	0,07	171
<b>Filamin A</b>	>110	1.481	0,45	170	675	0,33	171
<b>α-Actinin-4</b>	90	689	0,93	172	692	1,21	173
<b>Tropomodulin 3</b>	42	-/-			-/-		

Das angegebene Molekulargewicht gibt an, in welcher Höhe die untersuchte Bande im SDS-PAGE lag. Zu jedem untersuchten Gelstück sind die ausgeschnittenen Gelstücke und Mascot™ Scores sowie, falls vorhanden, die emPAI-Werte angegeben. '-/-' bedeutet, dass das Protein nicht gefunden wurde oder eine entsprechende Bande nicht untersucht wurde. Die angegebenen Mascot™ Scores beziehungsweise emPAI-Werte beziehen sich auf Proben des Drei-Tageversuchs.

Tab. 14: MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Aktin, zu Aktin-bindenden und Aktin-regulierenden Proteinen - ML-1

Cytosol-Fraktion							
	kDa	Mascot™ Score	1g emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	µg emPAI	Gel- stück
<i>Protein Aktin</i>							
<b>Aktin</b>	43	1.701		115	982		114
<i>Aktin-bindende Proteine</i>							
<b>Myosin-9</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Plectin</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Filamin A</b>	>110	241	123		379	122	
<b>α-Actinin-4</b>	90	-/-			-/-		
<b>Tropomodulin 3</b>	42	-/-			-/-		
<i>Aktin-regulierende Proteine</i>							
<b>Moesin</b>	65	368		137	604		136
<b>Tropomyosin α-4</b>	30	-/-			326		128
<b>Profilin 1</b>	17	2.246		159	250		158
<b>Profilin 2</b>	17	-/-			-/-		
<b>Cofilin 1</b>	20	806		121	503		120
<b>Cofilin 2</b>	17	549		121	-/-		
<b>Ezrin</b>	42	-/-			-/-		
Pellet-Fraktion							
	kDa	Mascot™ Score	1g emPAI	Gel- stück	Mascot™ Score	µg emPAI	Gel- stück
<i>Protein Aktin</i>							
<b>Aktin</b>	43	3041		213	1619		212
<i>Aktin-bindende Proteine</i>							
<b>Myosin-9</b>	>110	1.230		209	1.499		208
<b>Plectin</b>	>110	-/-			-/-		
<b>Filamin A</b>	>110	-/-			-/-		
<b>α-Actinin-4</b>	90	951		209	507		208
<b>Tropomodulin 3</b>	42	-/-			-/-		

Das angegebene Molekulargewicht gibt an, in welcher Höhe die untersuchte Bande im SDS-PAGE lag. Zu jedem untersuchten Gelstück sind die ausgeschnittenen Gelstücke und Mascot™ Scores sowie, falls vorhanden, die emPAI-Werte angegeben. '-/-' bedeutet, dass das Protein nicht gefunden wurde oder eine entsprechende Bande nicht untersucht wurde. Die angegebenen Mascot™ Scores beziehungsweise emPAI-Werte beziehen sich für die Gelstücke 112-121 auf den Drei-Tageversuch, für die Gelstücke 122-139 auf den Sieben-Tageversuch, für die Gelstücke 140-161 auf den Elf-Tageversuch und für die Gelstücke 200-215 auf den Ein-Tageversuch.

#### 4.2.2.4) Spaltprodukte

In den untersuchten Gelstücken fanden sich neben Proteinen, die ein Molekulargewicht entsprechend der Bandenlage aufwiesen, Proteine mit zum Teil sehr hohen Mascot™ Scores oder emPAI-Werten und deutlich größerem Molekulargewicht, als die Bande anzeigte. Das lässt vermuten, dass Proteasen während der Inkubation der Zellen oder während der Isolation der Proteine aktiv waren. Daher wurde nach möglichen Spaltprodukten gesucht, die in der Summe dem Molekulargewicht des jeweiligen Proteins entsprechen. **Tabelle 15** listet exemplarisch für zwei Pellet-Fractionen, Fraktion 33 der Zelllinie FTC-133 und Fraktion 35 der Zelllinie CGTH W-1, die gefundenen Proteine für mehrere Gelstücke jeweils im Vergleich 1g und µg auf. Gezeigt sind Proteine, die in zwei oder mehr Gelstücken gefunden wurden. Im Folgenden werden nur die Gelstücke der 1g Fraktionen genannt. Entsprechendes gilt auch für die Gelstücke der µg Fraktionen, wenn nicht ausdrücklich auf Unterschiede hingewiesen wird.

Die Proteine Myosin-9 und  $\alpha$ -Actinin-4, beide nachgewiesen in der Zelllinie FTC-133, konnten in verschiedenen Gelstücken identifiziert werden. Für das Protein Myosin-9, welches etwa 230 kDa groß ist, waren dies die Gelstücke 170, welches einem Molekulargewicht von rund 140 kDa entsprach, und 172, welches ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa aufwies. Allerdings wies die Summe beider Gelstücke eine Differenz von ungefähr 20 kDa zum Molekulargewicht von Myosin-9 auf. In den Gelstücken 172 (rund 70 kDa) und 176 (etwa 40 kDa) konnte mit einer guten Übereinstimmung in der Summe der Molekulargewichte das ungefähr 105 kDa große Protein  $\alpha$ -Actinin-4 gefunden werden.

Myosin-9 wurde auch in der Zelllinie CGTH W-1 gefunden. Es war in allen drei gezeigten Gelstücken unter 1g nachzuweisen. Die Gelstücke 185 (etwa 200 kDa) und 189 (etwa 50 kDa) entsprachen ebenfalls mit einer Differenz von ungefähr 20 kDa zusammen dem Molekulargewicht des Proteins. Das dritte Gelstück, in dem das Protein gefunden wurde, war Gelstück 197 bei ungefähr 140 kDa. Die Differenz zum Molekulargewicht von Myosin-9 beträgt rund 90 kDa. In dieser Lage wurde keine Proteinbande untersucht.

Auch für das Heat shock Protein HSP 90- $\beta$  mit einem Molekulargewicht von ungefähr 84 kDa ergaben zwei Gelstücke (174 mit rund 50 kDa und 176 mit rund 40 kDa) ungefähr die Größe des Proteins. Das Gelstück 176 mit rund 40 kDa könnte dem Protein entsprechen, wenn es in zwei gleich große Reste gespalten wurde. Unter Berücksichtigung der emPAI-Werte wurde dieses Protein mit der höchsten Konzentration in dem Gelstück 172 (rund 70 kDa) gefunden. Somit müsste in dem Gelstück 178 (etwa 15 kDa, **Abb. 24**) dieses Protein ebenfalls zu finden sein. Dies war jedoch nicht der Fall.

Die Proteine Spectrin  $\alpha$  chain (etwa 285 kDa), Filamin-A (rund 283 kDa), Filamin-B (circa 180 kDa) und Dynactin subunit 1 (rund 143 kDa) wurden in Gelstücken gefunden, die ungefähr der Hälfte der Molekulargewichte der Proteine entsprachen.

Alle gezeigten Proteine der **Tabelle 15** konnten, wie zuvor erklärt, sowohl für die Fraktionen der 1g Lysate als auch der  $\mu$ g Lysate beobachtet werden. Ausnahme davon war Myosin-9. Dieses Protein konnte unter  $\mu$ g nicht in dem Gelstück 190 bei rund 50 kDa nachgewiesen werden.

Für das Protein Myosin-9 sank die Proteinkonzentration unter  $\mu$ g laut der emPAI-Werte in den Gelstücken 172 und 173 der Zelllinie FTC-133. Für die Gelstücke mit vergleichbaren Molekulargewichten der Zelllinie CGTH W-1 konnte keine Veränderung zwischen 1g und  $\mu$ g gefunden werden.

**Tab. 15: Untersuchung der MS Ergebnisse mehrerer Gelstücke einer Pellet-Fraktion nach Spaltprodukten gefundener Proteine**

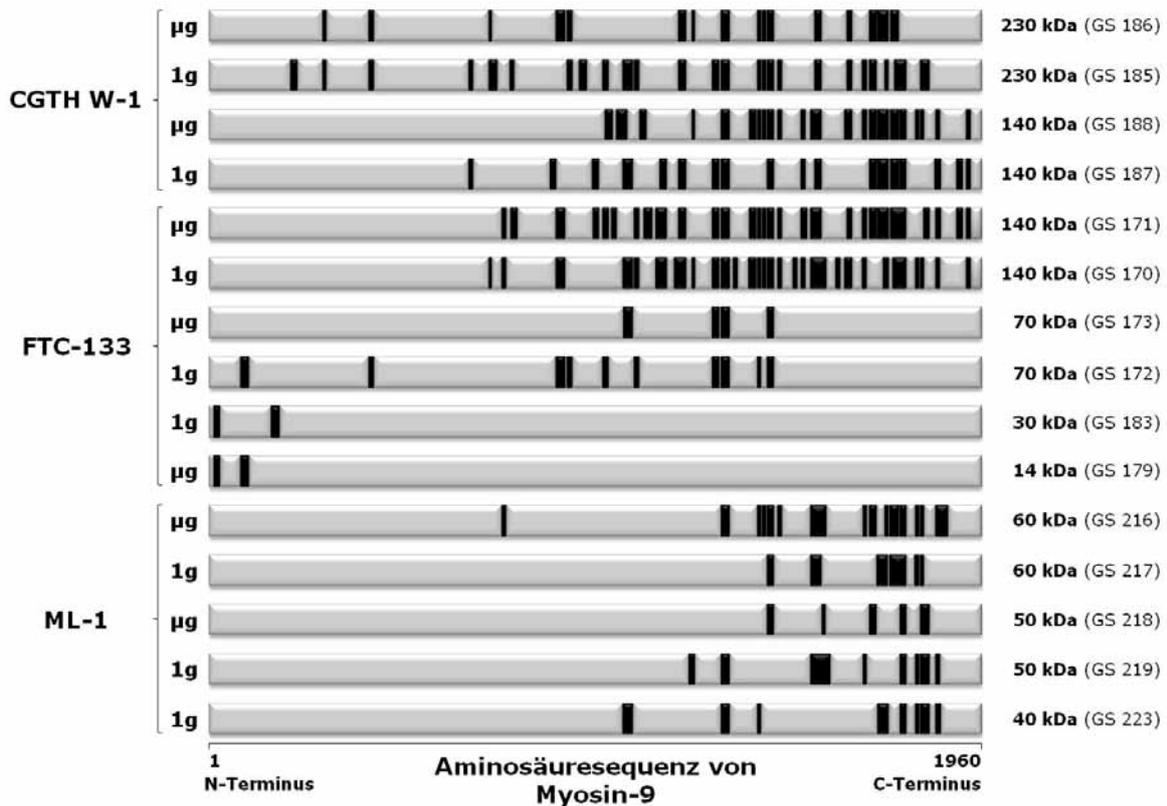
1g	emPAI	$\mu$ g	emPAI
<b>Fraktion 33, Abb. 24A FTC-133</b>		<b>Fraktion 33, Abb. 24A FTC-133</b>	
<b>Gelstück 170</b> ~140 kDa		<b>Gelstück 171</b> ~140 kDa	
Myosin-9 (~230 kDa)	3,29	Myosin-9 (~230 kDa)	2,12
Spectrin $\alpha$ chain, brain (~285 kDa)	0,85	Spectrin $\alpha$ chain, brain (~285 kDa)	0,82
Filamin-A (~283 kDa)	0,45	Filamin-A (~283 kDa)	0,33
Filamin-B (~280 kDa)	0,38	Filamin-B (~280 kDa)	0,31
<b>Gelstück 172</b> ~70 kDa		<b>Gelstück 173</b> ~70 kDa	
$\alpha$ -Actinin-4 (~105 kDa)	0,93	$\alpha$ -Actinin-4 (~105 kDa)	1,21
Heat shock protein HSP 90- $\beta$ (~84 kDa)	0,92	Heat shock protein HSP 90- $\beta$ (~84 kDa)	1,09
Filamin-A (~283 kDa)	0,26	Dynactin subunit 1 (~142 kDa)	0,23
Dynactin subunit 1 (~143 kDa)	0,23	Filamin-B (~280 kDa)	0,11
Spectrin $\alpha$ chain, brain (~285 kDa)	0,18	Spectrin $\alpha$ chain, brain (~285 kDa)	0,09
Myosin-9 (~230 kDa)	0,15	Myosin-9 (~230 kDa)	0,07
<b>Gelstück 174</b> ~50 kDa		<b>Gelstück 175</b> ~50 kDa	
Heat shock protein HSP 90- $\beta$ (~84 kDa)	0,30	Heat shock protein HSP 90- $\beta$ (~84 kDa)	0,21
<b>Gelstück 176</b> ~40 kDa		<b>Gelstück 177</b> ~40 kDa	
Heat shock protein HSP 90- $\beta$ (~84 kDa)	0,59	Heat shock protein HSP 90- $\beta$ (~84 kDa)	0,41
$\alpha$ -Actinin-4 (~105 kDa)	0,32	$\alpha$ -Actinin-4 (~105 kDa)	0,13
<b>Gelstück 178</b> ~14 kDa		<b>Gelstück 179</b> ~14 kDa	
-/-		Myosin-9 (~230 kDa)	0,03
<b>Fraktion 35, Abb. 24A CGTH W-1</b>		<b>Fraktion 35, Abb. 24A CGTH W-1</b>	
<b>Gelstück 185</b> ~200 kDa		<b>Gelstück 186</b> ~200 kDa	
Fibronectin (~266 kDa)	1,37	Filamin-A (~283 kDa)	1,06
Filamin-A (~283 kDa)	0,98	Spectrin $\alpha$ chain, brain (~285 kDa)	0,71
Spectrin $\alpha$ chain, brain (~285 kDa)	0,82	Myosin-9 (~230 kDa)	0,47
Myosin-9 (~230 kDa)	0,67	Fibronectin (~266 kDa)	0,43

<b>Gelstück 187</b> ~140 kDa		<b>Gelstück 188</b> ~140 kDa	
Myosin-9 (~230 kDa)	2,17	Myosin-9 (~230 kDa)	2,17
Spectrin $\alpha$ chain, brain (~285 kDa)	0,99	Spectrin $\alpha$ chain, brain (~285 kDa)	0,94
Fibronectin (~266 kDa)	0,62	Filamin-A (~283 kDa)	0,23
Filamin-A (~283 kDa)	0,33	Fibronectin (~266 kDa)	0,23
<b>Gelstück 189</b> ~50 kDa		<b>Gelstück 190</b> ~50 kDa	
Myosin-9 (~230 kDa)	0,03	-/-	

1g und  $\mu$ g geben die Bedingung der Kultivierung an. Nach der Fraktionsnummer sind sowohl die Abbildungen (fett) als auch die Zelllinien (kursiv) angegeben. Nachfolgend sind die untersuchten Gelstücke (fett) mit der ungefähren Lage im Gel (kDa) aufgelistet. Für die gefundenen Proteine sind die Molekulargewichte in Klammern und die emPAI-Werte angegeben. Es handelt sich jeweils um eine Auswahl an gefundenen Proteinen.

Eine Gegenüberstellung der Spaltprodukte und deren Verteilung auf die Aminosäuresequenz für das Protein Myosin-9 zeigt **Abbildung 25**.

Für die Zelllinie CGTH W-1 war Myosin-9 in insgesamt vier Gelstücken, für die Zelllinie FTC-133 in sechs Gelstücken und für die Zelllinie ML-1 in fünf Gelstücken nachweisbar. Die Anzahl der Peptide, anhand derer die Identifizierung des Proteins erfolgte, war sehr verschieden. Allgemein ließ sich feststellen, dass sich umso mehr Peptide fanden, je größer das entsprechende Molekulargewicht des vermeintlichen Spaltproduktes war. Für die Gelstücke 185 und 186 der Zelllinie CGTHW-1 (Molekulargewicht ungefähr 230 kDa) verteilten sich die nachgewiesenen Peptide auf die gesamte Aminosäuresequenz von Myosin-9. Die Peptidverteilung verkleinerte sich auf ungefähr 2/3 der Aminosäuresequenz von Myosin-9 mit Schwerpunkt C-Terminus für Gelstücke, die ein Molekulargewicht von rund 140 kDa aufwiesen (Gelstücke 170, 171, 187, 188). In Gelstücken, die einem Molekulargewicht zwischen 40 und 60 kDa glichen, waren Peptide zu finden, deren Verteilung dem letzten Drittel der Aminosäuresequenz des C-Terminus entsprechen. Die Peptide des Gelstücks 173 (Molekulargewicht ungefähr 70 kDa) zeigten für die Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz einen Bereich in der Mitte der Aminosäuresequenz. Einen ähnlichen Bereich deckten die Peptide gefunden in Gelstück 172 ab, wenngleich hier auch Peptide zu finden waren, die mit dem vorderen Drittel der Aminosäuresequenz am N-Terminus deckungsgleich waren. Für dieses vordere Drittel fanden sich auch Peptide in Gelstücken, die im SDS-PAGE bis zu einem Molekulargewicht von 14 kDa (Gelstück 179) beziehungsweise 30 kDa (Gelstück 183) migrierten.



**Abb. 25: Verteilung von Spaltprodukten auf die Aminosäuresequenz von Myosin-9 [Pietsch, 2011, a]**

Die x-Achse repräsentiert die Aminosäuresequenz von Myosin-9 (1960 Aminosäuren). Die Balken darüber symbolisieren die Übereinstimmung gefundener Peptide mit der Aminosäuresequenz (schwarz) oder Bereiche der Aminosäuresequenz, mit denen keine Peptide in Deckung gebracht werden konnten (grau). Die Informationen links von den Balken geben an, für welche Zelllinien und welche Schwerkraftbedingung die Peptide gefunden wurden. Rechts von den Balken ist die Lage des Gelstücks im SDS-PAGE (kDa) und in Klammern die Nummer des Gelstücks (GS) genannt.

### 4.3) Western Blot Analyse

Mit der Untersuchung der verschiedenen Gelstücke der FF-IEF Cytosol- und Pellet-Fraktionen (**Abb. 23** und **Abb. 24**) konnten viele Proteine identifiziert werden. Einige der Proteine waren in jeder der untersuchten vier Zelllinien HTU-5, CGTH W-1, FTC-133 und ML-1 nachweisbar. Andere waren mit sehr hohen Mascot™ Scores nur in einigen Zelllinien oder als mögliche Spaltprodukte in Gelstücken zu finden. Auch ließen sich im Vergleich der 1g und µg FF-IEF Cytosol- und Pellet-Fraktionen anhand der Mascot™ Scores oder emPAI-Werte Veränderungen in der Proteinkonzentration verschiedener Proteine beobachten (vgl. 4.2.2).

Mit Western Blot Analysen wurden Proteine untersucht, die funktionell in der Zelle verschiedene Funktionen regulieren. Ziel war einerseits eine Validierung der

Übereinstimmung zwischen den Mascot™ Scores und emPAI-Werten mit der densitometrischen Analyse von Western Blots im Vergleich 1g zu µg.

In weiteren Western Blot Analysen wurden Enzyme der Glycolyse über die Zeit untersucht, da die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse deutliche Konzentrationsänderungen andeuteten.

Interessant fielen auch die Konzentrationsänderungen laut der massenspektrometrischen Analyse auf. Aus diesem Grund erfolgten sowohl für Myosin-9 als auch für Aktin (direkt mit Myosin-9 interagierendes Protein) ebenfalls Western Blot Analysen. Im Zusammenhang mit den Proteinen Myosin-9 und Aktin wurden auch zwei andere Proteine des Cytoskeletts, Vimentin und β-Tubulin, näher untersucht.

**Tabelle 16** zeigt die ausgewählten Proteine mit den gegebenenfalls im Folgenden verwendeten Abkürzungen. Anhand ihrer Funktion wurden sie zu Gruppen zusammengefasst.

**Tab. 16: Proteinauswahl für Western Blot Analyse**

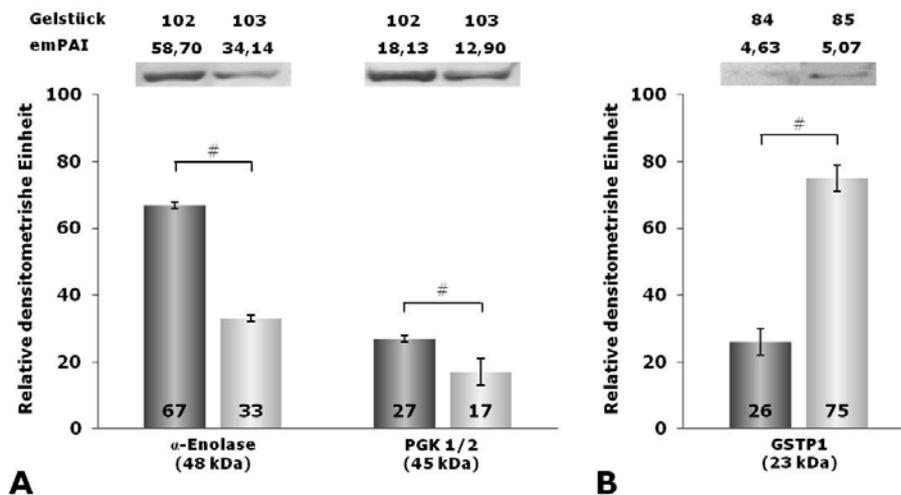
<b>Cytoskelett</b>	<b>Abkürzung</b>
Vimentin	
β-Tubulin	
Aktin	
Myosin-9	
<b>Heat Shock Proteine</b>	
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSC70
78 kDa Glucose regulated protein	GRP78
<b>Annexine</b>	
Annexin 1	
Annexin 2	
<b>RedOx-Proteine</b>	
Glutathione S-transferase P	GSTP1
Peroxiredoxin 1 und 2	PRXI/II
<b>Glycolyse</b>	
Triosephosphate isomerase	TIM
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1/2
α-Enolase	
Pyruvate kinase isoenzym M1/M2	PKM2
<b>Energie/Metastasis</b>	
Nucleoside diphosphate kinase A	nm23-H1
<b>Proteinbiosynthese</b>	
Elongation factor 1- α1	EF1-α1

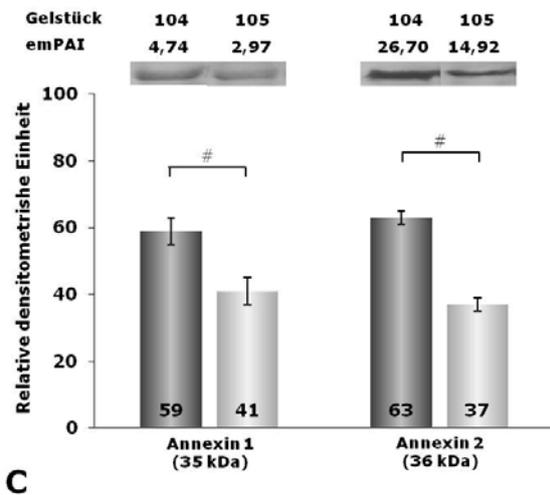
Die Proteine sind in funktionelle Gruppen geordnet. Gegebenenfalls im Folgenden verwendete Abkürzungen sind angegeben.

### 4.3.1) Vergleich Proteomergebnis mit Western Blot Analyse

Die Mascot™ Scores und emPAI-Werte der Proteomanalyse gaben Hinweise darauf, welche Proteine infolge der Kultivierung der Zelllinien unter  $\mu$ g in ihrer Expression verändert waren. In wieweit die Ergebnisse zutrafen, wurden für verschiedene Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten Western Blot Analysen durchgeführt (**Abb. 26-28**). Die densitometrische Auswertung dieser Western Blots wurde entweder mit den emPAI-Werten (**Abb. 26+28C**) oder mit den Mascot™ Scores (**Abb. 27+28A-B**) verglichen.

Die gefundenen Konzentrationsänderungen für die Proteine  $\alpha$ -Enolase, Phosphoglycerate kinase 1 (PGK 1/2), Annexin 1, Annexin 2 und Glutathione S-transferase P (GSTP1) für den Drei-Tageversuch der Zelllinie FTC-133 entsprachen den erwarteten Tendenzen der emPAI-Werte der massenspektrometrischen Analyse (**Abb. 26**). Für die Proteine  $\alpha$ -Enolase, PGK 1/2 (**Abb. 26A**), Annexin 1 und Annexin 2 (**Abb. 26C**) konnte in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Analysen eine Reduktion der Proteinmenge unter  $\mu$ g detektiert werden, wohin gegen GSTP1 (**Abb. 26B**) erwartungsgemäß erhöht war. Das Ausmaß der Änderung war für GSTP1 und  $\alpha$ -Enolase deutlich größer als erwartet.

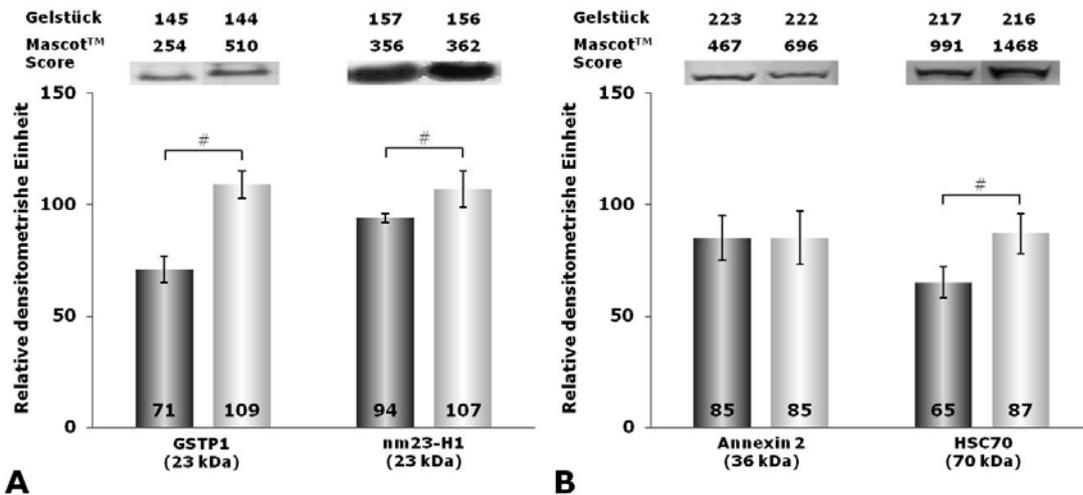




**Abb. 26: Vergleich emPAI-Werte mit Densitometrie von Western Blot Analysen verschiedener Proteine der Zelllinie FTC-133 [Pietsch, 2010]**

Die emPAI-Werte oberhalb der Diagramme beziehen sich auf die massenspektrometrische Analyse des Drei-Tageversuches der Cytosol-Lysate. Ebenfalls genannt sind die Gelstücke, in denen die Proteine gefunden wurden (**Abb. 23C**). Zwischen den emPAI-Werten und den Säulen im Diagramm sind repräsentative Western Blot Membranen gezeigt. **A:** Gelstücke 102 und 103, **B:** Gelstücke 84 und 85, **C:** Gelstücke 104 und 105. Der Wert innerhalb der dunkelgrauen (1g) und hellgrauen ( $\mu$ g) Balken gibt den Mittelwert der densitometrischen Einheit an. Hoch signifikante Unterschiede sind mit einem Rhombus (#) gekennzeichnet ( $p < 0,005$ ).

Die Zelllinie ML-1 wurde auf die Proteine GSTP1 und Nucleoside diphosphate kinase A (nm23-H1) in Proben des Elf-Tageversuches (**Abb. 27A**) und auf die Proteine Annexin 2 und Heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70) in Proben des Sieben-Tageversuches (**Abb. 27B**) untersucht. Für GSTP1, nm23-H1 und HSC70 konnte entsprechend der Mascot™ Scores ein signifikanter Anstieg der Proteinkonzentration unter  $\mu$ g beobachtet werden. Dieser Anstieg war für nm23-H1 deutlich größer als der Mascot™ Score vermuten ließ. Für Annexin 2 konnte keine Proteinerhöhung unter  $\mu$ g gefunden werden. Die Menge an Protein war im Western Blot identisch, wohingegen die Änderung des Mascot™ Scores einen deutlichen Anstieg unter  $\mu$ g vermuten ließ.

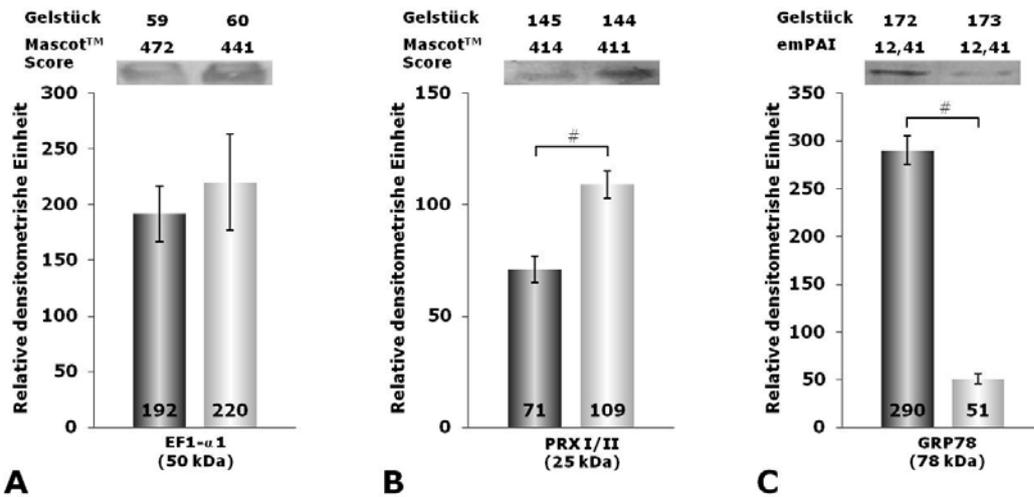


**Abb. 27: Vergleich Mascot™ Score Werte mit Densitometrie von Western Blot Analysen verschiedener Proteine der Zelllinie ML-1 [Pietsch, 2011, b]** Die Mascot™ Scores oberhalb der Diagramme beziehen sich auf die massenspektrometrische Analyse der Cytosol-Lysate des Elf-Tageversuches (A) und der Pellet-Lysate des Sieben-Tageversuches (B). Ebenfalls genannt sind die Gelstücke, in denen die Proteine gefunden wurden (Abb. 23D+24B). Zwischen den Mascot™ Scores und den Säulen im Diagramm sind repräsentative Western Blot Membranen gezeigt. **A:** GSTP1 in den Gelstücken 145 und 144 und nm-23H1 in den Gelstücken 157 und 156, **B:** Annexin 2 in den Gelstücken 223 und 222 sowie HSC70 in den Gelstücken 217 und 216. Der Wert innerhalb der dunkelgrauen (1g) und hellgrauen (µg) Balken gibt den Mittelwert der densitometrischen Einheit an. Hoch signifikante Unterschiede sind mit einem Rhombus (#) gekennzeichnet (p<0,005).

Es traten außerdem Proteinkonzentrationsänderungen auf, die entgegengesetzt zu den nach den Mascot™ Scores, beziehungsweise zu nach den emPAI-Werten zu erwartenden Resultaten verliefen (Abb. 28).

Für das Protein Elongation factor 1-α1 (EF1-α1) zeigte sich in der massenspektrometrischen Analyse eine Verringerung der Proteinkonzentration unter µg. In der Western Blot Analyse stieg die Proteinkonzentration, wenn auch nicht signifikant (Abb. 28A). Eine für das Protein hoch signifikant ansteigende Proteinmenge unter µg war für Peroxiredoxin 1 und 2 (PRXI/II) in der Western Blot Analyse zu verzeichnen. Der Vergleich der Mascot™ Scores für PRXI ließ eine geringe Erniedrigung bis gleichbleibende Proteinkonzentration erwarten (Abb. 28B).

Ebenfalls hoch signifikante Verringerung der Proteinkonzentration lag in der Western Blot Analyse für das Protein 78 kDa Glucose regulated protein (GRP78) vor. Es zeigte sich eine um 100 densitometrische Einheiten reduzierte Proteinmenge unter µg, wohingegen die emPAI-Werte unter 1g und µg gleich blieben. Die Mascot™ Scores jedoch zeigten eine Verringerung von 4011 unter 1g auf 3748 unter µg (Abb. 28C).



**Abb. 28: Vergleich Mascot™ Score und emPAI-Wert mit Densitometrie von Western Blot Analysen verschiedener Proteine der Zelllinien CGTH W-1, ML-1 und FTC-133**

Die Mascot™ Scores und emPAI-Werte oberhalb der Diagramme beziehen sich auf die massenspektrometrische Analyse des Drei-Tageversuches (**A** und **C**) beziehungsweise des Elf-Tageversuches (**B**). Daten der Zelllinie CGTH W-1 (**A**) und der Zelllinie ML-1 (**B**) beziehen sich auf die massenspektrometrische Analyse der Cytosol-Lysate (**Abb. 23C+D**), die der Zelllinien FTC-133 (**C**) auf die der Pellet-Lysate (**Abb. 24B**). Zwischen den Mascot™ Scores beziehungsweise den emPAI-Werten und den Säulen im Diagramm sind repräsentative Western Blot Membranen gezeigt. Der Wert innerhalb der dunkelgrauen (1g) und hellgrauen (µg) Balken gibt den Mittelwert der densitometrischen Einheit an. Hoch signifikante Unterschiede sind mit einem Rhombus (#,  $p < 0,005$ ) gekennzeichnet.

#### 4.3.2) Western Blot Analyse der zeitabhängigen Expression ausgewählter Proteine

Für die beiden Proteingruppen Cytoskelett und Glycolyse (**Tab. 10**) konnten in der Proteomanalyse deutliche Unterschiede in der Proteinkonzentration bei Vergleich der 1g mit den µg Proben beobachtet werden. Um dies zu bestätigen und die Konzentrationsänderung über die Zeit zu verfolgen, erfolgten für die in **Tab. 10** genannten Proteine der beiden Proteingruppen Western Blot Analysen, die im Folgenden gezeigt werden.

##### 4.3.2.1) Untersuchung von Enzymen der Glycolyse

Die Zelllinien CGTH W-1 und FTC-133 wurden für einen und drei Tage unter 1g und µg kultiviert. In Lysaten von Zellproben beider Zelllinien wurden auf die Proteine Triosephosphate isomerase (TIM), Phosphoglycerat kinase 1 (PGK1/2), α-Enolase und Pyruvat kinase isoenzyme M1/M2 (PKM2) mit der Western Blot Analyse (**Abb. 29**) untersucht.

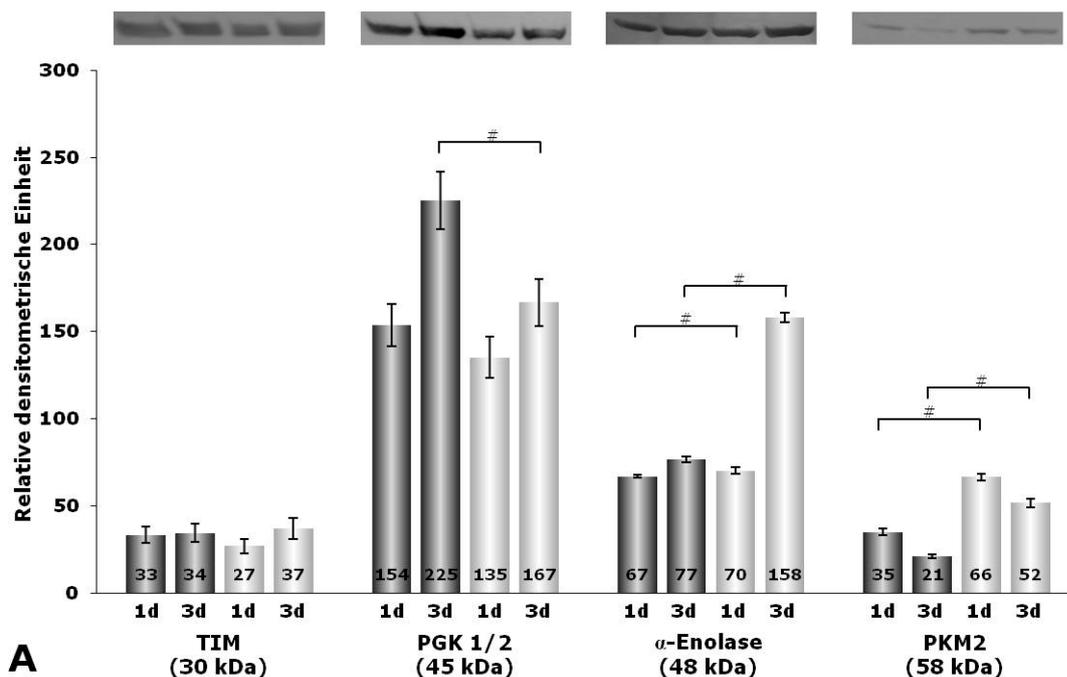
Für die Zelllinie CGTH W-1 (**Abb. 29A**) konnte für die zwei Proteine α-Enolase und PKM2 eine signifikante Steigerung der Proteinkonzentration nach einem und drei Tagen unter µg beobachtet werden. Für das Protein TIM fand sich zu beiden

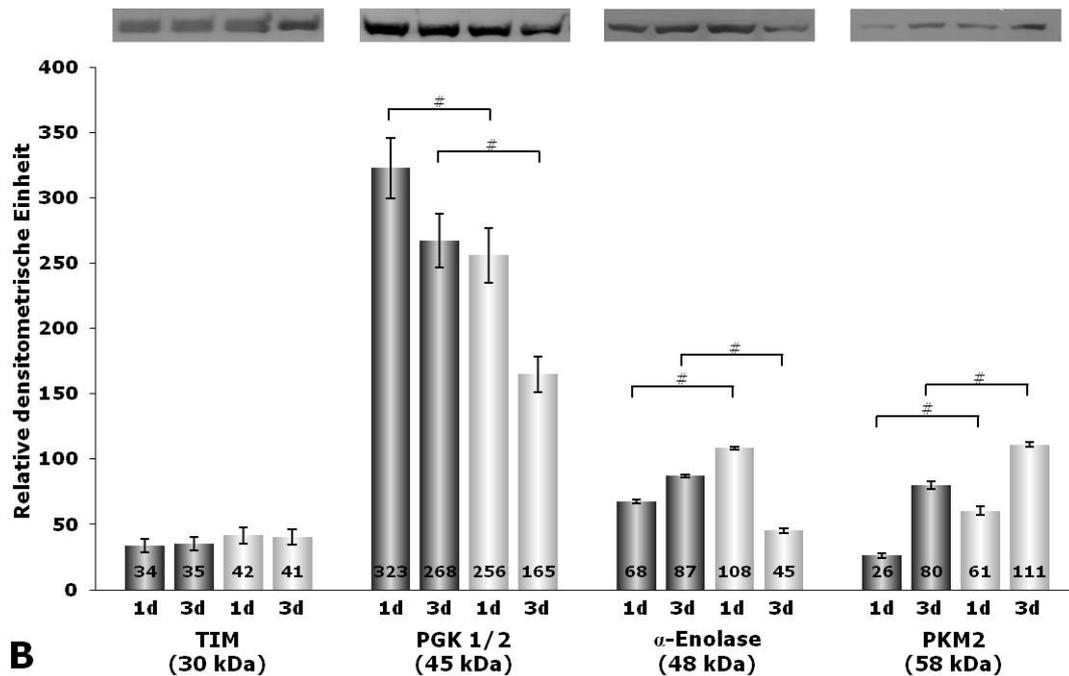
Zeitpunkten keine Veränderung der Proteinmenge. Im Gegensatz dazu war nach drei Tagen unter  $\mu\text{g}$  für das Protein PGK1/2 ebenfalls eine hoch signifikante Abnahme der Proteinkonzentration zu verzeichnen.

Unter 1g waren nach drei Tagen die Konzentrationen der Proteine PGK1/2 und  $\alpha$ -Enolase höher als nach einem Tag, bei TIM war keine Veränderung zu erkennen und für PKM2 eine Erniedrigung. Unter  $\mu\text{g}$  sanken die Konzentrationen des Proteins PKM2, PGK 1/2 und  $\alpha$ -Enolase stieg nach drei Tagen im Vergleich zum Ein-Tageversuch weiter an.

Für die Zelllinie FTC-133 (**Abb. 29B**) war eine hoch signifikant erhöhte Proteinkonzentration im Vergleich zu 1g für die Proteine  $\alpha$ -Enolase und PKM2 nach einem Tag und für PKM2 auch nach drei Tagen unter  $\mu\text{g}$  zu beobachten. Die Konzentration von TIM blieb zu beiden Zeitpunkten unter  $\mu\text{g}$  im Vergleich zu den 1g unverändert. Das Protein PGK 1/2 hingegen war hoch signifikant reduziert, was für das Protein  $\alpha$ -Enolase auch im Drei-Tageversuch zutraf.

Betrachtet man 1g und  $\mu\text{g}$  unabhängig voneinander, konnte für das Protein PGK1/2 im Ein- und Drei-Tageversuch sowohl unter 1g als auch unter  $\mu\text{g}$  Kultivierung eine Abnahme der Proteinkonzentration nach drei Tagen verzeichnet werden. Die konnte auch für das Protein  $\alpha$ -Enolase im Drei-Tageversuch unter  $\mu\text{g}$  beobachtet werden. Unter 1g hingegen stieg die Proteinmenge nach drei Tagen an. Sowohl unter 1g als auch unter  $\mu\text{g}$  war für das Protein PKM2 ein Anstieg im Drei-Tageversuch zu verzeichnen. Wie für die Zelllinie CGTH W-1 konnten für das Protein TIM keine Veränderungen beobachtet werden.





**Abb. 29: Western Blot Analysen glycolytischer Enzyme in den Zelllinien CGTH W-1 (A) und FTC-133 (B)**

Western Blot Analyse der Zelllinien CGTH W-1 (A) und FTC-133 (B). Von links nach rechts sind die Proteine TIM, PGK1/2,  $\alpha$ -Enolase und PKM2 in den Graphen dargestellt. Verglichen wurden für jedes Protein 1g (dunkelgrau) und  $\mu$ g (hellgrau) Proben für Versuchszeiträume von einem (1d) und drei (3d) Tagen. Oberhalb der Graphen sind repräsentative Western Blot Membranen des Proteins. Der Wert innerhalb der Balken in den Diagrammen gibt den Mittelwert der densitometrischen Einheit an. Hoch signifikante Unterschiede sind mit einem Rhombus (#,  $p < 0,005$ ) gekennzeichnet.

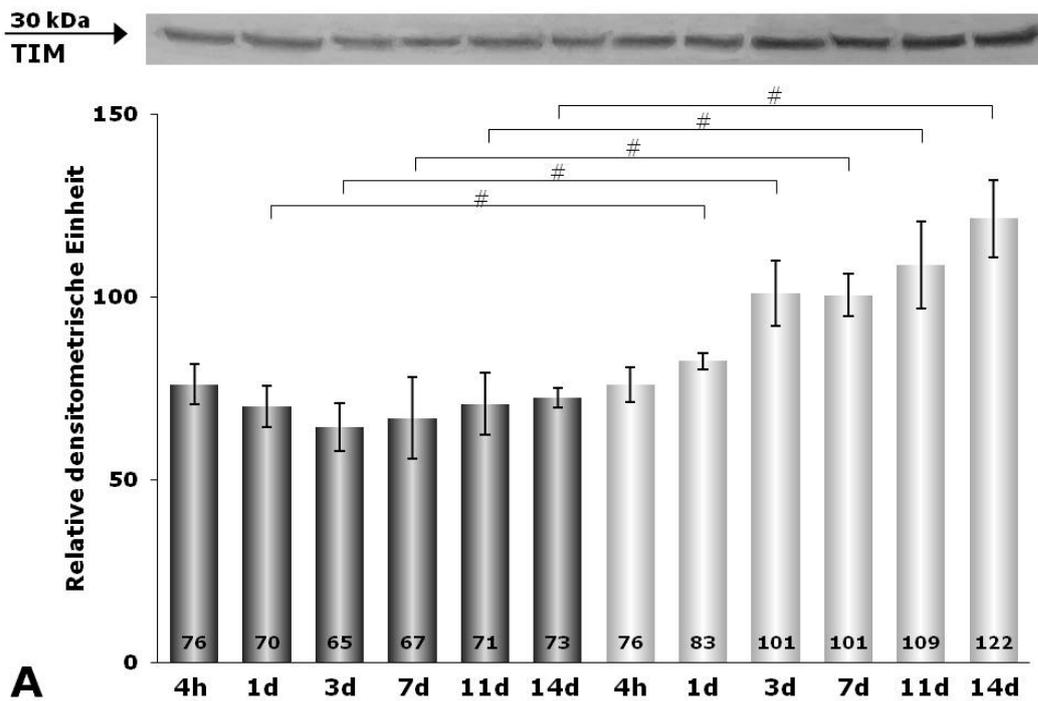
Wie die Zelllinien CGTH W-1 und FTC-133 wurde auch die Zelllinie ML-1 auf die Proteine TIM, PGK1/2,  $\alpha$ -Enolase und PKM2 untersucht (Abb. 30). Dabei wurden Lysate von Proben, die vier Stunden, ein, drei, sieben, elf und vierzehn Tage unter 1g und  $\mu$ g kultiviert wurden, eingesetzt.

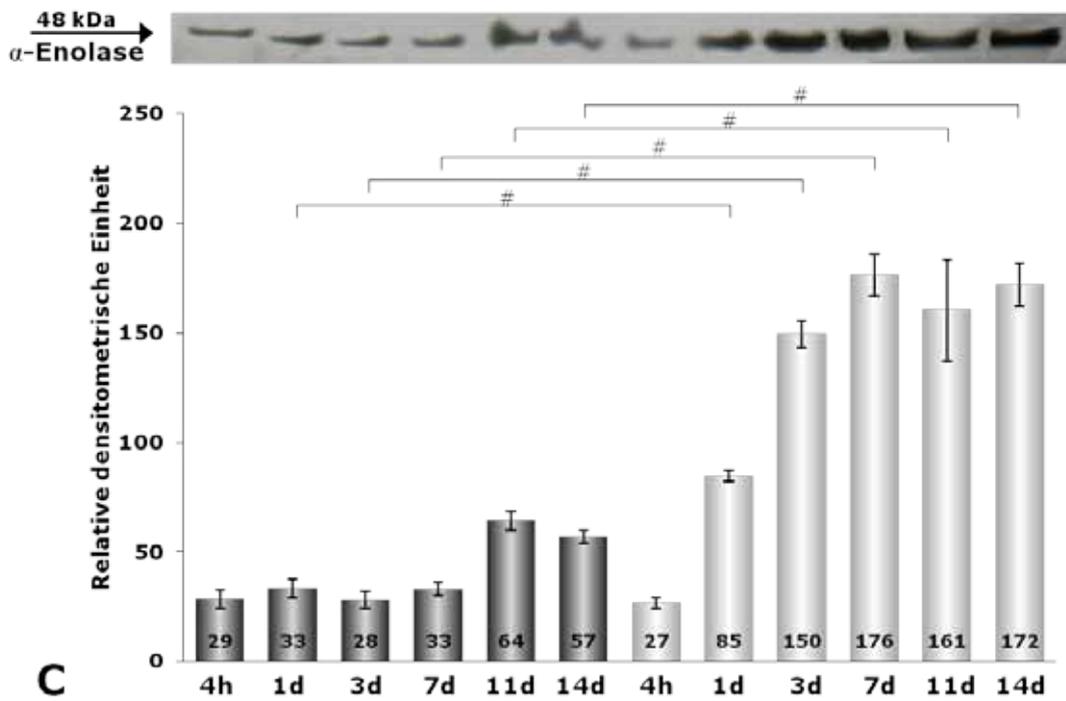
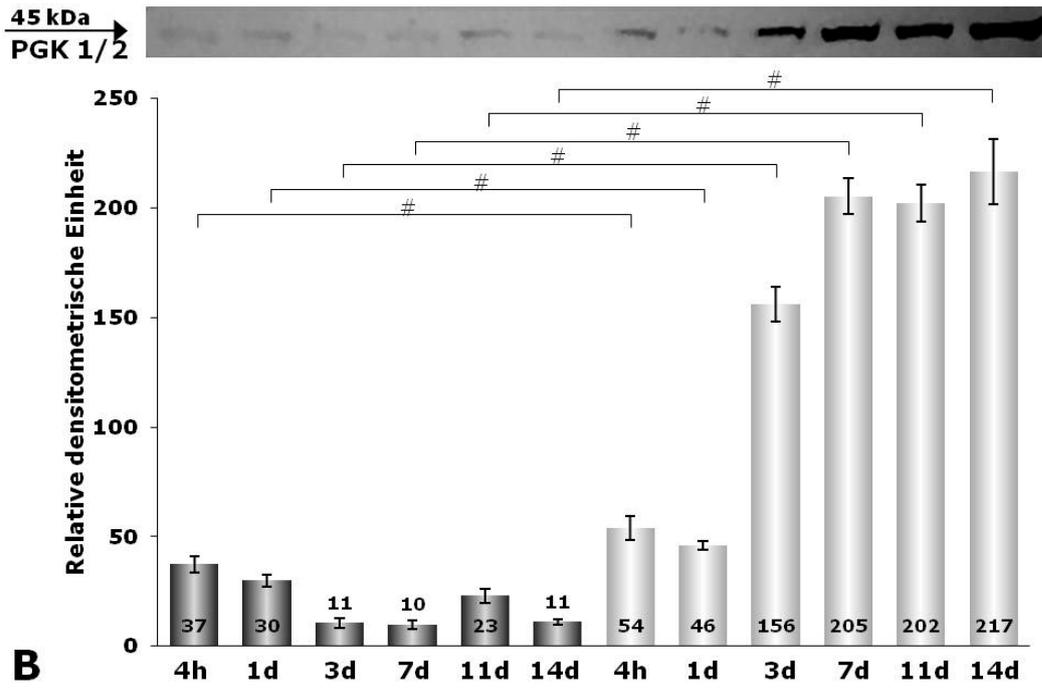
Unter 1g sank die Proteinmenge des Proteins TIM von vier Stunden bis drei Tage und stieg im weiteren Verlauf bis fast auf den Wert von vier Stunden nach vierzehn Tagen. Von vier Stunden bis vierzehn Tage stieg die Expression kontinuierlich bis auf einen 1,5-fach höheren Wert nach vierzehn Tagen im Vergleich zu vier Stunden unter  $\mu$ g. Der Vergleich der 1g mit den  $\mu$ g Werten zeigte zum jeweiligen Zeitpunkt, außer für vier Stunden, einen doppelt signifikanten Konzentrationsanstieg unter  $\mu$ g.

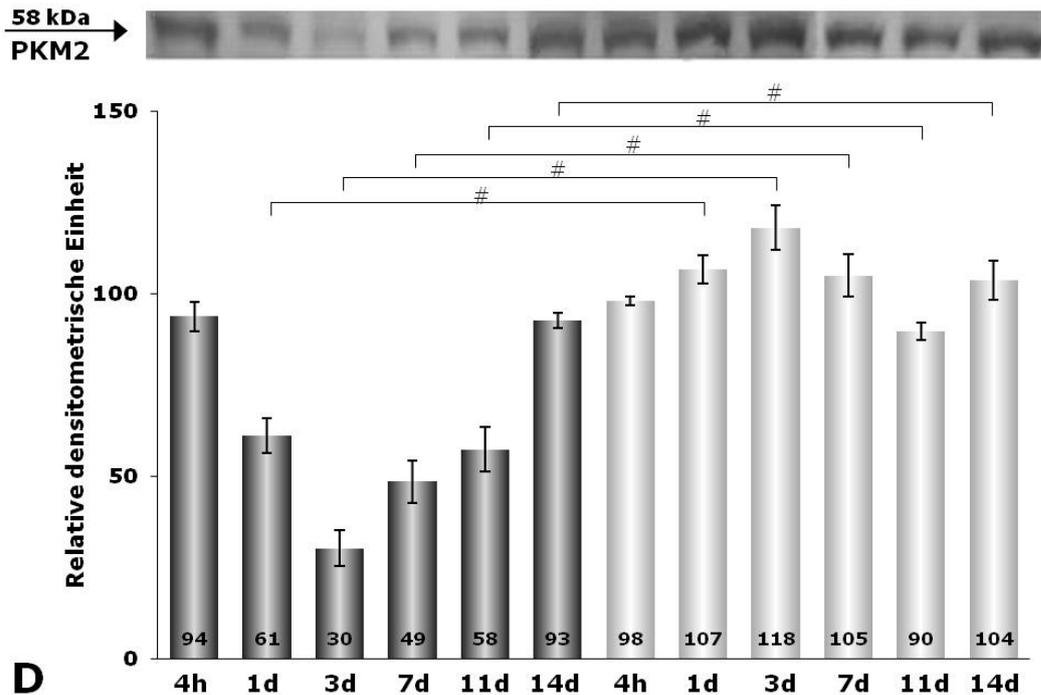
Die Proteinkonzentration von PGK1/2 sank unter 1g von vier Stunden bis sieben Tage. Nach elf Tagen stieg sie an und sank nach vierzehn Tagen wieder auf das Niveau von sieben Tagen. Im Vergleich von 1g zu  $\mu$ g betrug die Proteinmenge unter  $\mu$ g nach vier Stunden und einem Tag ungefähr 1,5-mal so viel wie unter 1g. Für die übrigen Zeitpunkte belief sich der Anstieg der Proteinkonzentration um mehr als das 10-fache. Auch für PGK1/2 waren die Veränderungen unter  $\mu$ g zum jeweiligen Zeitpunkt doppelt signifikant im Vergleich zu 1g.

Das Protein  $\alpha$ -Enolase zeigte unter 1g bis Tag sieben kaum eine Veränderung, verdoppelte sich jedoch ab Tag elf im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten. Unter  $\mu$ g waren außer nach vier Stunden die Proteinmengen mindestens 2-mal so hoch wie unter 1g zum jeweiligen Zeitpunkt und damit doppelt signifikant, wobei der Konzentrationsanstieg unter  $\mu$ g bis Tag sieben kontinuierlich steigend verlief und anschließend stagnierte.

Die Konzentration des Proteins PKM2 sank unter 1g von vier Stunden bis drei Tage. Über die folgenden Zeitpunkte stieg die Konzentration bis Tage vierzehn auf das Niveau von vier Stunden wieder an. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Menge an Protein unter  $\mu$ g von vier Stunden bis drei Tage. Im Anschluss sank die Proteinkonzentration bis Tag elf auf ein tieferes Niveau als nach vier Stunden und stieg bis Tag vierzehn wieder an. Die Zeitpunkte ein, sieben und vierzehn Tage wiesen unter  $\mu$ g ungefähr die gleiche Proteinkonzentration auf. Außer für vier Stunden waren die Konzentrationen zum jeweiligen Zeitpunkt unter  $\mu$ g doppelt signifikant erhöht im Vergleich zu 1g.







**Abb. 30: Western Blot Analyse glycolytischer Enzyme in der Zelllinie ML-1**

Western Blot Analyse der Zelllinie ML-1. Gezeigt sind die Analysen der Proteine TIM (A), PGK1/2 (B),  $\alpha$ -Enolase (C) und PKM2 (D). Verglichen wurden für jedes Protein 1g (dunkelgrau) und  $\mu$ g (hellgrau) Proben für Versuchszeiträume von vier Stunden (4h), einem (1d), drei (3d), sieben (7d), elf (11d) und vierzehn (14d) Tagen. Oberhalb der Graphen sind repräsentative Western Blot Membranen des Proteins abgebildet. Der Wert innerhalb der Balken in den Diagrammen gibt den Mittelwert der densitometrischen Einheit an. Doppelt signifikante Unterschiede sind mit einem Rhombus (#,  $p < 0,005$ ) gekennzeichnet.

#### 4.3.2.2) Untersuchung von Proteinen des Cytoskeletts

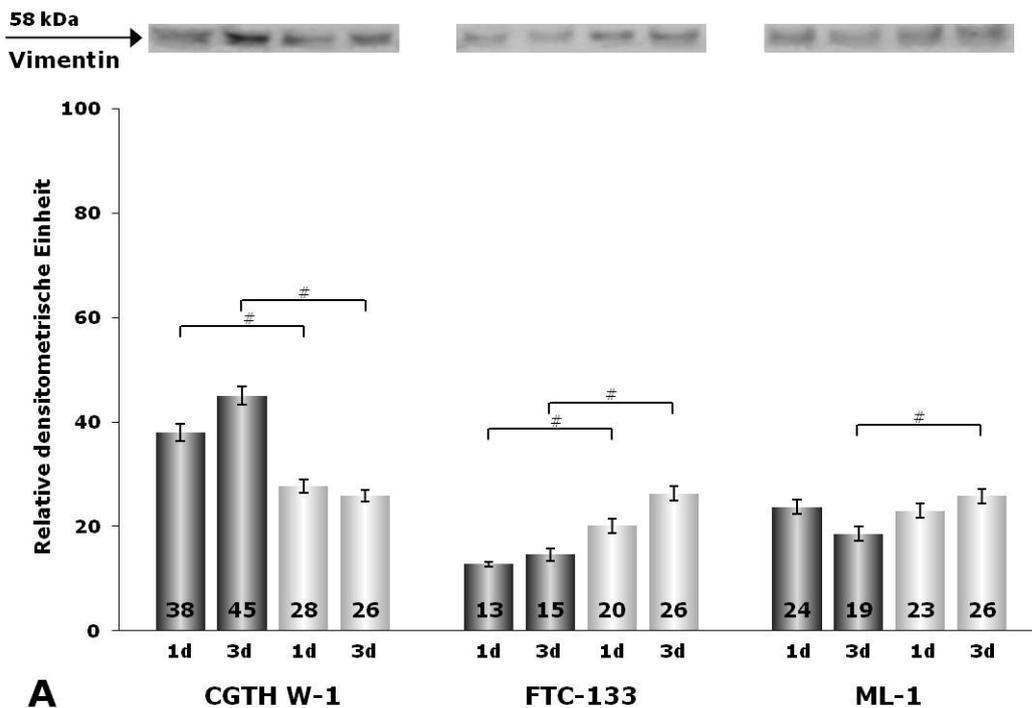
Für die Zeitpunkte ein und drei Tage wurden die Zelllinien CGTH W-1, FTC-133 und ML-1 unter 1g und  $\mu$ g kultiviert und die Expression der Proteine Vimentin (Abb. 31A),  $\beta$ -Tubulin (Abb. 31B), Aktin (Abb. 31C) und Myosin-9 (Abb. 31D) untersucht.

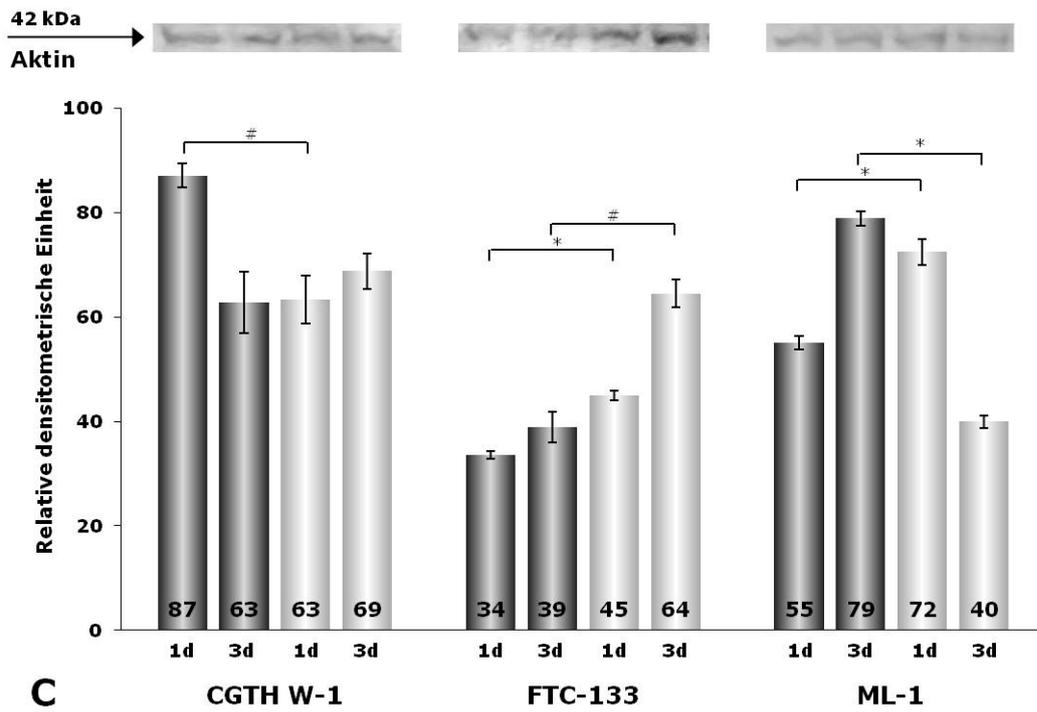
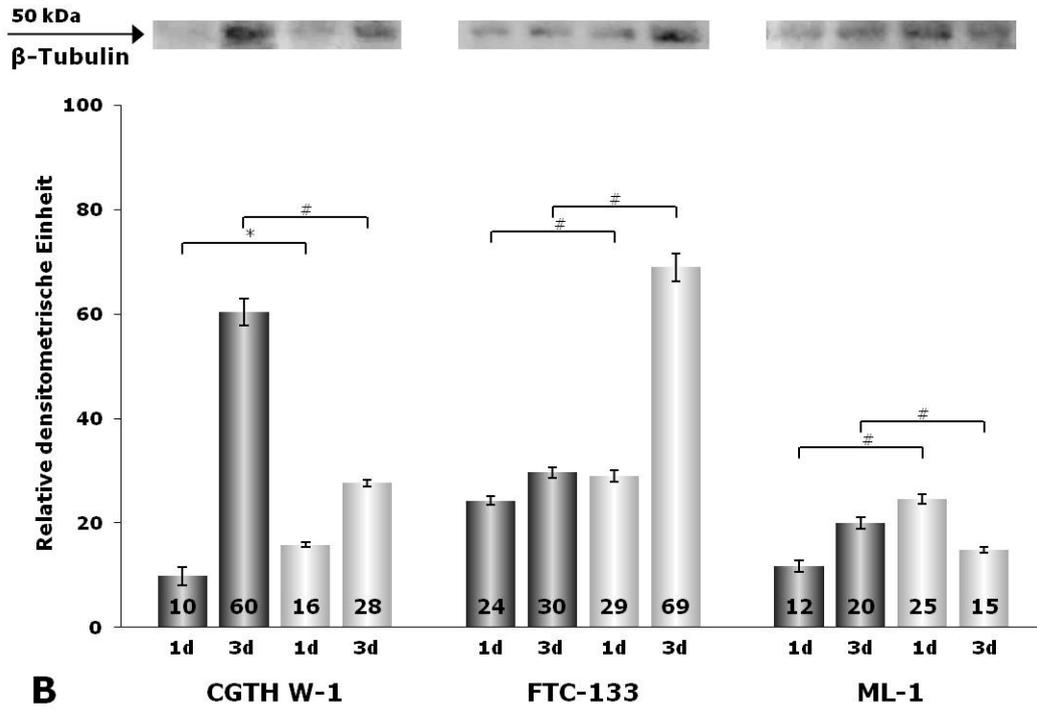
Zu jedem Zeitpunkt fand sich für die Zelllinie CGTH W-1 im Vergleich 1g zu  $\mu$ g eine doppelt signifikante Abnahme der Proteinkonzentration von Vimentin (Abb. 31A), für die Zelllinie FTC-133 eine doppelt signifikante Zunahme. Eine geringe und signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration konnte für die Zelllinie ML-1 nur für den Drei-Tageversuch beobachtet werden.

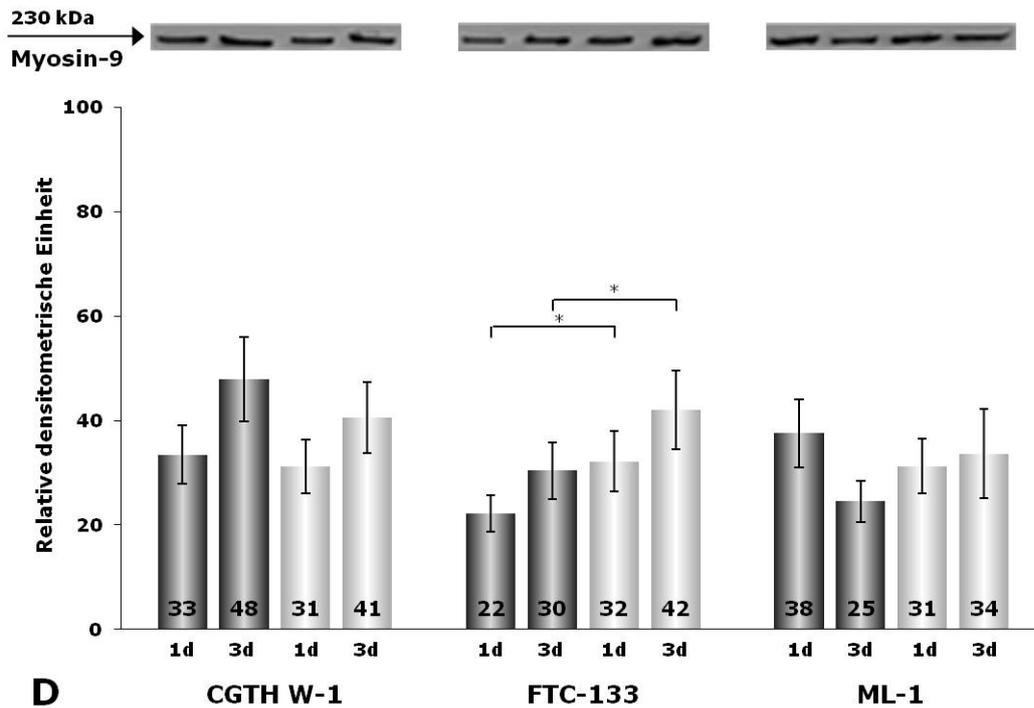
Ganz anders verhielt sich das Ergebnis für das Protein  $\beta$ -Tubulin (Abb. 31B). Hier zeigte die Zelllinie CGTH W-1 nach einem Tag unter  $\mu$ g einen signifikanten Proteinstoffmengenanstieg und nach drei Tagen eine hoch signifikante Verminderung. Die Zelllinie FTC-133 zeigte zu beiden Zeitpunkten eine hoch signifikante Erhöhung der Proteinmenge unter  $\mu$ g im Vergleich zu 1g. Für die Zelllinie ML-1 war in nach einem Tag unter  $\mu$ g ein hoch signifikanter Anstieg der Proteinkonzentration zu verzeichnen und im Drei-Tageversuch eine hoch signifikante Verminderung.

Für das Protein Aktin (**Abb. 31C**) konnte sowohl für die Zelllinie CGTH W-1 im Ein-Tageversuch eine Abnahme der Proteinmenge unter  $\mu\text{g}$  beobachtet werden. Nach drei Tagen zeigte sich eine Erhöhung, die jedoch nicht signifikant war. Für die Zelllinie FTC-133 ließ sich im Ein- und im Drei-Tageversuch nachweisen. Im Ein-Tageversuch der Zelllinie ML-1 fand sich ein signifikanter Anstieg der Proteinkonzentration für Aktin, im Drei-Tageversuch eine signifikante Verringerung.

Keine signifikanten Veränderungen in der Proteinmenge für Myosin-9 (**Abb. 31D**) zeigten sich für die Zelllinien CGTH W-1 und ML-1 zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Die Zelllinie FTC-133 wies jedoch einen signifikanten Anstieg des Proteins unter  $\mu\text{g}$  im Ein- und Drei-Tageversuch auf.







**Abb. 31: Western Blot Analysen für Proteine des Cytoskeletts [Pietsch, 2011,a]**

Western Blot Analyse für die Proteine Vimentin (A),  $\beta$ -Tubulin (B), Aktin (C) und Myosin-9 (D). Von links nach rechts sind in den Graphen die densitometrischen Auswertungen der Western Blot Membranen der Zelllinien CGTH W-1, FTC-133 und ML-1 dargestellt. Verglichen wurden für jedes Protein 1g (dunkelgrau) und  $\mu$ g (hellgrau) Proben für Versuchszeiträume von einem (1d) und drei (3d) Tagen. Oberhalb der Graphen sind repräsentative Western Blot Membranen des jeweiligen Proteins. Der Wert innerhalb der Balken in den Diagrammen gibt den Mittelwert der densitometrischen Einheit an. Hoch signifikante Unterschiede sind mit einem Rhombus (#,  $p < 0,005$ ), signifikante mit einem Stern (\*,  $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.



## 5.1) Proteomanalyse

### 5.1.1) FF-IEF

Die nach FF-IEF resultierende Proteinverteilung innerhalb der Fraktionen war inhomogen. In der SDS-PAGE konnten zwei Zonen starker Proteinanreicherung identifiziert werden. Die erste Zone lag sowohl in den Cytosol- als auch Pellet-Lysaten im pH-Bereich 5,5 bis 6,0 (Fraktionen 33 bis 35), die zweite nur in den Cytosol-Lysaten um pH 7,2 bis 7,5 (Fraktionen 49 bis 53). Obermaier *et al.* berichteten bereits 2005 über vergleichbare Ergebnisse [Obermaier, 2005].

Den Ergebnissen der Nano-LC-MS/MS Untersuchungen zufolge zählten die in den Fraktionen der Pellet-Lysate gefundenen Proteine überwiegend zu den Proteinen des Cytoskeletts. Für viele dieser Proteine korrelierten die isoelektrischen Punkte mit der zu erkennenden Konzentrierung der FF-IEF Fraktionen um pH 5,5 bis 6,0 (**Tab. 17**).

Im Cytosol-Lysat waren neben glycolytischen Enzymen, Annexinen und RedOx-Proteinen auch Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (78 kDa Glucose regulated protein) und der Mitochondrien (Enzyme des Citratzyklusses) zu finden. Diese Zellorganellen dienen unter anderem dazu, Bereiche höheren (Mitochondrium, pH 7,8 bis 8,0) oder niedrigeren (Golgi-Apparat, pH 6,4 bis 6,6) pHs im Vergleich zum neutralen pH-Wert des Cytosols (pH 7,0 bis 7,4) abzugrenzen [Llopis, 1998; Bright, 1987; Kiang, 1998]. Umschlossen sind sie von Membranen, die durch den Ultraschall-Aufschluss zerstört wurden. Für die Konzentrierungen in den zwei pH-Bereichen im Cytosol-Lysat (pH 5,5 bis 6,0 und um pH 7,2) fanden sich für die isoelektrischen Punkte der Proteine der oben genannten Proteingruppen nur zum Teil Übereinstimmungen der theoretischen isoelektrischen Punkte mit den Fraktionen, in denen ein Protein gefunden wurde. So stimmte beispielsweise die Fraktion mit dem isoelektrischen Punkt für die Proteine Aktin, Myosin-9,  $\alpha$ -Enolase, Annexin 1 und Malate dehydrogenase überein, jedoch nicht für die Proteine Vimentin, Triosephosphate isomerase (TIM), Cofilin, 78 kDa Glucose regulated protein und Citrate synthase (**Tab. 17**).

Die in **Tabelle 17** genannten isoelektrischen Punkte sind theoretisch berechnete Werte auf der Basis der Aminosäuresequenzen der Proteine. Einen nicht unerheblichen Einfluss auf die isoelektrischen Eigenschaften eines Proteins üben posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glycosylierung und Acetylierung aus, weshalb der reale isoelektrische Punkt eines Proteins in einer Zelle deutlich von dem theoretischen Wert abweichen kann. Bei Proteinen mit enzymatischer Funktion kann darüber hinaus auch die Regulation (aktiv, latent) eine Rolle in Bezug auf den isoelektrischen Punkt spielen. All dies sind mögliche Gründe, weshalb Proteine teilweise in sehr großen pH-Bereichen zu finden sind (**Tab. 17**,  $\alpha$ -Enolase) beziehungsweise deutliche Abweichungen zwischen Theorie und Praxis für den

isoelektrischen Punkt auftreten (Tab. 17, Pyruvate kinase isozymes M1/M2, Fumarase).

**Tab. 17: Isoelektrischer Punkt von Proteinen**

Protein	UniProtKB Identifizierungsnummer	Isoelektrischer Punkt pI	FF-IEF- Fraktion (pH)
<b>Cytoskelett</b>			
Aktin	P60709, P63261	5,3	31-37 (5,1-6,1)
Tropomyosin	P09493, P07951, ...	4,7	31-35 (5,1-6,0)
$\alpha$ - und $\beta$ -Tubulin	P08437, P68363, ...	4,8-5,0	31-35 (5,1-6,0)
Vimentin	P08670	5,0	33-37 (5,5-6,1)
Cytokeratin			
- sauer	P05787, P05783, P35900, ...	5,0-5,5	
- basisch, neutral	P04264, P13647, P02538, ...	7,6-8,1	
Myosin-9	P35579	5,5	33-37 (5,5-6,1)
<b>Cytosol</b>			
Fructose-bisphosphate Aldolase (ALD)	P05062, P04075	8,0-8,3	51-53 (7,4-7,5)
Triosephosphate isomerase (TIM)	P60174	6,5	51-53 (7,3-7,5)
GAPDH	P04406	8,6	53-67 (7,5-9,0)
Phosphoglycerate kinase (PGK1/2)	P00558, P07205	8,3-8,7	51-53 (7,4-7,5)
Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKM2)	P14618	8,0	41-45 (6,5-6,9)
$\alpha$ -Enolase	P06733	7,0	35-53 (6,0-7,4)
Cofilin	P23528	8,2	49-53 (7,3-7,6)
Elongation factor1- $\alpha$ 1 (EF1- $\alpha$ 1)	P68104	9,1	67-69 (9,0-9,3)
Heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70)	P11142	5,4	33-37 (5,5-6,1)
Annexin 1	P04083	6,6	33-53 (5,5-7,6)
Annexin 2	P07355	7,6	43-67 (6,7-9,0)
Glutathione S- transferase P (GSTP1)	P09211	5,4	33-45 (5,5-6,9)
Peroxiredoxin (1)	Q06830	8,3	43-51 (6,7-7,4)
(2)	P32119	5,7	33-45 (5,5-6,9)
(PRXI/II)			
Nucleoside di- phosphate kinase A (nm23-H1)	P15531	5,8	43-51 (6,7-7,4)
<b>Endoplasmatisches Retikulum</b>			
78 kDa Glucose regulated protein (GRP78)	P11021	5,1	33-37 (5,5-6,1)

**Mitochondrium**

Citrate synthase (CS)	O75390	8,45	53 (7,5)
Aconitate hydratase (ACO2)	Q99798	7,36	
2-Oxoglutarate dehydrogenase (OGDH)	Q02218	6,39	
Fumarate hydratase (FH)	P07954	8,85	51-53 (7,4-7,5)
Malate dehydrogenase (MDH)	P40926	8,92	61-67 (8,5-9,0)

Die pI-Werte sind mit dem ExpASY Proteomic Tool „Compute pI/MW“ unter der Verwendung der UniProtKB Datenbank berechnet worden.

In der letzten Spalte sind für einige Proteine die FF-IEF-Fraktionen genannt, in denen sie gefunden wurden. In Klammern dahinter ist der ungefähre pH-Bereich der Fraktion angegeben.

**5.1.2) nano-LC-MS/MS****5.1.2.1) Proteomvergleich mit der Literatur**

Die in dieser Arbeit gefundenen Proteine wurden mit bekannten, für die Schilddrüse bereits in der Literatur beschriebenen Proteinen verglichen. Der Vergleich ergab, dass 37 Proteine bisher nicht für die Schilddrüse nachgewiesen worden sind (vgl. **Tab. 6**, 2.2.2.1).

Darüber hinaus konnten alle identifizierten Proteine in drei Gruppen unterteilt werden: 1) gefunden im Lysat nach Ultraschall-Aufschluss, 2) gefunden im Lysat nach Solubilisieren der Proteine in den Zellfragmenten des Ultraschall-Aufschlusses und 3) gefunden in beiden Lysaten.

Zu Gruppe 1 zählten Proteaseinhibitoren wie Serpin-6, regulatorische Proteine wie Cofilin, Isoformen des Proteins 14-3-3 sowie lösliche glycolytische Enzyme.

Serpin-6 ist ein Mitglied einer Proteinfamilie von Serin-Proteinaseinhibitoren die an der Regulierung der Apoptose beteiligt sind [Bird, 1998]. Cofilin bindet an Aktin-Filamente und trägt dadurch zur Depolymerisierung der Aktin-Filamente bei [Maciver, 2002]. Über 300 Proteine sind bisher bekannt, mit denen Isoformen von 14-3-3 interagieren. Die Isoformen binden an phosphorylierte Tyrosin- und Serinreste. Auf diesem Weg beeinflussen sie eine Vielzahl zellulärer Regulationen wie beispielsweise metabolische Kreisläufe, RedOx-Regulationen, Transkriptionen, DNA-Reparaturen, RNA-Transkriptionen, Translationen und Faltungen von Proteinen, die Cytoskelettintegrität oder den programmierten Zelltod [Kjarland, 2006; Gardino, 2006]. Zu den identifizierten löslichen glycolytischen Proteinen gehörten unter anderem Fructose-bisphosphate Aldolase und Glyceraldehyde-3-phosphat Dehydrogenase [Masters, 1981].

Proteine des Cytoskeletts, wie Spectrin und Vimentin, sowie Proteine, die mit dem Cytoskelett verbunden sind oder interagieren wie beispielsweise Integrin- $\alpha$ , bildeten die zweiten Gruppe.

Spectrin verbindet Membranlipide, Transmembranproteine und Aktin-Filamente miteinander [Baines, 2009]. Vimentin gehört zu den Proteinen der Intermediär-Filamente, die die mechanische Belastbarkeit einer Zelle beeinflussen. Man geht davon aus, dass durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Auf- und Abbau der Intermediär-Filamente gesteuert wird [Deery, 1993; Chou, 1996]. Integrin- $\alpha$  ist ein Rezeptor, der für die Verbindung einer Zelle mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix wichtig ist [Ziegler, 2008; Gingras, 2009].

Zur dritten Gruppe gehörten unter anderem Annexine, Tropomyosin und Aktin. Tropomyosin ist ein Protein, das wie Aktin Polymere bildet. Die Stabilität der Tropomyosin-Polymere ist eng mit einem Aktin-Polymer verbunden und scheint von diesem abhängig zu sein [Gunning, 2008; Kostyukova, 2008]. Aktin-Filamente selbst unterliegen einem kontinuierlichen Auf- und Abbau, der durch eine Vielzahl von Proteinen, wie Cofilin oder Aktin verwandtes Protein (actin related 2/3 complex, Arp2/3), reguliert wird [Pollard, 2003]. Die Superfamilie der Annexine ist eine Proteinfamilie von 94 Proteinen. Sie sind in vielen Organismen zu finden und zur Unterscheidung in die Gruppen A - D eingeteilt, wobei A die Zugehörigkeit zu den Säugetieren angibt [Moss, 2004; Kourie, 2000]. Abgesehen von ihrer Fähigkeit sowohl Calcium als auch Phospholipide zu binden, Calciumkanäle in Membranen zu bilden sowie mit dem Cytoskelett zu assoziieren, sind ihre weiteren physiologischen Funktionen noch weitgehend unbekannt, obwohl oder gerade weil sie nahezu in jeder Zelle vorkommen [Kourie, 2000]. Ein Grund für die Schwierigkeiten in der Entschlüsselung ihrer Funktion in der Zelle könnte sein, dass die Annexine mit vielen weiteren Proteinen interagieren. Als Beispiel hierfür sei die ebenfalls Calcium-bindende Proteinfamilie der S100 Proteine genannt [Kourie, 2000; Rintala-Dempsey, 2008].

### 5.1.2.2) $\mu$ g-Betrachtungen

Ausgeschnittene Gelstücke der FF-IEF-Fraktionen der Zelllinien HTU-5, CGTH W-1 und FTC-133 wurden für die Drei-Tageversuche massenspektrometrisch analysiert, für die Zelllinie ML-1 darüber hinaus FF-IEF-Fraktionen der Ein-, Sieben-, Elf- und Vierzehntageversuche. Der Grund für die längeren Versuchszeiträume war die geplante Verwendung der Zelllinie ML-1 während des Shenzhou-8 Raumfahrtfluges. Shenzhou-8 ist eine für 2011 geplante, unbemannte, chinesische Weltraummission, bei der deutschen Wissenschaftlern die Möglichkeit geboten wird, automatisierte Experimente in realer Schwerelosigkeit für bis zu vierzehn Tage durchzuführen [Reinke, 2008].

Von den Cytosol- und Pellet-Lysaten kamen je FF-IEF 100  $\mu$ l zum Einsatz. Jedes Lysat wies eine Konzentration von 1 mg/ml Gesamtprotein auf. Das Gesamtprotein ist eine

Mischung aus allen in der Zelle vorhandenen Proteinen zum Zeitpunkt der Fixierung. Die Menge je Protein kann infolge äußerer Einflüsse, hier der veränderten Gravitation, variieren. Für jede untersuchte Proteinbande war zum Teil eine Vielzahl von Proteinen nachzuweisen. Der Vergleich der emPAI-Werte beziehungsweise Mascot™ Scores von Proteinen, die sowohl in Lysaten der 1g als auch der  $\mu\text{g}$  Proben zu finden waren, ließ erkennen, dass der Großteil der Proteine nur geringe oder keine Erhöhungen beziehungsweise Erniedrigungen unter  $\mu\text{g}$  aufwiesen. Für andere fanden sich jedoch deutliche Unterschiede (**Tab. 7 und 8**). Diese Proteine scheinen für die in den Gelen zu erkennenden, voneinander abweichenden Bandenintensitäten verantwortlich zu sein und diese möglicherweise zu verursachen. Ob diese Vermutung stimmt, wurde für ausgewählte Proteine in einer Validierung der Mascot™ Scores und emPAI-Werte untersucht (siehe 5.2.1). Für die Enzyme der Glycolyse konnten in den Nano-LC-MS/MS Ergebnissen deutliche Unterschiede zwischen 1g und  $\mu\text{g}$  registriert werden. Die Glycolyse ist ein zentraler Stoffwechselweg, weswegen dieser näher untersucht worden ist (siehe 5.2.2).

### 5.1.2.3) Spaltprodukte

In den untersuchten Proteinbanden der SDS-PAGE konnten viele Proteine indentifiziert werden, die ein Molekulargewicht aufwiesen, das deutlich größer war als die Bandenlage im Gel. Myosin-9 fand sich beispielsweise in mehreren Proteinbanden von verschiedenen Fraktionen. Obwohl für diese Fraktionen nicht alle erkennbaren Proteinbanden untersucht wurden, konnten in mehreren Gelstücken Bruchstücke in den Pellet-Lysaten gefunden werden (**Tab. 15**). Manche dieser Bruchstücke ergaben in ihrer Summe das Molekulargewicht des Proteins. Jedoch waren die emPAI-Werte beziehungsweise Mascot™ Scores für die Bruchstücke nicht gleich groß. Das läßt darauf schließen, dass die einzelnen Bruchstücke ebenfalls gespalten wurden.

Interessant war die Frage, ob die Spaltung aufgrund der Kultivierung der Zellen unter simulierter Schwerelosigkeit verändert ist. Für die Zelllinie FTC-133 zeigte sich eine deutliche Abnahme des 140 kDa großen Bruchstückes von Myosin-9 unter  $\mu\text{g}$ . Der emPAI-Wert sank von 3,29 auf 2,12. Keine Veränderung war für das gleich große Bruchstück der Zelllinie CGTH W-1 zu beobachten (**Tab. 15**).

Die Bande bei 140 kDa ergab für beide genannten Zelllinien die höchsten emPAI-Werte. Für die Zelllinie FTC-133 wurde die Bande in Fraktion 33 untersucht, für die Zelllinie CGTH W-1 in Fraktion 35. In diesen Fraktionen konnte das Protein entsprechend des berechneten isoelektrischen Punktes (**Tab. 17**) erwartet werden. Ebenfalls in Fraktion 33 war das Protein im Pellet-Lysat der Zelllinie HTU-5 zu finden, allerdings bei recht kleinen Molekulargewichten. Für die Zelllinie ML-1 entsprach die größte untersuchte Proteinbande in Fraktion 37 etwa 90 kDa. Myosin-9 konnte hier nachgewiesen werden.

Die Spaltung oder der Abbau von Proteinen in einer Zelle erfolgt durch Proteasen, die für den Abbau mit Ubiquitin markierte Proteine erkennen. Gründe für eine Markierung können eine fehlerhafte Faltung, eine Überalterung oder die Regulation der Konzentration eines Proteins sein. Proteasen spalten Peptidbindungen von Proteinen, sodass kleinere Peptide entstehen. Diese Peptide werden im Folgenden weiter zersetzt, bis das Protein vollständig in Aminosäuren abgebaut ist. Das Auffinden von Bruchstücken ist somit kein eindeutiger Hinweis auf Veränderungen in den untersuchten Zelllinien.

Aufgrund des recht deutlichen Unterschiedes zwischen den emPAI-Werten des Proteins Myosin-9 in den 1g und  $\mu\text{g}$  Lysaten der Zelllinie FTC-133 wurden Western Blot Analysen auf dieses Protein für alle vier Zelllinien, HTU-5, CGTH W-1, FTC-133 und ML-1, durchgeführt (siehe 5.2.2.2). Myosin-9 vernetzt Aktin-Filamente und trägt mit seinen kontraktilen Eigenschaften innerhalb des Aktin-Gerüsts einer Zelle zu ihrer Beweglichkeit bei [Vicente-Manzanares, 2009]. Veränderungen im Cytoskelett sowohl unter Schwerelosigkeit als auch unter simulierter Mikrogravitation sind bereits für eine Vielzahl von Zellen beschrieben [Crawford-Young, 2006; Carmeliet, 1999; Infanger, 2006; Infanger, 2004].

## 5.2) Western Blot Analyse

Die massenspektrometrische Analyse des Proteoms der untersuchten Zelllysate lieferte mit den emPAI-Werten beziehungsweise Mascot<sup>TM</sup> Scores einen Anhaltspunkt, ob ein Protein unter  $\mu\text{g}$  verstärkt oder reduziert exprimiert wurde.

Für einige Proteine erfolgten Western Blot Analysen, deren densitometrische Auswertungen den emPAI-Werte beziehungsweise Mascot<sup>TM</sup> Scores der Massenspektrometrie gegenüber gestellt wurden.

Darüber hinaus erfolgte für zwei ausgewählte Proteingruppen eine zeitabhängige Analyse der Proteinkonzentrationen im Vergleich 1g und  $\mu\text{g}$ . Die eine Gruppe umfasste Enzyme der Glycolyse und die zweite Proteine des Cytoskeletts.

### 5.2.1) Vergleich Proteomergebnis mit Western Blot Analyse

#### 5.2.1.1) Annexine

Zu der Familie der Annexine gehören Proteine, die nicht gebunden im Cytosol zu finden sind und in Abhängigkeit von der Calcium-( $\text{Ca}^{2+}$ )-Ionenkonzentration an negativ geladene Phospholipide in Membranen binden. Zu dieser Familie zählen in Wirbeltieren zwölf Proteine (A1-A11, A13) [Donnelley, 1997; Rescher, 2004]. Neben ihrer Fähigkeit,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Phospholipide reversibel zu binden, können Annexine N-terminal weitere Proteine binden und dadurch an einer Membran verankern [Gerke, 2005]. Eine Hauptfunktion einiger Annexine scheint infolge dieser Eigenschaften darin zu bestehen, Membranen zu stabilisieren sowie Transport durch Membranen über Exozytose und

Endozytose zu ermöglichen. Dabei kann es sich sowohl um die Zellmembran als auch um die Membranen von Zellorganellen handeln [Rescher, 2004; Gerke, 2005].

Annexin 2 bindet bei der geringsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration an Vesikel mit Phospholipiden und zeichnet sich zudem durch eine Bindungsstelle für Aktin aus [Donnelly, 1997; Merrifield, 2001]. Diese spezielle Eigenschaft ist für den effektiven Transport von Vesikeln entlang des Aktin-Cytoskeletts notwendig [Rescher, 2004; Merrifield, 2001]. Außerdem bildet Annexin 2 gebunden an eine Zellmembran eine Bindungsstelle für F-Aktin, die die Zellmembran und das Cytoskelett miteinander verbinden [Rescher, Ruhe, 2004; Rescher, 2004; Gerke, 2005]. Allerdings bindet cytosolisches Annexin 2 nicht an Aktin-Filamente wie zum Beispiel in Stressfasern, da für die Bindung eine Membran essenziell ist [Rescher, 2004; Rescher, Ruhe, 2004].

Ausgehend von und in Übereinstimmung mit diesen Eigenschaften konnte Annexin 2 überwiegend im Cytosol- aber auch im Pellet-Lysat der Proteomanalyse gefunden werden. Der theoretische isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei ungefähr pH 7,6. Somit war das Protein in der FF-IEF-Fraktion 53 zu erwarten, wo es für das Cytosol-Lysat der Zelllinie FTC-133 auch nachgewiesen wurde. Für den Vergleich der emPAI-Werte der Proteomanalyse mit der densitometrischen Auswertung der Western Blot Analyse fand sich eine gute Übereinstimmung für die 1g und  $\mu\text{g}$  Proben.

Für die Proteomanalyse des Pellet-Lysats der Zelllinie ML-1 konnte Annexin 2 in der FF-IEF-Fraktion 37 (etwa pH 6,1) im Sieben-Tageversuch nachgewiesen werden. Hier stimmte für die Gegenüberstellung der Lysate der 1g und  $\mu\text{g}$  Proben der beobachtete Trend der Proteomanalyse nicht mit dem Ergebnis der Western Blot Analyse überein. Eine Erklärung hierfür dürfte ohne Zweifel die Tatsache sein, dass die Western Blot Analyse für die Zelllysate der gesamten Zellen durchgeführt wurde, somit sowohl der cytosolische Anteil von Annexin 2 als auch der im Aktin-Gerüst gebundene Anteil detektiert wurde. Zudem weicht die zum Vergleich herangezogene FF-IEF-Fraktion deutlich von dem theoretischen isoelektrischen Punkt von Annexin 2 ab. Die Verschiebung des isoelektrischen Punktes könnte auf eine funktionelle Veränderung des Proteins hindeuten.

Für die Zelllinie FTC-133 konnte unter  $\mu\text{g}$  eine Verminderung an cytosolischem Annexin 2 in der Proteomanalyse beobachtet werden. Diese Reduktion an Proteinmenge konnte in der Western Blot Analyse bestätigt werden, wenngleich die Differenz der Proteomanalyse größer ausfiel. Dies könnte darauf hindeuten, dass unter  $\mu\text{g}$  mehr gebundenes Annexin 2 im Aktin-Gerüst vorlag. Für Annexine allgemein und für Annexin 2 sind auch weitere Funktionen bekannt.

Die Möglichkeit, dass unter  $\mu\text{g}$  mehr Annexin 2 im Aktin-Gerüst gebunden ist, könnte auch die Ergebnisse für die Zelllinie ML-1 erklären. Laut der Proteomanalyse konnte für die Menge an Annexin 2 im Pellet-Lysat der  $\mu\text{g}$  Probe ein deutlicher Anstieg verzeichnet werden. In der Western Blot Analyse war jedoch keine Veränderung zu

beobachten. Es wäre möglich, dass die Proteinmenge von Annexin 2 in der Summe konstant blieb, die Lokalisierung in der Zelle sich allerdings verschob.

Für Annexin 1, das ebenfalls für die Zelllinie FTC-133 untersucht wurde, fanden sich vergleichbare Ergebnisse wie für Annexin 2. Annexin 1 wird als ein Mitglied des Reparatur-Mechanismus für Risse in der Zellmembran infolge von mechanischer Überbelastung diskutiert [McNeil, 2006]. Simulierte Schwerelosigkeit scheint als eine solche Belastung angesehen werden zu können. Ein möglicher Riss könnte, trotz Verringerung an Gesamtprotein, zu einer prozentualen Erhöhung von im Cytoskelett beziehungsweise an der Membran gebundenem Annexin 1 führen.

Die Lokalisierung der Annexine in Zellen kultiviert unter  $\mu\text{g}$  und deren zeitliche Veränderung könnte beispielsweise mikroskopisch untersucht werden. In Anbetracht der vielfältigen Interaktion der Annexine mit anderen Proteinen könnte eine solche Untersuchung neue Anhaltspunkte für das Verhalten dieser Proteine unter  $\mu\text{g}$  geben.

### 5.2.1.2) Elongation factor 1-alpha 1

In der Proteinbiosynthese erfolgt die Verlängerung der Peptidkette mit Hilfe von Elongationsfaktoren, die in jeder Zelle zu finden sind [Lee, 1992]. Einer dieser Faktoren, das humane Protein Elongation factor 1-alpha 1 (EF1- $\alpha$ 1), ist an der Bindung der mit einer Aminosäure beladenen tRNA an die Ribosomen beteiligt [Brands, 1986]. EF1- $\alpha$ 1 bindet pH-abhängig an F-Aktin. Unter physiologischen Bedingungen (pH 6,2 bis 7,6) liegt das Protein überwiegend gebunden an F-Aktin vor, wobei mit steigendem pH-Wert die Menge an ungebundenem EF1- $\alpha$ 1 zunimmt. Korrespondierend mit dieser Beobachtung konnte für eine gesteigerte Proteinsynthese ein Anstieg des pH-Wertes und somit auch ein Anstieg an ungebundenem EF1- $\alpha$ 1 beobachtet werden [Edmonds, 1995; Liu, 1996]. Es lässt sich schlussfolgern, dass das Protein entweder im Cytosol- oder im Pellet-Lysat entsprechend seines isoelektrischen Punktes (ungefähr pH 9,1, **Tab. 17**) zu erwarten ist. Jedoch war das Protein im Cytosol-Lysat der Zelllinie CGTH W-1 in einer FF-IEF-Fraktion nachzuweisen, die ungefähr einem pH-Wert von 6,0 entsprach. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass der Vergleich der Mascot<sup>TM</sup> Scores mit der densitometrischen Validierung der Western Blot Membran die erwartete Veränderung nicht wiedergab. Die Mascot<sup>TM</sup> Scores und die densitometrischen Einheiten verhielten sich genau entgegengesetzt.

Weiterhin ist zu beachten, dass in den von dieser Zelllinie untersuchten Proteinbanden des Pellet-Lysats das Protein ebenfalls nachzuweisen war. Es konnte im Pellet-Lysat jedoch entweder in der FF-IEF-Fraktion 35 (pH-Wert ungefähr 6,0) des Lysats nur in der unter  $\mu\text{g}$  kultivierten Probe (Gelstück 192, **Abb. 24A**) oder in der FF-IEF-Fraktion 53 (pH-Wert ungefähr 7,5) nur in der unter Erdanziehungskraft kultivierten Probe (Gelstück 196, **Abb. 24A**) nachgewiesen werden. Beide Gelstücke waren somit ebenfalls in FF-IEF-Fraktionen enthalten, die einem niedrigeren pH-Wert entsprachen

als dem theoretischen isoelektrischen Punkt von EF1- $\alpha$ 1. Das lässt darauf schließen, dass das Protein möglicherweise funktionell verändert war, wodurch sich der isoelektrische Punkt veränderte.

In der Western Blot Analyse war ein geringer, jedoch nicht signifikanter Anstieg von EF1- $\alpha$ 1 unter  $\mu$ g zu verzeichnen. Für EF1- $\alpha$ 1 ist bekannt, dass dieses Protein bei Überexpression die durch Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) induzierte Apoptose über Caspase-12 reduziert [Talapatra, 2002]. Stress für das ER könnte vielleicht auch durch strukturelle Veränderungen im Cytoskelett infolge von Schwerelosigkeit ausgelöst werden. Für zukünftige Untersuchungen wäre es somit eine interessante Fragestellung, ob Zellen, die unter simulierter oder realer Schwerelosigkeit kultiviert werden, die Expression von EF1- $\alpha$ 1 steigern, um unter diesen Bedingungen zu überleben.

### 5.2.1.3) „Heat Schock“ Proteine

Stress für das ER wird im Allgemeinen durch eine Anhäufung von fehlerhaft gefalteten und/oder ungefalteten Proteinen hervorgerufen. Zum Schutz durchläuft die Zelle die so genannte „unfolded-protein response (UPR)“, einen vielschichtigen Mechanismus der zu gesteigertem Abbau fehlgefalteter Proteine, zur Reduzierung der Translation neuer Proteine und gleichzeitig zur Hochregulierung von Chaperonen und Enzymen der Proteinfaltung führt [Lee, 2007; Zhang, 2008; Shimizu, 2009].

Eine Gruppe von Chaperonen, die in Säugetieren und anderen Organismen weitverbreitet ist, ist die Familie der „Heat Schock“ Proteine (*engl.* Heat shock protein, HSP) [Kiang, 1998; Javid, 2007]. Humane HSPs werden entsprechend ihres Molekulargewichts in fünf Untergruppen eingeteilt: HSP110 (HSPH), HSP90 (HSPC), HSP70 (HSPA), HSP40 (DNAJ) und kleine HSPs (HSPB) [Schmitt, 2007; Vos, 2008; Kampinga, 2009]. Hitzeschock und andere Reize, wie beispielsweise die Konzentration von Schwermetallen, mikrobielle Infektionen, steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration und Hormone, sind in der Lage die Expression der HSPs zu induzieren [Kiang, 1998].

Zu jeder Untergruppe der HSPs zählen mehrere Mitglieder die entweder konstitutiv oder induziert exprimiert werden. Zwei Mitglieder der HSP70-Familie, das Heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70, HSPA8) und das 78 kDa Glucose regulated protein (GRP78, HSPA5), werden konstitutiv exprimiert. GRP78 liegt im ER vor, wohingegen HSC70 im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist. Beide Proteine sind in vielen Tumoren überexprimiert [Schmitt, 2007; Lee, 2007; Vos, 2008]. Für GRP78 ist zudem bekannt, dass es an der Regulation des Stresses im ER beteiligt ist. Es wirkt anti-apoptotisch und könnte möglicherweise von entscheidender Bedeutung für die Metastasierung von Tumoren sein [Lee, 2007].

Ausgehend von der Lokalisierung von HSC70 in der Zelle war dieses Protein in der Proteomanalyse im Cytosol-Lysat zu erwarten. HSC70 konnte jedoch sowohl in Cytosol-

als auch in Pellet-Lysaten der Proteomanalyse der Zelllinie ML-1 in der FF-IEF-Fraktion 37 (ungefähr pH 6,1) identifiziert werden. Der theoretisch berechnete isoelektrische Punkt von HSC70 liegt bei rund pH 5,4. Das Protein wurde somit bei einem höheren pH-Wert lokalisiert als zu erwarten gewesen ist. Alle Mitglieder der HSP70-Untergruppe, und somit auch HSC70, sind ATPasen, die kontinuierlich zwischen ADP- und ATP-gebundenem Zustand wechseln [Vos, 2008]. Die Bindung von ADP beziehungsweise ATP kann die Verschiebung des isoelektrischen Punktes erklären.

Für den in der Western Blot Analyse gezeigten Sieben-Tageversuch lag das Protein bei der Proteomanalyse im Pellet-Lysat vor. Für die Mascot™ Scores des Pellet-Lysats zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit der densitometrischen Auswertung der Western Blot Analyse bei Vergleich der Proteinmenge der Proben kultiviert unter 1g mit der Proteinmenge der Proben kultiviert unter  $\mu$ g.

Das Cytosol-Lysat des Sieben-Tageversuchs wurde nicht für die FF-IEF-Fraktion 37 massenspektrometrisch untersucht, weshalb kein Vergleich zwischen Cytosol- und Pellet-Lysat erfolgen konnte. Es ist jedoch zu vermuten, dass ein übereinstimmendes Ergebnis zu finden gewesen wäre, da für den Ein-Tageversuch die Analyse der FF-IEF-Fraktion 37 des Cytosol-Lysats erfolgte. Hier konnte eine tendenziell mit den Mascot™ Scores des Sieben-Tageversuchs übereinstimmende Veränderung verzeichnet werden. Die Veränderung betraf einen Anstieg der HSC70-Proteinmenge unter Einfluss von  $\mu$ g. Dies könnte darauf hindeuten, dass HSC70 im Cytoplasma und im Zellkern vermehrt benötigt wird, um die Integrität von Proteinen, die infolge von  $\mu$ g instabil werden, aufrecht zu erhalten.

Wie HSC70 war auch GRP78 im Cytosol-Lysat zu erwarten und fand sich ebenfalls auch im Pellet-Lysat der Proteomanalyse. In beiden Lysaten lag das Protein in der FF-IEF-Fraktion 33 (etwa pH 5,5) vor. Mit einem isoelektrischen Punkt von rund pH 5,1 hätte das Protein in der Fraktion 31 zu finden sein müssen und war, wenn auch nur gering, wie HSC70 bei einem höheren pH Wert zu finden. In Anbetracht der Methodik der FF-IEF kann jedoch angenommen werden, dass GRP78 auch in der FF-IEF-Fraktion 31 gefunden worden wäre.

In der Western Blot Analyse zeigte sich eine sehr deutliche Reduktion von GRP78 unter  $\mu$ g. Diese Tendenz war nach den emPAI-Werten der Proteomanalyse der Pellet-Lysate nicht zu erwarten, jedoch zeigten die Mascot™ Scores eine Verringerung von mehr als 260 Einheiten. Für das Cytosol-Lysat wurde gleichfalls die FF-IEF-Fraktion 33 untersucht und in entsprechenden Gelstücken GRP78 gefunden. Für diese Gelstücke ergab der Vergleich der Mascot™ Scores eine Reduzierung der Proteinmenge von GRP78 von mehr als 500 Einheiten.

Bei Überexpression von GRP78 in Tumoren wirkt dieses Protein zell-protektiv, in dem es Apoptose verhindert. Diese Wirkung des Proteins hat zur Folge, dass Tumorzellen resistent gegen Chemotherapeutika werden. Gelingt es, die Expression von GRP78 zu

verringern, steigt der Therapieerfolg [Lee, 2007]. Ließe sich im Hinblick auf die Western Blot Analyse der auf die Expression von GRP78 negative Einfluss von Schwerelosigkeit bestätigen, könnte aus diesem Ergebnis eine neue Therapie für die Behandlung von Krebs entwickelt werden.

#### **5.2.1.4) Nucleoside diphosphate kinase A**

Eine Caspase-unabhängige Induktion von Apoptose via DNA-Schädigung ist für die Nucleoside diphosphate kinase A (nm23-H1) bekannt [Fan, 2003]. Ein Phänomen, das für viele Tumore beschrieben wird, ist die verminderte Expression von nm23-H1 [Rosengard, 1989]. Unter Berücksichtigung der Funktion von nm23-H1 in der Induktion der Caspase-unabhängigen Apoptose scheint dieser Zelltod in mutierten Zellen vermindert zu sein. Darüber hinaus wurde eine Korrelation bezüglich der Aggressivität der Metastasierung eines Tumors mit der Stärke der verminderten Expression berichtet. Je geringer die Proteinkonzentration von nm23-H1 ist, desto aggressiver metastasiert ein Tumor [MacDonald, 1996; Lin, 2002].

Das Protein nm23-H1 hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt von ungefähr 5,8 und wäre in einer FF-IEF-Fraktion um 35 zu erwarten. Für die Zelllinie ML-1 fand sich das Protein in der Fraktion 51 (pH ungefähr 7,4) des Cytosol-Lysats. Diese Verschiebung kann mit der Funktion von nm23-H1 als Phosphat-Überträger von einem Nucleosidtriphosphat auf ein Nucleosiddiphosphat erklärt werden [Lascu, 2000; Min, 2002].

Übereinstimmend mit den Mascot™ Scores der Proteomanalyse fand sich für die densitometrische Validierung der Western Blot Analyse für den Vergleich von unter 1g mit unter µg kultivierten Proben ein Anstieg für die Proteinkonzentration von nm23-H1 unter µg. Unter Berücksichtigung von nm23-H1 als Metastase-Suppressor [MacDonald, 1996; Lin, 2002] könnte die Behandlung von Tumoren mit Schwerelosigkeit, wie für das Protein GRP78 angedeutet, die Metastasierung möglicherweise reduzieren beziehungsweise eine Behandlung von Krebs erleichtern.

#### **5.2.1.5) Redoxproteine**

Reaktive Sauerstoffverbindungen wie radikalischer Sauerstoff, der bei unvollständiger Zellatmung entstehen kann, sind Gift für die Zelle. Sie schädigen unter anderem die DNA, Membranlipide und Proteine. Um diese Schäden zu beseitigen oder zu verhindern, können Zellen einerseits entstandene Schäden reparieren oder mit Redoxproteinen die reaktiven Sauerstoffverbindungen reduzieren [Wagner, 2002].

Die Proteinfamilie der Peroxiredoxine ist in diesem Zusammenhang sehr interessant. Im Gegensatz zu den meisten anderen Peroxidasen, die mit Hilfe eines Co-Faktors die reaktive Sauerstoffverbindung reduzieren, besitzen die Peroxiredoxine ein Cysteinrest, der direkt im Molekül oxidiert wird. Auf diese Weise entsteht aus der SH-Gruppe des Cysteinrests eine Sulfensäure (-S-OH). Diese Oxidierung ist unter entsprechenden

Voraussetzungen und unter Verwendung von ATP reversibel [Yang, 2002; Wood, 2003; Rhee, 2005].

Infolge der Oxidation der Peroxiredoxine verringert sich deren isoelektrischer Punkt. Der isoelektrische Punkt des nicht-oxidierten Peroxiredoxins stimmt mit dem theoretisch berechneten gut überein. Somit können in 2D-Gelelektrophoresen für jede Isoform von Peroxiredoxin zwei Spots identifiziert werden [Wagner, 2002; Chevillet, 2003].

Peroxiredoxin 1 (PRXI) hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 8,3, Peroxiredoxin 2 (PRXII) von 5,7. Für die in der Proteomanalyse untersuchten Gelstücke fand sich PRXI in der FF-IEF-Fraktion 43 (pH von ungefähr 6,7). Unter Berücksichtigung der oben genannten Eigenschaft der Peroxiredoxine konnte somit in dieser Fraktion das oxidierte PRXI nachgewiesen werden.

Entgegen der Erwartung infolge der Mascot™ Scores für PRXI konnte in der Western Blot Analyse ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge für Proben kultiviert unter  $\mu\text{g}$  detektiert werden. Nach den Mascot™ Scores zu schließen war keine Veränderung beziehungsweise eine geringe Erniedrigung für PRXI zu erwarten. Gründe für dieses voneinander abweichende Ergebnis könnten einerseits sein, dass in der Proteomanalyse nur das oxidierte und in der Western Blot Analyse sowohl das oxidierte als auch das reduzierte Protein detektiert wurden, und zum anderen, dass der für die Western Blot Analyse verwendete Antikörper sowohl für PRXI als auch PRXII spezifisch war.

PRXI wird unter anderem als Tumorsuppressor diskutiert [Mu, 2002]. Sollte sich in weiteren Analysen eine Steigerung der PRXI Expression unter Einfluss von Schwerelosigkeit bestätigen lassen, wäre dies ein weiterer Hinweis darauf, dass Schwerelosigkeit negativ auf Tumore wirken könnte.

Das Enzym Glutathione S-transferase P (GSTP1) ist ein Beispiel für ein Redoxenzym, das reaktive Verbindungen innerhalb einer Zelle mit Hilfe eines Co-Faktors reduziert. Glutathione Transferasen (GST), von denen es verschiedene Isoformen im Menschen gibt, katalysieren allgemein die Kupplung des Tripeptids Glutathion (GSH) an ein endogenes oder exogenes Elektrophil. GSTP1 ist ein homodimeres, cytosolisches Protein [Armstrong, 1997; Townsend, 2003]. Glutathione Transferasen metabolisieren mit dieser Eigenschaft unter anderem Xenobiotika, weshalb sie für die Behandlung von Tumoren, in denen häufig GSTP1 überexprimiert ist, von Bedeutung sind [Wang, 2001; Cui, 2008]. Desweiteren katalysieren GST die Bindung von GSH an ein Protein über die SH-Gruppe eines Cysteins (S-Glutathionylierung), wodurch das Protein entweder vor dem Einfluss oxidativer Verbindungen geschützt oder wodurch die Funktion des Proteins infolge einer Ladungs- und/oder Konformationsänderung verändert wird [Townsend, 2006].

GSTP1 wurde für die Zelllinien FTC-133 und ML-1 in den FF-IEF-Fraktionen der Cytosol-Lysate wie erwartet identifiziert. Der theoretische isoelektrische Punkt von GSTP1 liegt bei ungefähr pH 5,4. Diesem pH-Wert entspricht ungefähr die FF-IEF-Fraktion 33, in der für das Cytosol-Lysat der Zelllinie FTC-133 das Protein auch identifiziert wurde. Der anhand der empPAI-Werte (FTC-133) beziehungsweise Mascot™ Scores (ML-1) der Proteomanalyse erwartete Konzentrationsanstieg von GSTP1 unter  $\mu\text{g}$  konnte in der densitometrischen Auswertung der Western Blot Analyse bestätigt werden. Jedoch fiel dieser Anstieg in der Western Blot Analyse für die Zelllinie FTC-133 deutlich stärker aus als die empPAI-Werte erwarten ließen.

Für die Zelllinie ML-1 fand sich GSTP1 für den Elf-Tageversuch in der FF-IEF-Fraktion 43 (pH ungefähr 6,7). Diese mögliche Veränderung des isoelektrischen Punktes könnte auf eine strukturelle Veränderung von GSTP1 in dieser Zelllinie hindeuten. Im Sieben-Tageversuch war GSTP1 ebenfalls nur in der Fraktion 41 (pH etwa 6,5), nicht jedoch in der Fraktion 35 (pH ungefähr 6,0) nachweisbar. Für GSTP1 sind bereits Proteinisoformen bekannt, in denen infolge des Austauschs einzelner Aminosäuren Konformationsänderungen resultierten und die Proteinisoformen voneinander abweichende Eigenschaften aufwiesen [Ali-Osman, 1997; McIlwain, 2006].

Neben der katalytischen Funktion interagiert GSTP1 auch mit der c-Jun N-terminalen Kinase 1 (JNK1) [Wang, 2001]. Diese Kinase gehört zur Familie der Mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK). Infolge einer Bindung zwischen GSTP1 und JNK wird JNK inhibiert. Der JNK-Signalweg kann zu der Einleitung von Apoptose führen. Bei erhöhter Expression von GSTP1 kann somit für Tumorzellen von einem endogenen JNK-Inhibitor gesprochen werden, mit dem Tumorzellen ihr Überleben sichern [Adler, 1999].

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass  $\mu\text{g}$  Apoptose einleitet. Apoptose induziert via dem JNK-Signalweg erfolgt infolge von Stressfaktoren wie beispielsweise UV-Strahlung [Yin, 2000; Wang, 2001; Townsend, 2006]. Eine verstärkte Apoptoserate unter simulierter Schwerelosigkeit könnte die Konzentrationserhöhung von GSTP1 erklären. Mit der gesteigerten Expression könnte die Zelle versuchen, der Apoptose entgegen zu wirken.

#### 5.2.1.6) Enzyme der Glycolyse

Die Glycolyse ist Teil des tierischen Stoffwechsels und läuft im Cytosol der Zelle ab. Während der Glycolyse wird Glucose über mehrere enzymatische Reaktionen in Pyruvat umgewandelt (**Abb. 33**) und dabei in der Bilanz zwei Moleküle ATP pro Molekül Glucose produziert [Koolman, 2003]. In Krebszellen ist die Energiegewinnung im Vergleich zu normalen gesunden Zellen verändert. Krebszellen gewinnen ihre Energie hauptsächlich über die Glycolyse mit Energierückgewinnung durch den Abbau

von Pyruvat in Laktat und nicht wie gesunde Zellen im Citratzyklus (Warburg-Effekt) [Warburg, 1956; Koolman, 2003].

Bei der Durchsicht der Ergebnisse der Massenspektrometrie zeigten sich deutliche Unterschiede in den Mascot™ Scores beziehungsweise den emPAI-Werten für verschiedene Enzyme der Glycolyse zwischen 1g und µg. Diese konnten für die beiden Enzyme Phosphoglycerate kinase (PGK1/2) und α-Enolase in Western Blot Analysen für die Zelllinie FTC-133 bestätigt werden (**Abb. 25A**). Die erwartete Konzentrationsminderung fiel für α-Enolase sogar deutlich stärker aus, als die emPAI-Werte vermuten ließen. Ausgehend von diesen Ergebnissen erfolgte eine nähere Untersuchung der Glycolyse zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, zu denen die Zelllinien CGTH W-1, FTC-133 und ML-1 unter µg untersucht wurden. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt (siehe 5.2.2.1) diskutiert.

Allgemein zeigte sich für die emPAI-Werte eine bessere Übereinstimmung zwischen Proteomanalyse und densitometrischer Auswertung von Western Blot Analysen als für die Mascot™ Scores. Jedoch machen alle Beispiele deutlich, dass die Ergebnisse einer Proteomanalyse gute Hinweise darauf geben können, welche Proteine vielleicht von Interesse sein könnten, genauer untersucht zu werden.

## 5.2.2) Western Blot Analyse der zeitabhängigen Expression ausgewählter Proteine

### 5.2.2.1) Enzyme der Glycolyse

Mit dem Abbau von Glucose zu Kohlenstoffdioxid und Wasser in der Atmungskette produzieren Zellen Energie. Der erste Schritt in dieser Kette ist die Glycolyse, in der Glucose in mehreren Reaktionsschritten zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut wird. Die Reaktionen laufen im Cytosol der Zelle ab [Michal, 1999].

Das Cytosol einer Zelle weist einen pH Wert von 7,0 bis 7,4 auf. Für eine Vielzahl von Enzymen findet sich für diesen pH-Bereich eine optimale Enzymaktivität. Im Mitochondrium (pH 7,8 bis 8,0) wird Pyruvat über den Citratzyklus zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut [Llopis, 1998; Bright, 1987; Michal, 1999]. Die Enzyme des Citratzyklusses weisen überwiegend isoelektrische Punkte von größer pH 8 auf (**Tab. 11**).

Die Glycolyse und der Citratzyklus (**Abb. 33**) erzeugen zusammen je Molekül Glucose 32 Moleküle ATP, wohingegen der Abbau von Glucose über Pyruvat zu Laktat nur zwei Moleküle ATP liefert [Koopman, 2003]. In Krebszellen erfolgt der Abbau von Glucose überwiegend über Pyruvat zu Laktat, also mit geringer Energieausbeute, auch wenn genügend Sauerstoff für einen aeroben, ertragsreicheren Abbau vorhanden wäre. Um dennoch genügend Energie zu gewinnen, steigern Krebszellen den Umsatz der

Glycolyse, um ausreichend Pyruvat für den Abbau zu Laktat zur Verfügung stellen zu können (Warburg-Effekt) [Warburg, 1956; Denko, 2008].

In der Western Blot Analyse der Glycolyse-Enzyme TIM, PGK1/2,  $\alpha$ -Enolase und PKM2 (**Abb. 28 und 29**) zeigten sich für die drei Zelllinien sehr unterschiedliche Proteinmengen unter  $\mu$ g. Zur Übersicht zeigt **Tabelle 18** einen Vergleich der drei Zelllinien nach einem und drei Tagen unter  $\mu$ g.

**Tab. 18: Zusammenfassung der Western Blot Analyse von Enzymen der Glycolyse**

1d / 3d	CGTH W-1	FTC-133	ML-1
<b>TIM</b>	$\pm / \pm$	$\pm / \pm$	+ / +
<b>PGK1/2</b>	$\pm / -$	- / -	+ / +
<b><math>\alpha</math>-Enolase</b>	+ / +	+ / -	+ / +
<b>PKM2</b>	+ / +	+ / +	+ / +

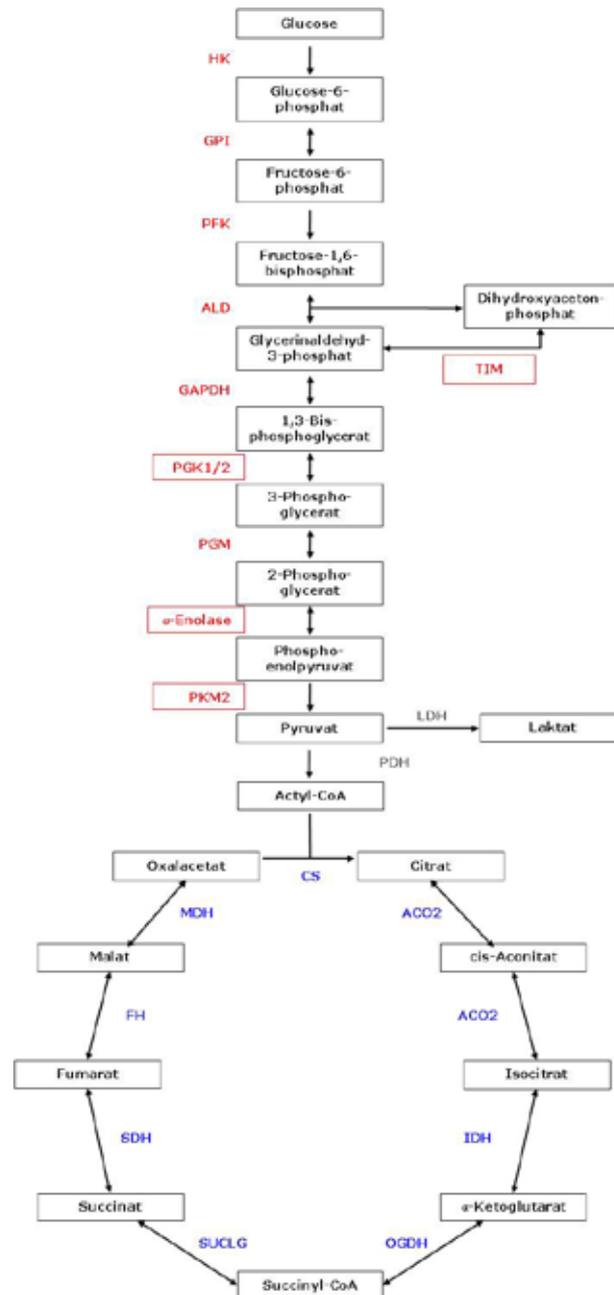
Angegeben sind jeweils die Ergebnisse des Ein- (1d) und Drei-Tageversuches (3d). ‚+‘ bedeutet einen Anstieg der Proteinkonzentration unter  $\mu$ g im Vergleich zu 1g, ‚-‘ eine Verringerung, ‚ $\pm$ ‘ keine Veränderung.

$\alpha$ -Enolase und PKM2 waren in allen Zelllinien nach einem Tag unter  $\mu$ g erhöht. Dieser Effekt setzte sich für die Zelllinien CGTH W-1 und ML-1 auch nach drei Tagen für beide Proteine und für die Zelllinie FTC-133 nur für das Protein PKM2 fort, wohingegen für die Zelllinie FTC-133 eine Verringerung der Proteinkonzentration für das Protein  $\alpha$ -Enolase nach drei Tagen zu beobachten war. Insgesamt waren alle untersuchten Enzyme für die Zelllinie ML-1 nach einem und drei Tagen unter  $\mu$ g erhöht. Das Expressionsmuster von TIM zeigte sowohl für die Zelllinie CGTH W-1 als auch die Zelllinie FTC-133 keine Veränderungen. Für PGK1/2 fand sich gleichfalls keine Veränderung nach einem Tag unter  $\mu$ g für die Zelllinie CGTH W-1 und im Drei-Tageversuch eine Verringerung. Eine solche Abnahme der Proteinmenge war für die Zelllinie FTC-133 zu beiden Zeitpunkten zu beobachten. Für verschiedene Enzyme des Citratzyklusses fanden sich laut MS-Analyse ebenfalls Veränderungen der Proteinkonzentration für die Zelllinien FTC-133 und ML-1 (Daten nicht gezeigt). Interessant war, dass sich hier den Ergebnissen der Massenspektrometrie zufolge ein genau gegensätzliches Bild zur Glycolyse abzeichnete. So waren die Proteine des Citratzyklusses der Zelllinie FTC-133 erhöht, die der Zelllinie ML-1 jedoch erniedrigt. Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der Untersuchungen der Zelllinie ML-1 könnte sein, dass das Hauptziel der Glycolyse nicht die Energiegewinnung sondern die Produktion anderer Bausteine für die Proliferation, wie zum Beispiel Nucleotide, Aminosäuren, Phospholipide und Fettsäuren, war [Mazurek, 2005; Jones, 2009; Tennant, 2009]. Unterstützend dafür wäre die Anwesenheit eines inaktiven dimeren PKM2-Enzyms, das die Anreicherung der Zwischenprodukte begünstigen würde

[Mazurek, 2005]. Die Ergebnisse der Annexin V-FITC/PI Messung könnten die Hypothese der gesteigerten Proliferation unter  $\mu\text{g}$  bekräftigen. Für die Zelllinie ML-1 fand sich nur im Ein-Tageversuch ein geringerer Prozentsatz an lebenden Zellen unter  $\mu\text{g}$  als unter 1g. Zu den übrigen Zeitpunkten war im Vergleich zu 1g die lebende Zellpopulation größer oder gleich unter  $\mu\text{g}$ . Als weiterführende Analyse sollte PKM2 genauer analysiert werden. Darüber hinaus wären Konzentrationsmessungen der Glycolyse-Zwischenprodukte nützlich, um die Bausteine für die vermutete gesteigerte Proliferation zu charakterisieren. Besondere Aufmerksamkeit sollte man auf 3-Phosphoglycerat legen. Im Vergleich zu den anderen drei untersuchten Enzymen ist PGK1/2, das 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat umsetzt, am stärksten vermehrt exprimiert.

Als ein weiterer Grund für die gesteigerte Glycolyse-Aktivität käme auch ein hypoxisches Milieu in Frage, das aber für die durchgeführten Experimente nicht zutrifft. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen, die voll mit Medium gefüllten waren, auf der RPM kultiviert. Die im Medium gemessenen hohen Sauerstoffkonzentrationen (**Abb. 16**) schließen eine Hypoxie ausgelöst durch Sauerstoffmangel aus. Einzig Zellen im Inneren der gebildeten Sphäroide (**Abb. 34**) würden einen sehr geringen Prozentsatz an Zellen repräsentieren, die vielleicht unter Nähr- und Sauerstoffmangel leiden. Allerdings waren gerade die Sphäroide der Zelllinie FTC-133 am größten, für die sich nur teilweise ein Anstieg der Enzyme nach einem Tag unter  $\mu\text{g}$  nachweisen ließ.

Ein Protein, das mit der Regulation der Hypoxie eng verbunden ist und das die metabolischen Veränderungen von Tumorzellen reguliert, ist der Hypoxie-induzierende Faktor (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) [Denko, 2008]. HIF-1 ist ein Protein, welches im Cytoplasma und im Zellkern vorkommt, ein Molekulargewicht von ungefähr 92 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pH 5,2 aufweist [UniProt]. Als Transkriptionsfaktor leitet HIF-1 die Expression von Proteinen ein, die eine Veränderung des Metabolismus an hypoxische Umstände ermöglichen [Dang, 2008]. Es wird derzeit diskutiert, dass eine Adaptation von Tumorzellen nicht primär eine Steigerung der Glycolyse bewirkt, sondern vielmehr als eine Minderung der Mitochondrienaktivität anzusehen ist (Marburg-Effekt). Als Transkriptionsfaktor reguliert HIF-1 unter anderem die Expression der Enzyme der Glycolyse [Denko, 2008]. In Hinblick auf diese Deutung des Marburg-Effekts scheint  $\mu\text{g}$  auf die Tumoreigenschaften der Zelllinie ML-1 unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Hypothesen keinen positiven Einfluss im Hinblick auf die Krebsbekämpfung zu haben.



**Abb. 33: Übersicht der Glycolyse und des Citratzyklusses**

Schematische Übersicht der Glycolyse (Enzyme in rot) und des Citratzyklusses (Enzyme in blau). Die Enzyme des aeroben oder anaeroben Umsatzes von Pyruvat sind in grau geschrieben. Angegeben sind für jeden Reaktionsschritt die Edukte und Produkte (schwarz umrandet) sowie an den Reaktionspfeilen die die Reaktion katalysierenden Enzyme. Die rot umrandeten Enzyme der Glycolyse wurden in Western Blot Analysen untersucht. Reversible Reaktionen sind durch einen Pfeil mit zwei Pfeilspitzen, irreversible mit einer Pfeilspitze dargestellt. HK: Hexokinase, GPI: Glucosephosphate isomerase, PFK: Phosphofructo kinase, ALD: Fructose-bisphosphate Aldolase, TIM: Triosephosphate isomerase, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphate dehydrogenase, PGK1/2: Phosphoglycerate kinase, PGM: Phosphoglycerate mutase, PKM2: Pyruvate kinase isoenzyme M1/M2, PDH: Pyruvate dehydrogenase, LDH: Lactate dehydrogenase, CS: Citrate synthase, ACO2: Aconitate hydratase, IDH: Isocitrate dehydrogenase, OGDH: 2-Oxoglutarate dehydrogenase, SUCLG: Succinyl-CoA ligase, SDH: Succinate dehydrogenase, FH: Fumarate hydratase, MDH: Malate dehydrogenase.

Genau entgegengesetzt lassen sich die Ergebnisse für die Zelllinie FTC-133 interpretieren. Mit der eher verringerten Glycolyse- und der gesteigerten Citratzyklusrate weisen diese Zellen unter  $\mu\text{g}$  quasi einen „Anti“-Warburg-Effekt auf. Das könnte möglicherweise auf eine bessere Prognose in der Behandlung für diese Art von Krebszelle hindeuten. Im Zusammenhang mit HIF-1 und dem „Anti“-Warburg-Effekt sollte der Transkriptionsfaktor *c-Myc* genauer untersucht werden. Wie HIF-1 reguliert *c-Myc* die Expression der Enzyme der Glycolyse und ist in vielen Krebszellen überexprimiert [Rimpini, 2007; Dang, 2008]. HIF-1, von dem die zwei Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  existieren, reguliert die Transkriptionseffizienz von *c-Myc*. Unter gesunden physiologischen Bedingungen inhibiert HIF-1 $\alpha$  die Transkription von *c-Myc*-spezifischen Genen. Steigt die Konzentration von *c-Myc* aufgrund der Krebsentstehung an, werden mehr *c-Myc*-spezifische Gene exprimiert [Dang, 2008; Hansen, 2011]. Neben der Glycolyse beeinflusst *c-Myc* weitere Stoffwechselwege, die zur Energiegewinnung beitragen. Aufgrund dieser Vielzahl an Wirkungen in der Krebsentwicklung kommt *c-Myc* eine besondere Bedeutung in der Entwicklung neuer Anti-Tumortheraeutika zu [Dang, 2009]. Würde sich bestätigen lassen, dass für die Zelllinie FTC-133  $\mu\text{g}$  wie in T-Lymphozyten [Gridley, 2009] eine Inhibierung von *c-Myc* bewirkt, wäre ein neuer, sehr interessanter therapeutischer Ansatz gefunden. Um dies zu untersuchen, könnten Western Blot Analysen, Immunhistochemische Färbungen und andere Methoden hilfreich sein.

Für die Zelllinie CGTH W-1 scheinen weder die Hypothesen für die Zelllinie ML-1 noch für die Zelllinie FTC-133 das Ergebnis der Western Blot Analysen deuten zu können. Eine ganz andere Erklärung für die zum Teil gesteigerten Enzymkonzentrationen könnte in der Verteilung der Enzyme im Cytoplasma liegen. Die Enzyme der Glycolyse binden bis auf die Hexokinase alle an Aktin-Filamente oder Mikrotubuli und organisieren sich auf diese Art zu einem glycolytischen Komplex [MacRae, 1992; Janmey, 1998; Penso, 2002]. Diese Anordnung könnte entscheidend dafür sein, ob der Zelle kurzfristig an einem bestimmten Ort Energie zur Verfügung gestellt werden kann [Janmey, 1998]. Wird das Cytoskelett infolge von mechanischem Stress beschädigt, ist es denkbar, dass die glycolytischen Komplexe ebenfalls aufbrechen und die Enzyme verstreut im Cytoplasma an einzelne Aktin-Filamente oder Mikrotubuli gebunden sind. Die Zelle könnte, um das Gleichgewicht der glycolytischen Komplexe wieder herzustellen, vermehrt Enzyme exprimieren. Diese ungeordnete Verteilung ließe sich mikroskopisch klären.

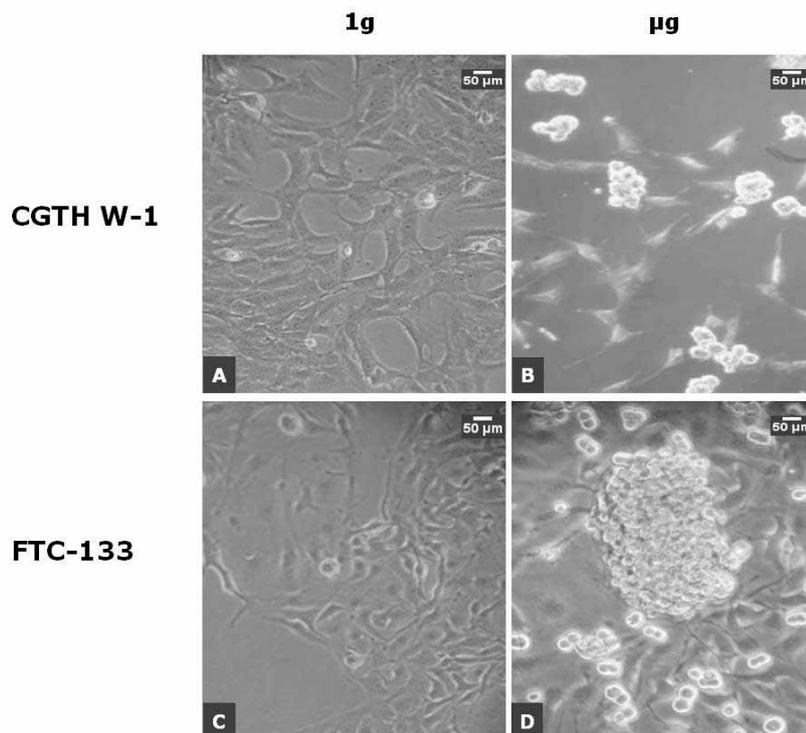
Zusammengenommen scheinen die drei untersuchten Schilddrüsentumorzelllinien metabolisch unterschiedlich auf  $\mu\text{g}$  zu reagieren. Ob diese Unterschiede mit der Herkunft der Zellen begründbar sind, wäre ein sehr interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen. Möglicherweise ließe sich ein Modell entwickeln, das vorhersagen könnte, für welche Art von Krebszelle oder Metastase, in dieser Arbeit eine aus dem

Brustbein (CGTH W-1) und eine aus einem Lymphknoten (FTC-133) untersucht, eine Behandlung unter  $\mu\text{g}$  eine positive Prognose erwarten lassen könnte.

### 5.2.2.2) Proteine des Cytoskeletts

Die Zelllinien CGTH W-1, FTC-133 und ML-1 bildeten während der Kultivierung unter  $\mu\text{g}$  Sphäroide. In **Abbildung 34** sind exemplarisch Sphäroide der Zelllinien CGTH W-1 und FTC-133 nach drei Tagen unter  $\mu\text{g}$  Kultivierung gezeigt. Der Durchmesser der Sphäroide der Zelllinie FTC-133 betrug ungefähr 1 mm, wohingegen für die Zelllinie CGTH W-1 Sphäroide mit einem Durchmesser von nur 0,15 mm zu beobachten waren. Die Sphäroide der Zelllinie ML-1 waren in ihrer Größe mit denen der Zelllinie CGTH W-1 vergleichbar. Die Anzahl der Sphäroide stieg jedoch für die Zelllinie ML-1 deutlich stärker an als für die Zelllinie CGTH W-1, je länger sie unter  $\mu\text{g}$  kultiviert wurde (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieses sehr unterschiedlichen Verhaltens unter  $\mu\text{g}$  wurden die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse auf Proteine des Cytoskeletts durchsucht. Zum Teil signifikante Unterschiede fanden sich für die Proteine Vimentin, Tubulin und Aktin sowie für Aktin-regulierende Proteine.



**Abb. 34: Sphäroide der Zelllinien CGTH W-1 und FTC-133 nach drei Tagen unter  $\mu\text{g}$  [Pietsch, 2011, a]**

Bilder der Zelllinie CGTH W-1 sind in **A** und **B**, der Zelllinie FTC-133 in **C** und **D** gezeigt. Zellen kultiviert unter normaler Schwerkraft (1g) sind in den Bildern **A** und **C** dargestellt. Die unter Einfluss simulierter Schwerelosigkeit ( $\mu\text{g}$ ) nach drei Tagen gebildeten Sphäroide zeigen die Bilder **B** und **D**. Die Sphäroide der Zelllinie FTC-133 (**D**) wiesen Durchmesser von bis zu 1 mm auf, wohingegen die Sphäroide der Zelllinie CGTH W-1 (**B**) kleiner als 0,15 mm waren. Rechts oben in den Bildern ist ein Maßstab eingezeichnet.

## Vimentin

Vimentin ist ein Intermediär-Filament, das die mechanische Belastbarkeit einer Zelle beeinflusst und dessen Auf- und Abbau durch Phosphorylierung gesteuert wird [Deery, 1993; Chou, 1996]. Das Phosphorylierungsmuster von Vimentin ist vielseitig und spielt wahrscheinlich in der Regulierung weiterer Funktionen wie Zell-Zell-Kontakt, Signaltransduktion und Zellmigration eine Rolle [Ivaska, 2007].

Für die Kultivierung der Zelllinien CGTH W-1, FTC-133 und ML-1 zeigten sich verschiedene Einflüsse von  $\mu\text{g}$  auf die Proteinkonzentration. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung ließen für die Zelllinie CGTH W-1 eine Verringerung der Proteinmenge während der Kultivierung unter  $\mu\text{g}$  vermuten, die in einer Western Blot Analyse bestätigt werden konnte. Für die Zelllinie FTC-133 stieg die Konzentration laut Western Blot Analyse an. Das Ergebnis dieser Western Blot Analyse stimmte mit den Erwartungen aus der massenspektrometrischen Untersuchung nur zum Teil überein. Während die Mascot<sup>TM</sup> Scores einen Anstieg vermuten ließen, suggerierten die emPAI-Werte eine Verringerung. Eine signifikante Steigerung der Proteinmenge wies die Zelllinie ML-1 in der Western Blot Analyse nur im Drei-Tageversuch auf. Die massenspektrometrische Untersuchung lieferte kein aussagekräftiges Ergebnis.

Die massenspektrometrische Analyse für Vimentin (**Tab. 9**) lieferte die größten Mascot<sup>TM</sup> Scores beziehungsweise emPAI-Werte und deutete darauf hin, dass das Protein in der isoelektrischen Fokussierung nicht seinen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI rund 5,0) erreichte.

Die untersuchten Gelstücke fanden sich in FF-IEF-Fraktionen 33 und 35, die einem pH Bereich von 5,5 bis 5,9 entsprachen. Als Ursache kann die bewusst knapp kalkulierte Zeit zur isoelektrischen Fokussierung angesehen werden, die Präzipitation verhindern sollte [Weber, 1998].

Die bereits erwähnten untersuchten Gelstücke entsprachen ungefähr dem Molekulargewicht von Vimentin. Vimentin konnte allerdings auch in Gelstücken, die geringeren Molekulargewichten (ungefähr 14, 30 und 40 kDa) entsprachen, nachgewiesen werden. Spaltprodukte dieser Molekulargewichte können Hinweise auf Apoptose sein [Bolichenko, 2001]. Die Spaltung von Vimentin ist auf verschiedene Caspasen zurückzuführen, die die Aminosäuresequenz von Vimentin an ganz bestimmten Aminosäuren spaltet [Byun, 2001]. Eine Spaltung von Vimentin wird durch das „Heat Shock“ Protein HSP90 inhibiert [Zhang, 2006]. Für das Protein HSP90 fand sich für die Zelllinien CGTH W-1 und ML-1 nach der Kultivierung für einen als auch für drei Tage unter  $\mu\text{g}$  eine Verringerung und für die Zelllinie FTC-133 nach einem Tag keine Veränderung und nach drei Tagen ein Anstieg der Proteinkonzentration (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis könnte erklären, weshalb nur für die Zelllinie FTC-133 ein Anstieg der Vimentinmenge zu beiden untersuchten

Zeitpunkten unter  $\mu\text{g}$  zu finden war. Denkbar wäre auch, dass für diese Zelllinie und für die Zelllinie ML-1 Vimentin resistent gegen die Spaltung durch Caspasen ist. Eine resistente Vimentinmutation unterbindet teilweise die Einleitung des Apoptosemechanismus [Belichenko, 2001]. Die Ergebnisse für Vimentin in Verbindung mit HSP90 könnten die voneinander abweichenden Apoptoseraten (**Abb. 17**) zum Teil erklären. Für die Zelllinie ML-1, die nach drei Tagen unter  $\mu\text{g}$  Kultivierung die niedrigste Apoptoserate, eine unveränderte Vimentin- und eine verringerte HSP90 Konzentration aufwies, scheinen noch weitere Faktoren eine Rolle zu spielen. Diese sollten in weiteren Versuchen analysiert werden. Darüber hinaus wäre eine Analyse der Aminosäuresequenz von Vimentin für alle drei Zelllinien interessant, um eine möglicherweise durch die Zellmutation zu einem Karzinom bedingte Vimentinmutation nachzuweisen.

### Tubulin

Mikrotubuli organisieren das Cytoplasma und bestimmen die Position von Zellkern und Zellorganellen. Sie sind physikalisch robuste Polymere mit einem für sie charakteristischen Widerstand gegen Verformung und Druck [Desai, 1997]. Die zwei Isoformen des Tubulins und somit die beiden Bausteine der Mikrotubuli,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, bilden Dimere. Die Bildung der Mikrotubuli aus diesen Heterodimeren unterliegt einem geregelten Auf- und Abbau [Howard, 2003; Karp, 2005; Avila, 1990]. In Übereinstimmung mit dieser Eigenschaft fanden sich beide Isoformen für die Zelllinie CGTH W-1 sowohl in den Cytosol- als auch in den Pellet-Lysaten der Proben für die massenspektrometrische Untersuchung entsprechend ihres Molekulargewichts. Für die anderen drei Zelllinien waren die Isoformen des Tubulins in den Cytosol-Lysaten nicht nachzuweisen. Die beiden mit positivem Ergebnis untersuchten Proteinbanden der Zelllinie CGTH W-1 lagen bei 50 kDa in der FF-IEF-Fraktion 35. Die in den Fraktionen 33 und 37 untersuchten Proteinbanden für die anderen drei Zelllinien hingegen wiesen ein Molekulargewicht von ungefähr 45 kDa auf. Dies könnte erklären, weshalb Tubulin nicht identifiziert wurde. Allerdings fanden sich in den untersuchten Proteinbanden 124 und 125 in der FF-IEF-Fraktion 35 des Sieben-Tageversuches der Zelllinie ML-1, die wie die Banden 59 und 60 der Zelllinie CGTH W-1 bei rund 50 kDa lagen, kein Tubulin.

In den Pellet-Lysaten konnten für alle Zelllinien Isoformen von sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Tubulin nachgewiesen werden. Interessanterweise waren die Mascot™ Scores beziehungsweise die emPAI-Werte der  $\beta$ -Tubulin-Isoform  $\beta$  chain zwei bis viermal höher als die der  $\alpha$ -Tubulin-Isoform  $\alpha$ -1B chain. Derzeit sind sieben verschiedene Isoformen von  $\alpha$ -Tubulin ( $\alpha$ -1A,  $\alpha$ -1B,  $\alpha$ -1C,  $\alpha$ -3C/D,  $\alpha$ -3E,  $\alpha$ -4A,  $\alpha$ -8) und zehn von  $\beta$ -Tubulin ( $\beta$ ,  $\beta$ -1,  $\beta$ -2A,  $\beta$ -2B,  $\beta$ -2C,  $\beta$ -3,  $\beta$ -4,  $\beta$ -6,  $\beta$ -8,  $\beta$ -8 chain B) bekannt [UniProt]. Daher wäre es für zukünftige Versuche sehr aufschlussreich genauer zu untersuchen,

welche der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Isoformen an der Bildung der Tubulin-Heterodimere für die untersuchten Schilddrüsenzellen im Einzelnen beteiligt sind. Es könnte durchaus sein, dass sich infolge der Krebsentstehung die Verhältnisse dieser beiden Isoformen zueinander verändern oder sogar für eine bestimmte Metastasierung spezifisch sind.

Für die  $\alpha$ -Tubulin-Isoform  $\alpha$ -1B chain im Cytosol-Lysat der Zelllinie CGTH W-1 war der Mascot™ Score unter 1g mehr als fünfmal höher als im Pellet-Lysat (**Tab. 10**), aber unter  $\mu$ g nur etwa viermal höher. Das könnte darauf hindeuten, dass für die Zelllinie CGTH W-1 aufgrund einer Mutation im Tubulinmolekül die Selbstorganisation der Mikrotubuli erschwert und unter  $\mu$ g diese Fehlfunktion teilweise aufgehoben wird. Eine Mutation in den Tubulin-Isoformen, die für die Zelllinie CGTH W-1 charakteristisch sein könnte, würde auch erklären, weshalb für diese Zelllinie aber nicht für die Zelllinie ML-1 Tubulin in den oben genannten Proteinbanden nachgewiesen wurde.

Für Leberkrebszellen einer Ratte konnte gezeigt werden, dass als Folge der Krebsentstehung posttranslationale Veränderungen in  $\beta$ -Tubulin auftreten [Miller, 2008]. Darüber hinaus sind Mutationen des  $\beta$ -Tubulin in Hamsterzellen bekannt, aus denen keine tubulären Strukturen gebildet werden können [Boggs, 1987]. Für eine molekulare Veränderung sowohl im  $\alpha$ - als auch im  $\beta$ -Tubulinmolekül sprechen die scheinbar veränderten isoelektrischen Punkte beider Isoformen (siehe **Tab. 17**, Vergleich isoelektrischer Punkt und FF-IEF-Fraktion für Tubulin). Zur Klärung dieser Vermutung sollten die Isoformen des Proteins Tubulin näher in ihrer Aminosäuresequenz und Struktur untersucht werden.

Wie bereits erwähnt, bilden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Isoformen Heterodimere im Verhältnis 1:1. Ungebundene Monomere werden einerseits autoregulatorisch abgebaut und wirken andererseits regulatorisch. So wird beispielsweise die Konzentration der mRNA von  $\alpha$ -Tubulin reduziert und das Protein nicht weiter translatiert, liegt viel  $\alpha$ -Tubulin im Cytosol ungebunden vor [Theodorakis, 1992; Gonzalez-Garay, 1996]. Kumei *et al.* beobachteten für nach vier und fünf Tagen im Weltraum fixierte Osteoblasten von Ratten, dass die mRNA-Konzentration unter anderem für  $\alpha$ -Tubulin nach vier Tagen um 30% und nach fünf Tagen um 50% reduziert war [Kumei, 2006]. Kumei *et al.* verwendeten einen Primer, der an die drei  $\alpha$ -Tubulin-Isoformen  $\alpha$ -1A,  $\alpha$ -1B und  $\alpha$ -1C bindet. Im Zusammenhang mit der oben beschriebenen Autoregulation wäre diese Beobachtung eine mögliche Ursache, weshalb in der Western Blot Analyse für die Zelllinie CGTH W-1 nach einem und drei Tagen nach einem Tag die Proteinkonzentration von  $\beta$ -Tubulin unter  $\mu$ g reduziert war (**Abb. 31B**). Das spricht dafür, dass das Tubulin-Gerüst infolge von  $\mu$ g in seiner Integrität destabilisiert wird und teilweise zerfällt. Allerdings fand sich für die Zelllinien FTC-133 und ML-1 nach einem Tag und für die Zelllinie FTC-133 auch nach drei Tagen unter  $\mu$ g eine deutliche Erhöhung für  $\beta$ -Tubulin. Es ist bekannt, dass das Tubulin-Gerüst nach ungefähr einem Tag unter reduzierter Gravitation nach anfänglichem Zerfall von Zellen wieder

aufgebaut werden kann [Meloni, 2006]. Diese Reorganisation kann in ihrer Dauer je nach Zelllinie verschieden sein. Es ist daher vorstellbar, dass die untersuchten Schilddrüsentumorzelllinien teilweise länger brauchen, um das Tubulin-Gerüst wieder aufzubauen. Anhand der Western Blot Analyse würde man mit dieser Hypothese für die Zelllinie FTC-133 die schnellste Reorganisation finden und für die Zelllinie CGTH W-1 die langsamste. Eine weitere Beobachtung im Zusammenhang mit dem Zerfall und der Reorganisation des Tubulin-Gerüsts war, dass die Reorganisation anscheinend in  $\mu\text{g}$  nicht korrekt verläuft. Es konnte beobachtet werden, dass humane Monocyten nach der Reorganisation nicht weiter proliferierten [Meloni, 2006]. In **Abbildung 34** ist deutlich zu sehen, dass für die Zelllinie CGTH W-1 nach drei Tagen unter  $\mu\text{g}$  weniger adhärenzte Zellen und kleinere Sphäroide vorhanden waren als für die Zelllinie FTC-133. Das könnte möglicherweise ein Hinweis auf eine nur eingeschränkte Proliferation unter  $\mu\text{g}$  aufgrund eines nicht einwandfrei funktionsfähigen Tubulin-Gerüsts sein. Diese Überlegung könnte zum Teil auch die signifikante Erniedrigung der Proteinkonzentration nach drei Tagen unter  $\mu\text{g}$  für die Zelllinie CGTH W-1 und ML-1 erklären (**Abb. 31B**). Vielleicht sogar den Ausmaß der Erniedrigung, der für die Zelllinie deutlich stärker ausfiel als für die Zelllinie ML-1.

Für weiterführende Versuche unter  $\mu\text{g}$ , um den Einfluss von  $\mu\text{g}$  auf das Tubulin-Gerüst genauer beschreiben zu können, wäre auch hier ein Profil der beiden Tubulin-Isoformen interessant. Vielleicht exprimiert eine Zelle, um dem Verlust des Tubulin-Gerüsts zu vermeiden, vermehrt andere Isoformen als die, für die Kumei *et al.* eine Erniedrigung unter  $\mu\text{g}$  beschrieben haben. Das ist insbesondere im Hinblick auf die Mascot™ Scores für die  $\alpha$ -Tubulin-Isoform  $\alpha$ -1B in Proben der Zelllinien CGTH W-1 und ML-1 von Bedeutung. Für diese beiden Zelllinien stiegen unter  $\mu\text{g}$  die Mascot™ Scores, entgegen der nach Kumei *et al.* zu erwartenden Erniedrigung (**Tab. 10**).

### **Aktin**

Das Tubulin-Gerüst ist über Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) mit dem Aktin-Gerüst einer Zelle verbunden, wobei die Bindung der MAPs an die Tubuli stärker ist als an die Aktin-Filamente [Pollard, 1984]. Ein interessanter Zusammenhang zwischen Aktin- und Tubulin-Gerüst zeigte sich, als in murinen Fibroblasten nach Zerstörung des Tubulin-Gerüsts mit Medikamenten sehr schnell Stressfasern gebildet wurden [Enomoto, 1996]. Stressfasern bestehen aus kontraktilen Aktin-Myosin-Filamenten [Hall, 1998], weshalb die Untersuchung von Aktin im Zusammenhang mit Myosin-9 anzuraten ist. Myosin-9, auch als non-muscle Myosin-IIA bezeichnet, kolokalisiert zusammen mit Aktin in peripheren Stressfasern [Bresnick, 1999].

Die Western Blot Analyse auf Tubulin in der Zelllinie CGTH W-1 zeigte eine deutliche Minderung an Protein im Drei-Tageversuch unter  $\mu\text{g}$ . Um diesem Verlust der Zellintegrität entgegen zu wirken, wäre unter Berücksichtigung der Beobachtung von

Enomoto zu erwarten, dass für diese Zelllinie die Aktin-Konzentration ansteigt. Dies konnte nicht beobachtet werden. Die Proteinmenge von Aktin stieg nur gering, jedoch nicht signifikant (**Abb. 31C**). Besonders deutlich war der Verlust an Proteinmenge im Ein-Tageversuch. Der scheinbar beobachtete Verlust der Integrität von sowohl des Tubulin- als auch des Aktin-Gerüsts der Zelllinie CGTH W-1 unter  $\mu\text{g}$  könnte auf die bereits erwähnte, eingeschränkte Proliferationsfähigkeit hindeuten. Ein weiterer Hinweis auf die schlechte Proliferation war auch das Ergebnis der Annexin V-FITC/PI-Messung (**Abb. 17C**). Im Gegensatz zu den Zelllinien FTC-133 (**Abb. 17D**) und ML-1 (**Abb. 17E**) zeigte die Zelllinie CGTH W-1 bereits nach einem Tag unter  $\mu\text{g}$  eine Apoptoserate von mehr als 40 %.

Für die Zelllinie FTC-133 betrug der Anteil an apoptotischen Zellen nach einem Tag unter  $\mu\text{g}$  rund 20 % und stieg gleichfalls nach drei Tagen weiter an. Dafür könnte dieselbe Erklärung wie für die Zelllinie CGTH W-1 in Bezug auf die Integrität des Aktin-Gerüsts in Frage kommen. Die Menge an Aktin im Gesamtlisat lag zu beiden untersuchten Zeitpunkten in der  $\mu\text{g}$ -Probe signifikant oberhalb der 1g-Probe (**Abb. 31C**). Eine wahrscheinlichere Ursache für den Apoptoseanstieg und die steigende Aktinmenge könnte allerdings auch in der Bildung der großen Sphäroide unter  $\mu\text{g}$  liegen. Aufgrund der großen Durchmesser ist es denkbar, dass die Zellen im Inneren der Sphäroide nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden und daher die Zellen absterben. Zur Bildung der Sphäroide lösen sich die Zellen vom Zellkulturflaschenboden. Dadurch geht die charakteristische Morphologie der Zelle verloren und sie runden sich ab, weshalb vielleicht deswegen mehr Aktinmoleküle für die Zellintegrität benötigt und neue Moleküle abgebaut werden. Der über die Zeit zu beobachtende weitere Anstieg der Proteinkonzentration würde somit die kontinuierlich wachsende Anzahl an abgelösten und sich zu großen Sphäroiden zusammenlagernden Zellen widerspiegeln.

Die Sphäroide der Zelllinie ML-1 waren in ihrem Durchmesser kleiner als die der Zelllinie FTC-133. Außerdem lag die Apoptoserate für die Zelllinie ML-1 nach drei Tagen unter  $\mu\text{g}$  deutlich niedriger als für die Zelllinie FTC-133. Daher kann man annehmen, dass die Proliferation der Zelllinie ML-1 nicht beeinträchtigt war. Die geringere Aktinmenge ließe sich durch die Art der gebildeten Sphäroide begründen (**Abb. 31C**). Die gesteigerte Proteinmenge im Ein-Tageversuch für die Zelllinie ML-1 würde somit andeuten, dass die Zellen versuchen durch ein stärkeres Aktin-Gerüst den Kontakt mit der Oberfläche der Zellkulturflaschen zu halten. Infolge der andauernden simulierten Schwerelosigkeit geht der Kontakt jedoch verloren und die Zellen lösen sich ab. Sind aber wie es schein nicht in dem Ausmaß fähig große Sphäroide zu bilden, wie die Zelllinie FTC-133. Das Ergebnis des Drei-Tageversuches könnte in dem beschriebenen Modell mit den Ergebnissen des Ein-Tageversuches der Zelllinie CGTH W-1 verglichen werden.

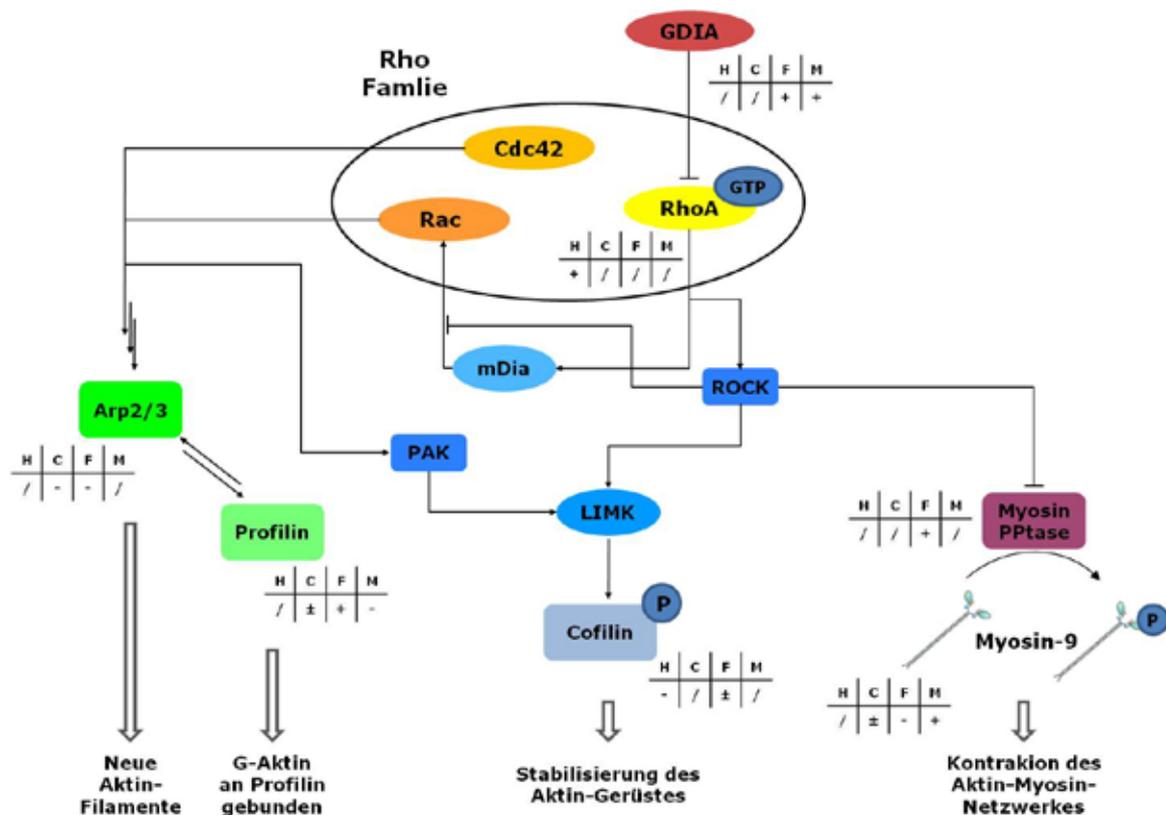
Die Bildung der Sphäroide erfolgte für die drei Zelllinien CGTH W-1, FTC-133 und ML-1 zu unterschiedlichen Zeiten. Bereits nach einem Tag unter  $\mu\text{g}$  hatten sich viele Zellen der Zelllinie FTC-133 vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und begannen kleinere Zellgruppen schwebend im Medium zu bilden. Ebenfalls nach einem Tag unter  $\mu\text{g}$  lösten sich Zellen der Zelllinie CGTH W-1, wobei die Zellen sich nur vereinzelt zu kleineren Gruppen zusammenschlossen. Erst ab dem zweiten Tag unter  $\mu\text{g}$  zeigten sich für die Zelllinie ML-1 die ersten Sphäroide. Die Anhaftung an die Zellkulturflasche kann als eine Kraft oder ein Widerstand aufgefasst werden, die auf die Zelle wirkt. Infolge der Auswirkung einer Kraft auf eine Zelle, wird die Rho-Signalkaskade aktiviert, woraufhin die Expression von Aktin gesteigert wird [Zhao, 2007]. Der Wegfall einer solchen Kraft könnte zu einer verminderten Signalaktivität führen. In der Tat konnte in humanen mesenchymalen Stammzellen eine verminderte RhoA Aktivität unter simulierter Schwerelosigkeit nachgewiesen werden [Meyers, 2005]. Diese verminderte Aktivität könnte der Grund dafür sein, dass die Zellen sich von der Kulturflasche lösen. Eine vergleichbare Beobachtung machten Higashibata *et al.* in aus Blutgefäßen eines Rinderhirns isolierten Endothelzellen. Neben der verminderten Aktivität von RhoA konnten sie jedoch auch zeigen, dass die Gesamtmenge von RhoA stieg [Higashibata, 2006].

RhoA zählt zu den GTPasen der Ras Superfamilie. Die Rho (Ras homologous) Unterfamilie von kleinen G-Proteinen besteht aus 20 Proteinen, von denen RhoA, Rac und Cdc42 am besten untersucht sind [Wennerberg, 2005]. Sie regulieren die Organisation und Dynamik des Aktin-Gerüsts [Hall, 2000]. Eine Übersicht der Signalkaskade der Rho Familie mit ausgewählten Effektorproteinen gibt **Abbildung 35**. Inaktives RhoA ist an ein GDP-Molekül, aktives an ein GTP-Molekül gebunden. Dies gilt auch für Rac und Cdc42. GDP kann durch GTP nur ersetzt werden, wenn nicht der Rho GDP-Dissoziationsinhibitor (Rho GDP dissociation inhibitor, GDIA) an RhoA-GDP gebunden ist. Liegt RhoA-GDP frei vor, initiieren GTP-Austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factor, GEF) den Austausch von GDP durch GTP und aktivieren so RhoA [Raftopoulou, 2004; Huveneers, 2009]. RhoA seinerseits aktiviert verschiedene Effektorproteine, darunter die Rho-assoziierte Proteinkinase (Rho-associated, coiled-coil forming kinase oder Rho kinase, ROCK) und mDia (mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*) [Raftopoulou, 2004; Watanabe, 2004; Govek, 2006; Huveneers, 2009; Olson, 2010].

ROCK ist in der Lage die Myosin Phosphatase (Myosin PPTase) zu phosphorylieren und dadurch zu inaktivieren. Nur die unphosphorylierte Myosin PPTase ist in der Lage, die regulatorischen leichten Ketten des Myosin-9 zu phosphorylieren und so eine Kontraktion im Aktin-Myosin-Netzwerk zu bewirken. Infolge dieser Kontraktion können sich Zellen vorwärts bewegen. Sind die regulatorischen leichten Ketten

unphosphoryliert, erfolgt eine Relaxation und somit ein Stillstand des Netzwerks [van Aelst, 1997; Somlyo, 2000; Fan, 2007].

Ein weiterer Effektor von ROCK ist die LIM Kinase (LIMK), die Cofilin phosphoryliert. Cofilin trägt mit seiner Eigenschaft Aktin binden zu können dazu bei, Aktin-Filamente abzubauen. Die Bindung von Cofilin an Aktin kann nur erfolgen, wenn Cofilin nicht phosphoryliert ist, weshalb die Phosphorylierung durch LIMK zur Stabilisierung des Aktin-Gerüsts beiträgt [Small, 2002; Raftopoulou, 2004; Meyers, 2005; Oser, 2009]. Außer durch RhoA-ROCK kann LIMK auch von Rac und Cdc42 über die p21-aktivierte Kinasen Familie (p21-activated kinase family, PAK) aktiviert werden, wodurch die drei G-Proteine RhoA, Rac und Cdc42 der Rho Familie zur Stabilisierung des Aktin-Gerüsts beitragen [Small, 2002; Raftopoulou, 2004].



**Abb. 35: Signalkaskade der Rho Familie**

Die G-Proteine RhoA, Rac und Cdc42 initiieren nach Aktivierung verschiedene Effektorproteine. RhoA-GTP, die aktive Form von RhoA die durch GDI inhibiert wird, aktiviert die Proteine ROCK und mDia. ROCK wiederum phosphoryliert die Myosin PPTase, wodurch eine Kontraktion des Aktin-Myosin-Gerüsts unterbunden wird. Ebenfalls inhibierend wirkt ROCK auf die Aktivierung von Rac durch mDia. Rac und Cdc42 leiten die Bildung von neuen Aktin-Filamenten mittels Arp2/3 ein. Zum Aufbau der neuen Filamente werden Aktin-Monomere unter anderem von Profilin zum sich neu bildenden Ende des Filaments transportiert. LIMK wird sowohl von Rac als auch von Cdc42 über PAK als auch von ROCK aktiviert. LIMK phosphoryliert Cofilin, was die Bindung von Cofilin an Aktin-Monomere verhindert und so eine Depolymerisation des Aktin-Gerüsts erschwert.

Linien mit Pfeilspitzen deuten eine Aktivierung an, mit einem waagerechten Strich am Ende eine Inhibierung. In dunkelblauen Kreisen ist angedeutet, ob

ein Protein phosphoryliert ist (GTP oder P). In welchen Zelllinien diese Proteine in der massenspektrometrischen Analyse gefunden wurden und ob unter  $\mu\text{g}$  eine Erhöhung (+), Erniedrigung (-) oder keine Veränderung ( $\pm$ ) zu beobachten war, geben die Tabellen neben einigen Proteinen wieder. ./' bedeutet Proteine nicht gefunden. Abkürzungen für die Zelllinien: H: HTU-5, C: CGTH W-1, F: FTC-133, M: ML-1.

Ein zweites Effektorprotein von RhoA, mDia, ist in der Lage Rac zu aktivieren [Raftopoulou, 2004; Huveneers, 2009]. Diese Aktivierung wird von ROCK inhibiert [Narumiya, 2009]. Sowohl Rac als auch Cdc42 aktivieren über verschiedene weitere Signalmoleküle den Aktin-verwandten 2/3 Komplex (actin-related 2/3 complex, Arp2/3) [Small, 2002; Olson, 2010]. Arp2/3 setzt sich aus sieben Untereinheiten zusammen. Er beschleunigt die Bildung von neuen Aktin-Filamenten und vernetzt einzelne Filamente miteinander [Machesky, 1999; Pollard, 2003]. Darüber hinaus ist auch eine Interaktion von Arp2/3 mit Profilin bekannt. An Profilin gebundene Aktin-Monomere (G-Aktin) werden an das schnell wachsende Ende eines sich bildenden Aktin-Filaments transportiert und damit ein schnelles Wachstum begünstigt. Ist jedoch die Konzentration von Profilin zu hoch, kann die Bindung zu G-Aktin auch hinderlich für die Neubildung von Aktin-Filamenten sein [Schlüter, 1997; Machesky, 1999; Pollard, 2003].

Ausgehend von den MS-Daten in Bezug auf GDIA, dass für zwei Zelllinien unter  $\mu\text{g}$  erhöht gewesen zu sein scheint, lässt sich vermuten, dass RhoA in seiner Aktivität vermindert ist. Somit kam es vermutlich zu einer verminderten Neubildung von Aktin-Filamenten und zeitgleich zu einer verstärkten Depolymerisation durch Cofilin. Dass die in den Tabellen der **Abbildung 35** gezeigten Veränderungen unter  $\mu\text{g}$  nicht den realen Gegebenheiten entsprechen müssen, zeigte sich für Myosin-9. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie ließen sich nur zum Teil bestätigen. Allerdings fügen sich die gefundenen Proteinkonzentrationen für Myosin-9 (**Abb. 31D**) recht gut in die mögliche Erklärung für die Bildung der Sphäroide ein. Für den Zusammenhalt der großen Sphäroide der Zelllinie FTC-133 ist ein bewegliches Aktin-Gerüst vorteilhaft und notwendig. Für diese Zelllinie ließ sich zu beiden Zeitpunkten eine gesteigerte Proteinkonzentration in der Western Blot Analyse zeigen. Dennoch wäre eine genauere Untersuchung der Signalkaskade von RhoA interessant. Vielleicht ließe sich ein detaillierterer Ablauf der Sphäroidbildung finden, der die unterschiedlichen Beobachtungen für die drei Zelllinien erklären könnte.

Darüber hinaus wäre eine weitergehende Untersuchung von Myosin-9 ratsam. Wie bereits erwähnt, ließen sich die Erwartungen der Massenspektrometrie nur zum Teil bestätigen. Darüber hinaus fanden sich für die schwere Kette des Myosin-9 viele Spaltprodukte (**Abb. 25**). Myosin-9 setzt sich aus drei Paaren von Peptiden zusammen: den schweren Ketten (heavy chain, MW ungefähr 230 kDa), den regulatorischen leichten Ketten (regulatory light chain, RLC, MW etwa 20 kDa) und den essenziellen

leichten Ketten (essential light chain, ELC, MW etwa 17 kDa) [Bresnick, 1999; Vicente-Manzanares, 2009]. Sollten die schweren Ketten nicht, wie sich vermuten ließe, während der Vorbereitung der Proteinlysate für die Massenspektrometrie gespalten worden sein, käme als mögliche andere Ursache der Spaltprodukte der Einfluss von  $\mu\text{g}$  in Betracht. Es wäre denkbar, dass die Zelle in  $\mu\text{g}$  mechanische Kräfte erfährt, unter deren Spannung die schwere Kette des Myosin-9 zerbricht. Ein Hinweis darauf könnte sein, dass viele kleine Bruchstücke im N-Terminus abgespalten wurden, der Bereich, der mit den RLCs und ELCs eine Bindung zu den Aktin-Filamenten herstellt. Eine mögliche Antwort auf die Frage nach Bruchstücken könnte beispielsweise eine Immunfluoreszenz-Färbung geben, für die Antikörper verwendet werden sollten, die nur an mögliche Bruchstücke binden. Unter Verwendung von verschiedenfarbige Fluorochromen könnte eine Aussage getroffen werden, ob die vermeintlichen Bruchstücke dicht beieinander oder räumlich im Cytosol getrennt vorliegen. Eine räumliche Trennung würde für eine Spaltung sprechen.

Die Untersuchung der verschiedenen Cytoskelettproteine hat viele Unterschiede zwischen den drei Zelllinien für ihre Adaptierungsfähigkeit auf  $\mu\text{g}$  aufgezeigt. Um diese Unterschiede genau verstehen und erklären zu können, sollten vor allem im Hinblick auf die Signalübertragung weitere Untersuchungen gemacht werden.

---

## Zusammenfassung

---

Mit dem Beginn der Raumfahrt in den 1960er Jahren und der Erkundung des Weltraumes, nicht zu Letzt der Konstruktion der ISS und den Plänen für eine bemannte Mission zum Mars, begegnete der Mensch ungewohnten physikalischen Bedingungen wie der Schwerelosigkeit. Der Wegfall der Erdanziehung hat auf viele Funktionen des Körpers, wie zum Beispiel auf die Muskeln und Knochen, negative Auswirkungen. Auch auf zellulärer Ebene wurden bei Versuchen zum Beispiel an Bord des Space Shuttles zahlreiche Veränderungen auf die Regulation von Proteinen und Genen beobachtet.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob und welche Proteine in Zellen nach Einwirkung simulierter Schwerelosigkeit verändert waren. Untersucht wurden Zellen der Schilddrüse (HTU-5), eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms (ML-1), einer Metastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms im Brustbein (CGTH W-1) und einer Metastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms in einem Lymphknoten (FTC-133). Die Zellen wurden über die Dauer unterschiedlicher Zeiträume auf einer Random Positioning Machine (RPM) unter simulierter Schwerelosigkeit kultiviert und die gewonnenen Zellproben mit einer massenspektrometrischen Untersuchung untersucht. Für diese Untersuchung wurden die Proteine erst entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte (FF-IEF) und anschließend entsprechend ihrer Molekulargewichte (SDS-PAGE) voneinander getrennt. Nach Färbung der Gele wurden ausgewählte Proteinbanden massenspektrometrisch untersucht.

Ein Vergleich mit der Literatur ergab, dass von 235 identifizierten Proteinen 37 erstmalig für die Schilddrüse beschrieben wurden. Der Vergleich der Mascot™ Scores/emPAI-Werte einiger Proteine unterschied sich für die  $\mu\text{g}$  Proben zum Teil deutlich von den 1g Proben. Zur Überprüfung der Aussagekraft dieser Unterschiede wurden für einige Proteine Western Blot Analysen durchgeführt, die die Unterschiede der Massenspektrometrie nur teilweise bestätigen konnten. Jedoch lieferten diese Proteine zusammen Hinweise darauf, dass die Apoptoserate unter  $\mu\text{g}$  begünstigt ist oder die für Krebszellen typische Inhibierung der Apoptose geschwächt wird. Enzyme der Glycolyse und Proteine des Cytoskeletts wurden in weiteren Western Blot Analysen für die verschiedenen Zeiträume näher untersucht. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Herkunft der untersuchten Zelllinien einen entscheidenden Einfluss darauf hat, wie die Zellen auf Schwerelosigkeit reagieren und sich anpassen, um zu überleben. Bei den untersuchten Zellen der Schilddrüse zeigte die Zelllinie ML-1 die beste Adaptierung an die Schwerelosigkeit, Zellen der Zelllinie CGTH W-1 die schlechteste. Für die Zelllinie FTC-133 fanden sich Hinweise darauf, dass karzinogene Eigenschaften reduziert werden und die Zellen möglicherweise einen gesunderen Metabolismus aufweisen. Diese Unterschiede im Detail genau zu klären sind Aufgaben

zukünftiger Versuche. Zum einen sollte die Regulation des Auf- und Abbau und der Bewegung des Cytoskletts im Hinblick auf daran beteiligte Signalkaskaden genauer untersucht werden. Darüber hinaus sollte der Metabolismus der verschiedenen Schilddrüsentumorzelllinien eingehender untersucht werden. Die Verwendung von Zwischenprodukten der Glycolyse zum Aufbau von Molekülen, die für die Bildung neuer Strukturen in der Zelle benötigt werden, könnte Hinweise darauf geben, wie Zellen auf  $\mu\text{g}$  reagieren.

---

## Summary

---

Since 1960, Juri Gagarin and later 1968 Mankind started to explore the universe with the first mission to the moon. Since then, missions to Space became more frequent with the construction of the ISS. The experience of these missions will probably be of great benefit for the planned manned mission to the Mars. During a stay in the outer Space, every organism coming from Earth faces uncommon physical conditions like weightlessness. Developed under the gravitational force of the Earth these organisms have to cope with effects like loss of bone and muscle mass. Furthermore, the effects of weightlessness are not only recognizable on a macroscopic scale but also on the molecular level. Cell culture experiments during Space Shuttle flights revealed that there are many differences in gene and protein expression.

The question of this thesis was whether the expression of proteins and of which ones changed in cells exposed to simulated weightlessness. Examined were healthy thyroid cells (HTU-5), cells of a follicular thyroid carcinoma (ML-1), cells of a follicular thyroid carcinoma metastasing to the sternum (CGTH W-1), and cells of a follicular thyroid carcinoma metastasing to a mediastinal lymph node (FTC-133). The cells were cultivated either under normal gravity (1g) or on a Random Positioning Machine (RPM) under simulated weightlessness ( $\mu\text{g}$ ) for varying periods of time. Cell samples were used to extract lysates which were first subjected to free-flow isoelectric focusing and then to a gelelectrophoretic separation with SDS-PAGE. Selected protein bands were prepared for mass spectrometry and analysed.

A comparison with the literature revealed 37 proteins so far unknown for the thyroid. The direct comparison of the mass spectrometry results of the 1g with the  $\mu\text{g}$  samples indicated differences to some extent for several proteins. For some of these proteins, western blot analyses verified only partly the reliance of the mass spectrometry results. However, taken together the results provided evidence that under  $\mu\text{g}$  apoptosis increases or that the for cancer cells typical inhibition of apoptosis is neutralized. Furthermore, enzymes of the glycolysis and cytoskeletal proteins examined indicated that the behavior of cells might depend essentially on their origin. For the mentioned thyroid cell lines, the cell line ML-1 appeared to possess the best ability to adapt to  $\mu\text{g}$ , whereas the cell line CGTH W-1 the worst. For the cell line FTC-133, there were hints that the cells possibly regain a healthy metabolism. To elucidate these differences in more detail will be a challenge for future investigations. Experiments should address the regulation of the formation and of the movement of the cytoskeleton especially in regard of the signaling cascades involved. Furthermore, the products of the metabolism of the different thyroid cell lines could give a hint how these cells adapt to  $\mu\text{g}$  and what kind of molecules are required for this.

---

## Anhang

---

### 8.1) Abkürzungen

AA	Acrylamid
ACN	Acetonitril
ACO2	Aconitate hydratase
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ALD	Fructose-bisphosphate Aldolase
AO	Acridine Orange
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	apoptosis protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	actin-regulated 2/3 complex
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BD	Becton Dickinson
CS	Citrate synthase
CytoC	Cytochrom C
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DISC	death-inducing signaling complex
DTT	1,4-Dithiothreit
ECL	essential light chain (Myosin-9)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electrospray ionization
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting, geschützte Handelsmarke von Becton Dickinson für ein Durchflusszytometer
FADD	FAS-associated death domain
FFE	Free flow electrophoresis
FF-IEF	Free flow- isoelectric focusing
FH	Fumarate hydratase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

FSC	forward scatter
GAG	Glykosaminglykan
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDIA	Rho GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GPI	Glucosephosphate isomerase
gr.	Griechisch
GS	Gelstück
GSH	Glutathione
GST	Glutathione Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H/E-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
HK	Hexokinase
HPAA	hypothalamic-pituitary axis
HPGA	hypothalamic-pituitary fanadal axis
HPTA	hypothalamic-pituitary thyroid axis
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSP	Heatschockprotein, Heat shock protein
IDH	Isocitrate dehydrogenase
ISS	Internationale Raumstation (International Space Station)
JNK1	c-Jun N-terminale Kinase 1
KAc	Kaliumacetat
lat.	lateinisch
LC	liquid chromatography
LDH	Lactate dehydrogenase
LIMK	LIM kinase
LT	Lower Tris
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
mDia	mammalian homolog of Drosophila diaphanous
MDH	Malate dehydrogenase
µg	Mikrogravitation
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
Myosin PPTase	Myosin phosphatase
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

---

NGF	nerve growth factor
o.a.	ohne alles
OGDH	2-oxoglutarate dehydrogenase
PAK	p21-activated kinase family
PCR	Polymerase chain reaction
PEP	Pepstatin
PDH	Pyruvate dehydrogenase
PFK	Phosphofructo kinase
PGK1/2	Phosphoglycerate kinase
PGM	Phosphoglycerate mutase
pI	isoelektrischer Punkt
PI	protease inhibitor
PI	Propidium Iodid
PKM2	Pyruvate kinase isoenzyme M1/M2
PMF	peptide mass fingerprint
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PS	Phosphatidylserin
P/S	Penicillin/Streptomycin
RCL	regulatory light chain (Myosin-9)
ROCK	Rho-associated, coiled-coil forming kinase
Rho	Ras homologous
RPM	Random Positioning Machine
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RWV	Rotating Wall Vessel
SDH	Succinate dehydrogenase
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
STH	Somatropin
SSC	side scatter
SUCLG	Succinyl-CoA ligase
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin, Tetraiodthyronin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TIM	Triosephosphate isomerase
TNF	tumor necrosis factor
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TRADD	TNF receptor-associated death domain
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TSH	Thyreotropin
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling
ÜN	über Nacht
UT	Upper Tris
WB	Western Blot
1d	Ein-Tageversuch
1g	Erdanziehungskraft

## 8.2) Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Hälfte eines normalen und eines atrophischen Sarcomers [nach: Fitts, 2000] .....	2
Abb. 2:	Lage und Form der Schilddrüse [nach: PB] .....	6
Abb. 3:	Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (Tetraiodthyroxin, T4) .....	7
Abb. 4:	Signaltransduktion der Apoptose [nach: Grimm, 2011].....	11
Abb. 5:	Free Fall Machine [aus: van Loon, 1998] .....	15
Abb. 6:	Rotating Wall Vessel [Hammond, 2001] .....	15
Abb. 7:	Desktop RPM der Firma Dutch EADS/Astrium, Leiden, NL [nach: Huijser, 2000] .....	26
Abb. 8:	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers [nach: BD] .....	29
Abb. 9:	BD™ Free Flow Elektrophorese (FFE) System [nach: BD] .....	32
Abb. 10:	Schematische Darstellung der Ionenerzeugung im ESI [nach: ESI] .....	34
Abb. 11:	Struktur des Bicinchoninsäurekomplexes (BCA) .....	37
Abb. 12:	Banden des Porteinmarkers Fermentas Page Ruler™ Plus Prestained [www.fermentas.de] .....	39
Abb. 13:	Reihenfolge der Materialien beim Tankblotting.....	40
Abb. 14:	Schematische Darstellung der Oxidation von Luminol .....	41
Abb. 15:	Schematische Darstellung der BCIP/NBT-Reaktion .....	41
Abb. 16:	Sauerstoffsättigung der Zelllinie ML-1.....	43
Abb. 17:	Annexin V-FITC/PI Messung .....	45
Abb. 18:	FF-IEF pH-Gradient [Pietsch, 2010].....	47
Abb. 19:	Silberfärbung der FF-IEF-Fraktionen der HTU-5 Zelllinie - Ein-Tageversuch ..	49
Abb. 20:	Silberfärbung der FF-IEF-Fraktionen der CGTH W-1 Zelllinie - Ein-Tageversuch .....	51
Abb. 21:	Silberfärbung der FF-IEF-Fraktionen der FTC-133 Zelllinie - Ein-Tageversuch .....	53
Abb. 22:	Silberfärbung der FF-IEF-Fraktionen der ML-1 Zelllinie - Ein-Tageversuch ....	55
Abb. 23:	Coomassie Blaufärbung von Cytosol-Fraktionen [Pietsch, 2010] .....	58
Abb. 24:	Coomassie Blaufärbung von Pellet-Fraktionen [Pietsch, 2010] .....	59

Abb. 25:	Verteilung von Spaltprodukten auf die Aminosäuresequenz von Myosin-9 [Pietsch, 2011, a] .....	75
Abb. 26:	Vergleich emPAI-Werte mit Densitometrie von Western Blot Analysen verschiedener Proteine der Zelllinie FTC-133 [Pietsch, 2010].....	78
Abb. 27:	Vergleich Mascot™ Score Werte mit Densitometrie von Western Blot Analysen verschiedener Proteine der Zelllinie ML-1 [Pietsch, 2011, b] .....	79
Abb. 28:	Vergleich Mascot™ Score und emPAI-Wert mit Densitometrie von Western Blot Analysen verschiedener Proteine der Zelllinien CGTH W-1, ML-1 und FTC-133 .....	80
Abb. 29:	Western Blot Analysen glycolytischer Enzyme in den Zelllinien CGTH W-1 (A) und FTC-133 (B) .....	82
Abb. 30:	Western Blot Analyse glycolytischer Enzyme in der Zelllinie ML-1.....	85
Abb. 31:	Western Blot Analysen für Proteine des Cytoskeletts [Pietsch, 2011,a] .....	88
Abb. 32:	Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung [Pietsch, 2011, b].....	89
Abb. 33:	Übersicht der Glycolyse und des Citratzyklusses .....	106
Abb. 34:	Sphäroide der Zelllinien CGTH W-1 und FTC-133 nach drei Tagen unter µg [Pietsch, 2011, a] .....	108
Abb. 35:	Signalkaskade der Rho Familie .....	115

### 8.3) Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Experimentplattformen für reale Schwerelosigkeit [Pietsch, 2011] .....	14
Tab. 2:	Zelllinien der Schilddrüse .....	17
Tab. 3:	Beispiele für Fluorochrome.....	30
Tab. 4:	Pipettierschema zur Bestimmung der Proteinkonzentration .....	38
Tab. 5:	Acrylamidkonzentration in Trenngelen .....	39
Tab. 6:	Liste der erstmals in der Schilddrüse gefundenen Proteine [Pietsch, 2010]...61	
Tab. 7:	MS Analyse vergleichender Gelstücke der Cytosol-Fraktionen [Pietsch, 2010].....	62
Tab. 8:	MS Analyse vergleichender Gelstücke der Pellet-Fraktionen.....	63
Tab. 9:	MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Vimentin [Pietsch, 2011, a] .65	
Tab. 10:	MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Tubulin (Isoformen) [Pietsch, 2011, a] .....	66
Tab. 11:	MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Aktin, zu Aktin-bindenden und Aktin-regulierenden Proteinen - HTU-5.....	68
Tab. 12:	MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Aktin, zu Aktin-bindenden und Aktin-regulierenden Proteinen - CGTH W-1 [Pietsch, 2011, a] .....	69
Tab. 13:	MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Aktin, zu Aktin-bindenden und Aktin-regulierenden Proteinen - FTC-133 [Pietsch, 2011, a] .....	70

Tab. 14:	MS Analyse Ergebnisse zum Cytoskelettprotein Aktin, zu Aktin-bindenden und Aktin-regulierenden Proteinen - ML-1 .....	71
Tab. 15:	Untersuchung der MS Ergebnisse mehrerer Gelstücke einer Pellet-Fraktion nach Spaltprodukten gefundener Proteine .....	73
Tab. 16:	Proteinauswahl für Western Blot Analyse .....	76
Tab. 17:	Isoelektrischer Punkt von Proteinen .....	91
Tab. 18:	Zusammenfassung der Western Blot Analyse von Enzymen der Glycolyse ..	104

---

**Literatur**

---

- Abbas** AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. (2003) Elsevier Science, USA
- Adams** G.R., Caiozzo V.J., Baldwin K.M. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol.* (2003), 95, 2185-2201
- Adler** V., Yin Z., Fuchs S.Y., Benezra M., Rosario L., Tew K.D., Pincus M.R., Sardana M., Henderson C.J., Wolf C.R., Davis R.J., Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* (1999), 18, 1321-1334
- Albrethsen** J., Knol J.C., Jimenez C.R. Unravelling the nuclear matrix proteome. *J Proteomics.* (2009), 72, 71-81
- Ali-Osman** F., Akande O., Antoun G., Mao J.-X., Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of Full-length cDNAs of three human Glutathione S-Transferase Pi gene variants. *J Biol Chem.* (1997) 272, 10004-10012
- Allen** C., Glasziou P., Del Mar C. Bed rest: a potentially harmful treatment needing more careful evaluation. *Lancet.* (1999), 354, 1229-1233
- Armstrong** R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the Glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* (1997) 10, 2-18
- Arya** R., Mallik M., Lakhota S.C. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci.* (2007) 32, 595-610
- Avila** J. Microtubule dynamics. *FASEB J.* (1990) 4, 3284-3290
- Badhwar** G.D., Atwell W., Badavi F.F., Yang T.C., Cleghorn T.F. Space radiation absorbed dose distribution in a human phantom. *Radiat Res.* (2002) 157, 76-91
- Baines** A.J. Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane function. *Biochem Soc Trans.* (2009) 37, 796-803
- Bauer** J., Weber G. Sodium chloride in preparative free-flow cell electrophoresis: recent developments. *Electrophoresis.* (1996) 17, 526-528
- Baum** Entscheidungsbaum Poster Die Auswahl statistischer Tests und Maße.  
<http://web.fu-berlin.de/biometrie/PDFs/Entscheidungsbaum%20Poster.pdf>
- BD** Scientific Note, [www.bd.com/proteomics/references](http://www.bd.com/proteomics/references)
- 1) Free Flow Electrophoresis: Novel High-Resolution Separation of Complex Protein and Peptide Mixtures
  - 2) Separation of Peptides Using Free-Flow Electrophoresis and a High Throughput Approach to Sample Clean-Up Prior to Mass Spectrometry
- Belichenko** I., Morishima N., Separovic D. Caspase-resistant vimentin suppresses apoptosis after photodynamic treatment with a silicon phthalocyanine in Jurkat cells. *Arch Biochem Biophys.* (2001) 390, 57-63
- Bier** M., Ostrem J., Marguez R.B. A new buffering system and its use in electrophoresis and isoelectric focusing. *Electrophoresis.* (1993) 14, 1011-1018

- Bird** P.I. Serpins and regulation of cell death. *Results Probl Cell Differ.* (1998) 24, 63-89
- Bleeker** M.W.P., De Groot P.C.E., Rongen, F.A., Rittweger, J., Felsenber, D., Smits, P., Hopman, M.T.E. Vascular adaptation to deconditioning and the effect of an exercise countermeasure: results of the Berlin bed rest study. *J Appl Physiol.* (2005) 99, 1293-1300
- Boggs** B., Cabral F. Mutations affecting assembly and stability of tubulin: evidence for a nonessential  $\beta$ -Tubulin in CHO cells. *Mol Cell Biol.* (1987) 7, 2700-2707
- Brands** J.H.G.M., Maassen J.A., Van Hemert F.J., Amons R., Möller W. The primary structure of the  $\alpha$  subunit of human elongation factor 1 - Structural aspects of guanine-nucleotide-binding sites. *Eur J Biochem.* (1986) 155, 167-171
- Bresnick** A.R. Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr Opin Cell Biol.* (1999) 11, 26-33
- Briegleb** W. 'Some qualitative and quantitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. *AGSB Bull.* (1992) 5, 23-30
- Bright** G.R., Fisher G.W., Rogowska J., Taylor D.L. Fluorescence ratio imaging microscopy: temporal and spatial measurements of cytoplasmic pH. *J Cell Biol.* (1987) 104, 1019-1033
- Buckey jr** J.C., Lane L.D., Levine B.D., Watenpaugh D.E., Wright S.J., Moore W.E., Gaffney A., Blomqvist C.G. Orthostatic intolerance after spaceflight. *J Appl Physiol.* (1996) 81, 7-18
- Burggraf** D., Weber G., Lottspeich F. Free flow-isoelectric focusing of human cellular lysates as sample preparation for protein analysis. *Electrophoresis.* (1995) 16, 1010-1015
- Byun** Y., Chen F., Chang R., Trivedi M., Green K.J., Cryns V.L. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* (2001) 8, 443-450
- Cañas** B., López-Ferrer D., Ramos-Fernández A., Camafeita E., Calvo E. 'Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic.* (2006) 4, 295-320
- Carmeliet** G., Bouillon R. The effect of microgravity on morphology and gene expression of osteoblasts *in vitro*. *FASEB J.* (1999) 13 Suppl., S129-S134
- Chevallet** M., Wagner E., Luche S., van Dorsselaer A., Leize-Wagner E., Rabilloud T. Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress. *J Biol Chem.* (2003) 278, 37146-37153
- Chou** Y.-H., Opal P., Quinlan R.A., Goldman R.D. The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells *J Cell Sci.* (1996) 109, 817-826
- Cogoli** A. The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. *J Leukoc Biol.* (1993) 54, 259-268
- Cravatt** B., Simon G.M., Yates J.R. 3<sup>rd</sup> The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature.* (2007) 450, 991-1000

- Crawford-Young** S.J. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *Int J Dev Biol.* (2006) 50, 183-191
- Cucinotta**,F.A.; Durante,M. *Lancet Oncol.* **2006**, 7 (5), 431-435, 'Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings'
- Cui** H., Shen J., Lu D., Zhang T., Zhang W., Sun D., Wang P.G. 4-Aryl-1,3,2-ocathiazolylum-5-olate: a novel GST inhibitor to release JNK and activate c-Jun for cancer therapy. *Cancer Chemother Pahrmacol.* (2008) 62, 509-515
- Curcio** F., Ambesi-Impiombato F.S., Perrella G., Coon H.G. Long-term culture and functional characterization of follicular cells from adult normal human thyroids *Proc Natl Acad Sci.* (1994) 91, 9004-9008
- Dang** C.V., Kim J.-W., Dao,P., Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer.* (2008) 8, 51-56
- Dang** C.V., Le A., Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities *Clin Cancer Res.* (2009) 15, 6479-6483
- Dedolph** R.R., Dipert M.H. The physical basis of gravity stimulus nullification by clinostat rotation. *Plant Physiol.* (1971) 47, 756-764
- Deery** W.J. Role of phosphorylation in keratin and vimentin filament integrity in cultured thyroid epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* (1993) 26, 325-339
- Denko** N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer.* (2008) 8, 705-713
- DLR** – Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt, *Schulinformation Raumfahrt – Raumfahrtmedizin* (2001)
- DLR1** <http://www.dlr.de/rd/desktopdefault.aspx/tabid-2282/>
- Donnelly** S.R., Moss S.W. Annexins in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci.* (1997) 53, 533-538
- DSMZ** 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH', Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, GERMANY, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)
- Eckstein**,P.P. *Angewandte Statistik mit SPSS – Praktische Einführung für Wirtschaftswissenschaftler* (2008), Betriebswirtschaftlicher Verlag Dr. Th. Gabler, GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, Germany
- Edmonds** B.T., Murray J., Condeelis J. pH regulation oft he F-actin binding properties of Dictyostelium elongation factor 1 $\alpha$ . *J Biol Chem.* (1995) 270, 15222-15230
- Enomoto** T. Microtuble disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesion in cultured cells: possible involvement of Rho signal cascade. *Cell Struct Funct.* (1996) 21, 317-326
- ESA** - <http://www.spaceflight.esa.int/users/index.cfm?act=default.page&level=11&page=385>
- ESI** [http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=ko\\_KR&cid=10073251](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=ko_KR&cid=10073251)
- Faller** A., Schünke M., Schünke G. *Der Körper des Menschen - Einführung in Bau und Funktion* (1999), George Thieme Verlag Stuttgart, Germany

- Fan Z.**, Beresford P.J., Oh D.Y., Zhand D., Liebermann J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. (2003) 112, 659-672
- Fan L.**, Sebe A., Péterfi Z., Masszi A., Thirone A.C.P., Rotstein O.D., Nakano H., McCulloch C.A., Szászi K., Mucsi I., Kapus A. Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the Rho-Rho kinase-phospho-myosin pathway. *Mol Biol Cell*. (2007) 18, 1083-1097
- Fenn J.B.**, Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. (1989) 246, 64-71
- Fitts R.H.**, Riley D.R., Widrick J.J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol*. (2000) 89, 823-839
- Fitts R.H.**, Riley D.R., Widrick J.J. J Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *Exp Biol*. (2001) 204, 3201-3208
- Fliers E.**, Alkemande A., Wiersinga W.M., Swaab D.F. Hypothalamic thyroid hormone feedback in health and disease. *Prog Brain Res*. (2006) 153, 198-207
- Fong K.** The limits of medicine – The next small step. *BMJ*. (2004) 329, 1441-1444
- Gardin A.K.**, Smerdon S.J., Yaffe M.B. *Serpin* Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Cancer Biol*. (2006) 16, 173-182
- Gerke V.** Creutz C.E., Moss S.E. Annexins: linking  $Ca^{2+}$  signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2005) 6, 449-461
- Giusti L.**, Iaconi P., Ciregia F., Giannaccini G., Donatini G.L., Basolo F., Miccoli P., Pinchera A., Lucacchini A. Fine-needle aspiration of thyroid nodule: Proteomic analysis to identify cancer biomarkers. *J Proteome Res*. (2008) 7, 4079-4088
- Glade N.**, Beaugnon E., Tabony J. Ground-based methods reproduce space-flight experiments and show that weak vibrations trigger microtubule self-organisation. *Biophys Chem*. (2006) 121, 1-6
- Gonzalez-Garay M.L.**, Cabral F.  $\alpha$ -Tubulin limits its own synthesis: evidence for a mechanism involving translational repression. *J Cell Biol*. (1996) 135, 1525-1534
- Goodwin T.J.**, Prewett T.L., Wolf D.A., Spaulding G.F. Reduced shear stress: a major component in the ability of mammalian tissues to form three-dimensional assemblies in simulated microgravity. *J Cell Biochem*. (1993) 51, 301-311
- Goretzki P.E.**, Frilling A., Simon D., Roeher H.D. Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res*. (1990) 118, 48-63
- Govek E.-E.**, Newey S.E., van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development *Genes Dev*. (2005) 19, 1-49
- Gridley D.S.**, Slater J.M., Luo-Owen X., Rizvi A., Chapes S.K., Stodieck L.S., Ferguson V.L., Pecaut M.J. Spaceflight effect T lymphocyte distribution, function and gene expression *J Appl Physiol*. (2009) 106, 194-202

- Grimm** D., Bauer J., Kossmehl P., Shakibaei M., Schönberger J., Pickenhahn H., Schulze-Tanzil G., Vetter R., Eilles C., Paul M., Cogoli A. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinomacells. *FASEB J.* (2002) 16, 604-606
- Grimm** D., Bauer J., Infanger M., Cogoli A. The use of the random positioning machine for the study of gravitational effects on signal transduction in mammalian cells. *Signal Transduction.* (2006) 6, 388-396
- Grimm** D., Wehland M., Pietsch J., Infanger M., Bauer J. Drugs interfering with apoptosis in breast cancer. *Curr Pharm Des.* (2011) 17, 272-283
- Gingras** A.R., Ziegler W.H., Bobkov A.A., Joyce M.G., Fasci D., Himmel M., Rothemund S., Ritter A., Grossmann J.G., Patel B., Bate N., Goult B.T., Emsley J., Barsukov I.L., Roberts G.C.K., Liddington R.C., Ginsberg M.H., Critchley D.R. Structural determinants of integrin binding to the talin rod. *J Biol Chem.* (2009) 284, 8866-8876
- Gruss** H.J. Molecular, structural, and biological characteristic of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int J Clin Lab Res.* (1996) 26, 143-159
- Gunning** P., O'Neil G., Hardeman E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev.* (2008) 88, 1-35
- Haas** U. Physik für Pharmazeuten und Mediziner - Ein Lehrbuch für Studierende mit Physik als Nebenfach (2002), 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany
- Hall** A., Nobes C.D. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* (2000) 355, 965-970
- Hall** A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* (1998) 27, 509-514
- Hammond** T.G., Benes E., O'Reilly K.C., Wolf D.A., Linnehan R.M., Taher A., Kaysen J.H., Allen P.L., Goodwin T.J. Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol Genomics.* (2000) 3, 163-173
- Hammon** T.G., Hammond J.M. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2001) 281, F12-F25
- Hansen** A-E., Kristensen A.T., Law I., Jørgensen J.T., Engelhom S.A. Hypoxia-inducible factors - regulation, role and comparative aspects in tumourigenesis. *Vet Comp Oncol.* (2011) 9, 16-37
- Hellweg** C.E., Baumstark-Khan C. Getting ready for the manned mission to Mars: the astronauts' risk from space radiation. *Naturwissenschaften.* (2007) 94, 517-526
- Higashibata** A., Imamizo-Sato M., Seki M., Yamazaki T., Ishioka N. Influence of simulated microgravity on the activation of the small GTPase Rho involved in cytoskeletal formation - molecular cloning and sequencing of bovine leukemia-associated guanine nucleotide exchange factor. *BMC Biochem.* (2006) 7,19

- Hoson** T., Kamisaka S., Masuda Y., Yamashita M. Changes in plant growth processes under microgravity conditions simulated by a three-dimensional clinostat. *Bot Mag.* (1992) 105, 53-70
- Hoson** T., Kamisaka S., Masuda Y., Yamashita M., Buchen B. Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta.* (1997) 203, S187-S197
- Howard** J., Hyman A.A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature.* (2003) 422, 753-758
- Hughes-Fulford** M., Gilbertson V. Osteoblast fibronectin mRNA, protein synthesis, and matrix are unchanged after exposure to microgravity. *FASEB J.* (1999) 13, S121-S127
- Huijser** R.H. Desktop RPM: New small size microgravity simulator for the bioscience laboratory. (2000) downloaded from the DESC web site: <http://www.desc.med.vu.nl>
- Huveneers** S., Danen E.H.J. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci.* (2009) 122, 1059-1069
- Infanger** M., Kossmehl P., Shakibaei M., Schulze-Tanzil G., Cogoli A., Faramarzi S., Bauer J., Curcio F., Paul M., Grimm D. Longterm conditions of mimicked weightlessness influences the cytoskeleton in thyroid cells. *J Gravit Physiol.* (2004) 11, P169-P172
- Infanger** M., Kossmehl P., Shakibaei M., Bauer J., Kossmehl-Zorn S., Cogoli A., Curcio F., Oksche A., Wehland M., Kreutz R., Paul M., Grimm D. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res.* (2006) 324, 267-277
- Ingber** D.E. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci.* (2003(a)) 116, 1157-1173
- Ingber** D.E. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci.* (2003(b)) 116, 1397-1408
- Ingber** D. How cells (might) sense microgravity. *FASEB J.* (1999) 13, S3-S15
- Ishihama** Y., Oda Y., Tabata T., Sato T., Nagasu T., Rappsilber J., Mann M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cel Proteomics.* (2005) 4, 1265-1272
- Ivaska** J., Pallari H.-M., Nevo J., Erkkisson J.E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res.* (2007) 313, 2050-2062
- Janmey** P.A. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev.* (1998) 78, 763-781
- Javid** B., MacAry P.A., Lehner P.J. *J Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity.* *Immunol.* (2007) 179, 2035-2040
- Jones** R.G., Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Gene Dev.* (2009) 23, 537-548

- Jost** P.D. Simulating human space physiology with bed rest. *Hippokratia*. (2008) 12, 37-40
- Kampinga** H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanfuay R.M., Bruford E.A., Cheetham M.E., Chen B., Hightower L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. (2009) 14, 105-111
- Karas** M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons. *Anal Chem*. (1988) 60, 2299-2301
- Karp** G. Molekulare Zellbiologie (2005), 1. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany
- Kiang** J.G., Tsokos G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*. (1998) 80, 183-201
- Kiefer** J., Pross H.D. Space radiation effects and microgravity. *Mutat Res*. (1999) 430, 299-305
- Kjarland** E., Keen T.J., Kleppe R. Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? *Curr Pharm Biotechnol*. (2006), 7, 217-223
- Klinke** R., Silbernagel S. Lehrbuch der Physiologie (2001), 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Germany
- Koolman** J., Rhöm K.-H. Taschenatlas der Biochemie (2003), 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany
- Kossmehl** P., Shakibaei M., Cogoli A., Pickenhahn H., Paul M., Grimm D. Simulated microgravity induces programmed cell death in human thyroid carcinoma cells. *J Gravit Physiol*. (2002) 9, P285-P296
- Kourie** J.I., Wood H.B. Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels. *Prog Biophys Mol Biol*. (2000) 73, 91-134
- Krammer** P.H. Apoptose. *Dtsch Arztebl*. (2000) 97, 1752-1759
- Krause** K., Karger S., Schierhorn A., Poncin S., Many M.-C., Fuhrer D. Proteomic profiling of cold thyroid nodules. *Endocrinology*. (2007) 148, 1754-1763
- Krause** K., Schierhorn A., Sinz A., Wissmann J.-D., Beck-Sickinger A.G., Paschke R., Fuhrer D. Towards the application of proteomics to human thyroid tissue. *Thyroid* (2006) 16, 1131-1143
- Kostyukova** A.S. Capping complex formation at the slow-growing end of the actin filament. *Biochemistry (Mosc)*. (2008) 73, 1467-1472
- Kumei** Y., Morita S., Katano H., Akiyama H., Kiroano M., Oyha K., Shimokawa H. Microgravity signal ensnarls cell adhesion, cytoskeleton, and matrix proteins of rat osteoblasts : Osteopontin, CD44, Osteonectin, and  $\alpha$ -Tubulin. *Ann N Y Acad Sci*. (2006) 1090, 311-317
- Lane** H.W., Feeback D.L. Water and energy dietary requirements and endocrinology of human space flight. *Nutrition*. (2002) 18, 820-828
- Lascu** I., Gonin P. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr*. (2000) 32, 237-246

- Ledgerwood** E.C., Morison I.M. Targeting the apoptosome for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* (2009) 15, 420-424
- Lee** A.S. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res.* (2007) 67, 3496-3499
- Lee** S., Francoeur A.-M., Liu S., Wang E. Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 $\alpha$  gene family. *J Biol Chem.* (1992) 267, 24064-24068
- Lewis** M.L., Rexnolds J.L., Cubano L.A., Hatton J.P., Lawless B.D., Piepmeier E.H. Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* (1998) 12, 1007-1018
- Lin** K.-H., Wang W.-J., Wu Y.-H., Cheng S.-Y. Activation of antimetastatic Nm23-H1 gene expression by estrogen and its  $\alpha$ -receptor. *Endocrinology.* (2002) 143, 467-475
- Lin** J.-D., Chao T.-C., Weng H.-F., Huang H.-S., Ho Y.-S. Establishment of Xenografts and cell lines from well-differentiated human thyroid carcinoma. *J Surg Oncol.* (1996) 63, 112-118
- Lippert** H. Lehrbuch Anatomie (2000), 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag München Jena, Germany
- Liu** G., Tang J., Edmonds B.T., Murray J., Levin S., Condeelis J. F-actin sequesters elongation factor 1 $\alpha$  from Interaction with aminoacyl-tRNA in a pH-dependent reaction. *J Cell Biol.* (1996) 135, 953-963
- Llopis** J., McCaffery J.M., Miyawaki A., Farquhar M.G., Tsien R.Y. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1998) 95, 6803-6808
- Lüllmann** H., Mohr K. Taschenatlas der Pharmakologie (2001), 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Germany
- LDA** Landesamt für Denkmalpflege und Archäologie Sachsen-Anhalt, Landesmuseum für Vor- und Frühgeschichte, Die Himmelscheibe von Nebra, [http://www.lda-lsa.de/himmelscheibe\\_von\\_nebra/](http://www.lda-lsa.de/himmelscheibe_von_nebra/)
- LeBlanc** A.D., Driscoll T.B., Shackelford L.C., Evans H.J., Rianon N.J., Smith S.M., Feedback D.L., Lai D. Alendronate as an effective countermeasure to disuse induced bone loss. *J Musculoskel Neuron Interact.* (2002) 2, 335-343
- LeBlanc** A.D., Spector E.R., Evans H.J., Sibonga J.D. Skeletal responses to space flight and the bed rest analog: a review. *J Musculoskel Neuron Interact.* (2007) 7, 33-47
- Lin** J.D., Chao T.C., Weng H.F., Huang H.S., Ho Y.S. Establishment of xenografts and cell lines from well-differentiated human thyroid carcinoma. *J Surg Oncol.* (1996) 63, 112-118
- Lipnicki** D.M., Gunga H.-C. Physical inactivity and cognitive functioning: results from bed rest studies. *Eur J Appl Physiol.* (2009) 105, 27-35
- Long** M., Lü S., Sun G. Kinetics of receptor-ligand interactions in immune responses. *Cell Mol Immunol.* (2006) 3, 79-86

- Machesky** L.M., Gould K.L. The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol.* (1999) 11, 117-121
- MacDonald** N.J., Freije J.M.P., Stracke M.L., Manrow R.E., Steeg P.S. Site-directed mutagenesis of nm23-H1: Mutation of proline 96 or serine 120 abrogates its motility inhibitory activity upon transfection into human breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* (1996) 271, 25107-25116
- Macias** B.R., Groppo E.R., Eastlack R.K., Watenpaugh D.E., Lee S.M., Schneider S.M., Boda W.L., Smith S.M., Cutuk A., Pedowitz R.A., Meyer R.S., Hargens A.R. Space exercise and earth benefits. *Curr Pharm Biotechnol.* (2005) 6, 305-317
- Maciver** W.K., Hussey P.J. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* (2002) 3, 3007.1-3007.12
- MacRae** T.H. Microtubule organization by cross-linking and bundling proteins. *Biochim Biophys Acta.* (1992) 1160, 145-155
- Masters** C.J. Interactions between soluble enzymes and subcellular structure. *CRC Crit Rev Biochem.* (1981) 11, 105-143
- Mateos-Langerak** J., Goetze S., Leonhardt H., Cremer T., van Driel R., Lanctôt C. Nuclear architecture: Is it important for genome function and can we prove it? *J Cell Biochem.* (2007) 102, 1067-1075
- Mazurek** S., Boschek C.B., Hugo F., Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol.* (2005) 15, 300-308
- McIlwain** C.C., Townsend D.M., Tew K.D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene.* (2006) 25, 1639-1648
- McNeil** A.K., Rescher U., Gerke V., McNeil P.L. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J Biol Chem.* (2006) 281, 35202-35207
- Meloni** M.A., Galleri G., Pippia P., Cogoli-Greuter M. Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modeled low gravity. *Protoplasma.* (2006) 229, 243-249
- Merrifield** C.J., Rescher U., Almers W., Proux J., Gerke V., Sechi A.S., Moss S.E. Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Curr Biol.* (2001) 11, 1136-1141
- Mesland** D.A.M. Novel ground-based facilities for research in the effects of weight. *ESA Microgravity News.* (1996) 9, 5-10
- Meyers** V.E., Zayzafoon M., Douglas J.T., McDonald J.M. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. *J Bone Miner Res.* (2005) 20, 1858-1866
- Michal** G. (Hrsg.) Biochemical Pathways – Biochemie Atlas (1999), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, Germany
- Miller** L.M., Menthena A., Chatterjee C., Verdier-Pinard P., Novikoff P.M., Horwitz S.B., Angeletti R.H. Increased levels of a unique post-translationally modified  $\beta$ IVb-tubulin isotype in liver cancer. *Biochemistry.* (2008) 47, 7572-7582

- Min** K., Song H.K., Chang C., Kim S.Y., Lee K.-J., Suh S.W. Crystal structure of human nucleoside diphosphate kinase A, a metastasis suppressor. *Proteins*. (2002) 46, 340-342
- Morbidelli** L., Monici M., Marziliano N., Cogoli A., Fusi F., Waltenberge J., Ziche M. Simulated hypogravity impairs the angiogenic response of endothelium by up-regulating apoptotic signals. *Biochem Biophys Res Commun*. (2005) 334, 491-499
- Moss** S.E., Morgan R.O. The annexins *Genome Biol*. (2004) 5, 219 Epub
- Mu** Z.M., Yin X.Y., Prochownik E.V. Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression. *J Biol Chem*. (2002) 277, 43175-43184
- Nagat** S. Apoptosis by death factor. *Cell* (1997) 88, 355-365
- Narumiya** S., Tanji M., Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. (2009) 28, 65-76
- NASA** Human Research Roadmap – A risk reduction strategy for human space exploration, <http://humanresearchroadmap.nasa.gov/>
- Nichols** H.L., Zhang N., Wen X. Proteomics and genomics of microgravity. *Physiol Genomics*. (2006) 26, 163-171
- Obermaier** C., Jankowski V., Schmutler C., Bauer J., Wildgruber R., Infanger M., Köhrle J., Krause E., Weber G., Grimm D. Free-flow isoelectric focusing of proteins remaining cell fragments following sonication of thyroid carcinoma cells. *Electrophoresis*. (2005) 26, 2109-2116
- Ohnishi** K., Ohnishi T. The biological effects of space radiation during long stays in space. *Biol Sci Space*. (2004) 18, 201-205
- Olson** E.N., Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2010) 11, 353-365
- Oser** M., Condeelis J. The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J Cell Biochem*. (2009) 108, 1252-1262
- Papaseit** C., Pochon N., Tabony J. Microtubule self-organization is gravity-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2000) 97, 8365-8368
- Paron** I., D'Ambrosio C., Scalonì A., Berlingieri M.T., Pallante P.L., Fusco A., Bivi N., Tell G., Damante G. A differential proteomic approach to identify proteins associated with thyroid cell transformation. *J Mol Endocrinol*. (2005) 34, 199-207
- PB** Abbildung Schilddrüse, Schilddrüsen-Informationen für de Raum Darmstadt, [www.patientinnenberatug.de/schilddruese.htm](http://www.patientinnenberatug.de/schilddruese.htm)  
Histologische Färbung des Drüsengewebes, [www.uni-duesseldorf.de/MedFak/mai/2004/content/histologie/docs/endo05.htm](http://www.uni-duesseldorf.de/MedFak/mai/2004/content/histologie/docs/endo05.htm)
- Pederson** T. Half a century of "the nuclear matrix". *Mol Biol Cell* (2000) 11, 799-805
- Penso** J., Beiter R. Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by clotrimazole and its

- correlation to cell viability and morphology. *Mol Genet Metab.* (2002) 76, 181-188
- Perkins** D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* (1999) 20, 3551-3567
- Pietsch** J., Kussian R., Sickmann A., Bauer J., Weber G., Nissum M., Westphal K., Egli M., Grosse J., Schönberger J., Wildgruber R., Infanger M., Grimm D. Application of free-flow IEF to identify protein candidates changing under microgravity conditions. *Proteomics.* (2010) 10, 905-913
- Pietsch** J., Bauer J., Egli M., Infanger M., Grimm D. The effects of weightlessness on the human organism and mammalian cells. *Curr Mol Med.* (2011) Epub ahead of print
- Pietsch** J., Sickmann A., Weber G., Bauer J., Egli M., Wildgruber R., Infanger M., Grimm D. A proteomic approach to analysing spheroid formation of two human thyroid cell lines cultured on a random positioning machine. *Proteomics.* (2011) 11, 2095-2104 [a]
- Pietsch** J., Sickmann A., Bauer J., Weber G., Nissum M., Westphal K., Egli M., Grosse J., Schönberger J., Eilles C., Infanger M., Grimm D. 'Proteom analysis of thyroid cancer cells after long-term exposure to simulated microgravity' (2011) Epub ahead of print [b]
- Pollard** T.D., Selden S.C., Maupin P. Interaction of actin filaments with microtubules. *J Cell Biol.* (1984) 99, 33s-37s
- Pollard** T.H. The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* (2003) 422, 741-745
- Pollard** T.D., Borisy G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* (2003) 112, 453-465
- Raftopoulou** M., Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* (2004) 265, 23-32
- Rehm** H. Der Experimentator – Proteinbiochemie/Proteomics (2006), Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München
- Reichert** U. Kalender der Bronzezeit. *Sterne und Weltraum.* (2006) 4, 14-15
- Reiners** C., Dietlein M., Luster M. Malignant goiter - thyroid cancer. *Dtsch Med wochenschr.* (2008) 133, 2215-2228
- Reinke** N., Preu P. Deutschland und China intensivieren Zusammenarbeit in der Raumfahrt. *DLR News-Archiv.* (2008), [http://www.dlr.de/desktopdefault.aspx/tabid-3432/7418\\_read-14864/](http://www.dlr.de/desktopdefault.aspx/tabid-3432/7418_read-14864/)
- Rescher** U., Gerke V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci.* (2004) 117, 2631-2639
- Rescher** U., Ruhe D., Ludwig C., Zobiack N., Gerke V. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci.* (2004) 117, 3473-3480

- Rhee** S.G., Chae H.Z., Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling. *Free Radic Biol Med.* (2005) 38, 1543-1552
- Riede** U.-N., Werner M., Schäfer H.-E. Allgemeine und spezielle Pathologie (2004), 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Germany
- Rimpi** S., Nilsson J.A. Metabolic enzymes regulated by the Myc oncogene are possible target for chemotherapy or chemoprevention. *Biochem Soc Trans.* (2007) 35, 305-310
- Rintala-Dempsey** A.C., Rezvanpour A., Shaw G.S. S100-annexin complexes - structural insights. *FEBS J.* (2008) 275, 4956-4966
- Rittweger** J., Beller G., Armbrecht G., Mulder E., Buehring B., Gast R., Dimeo F., Schubert H., da Haan A., Stegeman D.F., Schiessl H., Felsenberg D. Prevention of bone loss during 56 days of strict bed rest by side-alternating resistive vibration exercise. *Bone* (2010) 46, 137-147
- Rosengard** A.M., Krutzsch H.C., Shearn A., Biggs J.R., Barker E., Margulies I.M., King C.R., Liotta L.A., Steeg P.S. Reduced Nm23/Awd protein in tumor metastasis and aberrant Drosophila development. *Nature.* (1989) 342, 177-180
- Salzano** A.M., Paron I., Pines A., Bachi A., Talamo F., Bivi N., Vascotto C., Damante G., Quadrifoglio F., Scaloni A., Tell G. Differential proteomic analysis of nuclear extracts from thyroid cell lines. *J. Chromatogr B.* (2006) 833, 41-50
- Schatten** H., Lewis M.L., Chakrabarti A. Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells. *Acta Astronautica.* (2001) 49, 399-418
- Schlüter** K., Jockusch B.M., Rothkegel M. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta.* (1997) 1359, 97-109
- Schmitt** E., Gehrmann M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* (2007) 81, 15-27
- Schönberger** J., Bauer J., Spruß T., Weber G., Chahoud I., Eilles C., Grimm D. Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1. *J Mol Med.* (2000) 78, 102-110
- Schwarzenberg** M., Pippia P., Meloni M.A., Cossu G., Cogoli-Greuter M., Cogoli A. Signal transduction in T lymphocytes - a comparison of the data from space, the free fall machine and the random positioning machine. *Adv Space Res.* (1999) 24, 793-800
- Semov** A., Semova N., Lacelle C., Marcotte R., Petroulakis E., Proestou G., Wang E. Alterations in TNF- and IL-related gene expression in space-flown WI38 human fibroblasts. *FASEB J.* (2002) 16, 899-901
- Shackelford** L.C., LeBlanc A.D., Driscoll T.B., Evans H.J., Rianon N.J., Smith S.M., Spector E., Feedback D.L., Lai D. Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss *J Appl Physiol.* (2004) 97, 119-129

- Shimizu** Y., Hendershot L.M. Oxidative folding: cellular strategies for dealing with the resultant equimolar production of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal.* (2009) 11, 2317-2331
- Skoog** D.A., Leary J.J. Instrumentelle Analytik – Grundlagen, Geräte, Anwendungen (1996), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany
- Small** J.V., Stradal T., Vignal E., Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* (2002) 12, 112-120
- Smith** P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid *Anal Biochem.* (1985) 150, 76-85
- Smith** S.M., Wastney M.E., O'Brien K.O., Morukov B.V., Larina I.M., Abrams S.A., Davis-Street J.E., Oganov V., Shackelford L.C. Bone marker, calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the Mir space station. *J Bone Miner Res.* (2005) 20, 208-218
- Somlyo** A.P., Somlyo A.V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* (2000) 522, 177-185
- Sonnenfeld** G., Shearer W.T. Immune function during space flight. *Nutrition.* (2002) 18, 899-903
- Srisomsap** C., Subhasitanont P., Otto A., Mueller E.-C., Punyarit P., Wittmann-Liebhold B., Svasti J. Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics.* (2002) 2, 706-712
- Stein** G.S., van Wijnen A.J., Stein J.L., Lian J.B., Pockwinse S.H., McNeil S. Implications for interrelationships between nuclear architecture and control of gene expression under microgravity conditions. *FASEB J.* (1999) 13, S157-S166
- Strollo** F. Hormonal changes in humans during spaceflight. *Adv Space Biol Med.* (1999), 7, 99-129
- Tabony** J., Rigotti N., Glade N., Cortès S. Effect of weightlessness on colloidal particle transport and segregation in self-organising microtubule preparations. *Biophys Chem.* (2007) 127, 172-180
- Talapatra** S., Wagner J.D.O., Thompson C.B. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* (2002) 9, 856-861
- Tennant** D.A., Durán R.V., Boulahbel H., Gottlieb E. Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis* (2009) 30, 1268-1280
- Theodorakis** N., Cleveland D.W. Physical evidence for cotranslational regulation of  $\beta$ -tubulin mRNA degradation. *Mol Cell Biol.* (1992) 12, 791-799
- Townsend** D.M., Findlay V.J., Fazilev F., Ogle M., Fraser J., Saavedra J.E., Ji X., Keefer L.K., Tew K.D. A Glutathione S-transferase  $\pi$ -activated prodrug causes kinase activation concurrent with S-Glutathionylation of proteins. *Mol Pharmacol.* (2006) 69, 501-508

- Townsend** D.M., Tew K.D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. (2003) 22, 7369-7375
- Trappe** S., Costill D., Gallagher P., Creer A., Peter J.R., Evans H., Riley D.A., Fitts R. Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the international space station. *J Appl Physiol*. (2009) 106, 1159-1168
- Turner** R.T. Invited review: What do we know about the effects of spaceflight on bone? *J Appl Physiol*. (2000) 89, 840-847
- Ulbrich** C., Westphal K., Baatout S., Wehland M., Bauer J., Flick B., Infanger M., Kreuz R., Vadrucci S., Egli M., Cogoli A., Derradji H., Pietsch J., Paul M., Grimm D. Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity. *J Cell Biochem*. (2008) 104, 1324-1341
- UniProt** <http://www.uniprot.org/uniprot>
- van Aelst** L., D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. (1997) 11, 2295-2322
- van Loon** J.J.W.A., Veldhuijzen J.P., Kiss J., Wood C., vd Ende H., Guntemann A., Jones D., de Jong H., Wubbels R. Microgravity research starts on the ground: apparatusus for longterm ground based hypo- and hypergravity studies. *Proc. 2<sup>nd</sup> Europ. Symp. On the utilization of the International Space Station, ESTEC, Noordwijk, The Netherlands* 16.-18. Nov. (1998) ESA SP-433, 415-419
- Vicente-Manzanares** M., Ma X., Adelstein R.S., Horwitz A.R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2009) 10, 778-790
- Vos** M.J., Hageman J., Carra S., Kampinga H.H. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry*. (2008) 47, 7001-7011
- Wagner** E., Luche S., Penna L., Chevallet M., van Dorsselaer A., Leize-Wagner E., Rabilloud T. A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized *in vivo* at the active-site cysteine during oxidative stress. *Biochem J*. (2002) 366, 777-785
- Wang** T., Arifoglu P., Ronai Z., Tew K. Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C Terminus. *J Biol Chem*. (2001) 276, 20999-21003
- Warburg** O. On the origin of cancer cells. *Science*. (1956) 123, 309-314
- Watanabe** N., Higashida C. Formins: processive cappers of growing actin filaments. *Exp Cell Res*. (2004) 301, 16-22
- Watenpaugh** D.E. Fluid volume control during short-term space flight and implications for human performance. *J Exp Biol*. (2001) 204, 3209-3215
- Weber** G., Bocek P. Optimized continuous flow electrophoresis. *Electrophoresis*. (1996) 17, 1906-1910
- Weber** G., Bauer J. Counterbalancing hydrodynamic sample distortion effects increases resolution of free-flow zone electrophoresis. *Electrophoresis*. (1998) 19, 1104-1109

- Wennerberg** K., Rossman K.L., Der C.J. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* (2005) 118, 843-846
- White** R.J., Averner M. Humans in space. *Nature* (2001) 409, 1115-1118
- Williams** D., Kuipers A., Mukai C., Thirsk R. Acclimation during space flight: effects on human physiology. *CMAJ* (2009) 180, 1317-1323
- Wolf** D.A., Schwarz R.P. Analysis of gravity-induced particle motion and fluid perfusion flow in the NASA-designed rotating zero-head-space tissue culture vessel. *NASA Technical Paper* (1991) 3143, 1-12
- Wolf** D.A., Schwarz R.P. Experimental measurement of the orbital paths of particles sedimenting within a rotating viscous fluid as influenced by gravity- *NASA Technical Paper 3200* (1992)
- Wood** Z.A., Schröder E., Robin Harris J., Poole L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* (2003) 28, 32-40
- Xu** G., Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis' *Cell Res.* (2007) 17, 759-771
- Yang** K.S., Kang S.W., Woo H.A., Hwang S.C., Chae H.Z., Kim K., Rhee S.G. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem.* (2002) 277, 38029-38036
- Yonezawa** N., Nishida E., Sakai H. pH Control of actin polymerization by cofilin. *J Biol Chem.* (1985) 260, 14410-14412
- Yoshimitsu** K., Shiba N., Matsuse H., Takano Y., Matsugaki T., Inada T., Tagawa Y., Nagata K. Development of a training method for weightless environment using both electrical stimulation and voluntary muscle contraction. *Tohoku J Exp Med.* (2010) 220, 83-93
- Zhang** K., Kaufman R.J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* (2008) 454, 455-462
- Zhang** M.H., Lee J.S., Kim H.J., Jin D.I., Kim J.I., Lee K.J., Seo J.S. SP90 protects apoptotic cleavage of vimentin in geldanamycin-induced apoptosis. *Mol Cell Biochem.* (2006) 281, 111-121
- Zhao** X.-H., Laschinger C., Arora P., Szász K., Kapus A., McCulloch C.A. Force activates smooth muscle  $\alpha$ -actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J Cell Sci.* (2007) 120, 1801-1809
- Ziegler** W.H., Gingras A.R., Critchley D.R., Emsley J. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem Soc Trans.* (2008) 36, 235-239

---

## Wissenschaftliche Publikationen

---

### 10.1) Veröffentlichungen

#### 10.1.1) Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften

- a) **Pietsch J.**, Kussian R., Sickmann A., Bauer J., Weber G., Nissum M., Westphal K., Egli M., Grosse J., Schönberger J., Wildgruber R., Infanger M., Grimm D. Application of free-flow IEF to identify protein candidates changing under microgravity conditions. *Proteomics*. (2010) 10, 904-913
- b) **Pietsch J.**, Sickmann A., Weber G., Bauer J., Egli M., Wildgruber R., Infanger M., Grimm D. A proteomic approach to analysing spheroid formation of two human thyroid cell lines cultured on a random positioning machine. *Proteomics*. (2011) 11, 2095-2104
- c) **Pietsch J.**, Bauer J., Egli M., Infanger M., Grimm D. The effects of weightlessness on the human organism and mammalian cells. *Curr Mol Med*. (2011) 11, 350-364
- d) **Pietsch J.**, Sickmann A., Bauer J., Weber G., Nissum M., Westphal K., Egli M., Grosse J., Schönberger J., Eilles C., Infanger M., Grimm D. 'Proteom analysis of thyroid cancer cells after long-term exposure to simulated microgravity' (2011) 23, 381-390

#### 10.1.2) Kongressbeiträge - Poster

- a) Bauer J., **Pietsch J.**, Egli M., Weber G., Jankowski V., Westphal K., Kossmehl P., Kossmehl-Zorn S., Ulbrich C., Cogoli A., Grimm D. Preliminary Results of the ESA-CORA-GBF-2004-003-II Project. ESA Symposium – Technology for artificial gravity and microgravity simulation, 10.-12.12.2007 Noordwijk, Niederlande

#### 10.1.3) Kongressbeiträge - Vortrag

- a) Grosse J., **Pietsch J.**, Kussian R., Sickmann A., Bauer J., Weber G., Nissum M., Westphal K., Egli M., Infanger M., Eilles C., Grimm D. Proteomic analysis of four different thyroid cell types exposed to simulated microgravity. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly - 'In the footsteps of Columbus', 01.-04.09.2009, Bonn, Germany
- b) **Pietsch J.**, Wehland M., Bauer J., Infanger M., Grosse J., Sickmann A., Weber G., Egli M., Aleshcheva G., Grimm D. Schilddrüsentumore: Proteomanalyse unter simulierter Schwerelosigkeit - Ergebnisse der DLR-Parabelflugkampagnen. Erlanger Gravimeeting, 02.-03.12.2010, Erlangen, Germany

### 10.2) Veröffentlichungen mit der Arbeitsgruppe

#### 10.2.1) Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften

- a) Ulbrich C., Westphal K., Baatout S., Wehland M., Bauer J., Flick B., Infanger M., Kreutz R., Vadrucci S., Egli M., Cogoli A., Derradji H., **Pietsch J.**, Paul M., Grimm D. Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity. *J Cell Biochem*. (2008) 104, 1324-1341

- b) Grimm D., Infanger M., Westphal K., Ulbrich C., **Pietsch J.**, Kossmehl P., Vadrucchi S., Baatout S., Flick B., Paul M., Bauer J. A delayed type of three-dimensional growth of human endothelial cells under simulated weightlessness. *Tissue Eng Part A* (2009) 15, 2267-2275
- c) Grimm D., Bauer J., Ulbrich C., Westphal, K., Wehland M., Infanger M., Aleshcheva G., **Pietsch J.**, Ghardi M., Beck M., El-Saghire H., de Saint-Georges L., Baatout S. Different responsiveness of endothelial cells to vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor added to culture media under gravity and simulated microgravity. *Tissue Eng Part A*. (2010) 16, 1559-1573
- d) Ulbrich C., Westphal K., **Pietsch J.**, Winkler H.D.F., Leder A., Bauer J., Kossmehl P., Grosse J., Schönberger J., Infanger M., Egli M., Grimm D. Characterization of human chondrocytes exposed to simulated microgravity. *Cell Physiol Biochem*. (2010) 25, 551-569
- e) Ulbrich C., Leder A., **Pietsch J.**, Flick B., Wehland, M., Grimm, D. The impact of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on cardiac fibroblasts grown under altered gravity conditions. *Cell Physiol Biochem*. (2010) 26, 1011-1022
- f) Grimm D., Bauer J., **Pietsch J.**, Infanger M., Eucker J., Eilles C., Schönberger J. Diagnostic and therapeutic use of membrane proteins in cancer cells. *Curr Med Chem*. (2010) 18, 176-190
- g) Grimm D., Wehland M., **Pietsch J.**, Infanger M., Bauer J. Drugs interfering with apoptosis in breast cancer. *Curr Pharm Des*. (2011) 17, 272-283
- h) Wohllebe S., Ulbrich C., Grimm, D., **Pietsch J.**, Erzinger G., Richter R., Lebert M., Richter P., Häder D.-P. Photodynamic Treatment of *Chaoborus crystallinus* Larvae with Chlorophyllin induces Necrosis and Apoptosis. *Photochem Photobiol*. (2011) 87, 1113-1122
- i) Ubrich C., **Pietsch J.**, Grosse J., Wehland M., Schulz H., Saar K., Hübner N., Hauslage J., Hemmersbach R., Braun M., van Loon J., Vagt N., Egli M., Richter P., Einspanier R., Sharbati S., Baltz T., Grimm, D. Differential gene expression under altered gravity conditions in follicular thyroid cancer cells: relationship between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Cell Physiol Biochem*. (2011) 28, 185-198
- j) Grosse J., Wehland M., **Pietsch J.**, Ma X., Ulbrich C., Schulz H., Saar K., Hübner N., Hauslage J., Hemmersbach R., Braun M., van Loon J., Vagt N., Infaner M., Eilles C., Egli M., Richter P., Baltz T., Einspanier R., Sharbati S., Grimm D. Short-term weithlessness produced by parabolic flight maneuvers altered gene expression patterns in human endothelial cells *FASEB J*. (2011) Epub ahead of print

### 10.2.2) Kongressbeiträge - Poster

- a) **Pietsch J.**, Ulbrich C., Westphal K., Winkler H.D.F., Leder A., Egli M., Bauer J., Grimm D. Simulated Microgravity and Human Chondrocytes. 29<sup>th</sup> Annual International Gravitational Physiology Meeting, Angers, 22.-27.06.2008, Angers, France

Posterpreis 'Young Research Award'

- b) **Pietsch J.**, Ulbrich C., Leder A., Westphal K., Bauer J., Grimm G. Tissue engineering and simulated microgravity: A new technology for development of blood vessels. Erlanger Gravimeeting, 27.-28.11.2008, Erlangen
- c) **Pietsch J.**, Ulbrich C., von Bauer R., Leder A., Grimm D. bFGF and VEGF inhibit ECM production in porcine cardiac fibroblasts after ischemia and reperfusion. 14<sup>th</sup> Meeting of the European Council for Cardiovascular Research, 09.-11.10.2009, Nizza, France
- d) Ulbrich C., **Pietsch J.**, Bauer J., Grimm D. Endothelial cells during a parabolic flight - which changes appear? 16<sup>th</sup> World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 17.-23.07.2010, Copenhagen, Dänemark
- e) Grimm D., Ulbrich C., **Pietsch J.**, Infanger M., Aleshcheva G., Bauer J. Alteration of the effects of growth factors by simulated microgravity. 16<sup>th</sup> World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 17.-23.07.2010, Copenhagen, Dänemark
- f) Grosse J., Wehland M., **Pietsch J.**, Bauer J., Eilles C., Infanger M., Abouelaradat K., Baatout S., Grimm D. Effects of gravitational unloading on thyroid cancer cells. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 05.-09.09.2011, Antwerpen, Belgien

### 10.2.3) Kongressbeiträge - Vortrag

- a) Ulbrich C., Westphal K., Bauer J., **Pietsch J.**, Cogoli A., Grimm D. The effects of simulated microgravity on cultured human chondrocytes. 4. Europäischer Kongress Medizin im Weltraum und unter extremen Bedingungen, 24.-26.10.2007, Berlin, Germany
- b) Ulbrich C., Westphal K., **Pietsch J.**, Cogoli A., Egli M., Grimm D. Human chondrocytes and simulated microgravity – Use of the random positioning machine. ESA Symposium – Technology for artificial gravity and microgravity simulation, 10.-12.12.2007, Noordwijk, Niederlande
- c) Ulbrich C., **Pietsch J.**, Winkler H.D.F., Leder A., Westphal K., Baatout S., Bauer J., Grimm D. Behaviour of endothelial cells in simulated microgravity and their role in tissue engineering. 29<sup>th</sup> Annual International Gravitational Physiology Meeting, 22.-27.06.2009, Angers, France
- d) Grimm D., Ulbrich C., **Pietsch J.**, Winkler D.H.F., Westphal K., Egli M., Cogoli A., Paul M., Baatout S., Bauer J. Results of the spheroids proposal – Part I Ground based experiments, 2<sup>nd</sup> Sino-German Meeting, 13.-17.10.2008, Peking, China
- e) Ulbrich C., Grimm, D., Bauer J., Westphal K., Winkler H.D.F., **Pietsch J.** Kurzzeiteffekte der Schwerelosigkeit auf das Transkriptionsverhalten und das Zytoskelett von humanen Zellen: Erste Ergebnisse der 12. DLR PFC. Erlanger Gravimeeting, 27.-28.11.2008, Erlangen, Germany
- f) Ulbrich C., **Pietsch J.**, Grimm D. Influence of simulated microgravity on human hip joint chondrocytes. 4<sup>th</sup> Sino-German workshop, 15.-19.06.2009, Shanghai, China

- g) Ulbrich C., **Pietsch J.**, Winkler H.D.F., Westphal K., Grimm D., Fluoreszenztechnische Methoden in der Weltraummedizin. Jahrestagung der DAfP, 02.-03.07.2009, Berlin, Germany
- h) **Pietsch J.**, Wehland M., Ulbrich C., Grosse J., Schulz H., Hübner N., Hauslage J., Hemmersbach R., Braun M., van Loon J., Vagt N., Infanger M., Grimm D. Short-term weightlessness produced by parabolic flight maneuvers altered gene expression patterns in human endothelial cells. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 05.-09.09.2011, Antwerpen, Belgien
- i) Wehland M., Ulbrich C., **Pietsch J.**, Grosse J., Schulz H., Hauslage J., Hemmersbach R., Braun M., van Loon J., Vagt N., Infanger M., Grimm D. Effects of real weightlessness on thyroid cancer cells. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 05.-09.09.2011, Antwerpen, Belgien
- j) **Pietsch J.**, Wehland M., Ulbrich C., Grosse J., Schulz H., Hübner N., Hauslage J., Hemmersbach R., Braun M., van Loon J., Vagt N., Infanger M., Grimm D. Effekte der Kurzzeitschwerelosigkeit auf humane Endothelzellen erzielt durch Parabelflugmaneuver

---

## Danksagung

---

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Daniela Grimm dafür bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, in ihrer Arbeitsgruppe dieses sehr interessante Thema zu bearbeiten. Die Möglichkeit, Erfahrungen mit simulierter und persönlich mit realer Schwerelosigkeit (Parabelflüge) zu machen, hat man nicht überall.

Ein weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Knaus für die Anfertigung des zweiten Gutachtens und dafür, dass sie es mir als externe Doktorandin ermöglichte, an der Freien Universität meine Promotion einzureichen.

Herrn Johann Bauer und den Mitarbeitern bei Beckton Dickinson danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Free-Flow Elektrophorese. Darüber hinaus ein weiterer Dank an Herrn Bauer, der mir bei der Erstellung der Paper und des Textes der Doktor-Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Albert Sickmann und ihm selbst danke ich für die Hilfe bei der massenspektrometrischen Analyse der zahlreichen Proteinbanden.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Marcel Egli an der ETH Zürich danke ich für die nette und hilfsbereite Aufnahme, wenn ich dort Proben auf der großen RPM einen Drehwurm bekommen ließ.

In den letzten Jahren haben mir viele Leute der AG Grimm dabei geholfen, die Versuche und Auswertungen für meine Arbeit anzufertigen. Dazu zählen Prof. Dr. med. Manfred Infanger, Dr. med. vet. Claudia Ulbrich, Dipl.-Ing. Kriss Westphal, Ganna Aleshcheva und Dr. rer. nat. Markus Wehland. Danke!

Und nicht zu Letzt, auch wenn sie meistens als letzte genannt werden, möchte ich meiner Familie und meinen Freunden dafür danken, dass sie meine Launen vor allem während des Schreibens zum Teil ertragen haben. Danke Mama, Jeannette und Vanessa, dass ihr mich bei Laune gehalten habt. Danke Birgit für die Durchsicht meiner Arbeit und die netten langen Telefongespräche. Ich hoffe, wir werden noch viele weitere haben.

---

**Lebenslauf**

---

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



---

---

## **Selbständigkeitserklärung**

---

Die vorliegende Arbeit habe ich im Zeitraum vom April 2007 bis September 2011 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Daniela Grimm an der Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, angefertigt.

Gemäß der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin versichere ich, dass ich für die Durchführung der Versuche und das Verfassen der Arbeit außer den genannten Quellen und Hilfsmitteln keine weiteren verwendet habe.

Berlin, September 2011

Jessica Pietsch