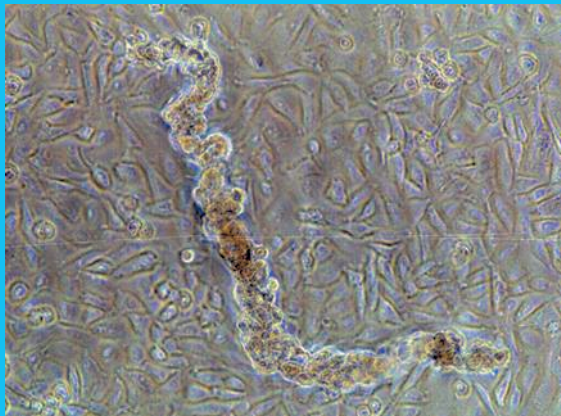


Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Toxikologie,
Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ivar Roots

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Endothelzellen in der Schwereelosigkeit



Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Claudia Ulbrich

Tierärztin aus Heilbronn

Berlin 2007

Journal-Nr.: 3149

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2009

© 2009 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-941703-16-2

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Toxikologie,
Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ivar Roots

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Endothelzellen in der Schwereelosigkeit

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Claudia Ulbrich

Tierärztin aus Heilbronn

Berlin 2007

Journal-Nr.: 3149

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. D. Grimm
3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

endothelium; apoptosis; growth factor; weightlessness simulation (MeSH);
extracellular spaces; cytoskeleton; spheroids, cellular (MeSH)

Tag der Promotion: 03.04.2009

In liebevoller Erinnerung
an meine Großeltern

Erinnerungen, die das Herz berühren, gehen nie verloren

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Zielsetzung	3
3.	Literaturübersicht	4
3.1	Die Bildung multizellulärer Sphäroide (MCS) in Kultur	4
3.1.1	Herkömmliche und neue Methoden zur Herstellung von MCS	5
3.1.1.1	Liquid-Overlay Technik	5
3.1.1.2	Spinner-Flask Methode	5
3.1.1.3	Aktuelle Methoden der Sphäroidkultur	6
3.2	Das Zytoskelett der Zelle	6
3.3	Die Extrazelluläre Matrix (EZM)	9
3.3.1	Kollagen Typ I und III	11
3.3.2	Fibronektin	12
3.3.3	Laminin	13
3.3.4	Osteopontin	13
3.3.5	Integrine	14
3.3.6	Transforming Growth Factor- β	15
3.3.7	Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf Zellen	15
3.4	Apoptose	16
3.4.1	Extrinsische Faktoren	19
3.4.1.1	Fas (CD95)	19
3.4.1.2	Welche Bedeutung hat Fas für den Körper?	20
3.4.2	Intrinsische Faktoren	21
3.4.2.1	Die Bedeutung der Bcl-2 Familie	21
3.4.2.2	Die Funktion von p53 im Zeichen der Apoptose	23
3.4.2.3	NF- κ B	24
3.5	Der Wachstumsfaktor bFGF	26
3.6	Endothelin-1	28
3.7	eNOS	28
3.8	Die „Random positioning machine“ in ihrer Verwendung als Klinostat	29
3.9	Die Zelllinie Ea.hy926	31

4.	Eigene Untersuchungen	32
4.1	Materialien und Methoden	32
4.1.1.	Material	
4.1.1.1	Geräte	32
4.1.1.1.1	Klinostat	33
4.1.1.1.2	Das Durchflusszytometer	33
4.1.1.2	Verbrauchsmaterialien	35
4.1.1.3	Chemikalien	35
4.1.1.4	Antikörper	37
4.1.1.5	Western Blot-Analyse	38
4.1.1.6	Oligonukleotide	39
4.1.1.7	Die Zelllinie	40
4.1.2	Methoden	40
4.1.2.1	Zellkulturtechnik	40
4.1.2.2	Gewinnung von Zellmaterial nach Kultivierung auf dem Klinostaten	40
4.1.2.4	Mikroskopie	41
4.1.2.5	Durchflusszytometrie	41
4.1.2.6	Western Blot-Analyse	42
4.1.2.7	TaqMan PCR	43
4.1.2.8	F-Aktin Färbung mittels Rhodamin-Phalloidin	45
4.1.2.9	Indirekte Immunfluoreszenz	46
4.1.2.10	Statistik	46
4.2	Ergebnisse	47
4.2.1	Die Effekte der Schwerelosigkeit auf extrazelluläre Matrixproteine	48
4.2.1.1	Kurzzeitversuche	48
4.2.1.1.1	Osteopontin	48
4.2.1.2	Langzeitversuche	50
4.2.1.2.1	Kollagen Typ I	50
4.2.1.2.2	Kollagen Typ III	51
4.2.1.2.3	Fibronektin	52
4.2.1.2.4	Laminin	53
4.2.1.2.5	Osteopontin	54
4.2.1.3	Einfluss des basic Fibroblast Growth Factor auf die EZM	57
4.2.1.3.1	Kollagen Typ I	57

4.2.1.3.2	Kollagen Typ III	60
4.2.1.3.3	Fibronektin	63
4.2.1.3.4	Laminin	65
4.2.1.3.5	Osteopontin	66
4.2.2	Die Auswirkungen von simulierter Schwerelosigkeit in Bezug auf Apoptose	69
4.2.2.1	Kurzzeitversuche	69
4.2.2.1.1	Bax	69
4.2.2.1.2	Bcl-2	71
4.2.2.1.3	Fas	73
4.2.2.2	Langzeitversuche	75
4.2.2.2.1	Bax	75
4.2.2.2.2	Bcl-2	77
4.2.2.2.3	Caspase-3	78
4.2.2.2.4	Fas	81
4.2.2.2.5	p53	83
4.2.2.3	Einfluss des basic Fibroblast Growth Factor auf die Apoptosefaktoren	84
4.2.2.3.1	Bax	84
4.2.2.3.2	Bcl-2	87
4.2.2.3.3	Caspase-3	89
4.2.2.3.4	Fas	92
4.2.2.3.5	p53	95
4.2.2.3.6	NFκB	98
4.2.3	Wirkung von bFGF auf Endothelin-1, eNOS und TGFβ ₁	100
4.2.3.1	Endothelin-1	100
4.2.3.2	eNOS	103
4.2.3.3	TGFβ ₁	105
4.2.4	Korrelation von Endothelin-1 und TGFβ ₁	106
4.2.5	Das Zytoskelett	107
4.2.5.1	F-Aktin	107
4.2.5.2	F-Aktin und alpha-/beta-Tubulin	108
4.2.5.3	Vimentin	109
5.	Diskussion	111
5.1	Endothelzellen und Schwerelosigkeit	111

5.2	Dreidimensionale multizelluläre Sphäroide	112
5.3	Veränderungen des Zytoskeletts der Endothelzellen unter simulierter Schwerelosigkeit	112
5.4	Die Rolle der Extrazellulären Matrix bei Endothelzellen	113
5.5	Apoptose und Schwerelosigkeit	113
5.6	Langzeiteffekte der simulierten Schwerelosigkeit auf Genexpression und Proteingehalt	115
5.7	Vorübergehende und Langzeiteffekte der Mikrogravitation	116
5.8	Der basic Fibroblast Growth Factor	116
5.9	Der Klinostat als Research-Tool	117
6.	Zusammenfassung	118
7.	Summary	119
8.	Literaturverzeichnis	120
9.	Wissenschaftliche Publikationen	132
10.	Anlagen	
	Tabellenverzeichnis	
	Abbildungverzeichnis	
	Abkürzungsverzeichnis	
	Quellenverzeichnis	
	Danksagung	
	Selbständigkeitserklärung	

1. EINLEITUNG

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass es unter der Einwirkung von Schwerelosigkeit, real oder simuliert, zu Veränderungen an Zellen kommt. Besonders interessant hierbei ist die Auslösung der Apoptose, die unter anderem zu Veränderungen im Hormonhaushalt, im Immunsystem und im Knochenstoffwechsel führt.

Gab es zunächst nur die Möglichkeit, Astronauten nach ihrem Flug zu untersuchen, was verständlicherweise die Probandenanzahl und die zeitliche Durchführbarkeit stark einschränkte, so wurden schon bald Zellkulturen im Orbit in speziellen Containern kultiviert, um diese nach ihrer Rückkehr untersuchen zu können (Walther *et al.*, 1994, 1999; Gmunder *et al.*, 1989).

Mit der Entwicklung von Maschinen, mittels derer Schwerelosigkeit simuliert werden konnte, wurden Untersuchungen kostengünstiger und besser planbar. Außerdem war es möglich, Versuche unter identischen Bedingungen beliebig oft zu wiederholen, auszuwerten, und gegebenenfalls zu variieren, ohne auf den nächsten realen Flug warten zu müssen.

Die Entwicklung des Klinostaten und der Rotating Wall Vessel waren große Schritte in diese Richtung. Beide ermöglichten eine planbare, rasche und mehrfach wiederholbare Versuchsdurchführung.

Die länger andauernde Exposition von Menschen gegenüber Weltraumstrahlung und Schwerelosigkeit beeinflusst deren Gesundheit (White und Averner, 2001; Baldwin, 1996; Buckley *et al.*, 1996). Viele der Gesundheitsprobleme, die während Weltraummissionen auftraten, beruhen vermutlich auf dem Einfluss von Mikrogravität auf zelluläre Charakteristika (Grimm *et al.*, 2002). Die Effekte der Schwerelosigkeit auf verschiedene Zelltypen sind daher ein Schwerpunkt der derzeitigen Interessenlage. Auf zellulärer Ebene wurden bereits Veränderungen des Zytoskeletts (Grimm *et al.*, 2002; Vassy *et al.*, 2001; Uva *et al.*, 2002), der Verlust der T-Zellaktivität (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2005) und Veränderungen in der Genexpression (Lewis *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 2000) untersucht. Des Weiteren wird das dreidimensionale Wachstum von normalen Zellen (Kossmehl *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2005; Clejan *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2000) und Tumorzellen (Grimm *et al.*, 2002; Kossmehl *et al.*, 2003; Chopra *et al.*, 1997) induziert. Die mikrotubuläre und mitochondriale Organisation ist verändert (Grimm *et al.*, 2002; Uva *et al.*, 2002) und die Produktion extrazellulärer Matrix sowie der zytoskelettalen Proteine sind modifiziert (Grimm *et al.*, 2002; Kossmehl *et al.*, 2003), während die Apoptose in verschiedenen Zelltypen initiiert wird (Grimm *et al.*, 2002; Uva *et al.*, 2002; Kossmehl *et al.*, 2003).

Eine dieser Zellarten sind die Endothelzellen, die eine tragende Rolle in der Angiogenese spielen. Um die Mechanismen der Gefäßneubildung besser verstehen zu können, ist es nötig, Endothelzellen nicht in Monolayern, sondern als dreidimensionale Gebilde zur

Verfügung zu haben, um Signaltransduktionswege, zelluläre Differenzierung und molekulare Mechanismen genauer untersuchen zu können.

Unter dem Einfluss von Schwerelosigkeit wurde die Bildung von Sphäroiden beobachtet, sodass der Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen in der Kultivierung unter Schwerelosigkeit zu suchen ist.

Endothelzellen sind eine Zellart, die von Schwerelosigkeit beeinflusst wird (Buravkova *et al.*, 2005; Sangha *et al.*, 2001). *In vivo* bilden sie das Endothel, welches am Übergang zwischen dem Blut und der Gefäßwand lokalisiert ist (Li *et al.*, 1994; Michiels, 2003). Jede Zelle ist mit der darunter liegenden Basallamina verankert und die individuellen Zellen sind miteinander durch Adhäsionsverknüpfungen verbunden, die prominente Tight Junctions beinhalten, welche dafür sorgen, dass es an den Zell-Zell-Verbindungen nicht zur Diffusion kommt. Endothelzellen können möglicherweise auf Veränderungen der lokalen Bedingungen wie Blutdruck, Sauerstoffgehalt und Blutfluss antworten, indem sie Substanzen sezernieren (zum Beispiel Endothelin-1 (ET-1)), welche starke Einflüsse auf den Tonus der vaskulären glatten Muskulatur haben. Unter bestimmten Bedingungen, vor allem als Antwort auf bestimmte Stimuli wie Wunden, Infektionen oder tumoröse Veränderungen, kann eine endotheliale Zelle aktiviert werden und ihre Funktion verändern. In der Geweberegeneration tragen Endothelzellen zur Bildung neuer Gefäße bei. Dieser als Angiogenese bezeichnete Prozess kann durch Proliferation, Migration und Remodelling von ausdifferenzierten Endothelzellen früher existierender Gefäße vermittelt werden (Tang und Conti, 2004; Infanger *et al.*, 2006a). In einer früheren Studie wurden bereits Kurzeffekte der simulierten Schwerelosigkeit auf endotheliale Zellen untersucht und es wurde herausgefunden, dass sich die Morphologie und der Differenzierungsgrad verändern, Apoptose initiiert wurde und die Expression von extrazellulärer Matrix und zytoskelettaler Proteine innerhalb weniger Stunden unter Klinorotation anstieg (Infanger *et al.*, 2006a). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die Effekte der Veränderungen der physikalischen Parameter der Gravitation ausbalanciert (Infanger *et al.*, 2004, 2006a). In der aktuellen Studie wurden Endothelzellen unter Bedingungen der simulierten Schwerelosigkeit für längere Zeit ($t=10$ d) untersucht. Das Hauptziel dieser Untersuchung war es, zwischen vorübergehenden und lang andauernden Effekten der Schwerelosigkeit zu unterscheiden. Die Genexpression von Fas (CD 95), Caspase-3, Osteopontin und TGF- β_1 und Langzeitveränderungen von Proteinen, die von der Mikrogravitation beeinflusst werden, wurden untersucht. Außerdem wurden morphologische Veränderungen des Zytoskeletts untersucht.

Im Zuge dieser Arbeit konnte dargestellt werden, welche Veränderungen an Endothelzellen im Vergleich zwischen Gravitation und Mikrogravitation entstehen, und welche Rolle der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) bei diesen Veränderungen spielen kann.

2. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Kultivierung von Endothelzellen in Form von Sphäroiden mit Hilfe eines dreidimensionalen Klinostaten, der Random Positioning Machine (RPM). Es wurde untersucht, ob die RPM für die Langzeitkultivierung über 10 d genutzt werden kann und eine geeignete ‚ground based facility‘ für die Simulation von Schwerelosigkeit darstellt. In der Dissertation von Holger Pickenhahn wurde diese Frage für eine kurzzeitige Kultivierung von Schilddrüsen(tumor)zellen bereits positiv beantwortet (Pickenhahn 2005). Für diese Arbeit wurden humane Endothelzellen für 10 d unter Bedingungen von Mikrogravitation (0 g) gezüchtet.

Die hierbei verwendete Zelllinie Ea.hy926 wurde zur Etablierung eines dreidimensionalen Zellkulturmodells in simulierter Schwerelosigkeit verwendet, sodass zeitgleich zu den eigentlichen Versuchen eine Charakterisierung der Effekte, die unter diesen Bedingungen auf die Zellen einwirken, untersucht und dokumentiert werden konnte. Anhand von vorangegangenen Experimenten konnte das Hauptaugenmerk auf die Untersuchung der extrazellulären Matrixproteine, der Morphologie und des Zytoskeletts gelegt werden.

Die aktuellen Forschungen auf dem Gebiet der simulierten Schwerelosigkeit beinhalten verschiedenste Zelllinien, wobei diese Arbeit sich auf die Endothelzelllinie Ea.hy926 beschränkt. Diese Zelllinie entstand durch Hybridisierung von HUVEC und A549 und beinhaltet endothelzellspezifische Eigenschaften wie die Expression des Faktor VIII bezogenen Antigens. Es handelt sich hierbei um eine makrovaskuläre Zelllinie, die von Bouis *et al.* zu Untersuchungen an so genanntem „Large-vessel“ Endothel empfohlen wird (Bouis *et al.*, 2001). Besonders interessant waren hierbei die Anpassungsmechanismen der Einzelzellen und Organismen an die Schwerelosigkeit sowie die Frage, ob simulierte 0 g-Bedingungen Apoptose induzieren und inwieweit sich die Differenzierung der Zellen ändert. Des Weiteren wurden die Endothelzellen mit dem Basic Fibroblast Growth Factor behandelt, um dessen Effekte auf das Verhalten der Zellen hinsichtlich der Produktion extrazellulärer Matrixproteine und der Apoptose zu untersuchen.

3. LITERATURÜBERSICHT

3.1 Die Bildung multizellulärer Sphäroide (MCS) in Kultur

Um Zellen in einem Verband wachsen zu lassen, bedient man sich verschiedener Techniken. Prinzipiell kann man zwischen Monolayern und dreidimensionalen Zellkulturen unterscheiden, wobei den dreidimensionalen Kulturen der Vorzug zu geben ist, da sie die physiologische Situation am besten widerspiegeln.

Die Idee der MCS gründet sich auf den Erfahrungen, die mittels der multizellulären Tumorsphäroide (MCTS) gesammelt werden konnten. In den 70er Jahren begannen Sutherland und Team die systematische Forschung und Arbeit an MCTS. Diese Arbeiten zeigten, dass starke Ähnlichkeiten zwischen Sphäroiden und soliden Tumoren *in vivo* bestehen, was das Potenzial für die Forschung mit dieser dreidimensionalen Zellkultur aufzeigt (Sutherland *et al.*, 1971).

Ein Sphäroid baut sich aus drei Schichten auf: Außen zeigt sich die Zone proliferierender Zellen, gefolgt von einem Bereich ruhender Zellen. Im Zentrum findet sich eine Nekrose. Endothelzellen bilden unter Bedingungen von Mikrogravitation dreidimensionale tubuläre Aggregate (Infanger *et al.*, 2006a). Betrachtet man diese histologisch, so zeigen sich tubuläre Strukturen, die in ihrem Inneren ein Lumen ausbilden, das durch eine Art Intima gekennzeichnet ist, welche von den Zellen produziert wird. Im Unterschied zu Sphäroiden, die mittels herkömmlicher Methoden (Spinner-Flask oder Liquid-Overlay) gezüchtet wurden, weisen die im Klinostaten erzeugten Sphäroide kein nekrotisches Zentrum auf. Dies wurde an Schilddrüsenzellsphäroiden gezeigt, die nach kurzer Kultivierung in simulierter Schwerelosigkeit entstehen (Grimm *et al.*, 2002).

Bei Sphäroiden der herkömmlichen Methode kommt es auf Grund von Nährstoffmangel im Inneren zu nekrotischen Vorgängen, da eine Zell-Zell-Interaktion nur unzureichend stattfindet, und nur die äußere Zellschicht hinreichend Nährstoffe aus dem sie umgebenden Medium ziehen kann. Die Aufnahme und Abgabe von Stoffen ist also verändert (Kunz-Schughart *et al.*, 1999, 2000).

Während des dreidimensionalen Wachstums kommt es zu Differenzierungsprozessen, was von Vorteil für die Zellen ist. Zellen, die im Verbund gezüchtet werden, differenzieren in der Regel und erhalten dadurch sowohl morphologische als auch funktionelle Charakteristika des Ursprungsgewebes zurück, die häufig bei der Kultivierung als Einzelzellen verloren gehen (Kunz-Schughart 1999, Jianmin *et al.*, 2002).

3.1.1 Herkömmliche und neue Methoden zur Herstellung von MCS

3.1.1.1 Liquid-Overlay-Technik

Zur Bildung von Sphäroiden kommt es nur, wenn die adhäsiven Kräfte zwischen den Zellen größer sind als jene zwischen den Zellen und dem Material, auf dem sie kultiviert werden. In der Vergangenheit wurden vor allem zwei Techniken angewendet, um Zellen zu einem dreidimensionalen Wachstum anzuregen, zum einen die so genannte Liquid-Overlay-Technik, bei der Suspensionen der entsprechenden Zellen auf einer nicht adhäsiven Oberfläche (z. B. Agarose) inkubiert werden. Der Nachteil hierbei ist, dass die Zellen großen Sedimentationskräften ausgesetzt sind. Dagegen wurde als vorteilhaft angesehen, dass diese Methode gut steuerbar ist, vor allem in Hinblick auf Größe und Anzahl der Sphäroide. Zum anderen wurde die Spinner-flask-Methode genutzt, die nachfolgend beschrieben wird.

3.1.1.2 Spinner-Flask-Methode

Bei der Spinner-Flask-Methode wird die Zellsuspension durch einen magnetischen Rührer in Bewegung gehalten. Unter diesen Bedingungen werden die Zellen ständig in der Schwebe gehalten und haben keine Möglichkeit, eine Bindung mit dem Kulturgefäß einzugehen.

Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass sie sich nicht für alle Zellarten eignet, da die auftretenden Scherkräfte recht groß sind und nicht alle Zellen sie überwinden können. Üblicherweise wird häufig eine Kombination aus den beiden oben genannten Techniken angewandt. Die initiale Aggregation der Zellen wird durch die Liquid-Overlay-Technik ermöglicht, die weitere Zucht erfolgt in der Spinner-Flask (Abb. 1). Ihr Hauptvorteil besteht in der Option, sehr viele Sphäroide herzustellen, und im Fehlen der Sedimentation. Nachteile sind unter anderem die schon genannten Scherkräfte und der leider geringe Einfluss auf die Größe der Sphäroide.



Abb. 1: Spinner-Flasks (Hersteller: Integra Biosciences)

3.1.1.3 Aktuelle Methoden der Sphäroidkultur

Neben den oben genannten Techniken wird in jüngster Zeit auch die Sphäroidbildung unter simulierter Mikrogravität mit Hilfe von so genannten Bioreaktoren erforscht (Hedlund *et al.*, 1999; Khaoustov *et al.*, 1999; Yoffe *et al.*, 1999; Ingram *et al.*, 1997). Besonders hervorzuheben sind hier der Bioreaktor, die Rotating Wall Vessel (Abb.2) sowie die Random Positioning Machine.

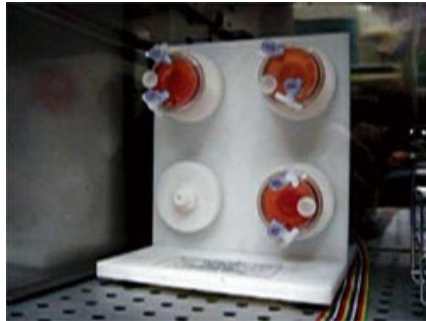


Abb. 2: Rotating Wall Vessel (entwickelt vom Johnson Space Center (NASA), Vertrieb durch die Firma Synthecon)

3.2 Das Zytoskelett der Zelle

Das Zytoskelett ist nicht nur ein Stütz- und Stabilisierungsgebilde der Zelle, sondern spielt bei verschiedenen Vorgängen wie Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Zellbeweglichkeit und Apoptose eine bedeutende Rolle. Es wird vermutet, dass das Zytoskelett außerdem die Funktion eines Schwerkraftsensors innehat.

Das Zytoskelett ist ein aus Proteinen aufgebautes Netzwerk im Zytoplasma jeder Zelle und besteht aus dynamisch auf- und abbaubaren, dünnen, fadenförmigen Filamenten (Abb.3). Der genaue Aufbau hierbei gliedert sich in Mikrotubuli, Mikrofilamentenbündel, kontraktile Mikrofilamente und intermediäre Filamente. Diese verbinden in einer Art Netzwerk die Rezeptoren der Membranoberfläche mit Kontaktpunkten am Kern (Ingber, 1999). So ist es nicht weiter verwunderlich, dass allein durch die Verformung der Form einer Zelle und der damit einhergehenden mechanischen Veränderung des Zytoskeletts die Zelldifferenzierung durch die Verformung transmembraner Adhäsionsrezeptoren an der Zelloberfläche beeinflusst wird (Ingber, 1999). In der eukaryotischen Zelle unterscheidet man, wie bereits erwähnt, drei Klassen von Zytoskelettfilamenten, die jeweils von unterschiedlichen Proteinen

bzw. Proteinklassen gebildet werden, spezifische Begleitproteine besitzen und sich auf jeweils verschiedene Weise an den Aufgaben des Zytoskeletts beteiligen: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Alle drei Klassen sind an der mechanischen Stabilisierung der Zelle beteiligt. Oberflächendifferenzierungen werden durch Aktinfilamente und Mikrotubuli unterstützt. Auch alle Formen aktiver Bewegung erfolgen entlang dieser beiden Filamenttypen, da sie über spezifische Motorproteine verfügen. Generell sind die Strukturen des Zytoskeletts mit für die Aufgabe und den Proteintyp spezifischen Begleitproteinen (u.a. Adaptorproteine und Motorproteine) assoziiert, welche die Filamente stabilisieren, sich an ihnen bewegen oder sie mit anderen Strukturen verbinden.

Die auffälligsten Bestandteile des Zytoskeletts sind die Mikrotubuli, Hohlzylinder mit einem Durchmesser von 25 nm, welche sich aus dem Protein Tubulin zusammensetzen. Intrazellulär sind sie mit ihren Motorproteinen (Dynein und Kinesin) für längere Transportvorgänge und die Bewegungen bzw. Befestigung der Organellen im Zytosol zuständig. Im Falle der Mitosespindel werden die replizierten Chromosomen an die beiden Kernpole gezogen. Mikrotubuli beteiligen sich nur wenig an der mechanischen Stabilisierung, sie stellen allerdings das charakteristische Binnengerüst der beweglichen Kinozilien.

Aktinfilamente (auch Mikrofilamente) sind Fasern mit einem Durchmesser von 7 nm. Sie stabilisieren die Zelle vor allem in netzartigen Anordnungen unterhalb der Plasmamembran und in Membranausbuchtungen (Mikrovilli, Pseudopodien), halten membranständige Proteine an ihrem Platz und ziehen in bestimmte Zelljunctionen ein (Adhärens-Kontakt). Die Motorproteine des Aktin bilden die Proteinklasse der Myosine. Auf der Aktin-Myosin-Interaktion basiert nicht nur die Bewegung der Muskulatur. Myosine verspannen vielmehr auch die Aktinfilamente zur Stabilisierung und sorgen für den Kurzstreckentransport zum Beispiel von Vesikeln zur Plasmamembran.

Unter dem Begriff Intermediärfilamente fasst man eine Reihe von Proteinfilamenten zusammen, welche ähnliche Eigenschaften aufweisen. Ihr Durchmesser beträgt um die 10 nm (8 bis 11 nm). Sie sind aufgrund ihrer größeren Stabilität im Vergleich zu Mikrotubuli und Aktinfilamenten am besten geeignet, mechanische Zugkräfte auszuhalten. Aus diesem Grund dienen sie hauptsächlich der mechanischen Stabilisierung der Zellen. Sie bilden deren Stützgerüst und strahlen in bestimmte Zellverbindungen ein (Desmosomen, Hemidesmosomen).

Vimentin ist ein intermediäres Filament, das von vielen Zellen mesenchymaler Herkunft wie Fibroblasten und Endothelzellen oder mesodermaler Herkunft wie Granulosazellen exprimiert wird. Der Name intermediäres Filament bezieht sich auf den Durchmesser (10-12 nm), der zwischen Mikrotubuli (25 nm) und den Mikrofilamenten (7 nm) liegt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Vimentin an vielen Vorgängen in der Zelle beteiligt ist. So

weisen Zellen und Gewebe, die arm an Vimentin sind, eine verminderte Motilität, chemotaktische Wanderung und eine verlängerte Wundheilung auf (Eckes *et al.*, 1998).

Scherkräfte werden nach neueren Erkenntnissen über Vimentinfilamente zum Zellkern und zu benachbarten Zellen geleitet (Helmke *et al.*, 2001). Eine weitere wichtige Funktion von Vimentin ist seine Tätigkeit als Dehnungsrezeptor der Zelle. Grimm *et al.* konnten 2002 an Schilddrüsenkarzinomzellen zeigen, dass es unter μg -Bedingungen zu einer Hochregulierung von Vimentin kommt (Grimm *et al.*, 2002).

α - und β -Tubulin sind Proteindimere, welche die Hauptbestandteile der Mikrotubuli repräsentieren. Mikrotubuli sind als Teil des Zytoskeletts in Vorgänge wie beispielsweise Zellteilung, Stofftransport in der Zelle und Kommunikation des Zellinneren mit der Zelloberfläche involviert. Die Entstehung von Mikrotubuli teilt man in zwei Phasen ein, die so genannte „Nucleation“ (Bildung eines Kernelements) und die „Elongation“ (Verlängerung des Kernelements). Während der Nucleation entsteht durch Verbindung eines Alpha- mit einem Beta-Tubulin-Molekül ein Heterodimer. Dreizehn solcher Heterodimere bilden eine ringförmige Anordnung mit einem Durchmesser von 25 nm. An dieses Kernstück lagern sich weitere aus Alpha- und Beta-Tubulin bestehende Heterodimere an und verlängern den so neu geformten Mikrotubulus. Dies bezeichnet man wie bereits erwähnt als „Elongation“. In der Zelle finden diese Vorgänge in der Nähe des Nukleus statt und zwar im so genannten „Microtubule Organizing Centre“ (MTOC). Jeder Mikrotubulus besitzt ein Plus-Ende (schnelles Wachstum) und ein Minus-Ende (langsames Wachstum). Polymerisierung und damit Wachstum von Mikrotubuli wird *in vivo* von der Hydrolyse von GTP zu GDP begleitet und vorangetrieben. Elongation findet *in vitro* aber auch ohne diese Hydrolyse statt (www.cytochemistry.net/Cell-biology; Downing und Nogales, 1999).

Tubuline sind Teil des Spindelapparats, der für die Mitose essenziell ist. Verschiedene Chemotherapeutika binden an Beta-Tubulin und stabilisieren dadurch die Tubulinpolymere. Dies verhindert weitere Aktivität, die im Auf- und Abbau dieser Polymere bestehen und somit die Zellteilung unterbinden (Verrills und Kavallaris, 2005; Islam *et al.*, 2004).

Zytokeratine sind Intermediärfilamente (IF) und stellen in ihrer Funktion den überwiegenden Teil des Zytoskeletts epithelialer Zellen da. Ihre Aufgaben und Eigenschaften bestehen allerdings nicht nur in ihrer Funktion als Stützkonstruktion der Zelle, so werden den Zytokeratinen Einfluss auf Faktoren der Apoptose, Signalmoleküle, Heat-Shock Proteine und anderer regulierender Moleküle zugeschrieben. Sie spielen eine Rolle in der Reaktion der Zelle auf Stress und in diesem Zuge auch bei der Therapieresistenz einiger Tumorarten (Dissertation Holger Pickenhahn 2005). Die Familie der Zytokeratine umfasst mehr als 20 Mitglieder, was sie zu einer der komplexesten Proteinfamilien unter den Intermediärfilamenten macht. Ähnlich wie bei der Bildung von Mikrotubuli assoziieren Zytokeratinmoleküle zu Heterodimeren, die wiederum zu Protofilamenten polymerisieren und

durch weitere Anlagerung von Zytokeratinmolekülen verlängert werden. Auch wenn der filamentöse Zustand *in vitro* der bevorzugte und weitaus stabilere zu sein scheint (Filamente lassen sich nur schwer abbauen), sind die Vorgänge in der Zelle *in vivo* sehr dynamisch und ein ständiger Auf- und Abbau ist im Gange (Chu *et al.*, 2002). Abbildung 3 zeigt den typischen Aufbau eines Zytoskeletts.

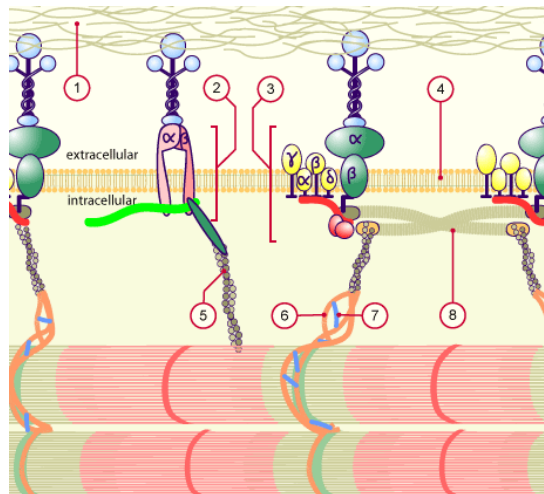


Abb. 3: 1. Basallamina; 2. Integrinkomplex; 3. Dystrophin-Glykoprotein-Komplex; 4. Sarkolemm; 5. Aktin; 6. Desmin; 7. Pektin; 8. Dystrophin (www.unifr.ch)

3.3 Die Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix (Extrazellulärmatrix, Interzellulärsubstanz, EZM) entsteht mittels Sezernierung der Zellen in den Interzellularraum. Eine extrazelluläre Matrix kommt grundsätzlich in allen vier Grundgewebetypen (Epithel-, Muskel-, Nerven-, Binde- und Stützgewebe) vor. Noch vor wenigen Jahren schrieb man – vereinfacht gesehen – den Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix lediglich eine Funktion als "Leim" (Kollagen) oder als gewebeinterner Wasserspeicher (Mucopolysaccharide) zu. Im Laufe der letzten Dekaden hat sich dieses Bild jedoch gewandelt. Nach heutiger Definition stellt die EZM die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden, dar. So dient die EZM – oberflächlich betrachtet – primär als eine Fixierungsmöglichkeit für die in ihr eingebetteten Zellen. Erst bei genauerer Betrachtung wird deutlich, dass zwischen Zellen und EZM stets eine wechselseitige

Beeinflussung besteht. Die EZM ist daher nicht statisch, sondern muss auf molekularer Ebene als im Fließgleichgewicht begriffen werden. Die Komponenten der EZM entstehen auf unterschiedliche Arten: Sie werden von Zellen synthetisiert und sezerniert, aber auch extrazellulär oder nach Endozytose intrazellulär abgebaut. Darüber hinaus wird durch die Bindung an bestimmte Komponenten der EZM durch Zellrezeptoren die Expression von Genen in den Zellen reguliert. Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation sowie der Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe resultieren damit ebenso aus der wechselseitigen Beeinflussung, die EZM und Zellen widerfährt. So können z.B. Moleküle, die als strukturgebende Proteine vorliegen, unter anderen Bedingungen Botenstoffe darstellen.

Es bleibt anzumerken, dass vor allem Matrix Metalloproteinasen (MMP) für den Abbau und Umbau der EZM verantwortlich sind. Bislang sind 20 verschiedene MMP bekannt.

Diese zinkhaltigen Enzyme werden entweder durch entsprechende Zellen in die EZM sezerniert oder befinden sich an der Zellmembran (MT-MMP, membrane type MMP), wobei das katalytische Zentrum des Enzyms in den extrazellulären Raum ragt. Diese Enzyme können in einer Pro-Form vorliegen, die mittels Abspaltung eines Peptides in das aktive Enzym umgewandelt wird (Zymogenaktivierung). Verschiedene MMPs haben hierbei auch eine unterschiedliche Substratspezifität. Die MMPs besitzen vielfältige biologische Bedeutungen, so ist zum Beispiel bekannt, dass Tumorgewebe, die MMP-2, MMP-9 und MMP-14 sezernieren, besonders zur Metastasierung neigen, da die exprimierten MMPs den Abbau von Basalmembranen und den Aufbau tumoreigener Blutgefäße unterstützen. Korrespondierend zu den MMPs existieren die so genannten Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMP). Diese Proteine hemmen die Aktivität der MMPs durch spezifische Bindung an deren katalytische Zentren. Dadurch kann der Ab- und Umbau des Gewebes durch MMPs moduliert werden. Bislang sind vier verschiedene TIMPs bekannt. Sie werden als lösliche Proteine in die EZM durch entsprechende Zellen sezerniert. TIMP-3 bildet hier eine Ausnahme. Dieses Protein wird in der EZM vornehmlich an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden und dauerhaft in der EZM sequestriert.

Die EZM besteht zu großen Teilen aus verschiedenen Proteinen und Glykoproteinen bzw. bestimmten Polysacchariden (Hay, 1951; Abb. 4). Die vorherrschende Proteinfamilie ist die der Kollagene, die verschiedene Arten von Fasern bilden und in fast jedem Gewebe vorhanden sind. Elastische Fasern werden aus den Proteinen Fibrillin und Elastin gebildet. Zudem gibt es eine große Vielfalt an Adhäsionsmatrixproteinen, welche die Zelle mit der EZM verbinden.

Die zweite große Gruppe stellen die Kohlenhydrate dar, und zwar besonders Glykosaminoglykane, langkettige Polysaccharide ganz bestimmter Einzelbausteine. Die Glykosaminoglykane assoziieren sich mit Proteinen und bilden noch größere

Makromoleküle, die Proteoglykane. Aus der Vielfalt und den Interaktionen von Proteinen, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen ergeben sich die Eigenschaften der EZM.

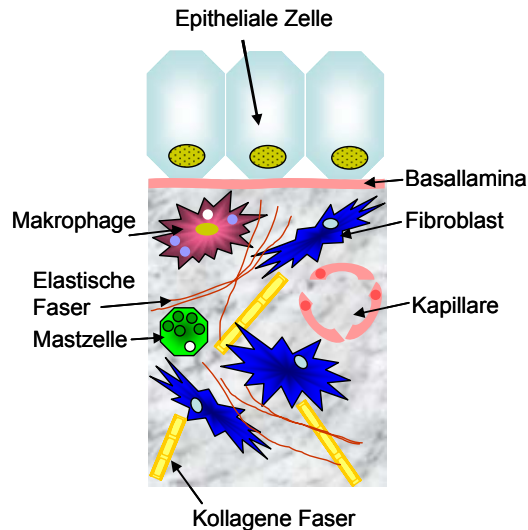


Abb. 4: Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (modifiziert nach: www.steve.gb.com)

3.3.1 Kollagen Typ I und III

Die Gruppe der Kollagene beinhaltet – soweit derzeit bekannt – etwa 20 Proteine. Zu den fibrillären Proteinen gehören unter anderem Kollagen Typ I und III. Sie kommen in der EZM von Haut, Sehnen, Knochen, Her, Schilddrüse usw. vor. Kollagen Typ I polymerisiert zu Kollagenfibrillen, welche sich zu Kollagenfasern verbinden. Dadurch entsteht Grundstoff für Kollagenfasern, und die Zellen sowie das Gewebe erhalten ihre Zugfestigkeit.

Kollagen Typ III bildet hingegen den Grundstock für retikuläre Fasern. Diese bilden Netze um Zellen und Gewebe und sind Namensgeber für das retikuläre Bindegewebe, in dem sie die vorherrschende Komponente der EZM sind. Aufgrund ihrer Längsrichtung sind Kollagenfasern zugfest, sie lassen sich so gut wie nicht dehnen. Jedes entsprechend auf Zug beanspruchte Bindegewebe enthält Kollagenfasern, die in Richtung der Belastung ausgerichtet sind. Ist ein Gewebe in jede Richtung beansprucht, liegen die Fasern geflechtartig vor (Dermis, Sklera, Kornea, Muskelfaszien, Dura mater, Stratum fibrosum der Gelenkkapseln). Bei Beanspruchung in nur eine Richtung sind die Fasern parallel ausgerichtet (besonders Sehnen und Bänder) und auch im Knochen und im Dentin (Zahnbein) sorgen Kollagenfasern für Zugfestigkeit. Kollagene sind allerdings nicht nur für

die mechanische Stabilität von Zellen verantwortlich, sondern stellen auch Signalmoleküle dar. Für die Signaltransduktion sind drei Rezeptortypen bekannt, an die Kollagene binden können: Integrine, Glykoprotein IV und der „Discoidin Domain Rezeptor“.

3.3.2 Fibronektin

Fibronektin ist ein hochmolekulares Glykoprotein welches 5% Kohlehydrate beinhaltet. Ihre verschiedenen Wirkungen entfalten Fibronektine nach Bindung an Integrin-Rezeptoren. Zusätzlich zu Integrinen bindet Fibronektin EZM-Komponenten wie Kollagen, Fibrin und Heparansulfat. Es wird im Blutplasma in löslicher Form gefunden, welche aus zwei 250 kDa Untereinheiten besteht die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Plasma Fibronektin wird in der Leber von Hepatozyten gebildet. Die unlösliche Form, die früher „cold-insoluble Globulin“ genannt wurde, ist ein großer Komplex von vernetzten Untereinheiten.

Es gibt verschiedene Isoformen von Fibronektin die alle das Produkt eines einzigen Gens sind. Die Struktur dieser Isoformen wird von drei Arten sich wiederholender internaler Regionen gebildet, die I, II und III genannt werden, welche unterschiedliche Längen aufweisen sowie die An- oder Abwesenheit von Disulfidbrücken. Alternatives Splicing der Prä-mRNA führt zur Kombination dieser drei Typen von Regionen aber auch zu einer variablen Regionen.

Zu ihren Wirkmechanismen zählen die fördernden Wirkungen auf die Zelladhäsion an andere Zellen (Alberts *et al.*, 1994), Unterlagen oder die EZM, und ihr Einfluss auf die Zellmorphologie, -migration und -differenzierung sowie auf die Organisation des Zytoskeletts (Abb. 5).

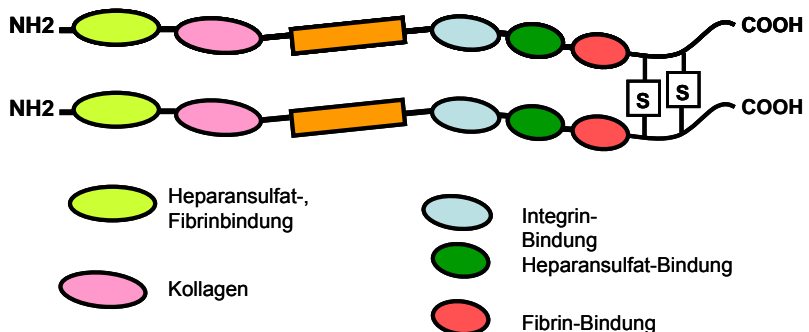


Abb. 5: Struktur von Fibronektin (modifiziert nach: www.unifr.ch)

3.3.3 Laminin

Laminin ein großes (400-600 kDa) heterotrimeres Glykoprotein, das aus α -, β - und γ -Einheiten besteht, die sich zu einer kreuzähnlichen Struktur zusammenfügen (Abb. 6) und hauptsächlich in der Basallamina von Zellen vorkommt. Hatte man früher erst ein Laminin identifiziert, und diesem nur strukturelle Funktionen zugewiesen, so sind heutzutage mindestens elf Laminine bekannt. Sie besitzen so genannte G-Domänen am Ende der Heterodimere, die eine wesentliche Rolle für Interaktionen mit der Zelle und anderen Matrixproteinen spielen. Zusätzlich zu der bekannten Beteiligung der Laminine an der Architektur der EZM und ihrer Beeinflussung von Zelladhäsion und -migration (Alberts *et al.*, 1994), findet man derzeit mehr und mehr Hinweise darauf, dass Laminine über Zelloberflächenmoleküle und -rezeptoren auch in der Lage sind, Zellproliferation und -Differenzierung zu steuern.

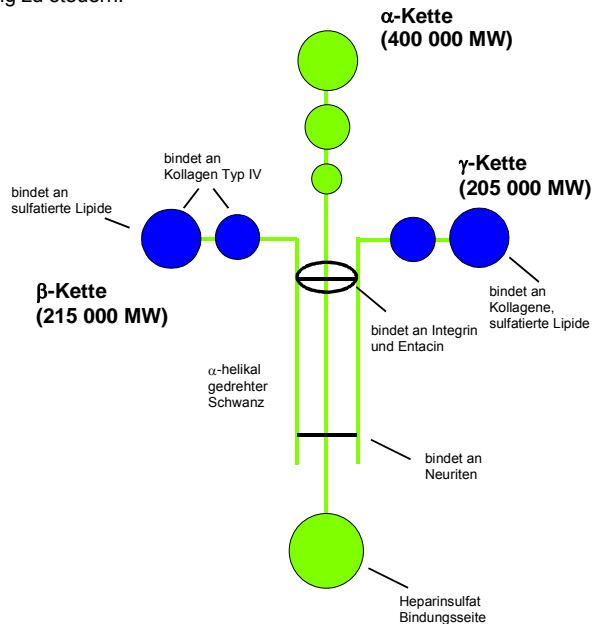


Abb. 6: Aufbau von Laminin (schematisch dargestellt)

3.3.4 Osteopontin

Sezerniertes Phosphoprotein 1 (Osteopontin, Bone Sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1), auch bekannt als SPP1 und üblicherweise als Osteopontin bezeichnet, ist ein

humanes Gen. Osteopontin ist ein Glykoprotein, welches erstmals 1986 in Osteoblasten identifiziert wurde (Oldberg *et al.*, 1986). Es ist ein extrazelluläres Strukturprotein und daher eine organische Komponente des Knochens. Synonyme für dieses Protein beinhalten Sialoprotein I und 44K BPP (Bone Phosphoprotein).

Das Gen hat 7 Exone, deren Abstand 5 Kilobasen in der Länge beträgt, und das im langen Arm des humanen Chromosoms 4q lokalisiert ist. Das Protein besteht aus etwa 300 Aminosäuren-Restbeständen und hat etwa 30 Kohlehydrat-Restbestände angehängt, welche 10 Sialinsäurereste beinhalten. Die C-Reste werden an das Protein während seines Aufenthaltes im Golgi-Apparat angehängt. Das Protein ist reich an Säureresten: 30-36% sind entweder Aspartat- oder Glutaminsäuren.

Osteopontin wird von verschiedenen Gewebetypen biosynthetisiert, unter anderem Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten, extraosseele Zellen im Innenohr, dem Gehirn, den Nieren, der Plazenta, Odontoblasten, einigen Knochenmarkszellen, hypertrophen Chondrozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Die Synthese von Osteopontin wird durch Calcitriol (1,25-dihydroxy-Vitamin D3) stimuliert.

Wie viele andere EZM-Proteine kann es Zellen durch Bindung an Integrine beeinflussen. Hierbei kann es das Migrations- und Adhäsionsverhalten von Zellen verändern. Man schreibt ihm eine Schlüsselrolle bei verschiedenen Fibrosierungsvorgängen wie z. B. in der Niere und im Herzen zu (Schnee und Hsueh, 2000).

3.3.5 Integrine

Bei den Integrinen handelt es sich um eine Familie transmembraner Zelloberflächenmoleküle, welche aus einer alpha- und einer beta-Kette bestehen. Sie sind hauptverantwortlich für die Interaktion von EZM und intrazellulären Strukturen. Integrine sind in der Lage EZM Proteine zu binden. Die Affinität zum Liganden ist hierbei im Vergleich zu anderen Rezeptortypen (z.B. Hormonrezeptoren) gering. Dies scheint für die Zelle sinnvoll zu sein, da sie sonst in ihrer Verbindung zur EZM zu unflexibel werden würde. Viele Matrixproteine werden von mehreren verschiedenen Integrinen gebunden. So hat z. B. Fibronectin mindestens acht Bindungspartner und Laminin mindestens fünf.

Integrine haben hierbei eine Funktion als Vermittler zwischen EZM und Zytoskelett, bzw. dem intrazellulären Raum. Nach der Bindung eines Matrixproteins bildet der zytoplasmatische Anteil der beta-Kette des Integrins eine Verknüpfung mit Talin und α -Aktin aus, die sich ihrerseits über weitere Bindungsproteine an Aktinfilamente anlagern. Diese transmembrane Anheftung ist für die Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Adhäsion notwendig.

Das Zytoskelett wird über Aktin beeinflusst, somit kommt es zu einer Auswirkung auf die Zellform, die Zellflexibilität und –mobilität. Neuere Forschung weist darauf hin, dass Integrine

auch in der Lage sind, über ihre Verbindung zu Matrixproteinen intrazelluläre Signalwege zu aktivieren und damit in den Stoffwechsel der Zelle einzugreifen (Alberts *et al.*, 1994).

Wichtig für die Herstellung von Bindungen ist unter anderem Talin, ein 270 kDa großes Protein, das wie oben bereits beschrieben, bei der Verbindung von Integrin zu Aktin beteiligt ist. Außerdem kann es Integrine in bestimmten Zellmembranbereichen induzieren und die Affinität der Integrine modulieren (Calderwood, 2003).

Auch Vinculin ist an den Bindungsvorgängen über Integrine beteiligt. Es besteht aus zwei Anteilen, einer 90 kDa schweren runden Kopfregion und einer 27 kDa schweren Schwanzregion. Vinculin spielt vor allem eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion, die bei Vinculinverlust erheblich gestört ist.

3.3.6 Transforming Growth Factor- β

Der Transforming Growth Factor- β ist ein so genanntes ubiquitäres Signalmolekül und kommt in drei Isoformen vor (TGF- β I-III). Am weitesten verbreitet ist TGF- β III.

TGF- β ist an verschiedenen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt, so z. B. an Proliferations- Differenzierungs-, Migrations-, und Angiogenesevorgängen. Des Weiteren ist er essenziell für das Überleben der Zelle. Die Wirkung von TGF- β wird über spezielle Rezeptoren vermittelt (T β R I-III), wobei er an T β R II direkt bindet, oder aber indirekt über Bindung an T β R III. In dieser Konformation wird anschließend T β R I phosphoryliert. Dieser Rezeptor ist wiederum für die ihm eigene Phosphokinase verantwortlich, über welche nun Proteine phosphoryliert werden, die in ihrer aktivierten Form in den Zellkern wandern, und dort zellspezifisch in Transkriptionsvorgänge eingreifen.

Eine Störung kann weitreichende Folgen haben. Veränderungen von TGF- β werden für die Angiogenese verantwortlich gemacht und können damit für die Blutversorgung von Tumoren sowie für die Resistenz von Tumoren gegenüber dem Immunsystem eine entscheidende Rolle spielen.

3.3.7 Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf Zellen

Das Überleben von Zellen ist abhängig von ihrer Verbindung zur extrazellulären Matrix (Rozzo *et al.*, 1997; Aoshiba *et al.*, 1997; Fukai *et al.*, 1998; Abb. 7). In den meisten Fällen löst eine Unterbrechung dieser Verbindung in den Zellen Apoptose aus (Frisch *et al.*, 1994). Dieser Vorgang wurde von Frisch *et al.* als Anoikis (aus dem Griechischen „heimatlos“) bezeichnet. Er wird durch so genannte Integrine vermittelt, deren Liganden verschiedene Komponenten der EZM sind. Hierbei gilt, dass bestimmte Integrine spezifisch für bestimmte Proteine der EZM sind, wobei ein Integrin durchaus in der Lage sein kann, mehrere Arten

von EZM-Proteinen zu binden. Integrine wirken auf zwei verschiedene Arten: einerseits durch Interaktion mit Wachstumsfaktoren, andererseits durch Aktivierung verschiedener Kinasen und des Inositol-3-Phosphat-Weges (Borges *et al.*, 2000; Schwartz *et al.*, 2001). Integrine sind in der Lage, die Zelle gegen apoptotische Stimuli wie beispielsweise zytotoxische Substanzen, Strahlung, oder Serumentzug zu schützen. Sie beeinflussen die Expression und die Aktivität verschiedener Mitglieder der Bcl-2 Familie und p53 (Strömblad *et al.*, 1996).

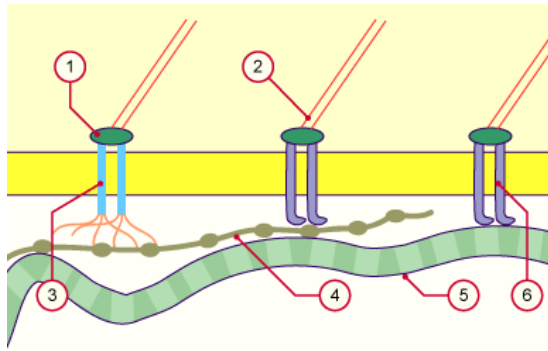


Abb. 7: 1. Adaptorprotein 2. Aktinfilamente 3. Syndecan 4. Fibronectin 5. Kollagenfibrille 6. Integrine mit einer α - und β -Kette (Quelle: www.unifr.ch)

3.4 Apoptose

Zellen können auf verschiedene Art untergehen, zum einen aufgrund von Apoptose und zum anderen durch Nekrose. Nekrose entsteht durch eine schwere mechanische oder chemische Schädigung oder durch völliges Fehlen von Energiereserven. Zuerst verliert die Zellmembran ihre Integrität. Dadurch kommt es zum Platzen der Zelle und das Zytoplasma fließt in den Zellzwischenraum. Dieser Prozess löst in der Regel eine Entzündung aus. Beispiele für Nekrose sind Verbrennungen, Verätzungen und das Sterben von Zellen durch Hypoxie bei Minderversorgung mit Blut.

Im Unterschied zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver Prozess, der einem festen Programm folgt. Es kommt zum geregelten Untergang der Zelle und der Beseitigung ihrer Reste. Sie ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase während der Entwicklung von Organismen (Zuzart-Luis *et al.*, 2002).

Programmierter Zelltod kommt nicht nur bei mehrzelligen Lebewesen vor, es gibt Hinweise, dass auch Einzeller sich diesen Mechanismus zunutze machen. Beispielsweise gibt es

Bakterien, die Selbstmord begehen, sobald sie einen Bakteriophagen entdecken und dadurch die Ausbreitung der Infektion verhindern (Vaux *et al.*, 1996).

Unabhängig vom Auslöser der Apoptose sind die darauf folgenden morphologischen Veränderungen der Zelle einheitlich. Es kommt zum Ausstülpfen der Zellmembran („membrane blebbing“). Anschließend wird die DNA durch Nukleasen gespalten und es kommt zur Kondensation des Chromatins. Der Kern zerfällt in Bruchstücke und die Zelle schrumpft. Nach dem Zerfall der Zelle wird sie von den umgebenden Zellen oder Makrophagen phagozytiert und damit aus dem Gewebe entfernt.

Grob beschrieben lässt sich der Prozess der Apoptose in zwei Phasen unterscheiden, zum einen die Initiationsphase und zum anderen die Effektorphase.

Die Initiationsphase untergliedert sich in zwei Vorgänge, den extrinsischen und den intrinsischen Weg.

Der extrinsische Weg (Apoptose Typ I) wird durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie (beispielsweise CD95) ausgelöst. Diese so genannten Todesrezeptoren besitzen in ihrem zytoplasmatischen Anteil eine Todesdomäne („death domain“). Liganden werden unter anderem von T-Lymphozyten sezerniert. Beispiele sind der Tumor Nekrose Faktor, sowie weitere Zytokine. Die death domains (DD) bilden durch die induzierte Trimerisierung des Rezeptors eine Struktur aus, an welcher nun Adaptormoleküle mit eigener Todesdomäne mittels homotypischer Interaktion binden können. Nachfolgend wird das „TNF-Rezeptor assoziierte Protein“ (TRADD) rekrutiert (Baker und Reddy, 1996). An die DD des TRADD bindet wiederum das „Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD) (Chinnaiyan *et al.*, 1995). FADD besitzt nicht nur eine death domain, sondern darüber hinaus eine Todeseffektordomäne (DED, „death effector domain“), an welcher proCaspase-8 mit ihrer DED an den Komplex bindet. Durch die entstandene hohe lokale Konzentration aktiviert sich proCaspase-8 autokatalytisch zu Caspase-8, welches folgend die so genannte Caspasen-Kaskade auslöst. Mittels einer signalverstärkten Rückkopplung werden weitere Caspase-8 Moleküle aktiviert.

Beim extrinsischen Weg unterscheidet man zwischen aktiver (durch Aktivierung von Rezeptoren induziert) und passiver (ausgelöst durch Entzug von Wachstumsfaktoren, z.B. Neurotrophine) Apoptose.

Der intrinsische Weg (Apoptose Typ II) verläuft über die Mitochondrien und führt zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren wie Smac/DIABLO ins Zytoplasma. Eine Aktivierung dieses Weges erfolgt beispielsweise über p53, einem Tumor-Suppressor, der durch Schädigung der DNA aktiviert wird. p53 stimuliert die Expression pro-apoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 Familie (z.B. Bax, Bad), wodurch es zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum

kommt (Breckenridge *et al.*, 2003). Chemotherapeutika wirken direkt auf die Mitochondrien und können so die Typ II Apoptose induzieren. Cytochrom c bindet zusammen mit dATP an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und verursacht somit eine Konformationsänderung des Proteins. Erst durch diese Konformationsänderung wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 zugänglich, und sie kann an die CARD Domäne der ProCaspase-9 binden (Hu *et al.*, 1999). Die Bildung dieses Heterodimers ist eine Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase-9. Der entstandene Komplex, auch Apoptosom genannt, stellt die aktive Form der Caspase-9 dar, welches nachfolgend die Caspase-Kaskade aktiviert. Auch hier kommt es zu einer Verstärkung mittels Rückkopplung, da innerhalb der Kaskade Caspase-7 rückwirkend Caspase-9 aktiviert.

Caspase-8 spielt auch beim intrinsischen Weg eine Rolle, da es durch Spaltung des zytosolischen Proteins Bid („BH3 interacting domain death agonist“) das C-terminale Spaltprodukt tBid („truncated Bid“) freisetzt (Li *et al.*, 1998). Dieses vermittelt wiederum nach der Translokation an die Mitochondrien die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren und führt seinerseits zur Aktivierung von Caspase-9.

Die Effektorphase besteht aus so genannten Effektorcaspasen, vor allem Caspase-3, -6 und -7, die zur Apoptose der Zelle führen. Caspasen aktivieren zum einen sekundäre Zielproteine wie CAD (Caspase-aktivierte DNase) durch limitierte Proteolyse, zum anderen beteiligen sie sich aktiv am Abbau von Laminin und Aktin. Weiterhin kommt es zu einer caspasevermittelten Unterdrückung der DNA-Reparatur. Schlussendlich schnürt die Zelle sich in kleine Vesikel ab, welche dann von Phagozyten aufgenommen werden können.

Bei der Unterdrückung der Apoptose spielen verschiedene Proteine eine wichtige Rolle, unter anderem die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie wie Bcl-2 und Bcl-x_L, sowie die IAPs (Apoptose-inhibitorische Proteine, „inhibitor-of-apoptosis proteins“). Nicht zu vergessen sind Proteinkinase B (auch bekannt als Akt), beispielsweise im Zusammenhang mit Rezeptoren der Trk-Familie, und Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie sowie der Transkriptionsfaktor NF- κ B.



Abb. 8: Apoptotische Zelle (Quelle: www.jedn.ipmc.cnrs.fr)

3.4.1 Extrinsische Faktoren

3.4.1.1 Fas (CD95)

Als extrinsische Faktoren werden im Allgemeinen die Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie bezeichnet. Am besten erforscht ist CD95, auch Fas genannt. An seinem Beispiel soll hier der Mechanismus der Rezeptoren erklärt werden.

Fas ist ein Typ-I-Transmembranprotein (c-Terminus zytosolisch, N-Terminus extrazellulär), dessen extrazelluläre Domäne cysteinreich ist, was zur Interaktion von Ligand und Rezeptor notwendig ist, da diese gestört wird, sobald die Cysteinanteile zerstört sind (Orlinick *et al.*, 1997). Von einer ganzen Reihe normaler Zellen wird Fas immer exprimiert, so zum Beispiel von Lymphozyten, Hepatozyten und von Epithelzellen der Ovarien (Lombard *et al.*, 2003). Fas-Ligand ist der entsprechende Ligand, dessen Bindung Apoptose auslöst. Es handelt sich hierbei um ein Typ-II-Transmembranprotein, dessen Expression im Gegensatz zum Rezeptor selbst beschränkt ist. Zellen, die über Fas-Ligand verfügen, sind aktivierte T-Zellen (Suda *et al.*, 1995), Natürliche Killerzellen (Oshimi *et al.*, 1996) und so genannte immunprivilegierte Gewebe wie Sertolizellen (Bellgrau *et al.*, 1995) sowie Kornea und Retina des Auges (Griffith *et al.*, 1995).

Nach Bindung von Fas-Ligand an Fas kommt es zu einer Trimerisierung von Fas. Nachfolgend kommt es zur Bindung von Adaptermolekülen (Fas associated death domain,

FADD) an die zytoplasmatischen Todesdomänen. Nach Bindung von ProCaspase-8 und -10 an die DED der entstandenen Komplexe kommt es zur autolytischen Spaltung und Aktivierung von Caspase-8.

Den Komplex aus Fas-Trimer, FADD und Procaspasen bezeichnet man als „Todesinduzierenden Signalkomplex“ (death inducing signaling complex, DISC) (Sharma *et al.*, 2000; Nagata 1997).

Die Caspasen-8 und -10 werden als Initiatorcaspasen bezeichnet; ihr Substrat sind die Procaspasen-2, -3, -4, -6, -7 und -9. Als Effektorcaspasen bezeichnet man die Caspasen-3 und -7. Ihr Substrat wiederum sind zelluläre Proteine, unter anderem Enzyme, die sie aktivieren und damit die Apoptose vorantreiben (Thornberry *et al.*, 1998). Caspase-3 spaltet des Weiteren die Procaspasen-6 und -7, welche anschliessend Procaspase-3 aktivieren. Dies verstärkt das Todessignal und stellt sicher, dass die durch Fas eingeleitete Apoptose ausgeführt wird.

3.4.1.2 Welche Bedeutung hat Fas für den Körper?

Eine Störung der Interaktion von Fas mit seinem Liganden hat schwere Folgen für die Zellhomöostase. An Fas-Knockoutmäusen konnte beobachtet werden, dass es zu Lymphadenopathien, Splenomegalie, und Hypergammaglobulinämie kommt, und die Tiere frühzeitig sterben (Singer *et al.*, 1994; Orlinick *et al.*, 1997).

So beruht zum Beispiel ALPS (Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom) beim Menschen auf einer Mutation des Fas-Systems. Bei Patienten wurden hierbei Mutationen an verschiedenen Loci des Fas-Gens gefunden wurden, was darauf hindeutet, dass jegliche Mutation das Syndrom auslösen kann (Straus *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1999).

Im Immunsystem des Menschen bewirkt Fas eine Abschwächung der Immunantwort, indem es aktivierte periphere Lymphozyten zerstört. Einerseits verhindert dies eine überschießende Immunreaktion, zum anderen trägt die zum Erhalt der Selbsttoleranz bei (Griffith *et al.*, 1995; Nagata, 1996). Fällt diese Funktion aus, so kann dies als Folge zu Autoimmunerkrankungen führen.

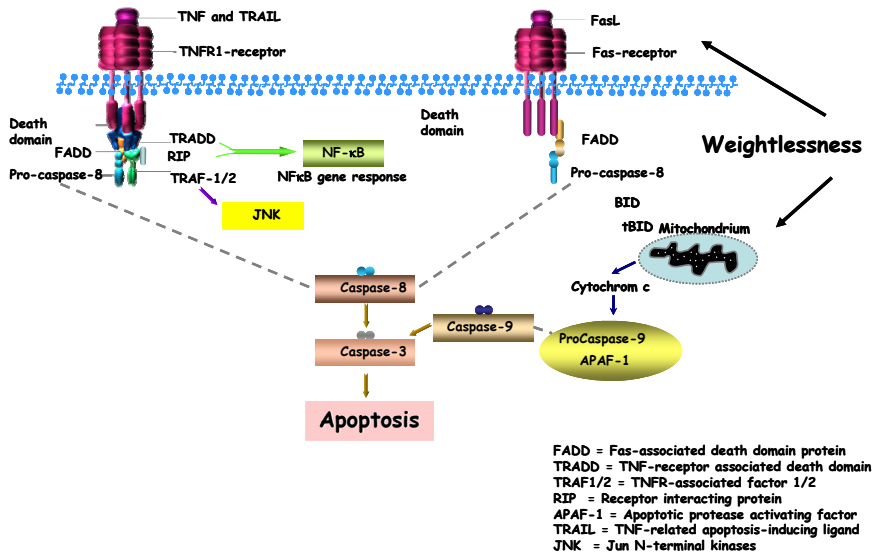


Abb. 9: Effekte der Schwerelosigkeit vermittelt über Fas-, bzw. TNF-Pathway (Grimm *et al.*, 2006)

3.4.2 Intrinsische Faktoren

3.4.2.1 Die Bedeutung der Bcl-2 Familie

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie wurden nach dem zweiten gefundenen Gendefekt, dem „B cell lymphoma“ benannt, bei dem es zu einer erhöhten Expression von Bcl-2 kommt (Tsujiyoto *et al.*, 1985). Bislang sind 15 Mitglieder der Familie bekannt, die entsprechend ihrer Wirkung in pro- und anti-apoptische Proteine unterteilt werden. Jedes Familienmitglied besitzt, unabhängig von seiner Wirkweise, mindestens eine der vier Bcl-2 Homologiedomänen (BH1-BH4) (Huang *et al.*, 1998). Die proapoptischen Proteine, das bekannteste hierbei ist Bax, werden in zwei Untergruppen unterteilt. Die erste Gruppe besitzt noch die Domänen BH1-BH3, die zweite Gruppe setzt sich aus „BH3-only“ Proteinen zusammen, die bis auf BH3 keine Homologie mit Bcl-2 mehr aufweisen.

Die Tatsache, dass alle der BH3-Gruppe angehörnden Proteine proapoptisch sind, hat zu der Annahme geführt, dass BH3 essenziell für die proapoptische Eigenschaft ist (Zha *et al.*, 1997). Bax und Bcl-2 sind in der Lage, sich in intrazelluläre Membranen zu integrieren und dort ionendurchlässige Kanäle zu formen, was für ihre Funktion wichtig ist. Eine weitere

wichtige Eigenschaft ist die Fähigkeit der Bcl-2 Proteinfamilie, miteinander Homo-oder Heterodimere bzw. -oligomere zu bilden (Huang *et al.*, 1998).

In nicht apoptotischen Zellen befindet sich Bax in Membranen von Mitochondrien des endoplasmatischen Retikulums und des Kerns (Germain *et al.*, 2003). Der Großteil der proapoptotischen Proteine befindet sich im Zytosol der Zelle. Dies ändert sich, sobald ein apoptotisches Signal die Zelle trifft. Dann ändert Bax seine Konformation, wodurch es in der Lage ist, sich zur äußeren Mitochondrienmembran zu begeben und sich in diese zu integrieren, was für seine Funktion ausschlaggebend ist (Wolter *et al.*, 1997).

Sobald ein Apoptosesignal an der Zelle ankommt, begibt sich Bax (wie oben beschrieben) zur Mitochondrienmembran und bildet dort Kanäle, wozu es Homodimere oder -oligomere formt (Antonsson *et al.*, 2000, 2001). Aufgrund dieser Kanäle verändert sich das Membranpotenzial. Dies bewirkt neben der Freisetzung anderer Stoffe die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Cytochrom c wiederum bindet an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) und bildet anschließend zusammen mit Caspase-9 das so genannte Apoptosom (Burlacu, 2003; Borner, 2003), welches in der Lage ist, Caspase-3 zu aktivieren. Ist Caspase-3 aktiviert, so wird Apoptose induziert und ist nicht mehr zu stoppen (Abb. 10).

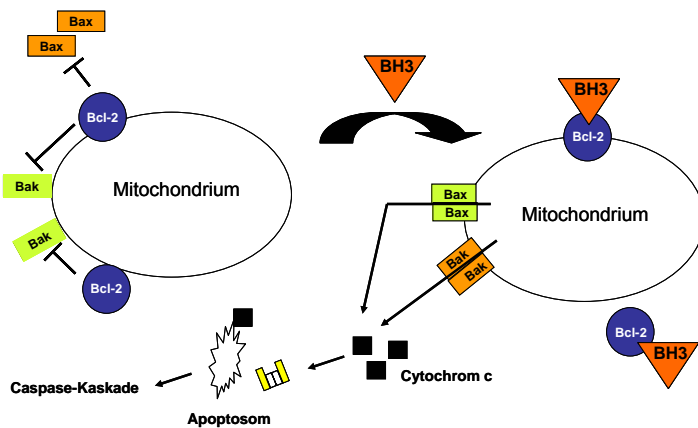


Abb. 10: Wirkung der BCL-2 Familie (modifiziert nach www.celldeath.de). BH3 besitzt proapoptotische Eigenschaften, es verbindet sich mit Bcl-2, blockiert dessen antiapoptotischen Wirkmechanismus und ermöglicht so die Konformationsänderung von Bax. Bax integriert sich in die äußere Mitochondrienmembran, bildet Kanäle aus und es kommt

zur Freisetzung von Cytochrom c, sowie nachfolgend zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade.

3.4.2.2 Die Funktion von p53 im Zeichen der Apoptose

Wird p53 aktiviert, so führt dies zur Blockade des Zellzyklus in den Stadien G1 und G2 und letztendlich zur Apoptose (Gualberto *et al.*, 1998). Während die durch p53 vermittelte Arretierung des Zellzyklus durch Induktion von p21Cip1/Waf1 recht eindeutig und gut beschrieben ist (Soria *et al.*, 2006), scheint der genaue Weg über den p53 Apoptose vermittelt, noch nicht vollkommen geklärt. In der nicht apoptotischen Zelle wird p53 ständig abgebaut und damit auf einem konstant niedrigen Niveau gehalten. Es geht dazu eine Bindung mit Mdm-2 ein, was einerseits p53 inaktiviert und es andererseits zum Ziel proteolytischen Abbaus durch Ubiquitin macht. Die p53 Homöostase wird gestört, wenn in diesem Abbau eingegriffen wird. Bei DNA-Schädigungen werden sowohl MDM-2 als auch p53 phosphoryliert und gehen dadurch keine Bindung mehr miteinander ein, was sowohl den Abbau als auch die Inaktivierung durch die Bindung aufhebt. Neben DNA-Schädigungen können auch andere schädliche Einflüsse wie Metabolitenentzug, physikalische Beschädigung, Hitzeschock, Hypoxie oder Expression von Onkogenen zur Stabilisierung und damit Akkumulation von p53 führen. Diese Akkumulation bewirkt die vermehrte Transkription von Bax und Fas und vermindert die Transkription von Bcl-2, womit sich der Kreis schließt. Es sind bislang noch nicht alle Mechanismen und Ebenen geklärt, durch die p53 seine Wirkung entfaltet. p53 wird durch DNA-Schädigung aktiviert. Daher kann ein Funktionsverlust weitreichende Folgen haben (Abb. 11). p53 stoppt normalerweise den Zellzyklus und beseitigt dann, falls nötig, die beschädigte Zelle durch Apoptose. Kommt es, aus welchen Gründen auch immer, zu einer Fehlfunktion von p53, so hat dies weitreichende Konsequenzen: Die DNA wird nicht repariert und die Zelle teilt sich weiter mit der beschädigten oder mutierten DNA. Es entsteht eine entartete Zelle mit verändertem Erbgut.

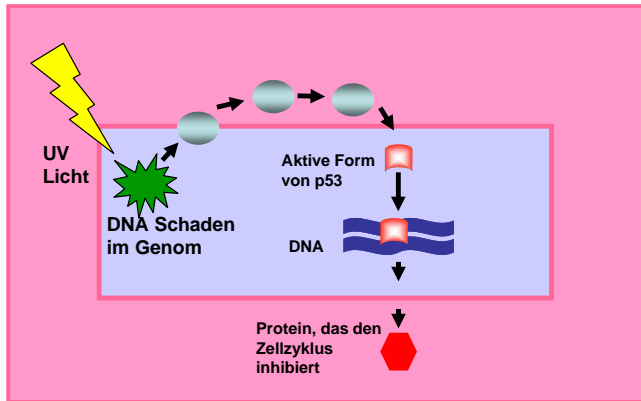


Abb. 11: p53-Pathway (modifiziert nach: www.fig.cox.miami.edu). Wird die DNA im Genom geschädigt, dann wird p53 freigesetzt, welches anschließend den Zellzyklus stoppt und die beschädigte Zelle mittels Apoptose beseitigt.

3.4.2.3 NF- κ B

Nuklear-Faktor kappa B (NF- κ B) ist ein primärer Transkriptionsfaktor, der in allen Zelltypen vorkommt, und der in die zelluläre Antwort auf Stimuli wie Stress, Zytokine, freie Radikale, ultraviolette Strahlung und bakterielle sowie virale Antigene eingebunden ist. NF- κ B spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Immunantwort auf Infektionen. Passend hierzu führt eine unkorrekte Regulation von NF- κ B zu Krebs, Entzündungen und autoimmunen Erkrankungen, septischem Schock, viralen Infektionen und fehlerhafter Immunentwicklung. Die Mitglieder der NF- κ B-Familie besitzen eine strukturelle Homologie mit dem retroviralen Onkoprotein v-Rel (Gilmore, 2006). Es sind fünf Mitglieder der NF- κ B-Familie in Säugetieren bekannt:

- NF- κ B1 (p50)
- NF- κ B2 (p52)
- RelA (p65)
- RelB
- c-Rel

Darüber hinaus gibt es NF- κ B-Proteine in niederen Organismen wie beispielsweise der Fruchtfliege *Drosophila*, Seeigel und Seeanemonen. Während alle Mitglieder der NF- κ B-

Familie eine homologe Rel-Domäne an ihrer N-terminalen Hälfte besitzen, hat eine Unterfamilie, welche RelA, RelB und c-Rel beinhaltet, eine Trans-Aktivierungs-Domäne an ihrem C-Terminus. Im Gegensatz hierzu werden NF- κ B1 und NF- κ B2 als lange Vorläufer synthetisiert (p105 und p199), welche einem Prozess unterworfen werden, um die ausgereiften NF- κ B-Untereinheiten p50 und p52 zu bilden. Die Reifung von p100 und p105 wird durch den Ubiquitin/Proteosomen Pathway reguliert und beinhaltet eine selektive Degradierung ihrer C-terminalen Region, welche Ankyrin Wiederholungen besitzt. Während die Generierung von p52 aus p100 ein eng regulierter Prozess ist, wird p50 mittels eines zusammensetzenden Prozesses von p105 generiert (Karin *et al.*, 2000; Senftleben *et al.*, 2001).

Ein Teil der Bedeutung von NF- κ B in der Regulation der zellulären Antwort ist, dass es zur Kategorie der „schnell-wirkenden“ primären Transkriptionsfaktoren zählt. Das bedeutet, Transkriptionsfaktoren, die bereits in der Zelle in inaktivem Zustand vorliegen und keine neue Proteinsynthese benötigen, um aktiviert zu werden. Dies ermöglicht es NF- κ B als „first responder“ auf verletzende Zellstimuli zu agieren. Die Stimulierung einer großen Anzahl von Zelloberflächenrezeptoren führt zur Aktivierung von NF- κ B und zu sehr schnellen Veränderungen der Genexpression (Abb.12).

Verschiedene bakterielle Produkte können NF- κ B aktivieren. Die Identifizierung des Toll-like Receptors (TLRs) ist ein spezieller Weg, um Moleküle zu erkennen. Die Entdeckung, dass die Stimulierung der TLRs zu einer Aktivierung von NF- κ B führt, hat unser Verständnis, wie unterschiedlich Pathogene NF- κ B aktivieren können, verbessert.

Anders als RelA, RelB und c-Rel beinhalten p50 und p52 keine trans-Aktivierungsdomänen in ihrem C-Terminus. Beide NF- κ B-Familienmitglieder spielen Schlüsselrollen in der Regulierung der Spezifität der NF- κ B-Funktion. Obwohl die Homodimere von p50 und p52 generell die Transkription von κ B unterdrücken, nehmen sie beide in der Transaktivierung von Zielgenen teil, indem sie Heterodimere mit RelA, RelB und c-Rel bilden (Li *et al.*, 2002). Darüber hinaus binden die Homodimere p50 und p52 auch an das nukleäre Protein Bcl-3 und bilden dadurch potente Transkriptions-Aktivatoren (Fujita *et al.*, 1993; Franzoso *et al.*, 1992; Bours *et al.*, 1993).

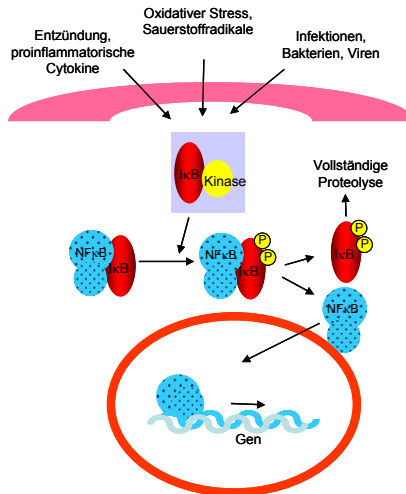


Abb. 12: Regulation des NF- κ B. In der Zelle liegt NF- κ B in inaktivem Zustand vor und reagiert als „first responder“ auf äußere Stimuli.

3.5 Der Wachstumsfaktor bFGF

Basic fibroblast growth factor, auch bekannt als bFGF oder FGF2, ist ein Mitglied der Fibroblast Growth Factor Familie. In Vertebraten kommen die 22 Mitglieder der FGF Familie in einem Größenverhältnis von 17-34 kDa vor und teilen beinhalten eine 13-71%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen. Die FGFs besitzen eine hohe Affinität für Heparansulfatproteoglykan und veranlassen Heparansulfat dazu, einen der vier zelloberflächennahen FGF-Rezeptoren zu aktivieren (Ornitz and Itoh, 2001). Die FGFR Tyrosinkinase-Rezeptoren beinhalten zwei oder drei immunoglobulin-ähnliche Domänen und eine heparin-bindende Sequenz (Lee *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1990; McKeehan *et al.*, 1998).

Eine wichtige Eigenschaft der FGF Biologie beinhaltet die Interaktion zwischen FGF und Heparin oder Heparansulfat-Proteoglykan (Ornitz, 2000). Diese Interaktionen stabilisieren die FGFs gegenüber thermaler Denaturierung und Proteolyse und können des weiteren ihre Diffusion und Freisetzung in den interstitiellen Raum beeinflussen (Moscatelli, 1987; Flaumenhaft *et al.*, 1990). FGFs müssen an den nahegelegenen Heparansulfat-

Bindungsstellen gesättigt sein, bevor sie einen Einfluss auf weiter entferntes Gewebe ausüben können, ansonsten müssen sie durch Heparin/Heparansulfat-degradierende Enzyme mobilisiert werden. Die Interaktion zwischen den FGFs und Heparansulfat resultiert in der Bildung von Dimeren und übergeordneten Oligomeren (Mach *et al.*, 1993; Herr *et al.*, 1997; Moy *et al.*, 1997). Obwohl die biologisch aktive Form von FGF schlecht definiert ist, wurde es bewiesen, dass Heparin für FGF nötig ist um effektiv FGFR in den Zellen zu aktivieren, die nur unzureichend oder gar nicht in der Lage sind, Heparansulfat-Proteoglykan zu synthetisieren, oder in Zellen, die mit Heparin/Heparansulfat-degradierenden Enzymen bzw. einem Inhibitor der Sulfatierung vorbehandelt sind (Ornitz *et al.*, 1992; Rapraeger *et al.*, 1991; Yayon *et al.*, 1991).

In normalem Gewebe ist der basic Fibroblast Growth Factor in der Basalmembran und in der subendothelialen extrazellulären Matrix der Blutgefäße enthalten. Es wurde hypothetisiert, dass sowohl bei der Wundheilung, als auch im normalen Gewebe und der Tumorentwicklung die Aktion der Heparansulfat-degradierenden Enzyme bFGF aktiviert, was wiederum die Formierung neuer Blutgefäße bewirkt, ein Prozess, der als Angiogenese bekannt ist. Im erwachsenen Organismus sind FGFs homöostatische Faktoren und besitzen eine Rolle in der Gewebereparatur sowie als Antwortmechanismus auf Verletzungen (Ornitz and Itoh, 2001). FGF1 und FGF2 werden möglicherweise von beschädigten Zellen freigesetzt, oder aber durch einen exozytotischen Mechanismus, der unabhängig vom Pfad des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates ist (Mignatti *et al.*, 1992).

Strukturelle Studien an FGF1 und FGF2 haben 12 antiparallele β -Fasern in der konservierten Core-Region des Proteins gezeigt (Zhu *et al.*, 1991; Eriksson *et al.*, 1991). FGF1 und FGF2 besitzen eine β -Kleeblatt-Struktur, die vierfach-verwobene β -Blätter beinhaltet, welche in einer dreieckigen Anordnung angesiedelt sind (Faham *et al.*, 1998).

In vitro hat bFGF gezeigt, dass es ein sehr potentes Mitogen und chemoattraktiv für kapilläre Endothelzellen ist (Gospodarowicz *et al.*, 1985).

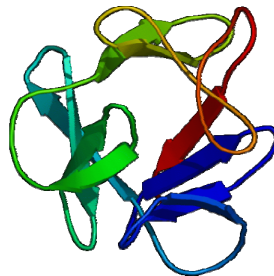


Abb. 13: Anordnung des basic Fibroblast Growth Factor (Quelle: www.hyper.quifis.uv.es)

3.6 Endothelin-1

Endothelin ist ein 21 Aminosäuren langes vasokonstriktorisches Peptid, das eine Schlüsselrolle in der vaskulären Homöostase spielt. Es ist einer der stärksten Vasokonstriktoren. Es gibt drei Isoformen mit variierenden Expressionsregionen und zwei Rezeptortypen, ETA und ETB. ETA wird in glatter Muskulatur gefunden und die Bindung von Endothelin an ETA steigert die Vasokonstriktion und die Natrium-Retention (Abb. 14). ETB ist vor allem auf endothelialen Zellen angelegt. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Steigerung der Natriurese, der Diurese und NO-Freisetzung.

In einem gesunden Organismus wird die Balance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation einerseits von Endothelin und Calcitonin sowie anderen Vasokonstriktoren, bzw. Vasodilatoren wie Stickstoff und Prostacyclin reguliert.

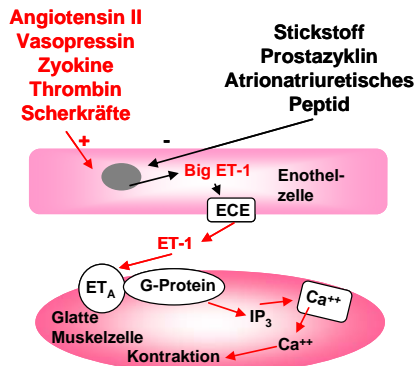


Abb. 14: ET-1 Produktion und sein Mechanismus (modifiziert nach: www.cvphysiology.com). Nach externem Reiz wird der Endothelin-1-Vorläufer Big ET-1 freigesetzt. Dieser wird vom Endothelin Converting Enzyme (ECE) zu ET-1 konvertiert und bindet an den G-Proteingekoppelten ET_A Rezeptor der glatten Muskelzelle. Über IP₃ kommt es schließlich zur Calcium-Freisetzung in der Zelle und somit zur Kontraktion.

3.7 eNOS

Die NO-Synthase wird in eukaryotischen Zellen als dimerisches calmodulin-abhängiges oder calmodulin-beinhaltendes Cytochrom p450-ähnliches Hämoprotein präsentiert, das Reduktase und Oxygenase katalytische Domänen in einem Monomer kombiniert (Chinje and Stratford, 1997). Nos ist eine Familie aus verwandten Enzymen, die von verschiedenen

Genen codiert wird (Tylor et al., 1997). Die drei Isoformen lauten nNOS (Neuronal NOS), iNOS (Inducible NOS) und eNOS (Endothelial NOS).

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS 3) synthetisiert aus L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO). NO relaxiert die glatten Muskelzellen der Gefäße und inhibiert deren Wachstum und Migration, blockiert Plättchen- und Leukozytenaggregation und limitiert die Oxidation von atherogenem LDL. Eine reduzierte NO-Syntheseleistung ist mit der Entwicklung einer koronaren Atherosklerose bei einer erblichen Komponente vergesellschaftet. Das NOS 3-Gen besteht aus 26 Exons auf Chromosom 7q35. eNOS ist mit der Plasmamembran assoziiert, die Zellen umgibt, und mit der Membran von Golgi-Körperchen im Inneren von Zellen.

3.8 Die „Random positioning machine“ in ihrer Verwendung als Klinostat

Klinostaten wurden bereits im 17. Jahrhundert zur Erforschung von Schwerkraft auf das Pflanzenwachstum verwendet (Klaus, 2001). Heute gibt es neben den damals verwendeten zweidimensionalen Klinostaten den in dieser Dissertation verwendeten dreidimensionalen Klinostaten (Cogoli, 1992). Weitere Geräte, die zur Simulation von Mikrogravität entwickelt wurden, sind beispielsweise der so genannte „Rotating Wall Vessel“-Bioreaktor, oder die „Free Fall Machine“. Heutzutage ist es noch nicht möglich, mithilfe dieser Maschinen alle Aspekte der Mikrogravitation nachzuahmen, jedoch stimmen die bisherigen gefundenen Effekte mit den Resultaten, die bei Weltraumflügen gewonnen werden, in den meisten Fällen überein. Klinostaten sind heute ein sinnvolles und anerkanntes Mittel, um Bodenexperimente durchzuführen (Schwarzenberg *et al.*, 1999; Ayed *et al.*, 1992; Hoson *et al.*, 1997; Grimm *et al.*, 2006). Dennoch müssen Versuche, die auf diese Weise durchgeführt wurden, unter realer Schwerelosigkeit im Weltraum überprüft werden. Die derzeit möglichen Bodenexperimente bieten verschiedene Vorteile: Der Klinostat gibt uns die Möglichkeit der Vorauswahl; die Plattform, um Hypothesen zu testen. So können aktuelle in absehbarer Zukunft grundlagenorientierte Versuche ermöglicht werden. Er gilt als so genannte „ground-based facility“ (Pickenhahn, 2005).

Es ist derzeit leider nicht möglich, alle Parameter der Schwerelosigkeit zu simulieren. Diffusionsverhältnisse, Durchmischung durch Konvektion und hydrostatischer Druck (Albrecht-Buehler, 1992) wirken am Klinostaten nicht anders als unter „normalen“ Erdbedingungen. Betrachtet man den Schwerkraftvektor vom Standpunkt der Zelle aus, so verändert sich dieser ständig und zwar in allen drei Dimensionen, sodass sich seine Summe über die Zeit eliminiert. Dies bedeutet eine Elimination der Sedimentation, einem Aspekt der Schwerkraft. Der Begriff Mikrogravitation statt Schwerelosigkeit ist genau genommen korrekter, da Schwerelosigkeit im engeren Sinne (0 g) auch (oder gerade) auf einer

Erdumlaufbahn nicht erreicht werden kann, denn auch hier wirken Kräfte, die den Körper auf der Umlaufbahn halten. (Pickenhahn, 2005). Um diesen theoretischen Zustand zu erreichen, müsste ein Körper völlig außerhalb jeglicher Gravitationsquelle sein. Was hingegen bei Weltraumflügen erzielt wird, sind ungefähr 10^{-5} g (Albrecht-Buehler, 1992; Klaus, 2001).

Die Effekte von Schwerelosigkeit stehen aus unterschiedlichen Gründen im Mittelpunkt des Interesses. Es ist allgemein bekannt, dass Weltraumflüge meist nachteilige Effekte auf Organismen haben (White und Averno, 2001). Diese entstehen häufig durch die Veränderung des Stoffwechsels verschiedener Zellen sowie einzelner Gewebe.

Unter Normalbedingungen (1 g) unterliegt jede Zelle einer gewissen Kompression aufgrund des hydrostatischen Drucks, was wiederum Auswirkungen auf den Stützapparat der Zellen hat. Entfällt diese Kompression, beispielsweise aufgrund von Veränderungen der 1 g-Bedingung, so hat dies Auswirkungen auf das Zytoskelett der Zelle (Vassy *et al.*, 2001; Tabony *et al.*, 2001; Schatten *et al.*, 2001; Infanger *et al.*, 2006).

Grundlegende und richtungweisende Forschungen im Bezug auf unterschiedliche Beschleunigung verschieden dichter Organellen wurden anhand von Pflanzen im Rahmen von Gravitropismusstudien durchgeführt. Pflanzenzellen enthalten so genannte Statolithen, die dichter sind als der Rest des Zytoplasmas und daher bei 1 g zum „Boden“ der Zelle sedimentieren. Die Zelle kann die Position der Statolithen erfassen und richtet das Wurzelwachstum in Richtung Erdzentrum, was allgemein als Gravitropismus bezeichnet wird (Kiss *et al.*, 1999; Sievers, 1991).

In eukaryotischen Zellen ist der Zellkern etwa 20 % dichter als der Rest der Zelle und kann somit theoretisch als Schwerkraftsensor dienen. Bei Erdbeschleunigung neigt der Kern dazu zum „Boden“ der Zelle zu sinken, wird aber durch das Zytoskelett daran gehindert, auf das somit ein gewisser Zug ausgeübt wird. Auch dies könnte ein Weg für die Zelle sein, Stärke und Ausrichtung des Schwerkraftfeldes zu ermitteln (Todd, 1989). Des Weiteren werden Zellen aufgrund ihres eigenen Gewichts und dem hydrostatischen Druck auf Oberflächen oder andere Zellen gedrückt. Zelladhäsion funktioniert unter 1g Bedingungen über spezielle Adhäsionsmoleküle (Integrine), die als Zwischenstück zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix fungieren.

Diese und weitere physikalische Faktoren können die Zelle beeinflussen. In dieser Arbeit werden vor allem Apoptose, morphologische Veränderungen und Veränderungen im Zytoskelett untersucht, die nicht direkt mit der Veränderung der physikalischen Faktoren erklärbar sind.



Abb. 15: Links die RPM im Labor der Gruppe Weltraumbiologie, ETH, Zürich, Schweiz; rechts die RPM (Quelle: Dutch Space).

3.9 Die Zelllinie Ea.hy926

Die permanente humane Zelllinie Ea.hy926 wurde 1983 von Cora-Jean Edgell etabliert. Sie ist durch die Fusion von Endothelzellen aus humanen Nabelvenen mit der permanenten humanen Zelllinie A549 entwickelt worden und zeichnet sich durch die Expression des Faktor VIII-related Antigen aus (Edgell *et al.*, 1983).

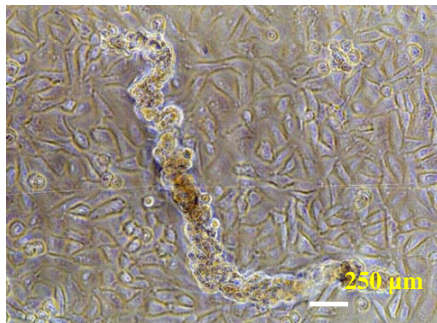


Abb. 16: Bildung tubulärer Strukturen durch Ea.hy926 Zellen unter simulierter Schwerelosigkeit (Infanger *et al.*, 2006a)

4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.1 Materialien und Methoden

4.1.1 Material

4.1.1.1 Geräte

Gerät

ABIPrism 7000 SDS
 ABL 555 Analysesystem
 Brutschrank UT6
 CCD Kamera DIANA
 Eismaschine Scotsman AF-20
 Färbekammer „feucht“
 FACSCAN
 Gefrierschrank (-20°C)
 Gefrierschrank Thermo Forma (-80°C)
 Gel-Blotting-Paper
 Heiz-/Rührplatte Ika Combimag Ret
 Klinostat
 Kolbenhubpipetten (versch. Volumina)
 Kühlschranks Küleg 0-15°C
 Kühlzentrifuge 5417 R
 Küvetten Typ-Nr. 105.202-QS
 Lichtmikroskop Olympus CK
 Microplate Reader Model 3550

 Mikrotom HM 355
 Mikrowelle MICROMAT
 Minikammer Biometra Mini Sub Cell GT

 Mini PROTEAN 3

 Mini Trans Blot™
 PH-Meter
 Protan Nitrocellulose Transfermembran
 Saughilfen
 Scanner GT 7000

Bezugsnachweis

Applied Biosystems, USA
 Radiometer, Kopenhagen, DK
 Heraeus, Langenselbold
 Raytest, Straubenhardt
 COTECH, England
 Eigenbau
 Becton Dickenson, Heidelberg
 Linde, Bad Hersfeld
 ULT Klatt, Berlin
 Schleicher & Schüll, Dassel
 Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau
 Dutch Space, Leiden, Netherlands
 Eppendorf, Hamburg
 Münchhoff, Berlin
 Eppendorf, Hamburg
 Hellma, Müllheim
 Olympus, Hamburg
 Bio-Rad Laboratories, Hercules,
 California, USA
 Microm International, Walldorf
 AEG, Zürich
 Bio-Rad Laboratories, Hercules,
 California, USA
 Bio-Rad Laboratories, Hercules,
 California, USA
 Bio Rad, München
 Knick, Berlin
 Schleicher & Schüll, Dassel
 Carl Roth, Karlsruhe
 EPSON, Meerbusch

Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
Spectrophotometer UV-VIS UV-1202	Shimadzu, Duisburg
Thermometer	Haake/Thermo Electron, Karlsruhe
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage	Sartorius, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Langensebold
UV-Licht Transilluminator	Stratagene, Heidelberg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wärmeplatte	MEDAX Nagel, Kiel
Wärmeschrank (37°C) UT6	Heraeus, Langensebold
Wärmeschrank (60°C)	Memmert, Schwabach
Wärmeschrank (98°C)	Memmert, Schwabach
Wasserbad Unitherm WA 15	Unitherm, Würzburg
Western Blot Kammer	Biometra, Göttingen
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturbank „Hera Safe“	Heraeus, Langensebold

4.1.1.1.1 Klinostat

Der dreidimensionale Klinostat befindet sich im Labor der Gruppe Weltraumbiologie, ETH Zürich, im Technopark Zürich, Schweiz und wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Cogoli zur Verfügung gestellt.

Er besteht aus zwei rotierenden Rahmen, die in orthogonal zueinander stehenden Rotationsachsen ausgerichtet sind. In der Mitte befindet sich eine Platte, auf der das untersuchende Probenmaterial befestigt wird. Vor dem Klinostaten befindet sich der Computer, auf dessen Bildschirm sich die Schwerkraftvektoren in alle drei Dimensionen ablesen lassen, und der zusätzlich deren Summe angibt, die im Idealfall 0 betragen sollte.

Das Probenmaterial (subkonfluente bis konfluente Monolayer-Kulturen) befand sich in T25 Kulturflaschen (Sarstedt), die komplett mit Medium aufgefüllt wurden, um die Scherkräfte so gut wie möglich zu minimieren. Parallel dazu wurden Bodenkontrollen (statische Kontrollen) im selben Raum über denselben Zeitraum angelegt.

4.1.1.1.2 Das Durchflusszytometer

Das FACScan-Durchflusszytometer wird in drei Systeme unterteilt:

1. Das Flüssigkeitssystem
2. Das optische System

3. Das elektronische System

Zu 1.

Die Zellsuspension wird in einem Probenröhrchen aufbereitet und gelangt mittels einer Kapillare in das Durchflusssystem. Im Inneren der Kapillare wird nun eine Flüssigkeitssäule erzeugt, in der die Zellen den Laserstrahl, im Idealfall in einer Reihe, passieren. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 6 Meter/Sekunde können so bis zu 50000 Ereignisse/ Sekunde gemessen werden. Nach der Messung gelangen die Zellen in einen Abfallbehälter.

Zu 2.

Der Laserstrahl muss so exakt wie möglich ausgerichtet werden, da er beim Erreichen der Zelloberfläche noch genauso groß ist wie diese selbst, und seine maximale Energie gesammelt hat. Hieraus wird ersichtlich, dass schon geringe Abweichungen in den Ausrichtungen zu falschen Ergebnissen führen.

Kreuzt eine Zelle den Laserstrahl, so gibt sie zwei Reflexionen ab. Zum einen wird das Laserlicht in 360 Grad reflektiert, was den so genannten „forward angle light scatter“, kurz FSC genannt, ergibt. Hierbei ist die Menge des Lichts, die entlang der Achse des Laserstrahls gestreut wird, proportional zur Größe der Zelle.

Zum anderen wird Licht im 90 Grad Winkel reflektiert, was durch besondere innere Strukturen der Zelle entsteht. Die Intensität dieser Reflektion ist daher proportional zur so genannten Granularität der Zelle und ergibt den „side scatter“, kurz SSC.

Größe und Granularität einer Zelle, also FSC und SSC, lassen sich bereits ohne Zusatz von Antikörpern oder fluoreszierender Vitalfarbstoffe messen.

Um Veränderungen an den Epitopen der Zelle zu messen werden Antikörper und mittels Fluorochromen konjugierte Antikörper eingesetzt. Wir setzen Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ein, welches das Laserlicht adsorbiert und ein Licht niedrigerer Energie und Wellenlänge reemittiert. Die Messung erfolgt nun ähnlich dem Prinzip des SSC, allerdings werden die Wege des Lichts durch Spiegel und Filter voneinander getrennt und zu verschiedenen Detektoren weiter geleitet.

Je höher die Zahl der sich auf der Zelle befindenden Zielproteine ist, desto mehr Licht wird ausgesendet, was bedeutet, dass die emittierte Lichtmenge direkt proportional zur Anzahl der markierten Epitope ist.

Zu 3.

Das elektronische System des Geräts besteht aus Verstärker, PMT-Spannungsregulator, Kompensationselektronik für die Restinterferenz zwischen FL1, FL2 und FL3 und dem Datenspeichersystem.

Die Verstärkersysteme werden wie folgt programmiert: FSC und SSC linear, wobei eine Ausrichtung der zweidimensionalen Darstellung nötig ist, die die Zellen in der Mitte des Diagramms hält, sowie für FL1, FL2 und FL3 logarithmisch.

Das von der Zelle reflektierte Licht wird durch das optische System aufgefangen und entsprechend der Wellenlänge aufgetrennt. Die jeweiligen Detektoren wandeln die Energie der Photonen in elektrische Impulse um, deren Stärke wiederum proportional zur Anzahl der Photonen ist. Nun folgt eine Umwandlung der analogen in digitale Signale, welche in eindimensionalen Histogrammen oder in zweidimensionalen Dot Plots dargestellt werden.

4.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material

50 ml Röhrchen (sterile)
 96-Well Optical Reaction Plate
 Gel-Blotting-Paper
 Nitrocellulose-Membran 0,45 µm

 Objektträger Elka
 Optical Adhesive Covers
 Pasteurpipette
 PCR Softstrips 0,2 ml, 711030
 Petrischale 120 mm
 Pipettenspitzen (versch. Größen)
 Pipettenspitzen für Western Blot
 Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml
 Super cell chamber slides
 Zellkulturflaschen T25
 Zellkulturflaschen T75
 Zellkulturflaschen T175

Bezugsnachweis

Sarstedt, Nürnberg
 Applied Biosystems, USA
 Sartorius, Göttingen
 Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
 Roth, Karlsruhe
 Applied Biosystems, USA
 Brand, Wertheim
 Biozym Diagnostik, Oldendorf
 VWR, Darmstadt
 Sarstedt, Nümbrecht
 VWR, Darmstadt
 Eppendorf, Hamburg
 Becton Dickenson, Heidelberg
 Sarstedt, Nürnberg
 Sarstedt, Nürnberg
 Sarstedt, Nürnberg

4.1.1.3 Chemikalien

Substanz

Acetatbuffer
 Agarose

Bezugsnachweis

Sigma, Taufkirchen
 Sigma, Taufkirchen

Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Azeton	J.T. Baker, England
Blotting Grade Blocker (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Bovines Serum Albumin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenol Blau	Biomol, Hamburg
BSA Standard für Protein Assay	Uptima, Interchim, Montlucon, Frankreich
Citronensäure Monohydrat 99,5%	
p.a. ACS, M210, 14	Roth, Karlsruhe
Chloroform, p.a.	Merck, Darmstadt
DEPC, Diethylpyrocarbonat	SERVA, Heidelberg
Diaminobenzidin	Sigma, Taufkirchen
Dimethylaminomethylphenol (DMP)	SERVA, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (verschiedene Konz.)	J.T. Baker, England
Fetales Kälberserum	Gibco, Eggenstein
25 % Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycin (MG=75,07)	Sigma, Taufkirchen
3 % Hydrogenperoxidase	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen
Kaiser´s Glyceringelatine Mikroskopie	Merck, Darmstadt
Kulturmedium RPMI 1640	GIBCO™ Invitrogen, UK
2-Mercaptoethanol (5 %)	BASF, Ludwigshafen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (0,9 %)	Berlin-Chemie, Berlin
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin	GIBCO™ Invitrogen, UK
Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	GIBCO™ Invitrogen, UK
0,2 M Phosphatpuffer	Sigma, Taufkirchen
Propanol	J.T. Baker, England
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Skim Milk Powder	Sigma, Taufkirchen
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) 20 %	ICN Biomedicals, CA, USA
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) MG=288,38	Sigma, Taufkirchen

Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamid)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trizma Base (MG=121,1)	Sigma, Taufkirchen
TRIzol™-Reagenz	Invitrogen, UK
Trypsin EDTA (1x) in HBSS W/O	GIBCO™ Invitrogen, UK
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Rhodamin-Phalloidin	GIBCO™ Invitrogen, UK
RNase Erase	ICN Biomedicals, CA, US
Streptomycin	PanSystems, Nürnberg
Styrol	Merck, Darmstadt
Vectarshield immunofluorescence mounting medium	Vector, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma, Taufkirchen
Xylol	J.T. Baker, England

4.1.1.4 Antikörper

Antikörper

Westernblot-primär AK: Caspase-3, p53
 Westernblot-primär AK: Bax, Bcl2, Fas
 Anti-mouse IgG/Alkal. Phosphatase konj.
 Anti-rabbit IgG/Alkal. Phosphatase konj.
 Caspase-3-AK MAB 4703 (mouse)
 Bax-AK MAB 4601Z (mouse)
 Bcl-2-AK MAB 8850 (mouse)
 p53-AK (mouse)
 Rabbit Anti-Mouse FITC F0261
 Swine Anti-Rabbit FITC F0205
 α-Tubulin-AK
 β-Tubulin-AK
 β-Aktin-AK
 Kollagen Typ I-AK
 Kollagen Typ III-AK
 Bcl-2-AK
 Fibronektin-AK
 p53-AK
 Bax-AK
 Fas-AK

Bezugsnachweis

R&D-Systems, Wiesbaden
 BD Transduction Laboratories, USA
 Chemicon, Hofheim
 Chemicon, Hofheim
 Chemicon, Chandlers Ford, UK
 Chemicon, Chandlers Ford, UK
 Chemicon, Chandlers Ford, UK
 CymbusBiotechnology, UK
 DAKO, Hamburg
 DAKO, Hamburg
 Sigma, Taufkirchen
 Sigma, Taufkirchen
 Sigma, Taufkirchen
 Sigma, Taufkirchen
 Monosan, Beutelsbach
 Chemicon, Chandlers Ford, UK
 Sigma, Taufkirchen
 BD Transduction Laboratories, USA
 Chemicon, Chandlers Ford, UK
 Chemicon, Chandlers Ford, UK

Vimentin-AK	Sigma, Taufkirchen
Osteopontin-AK	Hybridoma bank, University of Iowa, USA
Laminin-AK	Sigma, Taufkirchen
Caspase-3-AK	Chemicon, Chandlers Ford, UK

4.1.1.5 Western Blot-Analyse

Lysis-Puffer:

50 mM Tris-HCl, pH 7,2
150 mM NaCl
1 % Triton X-100
1mM Natriumorthovanadat
50 mM Natriumpyrophosphat
100 mM Natriumfluorid
0,01 % Aprotinin
4 µg/ml Pepstatin A
10 µg/ml Leupeptin
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid

Block-Reagenz:

Non Fat Dry Milk (2 %)
Tween (0,05 %)

Laufpuffer:

25 mM Trizma Base
192 mM Glycin
2,5 % (v/v) SDS

Transfer-Puffer:

48 mM Trizma Base
39 mM Glycin
0,037 % (v/v) SDS
Methanol 20 %

Trenngel:

13 % Rotiphorese (38 % Acrylamid 2 % Bisacrylamid)
375 mM Trizma Base
0,01 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) APS
0,0001 % (v/v)TEMED

Tris-Puffer:

5,85 g NaCl

12,11 g Trizma Base

10,17 g Magnesiumchlorid

mittels Aqua bidest auffüllen auf 1000 ml

Sammelgel:

7 % Rotiphorese (38 % Acrylamid 2 % Bisacrylamid)

125 mM Trizma Base

0,01 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) APS

0,0001 % (v/v) TEMED

4.1.1.6 Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Proglio in Frankreich synthetisiert. Die TaqMan®-Sonden wurden von TIBMolbiol, Syntheselabor GmbH in Berlin hergestellt. Alle Proben wurden am 3'-Ende mit FAM gelabelt. Die CD95L-Probe beinhaltet MGB, alle anderen Proben wurden mit TAMRA am 5'-Ende gelabelt. Ist die Probe nicht angegeben, so basiert der Assay auf SYBR Green.

Gene	Primer name	Sequence
CD95	CD95-Tq-F	AGGGATTGGAATTGAGGAAGACT
	CD95-Tq-R	AGTCTGGTTCATCCCCATTGAC
	CD95-Pr	ACTCAGAACTTGGAAGGCCTGCATCATG
CD95-Ligand	CD95L-Tq-F	CCCATTTAACAGGCAAGTCCAA
	CD95L-Tq-R	CTTCACTCCAGAAAGCAGGACAAT
	CD95L-Pr	CCATGCCTCTGGAATG
Osteopontin	OSP-Tq-F	CGAGGTGATAGTGTGGTTTTATGGA
	OSP-Tq-R	CGTCTGTAGCATCAGGGTACTG
Endothelin 1	EDN1-Tq-F	TGCCACCTGGACATCATTTG
	EDN1-Tq-R	CTCCAAGGCTCTCTTGGACCTA
	EDN1-Pr	ACACTCCCAGACGCTTGTTCGG
Caspase-3	Casp3-Tq-F	GCAGCAAACCTCAGGGAAAC
	Casp3-Tq-R	AACTGCTCCTTTTGTGTGTGATCT
TGF-beta₁	TGFb-Tq-F	AAATTGAGGGCTTTTCGCCTTA
	TGFb-Tq-R	CCGGTAGTGAACCCGTTGA
18S	18S-Tq-F	GGAGCCTGCGGCTTAATTT
	18S-Tq-R	CAACTAAGAACGGCCATGCA
	18S-Pr	CAATCTGTCAATCTGTCCGTGTCGG

4.1.1.7 Zelllinie

Es wurden Zellen der Zelllinie Ea.hy926 verwendet, da diese die am besten charakterisierte makrovaskuläre Zelllinie ist. Diese entstand durch Fusion humaner Nabelschnur-Endothelzellen mit der humanen epithelialen Zelllinie A549. Sie hat viele biochemische und physiologische Eigenschaften der primären Endothelzellen beibehalten, wie beispielsweise die Expression des humanen Faktor VIII bezogenen Antigens (Edgell *et al.*, 1983).

4.1.2 Methoden

4.1.2.1 Zellkulturtechnik

Die für das Experiment benötigten Zellen wurden im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, CBF, gezüchtet.

Hierzu wurden in Stickstoff eingefrorene Zellen aufgetaut, in RPMI Medium überführt, zentrifugiert, und der Überstand wurde abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen erneut in RPMI Medium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte bei Standardzellkulturbedingungen bei 37°C und 5 % CO₂. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Waren die Zellen subkonfluent bis konfluent, so wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen mit Trypsin-EDTA überschichtet. Nach 5-10 min wurde der Ablösungsgrad beurteilt, und nach vollständiger Ablösung wurde die Reaktion mit RPMI Medium gestoppt. Die Zellen wurden mit dem Medium-Trypsin-Gemisch in 50 ml Tubes überführt, zentrifugiert (2000 U/min) und die Flüssigkeit wurde dekantiert. Danach wurden die Zellen in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren wurden die Zellen in RPMI Medium aufgenommen und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt.

4.1.2.2 Gewinnung von Zellmaterial nach Kultivierung auf dem Klinostaten

Nach 0 h, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 7 Tagen und 10 Tagen wurden jeweils die entsprechenden Kulturen geerntet. Dazu wurden die Überstände abpipettiert, zentrifugiert (2000 U/min), die Zellen sowie der getrennte Überstand zur weiteren Untersuchung aufgehoben. Die verbliebenen Einzelzellen und Sphäroide wurden mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Boden der Kulturflaschen wurde dann mit Trypsin bedeckt, um eventuell noch adhärenente Zellen abzulösen. Die Trypsinreaktion wurde mit Medium gestoppt, die Trypsin-Medium-Zell-Suspension aus den Kulturflaschen abpipettiert und zentrifugiert (2000 U/min). Danach erfolgte wiederum ein Waschvorgang mit PBS. So wurden einerseits Einzelzellen, andererseits Sphäroide gewonnen, die für Western Blot-Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für Immunhistochemie auf Supercell chamber slides ausgesäht und für Durchflusszytometrie in 70 % Alkohol resuspendiert wurden.

4.1.2.3 Mikroskopie

Für die Untersuchung ungefärbter Zellen und Sphäroide in Kulturflaschen wurde ein Phasenkontrastmikroskop (Olympus, Hamburg) verwendet. Die Untersuchung fluoreszenzgefärbter Zellen (F-Aktin) fand entweder mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (Zeiss Axiophot, Oberkochen) oder mittels eines Konfokalen Laserscan Mikroskops (Leitz, Wetzlar) statt.

4.1.2.4 Durchflusszytometrie

Zuerst wurden die Zellen aus den Kulturflaschen gelöst, indem das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit Trypsin-EDTA überschichtet wurde. Nach dem vollständigen Lösen der Zellen wurde die Reaktion mit RPMI-Medium gestoppt und die Suspension in ein 50 ml Tube überführt. Nach Zentrifugation (2000 U/min) wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in PBS aufgenommen. Es erfolgte ein erneutes Zentrifugieren. PBS wurde dekantiert und die Zellen in 70 %-ROH aufgenommen.

Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurde jeweils 1 ml dieser Suspension in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Die Eppendorfröhrchen wurden zentrifugiert (10 min bei 4000 U/min), dekantiert, und mit 500 µl einer FKS-PBS-Waschlösung (2 % FKS) gefüllt. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren wurde der Erst-Antikörper in einer zuvor ermittelten Verdünnungsstufe aufgetragen und für 1 h im Dunkeln inkubiert (Bax 1:300; Osteopontin, Kollagen Typ III; fas 1:100; Kollagen Typ I, Fibronectin 1:20; Laminin 1:10; Bcl-2, p53, Vimentin 1-2 Tropfen).

Anschließend wurden die Eppendorfröhrchen mit 500 µl Waschlösung aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Zweitantikörper, passend zum Erst-Antikörper, aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls 1 h im Dunkeln. Danach wurde erneut mit Waschlösung (500 µl) aufgefüllt, zentrifugiert und dekantiert. Nun wurden die Zellen in FACFlow-Lösung aufgenommen, in Probenröhrchen überführt, und es erfolgte die Messung am Durchflusszytometer der Marke FACScan. Die passenden Einstellungen für die Zellart waren in Vorversuchen ermittelt worden.

Die Messungen erfolgten parallel an Inkubator- und statischen Kontrollen (Bodenkontrollen), wobei jeweils eine Reihe der Zellen nur mit dem Zweitantikörper bestückt worden war, um unspezifische Bindungen zu eliminieren. Dies geschah, indem die Fluoreszenz dieser Proben als Nullwert angesehen wurde, d. h., nur Signale oberhalb der Intensität dieser Proben waren als positiv angesehen worden.

Die Auswertung der bei der Messung erhaltenen Rohdaten erfolgte mittels eines hierfür entwickelten Programms (WinList®). Jede Probe wurde 5 Mal, soweit möglich, gemessen.

4.1.2.5 Western Blot-Analyse

Der Western Blot bedient sich, ähnlich der Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie, monoklonaler Antikörper, die speziell an das gesuchte Protein binden. Die Proteine werden hierzu zunächst mittels der Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei man sich deren Größe, Form und Ladung zur Auftrennung zunutze macht. Anschließend werden die so aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, mit Antikörper inkubiert und die Antikörperfärbung entwickelt.

Die in der Durchflusszytometrie ermittelten Daten wurden in diesem Experiment mittels Western Blot verifiziert, wobei der Western Blot ein semiquantitatives Verfahren ist und somit keine Aussagen über Gesamtmengen getroffen werden können.

Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Zellpellets und bei -80°C gelagerten Proben, wurden in Lysispuffer aufgenommen und unter mehrmaligem Auf- und Abziehen mit einer Pipette 30 Minuten auf Eis homogenisiert und lysiert. Dadurch werden die Zellmembranen aufgeschlossen. Die dabei freiwerdenden Proteasen, die den Nachweis der Proteine durch deren Destruktion qualitativ und quantitativ beeinträchtigen, wurden durch die Zugabe von 10 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 5 µl Pepstatin A je Milliliter Lysispuffer inhibiert. Die Homogenate wurden für 30 Minuten bei 4°C mit 10.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden in Eppendorfröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Im weiteren Verlauf musste die Gesamtproteinkonzentration der Proben gemessen werden. Dies geschah mit dem BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce Biotechnology, Rockfort, USA) per Extinktion. Je 10 µl des Proteinextraktes wurden mit 20 µl Reagenz A und 20 µl Reagenz B versetzt. Zum Vergleich wurden 10 µl BSA (Bovines Serum Albumin) als Standard verwendet, die wie die eigentliche Probe mit Reagenz A und B vermischt werden. Proben und Standards mussten gut vermischt und 30 min bei 60°C inkubiert werden. Die Farbstoffintensitäten wurden im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Aus diesen Messungen errechnete sich die Gesamtproteinkonzentration nach der Formel:

$$\text{Pro-Konz. [mg/ml]} = \frac{2 \cdot \text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}}$$

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mit 10 % Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)-PAGE, einem Polyacrylamidgel, das vor jedem Versuch neu gegossen werden muss. Dazu mussten die Glasplatten der Gussform zunächst gründlich mit 80 % Ethanol gereinigt und entfettet werden. Das frisch angerührte und noch flüssige Gel wurde nun eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu gewährleisten. Für die Polymerisation dieses so genannten Trenngels werden etwa 30 min benötigt. Danach wurde

das Isopropanol vollständig entfernt und das Trenngel mit einem weiteren, so genannten Sammelgel überschichtet, in dem ein Kamm platziert wurde, der nach Polymerisation entfernt wird. Dies dient zur Erzeugung von Kammern, in die später die verschiedenen Proben eingefüllt werden können. Das so entstandene Gel wurde nun in die Elektrophoresekammer eingebracht und diese mit Laufpuffer gefüllt. In jede der oben beschriebenen Kammern wurden 20 µl der jeweiligen Probe pipettiert und daraufhin die Proteine 15 min bei 80 Volt und 60 min bei 120 Volt aufgetrennt.

Nachdem dieser Prozess abgeschlossen war, wurde das Gel mit den darin befindlichen aufgetrennten Proteinen aus der Apparatur herausgenommen und zwischen Filterpapier und einer Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schüll, Dassel, Deutschland) in die Blotkammer (Mini Trans BlotTM, BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA) eingespannt, die mit Transferpuffer gefüllt ist. Nun begann der eigentliche Vorgang des Western Blot. Dazu wurden 2h lang 160 Volt angelegt, um den Übergang der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran zu gewährleisten. Danach wurde die Membran in Blocking Puffer (5 % entfettetes Milchpulver in PBS/0,1 % Tween 20 gelöst) über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Am folgenden Tag wurde die Membran bei Raumtemperatur für 1 h in eine Lösung aus Blocking Puffer und Primär-Antikörper (Verhältnis 1:1000) gelegt und danach mit antikörperfreiem Blocking Puffer fünf Mal gewaschen. Daraufhin erfolgte wieder bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Verhältnis 1:5000, 30 min). Zuletzt wurde die Membran fünf Mal mit Blocking Puffer und drei Mal mit 0,1 M Tris-Puffer gewaschen. Spezifische Bindungen der Antikörper wurden mittels der Entwickler Nitroblautetrazolium und 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat sichtbar gemacht. Dazu wurden die Membranen 160 min bei völliger Dunkelheit in eine mit Entwicklerlösung gefüllte Färbekammer gelegt. Danach wurde die Membran zwei Mal 10 min mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und in Saran-Film eingepackt. Zur Auswertung wurde die Membran eingescannt und durch Densitometrie quantifiziert (Molecular Dynamics Personal Densitometer No. 50301, Krefeld, Deutschland, Aida-Image-Analyse 2.11 Programm).

4.1.2.6 TaqMan PCR

Die TaqMan-PCR bietet die Möglichkeit, die Amplifikation und den Nachweis des PCR-Produkts simultan darzustellen. Zur Detektion Sequenz-spezifischer Amplifikationen bedient man sich der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase und einer fluoreszierenden Sonde, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (FAM) und dessen 3'-Ende hingegen mit einem Quencher-Farbstoff (TAMRA) modifiziert ist (Livak *et al.*, 1995). Ist die Sonde intakt, so wird die Fluoreszenz zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-

Energietransfer (FET) unterdrückt. Trifft nun die Taq-DNA-Polymerase während der Extension auf die intakte Sonde, so wird diese durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert. Es kommt zu einer Unterbrechung des FET und damit zu einer messbaren Fluoreszenz. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Farbstoffe werden freigesetzt, und entsprechend steigt auch die Signalstärke. Die Veränderungen der Fluoreszenz bei jedem Zyklus werden mittels des ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systems registriert.

Die Quantifizierung erfolgt nicht wie bei der normalen PCR anhand der absoluten Menge des PCR-Produkts, sondern es wird die Kinetik der PCR-Reaktion ausgenutzt: Im ersten Zyklus findet eine exponentielle Vermehrung der DNA statt, danach kommt es auf Grund von verschiedenen Einflüssen zu einer Verlangsamung des Prozesses (grafisch ist dies als lineare Steigung darstellbar) und schließlich zu einem Stillstand der Reaktion. Zur Quantifizierung nimmt man den CT-Wert, welcher der Zyklenzahl entspricht, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über den Schwellenwert erfolgt und die Vermehrung noch exponentiell ist.

Zur Messung müssen die Proben zuvor vorbereitet wurden. Hierzu wurden die Zellen aus den Kulturflaschen gelöst, gewaschen, und mittels 1 ml PBS in ein Eppendorfröhrchen aufgenommen. Dieses Eppendorfröhrchen wurde zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Das Röhrchen wurde verschlossen und es wurden mittels einer Kanüle drei Löcher im Deckel angebracht. Anschließend wurde das Röhrchen sofort in flüssigen Stickstoff verbracht und dann bei -80°C gelagert wurden.

Zur RNA Extraktion wurden in jedes Probenröhrchen 1 ml Trizol gegeben, um die Zellen zu lysieren. Nach 5 min kamen 200 µl Chloroform hinzu und die Suspension wurde gevortext. Anschließend wurde 15 min bei 12000 U/min zentrifugiert und man erhält zwei Phasen. In der festen Phase hatten sich die Zelltrümmer und die DNA gesammelt, in der wässrigen Phase die RNA. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Je Eppendorfröhrchen wurden 500 µl 2-Propanol zugegeben und gevortext. Nach 10 min Wartezeit war die RNA gefällt. Anschließend wurde 10 min bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Röhrchen wurden mit 1 ml 75% ETOH aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert worden war wurden die Röhrchen zum Trocknen aufgestellt. Anschließend wurde je Röhrchen 40 µl DEPC-Wasser zugegeben. Danach kamen die Röhrchen für 5 min bei 60°C auf den Rüttler. Es erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA. Hierzu wurden die Proben 1:50 mit DEPC-Wasser verdünnt und die Extinktion wurde gemessen. Proben, bei denen die Werte größer waren als eins, wurden weiter verdünnt.

Nun wurden die Proben entsprechend ihres RNA Anteiles in 0,2 ml PCR Softstrips gemischt. Hierzu wurden 2 µl RNA mit DEPC-Wasser und Random Hexamer Primer vermischt

(Gesamtvolumen der Probe 11 μl). Die Proben kamen daraufhin in den Peltier Thermal Cycler PTC-200 und das Programm lief für 5 min auf 72°C, sowie für weitere 5 min auf 4°C.

Danach wurden die Proben erneut gemischt, dieses Mal mit 4 μl Reaction buffer, 1 μl RNase Inhibitor, 2 μl dNTP-Mix sowie 2 μl RT-Enzym (Gesamtvolumen je Probe 20 μl). Die Proben wurden erneut in den Peltier Thermal Cycler PTC-200 gegeben (10 min 25°C, 60 min 37°C, 10 min 70°C, 10 min 4°C) und anschließend mittels nukleasefreiem Wasser auf 40 μl aufgefüllt.

Zur eigentlichen Messung wurde ein Master Mix, bestehend aus MMS Puffer, Primer-F, Primer-R, Sonde und destilliertem Wasser, hergestellt. 72 μl des Master Mix wurden mit 3 μl RNA gemischt und gevortext. Auf einer 96 Well Platte wurde nun ein Dreifachansatz durchgeführt, wobei je Well 23 μl Mischung eingebracht wurden. Die Platte wurde in das Gerät eingesetzt und die Messung begann. Die Berechnung mit Hilfe einer Standardkurve wurde wie folgt durchgeführt: Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem CT. Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den CT konstruiert werden. Durch die Geradengleichung $x = (\text{CT}-b)/m$ kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden. Alle Proben wurden normalisiert, indem die errechnete Kopienzahl des Targetgens durch die Kopienzahl der internen Referenz geteilt wurde: $\text{GEN (normalisiert)} = \text{Kopienzahl Target} / \text{Kopienzahl Referenz}$.

Die unterschiedliche Expression zweier Proben relativ zueinander lässt sich als Quotient darstellen und ergibt eine n-fache Expression $\text{GEN (normalisiert)} (\text{Gruppe A}) / \text{GEN (normalisiert)} (\text{Gruppe B}) = n\text{-Fache Expression Gruppe A zu Gruppe B}$

Die Berechnung anhand der delta-delta-CT-Methode geschieht auf eine andere Art: Die unterschiedliche Expression wird als n-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-CT-Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktion. Die CT-Werte werden hierbei einfach voneinander abgezogen (delta-CT), die beiden delta-CT-Werte der einzelnen Gruppen (z.B. krank/gesund, mit/ohne Medikament) voneinander abgezogen (delta-delta-CT-Wert) und in die Gleichung n-Fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = $2^{-\text{delta-delta-CT}}$ eingesetzt.

4.1.2.7 F-Aktin Färbung mittels Rhodamin-Phalloidin

Für die F-Aktin Darstellung wurden die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min mit 0,1 % Triton X-100 in PBS lysiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung der F-Aktin Filamente erfolgte mittels Rhodamin-Phalloidin in PBS, welches 1 % BSA laut Anleitung des Herstellers enthielt. Die Deckgläser

wurden in Moviol eingedeckt und mit Hilfe eines Zeiss Axiovert wide-field Mikroskops untersucht. Die Aufnahmen wurden mittels einer CCD Kamera und einem Standard RITC Filter erstellt.

4.1.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz bedient sich, wie die Durchflusszytometrie, monoklonaler Antikörper, um Proteine zu markieren und sichtbar zu machen. Hierzu wurden die Zellen bzw. Sphäroide auf gekammerte Supercell Kulturkammerobjektträger ausgesät und für 30 min inkubiert (Adhäsionszeit). Daraufhin wurde das Medium abgesaugt, die Objektträger zwei Mal mit PBS gewaschen und mit einem Gemisch aus Methanol und Ethanol (1:2) bei Raumtemperatur fixiert. Das Fixationsmittel wurde abgesaugt und die Objektträger zum Trocknen bei Raumtemperatur ausgelegt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit dem ersten Antikörper (α -Tubulin bzw. β -Tubulin) für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und für 24 h mit dem Sekundäntikörper (Anti-Mouse FITC-conjugated Immunglobulin-Antikörper) inkubiert. Zum Schluss wurden sie erneut mit PBS gewaschen, mit Vectarshield Immunfluoreszenz Eindeckmedium eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Morphologie der Mikrotubulären Strukturen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht.

4.1.2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde aus den Einzelwerten der jeweiligen Versuche für die entsprechende Versuchsgruppe der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Um die Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen wurde ein statistischer Lagetest verwendet. Da in den meisten Gruppen aufgrund der Probenmenge nur fünf mal gemessen werden konnte, war die Versuchszahl (n) relativ gering. Daher war die Überprüfung der Einzelwerte auf das Vorliegen einer Normalverteilung nicht möglich. Echte Normalverteilungen kommen in der Natur ohnehin nicht vor, da der Wertebereich realer Daten stets beschränkt ist und nur aus endlich vielen diskreten Werten besteht, was der Normalverteilungsangabe widerspricht (Trampisch und Windeler, 2000).

Damit diese Arbeit mit anderen wissenschaftlichen Veröffentlichungen verglichen werden kann, wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrisches Verfahren verwendet. In dieser Dissertation wurde er für die Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Stichproben angewendet und besitzt hier deskriptiven Charakter. Daher dient er der Hypothesenfindung. Durch die Berechnung von Überschreitungswahrscheinlichkeiten (p-Wert) soll statistisch gezeigt werden, wie deutlich sich die miteinander vergleichenden Versuchsgruppen

unterschieden. Bei einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ wurde bei einer Höhe von $p < 0,05$ eine statistische Signifikanz akzeptiert.

Die Einzelwerte der jeweiligen Untersuchung wurden grafisch in vertical points-scatter plots veranschaulicht. Die statistische Analyse wurde mit SPSS 12.0 durchgeführt. Zur Erstellung der Grafiken wurde das Programm Sigma Plot® (Version Windows 8.0) herangezogen.

4.2 Ergebnisse

Um vorübergehende Effekte von Langzeiteffekten zu unterscheiden, die Endothelzellen aufweisen, welche der simulierten Mikrogravitation ausgesetzt waren, wurden zeitabhängige Veränderungen verschiedener ausgewählter Gene, Veränderungen von extrazellulären Matrix-Komponenten, und der Anstieg der Faktoren, welche die Apoptose beeinflussen, sowie Veränderungen des Zytoskeletts und die Freisetzung löslicher Faktoren in die Überstände der Kulturen untersucht.

4.2.1 Die Effekte der Schwerelosigkeit auf extrazelluläre Matrixproteine

4.2.1.1 Kurzzeitversuche

Es handelt sich hier um Voruntersuchungen für ein neues Projekt, in dem Kurzzeiteffekte der simulierten Schwerelosigkeit auf Endothelzellen im Blickpunkt des Interesses stehen.

4.2.1.1.1 Osteopontin

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei 35,38 % \pm 1,71 %. Bei den Zellen, die für eine Stunde unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 29,97 % \pm 1,88 %. Nach zwei Stunden Kultivierung unter μ g lag der Mittelwert bei 22,47 % \pm 1,30 %. Für BK ergab sich n=4, für 1 h μ g und 2 h μ g jeweils n=5.

Osteopontin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK	35,9	37,5	33,54	34,58		35,38	1,71
1h μ g	31,62	31,2	28,92	27,16	30,94	29,97	1,88
2h μ g	22	21,7	24,7	22,48	21,48	22,47	1,3

Tab. 1: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Osteopontin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

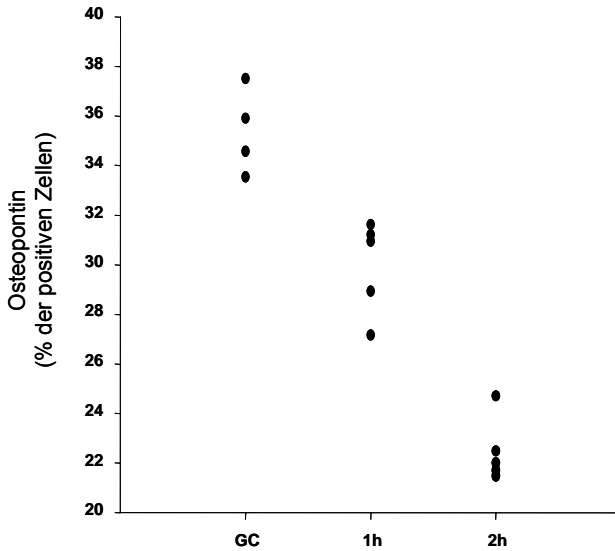
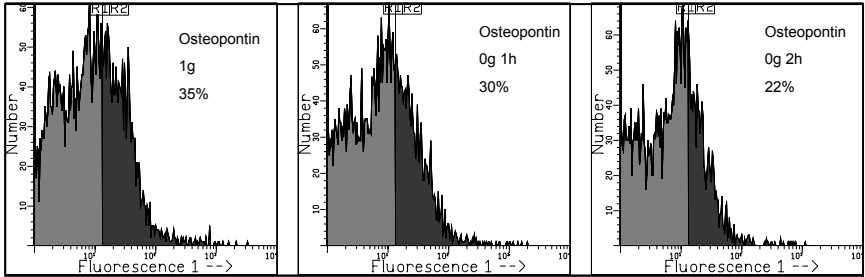


Abb. 17: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin: Nach einer und zwei Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kam es zu einer Reduktion des Osteopontingehalts der Zellen.

	Bodenkontrolle	0g 1h
0g 1h	0,016	
0g 2h	0,016	0,008

Tab. 2: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Osteopontin. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei P<0,05.

4.2.1.2 Langzeitversuche

4.2.1.2.1 Kollagen Typ I

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $9,9\% \pm 1,3\%$. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $79,3\% \pm 1,4\%$. Für BK und 10 d μg ergaben sich jeweils $n=4$.

Kollagen Typ I	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	9,7	10,3	11,3	8,2	9,9	1,3
10d μg	78,8	80,9	79,8	77,5	79,3	1,4

Tab. 3: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Kollagen Typ I-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

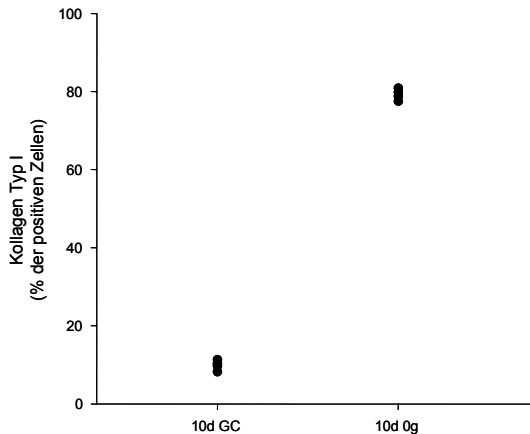
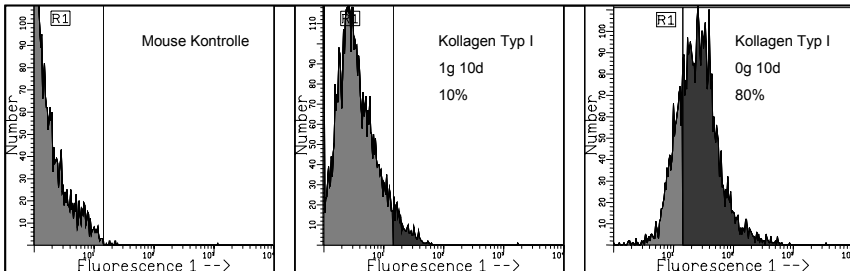


Abb. 18: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ I: Nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit kam es zu einem deutlichen Anstieg von Kollagen Typ I im Vergleich zur Bodenkontrolle. (Infanger *et al.*, 2007)

4.2.1.2.2 Kollagen Typ III

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $7,6\% \pm 1,0\%$. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $24,4\% \pm 3,1\%$. Für BK und 10d μg ergaben sich jeweils $n=4$.

Kollagen Typ III	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	7,9	8,4	8,0	6,1	7,6	1,0
10d μg	26,1	27,1	24,2	20,1	24,4	3,1

Tab. 4: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Kollagen Typ III-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

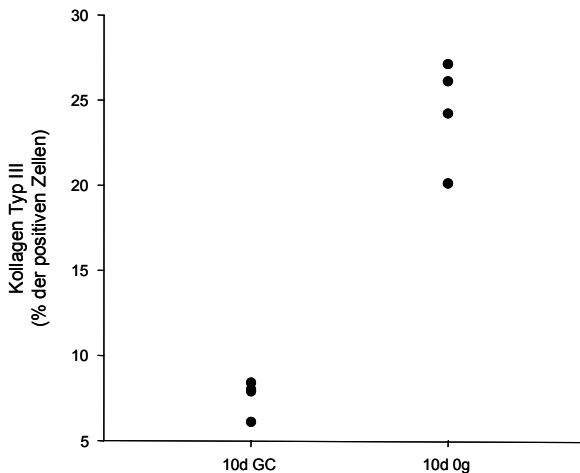
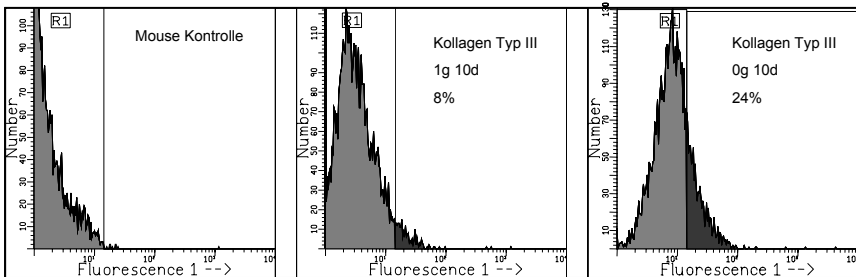


Abb. 19: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ III: Nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit kam es zu einem deutlichen Anstieg von Kollagen Typ III im Vergleich zur Bodenkontrolle (Infanger *et al.*, 2007).

4.2.1.2.3 Fibronektin

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $98,6 \pm 0,7 \%$. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $98,3 \pm 0,6 \%$. Für BK und 10 d μg ergaben sich jeweils $n=4$.

Fibronektin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	98,8	99,1	97,6	98,9	98,6	0,7
10d μg	98,5	98,5	98,8	97,5	98,3	0,6

Tab. 5: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Fibronektin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

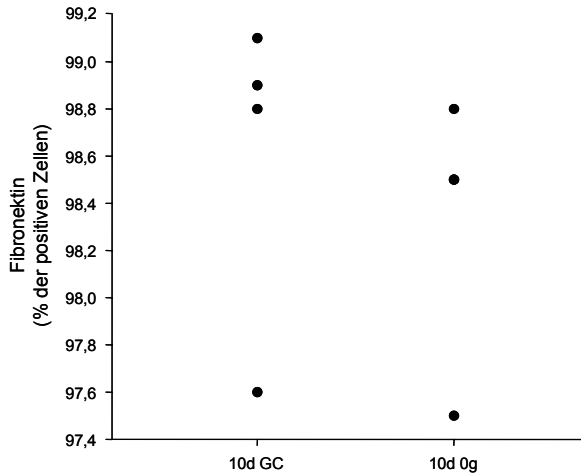
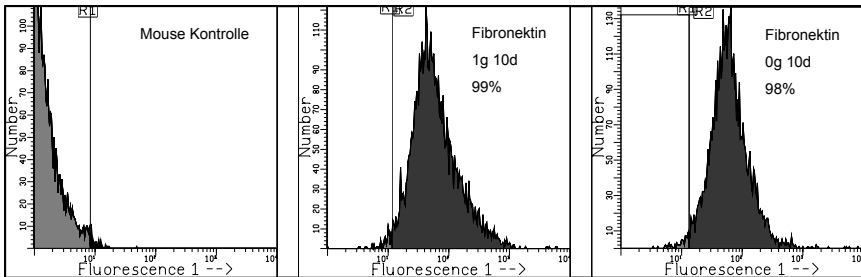


Abb. 20: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fibronektin: Es besteht kein Unterschied im Gehalt an Fibronektin im Vergleich zwischen der Bodenkontrolle und den Zellen, die 10 d simulierter Schwerelosigkeit ausgesetzt waren.

4.2.1.2.4 Laminin

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $84,4 \pm 1,8$ %. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $89,0$ % $\pm 2,6$ %. Für BK und 10d μ g ergaben sich jeweils $n=4$.

Laminin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	83,3	84,1	83,2	87,1	84,4	1,8
10d μ g	90,5	91,8	87,3	86,4	89,0	2,6

Tab. 6: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Laminin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

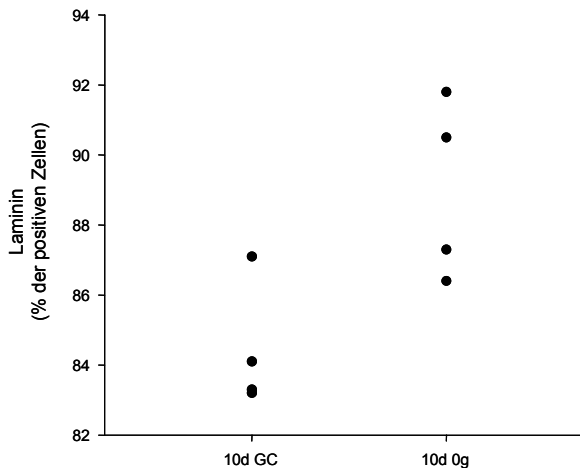
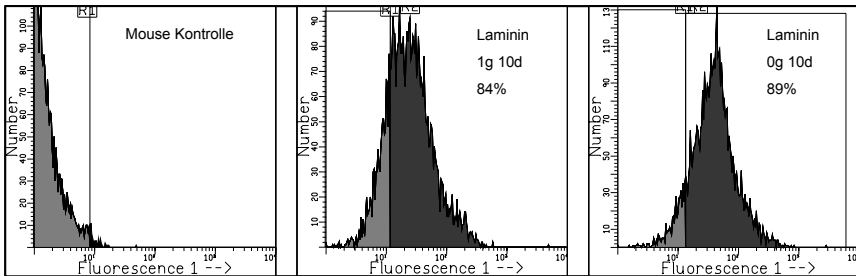


Abb. 21: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Laminin: Es kam zu einem moderaten Anstieg von Laminin nach 10 d unter simulierter Schwerelosigkeit im Vergleich zur Bodenkontrolle.

4.2.1.2.5 Osteopontin

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $69,5 \pm 1,1$ %. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $77,4$ % $\pm 3,1$ %. Für BK und 10 d μg ergaben sich jeweils $n=4$.

Osteopontin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	69,0	69,6	70,9	68,4	69,5	1,1
10d μg	77,9	80,4	78,1	73,1	77,4	3,1

Tab. 7: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Osteopontin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

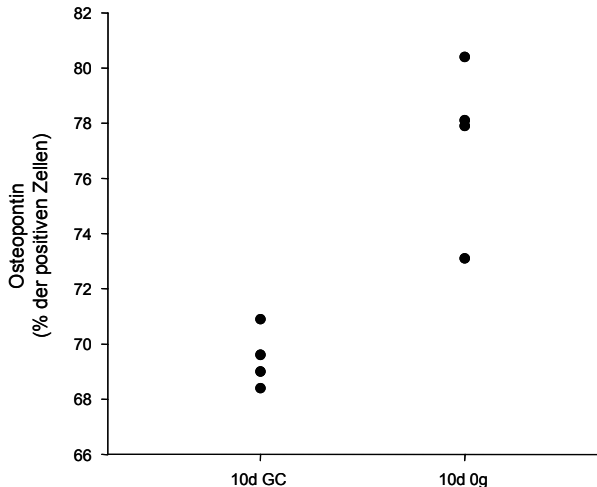
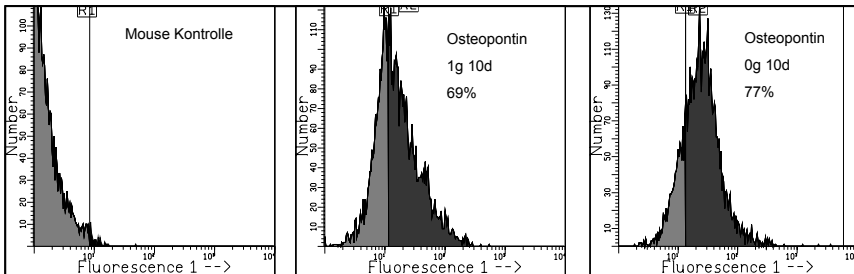


Abb. 22: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin: Nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit kam es zu einem leichten Anstieg von Osteopontin im Vergleich zur Bodenkontrolle (Infanger *et al.*, 2007).

b) PCR

Der Mittelwert der mittels TaqMan PCR erzielten Ergebnisse (% der Kontrolle) lag für die Zellen, die 10 min unter simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, bei 10,08 % \pm 10,04 %. Nach 20 min Kultivierung lag der Mittelwert bei 5,03 % \pm 3,10 % und nach einer Stunde bei 0,58 % \pm 0,02 %. Nach vier Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei 0,14 % \pm 0,12 % und der Mittelwert der unter μg kultivierten Zellen bei 0,73 % \pm 0,31 %. Nach sieben Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei 0,2 % \pm 0,05 % und der Mittelwert der unter μg kultivierten Zellen bei 0,19 % \pm 0,08 %. Nach zehn Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei 0,79 % \pm 0,14 % und der Mittelwert der unter μg kultivierten Zellen bei 1,30 % \pm 0,15 %. Für die Gruppe 1 h μg ergab sich n=2, für die Gruppen 10 min μg und 30 min μg n=3, für die Gruppe 4 d BK n=4, für die Gruppen 4 d μg , 7 d BK und 10 d BK n=5, für die Gruppe 10 d μg n=6 und für die Gruppe 7 d μg n=9.

Osteopontin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	6. Wert	7. Wert	8. Wert	9. Wert	MW	St.Abw.
10 min μg	1	8,38	20,87							10,08	10,04
30 min μg	7,29	6,31	1,49							5,03	3,10
1h μg	0,6	0,57								0,58	0,02
4d μg	1,14	0,57	0,59	0,96	0,40					0,73	0,31
4d BK	0,12	0,08	0,06	0,31						0,14	0,12
7d μg	0,08	0,18	0,18	0,10	0,14	0,23	0,17	0,28	0,34	0,19	0,08
7d BK	0,15	0,18	0,22	0,17	0,28					0,20	0,05
10d μg	1,37	1,27	1,10	1,18	1,34	1,54				1,30	0,15
10d BK	0,89	0,80	0,57	0,77	0,94					0,79	0,14

Tab. 8: Analyse der mittels TaqMan PCR ermittelten Daten; Osteopontin-Gen; % der Kontrolle mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

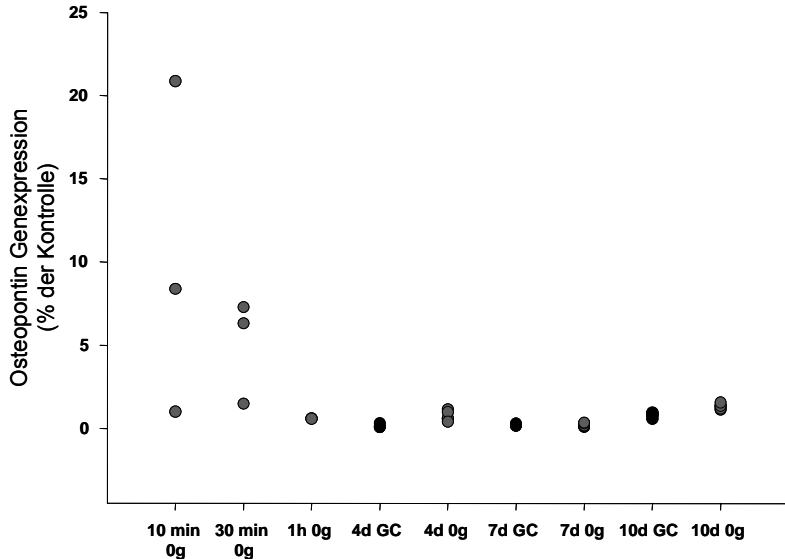


Abb. 23: Ergebnis der PCR-Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin: Zusammenfassung unterschiedlicher Kurz- und Langzeitversuche. Es zeigte sich eine rapide Reduktion der Osteopontin Genexpression bei Einsetzen simulierter Schwerelosigkeit. Erst nach 4 d unter 0 g kam es zu einem Anstieg der Genexpression, die jeweils die Osteopontin Expression der dazugehörigen Bodenkontrolle überstieg (Infanger *et al.*, 2007).

	7d GC	7d 0g	10d GC
7d 0g	n.s.		
10d GC	0,008	0,001	
10d 0g	0,004	0	0,004

Tab. 9: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Osteopontin. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.1.3 Einfluss des basic Fibroblast Growth Factor auf die EZM

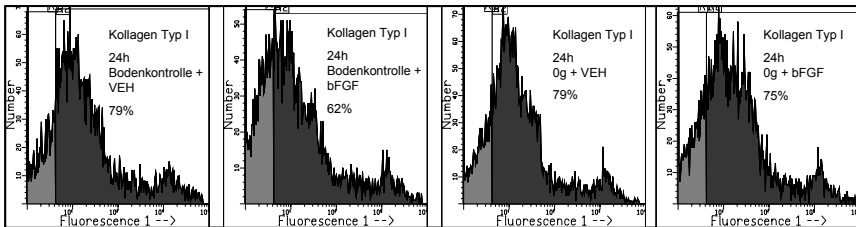
4.2.1.3.1 Kollagen Typ I

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 78,78 % \pm 0,92 %, bzw. für BK + bFGF bei 62,1 % \pm 1,12 %. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne bFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 78,49 % \pm 1,21 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 75,15 % \pm 2,08 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

Kollagen Typ I	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	77,68	78,04	78,8	79,86	79,5	78,78	0,93
BK bFGF	61,78	63,06	62,84	62,58	60,22	62,10	1,16
μ g VEH	79,78	79,12	78,9	78,02	76,64	78,49	1,21
μ g bFGF	75,94	76,12	76,94	75,12	71,62	75,15	2,08

Tab. 10: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Kollagen Typ I-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



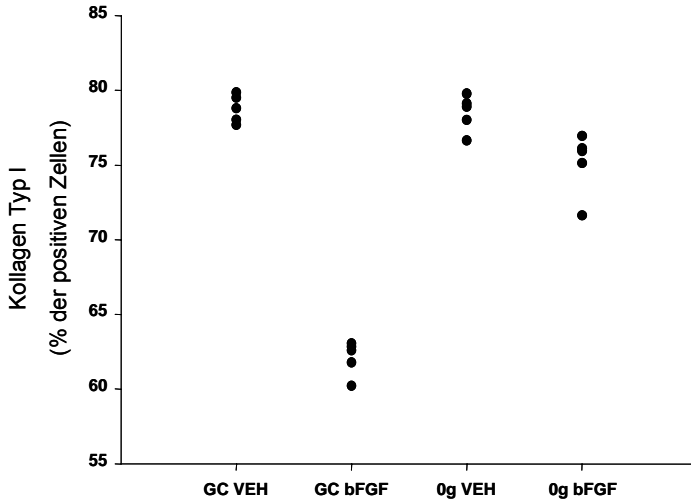


Abb. 24: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ I: bFGF senkt den Gehalt an Kollagen Typ I positiven Zellen im Vergleich der behandelten zur nicht-behandelten Bodenkontrolle. Ebenso zeigte sich eine Senkung des Kollagen Typ I Gehaltes im Vergleich der 0 g kultivierten behandelten zu den 0 g kultivierten nicht-behandelten Zellen.

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,008		
0g VEH	n.s.	0,008	
0g bFGF	0,008	0,008	0,016

Tab. 11: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Kollagen Typ I. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

b) Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei $7,61 \% \pm 1,77 \%$, bzw. für BK + bFGF bei $9,6 \% \pm 2,63 \%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne bFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $9,25 \% \pm 2,27 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $9,12 \% \pm 2,32 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

Kollagen Typ I	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	9,29	5,4	8,47	6,03	8,88	7,61	1,77
BK bFGF	9,15	6,32	12,73	11,74	8,05	9,60	2,63
μg VEH	11,13	7,48	12,22	8,1	7,32	9,25	2,27
μg bFGF	12,65	7,48	9,5	6,62	9,37	9,12	2,32

Tab. 12: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Kollagen Typ I-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

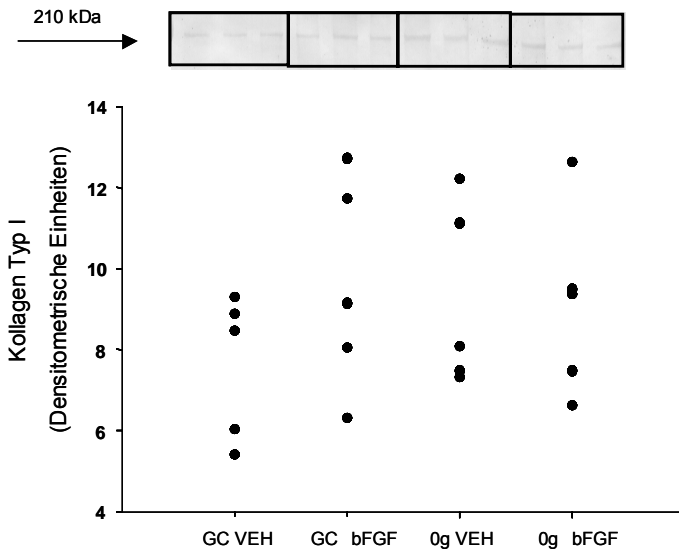


Abb. 25: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ I: Die gezeigten Werte liegen eng beieinander, einzelne Ausreißer lassen einen anderen Schluss der Ergebnisse zu als bei der Durchflusszytometrie. Für die Mehrzahl der Messergenisse zeigte sich jedoch eine Senkung des Kollagen Typ I Gehalts durch bFGF, jeweils verglichen mit der unbehandelten Probe. In der Auswertung ergaben sich keinerlei Signifikanzen (Ulbrich *et al.*, 2008).

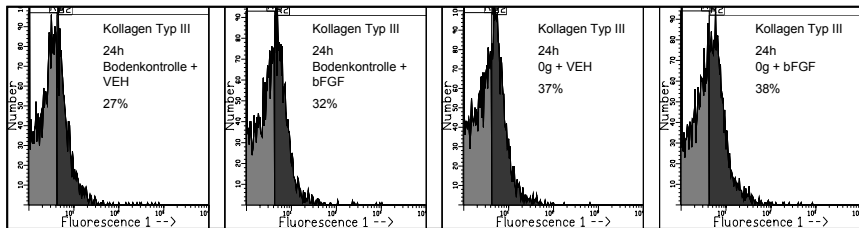
4.2.1.3.2 Kollagen Typ III

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 27,14 % \pm 2,37 %, bzw. für BK + bFGF bei 32,04 % \pm 3,07 %. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne bFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 37,43 % \pm 2,84 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 37,84 % \pm 4,57 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

Kollagen Typ III	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	24,64	28,94	29,36	28,22	24,52	27,14	2,37
BK bFGF	34,6	33,78	33,24	31,7	26,88	32,04	3,07
μ g VEH	40,46	38,36	39,34	35,32	33,66	37,43	2,84
μ g bFGF	41,1	41,44	39,64	36,58	30,42	37,84	4,57

Tab. 13: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Kollagen Typ III-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



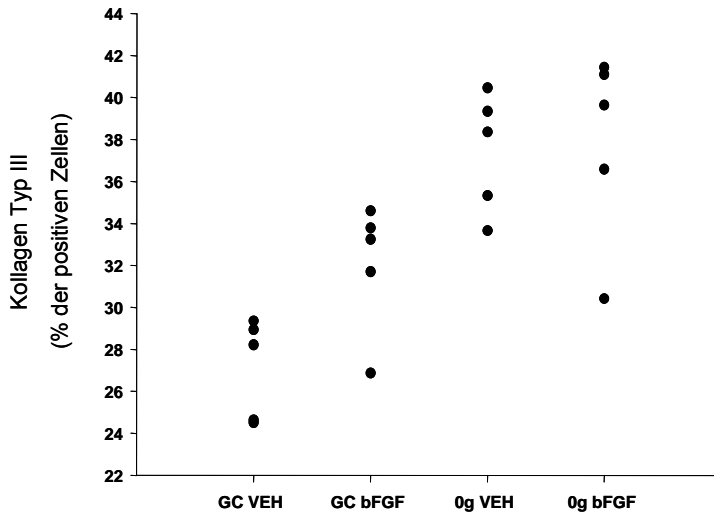


Abb. 26: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ III: bFGF erhöht den Gehalt an Kollagen Typ III positiven Zellen im Vergleich der behandelten zur nicht-behandelten Bodenkontrolle. Bei den unter 0 g kultivierten Proben waren die Werte nahezu gleich, vergleicht man die behandelten und nicht-behandelten Zellen.

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,047		
0g VEH	0,008	0,032	
0g bFGF	0,008	n.s.	n.s.

Tab. 14: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Kollagen Typ III. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

b) Western Blot Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei $8,51 \% \pm 0,68 \%$, bzw. für BK + bFGF bei $8,43 \% \pm 0,31 \%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne bFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $7,77 \% \pm 0,29 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $9,06 \% \pm 0,37 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

Kollagen Typ III	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	8,09	9,44	8,1	7,91	9,03	8,51	0,68
BK bFGF	8,56	8,62	8,53	8,58	7,88	8,43	0,31
μg VEH	7,64	7,99	7,72	7,4	8,12	7,77	0,29
μg bFGF	9,47	9,11	9,27	8,5	8,95	9,06	0,37

Tab. 15: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Kollagen Typ III-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

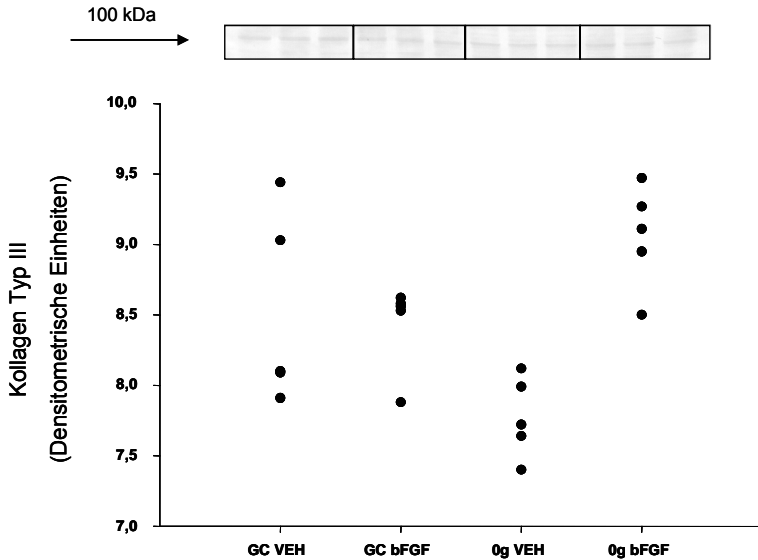


Abb. 27: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ III: Die hier gezeigten Werte lagen eng beieinander, deutlich zu sehen war jedoch eine Steigerung des Kollagen Typ III Gehalts der Zellen nach 24 h 0 g im Vergleich der behandelten zu den nicht-behandelten Zellen.

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	n.s.		
0g VEH	n.s.	0,032	
0g bFGF	n.s.	n.s.	0,008

Tab. 16: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Kollagen Typ III. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.1.3.3 Fibronektin

Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei $17,72\% \pm 0,32\%$, bzw. für BK + bFGF bei $19,85\% \pm 0,23\%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne bFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $30,81\% \pm 0,45\%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $31,62\% \pm 0,32\%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

Fibronektin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	17,93	17,69	18,03	17,21	17,76	17,72	0,32
BK bFGF	19,65	20,09	19,79	20,09	19,61	19,85	0,23
μg VEH	31,01	30,35	30,43	30,78	31,46	30,81	0,45
μg bFGF	31,42	31,86	31,75	31,92	31,17	31,62	0,32

Tab. 17: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Fibronektin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

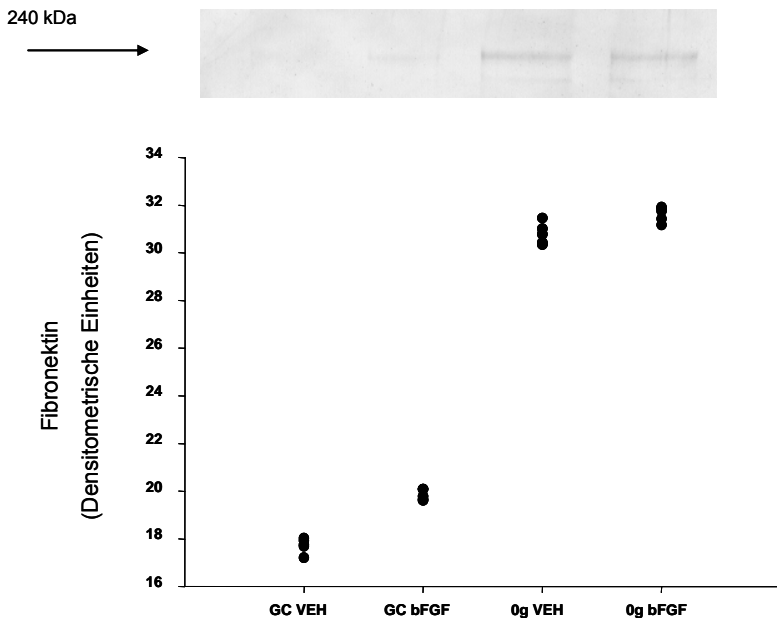


Abb. 28: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fibronektin: Im Vergleich zwischen 0 g kultivierten Zellen und der Bodenkontrolle kam es zu einer deutlichen Steigerung des Fibronektin-Gehalts. bFGF erhöhte diese Werte zusätzlich, wenn auch nur gering (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,008		
0g VEH	0,008	0,008	
0g bFGF	0,008	0,008	0,032

Tab. 18: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fibronektin. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.1.3.4 Laminin

Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei $7,18 \% \pm 2,5 \%$, bzw. für BK + bFGF bei $7,46 \% \pm 2,68 \%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne bFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $12,12 \% \pm 2,32 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $13,23 \% \pm 2,91 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

Laminin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	5,02	5,24	6	9,01	10,62	7,18	2,50
BK bFGF	5,44	6,54	4,72	10,27	10,35	7,46	2,68
μg VEH	9,42	10,1	12,64	13,5	14,96	12,12	2,32
μg bFGF	11,18	11,7	11,98	18,3	13,01	13,23	2,91

Tab. 19: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Laminin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

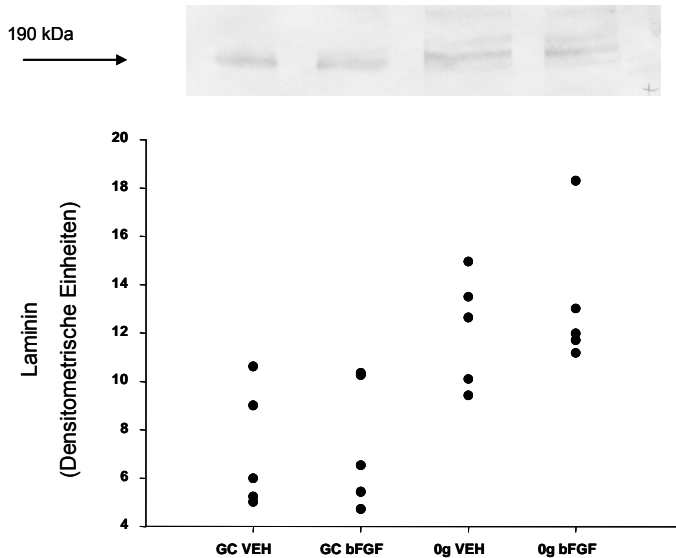


Abb. 29: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Laminin: Im Vergleich zwischen unter 0 g kultivierten Zellen und der Bodenkontrolle kam es zu einer Steigerung des Laminin-Gehalts. bFGF veränderte diese Werte kaum (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	n.s.		
0g VEH	0,032	n.s.	
0g bFGF	0,008	0,008	n.s.

Tab. 20: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Laminin. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.1.3.5 Osteopontin

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 70,66 % ± 2,01 %, bzw. für BK + bFGF bei 69,13 % ± 2,83 %. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne BFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 68,47 % ± 3,1 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 72,2 % ± 3,95 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

Osteopontin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	71,04	73	71,42	70,34	67,52	70,66	2,01
BK bFGF	71,36	70,92	69,56	69,54	64,28	69,13	2,83
µg VEH	70,24	70,82	70,26	67,64	63,38	68,47	3,10
µg bFGF	75,72	74,92	74,1	69,82	66,42	72,20	3,95

Tab. 21: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Osteopontin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

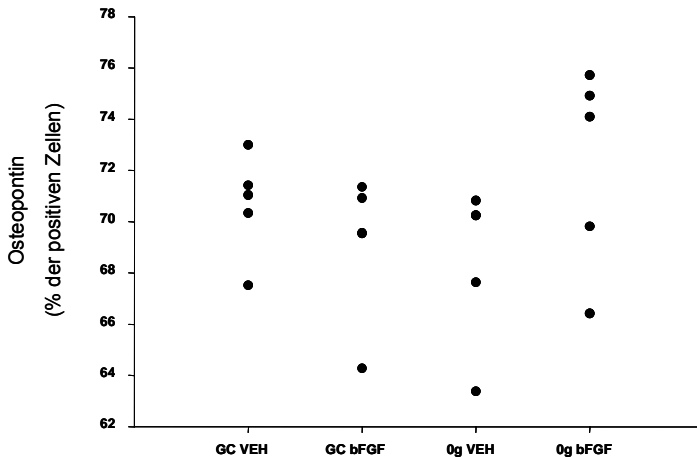
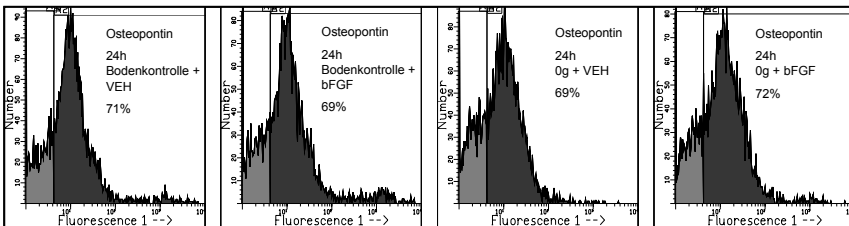


Abb. 30: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin: bFGF erhöhte den Gehalt an Osteopontin-positiven Zellen unter Schwerelosigkeit leicht, vergleicht man die behandelte mit der unbehandelten Gruppe. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

b) Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 12,84 % \pm 2,38 %, bzw. für BK + bFGF bei 11,96 % \pm 0,79 %. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne BFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 13,57 % \pm 0,66 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 13,66 % \pm 0,43 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

Osteopontin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	16,77	11,63	12,8	12,54	10,48	12,84	2,38
BK bFGF	11,55	12,7	12,36	10,76	12,42	11,96	0,79
μ g VEH	14,04	14,11	12,84	12,87	14	13,57	0,66
μ g bFGF	13,83	13,6	13,94	13,98	12,94	13,66	0,43

Tab. 22: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Osteopontin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

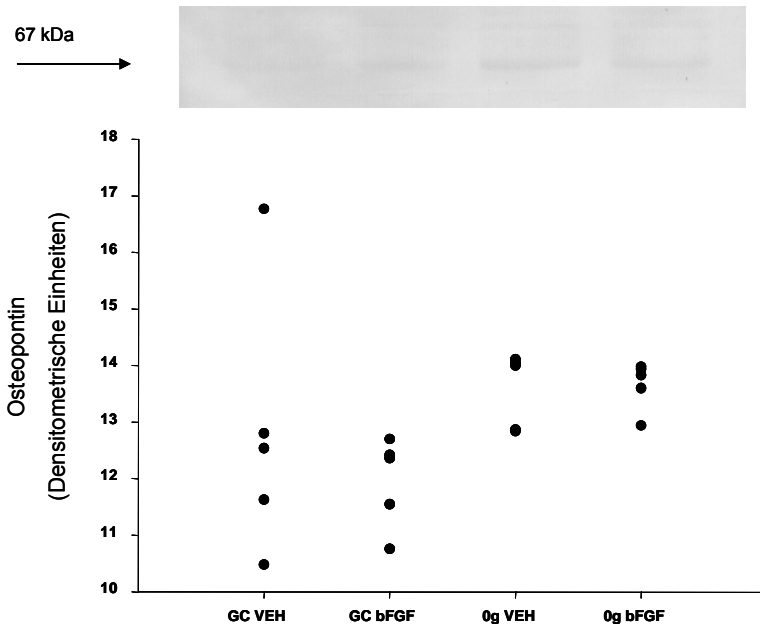


Abb. 31: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin: Im Vergleich zwischen unter 0 g kultivierten Zellen und der Bodenkontrolle kam es zu einer Steigerung des Osteopontin-Gehalts. Auch hier lagen die Werte eng beieinander.

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	n.s.		
0g VEH	n.s.	0,008	
0g bFGF	n.s.	0,008	n.s.

Tab. 23: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Osteopontin. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei P<0,05.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es nach Kurzzeitkultivierung der Endothelzellen in simulierter Schwerelosigkeit zu einem Rückgang der EZM Proteine kam, diese jedoch bei länger andauernder Exponierung dann entweder auf dem selben hohen Niveau stehen blieben (Fibronektin) oder noch weiter gesteigert wurden (Kollagen Typ I und III, Laminin, Osteopontin). Bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit bFGF kam es zu keiner weiteren Steigerung (Kollagen Typ I), bzw. zu einer weiteren geringgradigen Erhöhung der EZM-Proteine (Kollagen Typ III, Fibronektin, Laminin, Osteopontin).

4.2.2 Die Auswirkungen von simulierter Schwerelosigkeit in Bezug auf Apoptose

4.2.2.1 Kurzzeitversuche

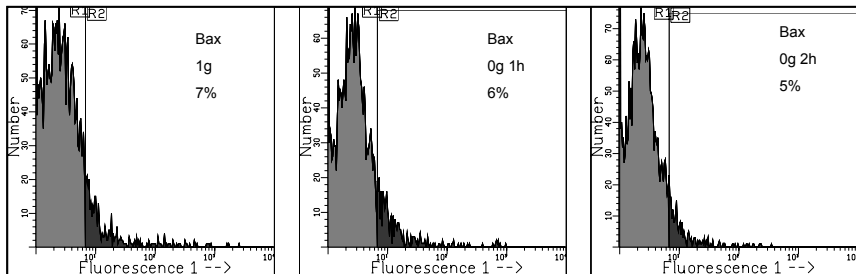
4.2.2.1.1 Bax

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $6,57 \% \pm 0,92 \%$. Bei den Zellen, die für eine Stunde unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $6,22 \% \pm 0,83 \%$, bzw. für die Zellen, die für zwei Stunden kultiviert wurden, bei $4,52 \% \pm 0,48 \%$. Für BK ergab sich $n=4$, für die Gruppen 1 h μg und 2 h μg ergaben sich jeweils $n=5$.

bax	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK	7,44	6,66	5,6			6,57	0,92
1h μg	6,84	6,8	6,62	5,94	4,88	6,22	0,83
2h μg	4,76	5,06	4,1	4,74	3,94	4,52	0,48

Tab. 24: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Bax-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



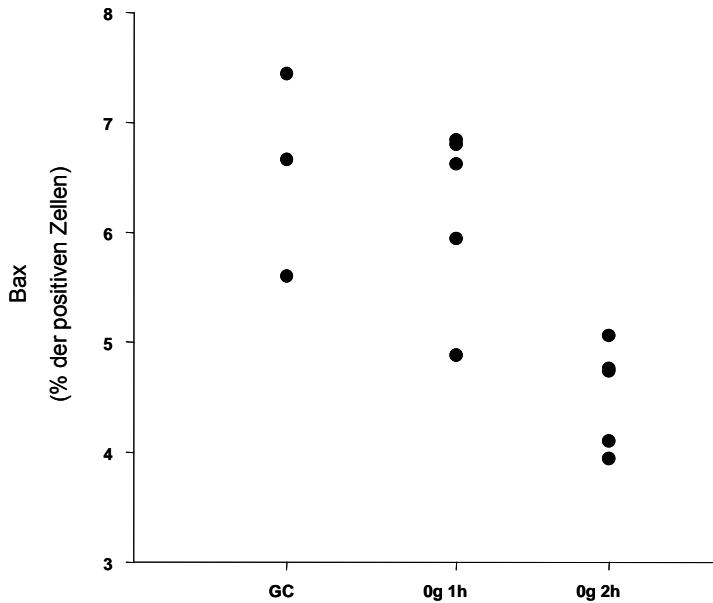


Abb. 32: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bax: Im Kurzzeitversuch zeigte sich eine Reduktion der Bax-positiven Zellen nach einer und noch deutlicher nach zwei Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit.

	Bodenkontrolle VEH	0g 1h
0g 1h	n.s.	
0g 2h	n.s.	0,016

Tab. 25: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bax. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

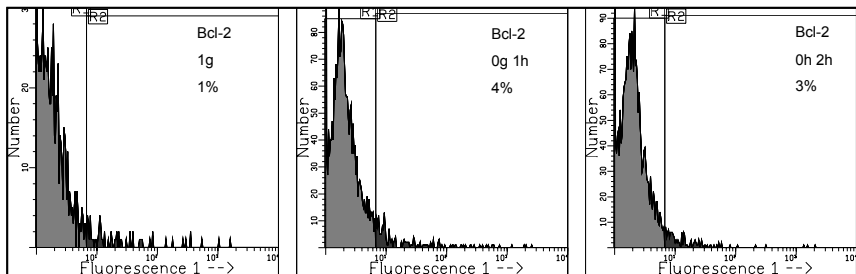
4.2.2.1.2 Bcl-2

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $1,3\% \pm 0,24\%$. Bei den Zellen, die für eine Stunde unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $3,74\% \pm 0,52\%$, bzw. für die Zellen, die für zwei Stunden kultiviert wurden, bei $2,76\% \pm 0,22\%$. Für BK ergab sich $n=4$, für die Gruppen 1 h μg und 2 h μg ergaben sich jeweils $n=5$.

bcl-2	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK	1,3	1,06	1,2	1,62		1,30	0,24
1h μg	3,86	4,08	3,48	2,98	4,28	3,74	0,52
2h μg	2,5	2,82	3,08	2,78	2,62	2,76	0,22

Tab. 26: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Bcl-2-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



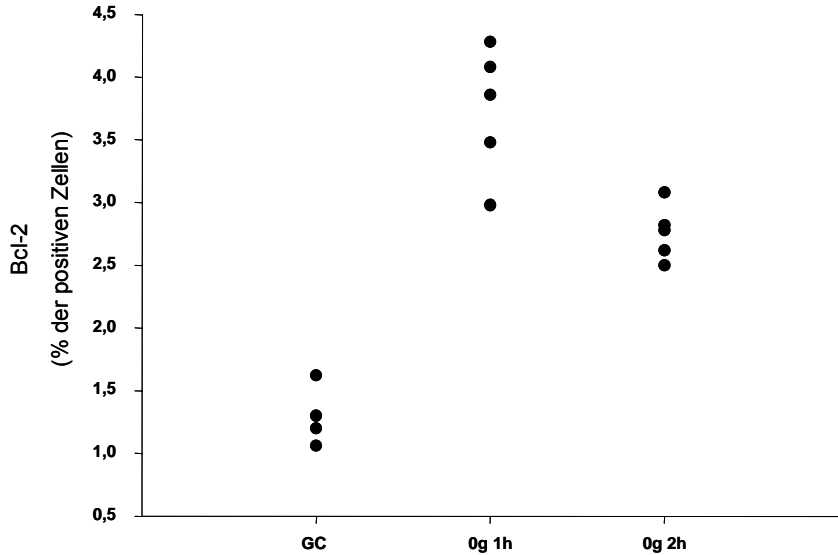


Abb. 33: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bcl-2: Im Kurzzeitversuch zeigte sich zuerst ein Anstieg der Bcl-2 positiven Zellen, dann eine Reduktion. Allgemein lagen die Werte eng beieinander.

	Bodenkontrolle VEH	0g 1h
0g 1h	0,016	
0g 2h	0,016	0,016

Tab. 27: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bcl-2. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

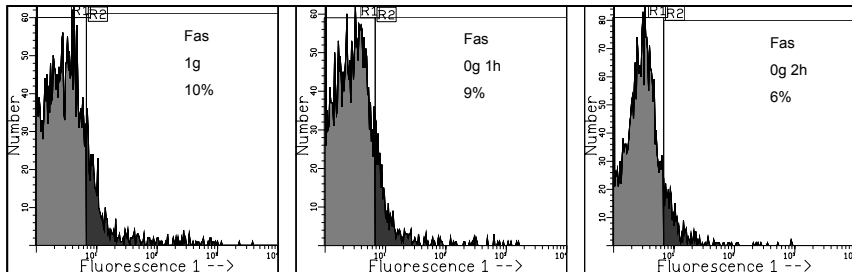
4.2.2.1.3 Fas

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $10,15 \% \pm 0,82 \%$. Bei den Zellen, die für eine Stunde unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $8,59 \% \pm 1,13 \%$, bzw. für die Zellen, die für zwei Stunden kultiviert wurden, bei $6,37 \% \pm 0,53 \%$. Für BK ergab sich $n=4$, für die Gruppen 1 h μg und 2 h μg ergaben sich jeweils $n=5$.

Fas	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK	11	10,12	9,04	10,44		10,15	0,82
1h μg	8,72	8	7,52	8,24	10,46	8,59	1,13
2h μg	7,12	6,18	6,68	6,08	5,8	6,37	0,53

Tab. 28: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Fas-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



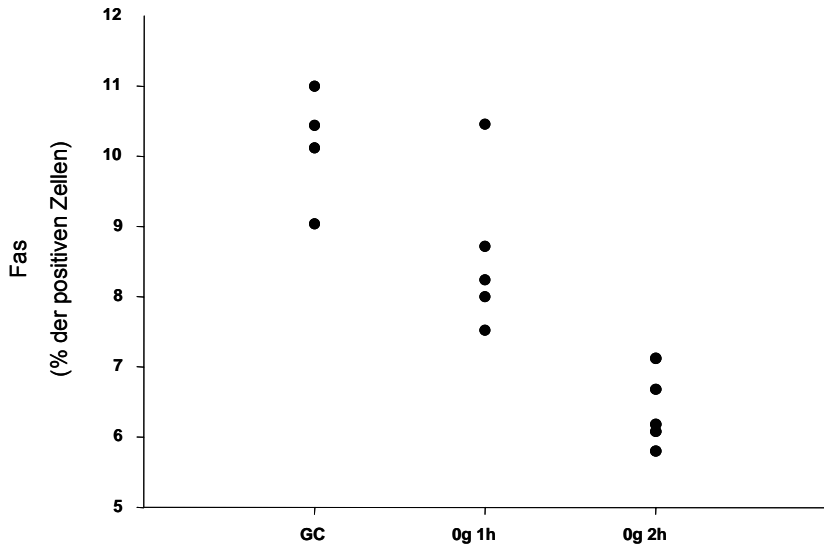


Abb. 34: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fas: Es zeigte sich ein kontinuierliches Absinken der Fas-positiven Zellen unter simulierter Schwerelosigkeit.

	Bodenkontrolle VEH	0g 1h
0g 1h	n.s.	
0g 2h	0,016	0,008

Tab. 29: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fas. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.2.2 Langzeitversuche

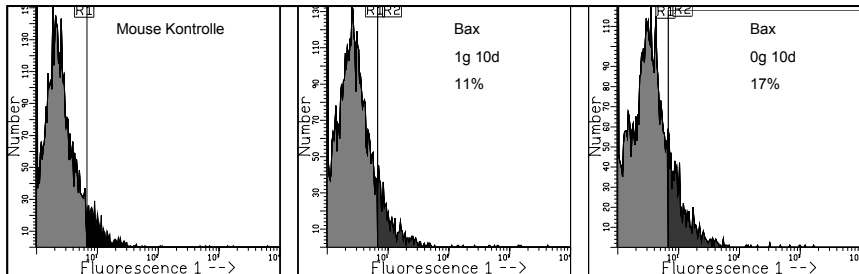
4.2.2.2.1 Bax

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $12,9 \% \pm 1,0 \%$. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $16,8 \% \pm 0,7 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

Bax	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	12,8	14,4	13,0	12,6	11,8	12,9	1,0
10d μg	16,1	16,5	16,7	17,8	16,7	16,8	0,7

Tab. 30: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Bax-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



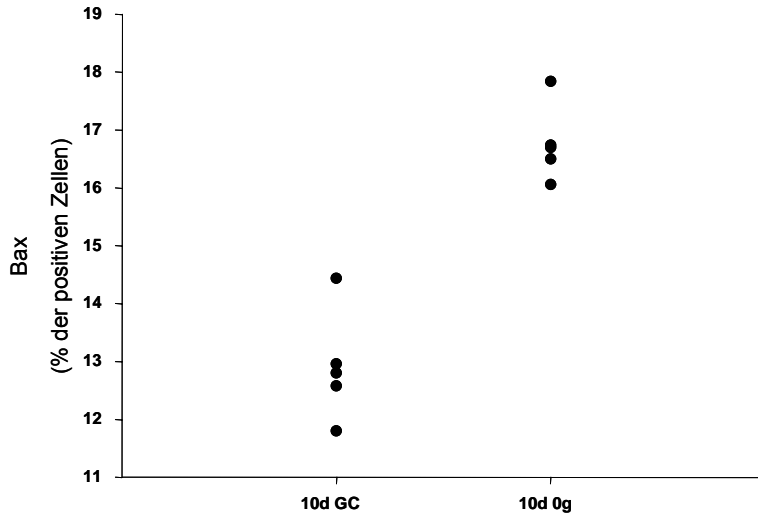


Abb. 35: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bax: Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Bax-positiven Zellen nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit (Infanger *et al.*, 2007).

	Bodenkontrolle VEH
0g 10d	0,008

Tab. 31: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bax. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.2.2.2 Bcl-2

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei 27,8 ± 0,7 %. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 34,9 % ± 2,1 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

Bcl-2	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	27,8	28,1	28,5	28,1	26,7	27,8	0,7
10d µg	37,0	37,3	33,9	33,1	33,1	34,9	2,1

Tab. 32: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Bcl-2-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

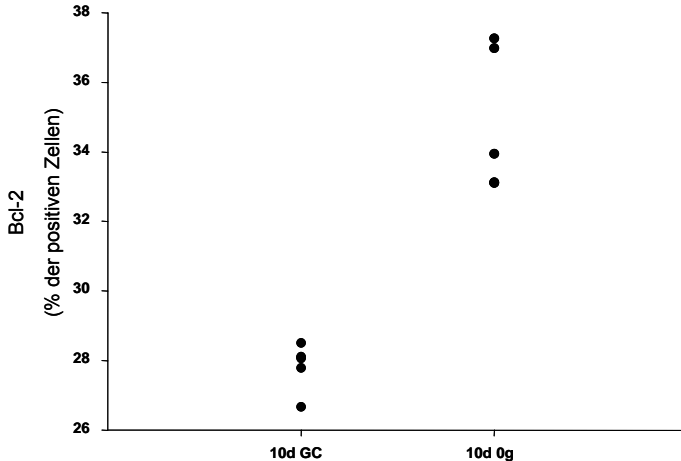
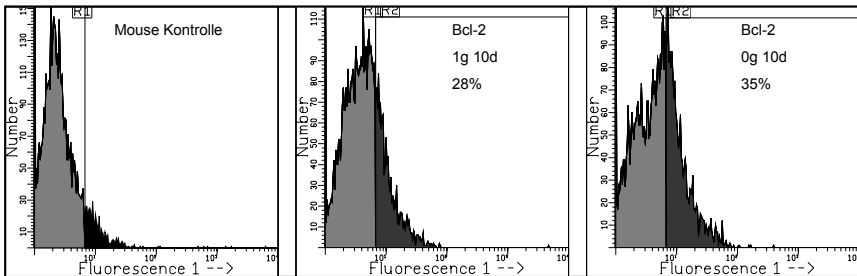


Abb. 36: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bcl-2: Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Bax-positiven Zellen nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit (Infanger *et al.*, 2007).

	Bodenkontrolle VEH
0g 10d	0,008

Tab. 33: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bcl-2. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei P<0,05.

4.2.2.2.3 Caspase-3

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $14,0 \pm 1,5 \%$. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $27,1 \pm 4,1 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=4$.

Caspase-3	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	13,8	14,4	15,7	12,2	14,0	1,5
10d μg	29,4	30,1	27,7	21,1	27,1	4,1

Tab. 34: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Caspase-3-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

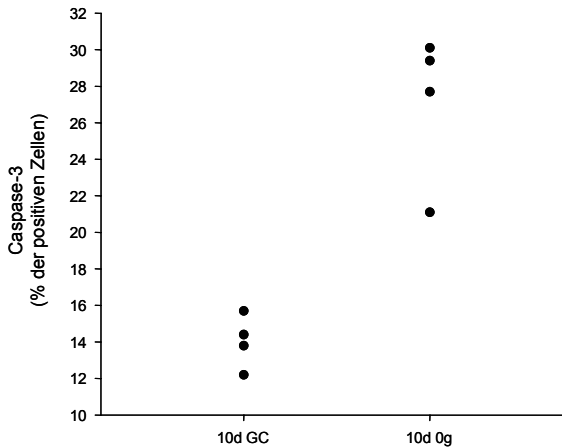
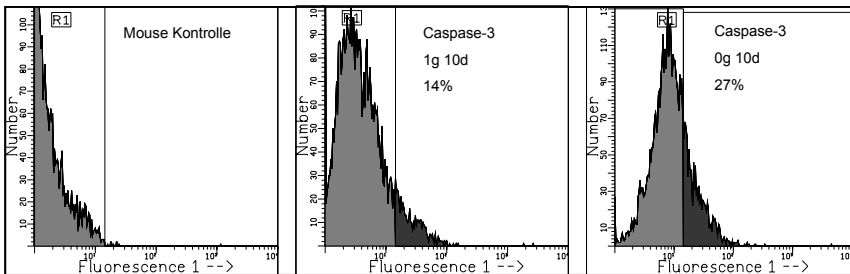


Abb. 37: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Caspase-3: Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Bax-positiven Zellen nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit (Infanger *et al.*, 2007).

b) PCR

Der Mittelwert der mittels TaqMan PCR erzielten Ergebnisse (% der Kontrolle) lag für die Zellen, die 10 min unter simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, bei 4,62 % \pm 3,51 %. Nach 20 min Kultivierung lag der Mittelwert bei 3,12 % \pm 1,86 % und nach einer Stunde bei 1,84 % \pm 0,66 %. Nach vier Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei 0,26 % \pm 0,28 % und der Mittelwert der unter μ g kultivierten Zellen bei 1,17 % \pm 0,63 %. Nach sieben Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei 0,36 % \pm 0,14 % und der Mittelwert der unter μ g kultivierten Zellen bei 0,3 % \pm 0,12 %. Nach zehn Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei 1,51 % \pm 0,28 % und der Mittelwert der unter μ g kultivierten Zellen bei 3,11 % \pm 0,58 %. Für die Gruppe 1 h μ g ergab sich n=2, für die Gruppen 10 min μ g und 30 min μ g n=3, für die Gruppe 4 d BK n=4, für die Gruppen 4 d μ g, 7 d BK und 10 d BK n=5, für die Gruppe 10 d μ g n=6 und für die Gruppe 7 d μ g n=9.

Caspase-3	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	6. Wert	7. Wert	8. Wert	9. Wert	MW	St.Abw.
10 min μ g	1,00	4,87	8,00							4,62	3,51
30 min μ g	5,27	2,15	1,96							3,12	1,86
1h μ g	2,31	1,38								1,84	0,66
4d μ g	1,51	1,87	1,19	1,10	0,19					1,17	0,63
4d BK	0,19	0,12	0,06	0,66						0,26	0,28
7d μ g	0,16	0,41	0,24	0,27	0,22	0,24	0,26	0,37	0,56	0,30	0,12
7d BK	0,19	0,37	0,49	0,30	0,53					0,38	0,14
10d μ g	3,24	3,00	3,71	2,15	2,87	3,66				3,11	0,58
10d BK	1,71	1,77	1,12	1,65	1,31					1,51	0,28

Tab. 35: Analyse der mittels TaqMan PCR ermittelten Daten; Caspase-3-Gen; % der Kontrolle mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

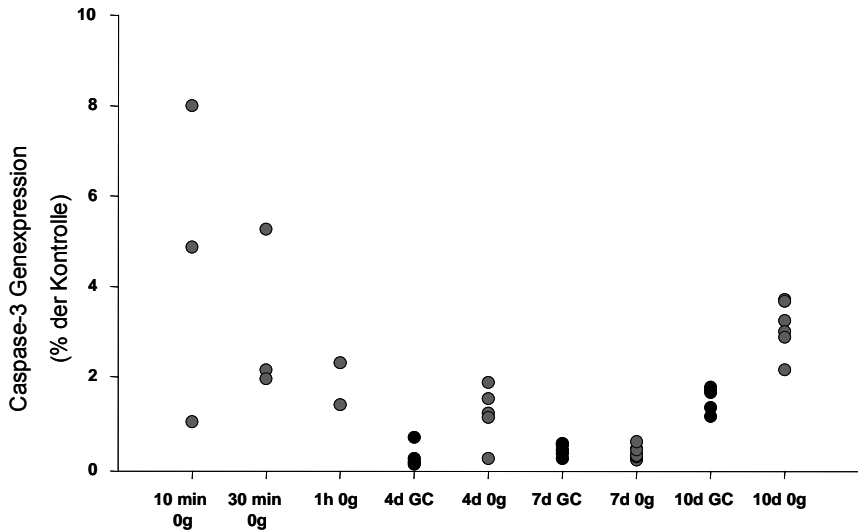


Abb. 38: Ergebnis der PCR-Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Caspase-3: Zusammenfassung unterschiedlicher Kurz- und Langzeitversuche. Zu beobachten ist eine Reduktion der Genexpression bis zu 7. Tag unter simulierter Schwerelosigkeit sowie ein erneuter Anstieg am Tag 10 (Infanger *et al.*, 2007).

	4d GC	4d 0g	7d GC	7d 0g	10d GC
4d 0g	n.s.				
7d GC	n.s.	n.s.			
7d 0g	n.s.	n.s.	n.s.		
10d GC	0,016	n.s.	0,008	0,001	
10d 0g	0,01	0,004	0,004	0	0,004

Tab. 36: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Caspase-3. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.2.2.4 Fas

PCR

Der Mittelwert der mittels TaqMan PCR erzielten Ergebnisse (% der Kontrolle) lag für die Zellen, die 10 min unter simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, bei $4,56 \% \pm 3,27 \%$. Nach 20 min Kultivierung lag der Mittelwert bei $2,25 \% \pm 1,35 \%$ und nach einer Stunde bei $0,46 \% \pm 0,03 \%$. Nach vier Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei $0,17 \% \pm 0,17 \%$ und der Mittelwert der unter μg kultivierten Zellen bei $0,35 \% \pm 0,18 \%$. Nach sieben Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei $0,09 \% \pm 0,02 \%$ und der Mittelwert der unter μg kultivierten Zellen bei $0,07 \% \pm 0,03 \%$. Nach zehn Tagen lag der Mittelwert der Bodenkontrolle bei $0,69 \% \pm 0,2 \%$ und der Mittelwert der unter μg kultivierten Zellen bei $0,84 \% \pm 0,26 \%$. Für die Gruppe 1 h μg ergab sich $n=2$, für die Gruppen 10 min μg und 30 min μg $n=3$, für die Gruppe 4 d BK $n=4$, für die Gruppen 4 d μg , 7 d BK und 10 d BK $n=5$, für die Gruppe 10 d μg $n=6$ und für die Gruppe 7 d μg $n=9$.

Fas	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	6. Wert	7. Wert	8. Wert	9. Wert	MW	St.Abw.
10 min μg	1	5,26	7,42							4,56	3,27
30 min μg	2,71	3,31	0,74							2,25	1,35
1h μg	0,48	0,43								0,46	0,03
4d μg	0,54	0,31	0,24	0,52	0,13					0,35	0,18
4d BK	0,12	0,10	0,04	0,42						0,17	0,17
7d μg	0,05	0,12	0,08	0,05	0,04	0,07	0,04	0,07	0,09	0,07	0,03
7d BK	0,06	0,10	0,11	0,09	0,09					0,09	0,02
10d μg	0,83	0,79	0,94	0,39	0,95	1,15				0,84	0,26
10d BK	0,47	0,98	0,55	0,75	0,71					0,69	0,20

Tab. 37: Analyse der mittels TaqMan PCR ermittelten Daten; Fas-Gen; % der Kontrolle mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

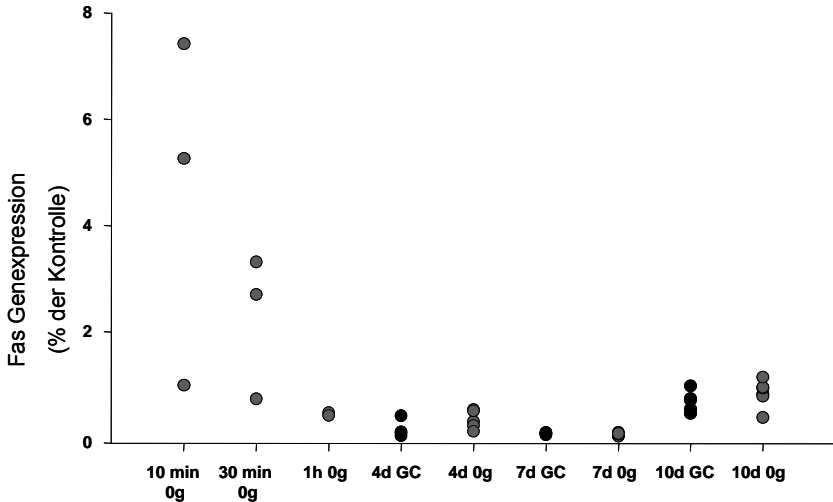


Abb. 39: Ergebnis der PCR-Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fas: Zusammenfassung unterschiedlicher Kurz- und Langzeitversuche. Zu beobachten ist eine Reduktion der Genexpression bis zu 7. Tag unter simulierter Schwerelosigkeit sowie ein erneuter Anstieg am Tag 10 (Infanger *et al.*, 2007).

	4d GC	4d 0g	7d GC	7d 0g	10d GC
4d 0g	n.s.				
7d GC	n.s.	0,008			
7d 0g	n.s.	0,001	n.s.		
10d GC	0,016	0,032	0,008	0,001	
10d 0g	0,019	0,017	0,004	0	n.s.

Tab. 38: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fas. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.2.2.5 p53

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei 9,2 % \pm 1,7 %. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 9,0 % \pm 1,6 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=4.

p53	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	10,2	10,1	9,6	6,7	9,2	1,7
10d μ g	10,4	9,5	9,3	6,6	9,0	1,6

Tab. 39: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; p53-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

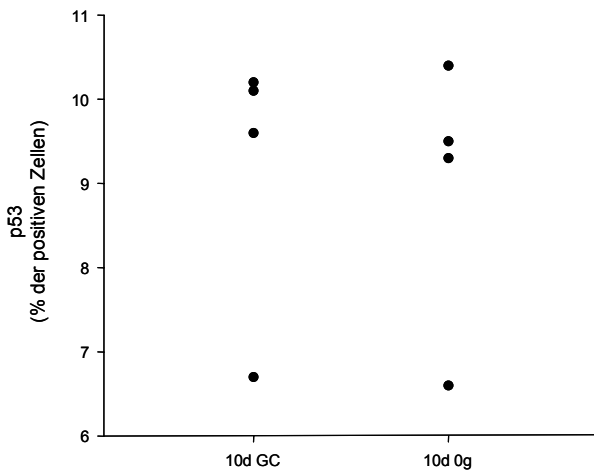
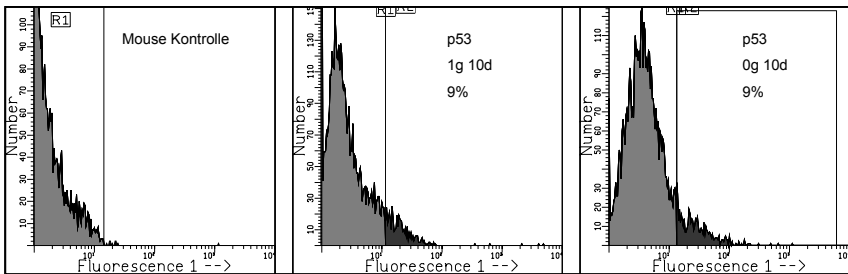


Abb. 40: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich p53: Es zeigte sich nahezu kein Unterschied zwischen den unter 0 g kultivierten Zellen und den Zellen der Bodenkontrolle.

4.2.2.3 Einfluss des basic Fibroblast Growth Factor auf die Apoptosefaktoren

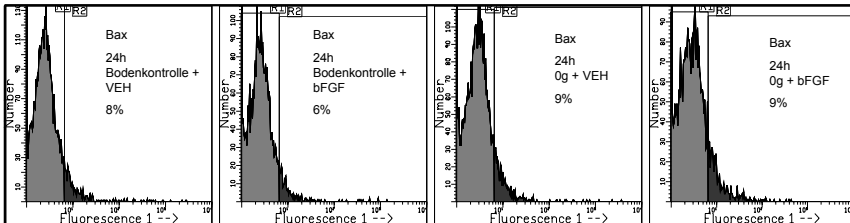
4.2.2.3.1 Bax

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 7,83 % \pm 0,79 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 6,11 % \pm 0,78 %. Bei den Zellen, die ohne BFGF für 24 Stunden unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 7,54 % \pm 2,41 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 9,41 % \pm 1,0 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

bax	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	3,76	4,16	3,6	3,56	3,82	7,83	0,79
BK bFGF	6,94	6,76	6,12	5,66	5,06	6,11	0,78
μ g VEH	8,62	8,34	8,72	8,76	3,24	7,54	2,41
μ g bFGF	10,52	9,9	9,86	8,76	8,02	9,41	1,00

Tab. 40: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Bax-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



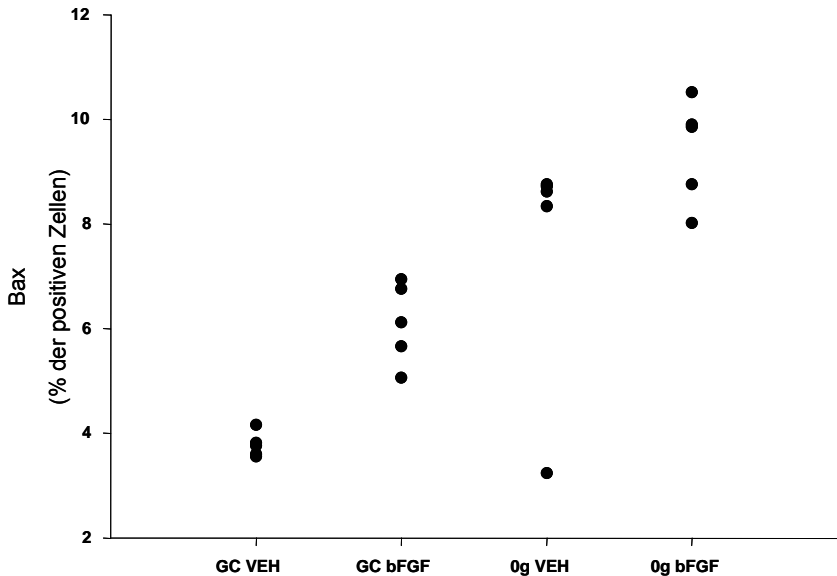


Abb. 41: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bax: Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg Bax-positiver Zellen jeweils im Vergleich zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen, bezogen auf unter 0 g kultivierten Zellen, bzw. der Bodenkontrolle (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,008		
0g VEH	n.s.	n.s.	
0g bFGF	0,008	0,008	n.s.

Tab. 41: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bax. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

b) Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei $6,92 \% \pm 6,19 \%$, bzw. für BK + bFGF bei $9,2 \% \pm 4,01 \%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne BFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $11,2 \% \pm 1,8 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $12,68 \% \pm 2,95 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

bax	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	4,09	4,25	4,92	3,39	17,96	6,92	6,19
BK bFGF	4,82	7,11	9,45	9,02	15,59	9,20	4,01
μg VEH	8,64	13,05	10,06	12,09	12,16	11,20	1,80
μg bFGF	12,44	12,12	9,04	12,53	17,27	12,68	2,95

Tab. 42: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Bax-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

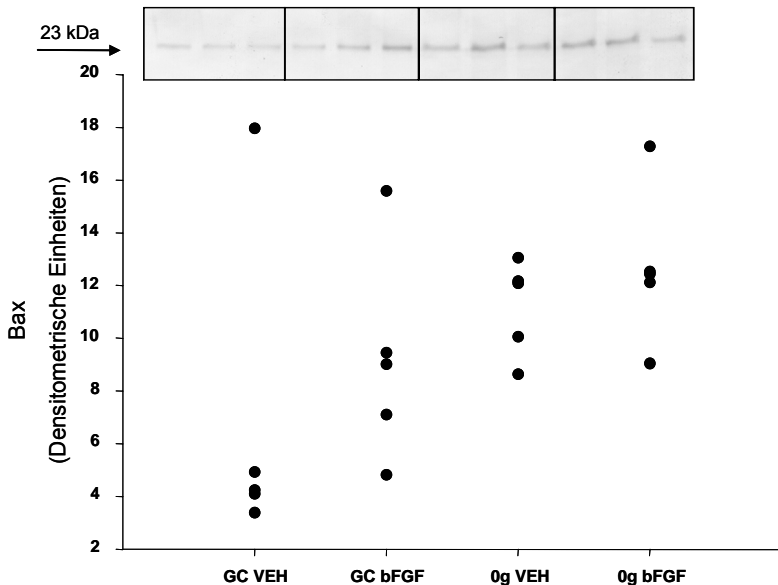


Abb. 42: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bax: Abgesehen von wenigen Ausreißern spiegelte das Ergebnis der Western Blot-Analyse die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung wieder (Ulbrich *et al.*, 2008).

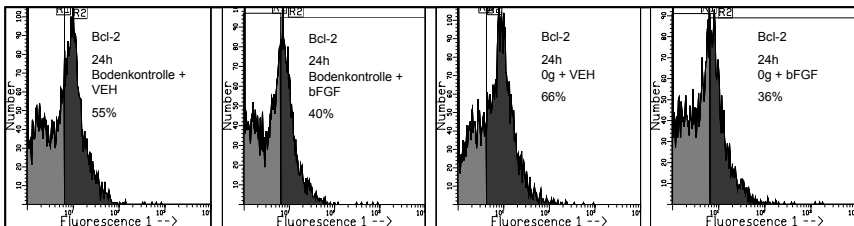
4.2.2.3.2 Bcl-2

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 54,58 % \pm 2,14 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 40,22 % \pm 4,19 %. Bei den Zellen, die ohne BFGF für 24 Stunden unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 65,54 % \pm 1,71 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 36,07 % \pm 2,85 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

bcl-2	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	57,58	55,06	54,94	53,5	51,8	54,58	2,14
BK bFGF	45,58	38,3	43,24	38,92	35,04	40,22	4,19
μ g VEH	65,88	65,14	64,34	68,3	64,02	65,54	1,71
μ g bFGF	36,58	38,66	38,5	34,8	31,82	36,07	2,85

Tab. 43: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Bcl-2-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



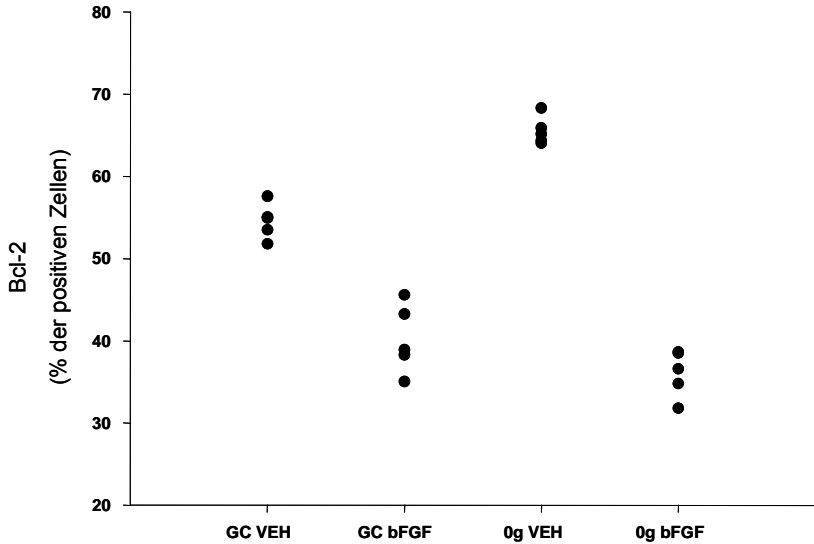


Abb. 43: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bcl-2: Es zeigte sich eine deutliche Reduktion Bcl-2-positiver Zellen jeweils im Vergleich zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen, bezogen auf unter 0 g kultivierten Zellen, bzw. der Bodenkontrolle (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH	0g bFGF
Bodenkontrolle + bFGF	0,008			
0g VEH	0,008		0,008	
0g bFGF	0,008		n.s.	0,008

Tab. 44: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Bcl-2-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

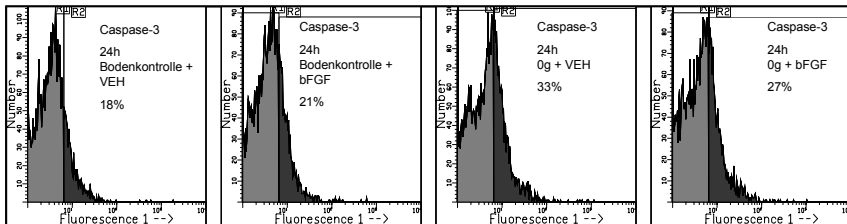
4.2.2.3.3 Caspase-3

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 17,66 % \pm 1,13 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 20,8 % \pm 1,13 %. Bei den Zellen, die ohne BFGF für 24 Stunden unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 33,17 % \pm 0,81 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 26,64 % \pm 1,33 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

caspase-3	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	18,14	18,7	18,04	17,68	15,76	17,66	1,13
BK bFGF	22,3	19,28	20,54	21,42	20,44	20,80	1,13
μ g VEH	33,66	33,76	33,54	33,1	31,8	33,17	0,81
μ g bFGF	26,88	28,26	27,4	24,92	25,74	26,64	1,33

Tab. 45: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Caspase-3-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



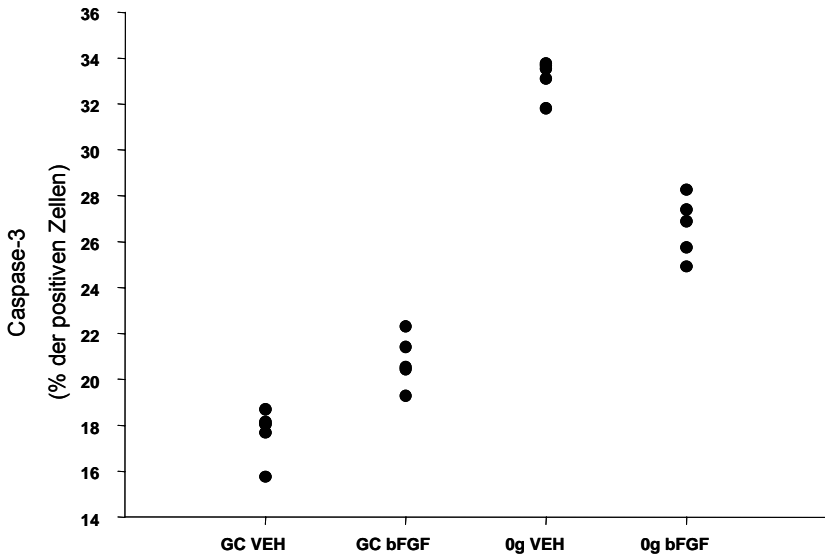


Abb. 44: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Caspase-3: Es zeigte sich ein Anstieg der Caspase-3-positiven Zellen im Vergleich der behandelten zur unbehandelten Bodenkontrolle. Bei den unter 0 g kultivierten Zellen zeigte sich ein genau umgekehrter Effekt durch bFGF (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH	0g bFGF
Bodenkontrolle + bFGF	0,008			
0g VEH	0,008	0,008		
0g bFGF	0,008	0,008	0,008	

Tab. 46: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Caspase-3. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

b) Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei $4,76 \% \pm 1,22 \%$, bzw. für BK + bFGF bei $6,46 \% \pm 0,9 \%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne BFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $11,3 \% \pm 2,27 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $12,2 \% \pm 0,61 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

caspase-3	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	2,66	5,53	5,56	5,3	4,73	4,76	1,22
BK bFGF	5,82	5,9	7,1	5,75	7,72	6,46	0,90
μg VEH	7,3	11,73	12,54	12,18	12,77	11,30	2,27
μg bFGF	11,88	12,86	12,11	11,4	12,75	12,20	0,61

Tab. 47: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Caspase-3-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

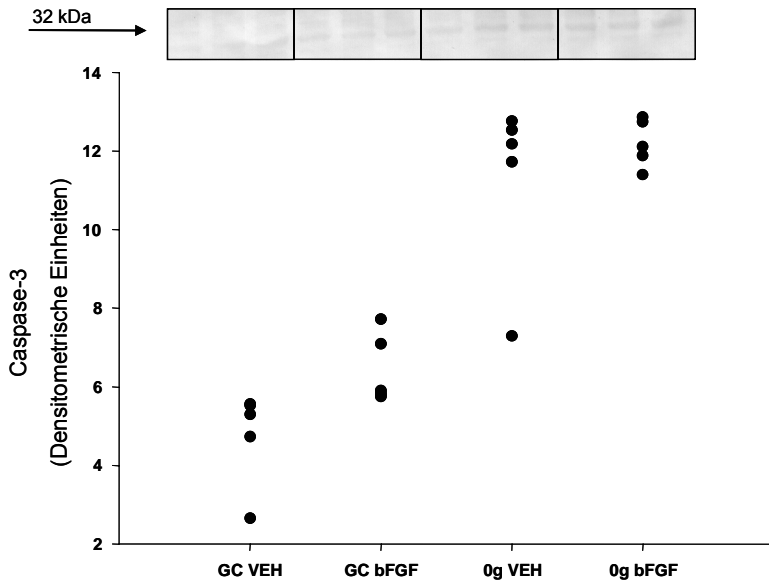


Abb. 45: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Caspase-3: Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse bestätigten das Ergebnis der Durchflusszytometrie.

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,008		
0g VEH	0,008	0,016	
0g bFGF	0,008	0,008	n.s.

Tab. 48: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Caspase-3. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

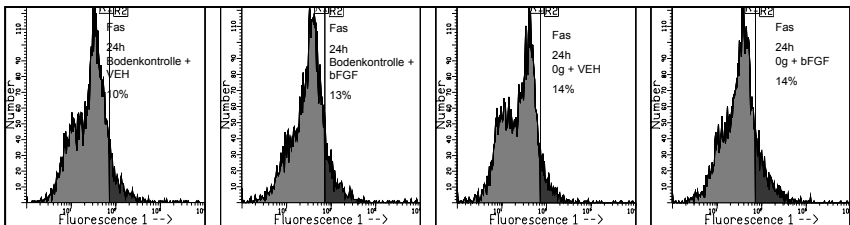
4.2.2.3.4 Fas

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 9,61 % \pm 1,8 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 12,5 % \pm 1,49 %. Bei den Zellen, die ohne BFGF für 24 Stunden unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 13,81 % \pm 3,11 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 13,81 % \pm 1,73 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

Fas	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	10,6	10,24	11,36	9,12	6,72	9,61	1,80
BK bFGF	13,3	13,42	12,46	13,38	9,92	12,50	1,49
μ g VEH	16,36	15,54	15,78	12,38	8,98	13,81	3,11
μ g bFGF	15,88	15,28	13,02	11,7	13,16	13,81	1,73

Tab. 49: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Caspase-3-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



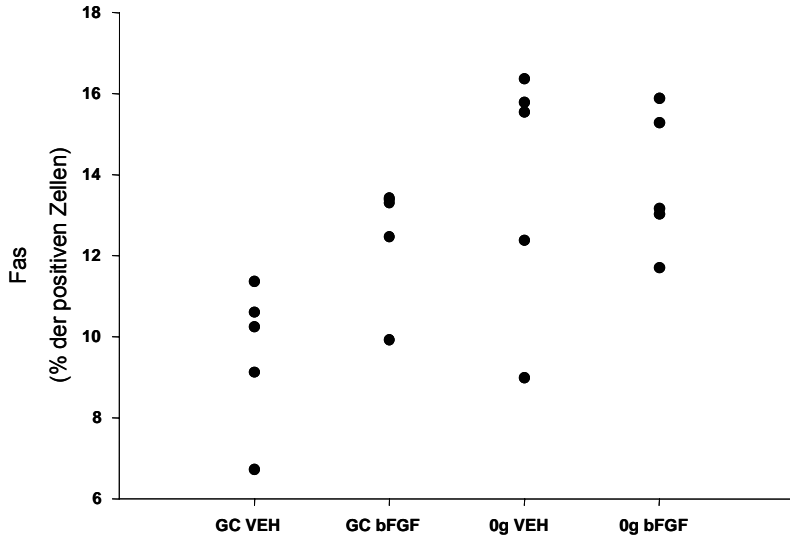


Abb. 46: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fas: Es zeigte sich ein Anstieg der Fas-positiven Zellen im Vergleich der behandelten zur unbehandelten Bodenkontrolle. Bei den unter 0 g kultivierten Zellen zeigte sich ein genau umgekehrter Effekt durch bFGF (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,047		
0g VEH	n.s.	n.s.	
0g bFGF	0,008	n.s.	n.s.

Tab. 50: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fas. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

b) Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei $7,16 \% \pm 2,58 \%$, bzw. für BK + bFGF bei $8,58 \% \pm 1,68 \%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne BFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $12,52 \% \pm 3,31 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $11,75 \% \pm 3,23 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

Fas	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	6,05	5,06	6,09	6,97	11,61	7,16	2,58
BK bFGF	6,33	7,56	9,51	8,85	10,63	8,58	1,68
μ g VEH	8,35	11,2	11,21	15,78	16,05	12,52	3,31
μ g bFGF	9,29	10,31	9,04	16,52	13,6	11,75	3,23

Tab. 51: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Fas-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

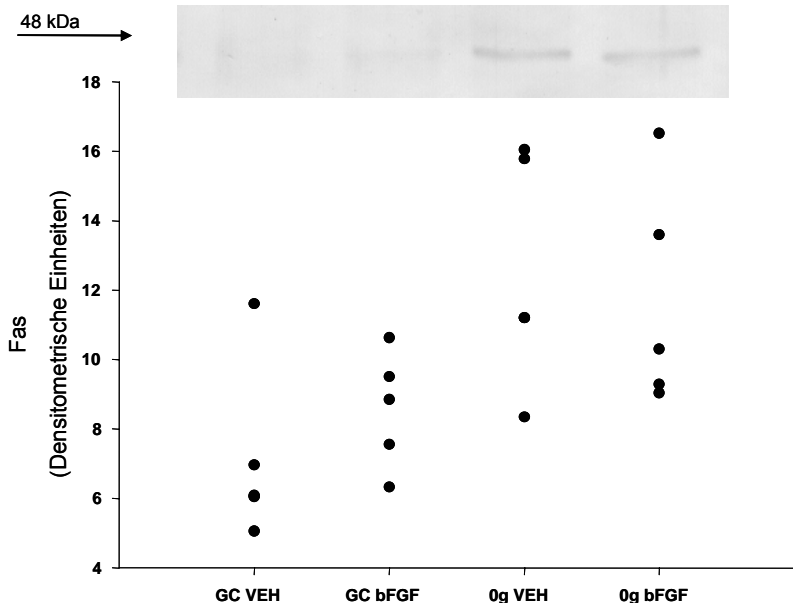


Abb. 47: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fas: Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse bestätigten das Ergebnis der Durchflusszytometrie (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	n.s.		
0g VEH	0,047	0,047	
0g bFGF	0,047	n.s.	n.s.

Tab. 52: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fas. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

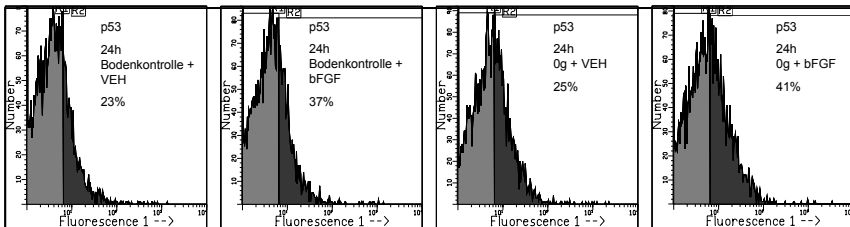
4.2.2.3.5 p53

a) Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 23,48 % \pm 1,15 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 25,2 % \pm 1,27 %. Bei den Zellen, die ohne BFGF für 24 Stunden unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 37,38 % \pm 1,17 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 31,81 % \pm 7,9 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

p53	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	24,36	23,84	24,44	23,08	21,66	23,48	1,15
BK bFGF	26,46	25,58	26	24,74	23,24	25,20	1,27
μ g VEH	37,82	35,72	37,92	38,72	36,7	37,38	1,17
μ g bFGF	41,64	41,7	42,76	41,24	38,56	41,81	7,90

Tab. 53: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; p53-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).



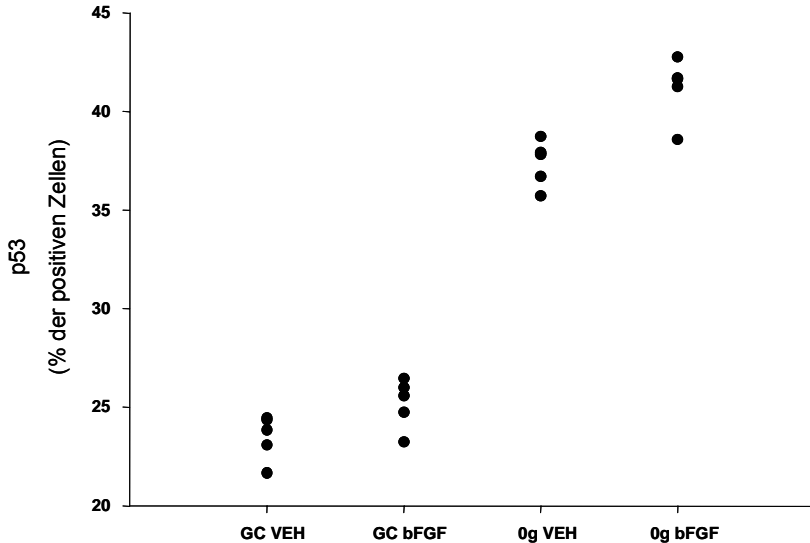


Abb. 48: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich p53: Es zeigte sich ein Anstieg der p53-positiven Zellen im Vergleich der behandelten zur unbehandelten Bodenkontrolle. Bei den unter 0 g kultivierten Zellen zeigte sich ein analoger Effekt durch bFGF (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,047		
0g VEH	0,008	0,008	
0g bFGF	0,008	0,008	0,016

Tab. 54: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für p53. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

b) Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei 5,91 % \pm 2,35 %, bzw. für BK + bFGF bei 10,91 % \pm 2,03 %. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne BFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei 11,53 % \pm 3,54 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 11,64 % \pm 2,7 %. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils n=5.

p53	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	3,43	3,93	5,53	8,17	8,51	5,91	2,35
BK bFGF	9,51	10,12	10,72	14,45	9,76	10,91	2,03
μ g VEH	7,51	9,55	10,08	15,15	15,38	11,53	3,54
μ g bFGF	9,62	10,38	9,62	12,65	15,93	11,64	2,70

Tab. 55: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; p53-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

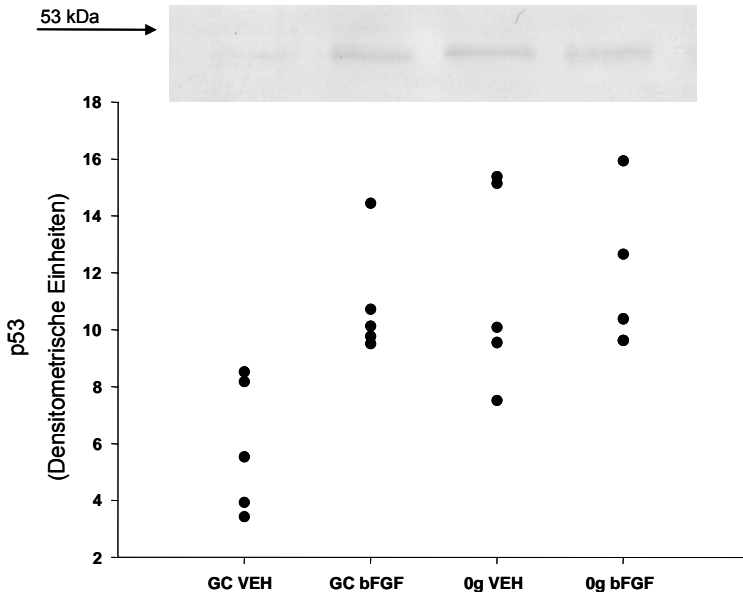


Abb. 49: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich p53: Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse bestätigten das Ergebnis der Durchflusszytometrie (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,008		
0g VEH	0,032	n.s.	
0g bFGF	0,008	n.s.	n.s.

Tab. 56: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für p53. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei P<0,05.

4.2.2.3.6 NFκB

Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Bodenkontrolle (BK + VEH) bei $3,34 \% \pm 0,63 \%$, bzw. für BK + bFGF bei $4,75 \% \pm 0,53 \%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden ohne bFGF unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $17,69 \% \pm 5,78 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $14,23 \% \pm 4,08 \%$. Für alle Gruppen ergaben sich jeweils $n=5$.

NFKB	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	3,33	3,13	3,06	2,76	4,4	3,34	0,63
BK bFGF	4,41	5,04	5,44	4,07	4,79	4,75	0,53
µg VEH	13,69	13,74	13,99	26,72	20,3	17,69	5,78
µg bFGF	11,21	11,58	11,38	20,25	16,71	14,23	4,08

Tab. 57: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; NFκB-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

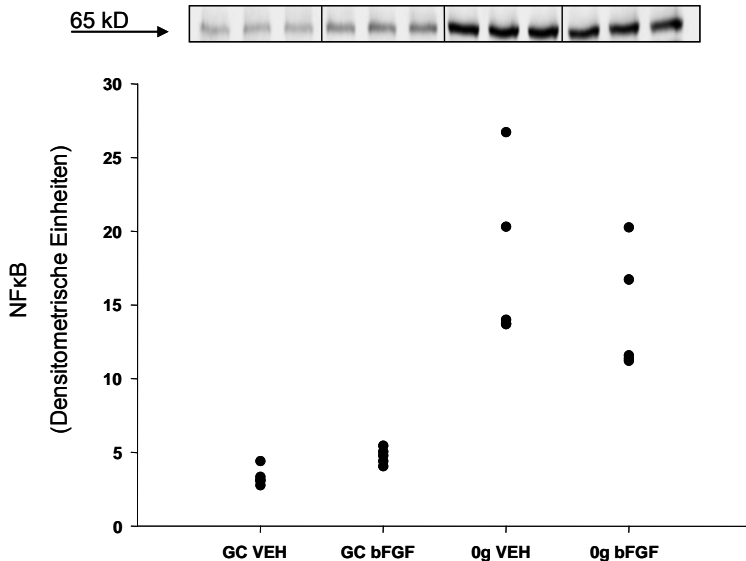


Abb. 50: Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich NFκB: Bei den unter 0 g kultivierten, behandelten Zellen kam es im Vergleich zur nicht-behandelten Gruppe zu einer Reduktion des NFκB Gehalts (65 kDa) (Ulbrich *et al.*, 2008).

	Bodenkontrolle VEH	Bodenkontrolle + bFGF	0g VEH
Bodenkontrolle + bFGF	0,016		
0g VEH	0,008	0,008	
0g bFGF	0,008	0,008	n.s.

Tab. 58: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für NFκB. Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es im Kurzzeitversuch mit simulierter Schwerelosigkeit auf Endothelzellen zu einer Reduktion der Apoptosefaktoren Bax, Bcl-2 und Fas kam. Dieser Effekt wurde nach länger andauernder Exposition aufgehoben und umgedreht. Nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit stiegen nahezu alle Apoptosefaktoren, bis auf p53, welches sein Level hielt, deutlich an.

Die Wirkungen von bFGF waren unterschiedlich. Während Bax und p53 unter dem Einfluss von bFGF leicht anstiegen, sanken die Werte von Bcl-2, Caspase-3, Fas und NFκB leicht ab.

4.2.3 Effekte von bFGF auf Endothelin-1, eNOS und TGF β_1

4.2.3.1 Endothelin-1

a) PCR

Der Mittelwert der mittels TaqMan PCR erzielten Ergebnisse (% der Kontrolle) lag für die Zellen, die für vier Stunden als Bodenkontrolle kultiviert wurden (BK + VEH) bei 1,12 % \pm 0,54 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 0,87 % \pm 0,36 %. Für die vier Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kultivierten unbehandelten Zellen lag der Mittelwert bei 1,59 % \pm 0,66 %, bzw. für die behandelten Zellen bei 1,01 % \pm 0,24 %. Bei den Zellen, die für 24 Stunden als Bodenkontrolle kultiviert wurden (BK + VEH) lag der Mittelwert bei 0,17 % \pm 0,09 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 0,18 % \pm 0,06 %. Für die 24 Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kultivierten unbehandelten Zellen lag der Mittelwert bei 0,42 % \pm 0,11 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 0,37 % \pm 0,11 %.

Endothelin-1	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
4h BK VEH	1	1,65	0,59	0,64	1,7	1,12	0,54
4h BK bFGF	0,57	1,47	0,94	0,67	0,7	0,87	0,36
4h μ g VEH	1,45	1,02	1,31	1,44	2,72	1,59	0,66
4h μ g bFGF	0,93	1,31	1,19	0,68	0,96	1,01	0,24
24h BK VEH	0,12	0,14	0,33	0,18	0,1	0,17	0,09
24h BK bFGF	0,17	0,15	0,14	0,16	0,28	0,18	0,06
24h μ g VEH	0,46	0,52	0,26	0,49	0,37	0,42	0,11
24h μ g bFGF	0,36	0,37	0,28	0,55	0,31	0,37	0,11

Tab. 59: Analyse der mittels TaqMan PCR ermittelten Daten; Endothelin-1-Gen; % der Kontrolle mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

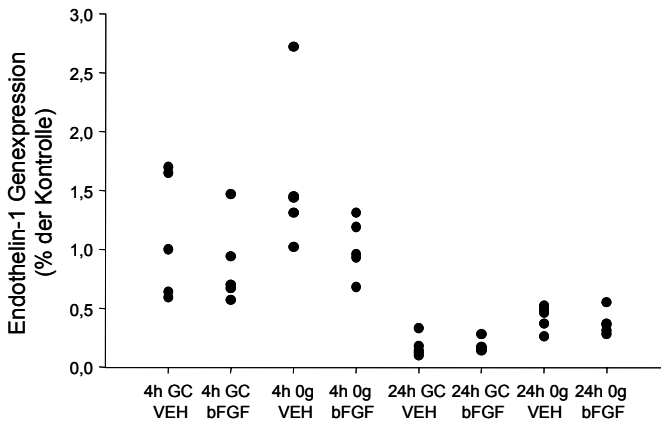


Abb. 51: Ergebnis der PCR von Ea.hy926 Zellen bezüglich Endothelin-1: Es zeigte sich zuerst eine verminderte Endothelin-1 Expression nach 24 h im Vergleich zu 4 h. Nach 4 h zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen 0 g, 1 g, behandelt und nicht behandelten Gruppen. Nach 24 h kam es unter simulierter Schwerelosigkeit zu einer Erhöhung der Expression (Ulbrich *et al.*, 2008).

	4h GC VEH	4h GC bFGF	4h µg VEH	4h µg bFGF	24h GC VEH	24h GC bFGF	24h µg VEH
4h GC bFGF	n.s.						
4h µg VEH	n.s.	n.s.					
4h µg bFGF	n.s.	n.s.	0,032				
24h GC VEH	0,008	0,008	0,008	0,008			
24h GC bFGF	0,008	0,008	0,008	0,008	n.s.		
24h µg VEH	0,008	0,008	0,008	0,008	0,016	0,016	
24h µg bFGF	0,008	0,008	0,008	0,008	0,032	0,008	n.s.

Tab. 60: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Endothelin-1: Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei P<0,05.

b) Western Blot-Analyse

Der Mittelwert der mittels Densitometrie erzielten Ergebnisse (Integral-Bkg [%]) lag für die Zellen, die für 24 Stunden als Bodenkontrolle kultiviert wurden (BK + VEH) bei 21,72 % ± 0,9 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 21,2 % ± 1,73 %. Für die 24 Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kultivierten unbehandelten Zellen lag der Mittelwert bei 27,58 % ± 0,98 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 29,49 % ± 2,12 %.

Endothelin-1	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
BK VEH	21,85	20,66	21,41	23,12	21,58	21,72	0,90
BK bFGF	20,68	22,05	22,11	22,76	18,42	21,20	1,73
µg VEH	29,25	26,76	27,41	27,03	27,45	27,58	0,98
µg bFGF	28,22	30,53	29,07	27,09	32,55	29,49	2,12

Tab. 61: Analyse der mittels Densitometrie ermittelten Daten; Endothelin-1-Protein; % der Kontrolle mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

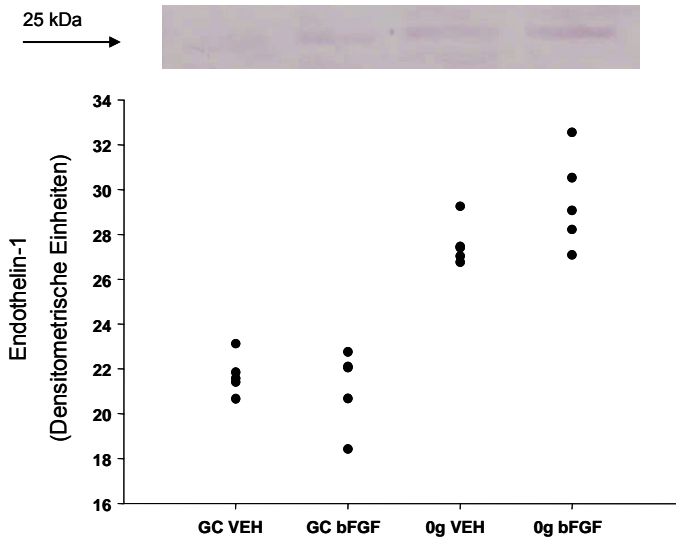


Abb. 52: Ergebnis der Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Endothelin-1: Nach 24h kam es unter simulierter Schwerelosigkeit zu einer Erhöhung der Endothelin-1 Gehalts. Dieser Effekt wurde durch bFGF verstärkt (Ulbrich *et al.*, 2008).

	24h GC VEH	24h GC bFGF	24h μ g VEH
24h GC bFGF	n.s.		
24h μ g VEH	0,008	0,008	
24h μ g bFGF	0,008	0,008	n.s.

Tab. 62: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Endothelin-1: Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.3.2 eNOS

PCR

Der Mittelwert der mittels TaqMan PCR erzielten Ergebnisse (% der Kontrolle) lag für die Zellen, die für vier Stunden als Bodenkontrolle kultiviert wurden (BK + VEH) bei $1,19 \% \pm 0,8 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $0,76 \% \pm 0,49 \%$. Für die vier Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kultivierten unbehandelten Zellen lag der Mittelwert bei $1,46 \% \pm 0,77 \%$, bzw. für die behandelten Zellen bei $0,66 \% \pm 0,15 \%$. Bei den Zellen, die für 24 Stunden als Bodenkontrolle kultiviert wurden (BK + VEH) lag der Mittelwert bei $1,3 \% \pm 0,18 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $0,89 \% \pm 0,25 \%$. Für die 24 Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kultivierten unbehandelten Zellen lag der Mittelwert bei $0,74 \% \pm 0,18 \%$, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei $0,61 \% \pm 0,1 \%$.

eNOS	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
4h BK VEH	1	1,96	0,49	0,39	2,1	1,19	0,80
4h BK bFGF	0,56	1,64	0,56	0,48	0,58	0,76	0,49
4h μ g VEH	2,71	0,79	1	1,11	1,67	1,46	0,77
4h μ g bFGF	0,7	0,73	0,75	0,74	0,39	0,66	0,15
24h BK VEH	1,51	1,27	1,08	1,44	1,19	1,30	0,18
24h BK bFGF	0,96	0,64	0,62	1,09	1,16	0,89	0,25
24h μ g VEH	0,98	0,61	0,57	0,88	0,66	0,74	0,18
24h μ g bFGF	0,46	0,72	0,6	0,67	0,59	0,61	0,10

Tab. 63: Analyse der mittels TaqMan PCR ermittelten Daten; eNOS-Gen; % der Kontrolle mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

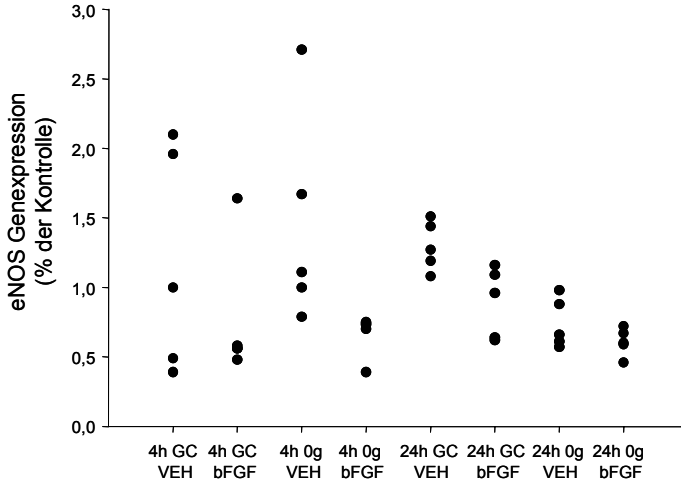


Abb. 53: Ergebnis der PCR von Ea.hy926 Zellen bezüglich eNOS: bFGF reduzierte in allen Gruppen die Expression von eNOS. Nach 24 h unter simulierter Schwerelosigkeit kam es zu einer deutlichen Reduktion der Expression im Vergleich zur Bodenkontrolle (Ulbrich *et al.*, 2008).

	4h GC VEH	4h GC bFGF	4h μ g VEH	4h μ g bFGF	24h GC VEH	24h GC bFGF	24h μ g VEH
4h GC bFGF	n.s.						
4h μ g VEH	n.s.	0,047					
4h μ g bFGF	n.s.	n.s.	0,008				
24h GC VEH	n.s.	n.s.	n.s.	0,008			
24h GC bFGF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,032		
24h μ g VEH	n.s.	n.s.	0,032	n.s.	0,008	n.s.	
24h μ g bFGF	n.s.	n.s.	0,008	n.s.	0,008	n.s.	n.s.

Tab. 64: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für eNOS: Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei $P < 0,05$.

4.2.3.3 TGF β_1

PCR

Der Mittelwert der mittels TaqMan PCR erzielten Ergebnisse (% der Kontrolle) lag für die Zellen, die für vier Stunden als Bodenkontrolle kultiviert wurden (BK + VEH) bei 0,93 % \pm 0,51 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 0,67 % \pm 0,28 %. Für die vier Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kultivierten unbehandelten Zellen lag der Mittelwert bei 1,28 % \pm 0,58 %, bzw. für die behandelten Zellen bei 0,61 % \pm 0,24 %. Bei den Zellen, die für 24 Stunden als Bodenkontrolle kultiviert wurden (BK + VEH) lag der Mittelwert bei 0,43 % \pm 0,11 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 0,26 % \pm 0,12 %. Für die 24 Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kultivierten unbehandelten Zellen lag der Mittelwert bei 0,75 % \pm 0,29 %, bzw. für die mit bFGF behandelten Zellen bei 0,45 % \pm 0,13 %.

TGF β_1	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	5. Wert	MW	St.Abw.
4h BK VEH	1	1,52	0,41	0,42	1,32	0,93	0,51
4h BK bFGF	0,48	1,14	0,73	0,53	0,48	0,67	0,28
4h μ g VEH	1,7	0,73	0,94	0,93	2,07	1,28	0,58
4h μ g bFGF	0,74	0,78	0,82	0,39	0,32	0,61	0,24
24h BK VEH	0,41	0,4	0,61	0,41	0,31	0,43	0,11
24h BK bFGF	0,4	0,13	0,16	0,35	0,24	0,26	0,12
24h μ g VEH	0,78	1,17	0,36	0,69	0,74	0,75	0,29
24h μ g bFGF	0,32	0,43	0,38	0,48	0,65	0,45	0,13

Tab. 65: Analyse der mittels TaqMan PCR ermittelten Daten; TGF β_1 -Gen; % der Kontrolle mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

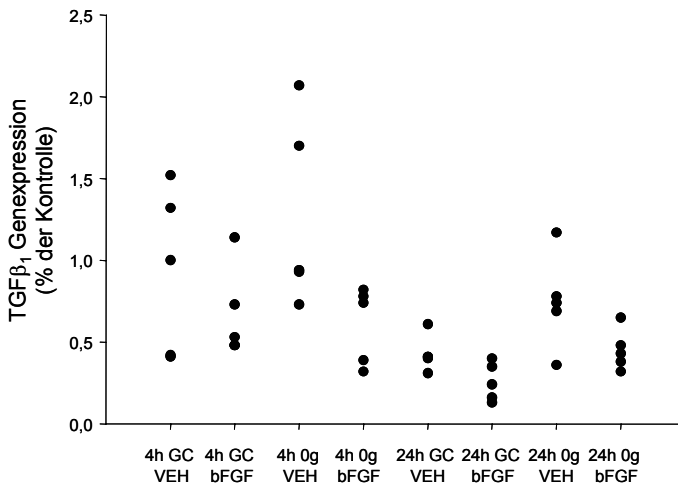


Abb. 54: Ergebnis der PCR von Ea.hy926 Zellen bezüglich TGF β_1 ; bFGF reduzierte in allen Gruppen die Expression von TGF β_1 . Nach 24 h unter simulierter Schwerelosigkeit kam es zu einer deutlichen Steigerung der Expression im Vergleich zur Bodenkontrolle (Ulbrich *et al.*, 2008).

	4h GC VEH	4h GC bFGF	4h μ g VEH	4h μ g bFGF	24h GC VEH	24h GC bFGF	24h μ g VEH
4h GC bFGF	n.s.						
4h μ g VEH	n.s.	n.s.					
4h μ g bFGF	n.s.	n.s.	0,047				
24h GC VEH	0,045	0,047	0,008	n.s.			
24h GC bFGF	0,008	0,008	0,008	0,047	0,047		
24h μ g VEH	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,016	
24h μ g bFGF	n.s.	n.s.	0,008	n.s.	n.s.	0,047	n.s.

Tab. 66: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für TGF β_1 : Nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (P=); Signifikanz bei P<0,05.

4.2.4 Korrelation von Endothelin-1 und TGF β_1

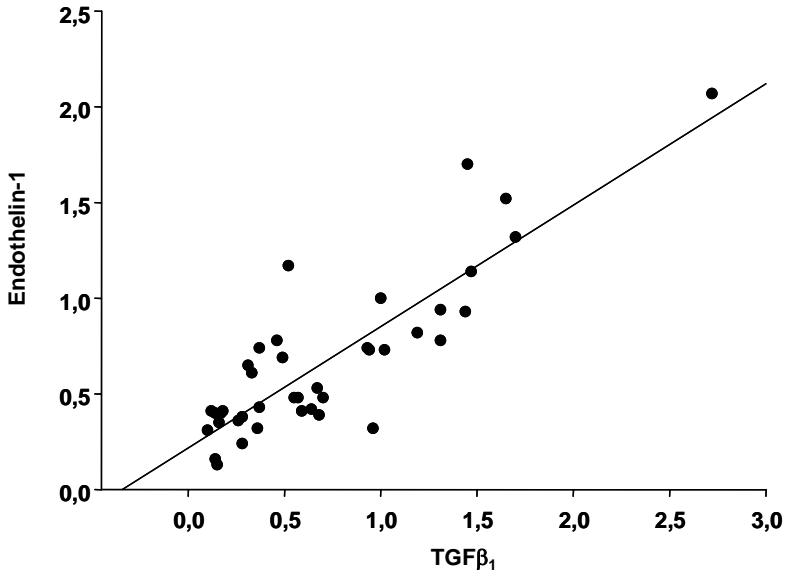


Abb. 55: Korrelation zwischen TGF β_1 und Endothelin-1. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant ($R=0,858$); Korrelation berechnet nach Pearson.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es unter dem Einfluss von bFGF zu einer erhöhten Expression von Endothelin-1 kam, während die eNOS und TGF β_1 mRNA reduziert wurden.

Bemerkenswert ist die deutliche Korrelation zwischen Endothelin-1 und TGF β_1 .

4.2.5 Das Zytoskelett

4.2.5.1 F-Aktin

Zur Verdeutlichung der Veränderungen des Zytoskeletts wurde F-Aktin angefärbt.

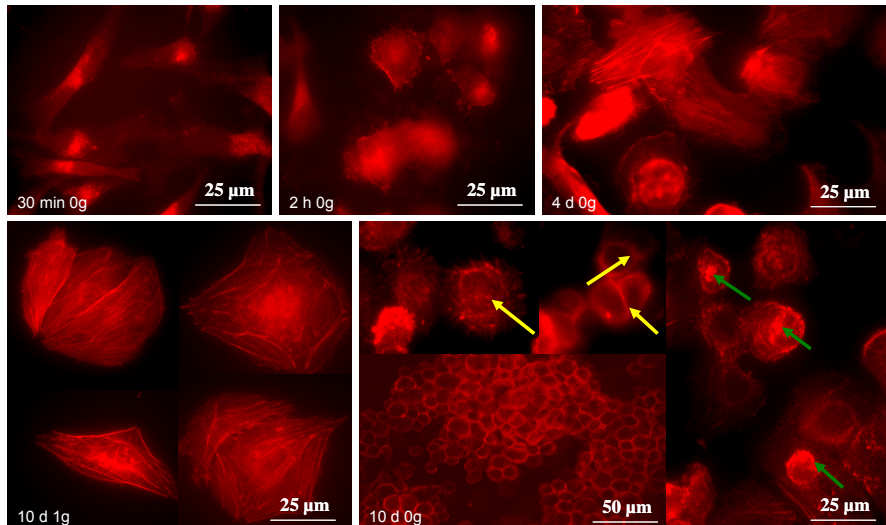


Abb. 56: F-Aktin Färbung. F-Aktin war nach 30 min (A), 2 h (B) und 4 Tagen (C) unter simulierter Schwerelosigkeit herabgesetzt. Nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit akkumulierte F-Aktin an der zellulären Membran und perinukleär (E, siehe Pfeile) verglichen mit den dazu gehörigen 1 g Kontrollzellen (D) (Infanger *et al.*, 2007).

4.2.5.2 F-Aktin und alpha-/beta-Tubulin

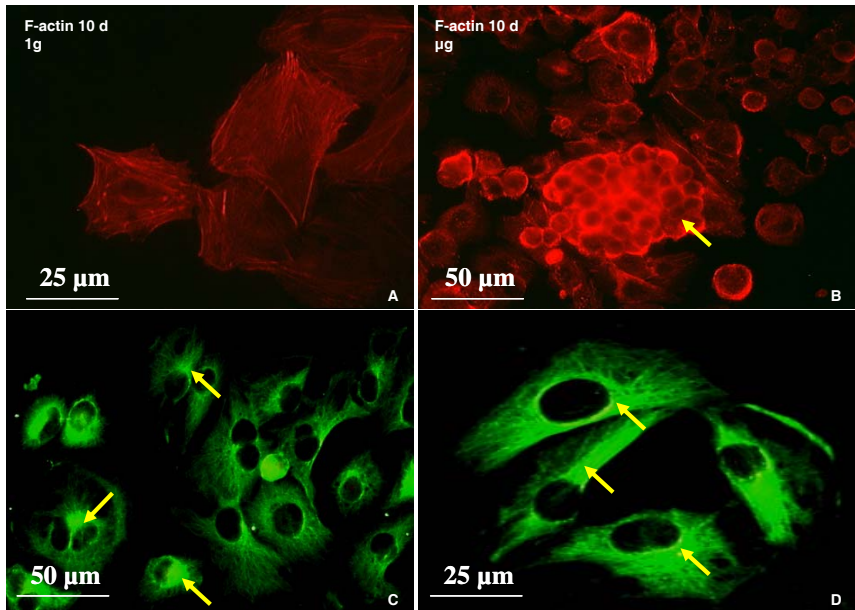


Abb. 57: F-Aktin, α - und β -Tubulin Färbung. Endothelzellen als Kontrolle (A) und nach 10 Tagen Klinorotation (B). F-Aktin akkumuliert an der zellulären Membran (Pfeil) multizellulärer Sphäroide (B). Alpha- (C) und beta (D)-Tubulin Immunfluoreszenz: Unter Mikrogravitation strecken sich die mikrotubulären Filamente von schlecht definierten Organisationszentren und werden vereinigt, verdickt und verkürzt (Pfeile) (Infanger *et al.*, 2007).

4.2.5.3 Vimentin

Durchflusszytometrie

Der Mittelwert der mittels Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse (% der positiven Zellen) lag für die Bodenkontrolle (BK) bei $80,3 \pm 2,0$ %. Bei den Zellen, die für zehn Tage unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert wurden, lag der Mittelwert bei $89,8 \pm 0,9$ %. Für BK und 10 d μg ergaben sich jeweils $n=4$.

Vimentin	1. Wert	2. Wert	3. Wert	4. Wert	MW	St.Abw.
10d BK	81,2	82,3	79,9	77,6	80,3	2,0
10d μg	90,5	89,6	90,3	88,6	89,8	0,9

Tab. 67: Analyse der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Daten; Vimentin-Protein; % der positiven Zellen mit Angabe der Einzelwerte, der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (St.Abw.).

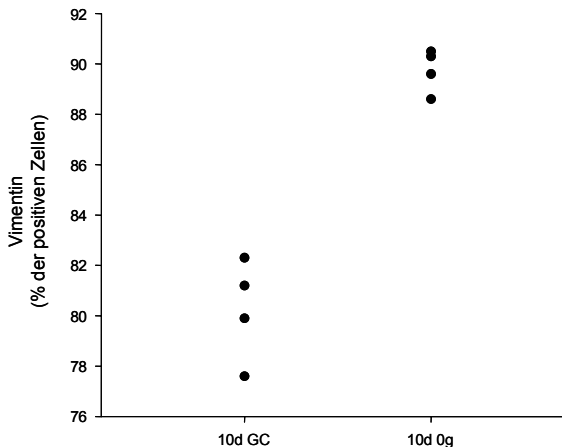
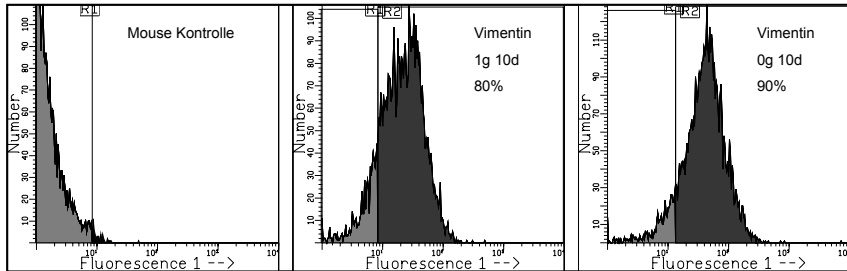


Abb. 58: Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Vimentin: Es zeigte sich ein Anstieg der Vimentin-positiven Zellen nach 10 Tagen unter simulierter Schwerelosigkeit.

Der Aufenthalt unter simulierter Schwerelosigkeit führte bei Endothelzellen zu gravierenden Veränderungen des Zytoskeletts. Die Menge und Lokalisation von F-Aktin bei Zellen, die 0 g Bedingungen ausgesetzt waren, variierte stark im Vergleich zu den Bodenkontrollen. Bei alpha-/ und beta-Tubulinen war eine deutliche morphologische Veränderung der unter 0 g kultivierten Zellen zu erkennen. Betrachtet man die Ergebnisse für Vimentin, so war eine gesteigerte Positivität nach Exposition der Zellen an Schwerelosigkeit deutlich zu sehen.

5. DISKUSSION

Für die vorliegende Arbeit wurden Endothelzellen des Menschen unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit für einen Zeitraum von 10 Tagen unter Zuhilfenahme eines dreidimensionalen Klinostaten (Random Positioning Machine, RPM) untersucht. Diese Doktorarbeit ist die Grundlage für das Sheroids Experiment ESA-AO-2004-006 „Effects of weightlessness on tube formation, differentiation, and the mechanisms of apoptosis in human endothelial cells“, das 2011 zur ISS geflogen wird.

5.1 Endothelzellen und Schwerelosigkeit

Seit der Zeit, als die ersten flugtauglichen Weltraumbioreaktoren konstruiert wurden, (Gmunder *et al.*, 1988) wurden immer wieder bei Weltraummissionen Zellkulturen mitgeführt und während, bzw. nach dem Flug analysiert. Das besondere Augenmerk bei den Untersuchungen lag bislang auf der Veränderung zellulärer Eigenschaften unter dem Einfluss von Schwerelosigkeit. Fanden die ersten Untersuchungen noch an Lymphozyten statt (Pippia *et al.*, 1996; Cogoli-Greuter *et al.*, 1996), so begann man recht bald, auch Einzelzellsuspensionen aus Gewebszellen auf Weltraumflüge mitzunehmen. Interessiert waren die Forscher vor allem am Einfluss kosmischer Strahlung auf Gewebszellen im Hinblick auf Schäden an den Zellen, und der Möglichkeit, diese Schädigung zu verhindern (Meli *et al.*, 1998). Des Weiteren war die Genexpression interessant, bzw. ihre Veränderung unter Schwerelosigkeit (Stein *et al.*, 1999; Ohnishi *et al.*, 2000). Während der STS-90 und STS-86 Flüge wurden Ratten-Nierenzellen als dreidimensionale Kulturen gezüchtet, anschließend fixiert, und nach der Landung hinsichtlich der Genexpression untersucht. Es stellte sich heraus, dass während der sechstägigen Inkubation im Space Shuttle, im Vergleich zu den Laborproben, mehr als 1600 Gene in ihrer Expression beeinflusst wurden (Hammond *et al.*, 2000). Die Forschung im Bereich Endothelzellen unter Schwerelosigkeit ist neu, wobei die angewendete Methode der Kultivierung mithilfe eines Klinostaten bereits etabliert ist (Grimm *et al.*, 2006). Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem Verhalten von Endothelzellen unter Schwerelosigkeit, zum einen hinsichtlich des Unterschieds zwischen Kurz- und Langzeiteffekten, zum anderen hinsichtlich des Einflusses von bFGF. Es stellte sich die Frage nach den Adaptationsprozessen, die Endothelzellen in der für sie neuen Umgebung durchlaufen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an extrazellulären Matrixproteinen stark ansteigt, was dafür spricht, dass die Zellen sich in ihrer neuen Umgebung stabilisieren. Bekannt ist bereits, dass sich Endothelzellen schon nach kurzer Zeit zu dreidimensionalen Sphäroiden zusammenlagern. Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass die Zellen auch einen längeren Aufenthalt unter diesen Bedingungen kompensieren, und sich der neuen Umgebung anpassen, ist ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung Tissue Engineering getan. Es stellt sich nunmehr die Frage ob es möglich ist,

mithilfe dieser Methode Mikrogefäße zu züchten, die einerseits in der Mikrochirurgie eingesetzt werden könnten, andererseits für Pharmakatest verwendet werden können, um so auf Dauer Tierversuche einzusparen.

5.2 Dreidimensionale multizelluläre Sphäroide

Um Gewebszellen in einer möglichst realistischen Umgebung beurteilen zu können ist es nötig, sie nicht im zweidimensionalen Wachstum zu untersuchen, sondern eingebunden in dreidimensionale Strukturen. Die derzeit noch angewendeten Standardverfahren haben große Nachteile. Bei der Liquid-overlay-Technik beeinflussen Sedimentationskräfte die Zell-Zell-Interaktion, und bei der Spinner flask entstehen durch das Rühren hohe Scherkräfte, welche sich ebenfalls negativ auf die Zell-Zell-Interaktionen auswirken.

Eine neue Technik ist das Anwenden von RPM oder RWV zur Bildung dreidimensionaler Sphäroide. Erste Ergebnisse waren viel versprechend (Ingram *et al.*, 1997; Yoffe *et al.*, 1999; Hedlund *et al.*, 1999; Khaoustov *et al.*, 1999; Battle *et al.*, 1999). Schon beim derzeitigen Stand der Technik ermöglichen es die Sphäroide, *in vitro* Antworten auf Fragen bezüglich der Diffusion von Luft, Nährstoffen, Proteinen usw. zu liefern (Gorlach und Acker, 1994).

Es soll zukünftig möglich werden, Sphäroide herzustellen, deren dreidimensionaler Aufbau dem Ursprungsgewebe derart ähnelt, dass man mit ihrer Hilfe schnellere Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation anstellen kann. Hierfür war es nötig zu zeigen, dass Zellen auch längere Zeit unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit kultiviert werden können und das entstandene Sphäroide während dieser Zeit stabil bleiben. Diese Bedingungen konnten durch diese Arbeit überprüft und bestätigt werden. Das Erzeugen multizellulärer Sphäroide mithilfe einer RPM ist schnell und einfach durchzuführen. Überprüft werden muss in Folgeversuchen die Frage, wie sich Suspensionen aus mehreren Kulturen unter diesen Bedingungen verhalten.

5.3 Veränderungen des Zytoskeletts der Endothelzellen unter simulierter Schwerelosigkeit

Wie bereits in Studien an anderen Zellen beobachtet, so verändern auch Endothelzellen ihre strukturellen Anordnungen der zytoskelettalen Filamente, wenn sie simulierter Schwerelosigkeit ausgesetzt werden. Das F-Aktin Netzwerk verschwindet vorübergehend innerhalb weniger Stunden zu Beginn der Klinorotation. Nach 4 Tagen wurde eine Reorganisation in einigen, wenn auch nicht in allen Zellen sichtbar. Nach einer 10-tägigen Wachstumsphase unter Mikrogravitation konnte eine Filamentanhäufung in der Nähe der Zellmembran beobachtet werden, sowie in der perinukleären Gegend, jeweils im Vergleich zu den Bodenkontrollen. Aktinfilamente stabilisieren die Zelle. Nachdem es im Langzeitversuch zu einer Reorganisation dieser Filamente kam liegt die Vermutung nahe,

dass dies ein Hinweis auf eine beginnende Anpassung der Zellen an die veränderten Bedingungen sein könnte. Eine Unterbrechung der zytoskelettalen Integrität wurde bereits lange als ein gravitationssensibler Mechanismus in einzelnen Zellen vermutet (Hughes-Fulford, 2003; Hoeger und Gruener, 1990). Neuere Untersuchungen, die auf dieser Arbeit aufbauen können, sollten der Frage nachgehen, welche Pathways aktiviert werden, und in wieweit das Zytoskelett hierin involviert ist. Obwohl die Veränderungen der Filamentstruktur auf einem direkten Einfluss der Mikrogravität auf die Proteine zu beruhen scheinen (Gruener *et al.*, 1993), kann es nicht ausgeschlossen werden, dass einige Faktoren, die während der Klinorotation überaus stark produziert werden, eine Rolle spielen könnten (Pellegrino *et al.*, 2004). Ein intaktes Zytoskelett ist für eine Signalübertragung von großer Bedeutung. Membranäre zytoskelettale Interaktionen sind in die Übertragung von second messengern durch Signalverstärkung involviert (Carraway und Carraway, 1989). Hierfür kann eine Beziehung zwischen zytoskelettaler Zerstörung und Apoptose postuliert werden (Lewis *et al.*, 1998). Apoptose wird in vielen verschiedenen Zelltypen induziert, die unter simulierter Schwerelosigkeit wachsen (Lewis *et al.*, 1998; Maccarrone *et al.*, 2003; Sakar *et al.*, 2000). Über ähnliche Veränderungen des Zytoskeletts in verschiedenen Zelltypen wurden bereits bei anderen berichtet (Meloni *et al.*, 2004; Meyers *et al.*, 2005; Guignandon *et al.*, 2001). Geklärt werden muss in neuen Untersuchungen die Frage, ob es über einen längeren Zeitraum (<10d) zu einer exakten Wiederherstellung des Zytoskeletts kommt, und inwieweit dies die Proliferation von Sphäroiden beeinflusst.

5.4 Die Rolle der Extrazellulären Matrix bei Endothelzellen

Endothelzellen sind in die EZM eingebettet. Die Hauptbestandteile der EZM sind verschiedene Typen von Kollagenen, Laminin und Fibronectin. Im gesunden Gewebe unterliegt die EZM einem kontrollierten Metabolismus (Blobel, 2000), welcher es der Zelle trotz Einbindung in ein Stützgewebe erlaubt, mit ihrer Umgebung zu kommunizieren. Kommt es zu einem gesteigerten Abbau der EZM, so führt dies zur Inaktivierung wichtiger Rezeptoren der Zell-Zell-Interaktion, und somit zum Zerfall des Gewebes. Ein verzögerter Abbau hingegen führt zu einer Überproduktion extrazellulärer Matrix, was eine Fibrose mit Gewebeverhärtung und Zerstörung der Zell-Zell-Interaktion nach sich zieht (Grimm *et al.*, 1998).

Unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit zeigte sich ein Anstieg sämtlicher untersuchter EZM-Proteine im Langzeitversuch. Bei Osteopontin konnte im Kurzzeitversuch ein Absinken der Werte beobachtet werden, welcher sich dann jedoch über die Dauer der 10-tägigen Inkubation relativierte. Dies spricht dafür, dass die Zellen sich an ihre neue Umgebung anpassen. Interessant wäre ein länger dauernder Aufenthalt (<10d) um der Frage nachzugehen, ob die Expression von Matrixproteinen einen Höhepunkt erreicht und dann

abfällt, oder ob ein gleich hohes Niveau gehalten wird. Unter dem Einfluss von bFGF zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen an der EZM, die Werte schwankten nur leicht oder veränderten sich nicht.

Gerade am Beispiel von Osteopontin lässt sich erkennen, dass es zu einem Einfluss der Schwerelosigkeit auf die EZM kommt. Nach einer und zwei Stunden unter simulierter Schwerelosigkeit kommt es zu einem Absinken der Werte, die dann jedoch über das Ausgangsniveau hinweg ansteigen. Dies ist eine Reaktion auf die Schwerelosigkeit. Ob es nun allerdings zuerst zu einem gestörten Zell-Zell-Kontakt und darauf folgender Matrixüberproduktion kommt, oder ob die Überproduktion der EZM-Proteine als Antwort auf Schwerelosigkeit erfolgt, und es infolgedessen zu einem gestörten Zell-Zell-Kontakt kommt, muss in weiteren Studien genauer geklärt werden.

5.5 Apoptose und Schwerelosigkeit

Ein ausgewogenes Verhältnis aus Zellvermehrung, Wachstumsstillstand und Zelltod ist eine Grundvoraussetzung sowohl für die embryonale und postembryonale als auch für die Homöostase eines erwachsenen Organismus. Die Mechanismen, die diesem Gleichgewicht zugrunde liegen, wurden allerdings erst in den letzten 20 Jahren entdeckt und erforscht.

Kommt es bei Astronauten in verschiedenen Gewebearten zu einer gesteigerten Apoptose? Ist diese gesteigerte Apoptose als Ursache für Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, der Schilddrüse oder für Osteoporose anzusehen? Wie lässt sich der gesteigerte Muskelabbau unter Schwerelosigkeit erklären? Dies alles sind Fragen, auf die der programmierte Zelltod eine Antwort sein kann. Erste Untersuchungen haben sich bereits mit diesen Fragen beschäftigt und zu neuen Erkenntnissen geführt (Aoshiba *et al.*, 1997; Baldwin 1996; Boonyaratanakornkit *et al.*, 2005; Grimm *et al.*, 2002).

Betrachtet man die Kurzzeiteffekte simulierter Schwerelosigkeit im Bezug auf Bax, Bcl-2 und Fas, so wird jeweils eine Reduktion der Proteine im Vergleich zur Bodenkontrollgruppe deutlich. Dieser Effekt verschwindet allerdings im Langzeitversuch. Hier ist ein deutlicher Anstieg aller untersuchten Proteine, Bax, Bcl-2, Fas und Caspase-3 zu verzeichnen, sowie eine Stagnation von p53 auf hohem Niveau. Die Veränderung der Proteine ist auf die Veränderung der Schwerkraftverhältnisse zurückzuführen. Wie jedoch genau die verschiedenen Regelmechanismen funktionieren, die diesen Ergebnissen zugrunde liegen, ist noch nicht geklärt. Zu welchem Zeitpunkt beginnen die Veränderungen im Inneren der Zelle? Was ist der exakte Auslöser dieses Signals? Diese und weitere Fragen müssen in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

Bei Behandlung mit bFGF kommt es zu unterschiedlichem Verhalten der untersuchten Proteine. Während Bax und p53 weiter ansteigen, kommt es bei Bcl-2, Fas, Caspase-3 und NFκB zu einer Reduktion der Proteinmenge. BFGF scheint also durchaus eine gewisse

Schutzfunktion auszuüben, welche sich jedoch nicht auf alle Faktoren gleichermaßen auswirkt. Hierbei ist hinzuzufügen, dass die Untersuchungen mit Applikation von bFGF nur für 24h getätigt wurden, und eine weitere Untersuchung hinsichtlich der Langzeiteffekte daher sehr interessant ist.

5.6 Langzeiteffekte der simulierten Schwerelosigkeit auf Genexpression und Proteingehalt

In bisherigen Untersuchungen wurde dokumentiert, dass die Expression von Genen möglicherweise innerhalb von 10 min erhöht wird, nachdem eine Zelle ein adäquates stimulierendes Signal empfangen hat, welches sowohl chemischer als auch mechanischer Natur sein kann (Choi *et al.*, 2004; Ben Rejeb *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2005; Varanasi und Datta, 2005). Betrachtet man die Gene dieser Proteine, so wurde das Signal untersucht, das die Zellen erreicht, nachdem die Schwerkraft „ausgeschaltet“ wurde. Dies scheint den schnellen Anstieg der mRNA Transkription zu induzieren. Ähnlich wie bei der c-fos mRNA Expression in Mäusen nach Gabe der Substanz P (Choi *et al.*, 2004) hatten die mRNA Konzentrationen der ausgewählten Gene ihren stärksten Anstieg in der 10. Minute und fielen anschließend von der 10. zur 30. Minute wieder ab. Das Maximum, das innerhalb der ersten 10 Minuten erreicht wird, wird bis zum 10. Tag der Inkubation nicht überschritten, obwohl die Caspase-3 mRNA einen zweiten Anstieg zwischen Tag 4 und Tag 10 der Kultivierung zeigt. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass ein Haupteffekt der Mikrogravität auf einem Signal beruht, welches die Zellen in dem Moment des Übergangs von 1 g zur Mikrogravität erreicht. Wie auch immer, ein lang andauernder zusätzlicher Einfluss der Mikrogravität scheint vorhanden zu sein, wie es bereits bei der Struktur der Caspase-3 Genexpression vermutet wird. Frühe vorübergehende und Langzeiteffekte der Mikrogravität wurden ebenfalls beobachtet, als der Umbau von extrazellulären Matrixkomponenten, Apoptosefaktoren und Wachstumsfaktoren untersucht wurde. Es ist aus der Literatur bekannt, dass es eine Hochregulierung der mRNA innerhalb von 10 Minuten nach Erreichen des aktivierenden Signals möglicherweise vom Prozess des korrespondierenden Proteins nach 24 bis 72 Stunden gibt (Ortega *et al.*, 2005; Varanasi und Datta, 2005). Hierfür konnte die Anreicherung der verschiedenen Proteine innerhalb von 4, 12 oder 24 Stunden, die an Ea.hy926 Zellen in einer früheren Studie beobachtet werden konnten, zu der sehr frühen Expression der korrespondierenden mRNA (Infanger *et al.*, 2006a) in Bezug gebracht werden. Die Erkenntnisse aus dieser Untersuchung sind neu, zeigen sie erstmalig die Auswirkung eines länger dauernden Aufenthaltes unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit. Interessant wäre nun ein exakter zeitlicher Verlauf, der in regelmäßigen Abständen das Absinken bzw. Ansteigen der Werte dokumentiert. Auf diese Weise könnte

gezeigt werden, wann es zu Veränderungen kommt, und ob dies in Relation zu beispielsweise Veränderungen am Zytoskelett steht.

5.7 Vorübergehende Veränderungen und Langzeiteffekte der Mikrogravitation

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studie, so zeigt es sich, dass der dreidimensionale Klinostat ein wichtiges experimentelles System darstellt, um Endothelzellen zu kultivieren, die in dreidimensionalen Verbänden wachsen. Es war hierbei zum ersten Mal möglich zu zeigen, dass der Übergang von Schwerkraft zu verminderter Schwerkraft einen Haupteffekt auf Endothelzellen des Menschen ausübt, die unter Bedingungen der simulierten Schwerelosigkeit kultiviert wurden. Ein zweiter Langzeiteffekt ist möglicherweise in den Proteinen der extrazellulären Matrix zu finden, im zytoskelettalen Netzwerk und in den Mikrotubuli. Es ist möglicherweise auch der Grund für den anhaltenden Anstieg des Levels der apoptotischen Zellen. Von einer Vielfalt löslicher Faktoren, Zytokinen und Wachstumsfaktoren wurde beobachtet, dass sie von humanen Endothelzellen in Kultur freigesetzt wurden. Die Mehrheit dieser Zytokine wurde in konstanter Menge (Bodenkontrolle verglichen mit klinorotierten Zellen) sezerniert, wie es mittels der benannten immunologischen Methode ermittelt werden konnte, was nicht notwendig die Veränderungen der biologische Aktivität der Faktoren ausschließt (Hymer *et al.*, 1996). Die ET-1 Freisetzung wurde deutlich unter simulierter Schwerelosigkeit vermindert, was auf eine Schlüsselrolle dieser Substanz bei der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion im Weltall schließen lässt. Die RPM ist hier wieder einmal ein wichtiges ground-based System, um die Effekte der Schwerelosigkeit an einzelnen Zellen auf der Erde zu untersuchen, auch als Vorbereitung für zukünftige Weltallmissionen auf der ISS.

5.8 Der basic Fibroblast Growth Factor

BFGF ist ein Mitglied der Fibroblast Growth Factor Familie. Es wirkt chemoattraktiv für kapilläre Endothelzellen (Gospodarowicz *et al.*, 1985) und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Angiogenese. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von bFGF im 24 Stunden Versuch auf Endothelzellen der humanen Zelllinie Ea.hy926 erforscht.

Es zeigte sich, dass bFGF zu einer weiteren geringen Erhöhung von Kollagen Typ III, Fibronectin, Laminin und Osteopontin führt. Dieses Ergebnis legt den Schluss nach, dass bFGF die Endothelzellen bei ihrer Adaptation an eine neue Umgebung unterstützt. Im Hinblick auf die Apoptosefaktoren kommt es durch bFGF zu einer Senkung von Caspase-3, Bcl-2, Fas und NFκB. Möglicherweise übt bFGF somit eine Schutzfunktion für die Zellen aus. In dieser Arbeit wurde nur der Zeitraum bis 24 h untersucht. Zu klären wäre, ob der bFGF erst bei länger dauernder Anwendung oder sogar zu Beginn der Gravitationsänderung wirkt, sodass es zu unterschiedlichen Effekten bei verschiedenen Zeitpunkten kommt. Es empfiehlt

sich somit, eine erneute Applikation von bFGF in einer Langzeitstudie, sowie in einer Ultrakurzzeitstudie zu testen.

5.9 Der Klinostat als Research-Tool

Die Vorteile des Klinostaten liegen in der Simulation von Schwerelosigkeit, ohne die bereits erwähnten Schwierigkeiten, wie sie bei Liquid-overlay Methode oder den Spinner flask Techniken auftreten. Allerdings ist auch der Klinostat nicht in der Lage, die im Weltraum angetroffenen Veränderungen in allen Aspekten zu simulieren. Weder kosmische Strahlung noch die veränderten Diffusionsverhältnisse können vom Klinostaten nachempfunden werden. Im Bezug auf die Fragestellung, ob es unter den gegebenen Umständen vertretbar ist, Experimente auf dem Klinostaten durchzuführen, lässt sich sagen, dass Strahlung selbst Apoptose auslösen kann, wie dies tagtäglich in der Strahlentherapie angewandt wird. Effekte der kosmischen Strahlung sind unter anderem DNS-Brüche, Mutationen, Veränderungen in der Zelldifferenzierung und die vermehrte Expression von p53 (Ohnishi et al., 2001). Auch sind Ergebnisse bekannt, die den Schluss nahe legen, dass Zellen, die der Schwerelosigkeit ausgesetzt sind, strahlungsempfindlicher sind, bzw. dass beide Einflüsse einen synergistischen Effekt haben könnten (Morrison, 1994).

Wie beeinflusst Diffusion die Zelle? Unter Schwerelosigkeit kommt es zu einem verlangsamten Austausch von Nährstoffen und Metaboliten. Dies bedeutet für die Zelle eine Beeinflussung hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Differenzierung. Ist nun das Fehlen dieses Faktors beim Einsatz des Klinostaten ein Nachteil, der die gewonnenen Ergebnisse unbrauchbar werden lässt? Es handelt sich bei der RPM um ein Simulationsgerät, mit dem die Schwerelosigkeit besser dargestellt werden kann, als dies mit herkömmlichen Methoden der Fall war. Eine 100%ige Übereinstimmung mit realer Schwerelosigkeit ist mit einer „ground based facility“ derzeit nicht zu erreichen. Das Fehlen von veränderten Diffusionsverhältnisse ist eher als Vorteil denn als Nachteil zu betrachten.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen somit den direkten Einfluss der Schwerelosigkeit auf die untersuchten Zellen. Durch die Eliminierung der anderen Faktoren ist es möglich, Schlüsse zu ziehen, welcher Faktor nun die Veränderungen in den Zellen hervorruft. Der Klinostat verändert nur einen der Faktoren, die im Orbit gegeben sind, nämlich die Schwerelosigkeit.

Des Weiteren ist zu betonen, dass die auf dem Klinostat gefundenen Veränderungen mit den Ergebnissen aus Untersuchungen im Weltraum ohne weiteres vergleichbar sind (Schwarzenberg et al., 1999; Ayed et al., 1992; Hoson et al., 1997). Der Klinostat ist somit ein geeignetes Werkzeug, um eine Vorauswahl geplanter Weltraumuntersuchungen zu treffen. Untersuchungen auf dem Klinostaten sind billiger als reale Flüge und vor allem beliebig oft reproduzierbar, was ihn unter anderem zu einem wichtigen Instrument der Grundlagenforschung macht.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Endothelzellen in der Schwerelosigkeit

Viele Weltraummissionen haben gezeigt, dass länger dauernde Weltraumflüge das Risiko kardiovaskulärer Probleme erhöhen. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal humane Endothelzellen der Zelllinie EA.hy926 über einen Zeitraum von 10 Tagen unter den Bedingungen der Mikrogravitation mithilfe eines dreidimensionalen Klinostaten untersucht, um vorübergehende von länger andauernden Effekten der Schwerelosigkeit zu unterscheiden. Die maximale Expression aller untersuchten Gene war 10 min nach Beginn der Klinorotation erreicht. Die Genexpression (Osteopontin, Fas, TGF- β_1) sank auf niedrigere aber hochregulierte Level oder stieg erneut (Caspase-3) nach dem vierten Tag der Klinorotation an. Der Caspase-3-, Bax- und Bcl-2-Proteingehalt erhöhte sich nach 10 Tagen Mikrogravitation. Darüber hinaus fanden sich im Langzeitversuch ein vermehrter Gehalt an Kollagen Typ I und III, sowie Veränderungen des Zytoskeletts im Bezug auf alpha- und beta-Tubulin sowie F-Aktin.

Darüber hinaus untersucht diese Arbeit die Wirkung von bFGF im Hinblick auf Kurzzeiteffekte. Die Fibroblast Growth Factor-Familie besteht aus Wachstumsfaktoren, die in Wundheilung und Embryonalentwicklung involviert sind. Die Interaktion mit an Zelloberflächen-gebundene Heparansulfat-Proteoglykane ist für die FGF Signaltransduktion essenziell. In normalem Gewebe kommt bFGF in Basalmembranen und in der subendothelialen extrazellulären Matrix von Blutgefäßen vor. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die möglichen Effekte von bFGF auf den programmierten Zelltod und die extrazellulären Matrixproteine, den Proteingehalt von Induktoren und Inhibitoren der Apoptose und der Genexpression von Endothelin-1 und eNOS zu untersuchen. Diese Arbeit hat erstmalig gezeigt, dass bFGF unter Bedingungen von 0 g den Gehalt an Kollagen Typ I, Bcl-2, Caspase-3, Fas und NF κ B reduziert und den Gehalt an Kollagen Typ III, Fibronectin, Laminin, Bax, p53, Endothelin-1, eNOS und TGF β_1 steigert.

In folgenden Studien muss nun geklärt werden, wie sich Endothelzellen über einen Zeitraum von > 10 d unter den Bedingungen simulierter Schwerelosigkeit verhalten, zu welchen exakten Zeitpunkten signifikante Veränderungen eintreten, welche Rolle bFGF bei diesen Vorgängen spielt und ob es möglich ist, die Methode der Kultivierung von Endothelzellen mithilfe einer RPM im Bereich des Tissue Engineering einzusetzen.

7. SUMMARY

Endothelial cells under microgravity

Many space missions have shown that prolonged space flights may increase the risk of cardiovascular problems. Using a three-dimensional clinostat, this work investigated for the first time human endothelial EA.hy926 cells up to 10 days under conditions of microgravity to distinguish transient from long-term effects of weightlessness. Maximum expression of all selected genes occurred after 10 minutes of clinorotation. Gene expression (osteopontin, Fas, TGF- β), declined to slightly upregulated levels or rose again (caspase-3) after the fourth day of clinorotation. Caspase-3, Bax and Bcl-2 protein content was enhanced for 10 days of microgravity. In addition, long-term accumulation of collagen type I and III and alterations of the cytoskeletal alpha- and beta-tubulins and F-actin were detectable.

Besides that, this work investigates the effects of bFGF on short-term investigations. Fibroblast growth factors are a family of growth factors involved in wound healing and embryonic development. The interaction with cell-surface associated heparin sulfate proteoglycans has been shown to be essential for FGF signal transduction.

In normal tissue, bFGF is present in basement membranes and in the subendothelial extracellular matrix of blood vessels. The specific goal of this work was to examine possible effects of bFGF on programmed cell death and extracellular matrix proteins, protein contents of inducers and inhibitors of apoptosis and the gene expression of endothelin-1 and eNOS.

This work clearly demonstrates for the first time that bFGF reduces collagen type I, bcl-2, caspase-3, fas and NF κ B and increases collagen type III, fibronectin, laminin, bax, p53, endothelin-1, eNOS and TGF β ₁.

New experiments should show how endothelial cells react to conditions of simulated microgravity for a time period > 10d, at which defined time points significant changes occur, if bFGF plays a key role in this changes and if it is possible to use this method of cultivation of endothelial cells with the help of a RPM for tissue engineering in future.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Mol. Biol. Cell*. Garland Publishing, New York and London: 831-907
- Albrecht-Buehler G (1992) The simulation of microgravity conditions on the ground. *ASGSB. Bull.* **5**: 3-10
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* **345**: 271-278
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 11615-11623
- Aoshiba K, Rennard SI, Spurzem JR (1997) Cell-matrix and cell-cell interactions modulate apoptosis of bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **272**: 28-37
- Ayed M, Pironneau O, Planel H, Gasset G, Ricoilley G (1992) Theoretical and experimental investigations on the fast rotating clinostat. *Microgravity. Sci. Technol.* **5**: 98-102
- Backer SJ, Reddy EP (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene.* **12**: 1-9
- Baldwin KM (1996) Effect of spaceflight on the functional, biochemical, and metabolic properties of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* **28**: 983-987
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature.* **377**: 630-632
- Ben Rejeb I, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Ammar S, Bouzid S, Ayadi A (2004) Iron-superoxide dismutase and monodehydroascorbate reductase transcripts accumulate in response to internode rubbing in tomato. *C. R. Biol.* **327**: 679-686
- Blobel CP (2000) Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**: 606-612
- Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A, Li CF, Schopper T, Pippia P, Galleri G, Meloni MA, Hughes-Fulford M (2005) Key gravity-sensitive signaling pathways drive T-cell activation. *FASEB. J.* **19**: 2020-2022
- Borges E, Jan Y, Ruoslahti E (2000) Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* **275**: 39867-39873
- Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* **39**: 615-647

- Bouis D, Hospers G, Meijer C, Molema G, Mulder N (2001) Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*. **4**: 91-102
- Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*. **12**: 729-739
- Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmatic pathways. *Oncogene*. **22**: 8608-8618
- Buckey JC, Lane LD, Levine BD, Watenpaugh DE, Wright SJ, Moore WE, Gaffney FA, Blomqvist CG (1996) Orthostatic intolerance following spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **81**: 7–18
- Buravkova L, Romanov Y, Rykova M, Grigorieva O, Merzlikina N (2005) Cell-to-cell interactions in changed gravity: Ground-based and flight experiments. *Acta Astronautica*. **57**: 67–74
- Burlacu A (2003) Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell. Mol. Med.* **7**: 249-257
- Calderwood DA, Ginsberg MH (2003) Talin forges the links between integrins and actin. *Nat. Cell. Biol.* **5**: 694-697
- Carlsson SI, Bertilaccio MT, Ballabio E, Maier JA (2003) Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. *Biochem. Biophys. Acta*. **1642**: 173-179
- Carraway KL, Carraway CAC (1989) Membrane-cytoskeleton interaction in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* **988**: 147–171
- Chinje EC and Stratford IJ (1997) Role of nitric oxide in growth of solid tumors: a balancing act. *Essays. Biochem.* **32**: 61-72
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. **81**: 505-512
- Choi SS, Lee HK, Shim EJ, Kwon MS, Seo YJ, Lee JY, Suh HW (2004) Alterations of c-fos mRNA expression in hypothalamic-pituitary-adrenal axis and various brain regions induced by intrathecal single and repeated substance P administrations in mice. *Archiv. Pharmacol. Res.* **27**: 863-866
- Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV (1997) Three-dimensional endothelial-tumor epithelial cell interactions in human cervical cancers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*. **33**: 432–442
- Chu PG, Weiss LM (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms.

Histopathology. **41**: 365-366

- Clejan S, O'Connor K, Rosensweig N (2001) Tri-dimensional prostate cell cultures in simulated microgravity and induced changes in lipid second messengers and signal transduction. *J. Cell. Mol. Med.* **5**: 60–73
- Cogoli M (1992) The fast rotating clinostat: a history of its use in gravitational biology and a comparison of ground-based and flight experiment results. *ASGSB. Bull.* **5**: 59-67
- Cogoli-Greuter M, Meloni MA, Sciola L, Spano A, Pippia P, Monaco G, Cogoli A (1996) Movements and interactions of leukocytes in microgravità. *J. Biotechnol.* **47**: 279-287
- Cubano LA, Lewis ML (2000) Fas/APO-1 protein is increased in spaceflown lymphocytes (Jurkat). *Exp. Gerontol.* **35**: 389-400
- Downing KH, Nogales E (1999) Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug bindings. *Cell. Struct. Funct.* **24**: 269-275
- Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvee A, Koteliensky V, Babinet C, Krieg T (1998) Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J. Cell. Sci.* **111**:1897-907
- Edgell C, McDonald C, Graham J (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Cell. Biol.* **80**: 3734-3737
- Eriksson AE, Cousens LS, Weaver LH, Matthews BW (1991) Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 3441-3445
- Faham S, Linhardt RJ, Rees DC (1998) Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 578-586
- Flaumenhafr R, Moscatelli D, Rifkin DB (1990) Heparin and heparin sulphate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Biol.* **111**: 1651-1659
- Franzoso G, Bours V, Park S, Tomita-Yamaguchi M, Kelly K, Siebenlist U (1992) The candidate protooncogene bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition.
- Frisch SM, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* **124**: 619-626
- Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D (1993) The candidate protooncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates trough NF-kappa B p50 homodimers. *Genes. Dev.* **7**: 1354-1363
- Fukai F, Mashimo M, Akiyama K, Goto T, Tanuma S, Katayama T (1998) Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide. *Exp. Cell. Res.* **242**: 92-99

- Germain M, Shore GC (2003) Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Sci. STKE*. **2003**:10
- Gilmore TD (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. **25**: 6680-6684
- Gmunder FK, Nordau CG, Tschopp A, Huber B, Cogoli A (1988) Dynamic cell culture system: a new cell cultivation instrument for biological experiments in space. *J. Biotechnol.* **7**: 217-228
- Gmunder FK, Suter RN, Kiess M, Urfer R, Nordan CG, Cogoli A (1989) Mammalian cell cultivation in space. *Adv. Space. Res.* **9**: 119-127
- Grolach A, Acker H (1994) pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1227**:105-112
- Gospodarowicz D, In Ford RJ, Maizel AL (1985) Mediators in cell growth and Differentiation. Raven pres. New York. 109-134
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. **270**: 1189-1192
- Grimm D, Bauer J, Kossmehl P, Shakibaei M, Schonberger J, Pickenhahn H, Schulze-Tanzil G, Vetter R, Eilles C, Paul M, Cogoli A (2002) Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *FASEB. J.* **16**: U55–U81
- Grimm D, Kromer EP, Bocker W, Bruckschlegel G, Holmer SR, Riegger GA, Schunkert H (1998) Regulation of extracellular matrix proteins in pressure-overload cardiac hypertrophy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *J. Hypertens.* **16**: 1345-1355
- Grimm D, Bauer J, Infanger M, Cogoli A (2006) The use of the random positioning machine for the study of gravitational effects on signal transduction in mammalian cells. *Signal Transduction*. Review
- Gruener R, Roberts R, Reitstetter R (1993) Exposure to microgravity alters properties of cultured muscle cells. *ASBSB. Bull.* **7**: 65
- Gualberto A, Marquez G, Carballo M, Youngblood GL, Hunt SW 3rd, Baldwin AS, Sobrino F (1998) p53 transactivation of the HIV-1 long terminal repeat is blocked by PD 144795, a calcineurin-inhibitor with anti-HIV properties. *J. Biol. Chem.* **273**:7088-93
- Guignandon A, Lafage-Proust MH, Usson Y, Laroche N, Caillot-Augusseau A, Alexandre C, Vico L (2001) Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2.8 cells exposed to space-related conditions. *FASEB. J.* **15**: 2036-2038

- Hammond TG, Benes E, O'Reilly KC, Wolf DA, Linnehan RM, Taher A, Kaysen JH, Allen PL, Goodwin TJ (2000) Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity induced changes on the space shuttle. *Physiol. Genomics*. **3**: 163-173
- Hay E (Hrsg.). Cell biology of Extracellular Matrix. New York and London 1951. Plenum Press: 223
- Hedlund TE, Duke RC, Miller GJ (1999) Three-dimensional spheroid cultures of human prostate cancer cell lines. *Prostate*. **41**: 154-165
- Helmke BP, Thakker DB, Goldman RD, Davies PF (2001) Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelial cells. *Biophys. J*. **80**: 184-194
- Herr AB, Ornitz DM, Sasisekharan R, Venkataraman G, Waksman G (1997) Heparin-induced self-association of fibroblast growth factor 2. Evidence for two oligomerization processes. *J. Biol. Chem*. **272**: 16382-16389
- Hoeger G, Gruener R (1990) Cytoskeletal properties are sensitive to vector-free gravity. *ASGSB. Bull*. **4**: 42
- Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M, Buchen M (1997) Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta*. **203**: 187-198
- Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G (1999) Role of cytochrom c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO. J*. **18**: 3586-3595
- Huang DC, Adams JM, Cory S (1998) The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO. J*. **17**: 1029-1039
- Hughes-Fulford M (2003) Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv. Space. Res*. **32**: 1585–1593
- Hymer WC, Salada T, Grindeland RE (1996) Experimental modification of rat pituitary prolactin cell function during and after spaceflight. *J. Appl. Physiol*. **80**: 971-980
- Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Cogoli A, Witzing A, Faramarzi S, Wittfoht W, Paul M, Grimm D (2004) Vascular endothelial growth factor inhibits programmed cell death of endothelial cells induced by clinorotation. *J. Gravit. Physiol*. **11**: P199-200
- Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Baatout S, Witzing A, Grosse J, Bauer J, Cogoli A, Faramarzi S, Derradji H, Neefs M, Paul M, Grimm D (2006 a) Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: Impact of vascular endothelial growth factor. *Apoptosis*. **11**: 749-64

- 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 (2006 b) Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell. Tissue. Res.* **324**: 267-277
- Infanger M, Ulbrich C, Baatout S, Wehland M, Kreutz R, Bauer J, Grosse J, Vadrucci S, Cogoli A, Derradji H, Neefs M, Küsters S, Spain M, Paul M, Grimm D (2007) Modeled Gravitational Unloading Induced Downregulation of Endothelin-1 in Human Endothelial Cells. *J. Cell. Biochem.* **101**:1439-1455
- Ingber D (1999) How cells (might) sense microgravity. *FASEB. J.* **13**: 3-15
- Ingram M, Techy GB, Saroufeem R, Yazan O, Narayan KS, Goodwin TJ, Spaulding GF (1997) Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**: 459-466
- Islam MN, Iskander MN (2004) Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents. *Mini. Rev. Med. Chem.* **4**:1077-1104
- Jianmin Z, Hongfang W, Meifu F (2002) Resistance of multicellular aggregates to pharmorubicin observed in human hepatocarcinoma cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**:255-260
- Johnson DE, Lee PL, Lu J, Williams LT (1990) Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4728-4736
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 621-663
- Khaoustov VI, Darlington GJ, Soriano HE, Krishnan B, Risin D, Pellis NR, Yoffe B (1999) Induction of three-dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **35**: 501-509
- Kiss JZ, Edelmann RE, Wood PC (1999) Gravitropism of hypocotyls of wild-type and starch-deficient Arabidopsis seedlings in spaceflight studies. *Planta.* **209**:96-103
- Klaus DM (2001) Clinostats and bioreactors. *Gravit. Space Biol. Bull.* **14**: 55-64
- Kossmehl P, Shakibaei M, Cogoli A, Infanger M, Curcio F, Schonberger J, Eilles C, Bauer J, Pickenhahn H, Schulze-Tanzil G, Paul M, Grimm D (2003) Weight-lessness induced apoptosis in normal thyroid cells and papillary thyroid carcinoma cells via extrinsic and intrinsic pathways. *Endocrinology* **144**: 4172–4179
- Kunz-Schughart LA (1999) Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell. Biol. Int.* **23**:157-61
- Kunz-Schughart LA, Doetsch J, Mueller-Klieser W, Groebe K (2000) Proliferative activity and tumorigenic conversion: impact on cellular metabolism in 3-D culture. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **278**:765-80

- Lee PL, Johnson DE, Cousoens LS, Fried VA, Williams LT (1989) Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*. **245**: 57-60
- Lewis ML, Reynolds JL, Cubano LA, Hatton JP, Lawless BD, Piepmeier EH (1998) Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB. J.* **12**: 1007–1018
- Lewis ML, Cubano LA, Zhao B, Dinh HK, Pabalan JG, Piepmeier EH, Bowman PD (2001) cDNA microarray reveals altered cytoskeletal gene expression in space-flown leukemic T lymphocytes (Jurkat). *FASEB. J.* **15**: 1783–1785
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. **94**: 491-501
- Li K, Sirois P, Rouleau JL (1994) Role of endothelial-cells in cardiovascular function. *Life. Sci.* **54**: 579–592
- Li Q, Verma IM (2002) NF-kappB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 725-734
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation. *PCR. Methods. Appl.* **4**: 357-362
- Lombard C, McCallip RJ, Hylemon PB, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2003) Fas Ligand-dependent and -independent mechanisms of toxicity induced by T cell lymphomas in lymphoid organs and in the liver. *Clin. Immunol.* **109**:144-53
- Maccarrone M, Battista N, Meloni M, Bari M, Galleri G, Pippia P, Cogoli A, Finazzi-Agro A (2003) Creating conditions similar to those that occur during exposure of cells to microgravity induces apoptosis in human lymphocytes by 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. *J. Leukoc. Biol.* **73**: 472–481
- Mach H, Volkin DB, Burke CJ, Middaugh CR, Linhardt RJ, Fromm JR, Loganathan D, Mattsson L (1993) Nature of the interaction of heparin with acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry*. **32**: 5480-5489
- Martin A, Zhou A, Gordon RE, Henderson SC, Schwartz AE, Friedman EW, Davies TF (2000) Thyroid organoid formation in simulated microgravity: Influence of keratinocyte growth factor. *Thyroid*. **10**: 481–487
- Martin DA, Zheng L, Siegel RM, Huang B, Fisher GH, Wang J, Jackson CE, Puck JM, Dale J, Straus SE, Peter ME, Krammer PH, Fesik S, Lenardo MJ (1999) Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:4552-4557
- McKeehan WL, Wang F, Kan M (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor

- family: diversity of structure and function. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **59**: 135-176
- Meli A, Perrella G, Curcio F, Ambesi-Impiombato FS (1999) In vitro cultured cells as probes for space radiation effects on biological systems. *Mutat. Res.* **430**: 229-234
 - Meloni MA, Galleri G, Camboni MG, Pippia P, Cogoli A, Cogoli-Greuter M (2004) Modeled microgravity affects motility and cytoskeletal structures. *J. Gravit. Physiol.* **11**: 197-198
 - Meyers VE, Zayzafoon M, Douglas JT, McDonald JM (2005) RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. *J. Bone. Miner. Res.* **20**: 1858-1866
 - Michiels C (2003) Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* **196**: 430-443
 - Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequences, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmatic reticulum-Golgi complex. *J. Cell. Physiol.* **151**: 81-93
 - Morrison DR (1994) Cellular changes in microgravity and the design of space radiation experiments. *Adv. Space. Res.* **14**: 1005-1019
 - Moscatelli D (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production for bovine capillary endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **131**: 123-130
 - Moy FJ, Safran M, Seddon AP, Kitchen D, Bohlen P, Aviezer D, Yayon A, Powers R (1997) Property oriented heparin-decasaccharide-induced dimmers are the biologically active form of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry.* **36**: 4782-4791
 - Mueller-Klieser W (1984) Microelectrode measurement of oxygen tension distributions in multicellular spheroids cultured in spinner flasks. *Recent Results. Cancer. Res.* **95**: 134-149
 - Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell.* **88**: 355-365
 - Nagata S (1996) Fas-mediated apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **406**: 119-124
 - Ohnishi T, Takahashi A, Ohnishi K (2001) Biological effects of space radiation. *Biol. Sci. Space.* **15**: 203-210
 - Ohnishi T, Wang X, Fukuda S, Takahashi A, Ohnishi K, Nagaoka S (2000) Accumulation of tumor suppressor p53 in rat muscle after a space flight. *Adv. Space. Res.* **25**: 2119-2122
 - Oldberg A, Franzen A, Heinegard D (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 8819-8823

- Orlinick JR, Elkon KB, Chao MV (1997) Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. *J. Biol. Chem.* **27**: 32221-32229
- Orlinick JR, Vaishnav A, Elkon KB, Chao MV (1997) Requirement of cystein-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J. Biol. Chem.* **272**: 28889-28894
- Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P (1992) Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 240-247
- Ornitz DM (2000) FGFs, heparin sulphate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays.* **22**: 108-112
- Ornitz DM and Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biology.* **2**: 3005.1-3005.12
- Ortega A, Ramila D, Izquierdo A, Gonzalez L, Barat A, Gazapo R, Bosch RJ, Esbrit, P (2005) Role of the renin-angiotensin system on the parathyroid hormone-related protein overexpression induced by nephrotoxic acute renal failure in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**: 939-949
- Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S (1996) Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J. Immunol.* **157**: 2909-2915
- Pan G, O'Rourke K, Dixit VM (1998) Caspase-9, Bcl-XL and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 5841-5845
- Pardo SJ, Patel MJ, Sykes MC, Platt MO, Boyd NL, Sorescu GP, Xu M, van Loon JJWA, Wang MD, Jo H (2005) Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts. *Am. J. Cell. Physiol.* **288**: C1211–C1221
- Paulus W, Huettner C, Tonn JC (1994) Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. *Int. J. Cancer.* **58**: 841-846
- Pickenhahn, Holger Jan (2005) Untersuchung der Auswirkungen simulierter Schwerelosigkeit auf Schilddrüsenzellen. Dissertation, Journal-Nr. 2983, Mensch Buch Verlag
- Pippia P, Sciola L, Cogoli-Greuter M, Meloni MA, Spano A, Cogoli A (1996) Activation signals of T lymphocytes in microgravity. *J. Biotechnol.* **47**: 215-222
- Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB (1991) Requirement of heparan sul fate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science.* **252**: 1705-1708
- Risin D, Pellis NR (2001) Modeled microgravity inhibits apoptosis in peripheral blood

- lymphocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **37**: 66-72
- Rozzo C, Chiesa V, Caridi G, Pagnan G, Ponzoni M (1997) Induction of apoptosis in human neuroblastoma cells by abrogation of integrin-mediated cell adhesion. *Int. J. Cancer.* **70**:688-698
 - Sakar D, Nagaya T, Koga K, Nomura Y, Gruener R, Seo H (2000) Culture in vector-averaged gravity under clinostat rotation results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *J. Bone. Miner. Res.* **15**: 489–498
 - Sangha DS, Han S, Purdy RE (2001) Simulated microgravity upregulates an endothelial vasoconstrictor prostaglandin. *J. Applied Physiol.* **91**: 789–796
 - Schatten H, Lewis ML, Chakrabarti A (2001) Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells. *Acta. Astronaut.* **49**: 399-418
 - Schnee JM, Hsueh WA (2000) Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc. Res.* **46**:264-268
 - Schwartz MA, Assoian RK (2001) Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J. Cell. Sci.* **114**: 2553-2560
 - Schwarzenberg M, Pippia P, Meloni MA, Cossu G, Cogoli-Greuter M, Cogoli A (1999) Signal transduction in T lymphocytes, a comparison of the data from space, the free fall machine and the random positioning machine. *Adv. Space Res.* **24**: 793-800
 - Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 7834-7838
 - Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M (2001) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signalling pathway. *Science.* **293**: 1495-1499
 - Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW, Shi YF (2000) Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligands. *Pharmacol. Ther.* **88**: 333-347
 - Sievers A (1991) Gravity sensing mechanisms in plant cells. *ASGSB. Bull.* **4**: 43-50
 - Singer GG, Carrera AC, Marshak-Rothstein A, Martinez C, Abbas AK (1994) Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 913-920
 - Soria G, Podhajcer O, Prives C, Gottifredi V (2006) P21Cip1/WAF1 downregulation is required for efficient PCNA ubiquitination after UV irradiation. *Oncogene.* **25**:2829-38
 - Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Pockwinse SH, McNeil S (1999) Implications for interrelationships between nuclear architecture and control of gene

- expression under microgravity conditions. *FASEB. J.* **13**: 157-166
- Stein TP, Schluter MD, Moldawer LL (1999) Endocrine relationships during human spaceflight. *Am. J. Physiol.* **276**: 155-162
 - Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W (1999) An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann. Intern. Med.* **130**:591-601
 - Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA (1996) Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **98**: 426-433
 - Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR (1971) Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl. Cancer. Inst.* **46**:113-120
 - Tabony J, Pochon N, Papaseit C (2001) Microtubule self-organisation depends upon gravity. *Adv. Space Res.* **28**: 529-535
 - Tang DG, Conti CJ (2004) Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: An update. *Semin. Thromb. Hemost.* **30**: 109–117
 - Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science.* **281**: 1312-1316
 - Todd P (1989) Gravity-dependent phenomena at the scale of the single cell. *ASGSB. Bull.* **2**: 95-113
 - Trampisch HJ, Windeler J, Ehle B, Lange S (2000) Medizinische Statistik. 2. Auflage. Springer Verlag: 165
 - Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* **228**:1440-3
 - Tylor BS, Kion YM, Wang QI, Sharpio RA, Billiar TR, Geller DA (1997) Nitric oxide downregulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch. Surg.* **1**: 1177-1182
 - Ulbrich C, Westphal K, Baatout S, Wehland M, Bauer J, Kreutz R, Infanger M, Vadrucci S, Egli M, Cogoli A, Deradji H, Grimm D (2008) Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity. *J. Cell. Biochem.* [Epub ahead of print]
 - Unsworth BR, Leikes PI (1998) Growing tissues in microgravity. *Nat. Med.* **4**: 901-907
 - Uva BM, Masini MA, Sturla M, Prato P, Passalacqua M, Giuliani M, Tagliaferro G, Strollo F (2002) Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain. Res.* **934**: 132–139
 - Varanasi SS, Datta HK (2005) Characterisation of cytosolic FK506 binding protein 12 and its role in modulating expression of Cbfa1 and osterix in ROS 17/2.8 cells. *Bone.*

36: 243-253

- Vassy J, Portet S, Beil M, Millet G, Fauvel-Lafeve F, Gasset G, Schoevaert D (2001) The effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7. *FASEB. J.* **15:** 1104–1106
- Vaux DL, Strasser A (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93:** 2239-2244
- Verrills NM, Kavallaris M (2005) Improving the targeting of tubulin-binding agents: lessons from drug resistance studies. *Curr. Pharm. Des.* **11:**1719-1733
- Walther I, van der Schoot B, Boillat M, Muller O, Cogoli A (1999) Microtechnology in space bioreactors. *Chimia.* **53:** 75-80
- Walther I, van der Schoot B, Jeanneret S, Arquint P, de Rooij NF, Gass V, Bechler B, Lorenzi G, Cogoli A (1994) Development of a miniature bioreactor for continuous culture in a space laboratory. *J. Biotechnol.* **38:** 21-32
- White RJ, Averner M (2001) Humans in space. *Nature.* **409:** 1115–1118
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J.Cell.Biol.* **139:** 1281-1292
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* **64:** 841-848
- Yoffe B, Darlington GJ, Soriano HE, Krishnan B, Risin D, Pellis NR, Khaoustov VI (1999) Cultures of human liver cells in simulated microgravity environment. *Adv. Space. Res.* **24:** 829-836
- Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ (1977) A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer. Res.* **37:** 3639-3643
- Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* **272:** 24101-24104
- Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science.* **251:** 90-93
- Zuzarte-Luis V, Hurlle JM (2002) Programmed cell death in the developing limb. *Int. J. Dev. Biol.* **46:** 871-876

9. WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

Vorträge

1. **Ulbrich C**, Infanger M, Cogoli A, Grosse J, Bauer J, Witzing A, Grimm D
"Human endothelial cells and simulated weightlessness"
8. Kongress Medizin und Mobilität; 44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Luft- und Raumfahrtmedizin (14.-16. September 2006) in Berlin

2. S. Baatout, H. Derradji, M. Infanger, **C. Ulbrich**, M. Wehland, R. Kreutz, J. Bauer, S. Bekaert, A. Chouker, J. Grosse, S. Vadrucci, A. Cogoli, M. Neefs, S. Küsters, M. Spain, D. Grimm
"Multiplex array assay for space and radiation biology"
Annual Planet xMAP Europe Scientific and Technology Symposium,
Amsterdam, Netherlands, 3-4/10/ 2006.

3. S. Baatout, M. Infanger, **C. Ulbrich**, M. Wehland, R. Kreutz, J. Bauer, J. Grosse, S. Vadrucci, A. Cogoli, H. Derradji, M. Neefs, S. Küsters, M. Spain, D. Grimm
"Chemokine changes induced by space-related microgravity in human endothelial cells"
11th joint annual conference of the Belgian and French societies
for cytometry, Bruges, Belgium, 18-20/10/2006.

4. S. Baatout, H. Derradji, M. Infanger, **C. Ulbrich**, J. Bauer, M. Neefs, S. Bekaert, D. Grimm
"Measurements of chemokines in cell cultures and in amniotic fluid"
Workshop on multiplex assay (20/10/2006),
11th joint annual conference of the Belgian and French societies for cytometry,
Bruges, Belgium, 18-20/10/2006.

5. **Ulbrich C**, Infanger M, Cogoli A, Grosse J, Bauer J, Witzing A, Grimm D
„Humane Endothelzellen und Schwerelosigkeit“
Erlanger Gravimeeting, 7.-9.12.2006, Erlangen

6. **Ulbrich C**, Infanger M, Baatout S, Bauer J, Grosse J, Vadrucci S, Cogoli A, Grimm D
„Simulated microgravity induces downregulation of Endothelin-1: a study on the human endothelial cell line Eahy 926“
28th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 8.-13. April 2007, San Antonio, Texas, USA

7. Grimm D, **Ulbrich C**, Bauer J, Cogoli A, Infanger M

„Influence of the basic fibroblast growth factor (bfgf) on endothelial cells under simulated microgravity“

28th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 8.-13. April 2007, San Antonio, Texas, USA

8. Schönberger J, **Ulbrich C**, Westphal K, Pohl F, Kölbl O, Grimm D, Eilles C

„Einfluß von Apoptose und strahlungsinduzierte Veränderung der p53 und bcl-2 Expression bei niedrig differenziertem Schilddrüsenkarzinom“

45. Jahrestagung der DNG in Hannover, 26.04.2007

9. **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

10. **Ulbrich C**, Faramarzi S, Westphal K, Wehland M, Kreutz R, Paul M, Grimm D

„Ein neues Ischämie-Reperfusion-Modell: Untersuchung von VEGF und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen“

Kongress der Deutschen Hochdruckliga, 22.-24.11.2007 Bochum

11. Grimm D, **Ulbrich C**, Bauer J, Egli M, Cogoli A, Curcio F, Baatout S

„Neueste Ergebnisse des Spheroids-Projekts: Endothelzellen unter Schwerelosigkeit“

Erlanger Gravimeeting, 6.-8.12.2007, Erlangen

12. **Ulbrich C**, Grimm D

„Kurzzeiteffekte der Schwerelosigkeit auf das Transkriptionsverhalten und das Zytoskelett von gesunden und malignen Zellen“

Erlanger Gravimeeting, 6.-8.12.2007, Erlangen

13. **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 Norwijk, NL

14. Grimm D, **Ulbrich C**, Bauer J, Infanger M, Egli M, Cogoli A, Baatout S
"Results of the spheroids proposal – Part I Ground based experiments"
ESA Symposium – Technology for artificial gravity and microgravity simulation,
10.-12.12.2007 Norwijk, NL

15. **Ulbrich C**, Pietsch J, Winkler HDF, Leder A, Westphal K, Baatout S, Bauer J, Grimm D
"Behaviour of endothelial cells in simulated microgravity and their role in tissue engineering"
29th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Angers, 22.-27.06.2008, Angers,
France

16. Grimm D, **Ulbrich C**, Pietsch J, Winkler HDF, Westphal K, Egli M, Cogoli A, Paul M,
Baatout S, Bauer J
"Results of the spheroids proposal – Part I Ground based experiments"
2nd Sino-German Meeting, 13.-17.10.2008, Peking, China

17. **Ulbrich C**, Grimm D, Bauer J, Westphal K, Winkler HDF, Pietsch J
„Kurzezeiteffekte der Schwerelosigkeit auf das Transkriptionsverhalten und das Zytoskelett
von humanen Zellen: Erste Ergebnisse der 12. DLR PFC“
Erlanger Gravimeeting, 27.-28.11.2008, Erlangen

Poster

1. S. Baatout, M. Infanger, **C. Ulbrich**, M. Wehland, R. Kreutz, J. Bauer, J. Grosse, S.
Vadrucci, A. Cogoli, H. Derradji, M. Neefs, S. Küsters, M. Spain, D. Grimm
"Space-related microgravity in human endothelial cells: chemokine changes"
Annual Planet xMAP Europe Scientific and Technology Symposium, Amsterdam,
Netherlands, 3-4/10/ 2006.

2. Schönberger J, Westphal K, Ulbrich C, Pohl F, Kölbl O, Grimm D, Eilles C
„Radioaktiv markiertes Annexin V als *in vivo* Apoptosemarker“
45. Jahrestagung der DNG in Hannover, 28.04.2007

3. Faramarzi S, **Ulbrich C**, Westphal K, Wehland M, Kreutz R, Paul M, Grimm D
„Vascular endothelial growth factor and receptor tyrosine kinases in cardiac ischemia-
reperfusion injury“
Annual meeting – Pharmacology of membrane receptors: from molecule to clinic; 21.-
22.06.2007, Kopenhagen, Dänemark

4. **Ulbrich C**, Faramarzi S, Westphal K, Infanger M, Paul M, Grimm D
„Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on endothelial cells under simulated microgravity
Annual meeting – Pharmacology of membrane receptors: from molecule to clinic; 21.-22.06.2007, Kopenhagen, Dänemark

5. 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 Norwijk, NL

6. Pietsch J, **Ulbrich C**, Westphal K, Winkler HDF, Leder A, Bauer J, Grimm D
„Simulated microgravity and human chondrocytes“
29th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Angers, 22.-27.06.2008, Angers, France

7. **Ulbrich C**, Pietsch J, Leder A, westphal K, Bauer J, Grimm D
„Tissue engineering and simulated microgravity: A new technology for development of blood vessels“
11th Meeting of the European Council for CV Research, 10.-12.10.2008, Nizza, France

8. Pietsch J, **Ulbrich C**, Leder A, Westphal K, Bauer J, Grimm D
„Tissue engineering and simulated microgravity: A new technology for development of blood vessels“
Erlanger Gravimeeting, 27.-28.11.2008, Erlangen

Veröffentlichungen

1. Manfred Infanger¹, **Claudia Ulbrich**¹, Sarah Baatout, Markus Wehland, Reinhold Kreutz, Johann Bauer, Jirka Grosse, Sonia Vadrucchi, Augusto Cogoli, Hanane Derradji, Mieke Neefs, Sabine Küsters, Mike Spain, Martin Paul, Daniela Grimm

¹ beide Autoren gleichberechtigt

„Modeled Gravitational Unloading Induced Downregulation of Endothelin-1 in Human Endothelial Cells“

Journal of Cellular Biochemistry, 2007, 101:1439-1455

2. Manfred Infanger, Shideh Faramarzi, Jirka Grosse, Ekkehard Kurth, **Claudia Ulbrich**, Johann Bauer, Markus Wehland, Reinhold Kreutz, Peter Kossmehl, Martin Paul, Daniela Grimm

“Expression of Vascular endothelial growth factor and receptor tyrosine kinases in cardiac ischemia-reperfusion injury”

Cardiovascular Pathology 2007, 16:291-299

3. **Claudia Ulbrich**¹, Kriss Westphal¹, Sarah Baatout, Markus Wehland, Johann Bauer, Reinhold Kreutz, Manfred Infanger, Sonia Vadrucchi, Marcel Egli, Augusto Cogoli, Hanane Derradji, Daniela Grimm

¹ beide Autoren gleichberechtigt

“Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity”

Journal of Cellular Biochemistry. 2008 Feb 5. [Epub ahead of print]

4. Manfred Infanger, Jirka Grosse, **Claudia Ulbrich**, Jessica Pietsch, Annekathrin Leder, Johann Bauer, Daniela Grimm

“Vascular endothelial growth factor induces extracellular matrix proteins and osteopontin in the umbilical artery”

Annals of Vascular Surgery. 2008 Mar;22(2):273-84

5. Jirka Grosse, Daniela Grimm, Kriss Westphal, **Claudia Ulbrich**, Jutta Moosbauer, Florian Pohl, Oliver Koelbl, Manfred Infanger, Christoph Eilles, Johann Schönberger

“Radiolabeled annexin V for imaging apoptosis in radiated human follicular thyroid carcinomas – is an individualized protocol necessary?”

Nucl Med Biol. 2009 Jan;36(1):89-98

6. Daniela Grimm, Manfred Infanger, Kriss Westphal, **Claudia Ulbrich**, Jessica Pietsch, Peter Kossmehl, Sonia Vadrucchi, Sarah Baatout, Burkhard Flick, Martin Paul, Johann Bauer

“A delayed type of three-dimensional growth of human endothelial cells under simulated weightlessness”

Tissue Eng Part A. 2009

Auszeichnungen und Preise

1. Februar 2006 bis Februar 2007:

Studentische Forschungsförderung der Charité Universitätsmedizin Berlin

2, Teilnahmestipendium für den Posterbeitrag:

„Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on endothelial cells under simulated microgravity

Annual meeting – Pharmacology of membrane receptors: from molecule to clinic; 21.-22.06.2007, Kopenhagen, Dänemark

13. ANLAGEN**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1:	Darstellung der Einzelwerte für Osteopontin	48
Tabelle 2:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Osteopontin	49
Tabelle 3:	Darstellung der Einzelwerte für Kollagen Typ I	50
Tabelle 4:	Darstellung der Einzelwerte für Kollagen Typ III	51
Tabelle 5:	Darstellung der Einzelwerte für Fibronektin	52
Tabelle 6:	Darstellung der Einzelwerte für Laminin	53
Tabelle 7:	Darstellung der Einzelwerte für Osteopontin	54
Tabelle 8:	Darstellung der Einzelwerte für Osteopontin	55
Tabelle 9:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Osteopontin	56
Tabelle 10:	Darstellung der Einzelwerte für Kollagen Typ I	57
Tabelle 11:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Kollagen Typ I	58
Tabelle 12:	Darstellung der Einzelwerte für Kollagen Typ I	59
Tabelle 13:	Darstellung der Einzelwerte für Kollagen Typ III	60
Tabelle 14:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Kollagen Typ III	61
Tabelle 15:	Darstellung der Einzelwerte für Kollagen Typ III	62
Tabelle 16:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Kollagen Typ III	62
Tabelle 17:	Darstellung der Einzelwerte für Fibronektin	63
Tabelle 18:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fibronektin	64
Tabelle 19:	Darstellung der Einzelwerte für Laminin	65
Tabelle 20:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Laminin	65
Tabelle 21:	Darstellung der Einzelwerte für Osteopontin	66
Tabelle 22:	Darstellung der Einzelwerte für Osteopontin	67
Tabelle 23:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Osteopontin	67
Tabelle 24:	Darstellung der Einzelwerte für Bax	69
Tabelle 25:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bax	70
Tabelle 26:	Darstellung der Einzelwerte für Bcl-2	71
Tabelle 27:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bcl-2	72
Tabelle 28:	Darstellung der Einzelwerte für Fas	73
Tabelle 29:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fas	74
Tabelle 30:	Darstellung der Einzelwerte für Bax	75
Tabelle 31:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bax	76
Tabelle 32:	Darstellung der Einzelwerte für Bcl-2	77
Tabelle 33:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bcl-2	77
Tabelle 34:	Darstellung der Einzelwerte für Caspase-3	78

Tabelle 35:	Darstellung der Einzelwerte für Caspase-3	79
Tabelle 36:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Caspase-3	80
Tabelle 37:	Darstellung der Einzelwerte für Fas	81
Tabelle 38:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fas	82
Tabelle 39:	Darstellung der Einzelwerte für p53	83
Tabelle 40:	Darstellung der Einzelwerte für Bax	84
Tabelle 41:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bax	85
Tabelle 42:	Darstellung der Einzelwerte für Bax	86
Tabelle 43:	Darstellung der Einzelwerte für Bcl-2	87
Tabelle 44:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Bcl-2	88
Tabelle 45:	Darstellung der Einzelwerte für Caspase-3	89
Tabelle 46:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Caspase-3	90
Tabelle 47:	Darstellung der Einzelwerte für Caspase-3	91
Tabelle 48:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Caspase-3	91
Tabelle 49:	Darstellung der Einzelwerte für Fas	92
Tabelle 50:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fas	93
Tabelle 51:	Darstellung der Einzelwerte für Fas	94
Tabelle 52:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Fas	94
Tabelle 53:	Darstellung der Einzelwerte für p53	95
Tabelle 54:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für p53	96
Tabelle 55:	Darstellung der Einzelwerte für p53	97
Tabelle 56:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für p53	97
Tabelle 57:	Darstellung der Einzelwerte für NF κ B	98
Tabelle 58:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für NF κ B	99
Tabelle 59:	Darstellung der Einzelwerte für Endothelin-1	100
Tabelle 60:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Endothelin-1	101
Tabelle 61:	Darstellung der Einzelwerte für Endothelin-1	101
Tabelle 62:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für Endothelin-1	102
Tabelle 63:	Darstellung der Einzelwerte für eNOS	102
Tabelle 64:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für eNOS	102
Tabelle 65:	Darstellung der Einzelwerte für TGF β ₁	105
Tabelle 66:	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für TGF β ₁	106
Tabelle 67:	Darstellung der Einzelwerte für Vimentin	109

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Spinner flasks	5
Abbildung 2:	Rotating Wall Vessel	6
Abbildung 3:	Zytoskelett	9
Abbildung 4:	Extrazelluläre Matrix	11
Abbildung 5:	Fibronektin	12
Abbildung 6:	Laminin	13
Abbildung 7:	Einfluss der EZM auf die Zelle	16
Abbildung 8:	Apoptotische Zelle	19
Abbildung 9:	Effekte der Schwerelosigkeit	21
Abbildung 10:	Wirkung der Bcl-2 Familie	22
Abbildung 11:	Pathway von p53	24
Abbildung 12:	Wirkungsweise von NFκB	26
Abbildung 13:	bFGF	27
Abbildung 14:	Wirkungsweise von Endothelin-1	28
Abbildung 15:	Random Positioning Machine	30
Abbildung 16:	tubuläre Struktur, geformt von Ea.hy926 Zellen	30
Abbildung 17:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin	49
Abbildung 18:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ I	50
Abbildung 19:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ III	51
Abbildung 20:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fibronektin	52
Abbildung 21:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Laminin	53
Abbildung 22:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin	54
Abbildung 23:	Ergebnis der PCR-Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin	56
Abbildung 24:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ I	58
Abbildung 25:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ I	59
Abbildung 26:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen	

	bezüglich Kollagen Typ III	61
Abbildung 27:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Kollagen Typ III	62
Abbildung 28:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fibronektin	63
Abbildung 29:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Laminin	65
Abbildung 30:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin	66
Abbildung 31:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Osteopontin	67
Abbildung 32:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bax	70
Abbildung 33:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bcl-2	72
Abbildung 34:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fas	74
Abbildung 35:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bax	76
Abbildung 36:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bcl-2	77
Abbildung 37:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Caspase-3	78
Abbildung 38:	Ergebnis der PCR-Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Caspase-3	80
Abbildung 39:	Ergebnis der PCR-Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fas	82
Abbildung 40:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich p53	83
Abbildung 41:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bax	85
Abbildung 42:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bax	86
Abbildung 43:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Bcl-2	88
Abbildung 44:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Caspase-3	90
Abbildung 45:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Caspase-3	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 46:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fas	93
Abbildung 47:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Fas	94
Abbildung 48:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich p53	96
Abbildung 49:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich p53	97
Abbildung 50:	Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich NF κ B	98
Abbildung 51:	Ergebnis der PCR von Ea.hy926 Zellen bezüglich Endothelin-1	100
Abbildung 52:	Ergebnis der Western Blot-Analyse von Ea.hy926 Zellen bezüglich Endothelin-1	102
Abbildung 53:	Ergebnis der PCR von Ea.hy926 Zellen bezüglich eNOS	104
Abbildung 54:	Ergebnis der PCR von Ea.hy926 Zellen bezüglich TGF β ₁	105
Abbildung 55:	Korrelation zwischen TGF β ₁ und Endothelin-1	106
Abbildung 56:	F-Aktin Färbung	107
Abbildung 57:	Färbung F-Aktin, α - und β -Tubulin	108
Abbildung 58:	Durchflusszytometrische Untersuchung von Ea.hy926 Zellen bezüglich Vimentin	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Akt	Proteinkinase B
ALPS	Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom
APAF-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
Bad	Bcl-2 associated death promoter
Bax	Bcl-2 associated death protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BK	Bodenkontrolle
BSA	Bovines Serum Albumin
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CD95	Fas
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
c-Rel	zelluläres Gegenstück zu v-Rel (aviäres retikuloendotheliales Virusstamm T transformierendes Gen)
d	day
dATP	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DD	Todesdomäne (death domain)
DDSA	Dodeceny succinatsäureanhydrid
DED	Todeseffektordomäne (death effector domain)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Todesinduzierender Signalkomplex (death inducing signalling complex)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleid acid
DPM	Dimethylaminomethylphenol
dUTP	2'-Desoxyuridin 5'-triphosphat
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamin tetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FADD	Fas assoziierte Todesdomäne (Fas associated death domain)
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

Abkürzungsverzeichnis

FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FGF2	basic fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FLICE	FADD-like IL-1 β -converting enzyme
FLIP	FLICE inhibitory Protein
FOXO	Forkhead Box O transcription factor
FSC	forward angle light scatter
g	gravity
GC	Ground control
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour
IAP	inhibitor-of-apoptosis protein
IF	Intermediärfilament
kDa	kiloDalton
MCS	multizelluläre Sphäroide
MCTS	multizelluläre Tumorsphäroide
Mdm-2	murine double minute 2
MG	Mikrogravität
min	minute
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTOC	Microtubule Organizing Centre
n.s.	nicht signifikant
NF- κ B	Nuklear Faktor kappa B
NK	natürliche Killerzellen
OPN	Osteopontin
p21Cip1/Waf	Zellzyklusregulator
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidiumjodid
RelA	Nuclear factor NF κ B p65 subunit
RelB	Transkriptionsfaktor
ROH	Alkohol

Abkürzungsverzeichnis

RPM	Random Positioning Machine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
scya11	chemokine (C-C motif) ligand 11
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Smac	second mitochondria activator of caspases
SSC	side scatter
t	time
tBid	truncated Bid
T β R	TGF β -Rezeptor
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
TLR	Toll-like Receptor
TRADD	TNF-Rezeptor assoziierte Protein
TRAIL	TNF-related-apoptosis-inducing ligand
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin
UV	Ultraviolett
VEH	Vehicle
ZNS	Zentrales Nervensystem

QUELLENVERZEICHNIS

Folgende Webseiten wurde von mir als Informationsquellen verwendet:

www.celldeath.de

www.cvphysiology.com

www.cytochemistry.net/Cell-biology

www.fig.cox.miami.edu

www.hyper.quifis.uv.es

www.jedn.ipmc.cnrs.fr

www.steve.gb.com

www.unifr.ch

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre:

In erster Linie möchte ich mich beim Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt bedanken, mit deren finanzieller Unterstützung das BMBF Projekt 50WB0524 durchgeführt werden konnte.

Frau PD Dr. Daniela Grimm danke ich für die Vergabe des Themas und darüber hinaus für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Ohne ihre Unterstützung und Förderung wäre der Weg in die Forschung deutlich schwerer geworden. Danke!

Herrn Dekan Prof. Dr. Martin Paul danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an der Charité anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Roland Rudolph danke ich für seine sofortige Bereitschaft, auch ein eher ungewöhnliches Thema zu vertreten.

Unserer Arbeitsgruppe, insbesondere PD Dr. Manfred Infanger, Dr. Siri Hollenberg, Dr. Jirka Grosse, Jessica Pietsch und Kriss Westphal, möchte ich danken, vor allem Kriss, ohne die meine Western Blots nie etwas geworden wären!

Für die Gastfreundschaft, die Bereitstellung des dreidimensionalen Klinostaten und anderer Materialien bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Augusto Cogoli und seinen Mitarbeitern, sowie bei der ETH Zürich, und hier besonders bei Dr. Marcel Egli und Dr. Sonia Vadrucci.

Des Weiteren gilt mein Dank der DLR und der Charité Universitätsmedizin Berlin, ohne deren Förderung die Erstellung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. G. Ruyters, Herrn PD Dr. M. Braun und Herrn Dr. HU Hoffmann von der DLR.

Herrn Dr. Dr. Hopfenmüller danke ich für die Beratung in statistischen Fragen.

Danksagung

Herrn Dr. Markus Wehland-von Trebra danke ich vor allem für seine Geduld, die er mit den Grenzen des medizinischen Verstandes im Allgemeinen, und mit meinem im speziellen hatte. Ohne ihn gäbe es keine PCR in dieser Arbeit. Danke!

Herrn Jessie Webb danke ich für seine Hilfe bei der Durchflusszytometrie und dafür, dass ich ihn deswegen zu jeder Zeit fragen konnte. Ein spezieller Dank auch an Frau Doris Webb!

Herrn Dr. Johann Bauer danke ich für seine Hilfe beim Schreiben der Publikation.

Ein besonderer Dank geht an Hans Figuhr und Klaus Duwe, die jederzeit alles parat hatten was ich benötigte.

Weiterhin bedanke ich mich bei all meinen Freunden, die mir immer zur Seite gestanden und mich ermutigt haben! Sie haben immer an mich geglaubt und mich das auch wissen lassen. Mein besonderer Dank gilt hier Sandra und Susanne, die mich schon seit Jahren kennen, und dennoch immer noch mit mir befreundet sind.

Allen Verwandten, die mich unterstützt haben, sei hier ebenfalls gedankt, ganz besonders meinem Patenonkel Hans und seiner Familie, sowie meiner Großtante Maria.

Schlussendlich möchte ich mich bei meiner Schwester und meinen Eltern mit den Worten Edward Bellamys bedanken:

Nach unserer Ansicht macht sich niemand so um die Welt verdient wie gute Eltern

Stude sapere

11. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Die Arbeit ist noch nie in einem Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden.

Claudia Ulbrich

ISBN 978-3-941703-16-2



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.de>**