

Aus der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Scaffold-freies 3D-Zellkulturmodell humaner
Lungenkarzinomzellen unter veränderten
Schwerkraftbedingungen auf der
Random Positioning Machine**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Carlo Dietz

aus Trier

Magdeburg 2020

Bibliographische Beschreibung:

Dietz, Carlo:

Scaffold-freies 3D-Zellkulturmodell humaner Lungenkarzinomzellen unter veränderten Schwerkraftbedingungen auf der Random Positioning Machine. 2020. 95 Bl., 10 Abb., 2 Tab.

Kurzreferat:

Der Einfluss von Mikrogravitation auf das Plattenepithelkarzinom der Lunge wurde bisher nur in geringem Umfang untersucht. Experimente mit anderen Zelllinien haben gezeigt, dass der Einfluss von Mikrogravitation auf Zellen zur Bildung dreidimensionaler Zellkulturmodelle führen kann. Dabei kann es zu multiplen Veränderungen in der Zellmorphologie, im Zytoskelett, im Zellzyklus, der Gen- und Proteinexpression, der Apoptose und vieler weiterer zellulärer Prozesse kommen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche Veränderungen bei Zellen des Plattenepithelkarzinoms der Lunge nach Kultivierung unter simulierter Mikrogravitation mittels der Random Positioning Machine (RPM) auftreten und ob sich dreidimensionale Zellkulturmodelle ausbilden.

Die Zellen wurden über verschiedene Zeiträume in der RPM kultiviert und anschließend mikroskopisch und mittels RT-qPCR, WesternBlotting und TUNEL-Methode untersucht.

Bereits nach 24 Stunden auf der RPM bildeten die Lungenkarzinomzellen dreidimensionale Strukturen. Die F-Aktinfasern waren konzentrisch angeordnet und akkumulierten unmittelbar unterhalb der Zellmembran. Die Expression aller untersuchten Tumorsuppressorgene war in den nicht-abgelösten (adhärenten) Zellen aus der RPM signifikant hochreguliert. SOX2 war das einzige Protoonkogen, bei dem sich eine Veränderung in der Expression zeigte. Die ebenfalls untersuchte Proteinsynthese korrelierte nur zum Teil mit der Genexpression. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Apoptoserate in den Sphäroiden nach 24 und 72 Stunden beobachtet (88,55% und 86,43%).

Somit konnte die Bildung dreidimensionaler Zellmodelle unter Mikrogravitationsbedingungen auch für plattenepitheliale Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich vor allem in den Tumorsuppressorgenen Veränderungen in der Expression, zusätzlich konnte eine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden.

Schlüsselwörter

Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, 3D-Zellkulturmodelle, simulierte Mikrogravitation, Random Positioning Machine, Apoptose

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit sind Grundlage der folgenden Publikation:

Dietz, C.; Infanger, M.; Romswinkel, A.; Strube, F.; Kraus, A. Apoptosis Induction and Alteration of Cell Adherence in Human Lung Cancer Cells under Simulated Microgravity. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 3601.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	4
1.1 Lungenkarzinom	4
1.1.1 Epidemiologie	4
1.1.2 Histologische Klassifikation	4
1.1.3 Molekularbiologie des Lungenkarzinoms.....	5
1.1.4 Apoptose beim Lungenkarzinom.....	8
1.2 Dreidimensionale Zellkulturmodelle.....	10
1.2.1 Sphäroide.....	10
1.2.2 Klinische Relevanz dreidimensionaler Zellkulturmodelle	12
1.3 Mikrogravitation.....	13
1.3.1 Pathophysiologische Veränderungen unter Mikrogravitation	13
1.3.2 Simulierte Mikrogravitation	14
1.3.2.1 Apoptose unter simulierter Mikrogravitation.....	16
1.3.2.2 Anlagen zur Simulation von Mikrogravitation auf der Erde	16
1.4 Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Zellkultur.....	20
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.4 TUNEL-Assay.....	23
2.1.5 Primer für die RT-qPCR.....	24
2.1.6 Antikörper für WesternBlot.....	25
2.1.7 Geräte	25
2.1.8 Software	28
2.2 Methoden	28
2.2.1 Auftauen der Zellkultur	28
2.2.2 Kultivierung der Zellen	28
2.2.3 Passagieren der Zellen.....	29

2.2.4 Einfrieren von Zellkulturen	29
2.2.5 Bestückung der RPM	29
2.2.6 Untersuchung der Zellen unter dem Durchlichtmikroskop	30
2.2.7 Anfärben von Aktinfilamenten mit Phalloidin.....	30
2.2.8 Nachweis von apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Methode	31
2.2.9 Quantifizierung der Genexpression mittels RT-qPCR.....	33
2.2.9.1 Extraktion von RNA	34
2.2.9.2 Messen der RNA-Konzentration.....	35
2.2.9.3 Synthese von cDNA	36
2.2.9.4 Quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR).....	36
2.2.10 Semiquantitative Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese und WesternBlot	38
2.2.10.1 Gewinnung von Zellen und Extraktion von Proteinen	38
2.2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.2.10.3 WesternBlot	38
2.2.11 Statistik	40
3. Ergebnisse.....	41
3.1 Morphologische Veränderungen der Lungenkarzinomzellen unter RPM-Bedingungen	41
3.1.1 Veränderungen der Zellmorphologie nach 24, 48, 72 und 96 Stunden.....	41
3.1.2 Veränderungen der Zellmorphologie und der F-Aktin-Anordnung nach 72 Stunden	43
3.2 Veränderungen der Genexpression und der Proteinsynthese	46
3.2.1 Protoonkogene	46
3.2.2 Tumorsuppressorgene	48
3.3 Apoptoserate.....	51
4. Diskussion	54
4.1. Morphologische Veränderungen der Lungenkarzinomzellen	54
4.2 Veränderungen der Genexpression und der Proteinsynthese	59
4.3 Apoptoserate.....	64
4.4 Einsatz der Random Positioning Machine	67
5. Zusammenfassung.....	70
6. Literaturverzeichnis.....	72
Danksagung	87
Ehrenerklärung	88
Lebenslauf	89

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
<i>ACTB</i>	<i>Beta-Aktin Gen</i>
AD	Adhärente Zellen
<i>AKT3</i>	<i>Serine/Threonine Kinase 3 Gen</i>
<i>ALK</i>	<i>Anaplastische Lymphomkinase Gen</i>
<i>ASS1</i>	<i>Argininosuccinate Synthase 1 Gen</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaare
<i>BRAF</i>	<i>Serin/Threonin-Kinase B-Raf Gen</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD95	Cluster of differentiation 95
<i>CDKN2A</i>	<i>Cyclin-dependent Kinase-Inhibitor 2A Gen</i>
CYP	Cytochrom P
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHM	Digital Holographic Microscope
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(complementary) Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
<i>EEF1A1</i>	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 Gen</i>
EGF(R)	Epidermal Growth Factor (Receptor)
EZM	Extrazellulärmatrix
<i>FGFR1</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gen</i>
g	Einheit der g-Kraft
GBF	Ground Based Facilities
HTS	High-throughput screening

IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ISS	International Space Station
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten Rat Sarcoma Gen</i>
MCS	Multizelluläre Sphäroide
MKI-67	Marker of Proliferation Ki-67
MMP2	Matrix Metalloproteinase-2
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
<i>NFE2L2</i>	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 Gen</i>
<i>Nrf2</i>	<i>Nuclear factor E2-related factor 2 Gen</i>
(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphate-Buffered Saline
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase Untereinheit Alpha Gen</i>
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and Tensin homolog Gen</i>
qRT-PCR	Quantitative RealTime-Polymerasekettenreaktion
<i>RB1</i>	<i>Retinoblastom 1 Gen</i>
Rel.	Relativ
<i>RhoA</i>	<i>Ras homolog A Gen</i>
(m)RNA	(Messenger) Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Random Positioning Machine
rpm	Rounds per minute
RWV	Rotating Wall Vessel
SDS	sodium dodecyl sulfate
<i>SOX2</i>	<i>SRY-related HMG-box 5 Gen</i>
SPH	Sphäroide
TBS	Tris-buffered saline
TdT	Terminale-desoxynucleotidyl-Transferase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
<i>TP53</i>	<i>TP53-Tumorsuppressor-Gen</i>
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
WHO	World Health Organisation
(s-)µg	(simulierte) Mikrogravitation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zoneneinteilung von Sphäroiden	11
Abbildung 2	Random Positioning Machine	27
Abbildung 3	Lungenkarzinomzellen unter 1g- und RPM-Bedingungen	42
Abbildung 4	Sphäroidale Zusammenlagerung der Lungenkarzinomzellen nach 72 Stunden auf der RPM	43
Abbildung 5	F-Aktin-Färbung nach 72 Stunden unter 1g- und RPM-Bedingungen	45
Abbildung 6	Expression der Protoonkogene <i>AKT3</i> , <i>NFE2L2</i> und <i>PIK3CA</i> nach 72 Stunden auf der RPM	47
Abbildung 7	Expression des Protoonkogens <i>SOX2</i> und Proteinsynthese von <i>SOX2</i> nach 72 Stunden auf der RPM	48
Abbildung 8	Expression der Tumorsuppressorgene <i>CDKN2A</i> , <i>PTEN</i> , <i>RB1</i> sowie <i>TP53</i> und Proteinsynthese von p14, PTEN, pRb1 und p53 nach 72 Stunden auf der RPM.	50/51
Abbildung 9	TUNEL-Färbung nach 24 und 72 Stunden unter 1g- und RPM-Bedingungen	51/52
Abbildung 10	Apoptoserate nach 24 und 72 Stunden unter RPM-Bedingungen	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Auflistung der mittels RT-qPCR untersuchten Gene	33
Tabelle 2	Beladungsschema der Gele für Gelelektrophorese	39

1. Einleitung

1.1 Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom ist eine der häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen in Deutschland. Bei Männern ist es die zweithäufigste maligne Tumorart, bei Frauen die Dritthäufigste (1). Bei Ansicht der anteiligen Krebssterbefälle unter den malignen Tumoren wird die Relevanz des Lungenkarzinoms für das deutsche Medizinwesen noch deutlicher. Bei Männern führt das Lungenkarzinom, anteilmäßig an allen malignen Tumoren, am häufigsten zum Tode, bei Frauen am zweithäufigsten (1). Dabei entwickelten sich die Erkrankungs- und Sterberaten bei beiden Geschlechtern in den letzten Jahrzehnten gegenläufig (2). Die Erkrankungshäufigkeit bei Männern nimmt seit 1990 stetig ab, bei Frauen dagegen jedoch zu, wobei dieses Phänomen unter anderem durch die sich verändernden Rauchgewohnheiten der beiden Geschlechter erklärt wird (2). Die Prognose des Lungenkarzinoms ist schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate, gemittelt über alle Unterformen des Lungenkarzinoms, liegt bei Frauen bei ungefähr 20%, bei Männern nur bei 15% (2). Wichtigster Risikofaktor ist das Rauchen, wobei das Risiko positiv mit frühem Beginn, Anzahl der Jahre, die geraucht wurde und der Menge der gerauchten Zigaretten korreliert (3). Einige weitere Risikofaktoren sind das Passivrauchen (3), Radon-Exposition (4) und ionisierende Strahlung (5).

1.1.2 Histologische Klassifikation

Die Einteilung von Lungenkarzinomen unter histologischen Gesichtspunkten unterliegt einem regelmäßigen Wandel, die aktuellste Einteilung der World Health Organisation (WHO) stammt aus dem Jahr 2014 (6). In der Vorgängerversion von 2004 wurden die wichtigsten Subtypen des Lungenkarzinoms aus klinischer Perspektive in kleinzellige und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome eingeteilt (7), wobei ca. 85% aller Lungenkarzinome zu den nicht-kleinzelligen und 15% zu den kleinzelligen Tumoren gehören (8). Diese klinische Einteilung hat vor allem wegen der eminenten Unterschiede in Therapie und Prognose der beiden Kategorien auch heute noch Bestand (9). Aufgrund neuer Möglichkeiten, insbesondere im Bereich der Immunhistochemie und genetischen Subtypisierung, haben sich mit der Erneuerung der Klassifikation von 2014 jedoch deutliche Veränderungen in der histologischen Einteilung ergeben (6). Lungenkarzinome werden nun in epitheliale, mesenchymale und

weitere Entitäten unterteilt. Die wichtigsten Tumore sind solche epithelialen Ursprungs, dazu gehören insbesondere Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und die neuroendokrinen Tumore (6). Jede Entität lässt sich dabei noch weiter untergliedern.

1.1.3 Molekularbiologie des Lungenkarzinoms

Wie auch bei anderen malignen Tumoren ist bei der Genese des Lungenkarzinoms die unkontrollierte Aktivierung von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutationen von großer Bedeutung (10). Dadurch kann es zu übermäßiger Proliferation und Zellteilung kommen und in der Folge, bei gemeinsamem Auftreten mehrerer Mutationen, zur Entstehung eines Tumors (11). Die Anzahl der bei der Tumorgenese des Lungenkarzinoms potentiell beteiligten Gene ist sehr groß, ebenso wie die dadurch betroffenen Signalwege bzw. Prozesse in der Zelle. Wichtig ist, dass bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen differenziert wird, da diese sich in ihrer Genese unterscheiden. Das Adenokarzinom der Lunge wurde molekularbiologisch intensiver erforscht als das Plattenepithelkarzinom. Erst in den letzten Jahren wurden mehr und mehr Studien auch zur Genese des Plattenepithelkarzinoms durchgeführt (10). So konnten für das Adenokarzinom bereits mehrere Zielstrukturen als Targets für gezielte Therapien entdeckt werden. Bei Patienten mit *EGFR*- oder *ALK*-Mutation kann eine Therapie mit einem entsprechenden Tyrosin-Kinase-Inhibitor als Erstlinientherapie in Erwägung gezogen werden, da sich hier insbesondere für *EGFR*-Mutation eine statistisch signifikante Verzögerung des Krankheitsprozesses gezeigt hat (12,13).

Durch intensivere Forschung zur Genese des Plattenepithelkarzinoms der Lunge wurden Gene identifiziert, die häufig beim Plattenepithel- und nur selten beim Adenokarzinom mutiert sind. Dazu gehören *MET*, *FGFR1* (14), *SOX2*, *PTEN*, *TP53* und Gene, die für Proteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges kodieren (*PIK3CA* und *AKT3*) (siehe unten). Weitere Gene, für die Mutationen beim Plattenepithelkarzinom der Lunge gefunden wurden, sind *DDR2* (15), *NFE2L2*, *RB1* und *CDKN2A* (siehe unten). Dagegen sind Mutationen in *EGFR*, *KRAS* oder *BRAF* deutlich häufiger beim Adenokarzinom zu finden und so für die Molekularbiologie des Plattenepithelkarzinoms von geringerer Relevanz (16–20).

Das Protoonkogen *MET* kodiert für einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor (hepatocyte growth factor receptor), der bei Aktivierung weitere Signalwege in der Zelle stimuliert, unter anderem den PI3K/Akt-Signalweg (siehe unten) (21). *MET* ist häufiger beim Plattenepithelkarzinom als beim Adenokarzinom der Lunge mutiert und hohe Genkopie-Anzahlen sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (22).

AKT3 (Serin/Threonin-Kinase 3) und die α -Untereinheit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) sind die Proteinprodukte der Gene *AKT3* und *PIK3CA*. Beide Kinasen sind elementare Bestandteile der Signaltransduktion bei Aktivierung transmembranärer Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosin-Kinase) der Zelle durch Wachstumsfaktoren und Insulin. Sie spielen eine Rolle bei Proliferation, Zellüberleben und -differenzierung, Apoptose und Tumorgenese (23,24). Als Suppressor des PI3K/AKT-Signalwegs findet sich das Expressionsprodukt des Gens *PTEN* (Phosphatase und Tensin homolog). *PTEN* kodiert für eine Phosphatase, die die Aktivierung von AKT verhindert (25), es fungiert dementsprechend als Tumorsuppressorgen. Bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge wurden in einer umfangreichen Studie von Hammerman et al. häufig Mutationen in diesen drei Genen gefunden (26), bei Adenokarzinomen sind sie selten (17,27,28).

Bei fast allen in der Studie von Hammerman et al. untersuchten Lungenkarzinomen wurden Mutationen im *TP53*-Gen gefunden (26). Mutationen in diesem Gen sind sowohl beim Adenokarzinom als auch beim Plattenepithelkarzinom zu finden. Es kodiert für das Protein p53, welches eine zentrale Rolle bei Zellzykluskontrolle und der damit in Zusammenhang stehenden Apoptose spielt. Bei DNA-Schäden agiert p53 als Transkriptionsfaktor und aktiviert die Expression ausgewählter Gene, was zu einem vorübergehenden Zellzyklusarrest oder zu Apoptose führen kann (29). Das von *CDKN2A* kodierte Protein p14 kann über die Inhibition eines Mediatorproteins (MDM2) p53 aktivieren und damit die Kontrollfunktion des Proteins initiieren (30). Ein weiteres am Zellzyklus beteiligtes Protein ist pRb1 (Retinoblastom-Protein, codiert von *RB1*). Es bindet E2F und verhindert so das Fortschreiten des Zellzyklus (31). Alle Gene verhindern demnach im nicht-mutierten Zustand unkontrollierte Proliferation und Mitose (Tumorsuppressorgene). Sowohl *CDKN2A* als auch *RB1* sind beim Plattenepithelkarzinom der Lunge häufig mutiert (26).

Zwei weitere Gene, bei denen Mutationen in Lungenkarzinomzellen gefunden wurden, sind *SOX2* und *NFE2L2* (26,32). *SOX2* kodiert für das gleichnamige Protein, welches als Transkriptionsfaktor agiert. Es ist beteiligt an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen und an der Differenzierung zu verschiedenen spezialisierten Zelltypen (beispielsweise Differenzierung zu Epithelzellen der Trachea und des Ösophagus) (33–35). Lu et al. konnten nachweisen, dass eine Überexpression von *SOX2* bei der Entstehung von Lungenkarzinomen beteiligt ist (36). Eine weitere Studie konnte bestätigen, dass *SOX2*-Mutationen häufig beim Plattenepithelkarzinomen der Lunge auftreten. Jedoch konnte in der gleichen Studie gezeigt werden, dass Patienten mit Genamplifikation von *SOX2* und Überexpression von *SOX2*-Protein eine bessere Prognose besitzen (37).

NFE2L2 (Synonym: *Nrf2*), kodiert durch das gleichnamige Gen, ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor. Durch die dadurch bedingte Aktivierung entsprechender Gene werden antioxidative Proteine transkribiert (38). Dies dient der Zelle als Mechanismus zur Reaktion auf oxidativen Stress. Mutationen im *NFE2L2*-Gen können zu erhöhter Malignität von Tumoren führen (39) und eine erhöhte Aktivität von *NFE2L2* kann zu einem verstärkten Wachstum von Lungenkarzinomzellen und einer Resistenz der Zellen gegenüber Cisplatin führen (40).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Auswahl der zu untersuchenden Gene darauf geachtet, dass eine ausgewogene Anzahl an Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen eingeschlossen wird. Des Weiteren wurden gezielt Gene ausgewählt, die Teil folgender Zellprozesse sind: Zellzykluskontrolle/Apoptose (*CDKN2A*, *RB1*, *TP53*), Signaltransduktion (*AKT3*, *PIK3CA*, *PTEN*), Reaktion der Zelle auf oxidativen Stress (*NFE2L2*) und epitheliale Differenzierung (*SOX2*). Diese Zellprozesse tragen, wie oben dargelegt, bei fehlerhaftem Ablauf entscheidend zur Tumorentstehung in der Lunge bei. Zusätzlich wurden zwei Referenzgene, *ACTB* und *EEF1A1*, für die qRT-PCR ausgewählt. Diese beiden Gene wurden als stabile Referenzgene für PCR-Untersuchungen beim Plattenepithelkarzinom der Lunge identifiziert (41).

1.1.4 Apoptose beim Lungenkarzinom

Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod als wichtigen Teil der Homöostase multizellulärer Organismen (42). Nicht mehr benötigte, defekte oder potentiell gefährliche Zellen werden so abgebaut (42,43). Durch Ausfall dieses Prozesses kann es zu Akkumulation von Mutationen in der Zelle und zur Entartung dieser Zelle kommen (44). Die Suppression der Apoptose spielt dementsprechend bei der Entstehung von malignen Tumoren eine wichtige Rolle. Insbesondere der Ausfall von p53 und die Überexpression von Bcl2 sind bei sehr vielen Tumorarten an deren Entstehung beteiligt (45). Andererseits ist die Induktion von Apoptose einer der wichtigsten Ansatzpunkte bei der Therapie von Tumoren. Viele Chemotherapeutika führen genauso wie Bestrahlung zur Apoptose der Tumorzellen und so zu deren Eliminierung (44,46,47).

Es können zwei Hauptformen der Apoptose unterschieden werden: Extrinsischer und intrinsischer Weg (43). Beim extrinsischen Weg wird der programmierte Tod der Zelle durch extrazelluläre Signale initiiert. Dazu bindet ein Ligand an einen sogenannten transmembranären „Todesrezeptor“ an der entsprechenden Zelle (48). Sehr gut untersuchte Liganden/Rezeptorpaare sind beispielsweise FasL/FasR, CD95L/CD95 und TNF- α /TNFR1 (49,50). Dies führt über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung des Enzyms „Caspase 8“, welches die gemeinsame Endstrecke von in- und extrinsischem Weg aktiviert (43).

Der intrinsische Weg führt unabhängig von Rezeptoraktivität zum Tod der Zelle. Zentral für diesen Mechanismus sind die Mitochondrien. Aus diesen werden Cytochrom c und andere pro-apoptotische, mitochondriale Proteine (Smac/DIABLO, Apoptose inducing factor) freigesetzt (51). An der Freisetzung sind Proteine der Bcl2-Familie beteiligt, wobei manche dieser Proteine pro-apoptotische (Bcl10, Bax), andere anti-apoptotische (Bcl2) Wirkung haben (52). Ziel des intrinsischen Weges ist die Aktivierung von Caspase 9, die wie Caspase 8 die apoptotische Endstrecke aktiviert (43). Auslöser des intrinsischen Weges sind unter anderem DNA-Schäden (durch z.B. Strahlung, Toxine, freie Radikale), Hypoxie oder Virusinfektionen (43,48). Die Apoptose wird bei Schädigung der DNA vor allem über das Protein p53 initiiert (29) (siehe 1.1.3).

Die gemeinsame Endstrecke beider Wege führt mittels verschiedener Caspasen (Casp. 3,6,7) und weiterer Enzyme zum Abbau zellulärer Proteine wie Lamin und Aktin (Zerstörung des Zytoskeletts) und zur Fragmentierung der DNA (42,53). Dies resultiert in für die Apoptose klassischen morphologischen Veränderungen (Separation von den Nachbarzellen, Bildung von Blasen in der Membran, Abrundung und Verkleinerung der Zelle). Es kommt zur Verdichtung des Zytoplasmas, zur Kondensation des Chromatins im Zellkern und schlussendlich zur Ablösung von membranumschlossenen Zellstücken („Apoptotic bodies“). Diese werden von Makrophagen phagozytiert (42,43,48,54).

Auch beim Lungenkarzinom kann die Unterdrückung von Apoptose Teil der Tumorgenese sein. Die Anzahl an Studien dazu ist, verglichen mit anderen Tumorarten, relativ gering. Eine Erkenntnis der bisherigen Arbeiten ist, dass die Bedeutung der Apoptose für nicht-kleinzellige und kleinzellige Lungenkarzinome unterschiedlich ist. Für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome konnte ein deutlich geringerer Apoptoseindex (Anteil an apoptotischen Zellen an allen untersuchten Zellen) nachgewiesen werden als für kleinzellige Lungenkarzinome. Plattenepithelkarzinome weisen einen Apoptoseindex von 1,2% – 2,3% und Adenokarzinome von 1,1% – 1,3% auf (55–57). Für kleinzellige Lungenkarzinome dagegen wurden Apoptoseindices von bis zu 20% beschrieben (57,58).

Wie bei Tumoren anderer Organsysteme finden sich auch beim Lungenkarzinom häufige Veränderungen bei Bcl2-Proteinen, p53, IAP (Inhibitoren von Apoptose-Proteinen) und Caspasen (59), jedoch mit deutlichen Unterschieden zwischen nicht-kleinzelligen und kleinzelligen Lungenkarzinomen. So exprimieren nicht-kleinzellige Karzinome der Lunge verschiedene Procaspasen (Procaspasen 1, 4, 8 und 10), die im Gegensatz dazu kleinzellige Tumore nicht exprimieren (60). Darüber hinaus findet sich eine niedrigere Expression des anti-apoptotischen Bcl2 in den nicht-kleinzelligen Karzinomen, bei Plattenepithelkarzinomen ist sie höher als bei den Adenokarzinomen (61). Die Mutationsrate von *TP53* dagegen ist beim kleinzelligen Lungenkarzinom im Vergleich zum nicht-kleinzelligen leicht erhöht (62).

1.2 Dreidimensionale Zellkulturmodelle

Unter Gravitationsbedingungen, wie sie auf der Erdoberfläche herrschen (1g) und ohne Zugabe bzw. Einsatz weiterer Hilfsmittel wachsen Zellen in Zellkulturflaschen meist als zweidimensionaler Monolayer, fest adhärent am Boden der Flasche. Als Folge verändert sich im Vergleich zu den physiologischen Bedingungen im Körper jedoch die Morphologie der Zellen, was potentiell mit einem Funktionsverlust einhergehen kann (63–65). Wichtige, durch die veränderte Morphologie beeinflusste Prozesse sind z.B. Zelldifferenzierung, zelluläre Signalverarbeitung und Apoptose (65–67). Daher sind Monolayer-Kulturen nur bedingt auf die Verhältnisse im menschlichen Körper übertragbar, zumal dort physiologisches Gewebe und Tumore dreidimensionale Strukturen bilden. Dies führt zu einer Limitierung für den Einsatz zweidimensionaler Kulturen in der Forschung.

Dagegen konnte für dreidimensionale in-vitro Zellkulturen nachgewiesen werden, dass Zellen dort ihre ursprüngliche Struktur erhalten können (68). Infolgedessen bleiben auch Funktion, Zell-Zell-Kontakte und die Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktion (EZM) (69–71) intakt. Dies führt zu einer näherungsweisen Rekonstruktion der physiologischen Funktion des Zellverbandes, da die Architektur epithelialer Gewebe und die Funktion epithelialer Zellen maßgeblich von der Interaktion der Zellen untereinander und mit der EZM abhängig sind (71). Des Weiteren konnte für manche Zelllinien gezeigt werden, dass sie als dreidimensionale Kulturen die physiologische Genexpression und Proteinsynthese imitieren (64,72,73). Beispielsweise wurde für Hepatozyten nachgewiesen, dass diese in dreidimensionalen Zellmodellen, anders als in Zweidimensionalen, Proteine (Albumin, verschiedene CYP-Enzyme) synthetisieren, welche auch in reifen Hepatozyten in der Leber gebildet werden (64). In einer weiteren Studie konnte für Mesotheliom-Zellen nachgewiesen werden, dass das ASS1-Gen nur in Sphäroiden und Tumorgewebe hochreguliert war, nicht jedoch in 2D-Kulturen (73).

1.2.1 Sphäroide

Es können verschiedene Typen von 3D-Zellkulturmodellen unterschieden werden, wobei die Klassifikation nicht einheitlich ist. Eine mögliche Einteilung untergliedert sie in Sphäroide, Organoide (generiert aus pluripotenten Stammzellen/Organvorläuferzellen (74)), Scaffolds/Hydrogels, Organs-on-chips und mittels 3D-Druckern hergestellte dreidimensionale Modelle (75). Diese Einteilung berücksichtigt insbesondere die Methoden, die zur Kultivierung

eingesetzt werden und ob Gerüstmaterialien (scaffolds) zum Einsatz kommen. Im Folgenden wird aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit detailliert auf die Charakteristik und Kultivierung von Sphäroiden eingegangen.

Sphäroide sind dreidimensionale Zusammenlagerungen von Zellen und können aus einer unterschiedlichen Anzahl an solchen bestehen (76). Die Bildung solcher Sphäroide ist für Zellen diverser Tumorarten nachgewiesen, unter anderem für Kolorektal-, Mamma-, und Schilddrüsenkarzinome sowie Osteosarkome (77–80). Kenny et al. fanden in ihrer Arbeit zu Brustkrebszelllinien vier verschiedene morphologische Klassen von Sphäroiden: Vollständig runde Sphäroide, rebenförmig angeordnete Sphäroide, sternförmig angeordnete Sphäroide und als kugelige Gebilde angeordnete Sphäroide (81). Weiterhin können nach Lin und Chang einzelne Sphäroide ab einer gewissen Größe von innen nach außen in Zonen eingeteilt werden, wobei sich die Zonen hinsichtlich Proliferationsrate, Zellzyklusstadium, Oxygenierung und Zellmetabolismus unterscheiden (Abb. 1) (82,83). Die innerste Zone wird dabei aufgrund der weiten Diffusionsstrecke am schlechtesten mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und kann im Verlauf nekrotisch werden. Dies gilt ab einem Durchmesser der Sphäroide von ca. 200 – 300 μm (abhängig von der Zellart) (84). Der Aufbau der Sphäroide mit verschiedenen Zonen entspricht in groben Zügen Tumormassen im Körper, die oft ein schlecht vaskularisiertes, teilnekrotisches Zentrum aufweisen (85).

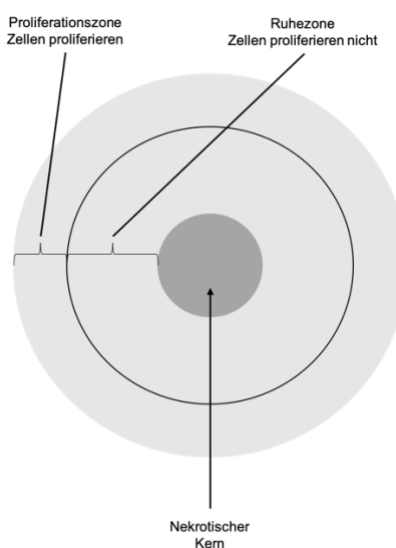


Abbildung 1 Zoneneinteilung von Sphäroiden

Dargestellt wird die Einteilung eines Sphäroides in verschiedene Zonen. Die Einteilung besitzt ab einem Sphäroiddurchmesser von ca. 200 – 300 μm Gültigkeit. Nach (82,84).

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Sphäroide in vitro zu generieren. Sie können unter anderem mittels low-adhesion-Zellkulturflaschen (86), hanging-drop-Verfahren (87) oder mithilfe von echter oder simulierter Mikrogravitation kultiviert werden (siehe Kapitel 1.3).

1.2.2 Klinische Relevanz dreidimensionaler Zellkulturmodelle

Die eingangs beschriebenen Eigenschaften dreidimensionaler Zellkulturmodelle sind die Grundlage für viele potentielle und bereits etablierte Anwendungen dieser Modelle in der klinischen Forschung. Unter anderem ergeben sich in den Bereichen Medikamentenentwicklung, Tumorforschung und Tissue-Engineering vielversprechende Möglichkeiten.

So können dreidimensionale Zellkulturen in der Pharmaforschung möglicherweise dazu beitragen, die für zweidimensionale Zellkulturen geltenden Limitierungen zu überwinden. Beispielsweise konnten in als Monolayer kultivierten Hepatozyten nach 5 Tagen ausgewählte Enzyme des CYP-450 Systems nicht mehr nachgewiesen werden (88). Diese sind in der Leber eminent wichtig für die Metabolisierung von Medikamenten. In als dreidimensionalen Strukturen kultivierten Hepatozyten dagegen waren viele der untersuchten CYP-Enzyme über mind. 2 Wochen stabil in den Zellen nachweisbar (88). Weiterhin wurden 3D-Zellkulturmodelle in der pharmakologischen Forschung unter anderem für die Suche nach neuen Zielstrukturen, beim High-Throughput-Screening (HTS), bei pharmakokinetischen, pharmakodynamischen und toxikologischen Untersuchungen implementiert (73,75,89,90).

Auch auf dem Feld der Tumorforschung erbrachten Arbeiten mit dreidimensionalen Zellkulturmodellen vielversprechende Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Reaktion von Zellen verschiedener Tumorarten aus 3D-Kulturen und solcher aus 2D-Kulturen auf die Zugabe von Zytostatika unterscheidet (91–93). Die Resistenz gegenüber zugegebenen Zytostatika stieg bei den 3D-Kulturen signifikant an, bei einer Kolonkarzinom-Zelllinie waren sechs Tage alte Sphäroide sogar fast gänzlich unempfindlich gegenüber Melphalan, Irinotecan, Oxaliplatin und 5-Fluorouracil (92). Dies spiegelt Erkenntnisse aus der klinischen Arbeit wider. Häufig sind Resistenzen der Tumore gegenüber Chemotherapeutika der Grund für das Versagen von Chemotherapien bei Menschen (94,95).

Darüber hinaus unterscheidet sich auch die Wirkung von Bestrahlung auf zwei- und dreidimensionale Tumorzellmodelle. Lungenadenokarzinome und verschiedene Plattenepithelkarzinome wiesen eine erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlung auf, wenn sie als 3D-Modelle kultiviert wurden (96). Dies konnte in ähnlicher Weise auch für somatische Zellen nachgewiesen werden (97).

1.3 Mikrogravitation

Der Begriff „Mikrogravitation“ (μg) wird in der einschlägigen Literatur zur Beschreibung von Experimenten verwendet, bei denen Organismen oder Zellen einen tatsächlichen oder theoretischen Zustand von Schwerelosigkeit erfahren. Dabei wirkt die Gravitationskraft jedoch stets weiter auf die Organismen oder Zellen ein. Selbst auf der Internationalen Raumstation (ISS) ist die Gravitation nur leicht geringer ($9,37 \text{ m/s}^2$) als auf der Erdoberfläche ($9,81 \text{ m/s}^2$) (98). Die Gravitation wird also nicht aufgehoben, sondern es herrscht physikalisch gesehen „freier Fall“ durch Aufhebung gegenseitig wirkender Kräfte (98) und dadurch Schwerelosigkeit. Der Begriff „Mikrogravitation“ (μg) ist daher aus physikalischer Sicht unpräzise. Nichtsdestotrotz hat er sich in der Literatur etabliert, im Rahmen von Experimenten im freien Fall wird von „echter Mikrogravitation“ gesprochen. Solche Experimente können beispielweise auf der ISS, in Raketen im Erdorbit, Parabelflügen oder im Bremer Fallturm (vakuumiertes Fallrohr, freier Fall für max. 9,3 Sekunden (99,100)) durchgeführt werden (98). Demgegenüber steht die „simulierte Mikrogravitation“ ($s-\mu g$). Darauf wird in Kapitel 1.3.2 genauer eingegangen.

1.3.1 Pathophysiologische Veränderungen unter Mikrogravitation

Studien zu Organismen, die sich über eine gewisse Zeitdauer im Weltall (echte μg) aufhielten, haben gezeigt, dass es zu Veränderungen in diesen Organismen kommt. Bei Astronauten konnte nachgewiesen werden, dass es bereits nach wenigen Tagen zu pathophysiologischen Veränderungen verschiedener Systeme kommt. Knochen- und Muskelgewebe reduzierten sich (101). Weiterhin konnte eine Umverteilung des Blutvolumens im Körper aufgezeigt werden, was zu einer veränderten Blutdruckregulation führt (102,103). Zusätzlich wird die Funktion des Immunsystems supprimiert (104,105). Mader et al. konnten darüber hinaus Ödeme des Discus nervi optici, eine Verschlechterung der Sehkraft in der Nähe und weitere

Veränderungen am Auge von Astronauten nachweisen, die sich über 6 Monate im Weltall aufgehalten hatten (106).

Auch bei Zellkulturen, die unter echter Mikrogravitation kultiviert wurden, konnten verschiedenste Veränderungen entdeckt werden, sowohl bei somatischen Zellen als auch bei Tumorzellen. Beispielsweise für Knorpel-, Schilddrüsenkarzinom-, Endothel-, und Knochenzellen wurden Veränderungen in Morphologie, im Zytoskelett, der Genexpression, Proteinsynthese und der Zellviabilität nach Aufenthalt im Weltall oder Parabelflügen beschrieben (107–110).

1.3.2 Simulierte Mikrogravitation

Wie vorangehend beschrieben, gibt es mehrere Möglichkeiten, Zellen echter Mikrogravitation auszusetzen. All diese Verfahren haben gemein, dass sie teuer und aufwendig sind oder nur eine sehr kurze Experimentdauer ermöglichen. Daher war es nötig, Verfahren zu entwickeln, die vergleichbare Effekte kostengünstig und über lange Zeiträume auch auf der Erde ermöglichen. Die dafür entwickelten Maschinen werden als Ground-Based-Facilities (GBFs) bezeichnet. Sie simulieren die μg durch ständiges Neuorientieren der Zellposition im Gravitationsfeld (siehe Kapitel 1.3.2.2). Da kein freier Fall, also keine echte μg , erreicht wird, spricht man von „simulierter Mikrogravitation“ ($s\text{-}\mu\text{g}$).

Es liegt eine Vielzahl an Arbeiten vor, die sich mit den Veränderungen in verschiedenen Zelllinien unter simulierter Mikrogravitation befasst haben. Veränderungen konnten unter anderem in der Zell- und Zellverbandmorphologie und im Zytoskelett, bei Proliferation, Migration und Zellzykluskontrolle, Apoptose, Genexpression und Proteinsynthese sowie in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (77,78,111–117). Dagegen ist die Anzahl an Arbeiten zum Verhalten von Lungenkarzinomzellen unter $s\text{-}\mu\text{g}$ bisher sehr begrenzt. Es wurden lediglich Proliferationsrate, Fähigkeit zur Migration, Metastasierungspotential und die Veränderung in der Expression weniger Gene untersucht (117,118).

Hinsichtlich Proliferationsrate und Migrationsfähigkeit liegen Ergebnisse zu verschiedenen Lungenkarzinom-Zelllinien aus drei verschiedenen Arbeiten vor, sowohl für Adeno- als auch für Plattenepithelkarzinome. Insgesamt zeigte sich sowohl für Adenokarzinom- als auch für

Plattenepithelkarzinomzellen eher eine verminderte Proliferationsrate unter Mikrogravitationsbedingungen (117,118). Diese Ergebnisse decken sich mit Studien, die die Proliferationsrate von anderen, unter $s\text{-}\mu\text{g}$ kultivierten Zelllinien untersuchten. Sie beschreiben fast alle eine verminderte Proliferationsrate der Zellen unter simulierter Mikrogravitation im Vergleich zu 1g -Kontrollen (113,114,119). Nur einzelne Zelllinien zeigten keine veränderte Proliferation oder umgekehrte Ergebnisse (91,119).

Weniger eindeutig sind die Ergebnisse bezüglich der Fähigkeit zur Migration von Zellen unter $s\text{-}\mu\text{g}$. Für die gleiche Lungenadenokarzinom-Zelllinie wurde einmal eine reduzierte (117) und zweimal eine erhöhte Migrationsfähigkeit festgestellt, erhöht war ebenfalls die Migrationsfähigkeit der Zellen des Plattenepithelkarzinoms (118,119). Zu anderen Zelllinien gibt es ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Es liegen Studien vor, die eine erhöhte Migration bei unter $s\text{-}\mu\text{g}$ kultivierten Zellen feststellen konnten (120). Dies kann zu einer schnelleren Wundheilung führen, jedoch auch zu erhöhtem metastatischem Potential. Andererseits beschreiben verschiedene andere Arbeiten eine verringerte Fähigkeit der Zellen zur Migration und weisen den Zellen damit ein verringertes Metastasierungspotential zu (115,121,122).

Keine Ergebnisse liegen dagegen bis jetzt für das Lungenkarzinom zu morphologischen Veränderungen oder zu Veränderungen im Zytoskelett vor. Bei vielen anderen Zelllinien konnte jedoch beobachtet werden, dass sich unter $s\text{-}\mu\text{g}$ die in Kapitel 1.2 beschriebenen dreidimensionalen Zellmodelle bilden (123,124). Die Zellen können sich unter Mikrogravitation vom Boden der Zellkulturflaschen ablösen und multizelluläre Sphäroide (MCS) bilden (76). Zusätzlich können jedoch auch Zellen am Boden der Zellkulturflaschen adhärent bleiben (125). Die Sphäroide nehmen dabei, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, verschiedene Formen an und können unterschiedlich groß werden (bis mehrere Millimeter (126)).

Im Zytoskelett fanden sich in mehreren Studien deutliche Unterschiede zwischen den unter simulierter Mikrogravitation kultivierten Zellen und Kontrollzellen. Insbesondere die Verteilung der Filamente des Zytoskeletts (Vimentin, Aktin, Tubulin, Vinculin) in der Zelle veränderte sich. Die bei 1g -Kontrollen vorzufindende geordnete Struktur ging verloren, wobei die höchste Aktin-Filament-Dichte häufig unmittelbar unterhalb der Zellmembran zu finden

war, Tubulin akkumulierte perinukleär (78,114–116). Des Weiteren wurden Löcher im Filamentnetzwerk, eine Verdickung der Filamente und ein verändertes Aufkommen von Stressfasern (Aktin-/Myosinbündel) beschrieben (77,78,122,127). Es liegen Arbeiten vor, die ein erhöhtes Aufkommen an Stressfasern beschreiben (77,78), andere Studien konnten dagegen ein vermindertes Aufkommen feststellen (128,129).

1.3.2.1 Apoptose unter simulierter Mikrogravitation

Simulierte Mikrogravitation beeinflusst die Apoptoserate von Zellen. Dies ist die Erkenntnis mehrerer Studien zu verschiedenen Zelllinien, insbesondere zu Tumorzelllinien (112,116,127,130,131). Gemeinsame Erkenntnis fast aller dieser Studien ist, dass die Apoptoserate durch den Einfluss simulierter Mikrogravitation signifikant erhöht wird. Schilddrüsenkarzinomzellen wiesen unter Gravitationsbedingungen von 1g eine Apoptoserate von 1%, nach Kultivierung auf einem 2D-Clinostat für 24 Stunden von ca. 20,8% auf (127). Bei Brustkrebszellen wurden unter simulierter Mikrogravitation Apoptoseraten von bis zu 13% nachgewiesen (1g = 3 – 4%) (116). Ursächlich für die erhöhten Apoptoseraten sind möglicherweise Veränderungen in der Expression und Synthese von pro- und anti-apoptotischen Genen bzw. Proteinen. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass in Zellen, die unter simulierter Mikrogravitation kultiviert wurden, die Bax/Bcl2-Ratio in Richtung Bax (pro-apoptotisch) verschoben ist (127,131). Zusätzlich war p53 erhöht exprimiert, ebenso wie Caspase 3 (127,131).

1.3.2.2 Anlagen zur Simulation von Mikrogravitation auf der Erde

Die grundsätzliche Idee Mikrogravitation simulierender Anlagen auf der Erde ist es, durch Rotation die Position der Zellen im Raum ständig zu verändern. Dies hat den Effekt, dass sich die Zellen im Verhältnis zur Richtung des Gravitationsvektors fortlaufend neu orientieren, sodass sich der Gravitationsvektor über die Zeit gesehen im Durchschnitt Null annähert (132). Das kann erreicht werden, indem entweder Rotationsgeschwindigkeit oder Rotationsrichtung zufällig verändert werden, beides gilt als gleichwertig (133).

Es sind verschiedene Anlagen zur Simulation von Mikrogravitation auf der Erde entwickelt worden. Dazu gehören der 2D-Clinostat, der Rotating-Well-Vessel-Bioreaktor (RWV) und die Random Positioning Machine (RPM). 2D-Clinostat und RWV rotieren nur um eine Achse, die

RPM rotiert um zwei Achsen. Eine Arbeit von Kraft et al. gibt Grund zu der Annahme, dass die RPM im Vergleich zum 2D-Clinostat Vorteile in der Simulation von Mikrogravitation hat. In der angesprochenen Arbeit wurden die gleichen Experimente sowohl im Weltall als auch auf der RPM und dem 2D-Clinostat durchgeführt. Dabei stimmten die Ergebnisse aus Weltall und RPM gut überein, die des 2D-Clinostat waren jedoch deutlich different (134). Darüber hinaus können Experimente auf 2D-Clinostats aufgrund räumlicher Limitierungen nur über einen kleinen Zeitraum durchgeführt werden (123).

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Experimente mithilfe der Random Positioning Machine durchgeführt, daher wird im Folgenden speziell darauf eingegangen.

Random Positioning Machine

Die Rotation wird bei der RPM mittels zweier Rahmen realisiert, mit denen der Inkubator um zwei voneinander unabhängige Achsen gedreht wird. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde ein RPM-Modus gewählt, der die Rahmen mit gleichbleibender Geschwindigkeit drehte, jedoch die Richtung der Rotation mittels eines Algorithmus zufällig veränderte.

Um die richtige Rotationsgeschwindigkeit der RPM festzulegen, müssen mehrere Dinge beachtet werden. Zum einen wird angenommen, dass der Gravitationsvektor über eine gewisse Zeitspanne in eine Richtung auf eine Zelle einwirken muss, damit sich die Zelle daran adaptieren kann (133). So können sich Zelle und zelluläre Prozesse im Verhältnis zur Gravitation orientieren. Daher ist es nötig, die Rotationsgeschwindigkeit so zu wählen, dass sie schneller ist als die Prozesse, die durch die simulierte Mikrogravitation beeinflusst werden sollen (133). Zum anderen darf sie nicht so schnell gewählt werden, dass die Zentrifugalkraft zu groß wird.

Grund dafür ist, dass Zentrifugalkraft und andere Beschleunigungskräfte, beispielweise während der Änderung der Rotationsrichtung, wichtige Störfaktoren bei der Arbeit mit der Random Positioning Machine sind (133). Die Zentrifugalbeschleunigung beträgt bei mittlerer Befestigung (max. 10 cm vom Zentrum) und angemessener Rotationsgeschwindigkeit bis zu ca. $10^{-2} g$ ($a_{pc} \approx 2.41 \cdot \omega^2 \cdot r$; wobei ω = Rotationsgeschwindigkeit beider Rahmen und r = Distanz vom Rotationsmittelpunkt) (133). Jedoch wird die Zentrifugalbeschleunigung durch die Anwesenheit der Gravitation sogar noch kleiner, sodass Wuest et al. diese für die RPM als vernachlässigbar ansehen (133).

Des Weiteren ist die Bewegung der Flüssigkeit in den Zellkulturflaschen, ausgelöst durch die Rotation, ein zu beachtender Störfaktor bei der Arbeit mit der RPM. Bei Experimenten im Weltall und bei den stationären 1g-Kontrollen finden sich keine Flüssigkeitsbewegungen (135). Die Bewegung der Flüssigkeit führt dazu, dass die Zellen Scherstress ausgesetzt werden, entweder untereinander oder an der Flaschenwand (135). Dies ist für allem bei hoher Rotationsgeschwindigkeit und Richtungswechsel besonders ausgeprägt (133,135). Um diese Störfaktoren und damit deren Auswirkung auf die Zellen so minimal wie möglich zu halten, sollte die Rotationsgeschwindigkeit nicht zu schnell gewählt werden, die Wechsel der Rotationsrichtung möglichst sanft verlaufen und die Zellkulturflaschen so weit wie möglich in der Mitte aller Rotationsachsen befestigt werden. Für Säugetierzellen wurde eine Rotationsgeschwindigkeit von 60 deg/s für die RPM als angemessen beschrieben (132). Diese Geschwindigkeit wurde daraufhin für die nachfolgenden Experimente auf der RPM gewählt.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die für andere Zelllinien bereits beschriebenen Veränderungen unter simulierter Mikrogravitation auch für das Plattenepithelkarzinom der Lunge nachzuweisen. Es wurde der Einfluss der durch die RPM geschaffenen Bedingungen über verschiedene Zeiträume auf die Morphologie von Zelle und Zytoskelett, Genexpression, Proteinsynthese und Apoptoserate untersucht. Von besonderem Interesse war die Frage, ob und nach welchem Zeitraum sich beim Plattenepithelkarzinom der Lunge Sphäroide bilden, wenn die Zellen simulierter Mikrogravitation ausgesetzt werden. Zusammenfassend wurden folgende Hypothesen überprüft:

- 1) Plattenepitheliale Lungenkarzinomzellen bilden Sphäroide, wenn sie simulierter Mikrogravitation ausgesetzt werden.
- 2) Durch den Einfluss simulierter Mikrogravitation kommt es zu einem Verlust der linearen Anordnung von F-Aktin-Fasern und zu einer submembranösen Akkumulation.
- 3) Durch den Einfluss simulierter Mikrogravitation kommt es zu Veränderungen in der Genexpression und Proteinsynthese.
- 4) Durch den Einfluss simulierter Mikrogravitation kommt es zu einer gesteigerten Apoptoserate.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Die verwendeten Lungenkarzinomzellen waren humane Karzinomzellen eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms vom Typ Plattenepithelkarzinom. Sie wurden von einem männlichen, 54-jährigen Spender bereitgestellt. Die Zelllinie H1703 mit der Typbezeichnung ATCC® CRL-5889™ wurde von der Firma American Type Culture Collection (ATCC) mit Firmensitz in Manassas, Virginia, USA bezogen.

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Aqua Poly/Mount Coverslipping Medium	Polysciences, Eppelheim
Clarity™ Western ECL Substrat Reagenz A + Reagenz B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Destilliertes Wasser (Aqua)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Dimethylsulfoxid für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's Phosphat Gepufferte Salzlösung (DPBS), kein Magnesium, kein Phosphat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol 70%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Ethanol 96%, 99,99%	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
F-12 Nutrient Mixture (Ham)+L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
First Strand cDNA Synthese Kit: <i>M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/μL)</i> <i>RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)</i> <i>5X Reaction Buffer (Zusammensetzung siehe unten)</i> <i>10mM dNTP Mix</i> <i>Oligo(dT)18 Primer 100 μM, 0.5 μg/μL (15 A260 U/mL)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Random Hexamer Primer 100 μM, 0.2 μg/μL

(6 A260 U/mL)

Vorwärts GAPDH Primer, 10 μM

(5' – CAAGGTCATCCATGACAACCTTG – 3')

Rückwärts GAPDH Primer, 10 μM

(5' – GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3')

Kontroll-GAPDH RNA 1.3 kb (3'-poly(A)

tailed RNA transcript, 0.05 μg/μL)

RNase-freies Wasser

Formaldehyd-Lösung 4%, neutral gepuffert Otto Fischar GmbH&Co. KG, Saarbrücken

Fötales Bovines Serum Biochrom GmbH, Berlin

Laemmli Puffer (2x) Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Laufpuffer 10x Tris, Glycine, SDS Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Methanol Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

Mini Protease Inhibitor Cocktail F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz

(cOmplete™)

Penicillin/Streptomycin Biochrom GmbH, Berlin

Phosphatase Inhibitor (PhosStop™) F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz

Proteinstandard PageRuler™ Prestained Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Protein Ladder

Proteinstandard Precision Plus Protein Bio-Rad Laboratories GmbH, München

WesternC Standard

RIPA-Puffer Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

RNeasy Mini Kit (50): Qiagen, Hilden

Puffer RTL

Puffer RW1

Puffer RPE

RNase-freies Wasser

Roti®-Quant universal Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

Skim Milk Powder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

β-Mercaptoethanol (99%) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

SYBR Green PCR Master Mix Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tris Buffered Saline (TBS, 10x)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
(<i>t</i> -Octylphenoxyethoxyethanol)	
Trypsin-EDTA 0,05%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween 20	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wasser für die Molekularbiologie	Millipore, Darmstadt
Phalloidin	PromoCell GmbH, Heidelberg

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well Mikrotiterplatte (MicroAmp [®] Fast Optical)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
CoverSlips (Deckgläschen)	Chance Glass Ltd., Malvern Link, England
Cryoröhrchen, mit Außengewinde (2 ml)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Culture Slides	Corning Inc., Corning, USA
Einmalhandschuhe Peha-Soft (versch. Größen)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Klebeband	Tesa SE, Norderstedt
MicroAmp [™] Clear Adhesive Film	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
MiniProtean [®] TGX [™] Stainfree Gele, 10 oder 15 Taschen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Neubauer Zählkammer (C-Chip)	NanoEnTek, Seoul, Korea
Optical Adhesive Films (MicroAmp [®])	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pipette (100-1000 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipette (Eppendorf Research, 0,5-10 µl, 10-100 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (0,1-10 µl und 1-100 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	Corning Inc., Corning, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen (5 ml)	Corning Inc., Corning, USA

Sammelröhrchen (2 ml)	Qiagen, Hilden
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
SlideFlasks	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transfer Pack	
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Corning Inc., Corning, USA
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugiersäule	Qiagen, Hilden

2.1.4 TUNEL-Assay

Das Kit für die TUNEL-Färbung „TUNEL TACS 2TdT“ wurde von der Firma Trevigen Inc., Gaithersburg, USA bezogen.

Proteinase K Lösung

50 µl	Molekulares Wasser
1µl	Proteinase K

1X TdT Puffer

45ml	destilliertes Wasser
5ml	10X TdT Puffer

TdT-Reaction Mix

1µl	TdT dNTP
1µl	50X Co ²⁺
1µl	TdT Enzym
50µl	1X TdT Puffer

1X TdT Stop Puffer

45ml	Destilliertes Wasser
5ml	10X TdT Stop Puffer

Cytonin

Strep-Fluor Lösung

200µl	1X PBST
1µl	Strep-Fluoreszin

2.1.5 Primer für die RT-qPCR

Die Primer wurden aus der Havard Primer Database ausgewählt. Alle Primer wurden hergestellt von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin.

	Primer	Sequenz
<i>ACTB</i>	<i>ACTB</i> Fwd.	5' GTCTGCCTTGGTAGTGGATAATG3'
	<i>ACTB</i> Rev.	5' TCGAGGACGCCCTATCATGG 3'
<i>AKT3</i>	<i>AKT3</i> Fwd.	5'TGTGGATTTACCTTATCCCCTCA3'
	<i>Akt3</i> Rev.	5'GTTTGGCTTTGGTCGTTCTGT3'
<i>CDKN2A</i>	<i>CDKN2A</i> Fwd.	5'GATCCAGGTGGGTAGAAGGTC3'
	<i>CDKN2A</i> Rev.	5'CCCCTGCAAACCTTCGTCCT3'
<i>EEF1A1</i>	<i>EEF1A1</i> Fwd.	5'TGTCGTCATTGGACACGTAGA3'
	<i>EEF1A1</i> Rev.	5'ACGCTCAGCTTTCAGTTTATCC3'
<i>NFE2L2</i>	<i>NFE2L2</i> Fwd.	5'TCAGCGACGGAAAGAGTATGA3'
	<i>NFE2L2</i> Rev.	5'CCACTGGTTTCTGACTGGATGT3'
<i>PIK3CA</i>	<i>PIK3CA</i> Fwd.	5'CCACGACCATCATCAGGTGAA3'
	<i>PIK3CA</i> Rev.	5'CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT3'
<i>PTEN</i>	<i>PTEN</i> Fwd.	5'TGGATTCGACTTAGACTTGACCT3'
	<i>PTEN</i> Rev.	5'GGTGGGTTATGGTCTTCAAAGG3'

<i>RB1</i>	<i>Rb1 Fwd.</i>	5'CTCTCGTCAGGCTTGAGTTTG3'
	<i>Rb1 Rev.</i>	5'GACATCTCATCTAGGTCAACTGC3'
<i>SOX2</i>	<i>SOX2 Fwd.</i>	5'TGGACAGTTACGCGCACAT3'
	<i>SOX2 Rev.</i>	5'CGAGTAGGACATGCTGTAGGT3'
<i>TP53</i>	<i>TP53 Fwd.</i>	5'CAGCACATGACGGAGGTTGT3'
	<i>TP53 Rev.</i>	5'TCATCCAAATACTCCACACGC3'

2.1.6 Antikörper für WesternBlot

Primärantikörper	Bestellnummer	Konzentration	Hersteller
p14 (CDKN2A)	sc-53639	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
p53	sc-126		
PTEN	sc-7974		
pRb1	sc-73598		
SOX2	sc-398254		

Sekundärantikörper	Bestellnummer	Konzentration	Hersteller
m-IgGκ HRP Anti-Mouse	sc-516102	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA

2.1.7 Geräte

Gerät

ABI 7500 Fast Real-Time PCR System
Axio Imager 2, Fluoreszenzmikroskop
AxioCam MRm
ChemiDoc™ XRS+ System
Gefrierschrank

Hersteller

Applied Biosystems, Waltham, USA
Carl Zeiss AG, Jena
Carl Zeiss AG, Jena
Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Liebherr, Biberach an der Riß

Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heraeus Zellschrank	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Kamera DiMage 7i	Konica Minolta, Langenhagen
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riß
Kühlschrank	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
Küvette	Hellma, Müllheim
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena
Photometer Ultrospec 2100 pro	Biochrom Ltd., Cambridge, England
Pipettierhelfer Accupipex	Glaswarenfabrik Karl-Hecht GmbH, Sondheim vor der Rhön
Präzisionswaage CP224S	Sartorius AG, Göttingen
Random Positioning Machine (RPM)	Fachhochschule Nordwestschweiz, Schweiz
Sicherheitswerkbank (Clean Bench)	NuAire, Plymouth, USA
Spektrales Konfokalmikroskop TCS SPE	Leica Camera AG, Wetzlar
Spektrophotometer SpectraMax M2	Molecular Devices, LLC, Kalifornien, USA
Tischabzug	Prutscher Laboratory Systems, Neudörfel, Österreich
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortexer TTS 2	IKA-Werke GmbH & CO.KG, Staufen
Wasserbad 25°C-100°C	Labortechnik Medingen, Arnsdorf
Zentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

Random Positioning Machine (RPM)

Die zur Durchführung der Experimente verwendete Random Positioning Machine wurde von der Fachhochschule Nordwestschweiz gebaut. Sie besteht aus einem in zentraler Position befestigten Inkubator (Abb. 2, 1). In diesem wurden während der Experimente die gleichen Verhältnisse aufrechterhalten wie im stationären Schrankinkubator (Temperatur 37,9°C; CO₂ 4,8%). Der Inkubator ist an einem inneren Rahmen befestigt (Abb. 2, 2), welcher um eine Achse in Längsrichtung des Inkubators gedreht werden kann. Der innere Rahmen wiederum ist an einem äußeren Rahmen befestigt (Abb.2, 3), dieser dreht sich um eine orthogonal zu innerem Rahmen und Inkubator stehenden Achse. Dementsprechend wurde der Inkubator immer um zwei Achsen gedreht. Die Bewegung der Rahmen wird von einem

vorprogrammierten Algorithmus zufällig gesteuert. Die RPM ist mit einem Computer inklusive Monitor verbunden (Abb. 2, 4), über den alle Vorgänge gesteuert und Messwerte überwacht werden können.

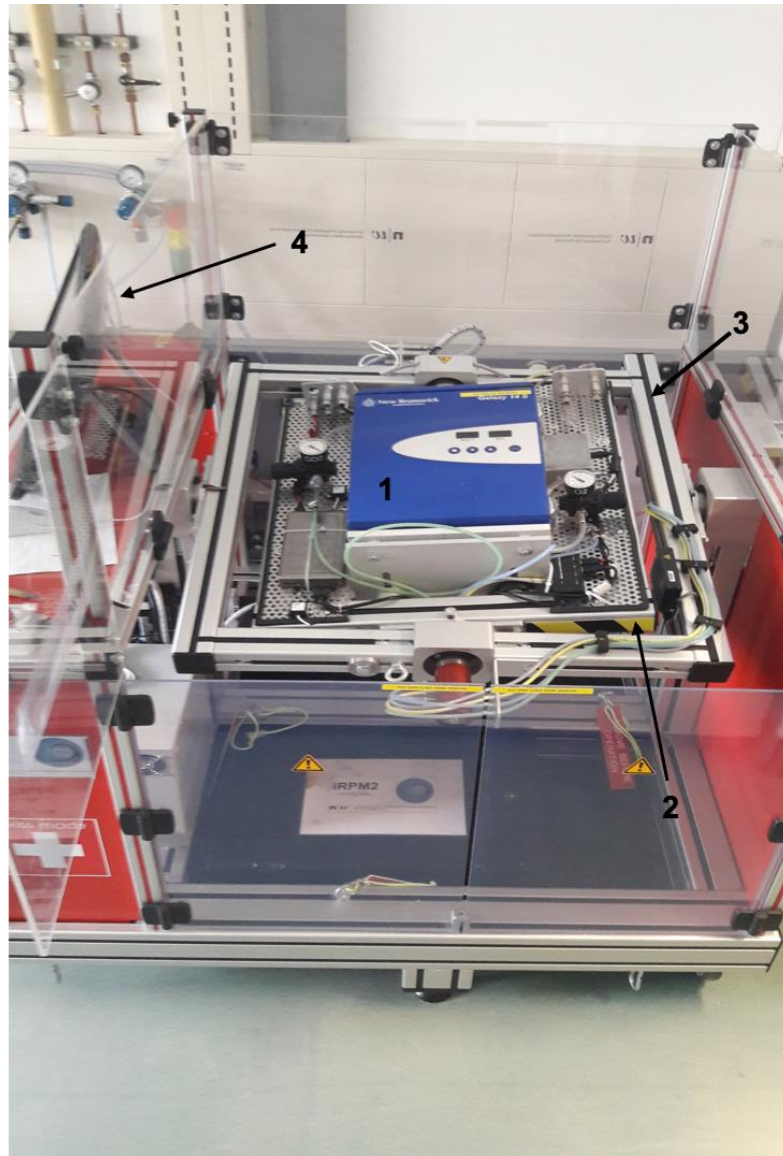


Abbildung 2 Random Positioning Machine

Random Positioning Machine mit Inkubator (1), innerem Rahmen (2), äußeren Rahmen (3) und Computer mit Monitor (4) zur Steuerung und Überwachung der RPM.

2.1.8 Software

Software	Entwickler
AxioVs40	Carl Zeiss, Jena
High Resolution Melt (HRM) Software	Applied Biosystems, Waltham, USA
Image Lab™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
LAS AF SPE Basis-Software	Leica Camera AG, Wetzlar
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SPSS Statistics (Version 24.0)	IBM, Armonk, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Auftauen der Zellkultur

Vorbereitung

Als Basis für das Kulturmedium zur Kultivierung der Zellen wurde F-12 Nutrient Mixture genutzt. Zu den 500ml F12-Mixture wurden 50ml fetales Rinder Serum (10%) und 5ml Penicillin/Streptomycin (1%) gegeben, um ein für das Wachstum der Zellen nutzbares Kulturmedium zu erhalten. Davon wurden 20ml in eine 250ml-Kulturflasche (T-75) pipettiert.

Durchführung

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank (-170°C) entnommen und im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis die Zellkultur aufgetaut war. Das gesamte Volumen wurde in ein mit 10ml Kulturmedium gefüllten 15ml Falcontube pipettiert und 3 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet mit 2ml Kulturmedium resuspendiert. Dann wurde das gesamte Volumen in die mit Medium vorbereitete Kulturflasche geben. Die Kultivierung fand in einem Schrankinkubator (Einstellungen: Temperatur 37,9°C; CO₂ 4,8%) statt.

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Das Medium aus den Zellkulturflaschen wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt, um eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu garantieren. Dazu wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen abpipettiert, die Zellkulturflasche mit 20ml DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) gewaschen und dann 20ml frisches Kulturmedium in die Flaschen pipettiert.

2.2.3 Passagieren der Zellen

Bei hoher Konfluenz der Zellen in der Kulturflasche (80-100 %) wurden die Zellen gesplittet und auf mehrere neue Kulturflaschen verteilt. Dazu wurde das alte Kulturmedium dekantiert und die Flaschen mit 20ml DPBS gewaschen. Dann wurde 4ml Trypsin-EDTA 0,05% in jede Flasche gegeben. Nach 10-12 Minuten im Inkubator wurden die Zellkulturen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, ob alle Zellen abgelöst sind. Danach wurde das Trypsin mit 6ml Kulturmedium abgeblockt und die Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

2.2.4 Einfrieren von Zellkulturen

Vorbereitung

Als Frostschutzmittel wurde DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) genutzt. Dies wurde zu Anfang mit Kulturmedium verdünnt, sodass eine 10%-Lösung entstand.

Durchführung

Bei hoher Konfluenz der Zellen wurde das alte Kulturmedium abpipettiert und die Zellkulturflaschen mit 20ml DPBS gewaschen. Danach wurden 4ml Trypsin-EDTA 0,05% in die Flaschen pipettiert und die Flaschen in den Inkubator gestellt. Nachdem alle Zellen vom Boden abgelöst waren, wurde das Trypsin mit 6ml Kulturmedium abgeblockt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in 15ml Falcontubes übertragen und für 3 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen in 3ml 10%-DMSO/Kulturmedium-Verdünnung resuspendiert. Je 1,5ml der Zellsuspension wurden in Gefrierföhrchen übertragen und bei -20°C gelagert. Nach 2 Stunden wurden die Gefrierföhrchen in einen -80°C-Schrank umgelagert und über Nacht dort aufbewahrt. Am jeweils nächsten Tag erfolgte ein erneutes Umlagern in den Stickstofftank (-170°C).

2.2.5 Bestückung der RPM

In Vorbereitung für die Experimente auf der RPM wurden die Zellkulturen in T25- oder T75-Kulturflaschen bzw. SlideFlaks mit einer Dichte von 100.000 Zellen/cm² übertragen und kultiviert, bis eine Konfluenz von 70-80% erreicht war. Dann wurden alle Kulturflaschen luftblasenfrei mit Kulturmedium gefüllt, um Scherkräfte zu minimieren. Um die Dichtigkeit der Flaschen zu gewährleisten, wurden die Deckel mit Parafilm abgeklebt. Die Flaschen wurden

mittig am Inkubatorgestell der RPM mit Klebeband fixiert und die RPM mit standardisierten Einstellungen gestartet (*Random Walk*, 60°/s).

2.2.6 Untersuchung der Zellen unter dem Durchlichtmikroskop

Um die mögliche Bildung von Sphäroiden unter RPM-Bedingungen nachweisen und die optimale Dauer des Experiments abschätzen zu können, wurden die Zellen direkt in den Kulturflaschen nach jeweils 24, 48, 72 und 96 Stunden unter RPM- bzw. Kontrollbedingungen mit Hilfe des Durchlichtmikroskops untersucht und die Morphologie verglichen.

2.2.7 Anfärben von Aktinfilamenten mit Phalloidin

Vorbereitung

Die zu färbenden Zellen wurden in SlideFlasks (Grundfläche 5cmx2cm) überführt. Sobald eine Konfluenz von 70 - 80% erreicht war, wurde die Hälfte der SlideFlasks in die RPM gestellt (Vorbereitung wie oben unter Kapitel 2.2.5 beschrieben) und der RPM-Lauf wurde gestartet. Die andere Hälfte verblieb als Kontrolle im Inkubator unter 1g-Bedingungen.

Vor dem Färbeprozess wurden als erstes die korrekten Konzentrationen der für die Färbung benötigten Reagenzien hergestellt. Für 10ml einer 1%-Triton-X-100-Lösung wurden 100µL Triton-X und 9,9ml PBS in einen 15ml Messzylinder pipettiert. Danach wurden 0,5g bovines Serum Albumin (BSA) abgewogen und in 49,5ml PBS aufgelöst, um eine 1% BSA-Lösung zu erhalten. Am nächsten Tag wurde das Phalloidin zuerst in Methanol zu einer Stocklösung verdünnt. Dazu wurden 300 Units (10nmol) Phalloidin zu 1,5ml Methanol pipettiert, sodass eine Konzentration von 200 Units/ml entstand. Dies entsprach 6,667µM. Zur anschließenden Herstellung einer Arbeitslösung aus der Stocklösung wurden 40µL der Stocklösung in 1,6ml PBS verdünnt. Als letztes wurde 1µl DAPI (für die Kernfärbung) in 50ml PBS verdünnt. DAPI lag vor Verdünnung in einer Konzentration von 5mg/ml vor, sodass eine Konzentration von 0,1µg/ml entstand.

Durchführung

Die SlideFlasks aus der RPM wurden zunächst für 15 Minuten stehen gelassen, damit sich die entstandenen Sphäroide am Boden absetzen konnten. Dann wurde aus allen Flaschen (auch Kontrollgruppe) vorsichtig das Kulturmedium abpipettiert. Die Kammer, welche auf dem

Boden (\triangleq Objektträger) festgeklebt war, wurde mit einem dazu passenden Hebel abgehelt. Alle folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer (Glasschale mit Deckel und ausgelegt mit feuchten Tüchern) durchgeführt, um ein Austrocknen der Objektträger zu verhindern.

Die Zellen wurden mit 1ml 4% Formaldehyd-Lösung pro Objektträger für 10 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit je 1ml PBS für jeweils fünf Minuten gewaschen. Zum Permeabilisieren der Zellen wurde 1ml der 1%-Triton-X-Lösung auf jeden Objektträger pipettiert und für vier Minuten dort belassen. Nach Entfernung des Tritons wurden die Objektträger erneut dreimal mit je 1ml PBS für 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit je 2ml der 1%-BSA-Lösung geblockt und über Nacht in der feuchten Kammer im Kühlschrank (4°C) stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde als erstes das BSA mit 1ml PBS abgewaschen und dann die Zellen mit 300 μ l der Phalloidin-Arbeitslösung bedeckt. Nach 30 Minuten wurden die Objektträger nochmals zweimal mit je 1ml PBS gewaschen und die Zellen wurden im Anschluss mit je 300 μ l DAPI für 1 Minute bedeckt. Danach wurden die Zellen mit je 1ml PBS gewaschen und die Objektträger mit einem Tropfen Aqua Poly/Mount und einem Deckglas bedeckt. Dabei wurde darauf geachtet, dass unter dem Deckglas keine Luftblasen zurückblieben. Die Färbung wurde sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch unter dem Konfokalmikroskop ausgewertet und es wurden Bilder aufgenommen.

2.2.8 Nachweis von apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Methode

Der Nachweis von apoptotischen Zellen mit Hilfe der TUNEL-Methode wurde erstmals 1992 von Gavrieli et al. beschrieben (136). Während des Apoptosevorgangs wird die DNA von spezifischen DNasen in Fragmente einer Länge von 180-185 bp gespalten. Am 3'-OH-Ende dieser Fragmente kann die Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) fluoreszenzmarkierte Nukleotide anhängen und die apoptotischen Zellen können unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Vorbereitung

In einem ersten Schritt wurden die Zellen in Culture Slides kultiviert, bis eine Konfluenz von 70-80% erreicht war. Die Culture Slides wurden dann luftblasenfrei mit Kulturmedium gefüllt und der Deckel mit Parafilm abgedichtet. Die Hälfte der Slides wurde in der RPM befestigt, die

andere Hälfte im Inkubator unter 1g-Bedingungen belassen. Nach 24h und 72h wurden Culture Slides aus der RPM entnommen. Um Sphäroide und adhärenente Zellen später differenzieren zu können, wurde der Überstand aus den in der RPM kultivierten Culture Slides in ein 50ml Zentrifugierröhrchen übertragen und schonend zentrifugiert (500 rpm). Der Überstand wurde abpipettiert und das entstandene Zellpellet mit 700µl Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen Objektträger pipettiert und leicht antrocknen gelassen. In der Kontrollgruppe wurde das Medium aus den Slides verworfen. Folgend wurden die verschiedenen Zellgruppen ebenso wie die entsprechende Kontrolle mittels des „TACS® 2 TdT-Fluor in Situ Apoptosis Detection Kit“ (Trevigen) gefärbt.

Durchführung der Färbung

Die die adhärenenten Zellen tragenden Culture Slides und die der Kontrolle wurden zuerst einmalig mit 1x PBS gewaschen und im Anschluss alle Zellkulturen (Kontrolle, Adhärenente, Sphäroide) mit 1ml 4% Formaldehyd für 10 Minuten fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellkulturen für 10 Minuten in 1ml 1xPBS gewaschen und die Gehäuse aller Culture Slides entfernt, sodass nur die Objektträger zur weiteren Verwendung vorlagen. Ab diesem Schritt wurden alle weiteren Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt, um das Austrocknen der Zellmonolayer auf den Objektträgern zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit je 100µl Proteinase K-Lösung (für die Zusammensetzung aller Lösungen siehe Kapitel 2.1.4) für 20 Minuten bedeckt. Nach zwei weiteren Waschkvorgängen mit destilliertem Wasser wurden die Proben mit je 1ml 1x TdT Puffer für den nächsten Schritt vorbereitet. Nach 5 Minuten wurde der Puffer abpipettiert, auf jeden Objektträger 100µl des TdT-Reaction-Mix gegeben und die Zellkulturen für 70 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mit TdT-Stop-Puffer beendet, welcher nach fünf Minuten in zwei Waschkvorgängen (je 1 Minute) mit 1 ml 1xPBS wieder abgewaschen wurde. Daraufhin wurde auf jede Probe 200µl Strep-Fluor Lösung pipettiert und für 30 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Slides erneut mit je 1ml 1xPBS für 1 Minute gewaschen. Dann folgte die DAPI-Färbung. Dazu wurde 1µl DAPI (5mg/ml) in 50ml 1x PBS verdünnt, von dieser Verdünnung je 1ml auf jeden Objektträger gegeben und nach einer Minute mit 1ml destilliertem Wasser abgewaschen. In einem letzten Schritt wurde ein Tropfen Aqua PolyMount auf die Objektträger gegeben und diese luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt.

Auswertung

Zum Vergleich der Apoptoseraten der Zellen aus der Kontrollgruppe und den adhären Zellen bzw. den Sphäroiden wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop zehn Gesichtsfelder bei einer 100-fachen Vergrößerung als Bild aufgenommen. Passend dazu wurden auch immer die exakt gleichen Bilder der DAPI-Färbung aufgenommen, mithilfe derer die Gesamtanzahl der Zellen im jeweiligen Gesichtsfeld ermittelt wurde. Die Anzahl der durch die TUNEL-Färbung angefärbten, also apoptotischen, Zellen wurde ins Verhältnis zur Gesamtanzahl an Zellen gesetzt und für die zehn Gesichtsfelder Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Kontrollen

Um sicherzustellen, dass die Permeabilisation der Zellen als Voraussetzung für die Färbung erfolgreich war und als Kontrolle für die Auswertung der Färbung wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle angefertigt. Dazu wurden Zellen 24 Stunden vor der Färbung auf zwei Culture Slides kultiviert. Die Negativkontrolle wurde ohne weitere Behandlung wie oben beschrieben mit dem TUNEL-Assay gefärbt. Zur Herstellung der Positivkontrolle wurde TACS-Nuclease™ verwendet, um DNA-Brüche in allen Zellen zu erzeugen. Dazu musste als Vorbereitung die TACS-Nuclease™ 1:50 in TACS-Nuclease™-Puffer zu einer Arbeitslösung verdünnt werden. Die Positivkontrolle wurde dann ebenfalls im ersten Schritt mit Formaldehyd 4% fixiert, mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 100 µl Proteinase-K-Lösung für 20 Minuten bedeckt. Nach einem anschließenden Waschen mit 1 ml 1xPBS wurden die Zellen für 45 Minuten in 1 ml der TACS-Nuclease™-Arbeitslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Culture Slides mit 1xPBS schlossen sich die oben genannten weiteren Schritte der TUNEL-Färbung ab Zugabe des TdT-Puffers an.

2.2.9 Quantifizierung der Genexpression mittels RT-qPCR

Es wurde die Expression der folgenden Gene mittels der RT-qPCR untersucht:

Tumorsuppressorgen

CDKN2A

PTEN

RB1

TP53

Protoonkogen

AKT3

NFE2L2

PIK3CA

SOX2

Tabelle 1 Auflistung der mittels RT-qPCR untersuchten Gene

2.2.9.1 Extraktion von RNA

Die Methode der RNA-Extraktion mit dem RNeasy Mini Kit basiert auf der Entwicklung der Single-Step-Methode von Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi (1987) (137). Hierbei wird Guanidiumthiocyanat zur Lyse der Zellen und in Kombination mit β -Mercaptoethanol zur Hemmung der RNasen genutzt. Zusätzlich beteiligt sind Phenol und Chloroform zur Phasentrennung. Mittels Ethanol wird die von DNA und Proteinen getrennte RNA an die Silicagel-Membran gebunden und kann mittels DEPC-Wasser abgelöst werden.

Vorbereitung

In Vorbereitung auf die folgenden Schritte wurden 10 ml RLT-Puffer mit 100 μ l β -Mercaptoethanol (10 μ l pro 1 ml Puffer) versetzt, um die Aktivität von RNasen zu unterdrücken. Darüber hinaus wurde der RPE-Puffer mit Ethanol 96% verdünnt (11 ml RPE und 44 ml Ethanol 96%).

Durchführung

Nach 72 Stunden wurde die RPM gestoppt und es wurden Zellpellets für die RNA-Extraktion und den Proteinnachweis (siehe Kapitel 2.2.10) gewonnen. Dazu wurde der Überstand aus den Kulturflaschen (mit den Sphäroiden) aus der RPM in 50ml-Falcontubes überführt und diese für 2 Minuten zentrifugiert (1300rpm). Der Überstand aus den Kontrollflaschen wurde verworfen und sowohl die adhärennten Zellen der Kontrollgruppe als auch die aus der RPM wurden je nach Flaschengröße mittels 2 oder 4 ml Trypsin-EDTA 0,05% vom Boden abgelöst. Nachdem die Zellen in Lösung waren, wurde das Trypsin mit 4ml bzw. 6 ml Kulturmedium abgeblockt und die Zellsuspensionen ebenfalls 2 Minuten bei 1300rpm zentrifugiert. Die Überstände aller Falcontubes wurden dekantiert und die Zellpellets vorsichtig in 2ml-Eppendorf-Gefäße überführt. Ein Teil der Zellpellets wurde bei -150°C zum späteren Proteinnachweis weggefroren.

Die Zellpellets zur RNA-Extraktion wurden in mehreren Waschschritten lysiert und die RNA gereinigt. Zuerst wurden die Proben mit 350 μ l RLT-Puffer (+ β -Mercaptoethanol) und 350 μ l Ethanol 70% resuspendiert und 700 μ l von der Suspension in eine Zentrifugier-Säule (RNeasy Mini Spin Column) pipettiert. Die Säule wurde in ein 2ml Sammelröhrchen eingesetzt und dann bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Danach wurde 700 μ l RW1-Puffer auf die Proben gegeben und 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Folgend wurde in zwei

Schritten nacheinander jeweils 500 µl RPE-Puffer (verdünnt mit Ethanol 96%) in die Säule pipettiert und im ersten Schritt 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, im zweiten Schritt dann 2 Minuten bei 10.000 rpm. Dies war nötig, um die Membran zu trocknen. Nachfolgend wurde die an die Membran gebundene und gereinigte RNA eluiert. Dazu wurden alle Säulen in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß eingesetzt und 30 µl RNase freies Wasser (DEPC-Wasser) hinzugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert (10.000 rpm, 1 Minute) und der Inhalt der Sammelröhrchen nochmals in die Säule pipettiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen. Der Durchfluss im Sammelröhrchen mit der RNA wurde sofort bei -150°C weggefroren.

2.2.9.2 Messen der RNA-Konzentration

Zur Vorbereitung für die PCR wurde die RNA-Konzentration gemessen, damit in der PCR mit gleichen RNA-Ausgangsmengen gearbeitet werden konnte. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Photometer (Ultrospec 2100 pro) gemessen. Dazu wurde zuerst eine 1:50 Verdünnung der RNA-Probe hergestellt. 2 µl der RNA-Probe wurden in die Messküvette zu 98 µl Wasser pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 100 µL entstand. Die Küvette wurde in den Strahlengang des Photometers gestellt und die Konzentration bei den folgenden Einstellungen gemessen:

Schichtdicke: 10 mm

Einheiten: µg/µl

320nm Korrektur: Ja

Spektrum Optionen: Aus

Verdünnungsfaktor: 50

Die Extinktion wurde bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Die zur RNA-Konzentrationsbestimmung entscheidende Extinktion war 260 nm, da RNA Licht der Wellenlänge 260 nm absorbiert. Die Extinktionen bei den anderen Wellenlängen wurden zur Bestimmung der Reinheit der Probe mittels 260/280- und 260/230-Quotient bestimmt. Um die Reinheit der Proben zu bestätigen, sollte der 260/280-Quotient über 1,6 liegen, der 260/230-Quotient über 2,0.

2.2.9.3 Synthese von cDNA

Die cDNA wurde mit Hilfe des First Strand cDNA Synthesis Kit synthetisiert.

In Vorbereitung auf die Herstellung der cDNA wurde der dafür benötigte Master Mix aus verschiedenen Reagenzien hergestellt. Dazu wurden 20 x 1 µl eines Random Hexamer Primers, 20 x 4 µl 5x-Reaktions-Puffer, 20 x 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 20 x 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 20 x 2 µl M-MuLV Reverse Transcriptase in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 200 µl vorlag. Alle Reagenzien wurden 20fach vorgegeben, da 18 Proben pipettiert werden mussten. Um in den folgenden Schritten der cDNA-Synthese mit gleichen RNA-Mengen arbeiten zu können, wurden die RNA-Proben gemäß der gemessenen Konzentrationen verdünnt. Dazu wurde in jedes der 18 Well (96-Well-Mikrotiterplatte) so viel µl der RNA-Probe pipettiert, dass 1 µg RNA vorlag, der Rest zum Gesamtvolumen von 10 µl wurde mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Dazu wurden 9 µl des hergestellten MasterMixes gegeben und die Platte wurde nach nachfolgendem Schema inkubiert (cDNA-Synthese Template):

5 Minuten bei 25°C



60 Minuten bei 42°C

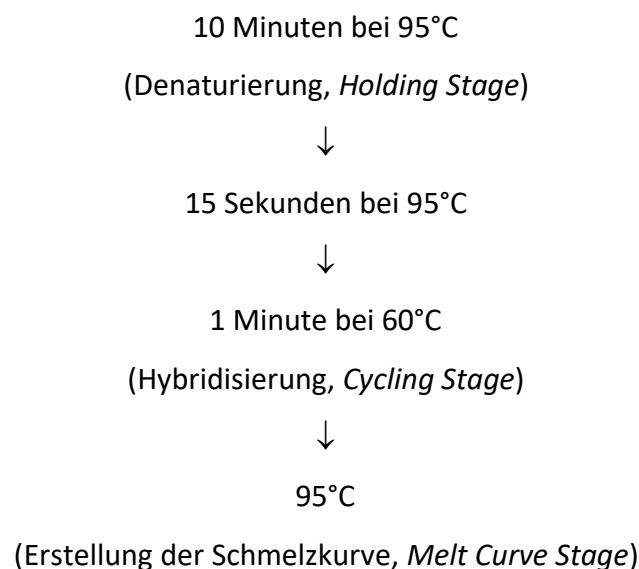


5 Minuten bei 70°C

2.2.9.4 Quantitative RealTime-PCR (RT-qPCR)

Die RT-qPCR wurde mit Hilfe des SYBR-Green-PCR-MasterMixes durchgeführt. Die SYBR-Green-basierte RT-qPCR beruht auf dem Prinzip, dass SYBR-Green nur mit doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert und nur bei Bindung stark fluoresziert. Dementsprechend ist die Fluoreszenz umso stärker, je mehr doppelsträngiges Produkt im PCR-Ansatz vorhanden ist. Die Zunahme des Produkts kann so über die Zeit verfolgt werden. Die Ausgangsmenge des Produkts entscheidet also, wie viele PCR-Zyklen nötig sind, um einen Cut-Off-Wert (C_T -Wert) der Fluoreszenz zu erreichen. Da SYBR-Green unspezifisch cDNA bindet, ist eine an die PCR angeschlossene Bestimmung der Schmelzkurve nötig, um darzustellen, dass nur ein Produkt synthetisiert wurde (138).

Die verwendeten Primer (siehe Kapitel 2.1.5) wurden zu einer Konzentration von 100 μM verdünnt. Dazu wurde zu jedem Primer 50 μl RNase-freies Wasser (Millipore) gegeben. Der für die PCR benötigte Mastermix wurde für jedes Gen für 18 Proben (6x Kontrolle, 6x adhärenente Zellen, 6x Sphäroide) hergestellt. Es wurden 428 μl SYBR-Green PCR MasterMix, 2,6 μl Forward Primer, 2,6 μl Reverse Primer und 365 μl RNase-freies Wasser (Gesamtvolumen= 798,2 μl) in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Davon wurden jeweils 42 μl in 18 2ml-Eppendorf-Gefäße verteilt und dazu je 3 μl cDNA der 18 Proben gegeben. Die Mischungen wurden je 3mal (je 13 μl) auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert, sodass 54 Wells befüllt waren. Die Platte wurde mit einer transparenten Abdeckfolie versiegelt und anschließend in die PCR-Maschine eingelegt. Der Ablauf der PCR wurde wie folgt gewählt:



Dieser Zyklus wurde 45mal wiederholt. Um die RNA-Menge quantifizieren zu können, wurde die komparative C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$) genutzt. Als House-Keeping-Gene wurden *EEF1A1* und *ACTB* verwendet.

Aus den in der PCR ermittelten Werten (jeweils 3 Werte pro Probe) wurden die Mittelwerte errechnet und diese dann wie oben beschrieben anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode in Bezug auf das House-Keeping Gen *EEF1A1* verrechnet. Die bestimmten Faktoren wurden für Kontrolle, Sphäroide und adhärenente Zellen jeweils wieder gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

2.2.10 Semiquantitative Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese und WesternBlot

2.2.10.1 Gewinnung von Zellen und Extraktion von Proteinen

Die Zellkulturflaschen wurden wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben vorbereitet und in die RPM gestellt. Nach 72 Stunden wurde die RPM gestoppt und es wurden Zellpellets für den Proteinnachweis gewonnen (siehe 2.2.9.1, „Durchführung“). Diese wurden sofort bei -150°C weggefroren für die Proteinanalyse.

Zur Isolierung der Proteine aus den eingefrorenen Zellpellets wurden diese aus dem Gefrierschrank entnommen und nach dem Auftauen mit Lyse-Puffer lysiert. Der Lysepuffer wurde aus 20 ml RIPA-Puffer, zwei Tabletten Protease-Puffer (cOmplete™) und zwei Tabletten Phosphatase-Inhibitor hergestellt. In jedes, die Zellpellets enthaltende, Eppendorfgefäß wurde 400 µl Lysepuffer pipettiert, die Pellets mithilfe der Pipette aufgelöst und im Anschluss wurden die Suspensionen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Folgend wurden die lysierten Zellen für 15 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der dadurch entstandene, die Proteine enthaltende, Überstand wurde abpipettiert und in neue Eppendorfgefäße übertragen.

2.2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der erhaltenen Proteinkonzentrationen wurde im ersten Schritt eine Konzentrationsreihe mit BSA-Albumin als Standard hergestellt (2mg/ml, 1,5 mg/ml, 1mg/ml, 0,75mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,05mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,005mg/ml). Je 20 µl der Standard-Verdünnungsreihe und der Proteinproben wurden auf eine Mikrotiterplatte in verschiedene Vertiefungen pipettiert und mit jeweils 100 µl Roti®Quant (Verhältnis Reagenz 1 zu Reagenz 2 = 15:1) versetzt. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 15 Minuten bei 50°C inkubiert und die Proteinkonzentrationen per Spektrophotometer (492 nm) gemessen.

2.2.10.3 WesternBlot

Die Proteinproben wurden in neue Eppendorfgefäße pipettiert, das Volumen ergab sich aus den vorher gemessenen Proteinkonzentrationen in den Proben. Es wurde mit Lysepuffer so pipettiert, dass für jede Probe ein Endvolumen von 50 µl mit einer Proteinkonzentration von 1,2 µg/µl entstand. Jede Probe wurde mit 25 µl Laemmli-Puffer versetzt und im Heizblock für 15 Minuten bei 95°C erhitzt. Zur Aufspaltung der Proteinproben wurden jeweils zwei Gele (MiniProtean TGX Stainfree Gele, 10 oder 15 Taschen) in eine Gelelektrophorese-Kammer

eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer (1x Tris/Glycerine/SDS) gefüllt. Die Geltaschen wurden mit 13µl Proteinprobe nach dem Schema entsprechend Tabelle 2 beladen.

nachzuweisendes Protein	Beladung Gel1	Beladung Gel2
p53, SOX2	M-M-K1-K2-...-K6-S1-...-S6-M	M-A1.1-M-A1.2-...-A1.6-A2.1-...-A2.6-M
p14		M-M-A1.1-...-A1.6-A2.1-...-A2.5-M-A2.6
PTEN		M-A2.1-...-A2.6-M
pRb1	M-K1-K2-...-K6-S1-S2-S3	S4-M-S5-S6-A2.1-A2.2-...-A2.6

Tabelle 2 Beladungsschema der Gele für Gelelektrophorese

Dargestellt werden die Beladungsschemata der Gele für die Gelelektrophorese für die jeweiligen Gene; M=Markerproteine, K=Kontrolle, S=Sphäroide, A=adhärente Zellen

Die Markerproteine (Standardproteinreihe) wurden in die entsprechenden Taschen pipettiert, jeweils 5µl. Der Gelelektrophorese-Lauf wurde mit 120V für 60 Minuten gestartet. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele aus der Kammer entfernt und im ChemiDoc XRS+ System aktiviert, belichtet und fotografiert. Im Anschluss wurden die Gele zwischen die Schichten jeweils eines TransBlot Turbo Systems übertragen und für 3 Minuten geblottet. Die geblotteten Membranen wurden nach dem Ende des Blottings aus der Kammer entnommen und für 15 Minuten in 5% Milchpulver-Lösung (10ml TBS 10x + 90ml destilliertes Wasser + 5g Milchpulver) geblockt, um die Bildung von unspezifischen Bindungen zu verhindern. Im Folgenden wurden die Membranen über Nacht in einer 1:400-fachen Verdünnung des jeweiligen primären Antikörpers (Verdünnung in 5%-Milchpulver-TBS-Lösung) auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss an diesen Inkubationsvorgang wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 Minuten in 1x TBS gewaschen und darauffolgend mit dem Sekundärantikörper (Anti-Mouse) für 60 Minuten inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde dazu 1:1000 in 5%-Milchpulver-TBS-Lösung verdünnt. Nach weiterem dreimaligem Waschen für je 10 Minuten in 1x TBS wurden die Membranen im ChemiDoc XRS+ System entwickelt. Dazu wurden die Membranen in 7ml Clarity Western ECL Substrat Reagenz A + Reagenz B

(Verhältnis 1:1) für 5 Minuten in Dunkelheit inkubiert und die Proteinbanden mittels einer Kamera detektiert. Die Auswertung erfolgte mittels Quantifizierung der Signalintensität der Proteinbanden mithilfe der ImageLab Software.

2.2.11 Statistik

Für alle ermittelten Versuchsergebnisse wurden jeweils in den zusammengehörigen Gruppen der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für 2 unabhängige, nicht normalverteilte Stichproben durchgeführt, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde. Alle Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ wurden als hoch signifikant angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit SPSS Version 24.0 durchgeführt.

3. Ergebnisse

Bei Befüllung der Kulturflaschen mit 100.000 Zellen/cm² dauerte es 24 bis 48 Stunden, bis eine Konfluenz von 70-80 % erreicht war. Dies entsprach jeweils Stunde 0 aller Experimente. Die mittels der Random Positioning Machine simulierte μ g-Kraft betrug durchschnittlich 0,0046g.

3.1 Morphologische Veränderungen der Lungenkarzinomzellen unter RPM-Bedingungen

3.1.1 Veränderungen der Zellmorphologie nach 24, 48, 72 und 96 Stunden

Wie in 2.2.6 beschrieben, wurden die Zellen als erstes unter dem Durchlichtmikroskop auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Nach 24 Stunden (entspricht Stunde 0 + 24 Stunden) war die Konfluenz in der Kontrollgruppe bereits auf ca. 90 % angewachsen, nach 48 Stunden auf nahezu 100 %. Nach 72 und 96 Stunden lag die Zelldichte bei 100 % und der Anteil an abgelösten, runden Zellen erhöhte sich deutlich.

Bei den in der RPM befindlichen Zellkulturen war bereits nach 24 Stunden zu erkennen, dass sich die Dichte der adhärennten Zellen verringerte und sich Zellen vom Boden der Kulturflaschen abgelöst hatten. Diese Zellen bildeten kugelige Zusammenlagerungen. Die kugeligen Gebilde bestanden aus bis zu 6 Zellen (Durchmesser ca. 30-50 μ m). Im Verlauf nahm die Konfluenz der adhärennten Zellen weiter ab, die Anzahl der an den dreidimensionalen Zellgebilden beteiligten Zellen jedoch zu. Nach 48 Stunden waren bereits bis zu 12 Zellen (ca. 70 μ m), nach 72 Stunden 15-17 Zellen (90-100 μ m) und nach 96 Stunden bis zu 20 Zellen (100 μ m) beteiligt (Abb. 3 und 4). Ebenso nahm die Anzahl dieser Strukturen zu, nach 96 Stunden konnten die meisten beobachtet werden. Jedoch verblieben zu jedem Zeitpunkt noch adhärennte Zellen am Boden der Zellkulturflaschen (Abb. 3). Daher wurden für die folgenden Experimente die Zellen aus der RPM in zwei Gruppen aufgeteilt: adhärennte Zellen und nicht-adhärennte, sphäroidale Zellen. Diese wurden jeweils getrennt voneinander untersucht.

Morphologisch ähnelten die kugeligen Gebilde der abgelösten Zellen der Anordnung von Weintrauben an der Rebe (Abb. 4).

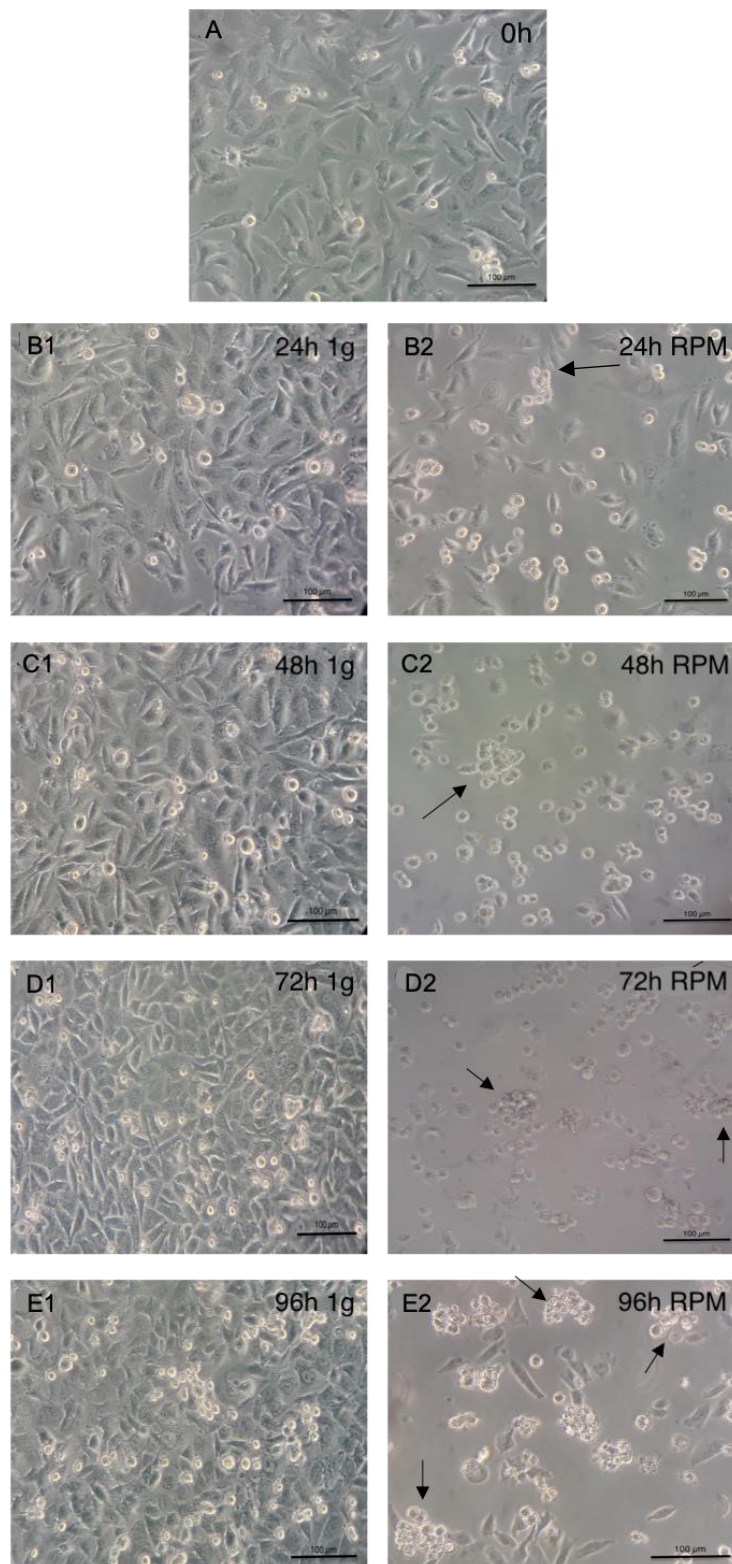


Abbildung 3 Lungenkarzinomzellen unter 1g- und RPM-Bedingungen

Bild A zeigt die Zellen zu Beginn des Experiments (Stunde 0). In der linken Spalte sind die Zellen unter 1g-Bedingungen (B1, C1, D1 und E1) und in der rechten Spalte die Zellen unter RPM-Bedingungen (B2, C2, D2 und E2) im Vergleich nach 24 (B), 48 (C), 72 (D) und 96 Stunden (E) dargestellt. Die Pfeile zeigen exemplarisch auf die sphäroidalen Zusammenlagerungen der Zellen. Maßstabstangen: 100µm.

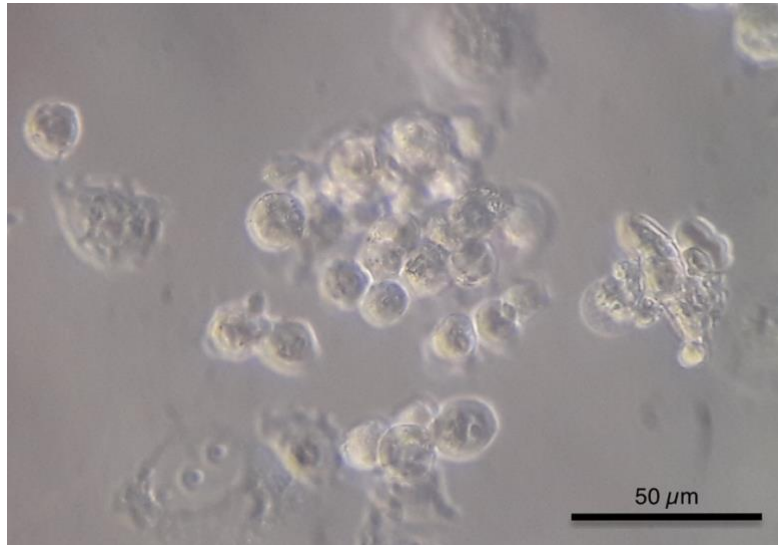


Abbildung 4 Sphäroidale Zusammenlagerung der Lungenkarzinomzellen nach 72 Stunden auf der RPM

Die adhärenenten Zellen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der RPM stellten sich als im Bereich des Zellkörpers ca. 25-30 μm große Zellen mit teils mehreren länglichen Ausläufern dar. Die Zellmorphologie wirkte entsprechend inhomogen. Jedoch waren in der RPM auch rundliche adhärenente Zellen und solche mit deutlich kleineren Ausziehungen zu finden. Die in ihrer Größe und Form einheitlichen Zellkerne wiesen meist mehrere Nukleoli auf. Verglichen dazu waren die abgelösten Zellen in der RPM rundlich, kleiner und ohne Zellausläufer.

3.1.2 Veränderungen der Zellmorphologie und der F-Aktin-Anordnung nach 72 Stunden

Nach 72 Stunden in der RPM wurden die F-Aktin-Filamente in den Zellen mit Phalloidin angefärbt (siehe 2.2.7). Experimentiergruppe und Kontrollgruppe wurden dann hinsichtlich der Morphologie der Zellen und der F-Aktinanordnung in den Zellen sowohl mit Hilfe eines Fluoreszenz- als auch eines Konfokalmikroskop miteinander verglichen.

Die Zellen der Kontrolle zeigten nach 72 Stunden, ebenso wie im Durchlichtmikroskop nach der gleichen Zeit, eine längliche Struktur mit zwei bis vier Ausziehungen und wiesen alle einen ähnlichen Zelldurchmesser auf, gemittelt ca. 50 μm im Längsschnitt und 30 μm im Querschnitt (vgl. Abb. 5 A1+A2). Die Konfluenz der Zellen war sehr hoch, sodass sich die Zellen teilweise überlappten. Die Zellkerne waren aufgrund der DAPI-Färbung gut abgrenzbar und stellten sich rundlich-oval dar, es zeigten sich jedoch auch gelappte Zellkerne und solche mit

unterschiedlich vielen Einkerbungen. Die Kerne lagen zentral im Zellkörper und waren im Längsschnitt ca. 20 μm lang und im Querschnitt ca. 12 μm breit. Der Anteil der Zellkerne am Gesamtvolumen betrug ungefähr ein Drittel. Die angefärbten F-Aktinfasern verliefen in den Zellen der Kontrollgruppe parallel von Zellpol zu Zellpol, die Anordnung ergab ein sehr homogenes Bild. Bei Zellen mit mehr als zwei Polen (mehrere Ausläufer) orientierten sich die F-Aktinfasern parallel zur Zellmembran. Direkt unter der Zellmembran war die Faserdichte innerhalb der Zelle am höchsten, eine konzentrierte Akkumulation an einem umschriebenen Ort in der Zelle war aber nicht zu erkennen.

Die Zellen aus der Experimentiergruppe wiesen unter Fluoreszenz- und Konfokalmikroskop eine deutlich andere Struktur und F-Aktinverteilung auf als die der Kontrollgruppe. Grundsätzlich ließen sich die weiter adhären von den abgelösten Zellen differenzieren. Die adhären Zellen in der RPM waren bezüglich vieler verschiedener Faktoren untereinander sehr inhomogen. Teilweise waren sie hinsichtlich ihrer Größe und der Anordnung der F-Aktinfasern mit den Zellen aus der Kontrollgruppe vergleichbar, wiesen jedoch keine Ausziehungen auf, sondern zeigten eine Tendenz zur Abrundung (Abb. 5, B1). Andere Zellen waren zwar ebenfalls adhären und ähnlich groß wie die Zellen der Kontrollgruppe, aber vollständig rund (Abb. 5, B2). Darüber hinaus fand sich bei diesen Zellen eine starke Veränderung der F-Aktinverteilung in der Zelle. Das F-Aktin war ähnlich wie bei den abgelösten Zellen (siehe unten) konzentrisch in der Zelle verteilt, ohne jedoch so exklusiv unter der Zellmembran zu akkumulieren. Die F-Aktinfilamente waren wie in der Kontrollgruppe als Fasern zu erkennen, hier jedoch konzentrisch um den Zellkern herum angeordnet. (Abb. 5, Bild B2).

Die abgelösten Zellen der Experimentiergruppe bildeten kugelige Gebilde aus bis zu 20 Zellen. Diese Zellen waren rund und im Vergleich zu den adhären Zellen aus der RPM und der Kontrollgruppe deutlich kleiner (15-20 μm im Querschnitt). Des Weiteren lagen die Kerne exzentrisch in den Zellen, direkt unterhalb der Zellmembran, zumeist in Richtung des Mittelpunktes der sphäroidalen Anordnungen verlagert. Darüber hinaus war das Kern- zu Zytoplasmaverhältnis gegenüber der Kontrolle stark in Richtung der Kerne verschoben. Die Zellkerne stellten sich zumeist rundlich-oval dar, es fanden sich aber auch halbmondförmige Zellkerne und solche mit mehreren Einziehungen (vgl. Abb. 5, C1-D2).

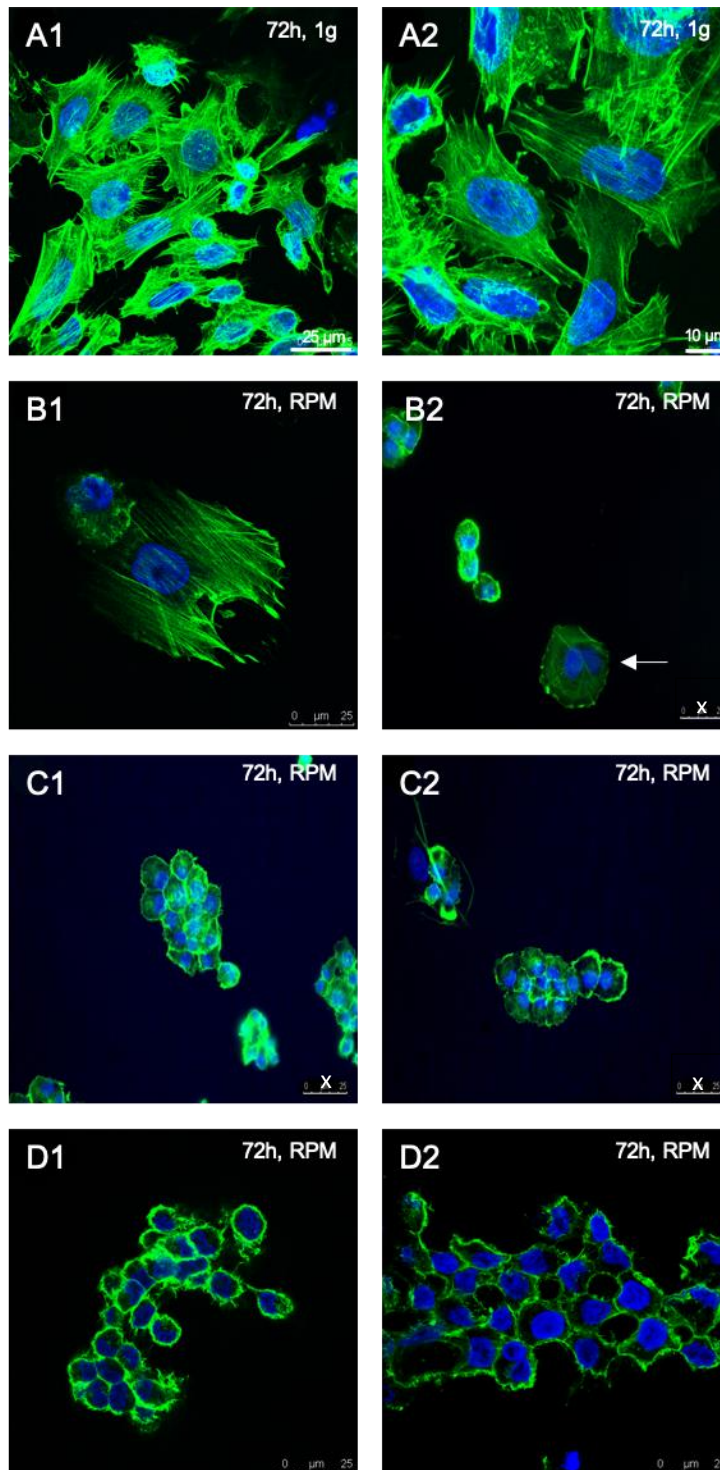


Abbildung 5 F-Aktin-Färbung nach 72 Stunden unter 1g- und RPM-Bedingungen

Anfärbung der F-Aktin-Filamente nach 72 Stunden unter 1g- (A1, A2, Konfokalmikroskop) und RPM-Bedingungen (B1, B2, C1, C2, D1, D2). B1 und B2 zeigen adhärenz Zellen aus der RPM (Fluoreszenzmikroskop). C1 und C2 zeigen sphäroidale Zusammenlagerungen aufgenommen mit dem Fluoreszenzmikroskop, D1 und D2 zeigen vergleichbare Formationen aufgenommen mit dem Konfokalmikroskop. Die Zellkerne stellen sich blau dar. Der Pfeil zeigt auf adhärenz Zelle. Maßstabbalken bei $X = 25\mu\text{m}$.

Auch die Anordnung der F-Aktinfilamente in den abgelösten Zellen wurde durch den Einfluss der RPM-Bedingungen verändert. Die homogene, parallel-faserartige Struktur der Filamente war aufgehoben. Die höchste Filamentdichte bestand direkt unterhalb der Zellmembran, sodass sich im Querschnitt ein ringförmiges Muster ergab. In der Konfokalmikroskopie zeigte sich, dass die Dichte der Filamente von der Membran in Richtung des Zellmittelpunktes abnahm, wobei die F-Aktin-Strukturen diffus verteilt waren und keine geordnete Struktur mehr aufwiesen (Abb. 5, D1+D2). Um die dem Zytosol zugewandte Seite der Zellkerne war die Dichte am geringsten. Darüber hinaus gab es Bereiche in der Zelle, in denen die F-Aktinfilamente vollständig fehlten, es bildeten sich Löcher im Filamentnetzwerk.

In den Bereichen, in denen die Zellen aneinandergrenzten, waren die Zellgrenzen scharf gegen die Umgebung abgrenzbar. Die nach außen gerichteten Zellgrenzen dagegen stellten sich in manchen Abschnitten unscharf, teilweise wie ausgefranst dar (Abb. 5 D1+D2). Dies war durch Zellausziehungen bedingt, in welchen sich ebenfalls mit F-Aktin angefärbte Fasern fanden.

3.2 Veränderungen der Genexpression und der Proteinsynthese

Die Veränderungen der Genexpression wurden für die Protoonkogene *AKT3*, *NFE2L2*, *PIK3CA* sowie *SOX2* und die Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *PTEN*, *RB1* und *TP53* bestimmt. Die Ergebnisse der sphäroidalen und der adhärennten Zellen aus der RPM wurden ins Verhältnis gesetzt mit den Ergebnissen der 1g-Kontrolle (je 100%). Die Veränderungen der Proteinmenge ausgewählter Proteine in den Zellen wurde mithilfe einer Gelelektrophorese und anschließendem WesternBlot bestimmt. Es wurden nur die Proteine untersucht, bei denen sich in der Expression des für das jeweilige Protein kodierende Gen eine signifikante Veränderung gezeigt hatte: p14 (*CDKN2A*), p53 (*TP53*), PTEN, pRb1 und SOX2 (siehe 3.2).

3.2.1 Protoonkogene

Bei *AKT3* zeigte sich nach 72 Stunden keine Veränderung in der Expression in den sphäroidalen Zellen, in den adhärennten Zellen war die Expression im Vergleich zur Kontrolle leicht herunterreguliert ($0,865 \pm 0,193$), ohne jedoch eine ausreichende Signifikanz zu erreichen. Ebenso zeigten sich nur kleine Veränderungen bei *NFE2L2* und *PIK3CA*, wobei das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht erreicht wurde. Bezüglich *NFE2L2* war die Expression in den adhärennten Zellen um das 1,8- ($1,787 \pm 0,786$), in den sphäroidalen Zellen um das 1,2-

fache ($1,231 \pm 0,381$) erhöht. Bei *PIK3CA* war die Expression in beiden Zellpopulationen in Bezug auf die Kontrolle erhöht, um das 1,3-fache ($1,323 \pm 0,173$) in den adhärennten Zellen bzw. um das 1,26-fache ($1,266 \pm 0,449$) in den Sphäroiden (vgl. Abb. 6).

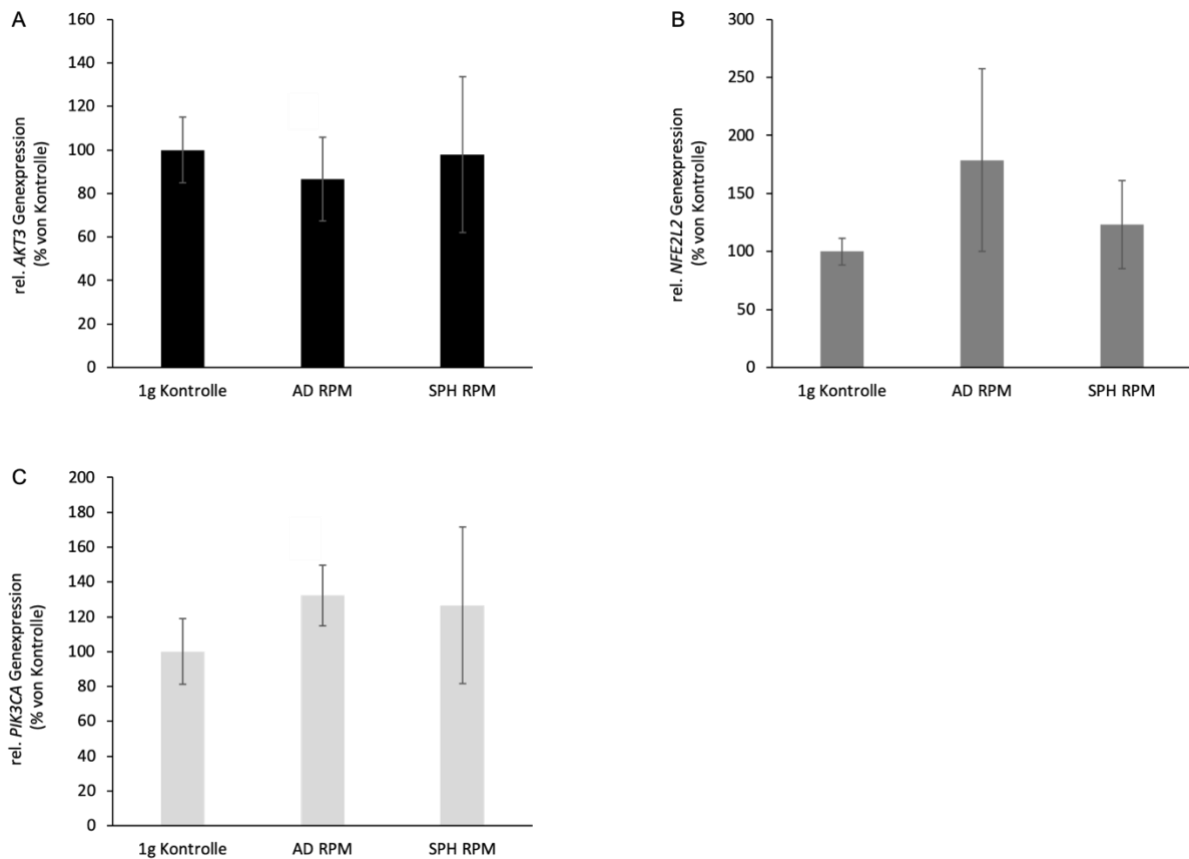


Abbildung 6 Expression der Protoonkogene *AKT3*, *NFE2L2* und *PIK3CA* nach 72 Stunden auf der RPM

Dargestellt wird die relative Genexpression in Prozent der Kontrolle (100%) nach 72 Stunden auf der RPM. A: *AKT3*, B: *NFE2L2*, C: *PIK3CA*. AD RPM= Adhärennt RPM, SPH RPM= Sphäroide RPM.

Das einzige der hier untersuchten Protoonkogen, welches eine signifikante Veränderung der Expression aufwies, war *SOX2*. Hier war die Genexpression in den adhärennten Zellen um das 1,9-fache ($1,873 \pm 0,541$; $p < 0,05$) erhöht. Bei den sphäroidalen Zellen zeigten sich jedoch auch hier keine signifikanten Veränderungen ($1,389 \pm 0,327$). Bei *SOX2* fanden sich keine Veränderungen der Proteinmenge in den sphäroidalen Zellen aus der RPM im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den adhärennten Zellen aus der RPM war die Proteinmenge von *SOX2* um das 2,4-fache herunterreguliert ($0,4149 \pm 0,0885$, $p < 0,01$). Zwischen den adhärennten und nicht-adhärennten Zellen aus der RPM bestand bei der *SOX2*-Proteinmenge ebenfalls ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) (vgl. Abb. 7).

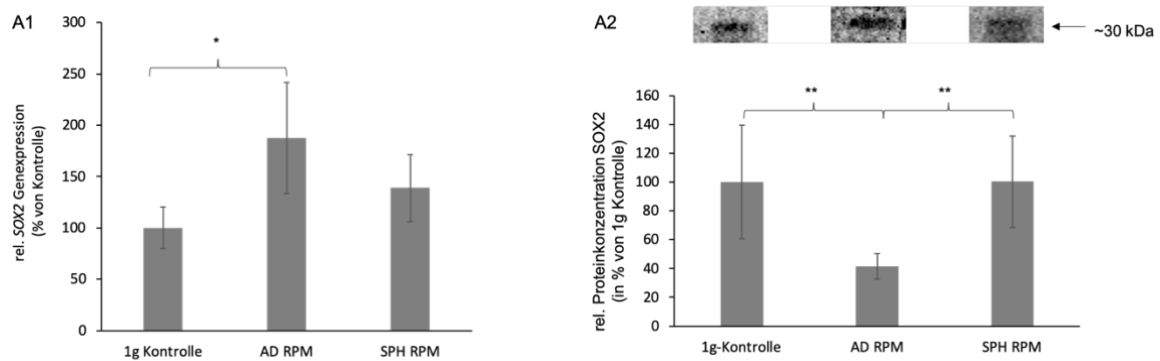


Abbildung 7 Expression des Protoonkogens *SOX2* und Proteinsynthese von *SOX2* nach 72 Stunden auf der RPM

Dargestellt wird in A1 die relative Genexpression von *SOX2* in Prozent der Kontrolle (100%) nach 72 Stunden auf der RPM. Zusätzlich wird in A2 die Veränderung der Proteinsynthese von *SOX2* in Prozent der Kontrolle (100%) nach 72 Stunden auf der RPM dargestellt. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$. AD RPM= Adhärenz RPM, SPH RPM= Sphäroide RPM.

3.2.2 Tumorsuppressorgene

Für *CDKN2A* zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Expression in den adhären Zellen aus der RPM gegenüber der Kontrolle um das 14-fache ($14,054 \pm 5,620$; $p < 0,05$). In den Sphäroiden zeigte sich für dieses Gen ebenfalls eine leichte Hochregulation, hier lag jedoch keine ausreichende Signifikanz vor ($1,281 \pm 0,337$). Die Proteinmenge von p14 in allen untersuchten Experimentgruppen war gering. In den adhären Zellen der RPM war das p14-Protein um das 1,17-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert ($1,1668 \pm 0,4424$), in den nicht-adhären um das 2-fache herunterreguliert ($0,4931 \pm 0,1163$), beides mal, ohne eine ausreichende Signifikanz zu erreichen. Lediglich der Unterschied in der Proteinmenge von p14 in den adhären und nicht-adhären Zellen der RPM war hoch signifikant verändert ($p < 0,01$) (Abb. 8, A1+A2)

Die Expression von *PTEN* war in den adhären Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant hochreguliert ($2,261 \pm 0,627$; $p < 0,05$), es gab jedoch keine signifikante Veränderung in den sphäroidalen Zellen ($1,37 \pm 0,264$). Das *PTEN*-Protein in den sphäroidalen Zellen war hochreguliert ($1,2803 \pm 0,3354$), ohne ein ausreichendes Signifikanzniveau zu erreichen. In den adhären Zellen aus der RPM konnte kein *PTEN*-Protein nachgewiesen werden (Abb. 8, B1+B2).

Bei *RB1* und *TP53* fand sich jeweils eine signifikante Hochregulation der Genexpression in den adhären Zellen im Vergleich zu den Zellen der 1g-Kontrolle, bei *TP53* mit hoher Signifikanz. Die Expression von *RB1* war um das 2,4-fache erhöht ($2,357 \pm 0,746$; $p < 0,05$) und von *TP53* um das 4,5-fache ($4,519 \pm 1,838$; $p < 0,01$). Die Expression der Gene in den Sphäroiden zeigte keine signifikanten Veränderungen. Bei p53 fand eine hochsignifikante Herunterregulation des Proteins in den adhären Zellen im Vergleich zur Kontrolle um das 2-fache statt ($0,494 \pm 0,1597$; $p < 0,001$), in den sphäroidalen Zellen kam es jedoch zu einer Erhöhung der Proteinmenge von p53 um das 1,65-fache ($1,653 \pm 1,4554$; $p < 0,01$). Zwischen adhären und nicht-adhären Zellen aus der RPM bestand ebenfalls ein hochsignifikanter Unterschied in der Proteinmenge ($p < 0,001$). Bei pRb1 fand sich eine nach oben regulierte Proteinmenge in den adhären RPM-Zellen um das 1,75-fache ($1,7539 \pm 0,4297$) und eine nach unten regulierte Proteinmenge in den sphäroidalen Zellen um das 1,35-fache ($0,7410 \pm 0,1713$). Beide Ergebnisse wiesen jedoch keine ausreichende Signifikanz auf. Hoch signifikant war aber der Unterschied zwischen adhären und sphäroidalen Zellen aus der RPM bezüglich der Proteinmenge von pRb1 ($p < 0,01$) (Abb. 8, C1-D2). Bei *CDKN2A*, *RB1* und *TP53* zeigten sich darüber hinaus auch signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den adhären und den sphäroidalen Zellen ($p < 0,05$), wobei die Expression in den adhären Zellen hochreguliert war (Abb. 8).

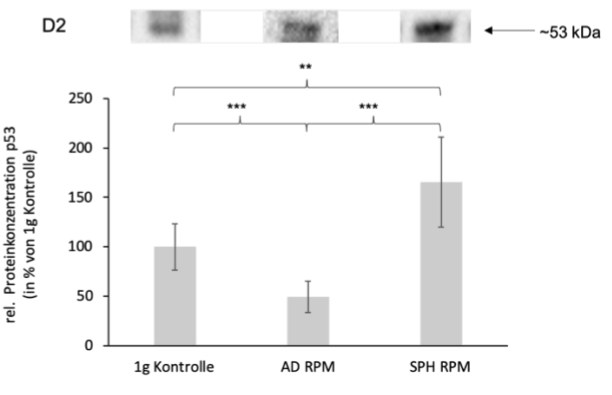
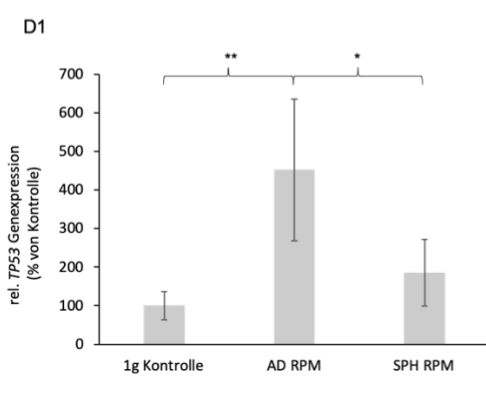
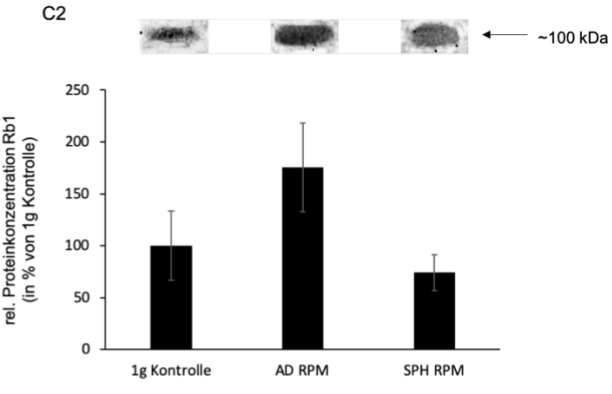
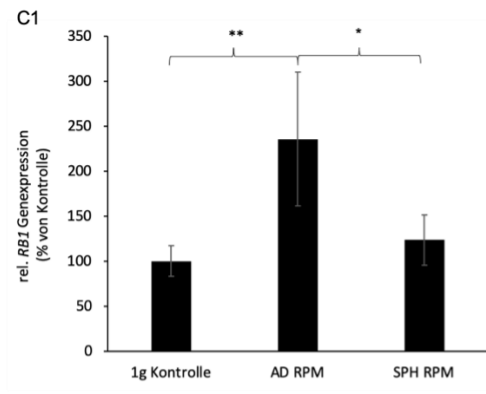
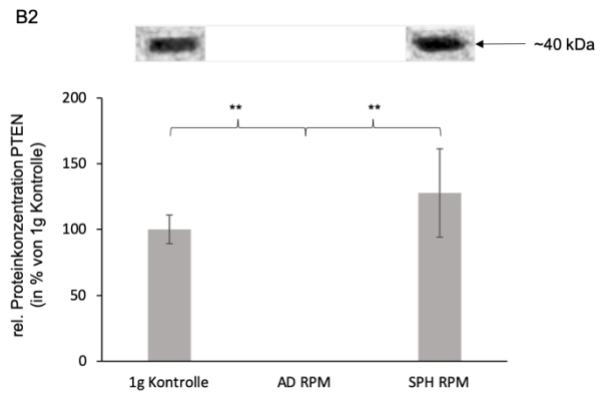
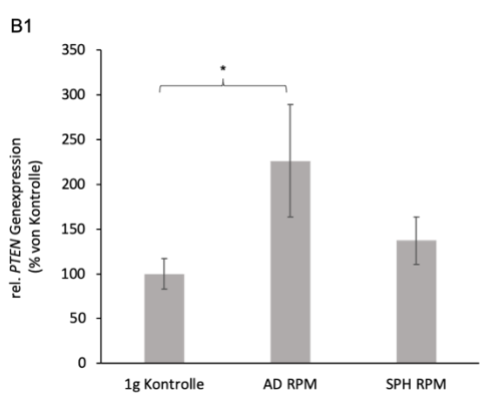
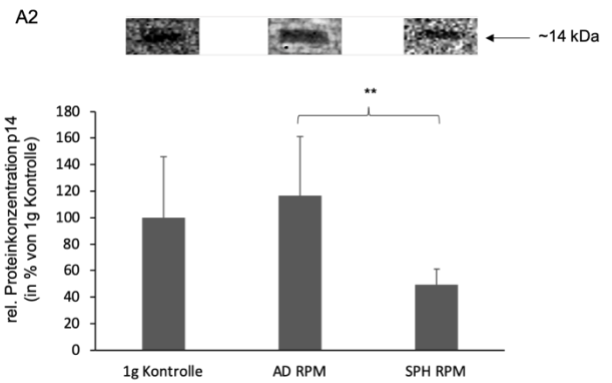
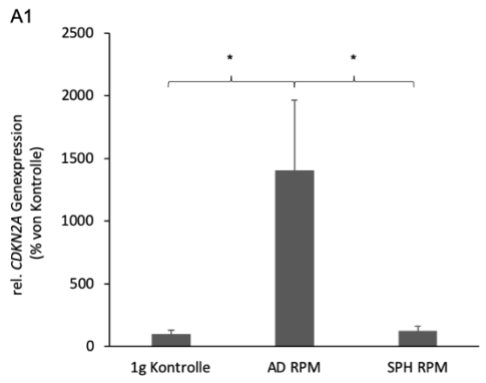
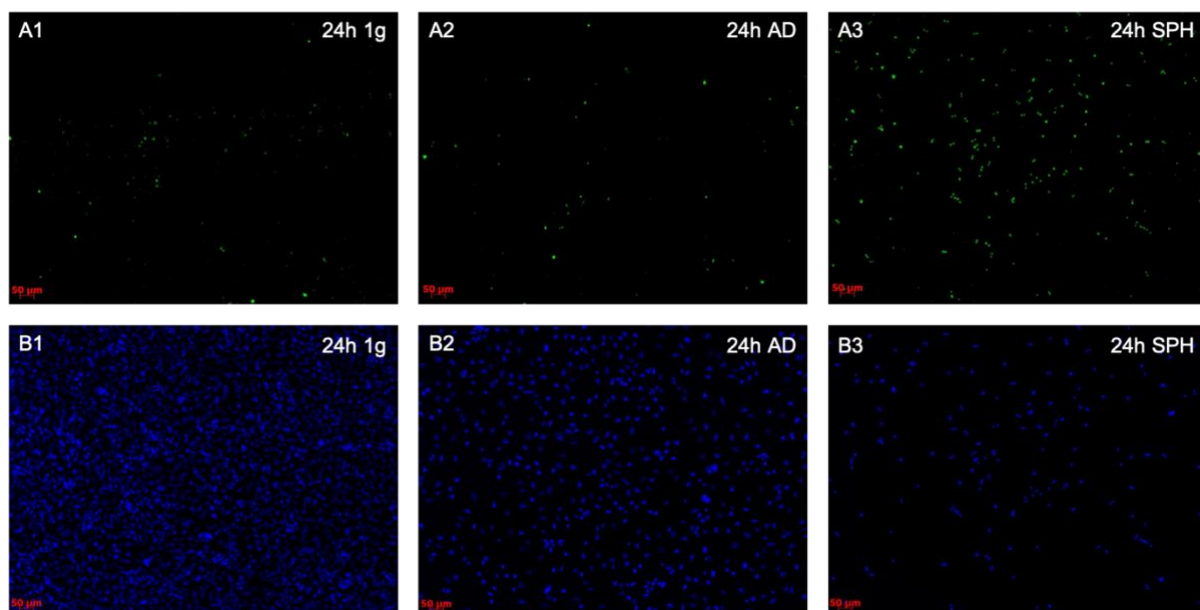


Abbildung 8 Expression der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *PTEN*, *RB1* sowie *TP53* und Proteinsynthese von p14, PTEN, pRb1 und p53 nach 72 Stunden auf der RPM.

Dargestellt wird in der linken Spalte die relative Genexpression in Prozent der Kontrolle (100%) nach 72 Stunden auf der RPM. A1: *CDKN2A*, B1: *PTEN*, C1: *RB1*, D1: *TP53*. In der rechten Spalte wird die Veränderung der Proteinsynthese in Prozent der Kontrolle (100%) nach 72 Stunden auf der RPM dargestellt. A2: p14, B2: PTEN, C2: pRb1, D2: p53. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. AD RPM= Adhärent RPM, SPH RPM= Sphäroide RPM.

3.3 Apoptoserate

Die Apoptoserate wurde nach 24 und 72 Stunden mittels der TUNEL-Methode bestimmt (siehe 2.2.8). Nach der Färbung wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Apoptotische Zellen wurden durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff als solche detektierbar, nicht-apoptotische Zellen fluoreszierten nicht (vgl. Abb. 9). Zur Erfolgskontrolle der Färbung wurden zuerst Positiv- und Negativkontrolle ausgewertet. Hier zeigte sich, dass die Färbung erfolgreich war.



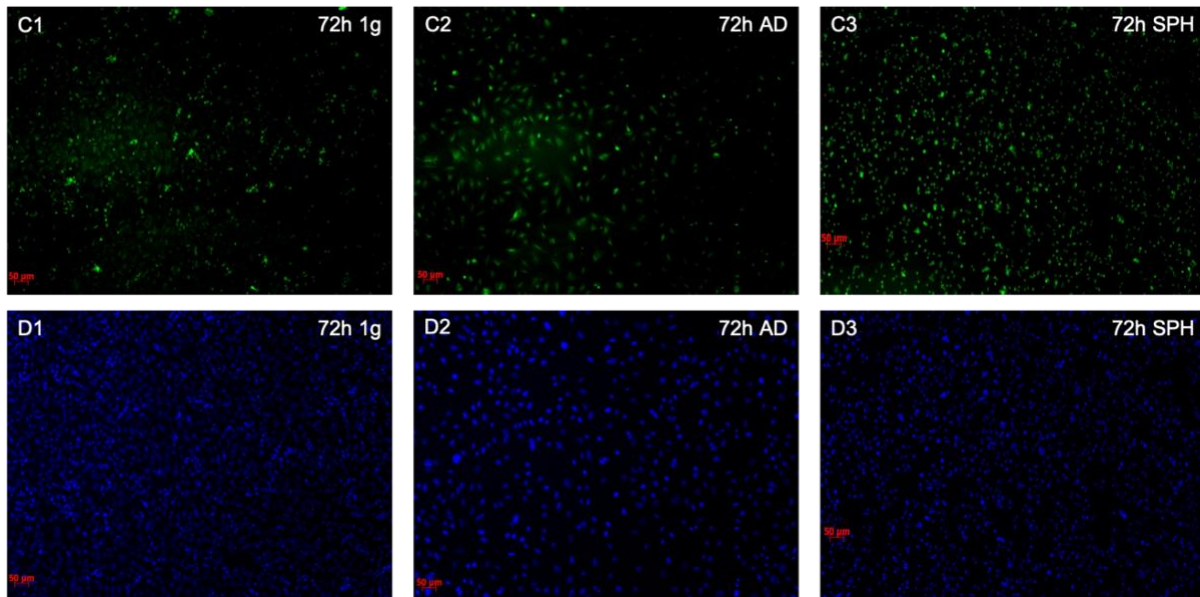


Abbildung 9 TUNEL-Färbung nach 24 und 72 Stunden unter 1g- und RPM-Bedingungen

Dargestellt wird die TUNEL-Färbung nach Exposition der Zellen unter RPM-Bedingungen nach 24 (A) Stunden und 72 Stunden (C). Die apoptotischen Zellen stellen sich grün fluoreszierend dar. Zum Vergleich ist unter den TUNEL-Färbungen die jeweilige DAPI-Färbung zur Darstellung aller Zellen im Bildausschnitt abgebildet. A1: Kontrolle TUNEL 24h, B1: Kontrolle DAPI 24h, A2: Adhärenz RPM TUNEL 24h, B2: Adhärenz RPM DAPI 24h, A3: Sphäroide TUNEL 24h, B3: Sphäroide DAPI 24h, C1: Kontrolle TUNEL 72h, D1: Kontrolle DAPI 72h, C2: Adhärenz RPM TUNEL 72h, D2: Adhärenz RPM DAPI 72h, C3: Sphäroide TUNEL 72h, D3: Sphäroide DAPI 72h. AD= Adhärenz RPM, SPH= Sphäroide RPM.

In der 1g-Kontroll-Zellkultur fand sich nach 24 Stunden eine Apoptoserate von 2,79% ($\pm 1,76$) als Anteil an allen Zellen in der Zellkultur. Nach 72 Stunden waren 11,42% ($\pm 3,04$) aller Zellen der 1g-Kontrolle apoptotisch. Dies entspricht einer hochsignifikanten Veränderung der Apoptoserate nach 72h Stunden im Vergleich mit 24 Stunden ($p < 0,001$). Der Apoptoseanteil bei den adhärenz Zellen aus der RPM betrug nach 24 Stunden 12,01% ($\pm 6,58$) und nach 72 Stunden 13,06% ($\pm 1,71$). Hier kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate. Bei den nicht-adhärenz Zellen aus der RPM zeigte sich nach 24 Stunden eine Apoptoserate von 88,55% ($\pm 7,35$). Nach 72 Stunden in der RPM waren 86,43% ($\pm 2,43$) der Zellen apoptotisch. Auch hier kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate (Abb. 10). Im Vergleich zur 1g-Kontrolle zeigte sich bei den adhärenz Zellen nur nach 24 Stunden ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Bei den sphäroidalen Zellen zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle sowohl nach 24 Stunden und 72 Stunden ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) (vgl. Abb 10).

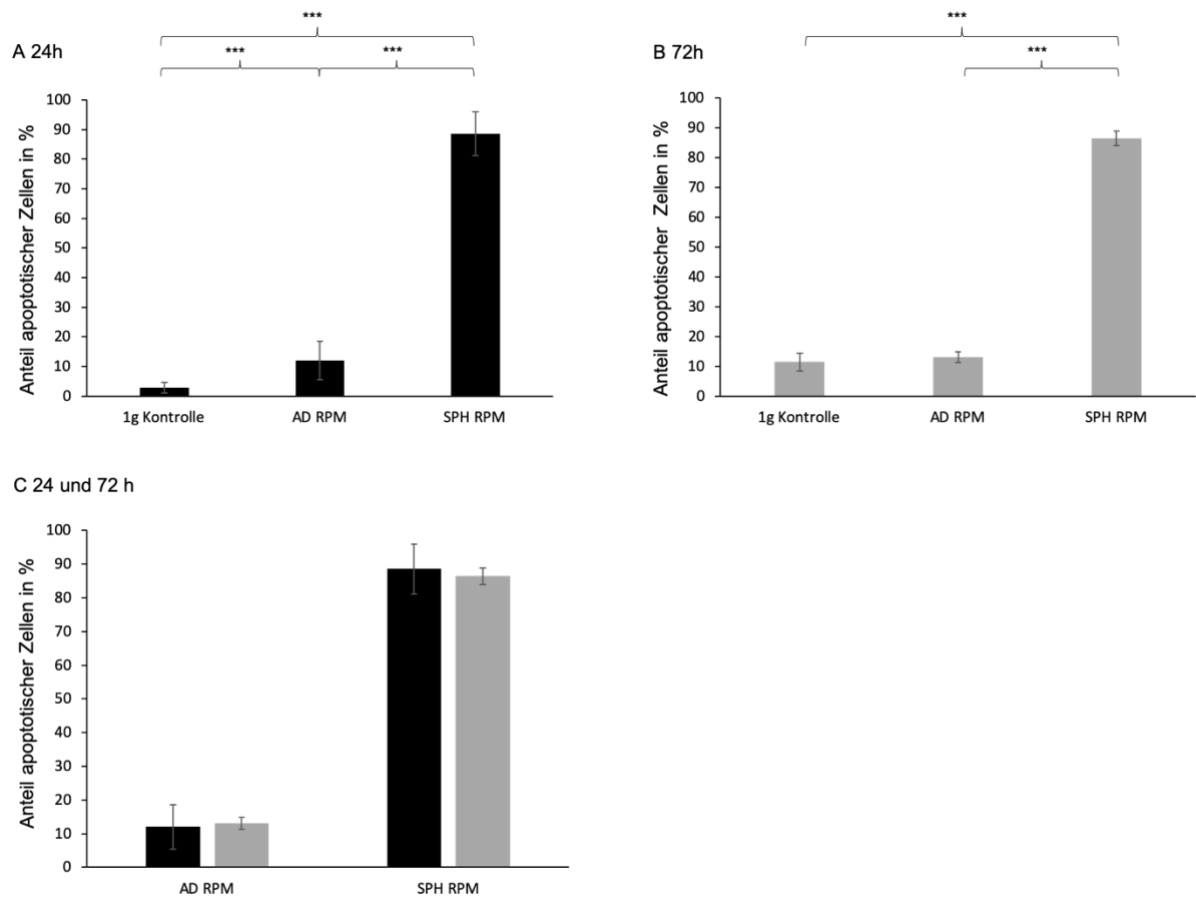


Abbildung 10 Apoptoserate nach 24 und 72 Stunden unter RPM-Bedingungen

Dargestellt wird der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen an allen Zellen in der jeweiligen Gruppe. A: 24 Stunden, B: 72 Stunden, C: Vergleich 24/72 Stunden, wobei schwarz= 24 Stunden und grau= 72 Stunden. ***= $p < 0,001$. AD RPM= Adhärenz RPM, SPH RPM= Sphäroide RPM.

4. Diskussion

Der Einfluss simulierter Mikrogravitation auf verschiedene Zelllinien wurde bereits eingehend untersucht. Dies gilt jedoch nicht für das Plattenepithelkarzinom der Lunge. Hier gibt es bisher nur zwei kleinumfänglichere Studien (118,119). Bei diesen Studien wurden jedoch lediglich Proliferation und Migration untersucht. Dementsprechend sind die Erkenntnisse der Mikrogravitationsforschung bezüglich des Plattenepithelkarzinoms der Lunge bisher gering. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Ergebnisse zu erheben, um daraus neue Erkenntnisse zum Verhalten von Lungenkarzinomzellen unter simulierter Mikrogravitation gewinnen zu können.

Auf der Grundlage bisher publizierter Ergebnisse zu anderen Tumorzelllinien wurden vier Hypothesen aufgestellt (siehe Einleitung). Davon konnten durch die vorliegende Arbeit einige ganz, manche nur teilweise bestätigt werden. Unter dem Einfluss simulierter Mikrogravitation konnten Veränderungen in der Morphologie des Zellverbandes, der Zelle und des Zytoskeletts gezeigt werden. Bereits nach 24 Stunden bildeten die Plattenepithelkarzinomzellen Sphäroide. Darüber hinaus zeigte sich in den Sphäroiden eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu den adhärennten Zellen und der 1g-Kontrolle, sowohl nach 24 als auch nach 72 Stunden. Die Genexpression aller hier untersuchten Tumorsuppressorgene war in den adhärennten Zellen aus der RPM signifikant hochreguliert. Die ebenfalls untersuchte Expression der jeweiligen Proteine korrelierte nicht sehr stark mit der Genexpression. Bezüglich der Protoonkogene fand sich nur bei *SOX2* eine signifikante Hochregulation der Genexpression der adhärennten Zellen, die Proteinsynthese war dagegen herunterreguliert.

4.1. Morphologische Veränderungen der Lungenkarzinomzellen

Sphäroidbildung

Wie anfangs erläutert, ist für viele somatische Zelllinien und Tumorzelllinien die Bildung von Sphäroiden unter simulierter Mikrogravitation bereits beschrieben. Dabei kamen unterschiedliche Anlagen zur Simulation der Mikrogravitation zum Einsatz. Die Bildung von Sphäroiden in einer Random Positioning Machine konnte durch die vorliegende Arbeit nun auch für das Plattenepithelkarzinom der Lunge gezeigt werden und so die aufgestellte Hypothese 1 bestätigt werden.

Bereits nach 24 Stunden konnten erste Sphäroide nachgewiesen werden. Die Sphäroide ähnelten der Form von Weinreben. Dies entspricht einer der Kategorien in der von Kenny et al. vorgestellten morphologischen Klassifikation der Sphäroide (rebenförmig angeordnet) (81) (siehe Kapitel 1.2.1).

Die Größe der Sphäroide und die Anzahl an Zellen pro Sphäroid nahmen mit fortschreitender Kultivierungsdauer zu. Damit konnte die in vorangegangenen Studien (126,139) bereits postulierte positive Korrelation zwischen der Größe der Sphäroide und der Dauer der Kultivierung bestätigt werden. Andere Faktoren mit potentielltem Einfluss auf die Sphäroidgröße sind die Zusammensetzung des Mediums, die Dichte, mit der die Zellen in der Zellkulturflasche ausgesät werden und die Rotationsgeschwindigkeit des eingesetzten GBF (82). Diese Faktoren wurden bei den hier durchgeführten Experimenten nicht verändert.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Größe der Sphäroide betrug maximal 100 μm nach 96 Stunden. Dies ist, verglichen mit der Sphäroidgröße anderer Zelllinien, die unter simulierter Mikrogravitation kultiviert wurden, klein. In vorangegangenen Arbeiten wurden Sphäroide verschiedener Größe beschrieben, abhängig von der Zellart. Mesenchymale Stammzellen bildeten unter simulierter Mikrogravitation nach sieben Tagen Sphäroide mit einem Durchmesser von 100 – 200 μm (140). Verschiedene Autoren konnten für Schilddrüsenkarzinomzellen Sphäroide mit einem Durchmesser von 400 μm bis zu 3 mm beschreiben (107,125,141). In einer anderen Arbeit von Arun et al. ließen sich bei Zellen des Kolorektalkarzinoms, die unter simulierter Mikrogravitation kultiviert wurden, Sphäroide in einer Größe zwischen 200 – 1000 μm nachweisen (126). Darüber hinaus verklumpten die einzelnen Sphäroide noch zusätzlich, sodass Aggregate von einer Gesamtgröße bis zu 0,5 cm entstanden (126). Dieses Phänomen konnte bei den Lungenkarzinomzellen nicht beobachtet werden.

Die Art der 3D-Kultivierung scheint für die Größe der Sphäroide nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Für mesenchymale Stammzellen, Melanomzellen und Kolorektalkarzinome wurden mittels anderer Kultivierungstechniken (hanging-drop-Methode, low-attachment-Kulturflaschen) Sphäroiddurchmesser in ähnlicher Größenordnung wie oben genannt beschrieben (72,142–144). Einzig für echte Mikrogravitation sind, im Vergleich zu s- μg , für die gleiche Zelllinie (Schilddrüsenkarzinom) deutlich größere Sphäroide beschrieben (107).

Es kann also anhand der hier durchgeführten Experimente keine Ursache für die geringe Größe der Lungenzell-Sphäroide eruiert werden. Die oben beschriebenen potentiellen Einflussfaktoren auf die Sphäroidgröße sind in der vorliegenden Arbeit und in den zitierten Arbeiten vergleichbar. Möglicherweise führt die hohe Apoptoserate, wie sie in den Sphäroiden festgestellt wurde, zu einer Einschränkung des Größenwachstums. Andererseits besteht erst ab einer Strecke von ca. 150 µm eine Einschränkung der Diffusion und somit des Stofftransportes in den Sphäroiden (82,84). Das heißt, dass auch im inneren Kern der Sphäroide die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ausreichend sein sollte. Daher können die hier kultivierten Sphäroide wahrscheinlich auch nicht in die von Lin und Chang beschriebenen Zonen eingeteilt werden (Kapitel 1.2.1). Diese Hypothese muss in weiteren Experimenten mit Untersuchung des Stofftransportes in den Sphäroiden überprüft werden. Es bleibt abzuwarten, ob zukünftige Experimente mit Lungenkarzinomzellen vergleichbar große Sphäroide nach Einfluss echter oder simulierter Mikrogravitation nachweisen können. Aktuell kann konstatiert werden, dass die Sphäroidgröße insbesondere von der jeweiligen Zellart abhängig zu sein scheint und in geringerem Maße von der Kultivierungstechnik oder anderen Einflüssen.

Zytoskelett der Sphäroide

Der Einfluss von Mikrogravitation führt zu gravierenden Veränderungen im Zytoskelett. Dies kann die vorliegende Arbeit im Einklang mit vielen weiteren Studien belegen. Die zytoskelettalen Veränderungen wurden hier zum ersten Mal auch für Zellen des Plattenepithelkarzinoms der Lunge nachgewiesen. Die in Längsrichtung der Zelle verlaufende, parallele Struktur der F-Aktinfilamente war aufgehoben. Die Filamente verliefen sphärisch. Weiterhin akkumulierten die F-Aktinfasern direkt unterhalb der Zellmembran, die Dichte um den Zellkern herum war deutlich reduziert. Teilweise entstanden dadurch sogar Löcher im Filamentnetzwerk. Dementsprechend kann die zweite aufgestellte Hypothese bestätigt werden. Die genannten Veränderungen konnten bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden. Insbesondere die inhomogene Verteilung der F-Aktinfilamente mit Akkumulation unterhalb der Zellmembran und sehr geringer Dichte in den anderen Bereichen der Zelle ist mehrfach beschrieben (78,115,125,127).

Weiterhin stellten sich die nach außen gerichteten Zellgrenzen abschnittsweise unscharf dar. Ähnliche Beobachtungen wurden von Rivaldt et al. in einer Studie mit Schilddrüsenkarzinomzellen als Lamellipodien und Filopodien interpretiert (77). Diese bestehen unter anderem aus Aktinfilamenten und können daher durch die hier angewandte Färbung dargestellt werden. Sie sind von Bedeutung für die Migration von Zellen (145,146). Die potentiell vermehrte Ausbildung von Pseudopodien unter simulierter Mikrogravitation bei den Lungenkarzinomzellen kann daher als Hinweis auf ein erhöhtes Migrations- und damit Metastasierungspotential der Zellen der Sphäroide gewertet werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen zweier Studien, die ein erhöhtes Migrationspotential sowohl beim Plattenepithelkarzinom als auch beim Adenokarzinom der Lunge unter simulierter Mikrogravitation nachweisen konnten (118,119). Auch bei Keratinozyten wurde ein erhöhtes Migrationspotential nach Kultivierung unter $s\text{-}\mu\text{g}$ beschrieben (120). Als Ursache konnten die Autoren, passend zu den hier erhobenen Befunden, eine verstärkte Ausbildung von Lamellipodien an den Zellen feststellen (120).

Zu einem anderen Ergebnis kommt eine weitere Studie zum Einfluss von $s\text{-}\mu\text{g}$ auf Lungenadenokarzinomzellen. Diese Studie kommt zu dem Schluss, dass aufgrund verminderter Proliferation, reduzierter Migrationsfähigkeit und dazu passend veränderter Genexpression das Metastasierungspotential der Zellen reduziert ist (117). Ähnliches wurde für Melanomzellen nachgewiesen. Als Ursache konnte die Inhibition spezifischer Signalwege (FAK/RhoA) und eine Reduktion von Lamellipodien und Filopodien beobachtet werden (122).

Folglich liegt eine nicht vollständig übereinstimmende Datenlage vor. Veränderungen im Zytoskelett, Beeinflussung der Migrationsfähigkeit und des Metastasierungspotential durch simulierte Mikrogravitation scheinen vor allem vom Zelltyp abhängig zu sein. Möglicherweise spielt auch die Maschine, welche zur Simulation der Mikrogravitation eingesetzt wird, eine Rolle. Die Adenokarzinomzelllinie A549 (Lunge) wurde in zwei unabhängigen Studien untersucht (117,119). Einmal wurde ein erhöhtes, einmal ein vermindertes Migrationspotential festgestellt. Wichtiger Unterschied beider Studien war, dass in erstgenannter ein 2D-Clinostat, in zweitgenannter eine RPM eingesetzt wurde. Insgesamt ergab sich bei Zusammenschau mehrerer Studien jedoch kein eindeutiger Trend zum Zusammenhang zwischen eingesetztem GBF und Migrations-/Metastasierungspotential.

Zytoskelett der adhärenen Zellen

Zusätzlich zu den Sphäroiden konnten auch weiterhin adhärenente Zellen in den Zellkulturflaschen aus der RPM nachgewiesen werden. Das Verbleiben von adhärenenten Zellen unter simulierter Mikrogravitation auch nach längerem Zeitraum ist bereits für andere Zelllinien beschrieben (116,123,139). Anhand der in der vorliegenden Untersuchung durchgeführten Experimente lassen sich die adhärenenten Zellen nach morphologischen Gesichtspunkten weiter in Unterstadien gliedern. Es fanden sich adhärenente Zellen, welche fast die gleiche Morphologie und Anordnung der F-Aktinfasern aufwiesen wie die Zellen der 1g-Kontrolle. Des Weiteren gab es Zellen, die eine rundliche Form angenommen hatten, die Anordnung der F-Aktinfasern war aber weiterhin parallel in Längsrichtung der Zelle. In einem dritten Stadium waren die Zellen kleiner und die Struktur der F-Aktinfasern ähnelte der in den sphäroidalen Zellen. Diese Zellen waren trotzdem noch deutlich größer als die Zellen, welche sich abgelöst hatten und die Sphäroide bildeten (siehe Kapitel 3.1.2, Abb. 5).

Die beschriebenen Zellen bilden also möglicherweise Zwischenstadien zwischen Zellen, wie sie in der 1g-Kontrolle zu finden sind und solchen in den Sphäroiden. Dafür spricht auch, dass der Anteil der adhärenenten Zellen über die Zeit immer kleiner wurde und die Anzahl der abgelösten Zellen immer größer. Daher besteht die Möglichkeit, dass die simulierte Mikrogravitation einen Prozess aktiviert, bei dem sich die adhärenenten Zellen mit fortschreitender Zeit formverändern, sich die Anordnung der F-Aktinfasern verändert und die Zellen kleiner werden. Ob alle Zellen diesen Prozess durchlaufen und ob dieser Voraussetzung für die Ablösung vom Boden der Zellkulturflasche ist, kann anhand der hier erhobenen Daten nicht überprüft werden.

Die Annahme eines kontinuierlichen Prozesses wird jedoch von den Ergebnissen einer weiteren Studie gestützt (78). Hier konnten bei Brustkrebszellen Veränderungen im Zytoskelett von adhärenenten Zellen nachgewiesen werden, die bei Sphäroiden ebenfalls nachweisbar waren.

Dem gegenüber steht eine Studie von Masiello et al. Die Autoren konnten zwar ebenfalls die Existenz von sowohl adhärenenten Zellen als auch Sphäroiden unter dem Einfluss von simulierter Mikrogravitation für Brustkrebszellen nachweisen. Sie gehen aber nicht von Zwischenstadien aus, da der prozentuale Anteil beider Zellpopulationen nach 24 und 72 Stunden in dieser Studie konstant blieb (116).

Auch in den hier erhobenen Daten lassen sich Argumente dafür finden, die adhärenen Zellen als eigene Zellpopulation und nicht als Zwischenstadien anzusehen. Die Expression mehrerer Gene (*CDKN2A*, *RB1* und *TP53*) in den adhärenen Zellen unterschied sich signifikant von der Expression dieser Gene in den Sphäroiden. Noch auffälliger waren die Unterschiede in der Synthese einiger Proteine, hier zeigten sich teilweise sogar entgegengesetzte Ergebnisse in Bezug auf die 1g-Kontrolle. Diese Diskrepanz in Gen- und Proteinexpression zwischen adhärenen Zellen und Sphäroiden wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (78,116,125). Auch die hier festgestellten, signifikant unterschiedlichen Apoptoseraten sprechen für diese Annahme. Zusätzlich konnten in einer Studie von Testa et al. zwei deutlich voneinander differente Zellpopulationen in einer RPM gefunden werden (147). Die Autoren verglichen verschiedene physikalische Zelleigenschaften miteinander (Rundheit, fraktale Dimensionen und weitere) und fanden signifikant unterschiedliche Werte für diese beiden Zellgruppen aus der RPM. Manche Autoren kommen deshalb ebenfalls zu dem Schluss, dass die adhärenen Zellen als eigene Zellpopulation zu behandeln sind.

In Zukunft könnte die Frage, ob die Sphäroidbildung als Prozess kontinuierlicher Veränderung der zunächst adhärenen Zellen anzusehen ist, mittels Live-Bildgebung in weiteren Studien überprüft werden. Dafür kann beispielsweise ein „Digital Holographic Microscope“ (DHM) in die RPM integriert werden (133). Das DHM liefert hochauflösende Live-Bilder von den Zellen auf der RPM. Die DHM-Technik wurde bereits, mit anderem Schwerpunkt der Fragestellung und anderer Zelllinie, in verschiedenen Studien eingesetzt (148,149). In diesen Arbeiten konnten kontinuierliche Veränderungen im Zytoskelett der Zellen nachgewiesen werden.

4.2 Veränderungen der Genexpression und der Proteinsynthese

Für acht Gene wurde die Expression nach Kultivierung der Zellen auf der Random Positioning Machine untersucht. Für fünf dieser Gene (*SOX2*, *CDKN2A*, *PTEN*, *RB1* und *TP53*) konnten signifikante Veränderungen in den adhärenen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhoben werden. Die Expression aller vorangehend genannter Gene war hochreguliert. Auch in den Sphäroiden war die Genexpression all dieser Gene hochreguliert, ohne jedoch eine ausreichende statistische Signifikanz zu erreichen. Daraufhin wurden für die Proteinprodukte der fünf Gene, bei denen sich statistisch signifikante Veränderungen gezeigt hatten, WesternBlot-Analysen durchgeführt. Daraus konnten semiquantitative Daten zur

Proteinmenge erhoben werden. Die Proteinsynthese korrelierte nur teilweise mit der Genexpression. Bei den adhärennten Zellen zeigte sich bei *CDKN2A/p14* und *RB1/pRb1* eine gleichgerichtete Veränderung von Genexpression und Proteinsynthese. Ein gemeinsamer Trend zeigte sich bei den Sphäroiden für *SOX2/SOX2*, *PTEN/PTEN* und *TP53/p53*.

Proliferation und Zellzykluskontrolle

PIK3CA und *AKT3* sind wichtige Bestandteile intrazellulärer Signalwege. Die Aktivierung dieser Signalwege durch Wachstumsfaktoren initiiert unter anderem Proliferation und inhibiert apoptotische Prozesse (siehe Kapitel 1.1.3). Eine ausgeprägte Expression dieser Gene kann dementsprechend zur Tumorgenese beitragen und das Tumorwachstum verstärken (150,151). Überexpression dieser Gene konnte für Ovarial-, Zervix- und Lungenkarzinome bewiesen werden (26,151,152). In der vorliegenden Studie wurde die Expression beider Gene durch die simulierte Mikrogravitation jedoch nicht beeinflusst, weder in den Sphäroiden noch bei den adhärennten Zellen.

Anders stellen sich die Ergebnisse für *PTEN* dar. Das PTEN-Protein ist ein Inhibitor des PI3K/Akt-Signalweges durch Blockierung von Akt (25). Daher weist die hier dargelegte, signifikant erhöhte Genexpression von *PTEN* in den adhärennten RPM-Zellen auf eine Zunahme der Blockierung des PI3K/Akt-Signalwegs hin. Jedoch konnte in diesen Zellen kein PTEN-Protein nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz zwischen den Veränderungen der Genexpression und den Veränderungen der Synthese des zugehörigen Proteins konnte auch für andere Gen/Protein-Paare (*RB1/pRb1*, *SOX2/SOX2* und *TP53/p53*) festgestellt werden. In anderen Studien wurden solche Unterschiede bereits beschrieben (77,78,125,139). Als Ursachen können hier posttranslationale Modifikationen, verschiedene Protein-Halbwertszeiten, schneller mRNA-Abbau oder verzögerte Proteinsynthese diskutiert werden (153).

Insgesamt weisen die hier erhobenen Daten darauf hin, dass der PI3K/Akt-Signalweg aufgrund der erhöhten *PTEN*-Expression in den adhärennten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, vermehrt supprimiert wird. Andere Studien beschreiben im Einklang damit ebenfalls eine verminderte Aktivität dieses Signalwegs in verschiedenen Zelllinien nach Einfluss simulierter Mikrogravitation. In diesen Studien konnten verminderte *AKT*- und *PI3K*-Expressionen und erhöhte Expression von *PTEN* bzw. Synthese von PTEN-Protein nachgewiesen werden

(126,131,154). In den gleichen Arbeiten wurden erhöhte Apoptoseraten, Zellzyklusarrest und verminderte Proliferation festgestellt.

Weitere Gene, welche Zellzyklus und Apoptose beeinflussen, sind *CDKN2A*, *RB1* und *TP53*. Für das Plattenepithelkarzinom der Lunge konnte anhand der hier durchgeführten Experimente gezeigt werden, dass unter simulierter Mikrogravitation die Expression von *RB1* in den adhären Zellen gesteigert wird. Auch die Proteinexpression von pRb1 in den adhären Zellen war verstärkt, jedoch ohne eine ausreichende Signifikanz zu erreichen. pRb1 besitzt eine wichtige Kontrollfunktion in der G1-Phase des Zellzyklus (siehe Kapitel 1.1.3). Daher deuten die beschriebenen Ergebnisse auf ein verzögertes Fortschreiten des Zyklus in der G1-Phase in diesen Zellen hin. Diese Hypothese wird durch die Veränderungen in der Expression der anderen, hier untersuchten Tumorsuppressorgene gestützt.

So zeigte sich bei *CDKN2A* ebenfalls eine deutlich gesteigerte Expression in den adhären Zellen nach Kultivierung auf der RPM. Dazu passend konnte für p14 eine leichte Steigerung der Synthese in den adhären RPM-Zellen (keine ausreichende Signifikanz) nachgewiesen werden. Das Protein p14 kann p53 aktivieren und so Einfluss auf Zellzyklusarrest und Apoptose nehmen (30). Bei *TP53*, welches in der Zellzykluskontrolle eine zentrale Funktion wahrnimmt (siehe Kapitel 1.1.3), wurde eine signifikant gesteigerte Expression in den adhären Zellen aus der RPM im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Jedoch war die Proteinsynthese von p53 in den gleichen Zellen signifikant reduziert. Diese Diskrepanz wurde bereits weiter oben diskutiert.

Eine gesteigerte Expression von *CDKN2A*, *TP53* und p14 weist also, im Einklang mit den Ergebnissen von *RB1* und pRb1, auf ein verzögertes Fortschreiten des Zellzyklus und damit ein vermindertes Potential der Lungenkarzinomzellen zur Proliferation hin. In den Sphäroiden konnten in diesen drei Genen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur 1g-Kontrolle festgestellt werden. Lediglich die p53-Expression war, anders als in den adhären Zellen, erhöht.

Die bisher diskutierten Ergebnisse untermauern die Aussagen vorangegangener Studien, die für andere Zelllinien die Auswirkung simulierter Mikrogravitation auf den Zellzyklus untersucht haben. Die Proteine pRb1, p53 und p14 haben eine Kontrollfunktion beim Übertritt von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus (siehe Kapitel 1.1.3). Daher liegt vor dem

Hintergrund der hier erhobenen Ergebnisse die Vermutung nahe, dass der Zellzyklus durch den Einfluss von Mikrogravitation verzögert wird und die Zellen potentiell in der G0/G1-Phase arretiert werden. Dies konnte in anderen Arbeiten für humane Endothelzellen (155) und Thymus- und Milzzellen der Maus bestätigt werden (156). In der letztgenannten Studie wurde für *CDKN2A*, in Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Ergebnissen, eine verstärkte Expression nach Einfluss von Mikrogravitation nachgewiesen (156). Weitere Arbeiten zeigten ebenfalls eine erhöhte *CDKN2A*- und p14-Expression (157,158), Vidyasekar et al. haben für eine Leukämie-Zelllinie eine hochregulierte Expression von *RB1* nachweisen können, wenn diese unter simulierter Mikrogravitation kultiviert wurde (111).

Insgesamt ergibt sich durch die hier und vorangehend erhobenen Daten das Bild verminderter Proliferation durch verändertes Voranschreiten des Zellzyklus nach Kultivierung verschiedener Zellen in Mikrogravitation. Dies gilt für die Plattenepithelkarzinomzellen der Lunge jedoch nur für die adhärenen Zellen. In den Sphäroiden konnte lediglich für p53 eine veränderte Proteinexpression festgestellt werden. Dennoch kann die vorliegende Arbeit dazu beitragen, die Ursachen für die in Kapitel 1.3.2 dargelegte, deutlich reduzierte Proliferation von Zellen unter Mikrogravitation zu beleuchten.

Oxidativer Stress und Zelldifferenzierung

Das *NFE2L2*-Protein agiert als Transkriptionsfaktor und ist elementarer Teil der Schutzmechanismen der Zelle gegen oxidativen Stress (38). Dementsprechend bedeutet eine verminderte Aktivität von *NFE2L2* eine verminderte Abwehrfähigkeit der Zelle gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die Herunterregulation von *NFE2L2* unter Mikrogravitationsbedingungen konnte sowohl für Leberzellen der Maus (13,5 Tage im All) als auch bei Astronauten (6 Monate auf der ISS) nachgewiesen werden (159,160). Beide Studien konnten eine insgesamt verminderte Abwehrfähigkeit der Zellen gegenüber oxidativem Stress und anderen Stressoren feststellen. Andererseits konnte eine erhöhte *NFE2L2*-Aktivität in vielen Tumorzelllinien nachgewiesen werden, darunter auch beim Plattenepithelkarzinom der Lunge (26,161,162). Aktivitätssteigerung in diesem Gen durch Mutation kann beim Lungenkarzinom zu verstärktem Tumorwachstum, erhöhter Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und zu einer schlechten Prognose führen (40,161,163). Die Expression von *NFE2L2* zeigte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine signifikanten Veränderungen nach

Kultivierung unter simulierter Mikrogravitation, weder in den adhärenen Zellen noch in den Sphäroiden. So lassen die hier erhobenen Daten den Schluss zu, dass durch die RPM-Bedingungen weder die *NFE2L2*-getriggerte Abwehr oxidativen Stresses beeinträchtigt ist, noch die Malignität der Tumorzellen durch eine gesteigerte *NFE2L2*-Aktivität erhöht wird.

SOX2 war das einzige gemessene Protoonkogen, bei dem eine signifikante Veränderung der Expression nach 72 Stunden auf der RPM nachgewiesen werden konnte. Dies war jedoch nur in den adhärenen Zellen der Fall, die Genexpression war signifikant hochreguliert. Die Proteinsynthese war im Gegensatz dazu signifikant herunterreguliert. In den Sphäroiden zeigten sich weder in der Gen- noch in der Proteinexpression signifikante Veränderungen.

Die Anzahl vergleichbarer Ergebnisse zu *SOX2*, Tumorzellen und Mikrogravitation ist begrenzt. Nur für andere Mitglieder der SOX-Familie liegen Ergebnisse hinsichtlich der Genexpression in Tumorzellen unter veränderten Gravitationsbedingungen vor. So konnten Bauer et al. für *SOX8*, *-9* und *-10* nachweisen, dass die Expression in adhärenen Zellen aus einer RPM ebenfalls deutlich stärker erhöht war als die in Sphäroiden (164,165). Für *SOX4* zeigte sich bei Zellen des Zervixkarzinoms in einer weiteren Studie eine erhöhte Genexpression und Proteinsynthese des *SOX4*-Proteins nach Aufenthalt der Zellen im Weltall (166). Dabei wurde jedoch nicht zwischen adhärenen Zellen und Sphäroiden unterschieden. Die Genexpression von *SOX2* unter Mikrogravitation wurde vor allem für Stammzellen (sowohl embryonale als auch adulte) untersucht. Dabei zeigten sich in der Mehrzahl der Studien keine signifikanten Veränderungen (167,168), wie auch in den Sphäroiden der vorliegenden Arbeit.

Die Überexpression von *SOX2* ist bereits als eine Komponente der Genese des Lungenkarzinoms identifiziert (36). Jedoch konnten Wilbertz et al. für Plattenepithelkarzinome der Lunge nachweisen, dass *SOX2*-Amplifikationen und eine Überexpression von *SOX2*-Protein mit einem besseren Outcome für die Patienten verbunden ist (u.a. aufgrund geringerer Tumorgröße und Metastasierungsrate im Vergleich zu Lungentumoren mit geringer *SOX2*-Expression) (37). Daher kann aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bezüglich Genexpression/Proteinsynthese und den unterschiedlichen molekularbiologischen und klinischen Erkenntnissen zu *SOX2* keine eindeutige Schlussfolgerung zu den Konsequenzen der

gefundenen Veränderungen in den Lungenkarzinomzellen getroffen werden. Es bleiben die Daten weiterer Studien zum Lungenkarzinom, *SOX2* und Mikrogravitation abzuwarten.

4.3 Apoptoserate

Die Apoptoserate zeigte sowohl nach 24 als auch nach 72 Stunden deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und adhärenen Zellen aus der RPM einerseits und Sphäroiden andererseits. Die beiden erstgenannten Zellpopulationen wiesen nach 72 Stunden einen Anteil von apoptotischen Zellen von ca. 11% bzw. 13% auf, in den Sphäroiden waren 86% aller Zellen apoptotisch. Nach 24 Stunden unterschieden sich Kontrolle und adhärenente Zellen noch hoch signifikant (3% vs. 12%). Die Apoptoserate in den Sphäroiden und in den adhärenen Zellen blieb von 24 Stunden auf 72 Stunden konstant. Nur die Kontrolle zeigte im Vergleich zu 24 Stunden eine signifikant höhere Rate an apoptotischen Zellen nach 72 Stunden. Zusammenfassend konnte dementsprechend eine deutlich gesteigerte Apoptose in den unter simulierter Mikrogravitation kultivierten Zellen gezeigt werden und so die anfängliche aufgestellte Hypothese 4 zur Apoptoserate bestätigt werden.

Die Rate apoptotischer Zellen beim Lungenkarzinom *in vivo* beträgt in unterschiedlichen Studien zwischen 1,2% und 2,3% (55–57). Dies spiegelt sich nach 24 Stunden in den Zellen der Kontrolle wider (3%). Ein Anstieg der Apoptoserate mit fortschreitender Zeit, wie in der Kontrollgruppe festgestellt (von ca. 3% auf ca. 11% nach 72 Stunden), ist für Lungenkarzinomzellkulturen bereits beschrieben (169,170) und kann durch die zunehmende Zelldichte in der Kulturflasche erklärt werden (171).

Die erhöhte Apoptoserate in unter echter und simulierter Mikrogravitation kultivierten Zellkulturen ist bereits für viele andere Zelllinien untersucht und belegt (siehe Kapitel 1.3.2.1). Die dort zitierten Studien zeigen, dass die Schwankungsbreite des Anteils an apoptotischen Zellen dabei groß ist. Die ermittelten Apoptoseraten betragen maximal 40-50 % (126,130). In Relation dazu ist die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Apoptoserate der Sphäroide (86 – 88%) höher. Durch die Kultivierungsdauer kann dieser hohe Anteil nicht erklärt werden. Zum einen ist bereits nach 24 Stunden eine Apoptoserate von 88% erhoben worden, zum anderen ist diese auch in den vorangegangenen Studien zu vergleichbaren Zeitpunkten gemessen

worden. Weiterhin ist, wie oben diskutiert, auch die Größe der Sphäroide wahrscheinlich kein Grund für die erhöhte Apoptoserate.

Ein suffizienterer Erklärungsansatz berücksichtigt die Tatsache, dass in vorangegangenen Studien selten zwischen adhärennten und sphäroidalen Zellen unterschieden wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass es zwischen diesen beiden Zellpopulationen gravierende Unterschiede hinsichtlich des Anteils apoptotischer Zellen geben kann. Diese Beobachtung wird durch die bereits erwähnte Studie von Masiello et al. (116) untermauert. Die Autoren unterschieden bei Brustkrebszellen ebenfalls zwischen den zwei Zellpopulationen (adhärente und sphäroidale Zellen) und untersuchten die gleichen Zeitpunkte (24 und 72 Stunden) wie in der vorliegenden Arbeit. Es konnte eine signifikante Differenz in der Apoptoserate zwischen Sphäroiden und adhärennten Zellen beschrieben werden (ca. 11 – 12% bei den Sphäroiden vs. ca. 4 – 7% bei den adhärennten Zellen).

Wenn man in der hier vorliegenden Arbeit die Zellen aus der Random Positioning Machine (adhärente Zellen und Sphäroide) als eine gemeinsame Zellpopulation betrachtet, dann ergibt sich eine Apoptoserate von ca. 50% nach 24 und 72 Stunden. Somit liegt die hier ermittelte Apoptoserate in dem Bereich, den auch andere Studien ermitteln konnten.

Als mitursächlich für die erhöhte Apoptoserate können Veränderungen in der Genexpression und der Proteinsynthese nach Kultivierung in simulierter Mikrogravitation angenommen werden. Die Analyse zeigt eine hoch signifikante Erhöhung des p53-Proteins und eine leicht erhöhte Genexpression von *TP53* in den Sphäroiden (keine Signifikanz). Wie in Kapitel 1.1.3 dargestellt, ist das p53-Protein ein entscheidender Regulator des Zellzyklus und kann Apoptose initiieren. Daher ist die erhöhte Apoptoserate potentiell durch die erhöhte p53-Synthese mitbedingt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer Studie von Grimm et al. (127). Diese konnte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen erhöhter Apoptoserate und Erhöhung von p53 unter simulierter Mikrogravitation nachweisen. Das Protein p53 scheint eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Apoptose unter Mikrogravitationsbedingungen zu spielen. Bei Säugetieren konnten auch nach Einfluss echter Mikrogravitation erhöhte p53-Werte nachgewiesen werden (172,173).

Auch die bereits weiter oben diskutierten Veränderungen der Genexpression von *RB1*, *CDKN2A* und *PTEN* sind ein suffizienter Erklärungsansatz für die Erhöhung der Apoptoserate.

Darüber hinaus konnten mehrere Studien veränderte Expressionsmuster in Genen der Bcl2-Familie unter $s\text{-}\mu\text{g}$ als weiteren Grund für die veränderte Apoptoserate feststellen. Es wurde eine deutlich verringerte Expression von Bcl2 (anti-apoptotisch) und eine erhöhte Expression von Bax (pro-apoptotisch) beschrieben (112,127,131). Zusätzlich war in zwei Studien die Expression von drei, für die Apoptose eminent wichtigen, Caspasen (3, 8 und 9) unter $s\text{-}\mu\text{g}$ kultivierten Zellen erhöht (112,131).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen dementsprechend im Einklang mit den bereits erhobenen Daten anderer Studien. Es konnte jedoch nun zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass auch beim Lungenkarzinom die Apoptoserate in Zellen, die simulierter Mikrogravitation ausgesetzt werden, signifikant ansteigt. So kann die anfänglich aufgestellte Hypothese 4 zur Veränderung der Apoptoserate angenommen werden. Zusätzlich konnten auch hier Expressionsveränderungen in Genen identifiziert werden, durch die potentiell die Apoptose verstärkt initiiert wird.

Die vorliegende Arbeit hat sich zum ersten Mal ausführlich mit den Auswirkungen simulierter Mikrogravitation auf Zellen des Plattenepithelkarzinoms der Lunge beschäftigt. Nach Diskussion aller Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass aufgrund erhöhter Expression der Tumorsuppressorgene, des folglich mutmaßlich verzögerten Zellzyklus und der hohen Apoptoserate die Malignität der Karzinomzellen durch den Einfluss der RPM-Bedingungen potentiell vermindert sein könnte. Damit konnten die meisten der in der Einleitung aufgestellten Hypothesen bestätigt werden. Nichtsdestotrotz fügen sich nicht alle erhobenen Ergebnisse in dieses Bild ein. Die beschriebene vermehrte Ausbildung von Pseudopodien und die damit anzunehmend erhöhte Migrationsfähigkeit der Zellen sind eher mit einem erhöhten Metastasierungspotential assoziiert. Weiterhin erschwert die Diskrepanz mancher der für die Sphäroide einerseits und die adhären Zellen andererseits erhobenen Ergebnisse eine gemeinsame Schlussfolgerung für beide Zellarten. Daher ist es nötig, weitere Experimente mit Plattenepithelkarzinomzellen der Lunge in simulierter, vor allem aber auch echter Mikrogravitation durchzuführen, um die hier erhobenen Daten zu validieren bzw. zu erweitern.

Als eindeutiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit lässt sich jedoch festhalten, dass simulierte Mikrogravitation zur Bildung dreidimensionaler Strukturen der Lungenkarzinomzellen führt. Wie in der Einleitung dargelegt, können diese Strukturen als Modelle in der Grundlagenforschung und klinischen Forschung behilflich sein, die Verhältnisse im menschlichen Körper, zumindest in Teilaspekten, exakter zu simulieren als zweidimensionale Modelle. Die Möglichkeit, solche Modelle für Plattenepithelkarzinomzellen der Lunge mittels einer Random Positioning Machine reproduzierbar zu generieren, konnte durch die vorliegende Arbeit erstmals aufgezeigt werden.

4.4 Einsatz der Random Positioning Machine

Zur Untersuchung des Einflusses von Mikrogravitation auf die Lungenkarzinomzellen wurde die Random Positioning Machine eingesetzt, mit deren Hilfe Mikrogravitation simuliert werden kann. Die Frage, inwieweit die Ergebnisse, die mittels der RPM erhoben wurden, mit Ergebnissen aus echter Mikrogravitation übereinstimmen, war bereits Gegenstand mehrerer Studien.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeiten so interpretieren, dass die RPM Ergebnisse liefert, welche zwischen denen von 1g-Kulturen und Kulturen aus echter Mikrogravitation einzuordnen sind. Manche Studien konnten mit der RPM, im Vergleich zu unter echter Mikrogravitation durchgeführten Experimenten, sehr ähnliche Daten erheben (134,174–176). Dabei sind die Ergebnisse von RPM und echter μg nicht identisch, zeigen aber oft hohe qualitative und teilweise auch quantitative Übereinstimmungen. So konnten Schwarzenberg et al. fast vollständig übereinstimmende Mitoseindices für Zellen aus RPM-Experimenten und solchen von mehreren Weltraummissionen nachweisen (174). Auch Aleshcheva et al. konnten für Chondrozyten, die auf Parabelflügen (echte μg) kultiviert wurden, bei fast allen untersuchten Genen und Proteinen ein in ähnlicher Weise verändertes Expressionsmuster finden wie bei auf der RPM kultivierten Chondrozyten (175,176). Jedoch stimmten die in den gleichen Studien ebenfalls untersuchten morphologischen Veränderungen des Zellskeletts nicht gut überein. Auch in anderen Studien sind weniger gut übereinstimmende Ergebnisse gefunden worden. Partiiell zeigten die Ergebnisse einen ähnlichen Trend bei RPM-Experimenten und echter Mikrogravitation, die Ausprägungen der

beobachteten Veränderungen unterschied sich jedoch (107,177). Teilweise zeigten sich auch genau gegensätzliche Ergebnisse, zum Beispiel in der Genexpression (107,177).

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für die existierenden Unterschiede in den Ergebnissen, die aus Experimenten in echter Mikrogravitation einerseits und mit der Random Positioning Machine andererseits stammen. Bei der Arbeit mit der RPM treten Störfaktoren auf (siehe Kapitel 1.3.2.2), die in echter μg nicht zu beachten sind. Dazu gehören Zentrifugalbeschleunigung, andere Beschleunigungskräfte und Bewegungen der Flüssigkeit in den Zellkulturflaschen. Diese mechanischen Kräfte können zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen, da sie bei Experimenten im Weltall keine Rolle spielen (133). Andererseits wirken auch bei Weltraumflügen Kräfte auf die Zelle ein, die die Experimente in „reiner“ Mikrogravitation stören und zusätzlich nicht auf der RPM simuliert werden. Bei Start und Landung sind die Zellen starken Geschwindigkeitsveränderungen und Vibrationen ausgesetzt und im Weltall zusätzlich kosmischer Strahlung (178,179). Dies kann das Verhalten der Zellen und zellulärer Prozesse beeinflussen (178) und deshalb die Vergleichbarkeit mit Arbeiten mit der RPM dementsprechend zusätzlich reduzieren.

Weiterhin muss bei Vergleichen der RPM-Ergebnisse mit Ergebnissen aus echter μg , erzeugt durch Parabelflüge, darauf geachtet werden, dass eine komplette Parabel nicht nur aus einer Mikrogravitationsphase, sondern auch aus zwei Hypergravitationsphasen besteht (109). Durch diese Phasen können Veränderungen, die sich in der Mikrogravitations-Phase eingestellt haben, zumindest teilweise wieder rückgängig gemacht werden (175). Daher wird auf Parabelflügen keine „reine“ echte Mikrogravitation erreicht. Dies zeigt sich nach Ma et al. auch darin, dass Ergebnisse aus dem Weltall und Parabelflügen (beides freier Fall, also „echte“ Mikrogravitation) nicht identisch sind, sondern teilweise deutlich voneinander differieren (179).

Zusammenfassend lässt sich die Hypothese formulieren, dass Experimente mit der RPM trotz einiger Einschränkungen und zu beachtender Störfaktoren zu einer Annäherung an die Ergebnisse aus echter Mikrogravitation beitragen. Daher ist die Annahme zu treffen, dass die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse für Lungenkarzinomzellen ebenfalls eine suffiziente Annäherung an Ergebnisse in echter Mikrogravitation sind. In Zukunft können die

hier erhobenen Ergebnisse als Referenz für die Planung, Vorbereitung und Durchführung von Experimenten mit Lungenkarzinomzellen in echter Mikrogravitation dienen.

Darüber hinaus sollten die auf der RPM erzielten Ergebnisse auch losgelöst von ihrer Vergleichbarkeit mit echter μg betrachtet werden. Dadurch, dass die Zellen den besonderen Bedingungen der RPM ausgesetzt werden, kommt es bewiesenermaßen zu deutlichen Veränderungen in verschiedenen zellulären Systemen. Vor allem die signifikante Erhöhung der Apoptoserate in den Sphäroiden sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die Induktion von Apoptose in Lungenkarzinomzellen in vivo könnte ein Ansatz für medikamentöse Therapeutika sein, um die Vitalität des Tumors zu reduzieren.

5. Zusammenfassung

Das Lungenkarzinom gehört zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen in Deutschland. Aufgrund dessen stellt es eine besondere Herausforderung für das Gesundheitswesen dar und wird intensiv beforscht. Unter üblichen Laborbedingungen bilden Zellen jedoch meist zweidimensionale Monolayer, was mit einer Veränderung der Morphologie der Zellen und weiterer zellulärer Prozesse einhergehen kann. Solche Veränderungen *in vitro* können durch Kultivierung der Zellen als dreidimensionale Strukturen zum Teil verhindert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob der Einfluss simulierter Mikrogravitation auf Plattenepithelkarzinomzellen der Lunge zur Ausbildung dreidimensionaler Zellstrukturen (Sphäroide) führt. Zusätzlich wurden Veränderungen in Morphologie und Zytoskelett, bei der Expression von für die Genese des Lungenkarzinoms relevanter Gene und Proteine sowie der Apoptoserate untersucht. Dazu wurden die Zellen auf einer Random Positioning Machine (RPM) kultiviert, mittels Durchlicht- und Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie (nach Anfärbung der F-Aktinfasern mit Phalloidin), RT-qPCR, WesternBlot und TUNEL-Methode untersucht und mit Kontrollzellen verglichen.

Bereits nach 24 Stunden auf der RPM bildeten die Lungenkarzinomzellen Sphäroide. Das Zytoskelett dieser Zellen zeigte deutliche Veränderungen. Die F-Aktinfasern waren konzentrisch angeordnet, die Dichte der Fasern perinukleär war reduziert. Dafür akkumulierten die F-Aktinfasern unmittelbar unterhalb der Zellmembran. Die Genexpression aller untersuchten Tumorsuppressorgene war in den weiter adhären Zellen aus der RPM signifikant hochreguliert. Das einzige Protoonkogen, welches in den adhären Zellen eine veränderte Expression zeigte, war *SOX2* (Hochregulation, 1,9x). In den Sphäroiden zeigte sich bei keinem Gen eine signifikante Veränderung. Die ebenfalls untersuchte Proteinsynthese korrelierte nur zum Teil mit der Genexpression. Darüber hinaus wurde eine hohe Apoptoserate in den Sphäroiden nach 24 und 72 Stunden beobachtet (88,55% und 86,43%). In den adhären Zellen betrug diese nach 24 Stunden 12,01% und nach 72 Stunden 13,06%.

Die Bildung dreidimensionaler Zellverbände durch den Einfluss simulierter Mikrogravitation konnte zum ersten Mal für Plattenepithelkarzinomzellen der Lunge beschrieben werden. So konnte reproduzierbar ein dreidimensionales Zellkulturmodell für diese Zellen etabliert werden. Die erhöhte Apoptoserate und die gesteigerte Expression der Tumorsuppressorgene weisen zusammenfassend auf eine potentiell verminderte Malignität hin und die weitere

Erforschung der zugrundeliegenden Ursachen könnte neue therapeutische Optionen erschließen.

6. Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland |2015/2016| Krebs gesamt. 2019. Verfügbar:https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c00_97_krebs_gesamt.pdf?__blob=publicationFile. Zugriffen am 02.02.2020
2. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland |2015/2016| Lunge C33, C34. 2019. Verfügbar:https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c33_c34_lunge.pdf?__blob=publicationFile. Zugriffen am 02.02.2020
3. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. VOLUME 83 Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC. 2004;83.
4. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: Collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *British Medical Journal*. 2005;330(7485):223–6.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe). Leitlinienprogramm Onkologie: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0, AWMF-Registernummer: 020/007QL. 2018. p. 1–417. Verfügbar: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Lungenkarzinom/LL_Lungenkarzinom_Langversion_1.0.pdf. Zugriffen am 04.03.2019
6. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;10(9):1243–60.
7. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Seminars in Roentgenology*. 2005 Apr;40(2):90–7.
8. Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small Cell Lung Cancer. *Mayo Clinic Proceedings*. 2008 Mar;83(3):355–67.
9. MacDonald SLS, Hansell DM. Staging of non-small cell lung cancer: Imaging of intrathoracic disease. *European Journal of Radiology*. 2003;45(1):18–30.
10. Cooper WA, Lam DCL, O’Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *Journal of thoracic disease*. 2013 Oct;5 Suppl 5(Suppl 5):S479–90.
11. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2003 Nov;544(2–3):99–106.

12. Reinmuth N, De Ruyscher D, Kerr KM, Peters S, Popat S, Reck M. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2014;25(suppl 3):iii27–39.
13. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai CM, et al. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: A meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(9):595–605.
14. Dutt A, Ramos AH, Hammerman PS, Mermel C, Cho J, Sharifnia T, et al. Inhibitor-Sensitive FGFR1 Amplification in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*. 2011 Jun 7;6(6):e20351.
15. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, et al. Mutations in the DDR2 Kinase Gene Identify a Novel Therapeutic Target in Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Discovery*. 2011 Jun;1(1):78–89.
16. Sequist L V., Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Annals of Oncology*. 2011 Dec;22(12):2616–24.
17. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1069–75.
18. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ, Oxnard GR, Moreira AL, et al. Clarifying the Spectrum of Driver Oncogene Mutations in Biomarker-Verified Squamous Carcinoma of Lung: Lack of EGFR/KRAS and Presence of PIK3CA/AKT1 Mutations. *Clinical Cancer Research*. 2012 Feb 15;18(4):1167–76.
19. Ohtsuka K, Ohnishi H, Fujiwara M, Kishino T, Matsushima S, Furuyashiki G, et al. Abnormalities of epidermal growth factor receptor in lung squamous-cell carcinomas, adenosquamous carcinomas, and large-cell carcinomas. *Cancer*. 2007 Feb 15;109(4):741–50.
20. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, Grazia Sciarrotta M, Guetti L, Chella A, et al. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Sep 10;29(26):3574–9.
21. Sadiq AA, Salgia R. MET As a Possible Target for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Mar 10;31(8):1089–96.
22. Go H, Jeon YK, Park HJ, Sung S-W, Seo J-W, Chung DH. High MET Gene Copy Number Leads to Shorter Survival in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2010 Mar;5(3):305–13.

23. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current Biology*. 1997 Apr;7(4):261–9.
24. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 2007 Jun;129(7):1261–74.
25. Li W, Zhang T, Guo L, Huang L. Regulation of PTEN expression by noncoding RNAs. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(1):1–12.
26. Hammerman PS, Voet D, Lawrence MS, Voet D, Jing R, Cibulskis K, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519–25.
27. Kawano O, Sasaki H, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H, et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2006;54(2):209–15.
28. Jin G, Kim MJ, Jeon H-S, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*. 2010 Sep;69(3):279–83.
29. Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(3):165–7.
30. Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: An unsettled case. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(9):663–73.
31. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995;81(3):323–30.
32. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature Genetics*. 2009 Nov 4;41(11):1238–42.
33. Avilion AA. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*. 2003 Jan 1;17(1):126–40.
34. Que J, Luo X, Schwartz RJ, Hogan BLM. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development*. 2009 Jun 1;136(11):1899–907.
35. Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam K-T, Kurotani R, Morrisey EE, et al. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*. 2007 May 23;134(13):2521–31.
36. Lu Y, Futtner C, Rock JR, Xu X, Whitworth W, Hogan BLM, et al. Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS ONE*. 2010;5(6).

37. Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl A-C, Scheble VJ, Maier S, et al. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Modern Pathology*. 2011 Jul 1;24(7):944–53.
38. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994 Oct 11;91(21):9926–30.
39. Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Sep 9;105(36):13568–73.
40. Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, et al. Loss of Keap1 Function Activates Nrf2 and Provides Advantages for Lung Cancer Cell Growth. *Cancer Research*. 2008 Mar 1;68(5):1303–9.
41. Zhang Y, Zhan C, Shi Y, Jiang W, Ma J, Wang L, et al. Identification of reference genes for qRT-PCR in human lung squamous-cell carcinoma by RNA-Seq. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2014;46(4):330–7.
42. Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: An Overview of the Process and Its Relevance in Disease. *Advances in Pharmacology*. 1997. p. 1–34.
43. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007 Jun 25;35(4):495–516.
44. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*. 2005 Mar 1;5:231.
45. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):485–95.
46. Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, Kerr JFR. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *The Journal of Pathology*. 1975 Jul;116(3):129–38.
47. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1995 Nov;33(4):781–96.
48. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *British medical bulletin*. 1997;53(3):451–65.
49. Ashkenazi A. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305–8.
50. Nagata S. Apoptosis by Death Factor. *Cell*. 1997 Feb;88(3):355–65.

51. Saelens X, Festjens N, Walle L Vande, Gurp M van, Loo G van, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2861–74.
52. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*. 2002 Sep;2(9):647–56.
53. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*. 2005 Feb 2;4(2):147–71.
54. Kothakota S. Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science*. 1997 Oct 10;278(5336):294–8.
55. O'NEILL AJ, STAUNTON MJ, GAFFNEY EF. Apoptosis occurs independently of bcl-2 and p53 over-expression in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology*. 1996 Jul;29(1):45–50.
56. Törmänen U, Eerola AK, Rainio P, Vähäkangas K, Soini Y, Sormunen R, et al. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer research*. 1995 Dec 1;55(23):5595–602.
57. Gaffney EF, O'Neill AJ, Staunton MJ. In situ end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*. 1995 Nov 1;48(11):1017–21.
58. Sirzén F, Zhivotovsky B, Nilsson A, Bergh J, Lewensohn R. Higher spontaneous apoptotic index in small cell compared with non-small cell lung carcinoma cell lines; lack of correlation with Bcl-2/Bax. *Lung Cancer*. 1998 Oct;22(1):1–13.
59. Xu C-X, Jin H, Cho M-H. Apoptosis and Apoptosis-Based Therapy in Lung Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2009 Nov 1;9(9):952–7.
60. Joseph B, Ekedahl J, Sirzen F, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Differences in Expression of Pro-Caspases in Small Cell and Non-small Cell Lung Carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999 Aug;262(2):381–7.
61. Joseph B, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Role of Apoptosis in the Response of Lung Carcinomas to Anti-Cancer Treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006 Jan 25;926(1):204–16.
62. Herbst RS, Heymach J V., Lippman SM. Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008 Sep 25;359(13):1367–80.
63. Mayne R, Vail MS, Mayne PM, Miller EJ. Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976 May;73(5):1674–8.

64. Semino CE, Merok JR, Crane GG, Panagiotakos G, Zhang S. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation*. 2003;71(4–5):262–70.
65. Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Mar 16;107(11):4872–7.
66. Meyers J, Craig J, Odde DJ. Potential for Control of Signaling Pathways via Cell Size and Shape. *Current Biology*. 2006 Sep;16(17):1685–93.
67. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*. 1997 May 30;276(5317):1425–8.
68. Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*. 2002 Dec;70(9–10):537–46.
69. Yamada KM, Cukierman E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*. 2007;130(4):601–10.
70. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. 2018;14(4):910–9.
71. Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;15(6):753–62.
72. Reschner A, Heberer M, Ploegert S, Spagnoli GC, Martin I, Ghosh S, et al. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology*. 2005;204(2):522–31.
73. Barbone D, Van Dam L, Follo C, Jithesh P V., Zhang S-D, Richards WG, et al. Analysis of Gene Expression in 3D Spheroids Highlights a Survival Role for ASS1 in Mesothelioma. *PLOS ONE*. 2016 Mar 16;11(3):e0150044.
74. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014;345(6194).
75. Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discovery*. 2017;22(5):456–72.
76. Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity. *Nature Medicine*. 1998 Aug;4(8):901–7.

77. Riwaldt S, Bauer J, Wehland M, Slumstrup L, Kopp S, Warnke E, et al. Pathways regulating spheroid formation of human follicular thyroid cancer cells under simulated microgravity conditions: A genetic approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(4):1–20.
78. Aleshcheva G, Corydon TJ, Grimm D, Infanger M, Islam T, Bauer J, et al. Identifications of novel mechanisms in breast cancer cells involving duct-like multicellular spheroid formation after exposure to the Random Positioning Machine. *Scientific Reports*. 2016;6(1):1–18.
79. Santini MT, Rainaldi G, Romano R, Ferrante A, Clemente S, Motta A, et al. MG-63 human osteosarcoma cells grown in monolayer and as three-dimensional tumor spheroids present a different metabolic profile: A ¹H NMR study. *FEBS Letters*. 2004;557(1–3):148–54.
80. Hauptmann S, Denkert C, Lührke H, Tietze L, Ott S, Klosterhalfen B, et al. Integrin expression on colorectal tumor cells growing as monolayers, as multicellular tumor spheroids, or in nude mice. *International Journal of Cancer*. 1995 Jun 9;61(6):819–25.
81. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology*. 2007;1(1):84–96.
82. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*. 2008;3(9–10):1172–84.
83. Alvarez-Pérez J, Ballesteros P, Cerdán S. Microscopic images of intraspheroidal pH by ¹H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*. 2005 Dec 18;18(6):293–301.
84. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, De Bartolo L, Drioli E, Bader A. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*. 2007;28(36):5487–97.
85. Vaupel P, Höckel M, Mayer A. Detection and Characterization of Tumor Hypoxia Using pO₂ Histograms. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007 Aug;9(8):1221–36.
86. Court W, Lomas C, Boxall F, Zimmermann M, Vinci M, Mendiola M, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology*. 2012;10(1):29.
87. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 2011;136(3):473–8.
88. Gómez-Lechón MJ, Jover R, Donato T, Ponsoda X, Rodríguez C, Stenzel KG, et al. Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *Journal of Cellular Physiology*. 1998 Dec;177(4):553–62.

89. Zhang X, Larsson R, Gustafsson M, Senkowski W, Fryknas M, Olofsson MH, et al. Three-Dimensional Cell Culture-Based Screening Identifies the Anthelmintic Drug Nitazoxanide as a Candidate for Treatment of Colorectal Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015;14(6):1504–16.
90. Gunness P, Mueller D, Shevchenko V, Heinzle E, Ingelman-Sundberg M, Noor F. 3D organotypic cultures of human heparg cells: A tool for in vitro toxicity studies. *Toxicological Sciences*. 2013;133(1):67–78.
91. Loessner D, Stok KS, Lutolf MP, Hutmacher DW, Clements JA, Rizzi SC. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials*. 2010;31(32):8494–506.
92. Karlsson H, Fryknäs M, Larsson R, Nygren P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Experimental Cell Research*. 2012;318(13):1577–85.
93. Meenach SA, Tsoras AN, McGarry RC, Mansour HM, Hilt JZ, Anderson KW. Development of three-dimensional lung multicellular spheroids in air- and liquid-interface culture for the evaluation of anticancer therapeutics. *International Journal of Oncology*. 2016 Apr;48(4):1701–9.
94. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2017 Sep 25;7(3):339–48.
95. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*. 2014 Sep 5;6(3):1769–92.
96. Storch K, Eke I, Borgmann K, Krause M, Richter C, Becker K, et al. Three-Dimensional Cell Growth Confers Radioresistance by Chromatin Density Modification. *Cancer Research*. 2010 May 15;70(10):3925–34.
97. Durand RE, Sutherland RM. Growth and Radiation Survival Characteristics of V79-171b Chinese Hamster Cells: A Possible Influence of Intercellular Contact. *Radiation Research*. 1973 Dec;56(3):513.
98. Karmali F, Shelhamer M. The dynamics of parabolic flight: Flight characteristics and passenger percepts. *Acta Astronautica*. 2008 Sep;63(5–6):594–602.
99. ZARM. The Bremen Drop Tower. Verfügbar: <https://www.zarm.uni-bremen.de/de/fallturm/allgemeine-informationen.html>. Zugriff am 29.04.2019
100. Ruyters G, Friedrich U. From the Bremen Drop Tower to the international space station ISS – Ways to weightlessness in the German space life sciences program. *Signal Transduction*. 2006 Dec;6(6):397–405.

101. Leblanc A, Schneider V, Shackelford L, West S, Oganov V, Bakulin A, et al. Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. 2000; 1(2):157-160.
102. Demontis GC, Germani MM, Caiani EG, Barravecchia I, Passino C, Angeloni D. Human Pathophysiological Adaptations to the Space Environment. *Frontiers in Physiology*. 2017 Aug 2;8(August):1–17.
103. Norsk P. Blood pressure regulation IV: adaptive responses to weightlessness. *European Journal of Applied Physiology*. 2014 Mar 5;114(3):481–97.
104. Crucian B, Stowe RP, Mehta S, Quiariarte H, Pierson D, Sams C. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. *npj Microgravity*. 2015 Nov 3;1(1):15013.
105. Crucian BE, Choukèr A, Simpson RJ, Mehta S, Marshall G, Smith SM, et al. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Frontiers in Immunology*. 2018 Jun 28;9(JUN):1–21.
106. Mader TH, Gibson CR, Pass AF, Kramer LA, Lee AG, Fogarty J, et al. Optic Disc Edema , Globe Flattening , Choroidal Folds , and Hyperopic Shifts Observed in Astronauts after Long-duration Space Flight. *OPHTHA*. 2011;118(10):2058–69.
107. Pietsch J, Ma X, Wehland M, Aleshcheva G, Schwarzwälder A, Segerer J, et al. Spheroid formation of human thyroid cancer cells in an automated culturing system during the Shenzhou-8 Space mission. *Biomaterials*. 2013;34(31):7694–705.
108. Wehland M, Aleshcheva G, Schulz H, Saar K, Hübner N, Hemmersbach R, et al. Differential gene expression of human chondrocytes cultured under short-term altered gravity conditions during parabolic flight maneuvers. *Cell Communication and Signaling*. 2015;13(1):1–13.
109. Grosse J, Wehland M, Pietsch J, Ma X, Ulbrich C, Schulz H, et al. Short-term weightlessness produced by parabolic flight maneuvers altered gene expression patterns in human endothelial cells. *The FASEB Journal*. 2012 Feb;26(2):639–55.
110. Kapitonova MY, Salim N, Othman S, Muhd Kamauzaman TMHT, Ali AM, Nawawi HM, et al. Alteration of cell cytoskeleton and functions of cell recovery of normal human osteoblast cells caused by factors associated with real space flight. *Malaysian Journal of Pathology*. 2013;35(2):153–63.
111. Vidyasekar P, Shyamsunder P, Arun R, Santhakumar R, Kapadia NK, Kumar R, et al. Genome wide expression profiling of cancer cell lines cultured in microgravity reveals significant dysregulation of cell cycle and MicroRNA gene networks. *PLoS ONE*. 2015;10(8):1–20.

112. Zhao T, Deng Y, Tang X, Xiang J, Ma H, Gao H, et al. Simulated Microgravity Promotes Cell Apoptosis Through Suppressing Uev1A/TICAM/TRAF/NF- κ B-Regulated Anti-Apoptosis and p53/PCNA- and ATM/ATR-Chk1/2-Controlled DNA-Damage Response Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016;117(9):2138–48.
113. Kim YJ, Jeong AJ, Kim M, Lee C, Ye SK, Kim S. Time-averaged simulated microgravity (taSMG) inhibits proliferation of lymphoma cells, L-540 and HDLM-2, using a 3D clinostat. *BioMedical Engineering Online*. 2017;16(1):1–12.
114. Villa A, Versari S, Maier JA, Bradamante S. Cell behavior in simulated microgravity: a comparison of results obtained with RWV and RPM. *Gravitational and Space Biology Bulletin*. 2005;18(2):89–90.
115. Meloni MA, Galleri G, Pippia P, Cogoli-Greuter M. Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity. *Protoplasma*. 2006 Dec 16;229(2–4):243–9.
116. Masiello MG, Pasqualato A, D’Anselmi F, Proietti S, Bizzarri M, Coluccia P, et al. Phenotypic Switch Induced by Simulated Microgravity on MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *BioMed Research International*. 2014;2014:1–12.
117. Chang D, Xu H, Guo Y, Jiang X, Liu Y, Li K, et al. Simulated microgravity alters the metastatic potential of a human lung adenocarcinoma cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2013 Mar 13;49(3):170–7.
118. Ahn CB, Lee J-H, Han DG, Kang H-W, Lee S-H, Lee J-I, et al. Simulated microgravity with floating environment promotes migration of non-small cell lung cancers. *Scientific Reports*. 2019 Dec 10;9(1):14553.
119. Chung JH, Ahn CB, Son KH, Yi E, Son HS, Kim H-S, et al. Simulated Microgravity Effects on Nonsmall Cell Lung Cancer Cell Proliferation and Migration. *Aerospace Medicine and Human Performance*. 2017 Feb 1;88(2):82–9.
120. Ranieri D, Proietti S, Dinicola S, Masiello MG, Rosato B, Ricci G, et al. Simulated microgravity triggers epithelial mesenchymal transition in human keratinocytes. *Scientific Reports*. 2017 Dec 3;7(1):538.
121. Mao X, Chen Z, Luo Q, Zhang B, Song G. Simulated microgravity inhibits the migration of mesenchymal stem cells by remodeling actin cytoskeleton and increasing cell stiffness. *Cytotechnology*. 2016;68(6):2235–43.
122. Tan X, Xu A, Zhao T, Zhao Q, Zhang J, Fan C, et al. Simulated microgravity inhibits cell focal adhesions leading to reduced melanoma cell proliferation and metastasis via FAK/RhoA-regulated mTORC1 and AMPK pathways. *Scientific Reports*. 2018 Dec 28;8(1):3769.

123. Aleshcheva G, Bauer J, Hemmersbach R, Slumstrup L, Wehland M, Infanger M, et al. Scaffold-free Tissue Formation Under Real and Simulated Microgravity Conditions. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2016;119:26–33.
124. Ingram M, Techy GB, Saroufeem R, Yazan O, Narayan KS, Goodwin TJ, et al. Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 1997 Jun;33(6):459–66.
125. Aleshcheva G, Ma X, Corydon TJ, Wehland M, Bauer J, Svejgaard B, et al. Common Effects on Cancer Cells Exerted by a Random Positioning Machine and a 2D Clinostat. *Plos One*. 2015;10(8):e0135157.
126. Arun RP, Sivanesan Di, Vidyasekar P, Verma RS. PTEN/FOXO3/AKT pathway regulates cell death and mediates morphogenetic differentiation of Colorectal Cancer Cells under Simulated Microgravity. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–15.
127. Grimm D, Bauer J, Kossmehl P, Shakibaei M, Schöberger J, Pickenhahn H, et al. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(6):604–6.
128. Carlsson SIM, Bertilaccio MTS, Ballabio E, Maier JAM. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2003 Oct;1642(3):173–9.
129. Gershovich PM, Gershovich JG, Buravkova LB. Cytoskeleton structure and adhesion properties of human stromal precursors under conditions of simulated microgravity. *Cell and Tissue Biology*. 2009 Oct 5;3(5):423–30.
130. Qian A, Zhang W, Xie L, Weng Y, Yang P, Wang Z, et al. Simulated weightlessness alters biological characteristics of human breast cancer cell line MCF-7. *Acta Astronautica*. 2008 Oct;63(7–10):947–58.
131. Kang CY, Zou L, Yuan M, Wang Y, Li TZ, Zhang Y, et al. Impact of simulated microgravity on microvascular endothelial cell apoptosis. *European Journal of Applied Physiology*. 2011;111(9):2131–8.
132. Borst AG, van Loon JJWA. Technology and Developments for the Random Positioning Machine, RPM. *Microgravity Science and Technology*. 2009 Nov 3;21(4):287–92.
133. Wuest SL, Richard S, Kopp S, Grimm D, Egli M. Simulated microgravity: Critical review on the use of random positioning machines for mammalian cell culture. *BioMed Research International*. 2015;2015.

134. Kraft TFB, van Loon JJWA, Kiss JZ. Plastid position in *Arabidopsis columella* cells is similar in microgravity and on a random-positioning machine. *Planta*. 2000 Aug 10;211(3):415–22.
135. Leguy CAD, Delfos R, Pourquie MJBM, Poelma C, Krooneman J, Westerweel J, et al. Fluid motion for microgravity simulations in a random positioning machine. *Gravitational and Space Biology*. 2011;25(1):36–9.
136. Gavrieli Y. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 1992 Nov 1;119(3):493–501.
137. Chomzynski P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987 Apr;162(1):156–9.
138. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*. 1997 Feb;245(2):154–60.
139. Warnke E, Pietsch J, Wehland M, Bauer J, Infanger M, Görög M, et al. Spheroid formation of human thyroid cancer cells under simulated microgravity: a possible role of CTGF and CAV1. *Cell Communication and Signaling*. 2014;12(1):32.
140. Sheyn D, Pelled G, Netanely D, Domany E, Gazit D. The Effect of Simulated Microgravity on Human Mesenchymal Stem Cells Cultured in an Osteogenic Differentiation System: A Bioinformatics Study. *Tissue Engineering Part A*. 2010 Nov;16(11):3403–12.
141. Pietsch J, Sickmann A, Weber G, Bauer J, Egli M, Wildgruber R, et al. A proteomic approach to analysing spheroid formation of two human thyroid cell lines cultured on a random positioning machine. *PROTEOMICS*. 2011 May;11(10):2095–104.
142. Kelm JM, Breitbach M, Fischer G, Odermatt B, Agarkova I, Fleischmann BK, et al. 3D Microtissue Formation of Undifferentiated Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Leads to Elevated Apoptosis. *Tissue Engineering Part A*. 2012 Apr;18(7–8):692–702.
143. Kondo J, Endo H, Okuyama H, Ishikawa O, Iishi H, Tsujii M, et al. Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Apr 12;108(15):6235–40.
144. Valcárcel M, Arteta B, Jaureguibeitia A, Lopategi A, Martínez I, Mendoza L, et al. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *Journal of Translational Medicine*. 2008;6(1):57.
145. Theriot JA, Mitchison TJ. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*. 1991 Jul;352(6331):126–31.

146. Pollard TD, Borisy GG. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell*. 2003 Feb;112(4):453–65.
147. Testa F, Palombo A, Dinicola S, D'Anselmi F, Proietti S, Pasqualato A, et al. Fractal analysis of shape changes in murine osteoblasts cultured under simulated microgravity. *Rendiconti Lincei*. 2014 Mar 13;25(S1):39–47.
148. Toy MF, Pache C, Parent J, Kühn J, Egli M, Depeursinge C. Dual-mode digital holographic and fluorescence microscopy for the study of morphological changes in cells under simulated microgravity. *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XVII*. 2010. p. 75700A.
149. Kühn J. Digital holographic microscopy real-time monitoring of cytoarchitectural alterations during simulated microgravity. *Journal of Biomedical Optics*. 2010 Mar 1;15(2):026021.
150. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2004 Apr;30(2):193–204.
151. Ma Y, Wei S, Lin Y, Lung J, Chang T, Whang-peng J, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene*. 2000; 19: 2739-2744.
152. Gray JW, Shayesteh L, Lu YL, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature Genetics*. 1999;21(1):99–102.
153. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*. 2003;4(9).
154. Xu D, Guo Y-B, Zhang M, Sun Y-Q. The subsequent biological effects of simulated microgravity on endothelial cell growth in HUVECs. *Chinese Journal of Traumatology*. 2018 Aug;21(4):229–37.
155. Sokolovskaya AA, Ignashkova TI, Bochenkova A V., Moskovtsev AA, Baranov VM, Kubatiev AA. Effects of simulated microgravity on cell cycle in human endothelial cells. *Acta Astronautica*. 2014 Jun;99(1):16–23.
156. Gridley DS, Mao XW, Stodieck LS, Ferguson VL, Bateman TA, Moldovan M, et al. Changes in Mouse Thymus and Spleen after Return from the STS-135 Mission in Space. *PLoS ONE*. 2013 Sep 19;8(9):e75097.
157. Coinu R, Chiaviello A, Galleri G, Franconi F, Crescenzi E, Palumbo G. Exposure to modeled microgravity induces metabolic idleness in malignant human MCF-7 and normal murine VSMC cells. *FEBS Letters*. 2006 May 1;580(10):2465–70.
158. Cui Y, Han J, Xiao Z, Qi Y, Zhao Y, Chen B, et al. Systematic Analysis of mRNA and miRNA Expression of 3D-Cultured Neural Stem Cells (NSCs) in Spaceflight. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018 Jan 11;11(January):1–14.

159. Blaber E, Pecaut M, Jonscher K. Spaceflight Activates Autophagy Programs and the Proteasome in Mouse Liver. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Sep 27;18(10):2062.
160. Indo HP, Majima HJ, Terada M, Suenaga S, Tomita K, Yamada S, et al. Changes in mitochondrial homeostasis and redox status in astronauts following long stays in space. *Scientific Reports*. 2016 Dec 16;6(1):39015.
161. Solis LM, Behrens C, Dong W, Suraokar M, Ozburn NC, Moran CA, et al. Nrf2 and Keap1 Abnormalities in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Association with Clinicopathologic Features. *Clinical Cancer Research*. 2010 Jul 15;16(14):3743–53.
162. Kerins MJ, Ooi A. A catalogue of somatic NRF2 gain-of-function mutations in cancer. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–13.
163. Qian Z, Zhou T, Gurguis CI, Xu X, Wen Q, Lv J, et al. Nuclear factor, erythroid 2-like 2-associated molecular signature predicts lung cancer survival. *Scientific Reports*. 2015 Dec 24;5(1):16889.
164. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, et al. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 2019 Mar;1–32.
165. Bauer J, Kopp S, Schlagberger E, Grosse J, Sahana J, Riwaldt S, et al. Proteome Analysis of Human Follicular Thyroid Cancer Cells Exposed to the Random Positioning Machine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Mar 3;18(3):546.
166. Guo F, Li Y, Liu Y, Huang J, Zhang Z, Wang J, et al. Identification of genes associated with tumor development in CaSki cells in the cosmic space. *Molecular Biology Reports*. 2012 Jun 4;39(6):6923–31.
167. Blaber EA, Finkelstein H, Dvorochkin N, Sato KY, Yousuf R, Burns BP, et al. Microgravity Reduces the Differentiation and Regenerative Potential of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 2015 Nov 15;24(22):2605–21.
168. Blaber EA, Dvorochkin N, Torres ML, Yousuf R, Burns BP, Globus RK, et al. Mechanical unloading of bone in microgravity reduces mesenchymal and hematopoietic stem cell-mediated tissue regeneration. *Stem Cell Research*. 2014 Sep;13(2):181–201.
169. Wang X, Chen K, Yu Y, Xiang Y, Kim JH, Gong W, et al. Metformin sensitizes lung cancer cells to treatment by the tyrosine kinase inhibitor erlotinib. *Oncotarget*. 2017 Dec 12;8(65):109068–78.
170. Zhang L, Kavanagh BD, Thorburn AM, Camidge DR. Preclinical and clinical estimates of the basal apoptotic rate of a cancer predict the amount of apoptosis induced by subsequent proapoptotic stimuli. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(17):4478–89.

171. Saeki K, Yuo A, Kato M, Miyazono K, Yazaki Y, Takaku F. Cell Density-dependent Apoptosis in HL-60 Cells, Which Is Mediated by an Unknown Soluble Factor, Is Inhibited By Transforming Growth Factor β 1 and Overexpression of Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Aug 8;272(32):20003–10.
172. Ohnishi T, Inoue N, Matsumoto H, Omatsu T, Ohira Y, Nagaoka S. Cellular content of p53 protein in rat skin after exposure to the space environment. *Journal of Applied Physiology*. 2017;81(1):183–5.
173. Ohnishi T, Takahashi A, Wang X, Ohnishi K, Ohira Y, Nagaoka S. Accumulation of a tumor suppressor p53 protein in rat muscle during a space flight. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999 Dec;430(2):271–4.
174. Schwarzenberg M, Pippia P, Meloni MA, Cossu G, Cogoli-Greuter M, Cogoli A. Signal transduction in T lymphocytes — A comparison of the data from space, the free fall machine and the random positioning machine. *Advances in Space Research*. 1999 Jan;24(6):793–800.
175. Aleshcheva G, Wehland M, Sahana J, Bauer J, Corydon TJ, Hemmersbach R, et al. Moderate alterations of the cytoskeleton in human chondrocytes after short-term microgravity produced by parabolic flight maneuvers could be prevented by up-regulation of BMP-2 and SOX-9. *The FASEB Journal*. 2015 Jun;29(6):2303–14.
176. Aleshcheva G, Sahana J, Ma X, Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, et al. Changes in Morphology, Gene Expression and Protein Content in Chondrocytes Cultured on a Random Positioning Machine. *PLoS ONE*. 2013 Nov 11;8(11):e79057.
177. Stamenković V, Keller G, Nesic D, Cogoli A, Grogan SP. Neocartilage Formation in 1 g, Simulated, and Microgravity Environments: Implications for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. 2010 May;16(5):1729–36.
178. Dieriks B, De Vos W, Meesen G, Van Oostveldt K, De Meyer T, Ghardi M, et al. High Content Analysis of Human Fibroblast Cell Cultures after Exposure to Space Radiation. *Radiation Research*. 2009 Oct;172(4):423–36.
179. Ma X, Pietsch J, Wehland M, Schulz H, Saar K, Hübner N, et al. Differential gene expression profile and altered cytokine secretion of thyroid cancer cells in space. *FASEB Journal*. 2014;28(2):813–35.

Danksagung

Die Danksagung ist in dieser Version aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Scaffold-freies 3D-Zellkulturmodell humaner Lungenkarzinomzellen unter veränderten Schwerkraftbedingungen auf der Random Positioning Machine“

in der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie

mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. med. Armin Kraus

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 04.02.2020

Carlo Dietz

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in dieser Version aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.