

Schlussbericht zu Nr. 3.2

I. KURZE DARSTELLUNG ZU

Projekt 50WB1924

Effekte der Schwerelosigkeit auf Gefäß- und Sphäroidbildung
humaner Zellen sowie auf Wundheilung und Herzmorphologie

Projektleiterin:

Prof. Dr. med. Daniela-Gabriele Grimm
ORCID: 0000-0002-4991-3105
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Medizinische Fakultät
Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie
Abteilung Mikrogravitation und Translationale Regenerative Medizin
Universitätsplatz 2 / Gebäude 28
39106 Magdeburg
Tel. +49 391 67-57599
Fax. + +49 391 67-40128
E-mail. daniela.grimm@med.ovgu.de

und bis 31.05.2020

Department of Biomedicine
Aarhus University
Hoegh-Guldbergsgade 10
8000 Aarhus C
Denmark
Mobile: +45-21379702
E-mail: dgg@biomed.au.dk

Zuwendungsempfänger:

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg,
Medizinische Fakultät, Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie

Förderkennzeichen:

50WB1924

Laufzeit des Vorhabens:

01.04.2019 bis 31.03.2022

Berichtszeitraum:

01.04.2019 bis 31.03.2022

1. Aufgabenstellung

Es handelt sich um ein Projekt aus dem Bereich ‚*Forschung unter Weltraumbedingungen*‘, Deutsches Zentrum für Luft und Raumfahrt (DLR). Mittelpunkt des Projekts ist die Untersuchung der Effekte der Schwerelosigkeit auf humane Zellen verschiedenen Ursprungs. Neben den noch ausstehenden Arbeiten zu den *THYROID* und *SPHEROIDS* Projekten stehen in diesem Antrag Brust- und Prostatakarzinomzellen im Mittelpunkt. Innerhalb dieses Vorhabens sollen neben den vorbereitenden RPM-Experimenten auch Untersuchungen dieser Zelltypen in realer Mikrogravitation (μg) im Rahmen von Parabelflugkampagnen (PFCs) und die Vorbereitung entsprechender TEXUS-Flüge erfolgen. Es sollen nun die bisher gewonnenen Daten durch weitere PFCs vervollständigt bzw. ergänzt werden, um ein umfassenderes Bild von den μg -bedingten Veränderungen zu erhalten. Darüber hinaus werden die Untersuchungen mit potentiellen Inhibitoren oder Induktoren von Schilddrüsen- und Mammakarzinom-Sphäroiden fortgesetzt.

Die Arbeiten mit Prostatakarzinomzellen werden in diesem Vorhaben neu begonnen und zur Vergleichbarkeit der Daten einem ähnlichen Programm unterworfen, wie wir es schon mit den Schilddrüsen- und Brustkrebszellen durchgeführt haben. Auf diese Weise soll durch Abgleich aller gewonnenen Daten ein allgemeines Prinzip der zellulären Antwort auf reale und simulierte Mikrogravitation herausgefiltert werden.

Ein weiterer Aspekt des Vorhabens ist die erstens die Untersuchung der Effekte von realer Mikrogravitation auf die Wundheilung (Weltraumphysiologisches Projekt auf der Internationalen Weltraumstation (ISS) und zweitens auf das Herz von Mäusen im Rahmen eines BION-Weltraumfluges. Für das Projekt „*Wound Healing and Sutures in Unloading Conditions*“ (14- ILSRA_Prop-0043) wird nach ersten RPM-basierten Ergebnissen nun der für Ende 2022 geplante ISS-Flug vorbereitet. Zusätzlich sollen im Rahmen dieses Vorhabens vorbereitende Arbeiten für den deutsch-russischen BION-Flug „*Effects of real microgravity and space radiation on the apoptosis associated cardiovascular damage in mice*“ geleistet werden.

Zusätzlich sind weitere Experimente auf der RPM und anderen GBFs (Klinostat, Rotating Wall Vessel, SAHC) zur Komplementierung der gewonnenen Daten notwendig.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Parabelflugkampagnen konnten trotz der COVID-19 Pandemie durch Verschiebung von Ort und Terminen erfolgreich realisiert werden (37. DLR Parabelflugkampagne im Juli 2021 in Paderborn: https://www.dlr.de/rd/desktopdefault.aspx/tabid-17856/28201_read-73386/).

Die 34. DLR Parabelflugkampagne wurde im September 2019 in Bordeaux-Merignac durchgeführt. https://www.dlr.de/rd/desktopdefault.aspx/tabid-2285/3423_read-58266/

Darüber hinaus wurden begleitende und ergänzende GBF-Experimente (RPM, Hypergravitation und Vibration) 2021 Köln in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Ruth Hemmersbachs Team, Biomedizinisches Wissenschaftsunterstützungszentrum, DLR, Köln, durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden gerade mit den Resultaten der 34. DLR PFC im „*International Journal of Molecular Sciences*“ publiziert (PMID: 35887223).

Mikrogravitation beeinflusst das Wachstum von normalen und malignen Zellen. Es bilden sich 3D-Aggregate, die für pharmakologische Untersuchungen interessant sind. Es konnten umfassende pharmakologische Tests mit Schilddrüsen- und Mammakarzinomsphäroiden durchgeführt werden. Insbesondere Kokulturen von Tumorsphäroiden mit u.a. Fibroblasten und Endothelzellen kommen für pharmakologische Tests infrage. Leider mussten diese Experimente wegen Lieferschwierigkeiten von Verbrauchsmaterial und Ersatzteilen für die RPM aufgrund der COVID-19 Pandemie verschoben werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde gemäß den Vorgaben durch die BMWi-Anträge durchgeführt. Allerdings mussten wir gemäß der COVID-19 Verordnungen Abläufe etwas umplanen. Das Vorhabensziel konnte so erreicht werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- **Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,**

1. Random Positioning Machine von der Firma Airbus Defence & Space (ADS), früher DUTCH-Space, Leiden, Niederlande
2. Short-arm Human Centrifuge (SAHC), Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Biomedizinisches Wissenschaftsunterstützungszentrum, DLR, Köln
3. Vibrationsgerät (Vibraplex), Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Biomedizinisches Wissenschaftsunterstützungszentrum, DLR, Köln
4. Klinostat, DLR, Köln
5. ClinoStar, CelVivo, Odense, Dänemark
6. Rotating Wall Vessel, NASA, Synthecon
7. Airbus A300/A310 ZERO-G-Parabelflugzeug der Firma Novespace, Bordeaux-Merignac, Frankreich
8. TEXUS-Höhenforschungsraketen, Swedish Space Corporation (SSC), DLR, ADS und andere

- **Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste**

Literatur aus PubMed, Google, Fachbüchern, Informationen von Kongressen, Meetings, Workshops, Investigator-Meetings der ESA, ESA-Dokumente über das ESA-SPHEROIDS-Projekt, Literatur herausgegeben durch das DLR, von der NASA, von SpaceX und RUAG, Dokumente herausgegeben von ADS bezüglich SIMBOX, SIMBOX-Hardware, und TEXUS-experimenten, Dokumente von der Firma Novespace zur Durchführung von Parabelflügen, Publikationshinweise durch Kooperationspartner.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Es besteht eine enge Zusammenarbeit mit Prof. Monica Monici, Universität Florenz, Italien, Prof. Thomas Juhl Corydon, Aarhus Universität, Dänemark, Prof. Ulf Simonsen, Aarhus Universität, Dänemark, Prof. Vladimir Matchkov, Aarhus Universität, Dänemark, Prof. Olga Tarasova und Prof. Olga Vinogradova vom IBMP Moskau, Russland, Dr. Johann Bauer, SIHATHO GmbH Biedenkopf, Dr. Peter Richter, Universität Erlangen, Prof. Dr. Marcel Egli, University of Applied Sciences, Luzern, Schweiz, Prof. Francesco Curcio, Universität Udine, Italien, PD Dr. Markus Braun, DLR Bonn, Prof. Dr. Sarah Baatout, Belgian Nuclear Research Center, Mol, Belgien, Dr. Jack van Loon, ACTA Free University, Amsterdam, Niederlande, Dr. Jens Hauslage, Dr. Christian Liemersdorf, und Frau PD Dr. Ruth Hemmersbach vom DLR Köln, Prof. Alamelu Sundaresan, Texas Southern University, Houston, TX, USA, Prof. Jessica Bertrand, Experimentelle Orthopädie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Prof. Michael Kreissl, Abteilung für Nuklearmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Dr. Paolo Nebviani, Children's Hospital, USC, Los Angeles, CA, USA und Prof. Dr. Norbert Hübner, MDC, Berlin, die durch ständigen wissenschaftlichen Austausch charakterisiert sind.

II. EINGEHENDE DARSTELLUNG

1. Der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die Zuwendung wurde gemäß der DLR/BMWi-Anträge (wissenschaftliche Mitarbeiter, Werkstudenten, Reisekosten, Verbrauchsmaterial, sowie Auftragsvergabe an das DLR (Frau PD Dr. Ruth Hemmersbach) und an Herrn Dr. Johann Bauer verwendet.

Projekt-Gesamtziel:
Effekte der Schwerelosigkeit auf Gefäß- und Sphäroidbildung humaner Zellen sowie auf Wundheilung und Herzmorphologie

1.1 erzielte Ergebnisse im Einzelnen:

1.1.1 Projektförderung vom 01.04.-31.12.2019:

Alle geplanten und beantragten Missionen wurden 2019 durchgeführt. Die 34. DLR Parabelflugkampagne wurde im September 2019 in Bordeaux-Merignac, Frankreich, erfolgreich geflogen.

Die Daten der bereits im Jahr 2018 durchgeführten 31. DLR Parabelflugkampagne und der TEXUS-54 Mission wurden 2019 ausgewertet und publiziert.

Weitere Daten zur SPHEROIDS-ISS Mission wurden erfolgreich in zwei Manuskripten veröffentlicht.

Im Jahr 2018 wurden die Zellproben der im Dezember 2017 erfolgreich geflogenen Cellbox-2 ISS Mission untersucht und anschließend statistisch ausgewertet. 2019 wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um die erzielten Daten stärker zu untermauern. Es mussten zusätzliche RPM-Experimente und noch weitere molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Eine Publikation der CellBox-2 Daten konnte 2021 herausgegeben werden.

Zusätzliche Artikel wurden mit Bezug zu „Ground-Based Facilities“ veröffentlicht.

Zusammenfassung der Ergebnisse zu differenzierten Mammakarzinomzellen
in realer Mikrogravitation

Die Publikation „*Real Microgravity Influences the Cytoskeleton and Focal Adhesions in Human Breast Cancer Cells*“ wurde in der Zeitschrift „*International Journal of Molecular Sciences*“ im Juni 2019 veröffentlicht.

Nassef MZ, Kopp S, Wehland M, Melnik D, Sahana J, Krüger M, Corydon TJ, Oltmann H, Schmitz B, Schütte A, Bauer TJ, Infanger M, Grimm D. Real Microgravity Influences the Cytoskeleton and Focal Adhesions in Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 28;20(13):3156. doi: 10.3390/ijms20133156. PMID: 31261642; PMCID: PMC6651518.

Der Artikel beschreibt die frühen Veränderungen des Zytoskeletts in MCF-7 Brustkrebszellen während einer Parabelflugkampagne (31. DLR-PFC) und einer Höhenforschungsraketenmission (TX54).

Während bei der PFC die Genexpression und das Proteom der Zellen untersucht wurden, standen bei der TX54 Mission Veränderungen der Morphologie im Fokus.

Im Folgenden werden Auszüge des Artikels und einige Abbildungen gezeigt.

Während der TX54 Mission wurde sowohl ein Laser-Scanning-Mikroskop (LSM), um Life-Cell-Imaging in Mikrogravitation zu ermöglichen (FLUMIAS Mikroskop), als auch eine Fixiereinheit verwendet.

Während des zeitlichen Verlaufes des Raketenfluges zeigten sich frühe Veränderungen sowohl im F-Aktin- als auch im α -Tubulin-Zytoskelett (Abb. 1). Während eine verstärkte Ablagerung von F-Aktin an der Zellmembran zu beobachten war, zeigte das α -Tubulinnetzwerk eine eher lockere Zusammensetzung und vermehrte Ablagerungen von α -Tubulin um den Zellkern.

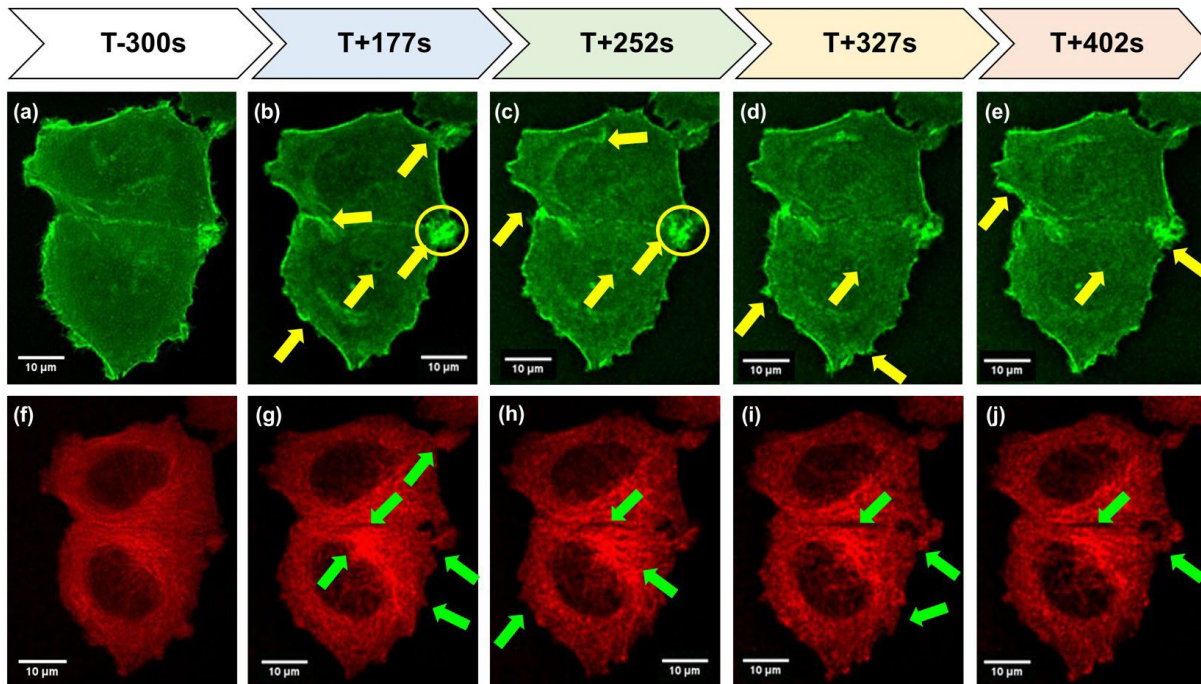


Abbildung 1: Zeitverlauf der von FLUMIAS aufgenommenen Bilder auf TEXUS-54 (40x/1,2): Die MCF-7- Brustkrebszellen 5 Minuten vor dem Start (T-300 s) der Rakete und während der $r\text{-}\mu g$ -Phase (T + 177s – T + 402s). Die gelben Pfeile zeigen die Veränderungen des F-Aktins (a–e; grüne Fluoreszenz). Die gelben Kreise heben einen Bereich mit F-Aktin-Ablagerungen hervor. Filopodia und Lamellipodia werden nach 150s gebildet, welche sich im Zeitverlauf weiter ausprägten. Die grünen Pfeile zeigen Veränderungen des α -Tubulins (f – j; rote Fluoreszenz). Das α -Tubulin-Netzwerk zeigt nach 150 s Löcher und eine lockere Struktur. Es finden sich vermehrte Ablagerungen des Tubulins um den Zellkern (grüne Pfeile).

Zusätzlich wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung an PFA-fixierten Zellen, die am Ende der Hyper- g -Phase oder am Ende der μg -Periode fixiert wurden, durchgeführt (Abb.2). Die beiden Bedingungen wurden mit $1g$ -Bodenkontrollproben verglichen. Wir untersuchten mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie MMP-9, VEGF-A, IL-6 und IL-8 Protein sowie F-Aktin. Die Intensität der Färbung wurde quantifiziert. Alle untersuchten Proteine zeigten eine quantitative Veränderung gegenüber den Bodenkontrollproben (Abb. 2 m-q).

Während der 31. DLR PFC untersuchten wir MCF-7 Brustkrebszellen, die nach der 1. oder der 31. Parabel mit RNA*later* chemisch eingefroren wurden. Eventuelle quantitative Veränderungen der Genexpression von Zytoskelett- und Zelladhäsionsgenen wurde im Verlauf untersucht (Abb. 3-8).

Die Genexpression war bei den meisten untersuchten Faktoren während der PFC sehr stabil. Expressionsveränderungen von Zytoskelettgenen zeigte nur *KRT8*. Tendenziell waren die untersuchten Adhäsionsmoleküle herunterreguliert, Vinculin zeigte eine signifikante Regulierung. Extrazelluläre Matrix Proteine wiesen kaum Veränderungen auf. Allerdings waren *VEGFA* und *IL8* im Vergleich zum TX54-Flug signifikant reguliert.

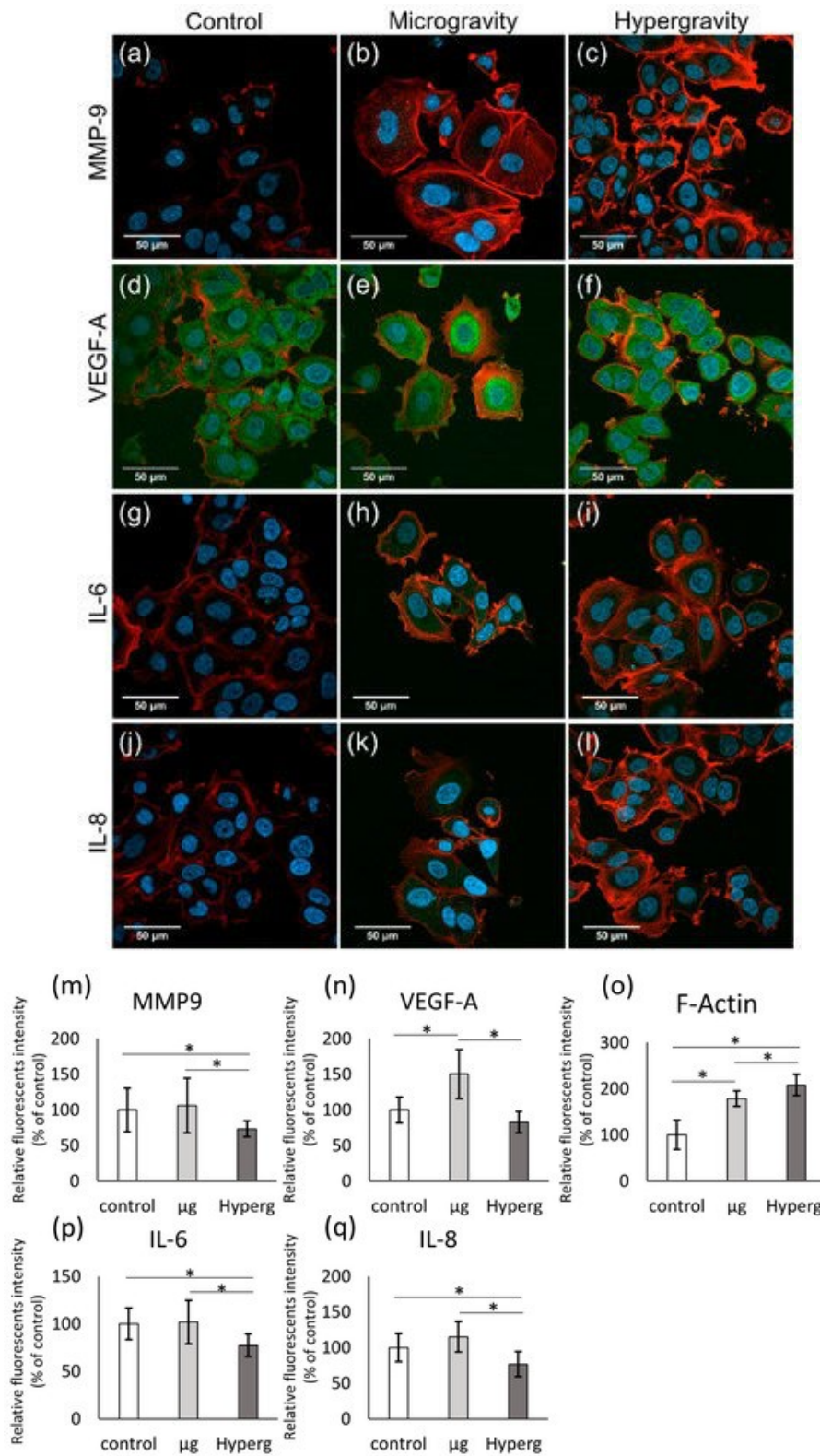


Abbildung 2: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von PFA-fixierten Zellen (untersucht im Rahmen der TEXUS 54-Raketenmission): 2500 MCF-7-Zellen wurden in eine Vertiefung der Ibidi-Objektträger (18 Vertiefungen) ausgesät. Die Zellen wurden entweder am Ende der Hyper-g-Periode oder am Ende der μg-Periode fixiert. Die beiden Bedingungen wurden mit 1g-Bodenkontrollproben verglichen. Die konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopiebilder (a – l) zeigen entweder MMP9, VEGF-A, IL-6 oder IL-8 in Grün, DAPI (in Blau) und F-Aktin (in Rot). Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm. Die Intensität der Färbung wurde mit ImageJ (m – q) quantifiziert. Alle Daten sind als Mittelwert ± SD, n = 10–14 angegeben, wobei die Signifikanz p < 0,05 durch * angegeben ist.

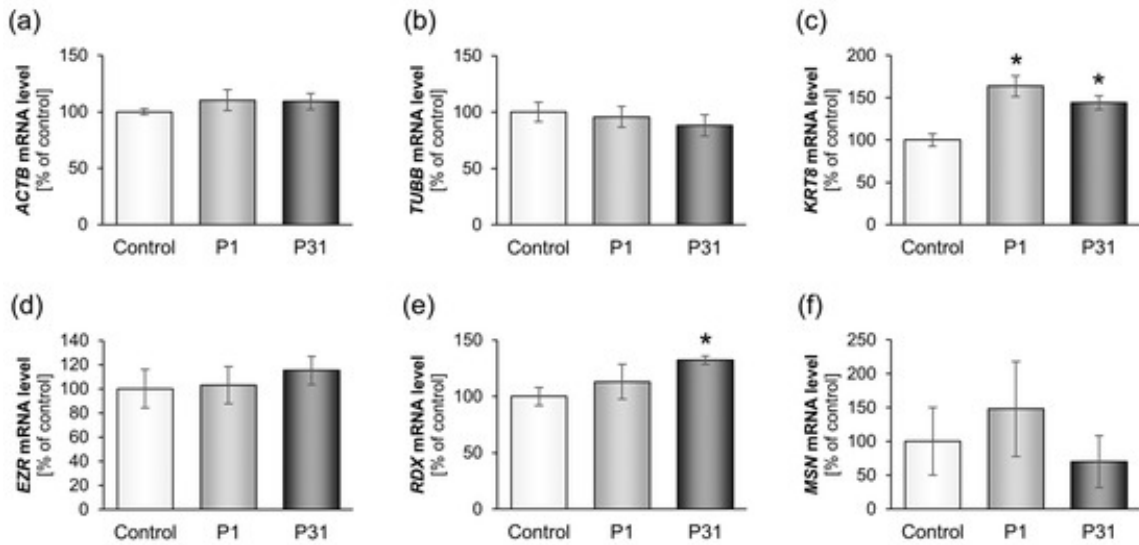


Abbildung 3: Einfluss der Kurzzeit-Mikrogravitation auf die Genexpression (mRNA) von Zytoskelettkomponenten: Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. * p < 0.05 vs. Kontrollen.

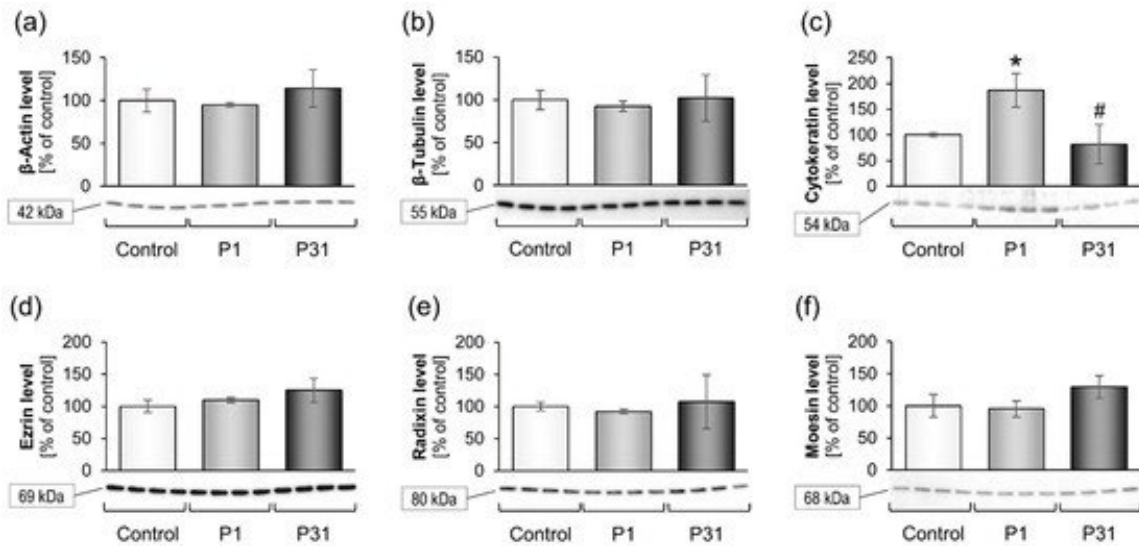


Abbildung 4: Einfluss der Kurzzeit-Mikrogravitation auf den Proteingehalt von Komponenten des Zytoskeletts: Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. * p < 0.05 vs. Kontrollen; # p < 0.05 vs. P1.

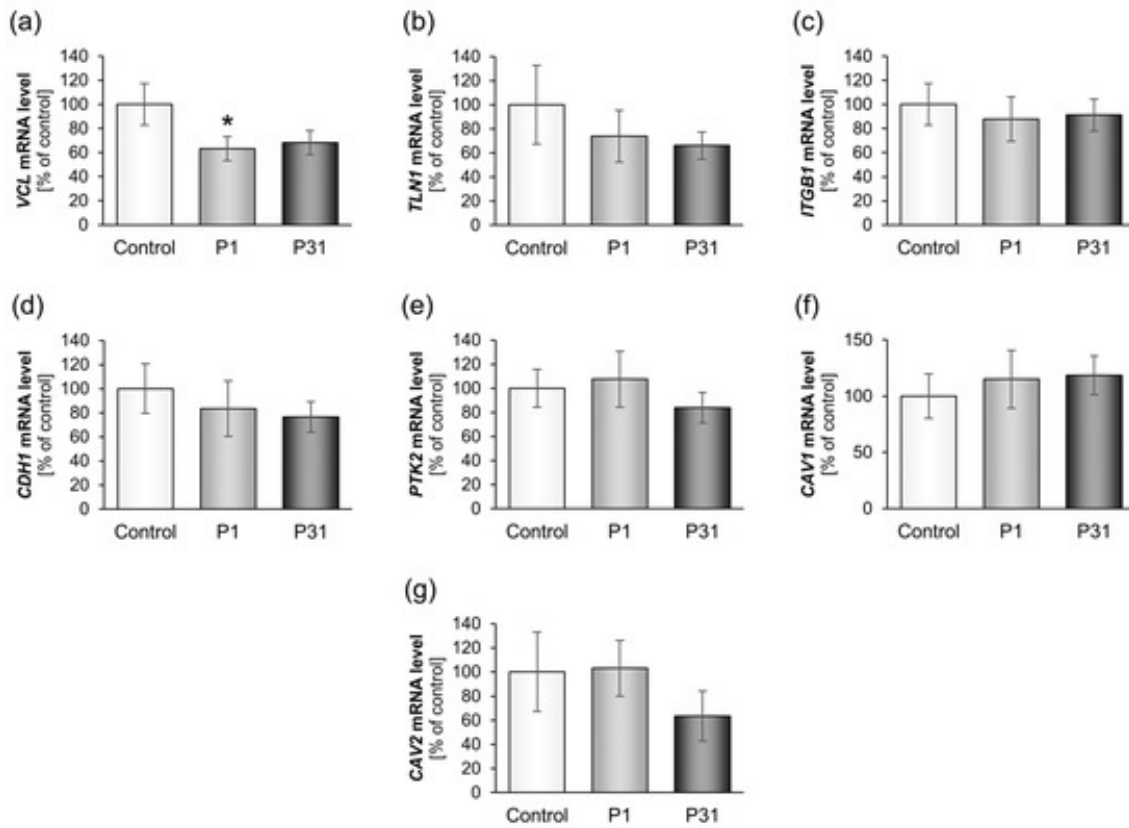


Abbildung 5: Einfluss der Kurzzeit-Mikrogravitation auf die mRNA Expression von fokalen Adhäsionsfaktoren: Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. * p < 0.05 vs. Kontrollen.

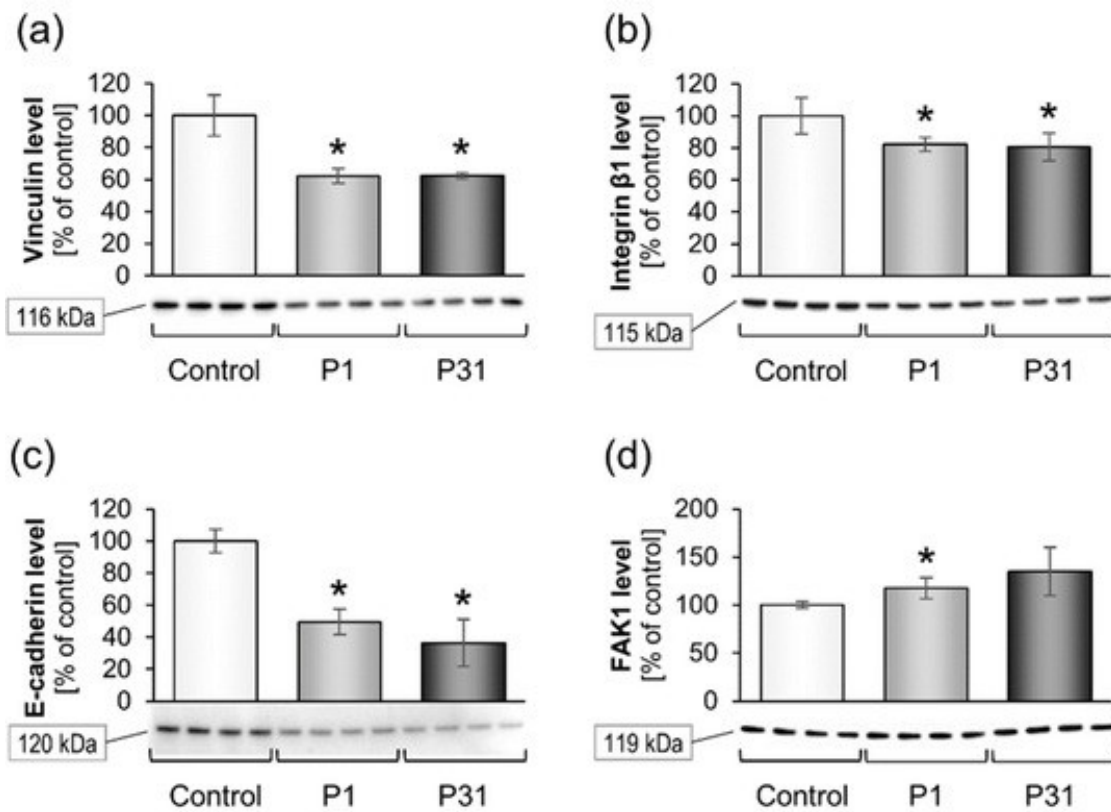


Abbildung 6: Einfluss der Kurzzeit-Mikrogravitation auf den Proteingehalt von fokalen Adhäsionskomponenten: Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. * p < 0.05 vs. Kontrollen.

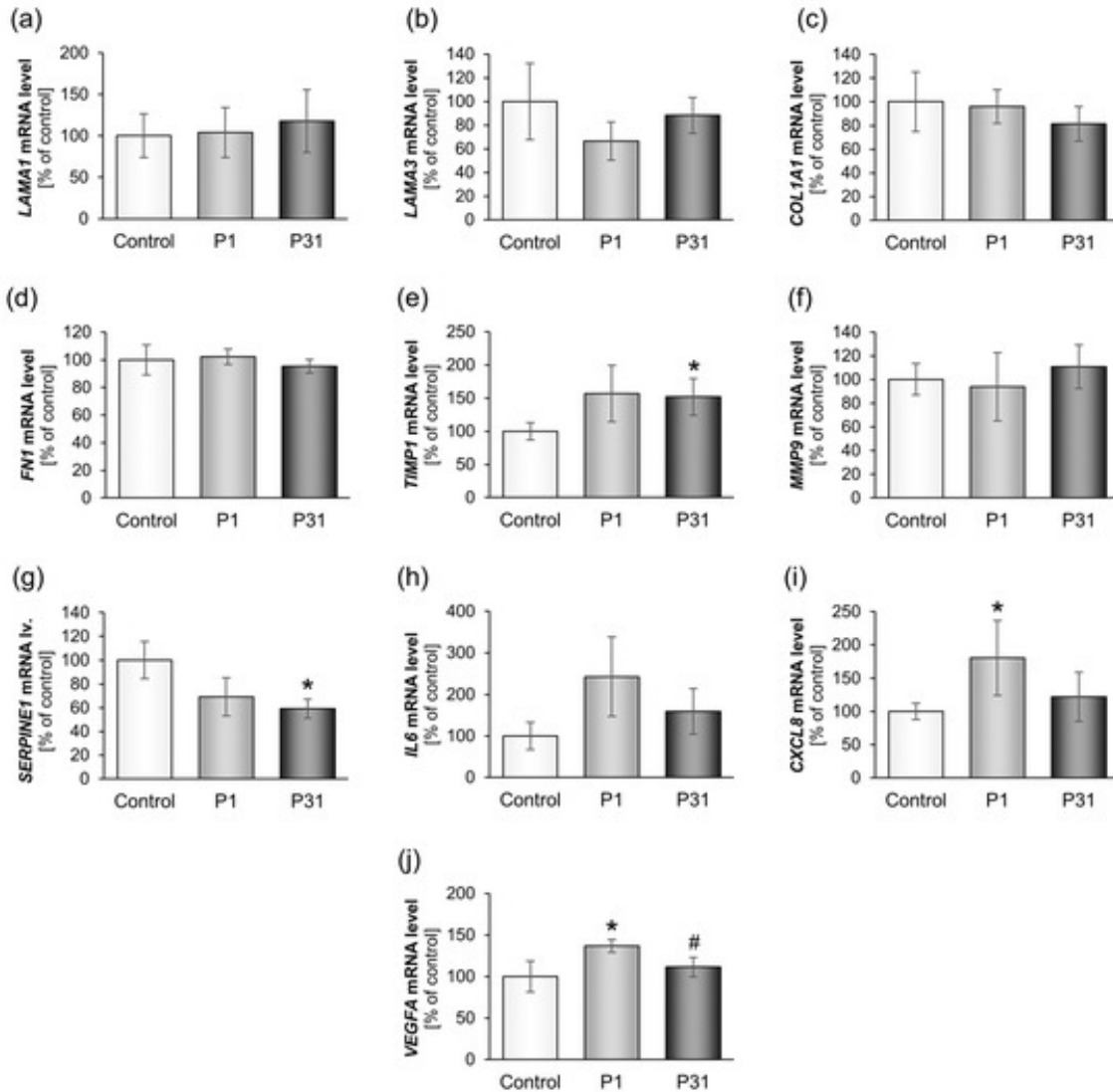


Abbildung 7: Einfluss der Kurzzeit-Mikrogravitation auf die Genexpression verschiedener Extrazellulärmatrix- und Zytokine: Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. * p < 0.05 vs. Kontrollen; # p < 0.05 vs. P1.

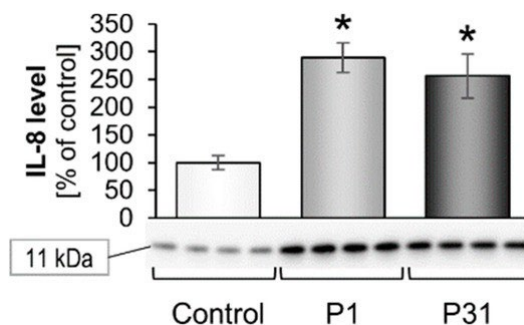


Abbildung 8: Einfluss der Kurzzeit-Mikrogravitation auf den Proteingehalt von IL-8: Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. * p < 0.05 vs. Kontrollen.

Zusammenfassend wurden Veränderungen des Zytoskeletts und eine differenzielle Regulierung von *CXCL8* und *VEGFA* während der TX54 Mission festgestellt.

Weiterhin wurde eine Hochregulation von *KRT8*, *RDX*, *TIMP1*, *CXCL8*, *VCL* und *VEGFA* mRNAs nach den PF-Manövern gefunden. Das E-Cadherin-Protein war nach den PF- Manövern reduziert. Dieses Ergebnis

ist sehr wichtig, da E-Cadherin nicht nur am Zelladhäsionsprozess beteiligt ist, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung, Metastasierung und Progression spielt.

Veränderungen des E-Cadherin-Protein können daher zur Tumorprogression führen. Das VCL-Protein wirkt aktivierend auf CDH1. CXCL8 und VEGFA sind ebenfalls wichtig für das Fortschreiten des Tumors. Die frühe Hochregulation des Zytokins stützt die These, dass der frühe Einfluss von μg die Malignität der Tumorzellen erhöht.

Zusammenfassung:

Veröffentlichung zu niedrig differenzierten Mammakarzinomzellen in realer Mikrogravitation

Der Artikel „*Short-Term Microgravity Influences Cell Adhesion in Human Breast Cancer Cells*“ beschreibt die Ergebnisse der Untersuchungen an MDA-MB-231 Brustkrebszellen während der 29. DLR Parabelflugkampagne und wurde im November 2019 veröffentlicht.

Nassef MZ, Kopp S, Melnik D, Corydon TJ, Sahana J, Krüger M, Wehland M, Bauer TJ, Liemersdorf C, Hemmersbach R, Infanger M, Grimm D. Short-Term Microgravity Influences Cell Adhesion in Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 15;20(22):5730. doi: 10.3390/ijms20225730. PMID: 31731625; PMCID: PMC6887954.

Wir untersuchten den Einfluss von r- μg , sim. Mikrogravitation (s- μg , Inkubator-RPM), Hypergravitation (hyper-g) und Vibration (VIB) auf dreifach-negative Brustkrebszellen (triple-negative breast cancer (TNBC); MDA-MB-231-Zelllinie) mit dem Ziel frühe Veränderungen der Genexpression von Faktoren zu erkennen, die mit der Zelladhäsion, Apoptose, dem nuklearen Faktor „kappa-light-chain-enhancer“ von aktivierten B-Zellen (NF- κB) und aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwegen verknüpft sind.

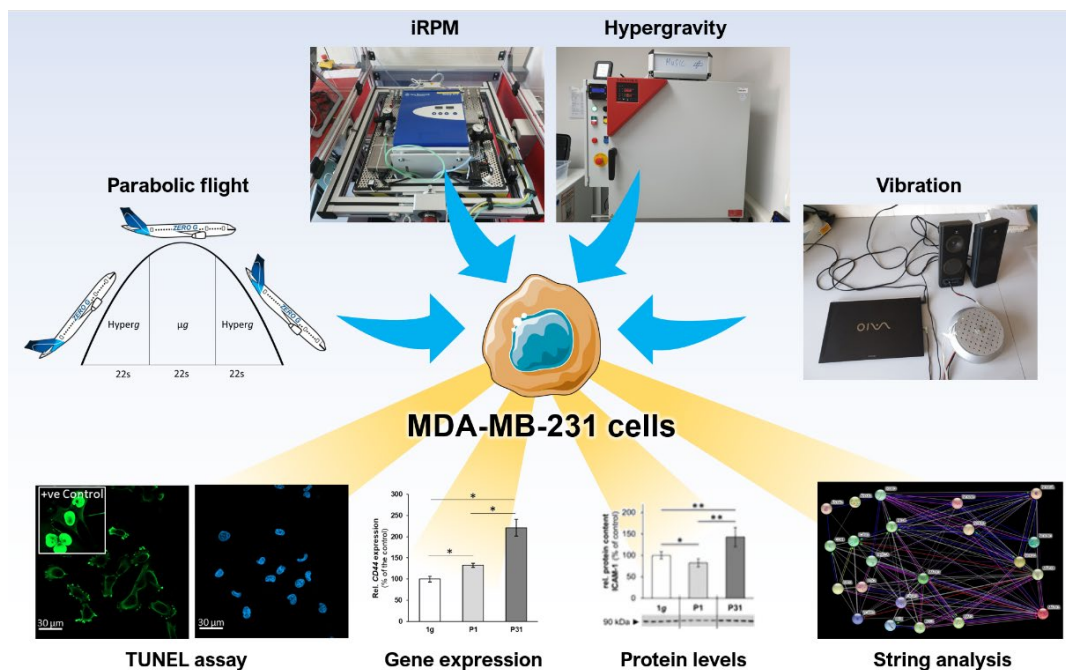


Abbildung 9: Experimentaufbau zur Untersuchung von MDA-MB-231 Zellen: Ein Parabelflug setzt ein Experiment unterschiedlichen Stressoren aus. Neben der gewünschten μg gibt es hyper-g Phasen und Vibration. Um den Effekt von μg auf unser Zellsystem nachweisen zu können, wurden alle Stressoren unabhängig voneinander simuliert und entsprechende Analysen durchgeführt.

PF-Manöver induzierten eine frühe Hochregulation von *ICAM1*-, *CD44*- und *ERK1*-mRNAs nach der ersten Parabel (P1) und eine verzögerte Hochregulation von *NFKB1*, *NFKBIA*, *NFKBIB* und *FAK1* nach der letzten Parabel (P31). Der ICAM-1-, VCAM-1- und CD44- Proteingehalt war erhöht, wohingegen der Proteingehalt der NF-KB-Untereinheit p-65- und von Annexin-A2 nach der 31. Parabel (P31) verringert war. Die *PRKCA*-, *RAF1*-, *BAX* mRNA Expression wurde nicht verändert. Darüber hinaus war aktivierte Caspase-3 (17 kDa) in MDA- MB-231-Zellen, die PF-Manövern ausgesetzt waren, nicht nachweisbar. Die Hyper-g-Exposition der Zellen erhöhte die Expression von *CD44*- und *NFKBIA*-mRNAs, während die iRPM-Exposition *ANXA2* und *BAX* herunterregulierte. VIB hatte keinen Einfluss auf die TNBC- Zellen.

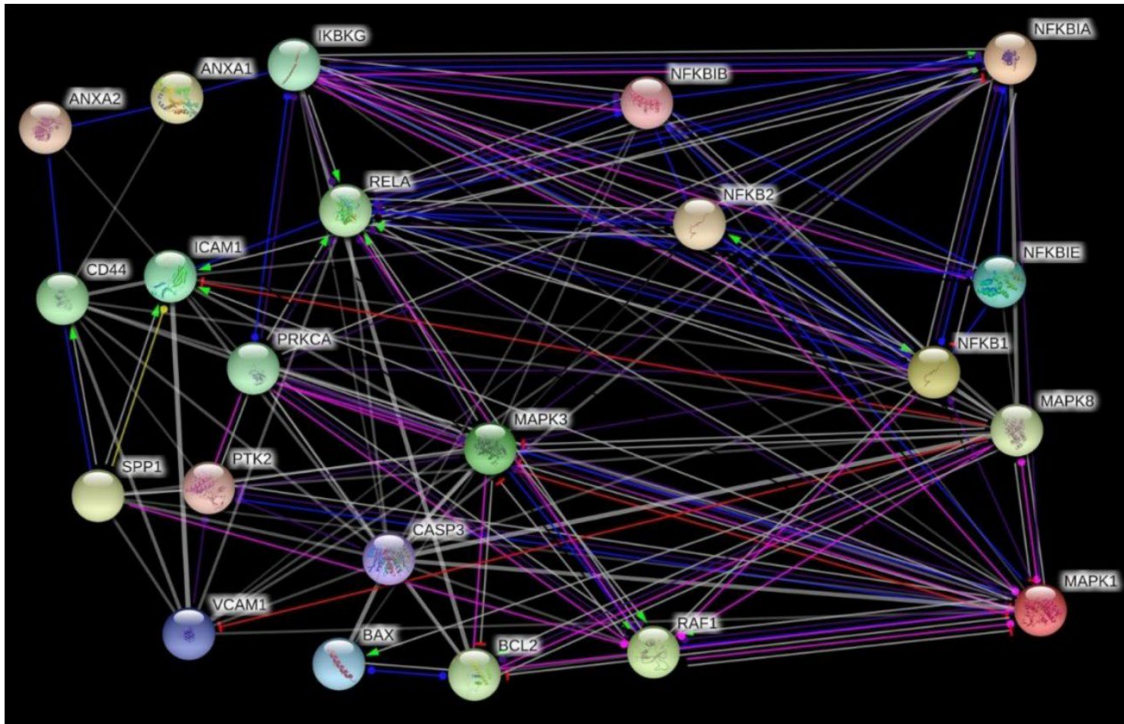


Abbildung 10: Netzwerk der funktionellen Interaktion von Genen und deren Produkten dieser Studie: STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) Analyse aller untersuchten Faktoren.

Zusammenfassung

Die frühen Veränderungen von ICAM-1 und VCAM-1 und die rasche Abnahme der NF- κ B-Untereinheit p-65 können als schnell reagierende, schwerkraftregulierte und zellschützende Mechanismen von TNBC-Zellen angesehen werden, die veränderten Schwerkraftbedingungen ausgesetzt sind (Abb. 10).

Diese Daten legen eine Schlüsselrolle für die nachgewiesenen Signalelemente beim dreidimensionalen Wachstum und der Metastasierung nahe.

ABSOLVENTEN 2019**Doktorarbeiten, begonnen und laufend:**

M. Sc. Mohamed Zakaria Nassef (Dr. rer. medic.) (I)
M. Sc. Daniela Melnik (Dr. rer. medic.) (I)
Christoph Buken (Dr. med.) (I)
Dorothea Dietrichs (Dr. med.) (b)
Sophia Gilger (Dr. med.) (b)
Paul Steinwerth (Dr. med.) (b)
Anna Heinrichs (Dr. med.) (I)

Masterarbeiten abgeschlossen:

Christian Legarth Brødsgaard (a)
Ole Vincent Ancker (a)

Bachelorarbeiten abgeschlossen:

Amalie L. Povlsen (a)
Khalil Rafiqi (a)
Mikkel Rodin Deutch (a)
Trine Engelbrecht Hybel (a)

PUBLIKATIONEN 2019

1. Ancker OV, Krüger M, Wehland M, Infanger M, Grimm D. Multikinase Inhibitor Treatment in Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 18;21(1).
2. Legarth C, Grimm D, Krüger M, Infanger M, Wehland M. Potential Beneficial Effects of Vitamin D in Coronary Artery Disease. *Nutrients*. 2019 Dec 30;12(1).
3. Nassef MZ, Kopp S, Melnik D, Corydon TJ, Sahana J, Krüger M, Wehland M, Bauer TJ, Liemersdorf C, Hemmersbach R, Infanger M, Grimm D. Short-term Microgravity Influences Cell Adhesion in Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 20(22):5730.
4. Bauer TJ, Gombocz E, Krüger M, Sahana J, Corydon TJ, Bauer J, Infanger M, Grimm D. Augmenting cancer cell proteomics with cellular images – A semantic approach to understand focal adhesion. *J Biomed Inform* 100:103320.
5. Deutch MR, Grimm D, Wehland M, Infanger M, Krüger M. Bioactive Candy: Effects of Licorice on the Cardiovascular System. *Foods* 8(10):495.
6. Grimm D. Guest Edited Collection: Gravitational biology and space medicine. *Sci Rep*. 9(1):14399.
7. Lützenberg R, Wehland M, Solano K, Nassef MZ, Buken C, Melnik D, Bauer J, Kopp S, Krüger M, Riwaldt S, Hemmersbach R, Schulz H, Infanger M, Grimm D. Beneficial Effects of Low Frequency Vibration on Human Chondrocytes in Vitro. *Cell Physiol* 53:623-637.
8. Bæk Møller N, Budolfson C, Grimm D, Krüger M, Infanger M, Wehland M, Magnusson NE. Drug-Induced Hypertension Caused by Multikinase Inhibitors (Sorafenib, Sunitinib, Lenvatinib and Axitinib) in Renal Cell Carcinoma Treatment. *Int J Mol Sci* 20(19):4712.
9. Pedersen ML, Krüger M, Grimm D, Infanger M, Wehland M. The prostacyclin analogue treprostinil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, in press.

10. Buken C, Sahana J, Corydon TJ, Melnik D, Bauer J, Wehland M, Krüger M, Balk S, Abuagela N, Infanger M, Grimm D. Morphological and Molecular Changes in Juvenile Normal Human Fibroblasts Exposed to Simulated Microgravity. *Sci Rep* 9(1):11882.
11. Khalaf D, Krüger M, Wehland M, Infanger M, Grimm D. The Effects of Oral L-Arginine and L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. *Nutrients* 11(7):1679.
12. Nassef MZ, Kopp S, Wehland M, Melnik D, Sahana J, Krüger M, Corydon TJ, Oltmann H, Schmitz B, Schütte A, Bauer, TJ, Infanger M, Grimm D. Real Microgravity Influences the Cytoskeleton and Focal Adhesions in Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 20(13):3156.
13. Toxvig AK, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. A Focus on Riociguat in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 125:202- 214.
14. Grimm D. Cell and Molecular Biology of Thyroid Disorders. *Int J Mol Sci*. 20(12):2895.
15. Krüger M, Melnik D, Kopp S, Buken C, Sahana J, Bauer J, Wehland M, Hemmersbach R, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D. Fighting Thyroid Cancer with Microgravity Research. *Int J Mol Sci* 20(10):2553.
16. Olawi N, Krüger M, Grimm D, Infanger M, Wehland M. Nebivolol in the Treatment of Arterial Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 125:189-201.
17. Krüger M, Pietsch J, Bauer J, Kopp S, Carvalho DTO, Baatout S, Moreels M, Melnik D, Wehland M, Egli M, Sahana J, Kobberø SD, Corydon TJ, Nebuloni S, Gass S, Evert M, Infanger M, Grimm D. Growth of Endothelial Cells in Space and in Simulated Microgravity – A Comparison on the Secretory Level. *Cell Physiol Biochem* 52(5):1039- 1060.
18. Krüger M, Kopp S, Wehland M, Bauer J, Baatout S, Moreels M, Egli M, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D. Growing blood vessels in space: Preparation studies of the SPHEROIDS project using related ground-based studies. *Acta Astronaut* 159:267-272.
19. Mann V, Grimm D, Corydon TJ, Krüger M, Wehland M, Riwaldt S, Sahana J, Kopp S, Bauer J, Reseland JE, Infanger M, Lian AM, Okoro E, Sundaresan A. Changes in Human Foetal Osteoblasts Exposed to the Random Positioning Machine and Bone Construct Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 20(6):1357.
20. Budolfson C, Faber J, Grimm D, Krüger M, Bauer J, Wehland M, Infanger M, Magnusson NE. Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Hypertension: Role of Hypertension as a Biomarker in Cancer Treatment. *Curr Vasc Pharmacol* 17(6):618-634.
21. Strauch SM, Grimm D, Corydon TJ, Krüger M, Bauer J, Lebert M, Wise P, Infanger M, Richter P. Current knowledge about the impact of microgravity on the proteome. *Expert Rev Proteomics* 16(1):1-12.
22. Romswinkel A, Infanger M, Dietz C, Strube F, Kraus A. The Role of C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4) in Cell Adherence and Spheroid Formation of Human Ewing's Sarcoma Cells under Simulated Microgravity. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 2;20(23):6073. doi: 10.3390/ijms20236073. PMID: 31810195; PMCID: PMC6929163.
23. 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 Jul 23;20(14):3601. doi: 10.3390/ijms20143601. PMID: 31340547; PMCID: PMC6678991.
24. Strube F, Infanger M, Dietz C, Romswinkel A, Kraus A. Short Term Effects of Simulated Microgravity on Morphology and Gene Expression in Human Breast Cancer Cells. *Physiol Int*. 2019 Dec 1;106(4):311-322

MEETINGS/TAGUNGEN**Posterpräsentationen****24. ESA-Symposium „European Rocket and Balloon Programmes“**

16. Juni 2019 - 20. Juni 2019, Essen, DE

- Sascha Kopp, Marcus Krüger, Markus Wehland, Johann Bauer, Manfred Infanger, Daniela Grimm. Genetic alterations of thyroid cancer cells during a sounding rocket flight (TX53)
- Marcus Krüger, Sascha Kopp, Daniela Melnik, Markus Wehland, Johann Bauer, Manfred Infanger, Daniela Grimm. Back to the Beginning: Studying the Origin of Microgravity-Induced Alterations in Thyroid Cancer Cells on an Upcoming TEXUS Sounding Rocket Flight

Vorträge**24. ESA-Symposium „European Rocket and Balloon Programmes“**

16. Juni 2019 - 20. Juni 2019, Essen, DE

- Daniela Melnik. The Influence of Microgravity on Human Cells
- Markus Wehland (Daniela Grimm). Molecular Changes in Human Cells Exposed to Microgravity
- Johann Bauer. Semantic Evaluation of Data Obtained from Experiments on Cells Exposed to Microgravity

Gravimeeting 2019

04.-06.12.2019, Erlangen, Deutschland

- Daniela Melnik, Marcus Krüger. Schilddrüsentumorforschung in Mikrogravitation: Neue Ansatzpunkte für die Krebstherapie

1.1.2 Projektförderung vom 01.01.-31.12.2020:

Wegen der anhaltenden COVID-19 Pandemielage konnten einige beantragte Missionen im Jahr 2020 nicht durchgeführt werden. Dazu zählte auch die 37. DLR Parabelflugkampagne, welche in den Juli 2021 verlegt wurde.

Da die Arbeit generell extrem eingeschränkt war, haben wir uns verstärkt auf die Erhebung von Daten auf „Ground-Based Facilities“ konzentriert. Wir konnten leider auch nicht die Anlagen des DLR in Köln nutzen und mußten daher die geplanten Experimente in den Herbst 2021 legen. Es konnten keine Dienstreisen durchgeführt werden.

Im Jahr 2020 wurde der Funktionalitätstest des FLUMIAS ISS Systems durchgeführt. In unseren Laboren haben wir sowohl das Lebenserhaltungssystem als auch das SIM-Mikroskop ausführlichen Tests unterzogen. Wir standen in regelmäßigem Kontakt mit der Firma Airbus und dem DLR, haben Zwischenberichte verfasst und einen ausführlichen Abschlussbericht abgegeben. Weitere Tests sind für 2021 geplant, welche unter Rücksprache mit anderen Experimentatoren stattfinden sollen.

Im Berichtszeitraum wurden ferner die Daten der CellBox-1 und CellBox-2 Missionen bearbeitet, ergänzt und analysiert und zwei Publikationen vorbereitet. Beide Publikationen wurden 2021 bei internationalen wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert.

Zusätzlich fanden Arbeiten an den Veröffentlichungen zu Daten, die im Rahmen der 34. DLR Parabelflugkampagne erhoben wurden, statt. Durch den Verlust eines Tages während der Kampagne war der Datensatz noch nicht vollständig, weshalb der Experimentansatz während der 37. DLR Parabelflugkampagne ergänzt wurde.

Im Folgenden werden einige Publikationen, Experimente und der FLUMIAS-ISS Abschlusstestbericht vorgestellt, die im Berichtsjahr 2020 publiziert bzw. erstellt wurden.

Zusammenfassung:**Drug Targeting - Schilddrüsentumorzellen in der simulierten Mikrogravitation**

Ein Artikel mit den gewonnenen Daten über die Dexamethason-Behandlung von Schilddrüsentumorzellen in der simulierten Mikrogravitation mit dem Titel „*Dexamethasone Inhibits Spheroid Formation of Thyroid Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity*“ ist 2020 in der internationalen Zeitschrift *Cells* erschienen.

Melnik D, Sahana J, Corydon TJ, Kopp S, Nassef MZ, Wehland M, Infanger M, Grimm D, Krüger M. Dexamethasone Inhibits Spheroid Formation of Thyroid Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity. *Cells*. 2020 Feb 5;9(2):367. doi: 10.3390/cells9020367. PMID: 32033410; PMCID: PMC7072698.

Die Ablösung von eigentlich adhären wachsenden Zellen und die anschließende Bildung von Sphäroiden ist bei unterschiedlichen humanen Zelltypen, die unter dem Einfluss von Mikrogravitation gezüchtet werden, zu beobachten. Bei Tumorzellen zeigt dieser Prozess Ähnlichkeiten mit der Metastasierung im menschlichen Körper und kann somit wertvolle Erkenntnisse für die Entwicklung von Tumoren liefern. Diese Erkenntnisse wiederum können genutzt werden, um neue Wirkstoffe auszutesten und/oder Angriffspunkte für neuartige Medikamente zu finden.

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass die Verwendung des synthetischen Glukokortikoides Dexamethason die Sphäroidbildung von FTC-133 Schilddrüsentumorzellen hemmt. Die Sphäroide wurden auf einer Random Positioning Machine (RPM) in simulierter Mikrogravitation gebildet (Abb. 11).

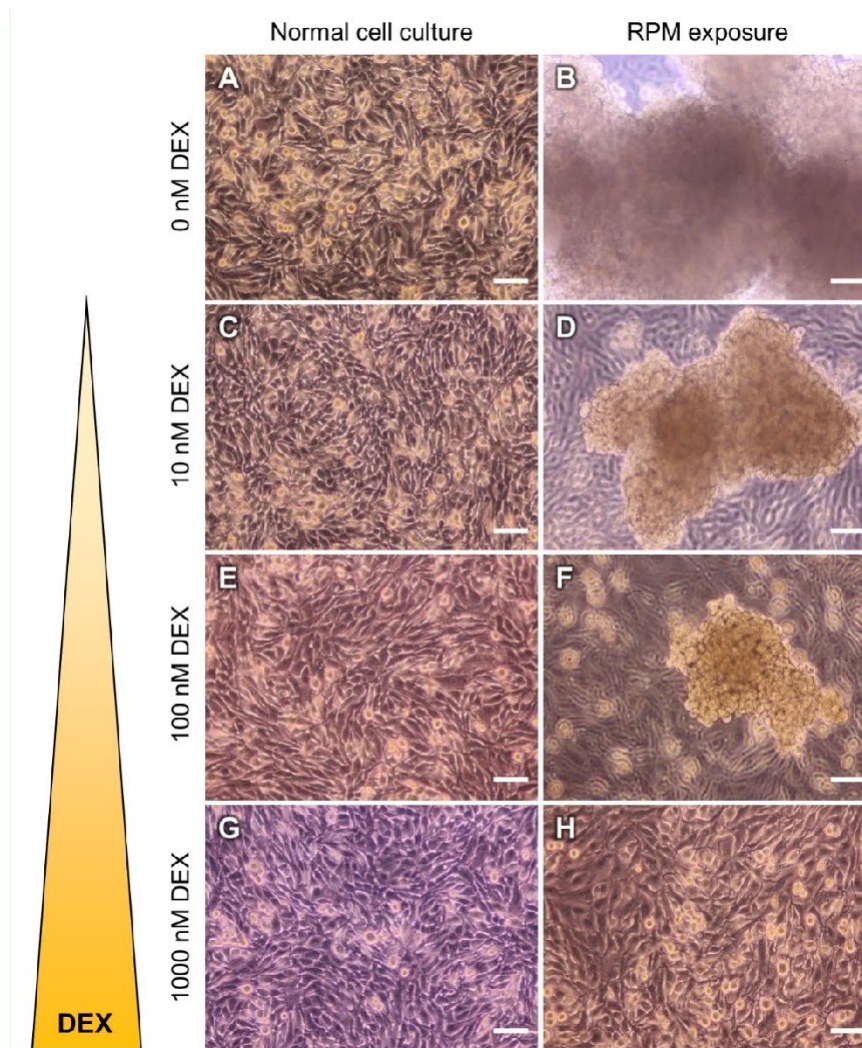


Abbildung 11. Einfluss von Dexamethason (DEX) auf die Sphäroidbildung von FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen: Nach 3 Tagen auf einer RPM zeigten die Zellen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Sphäroidbildung. Größenbalken: 100 μm .

Anders als ursprünglich angenommen, scheint der an der Sphäroidbildung von Mammakarzinomzellen beteiligte Transkriptionsfaktor NF- κ B bzw. der NF- κ B-Signalweg bei FTC-133-Schilddrüsenkarzinomzellen weniger stark durch Dexamethason beeinflusst zu werden (Abb. 12).

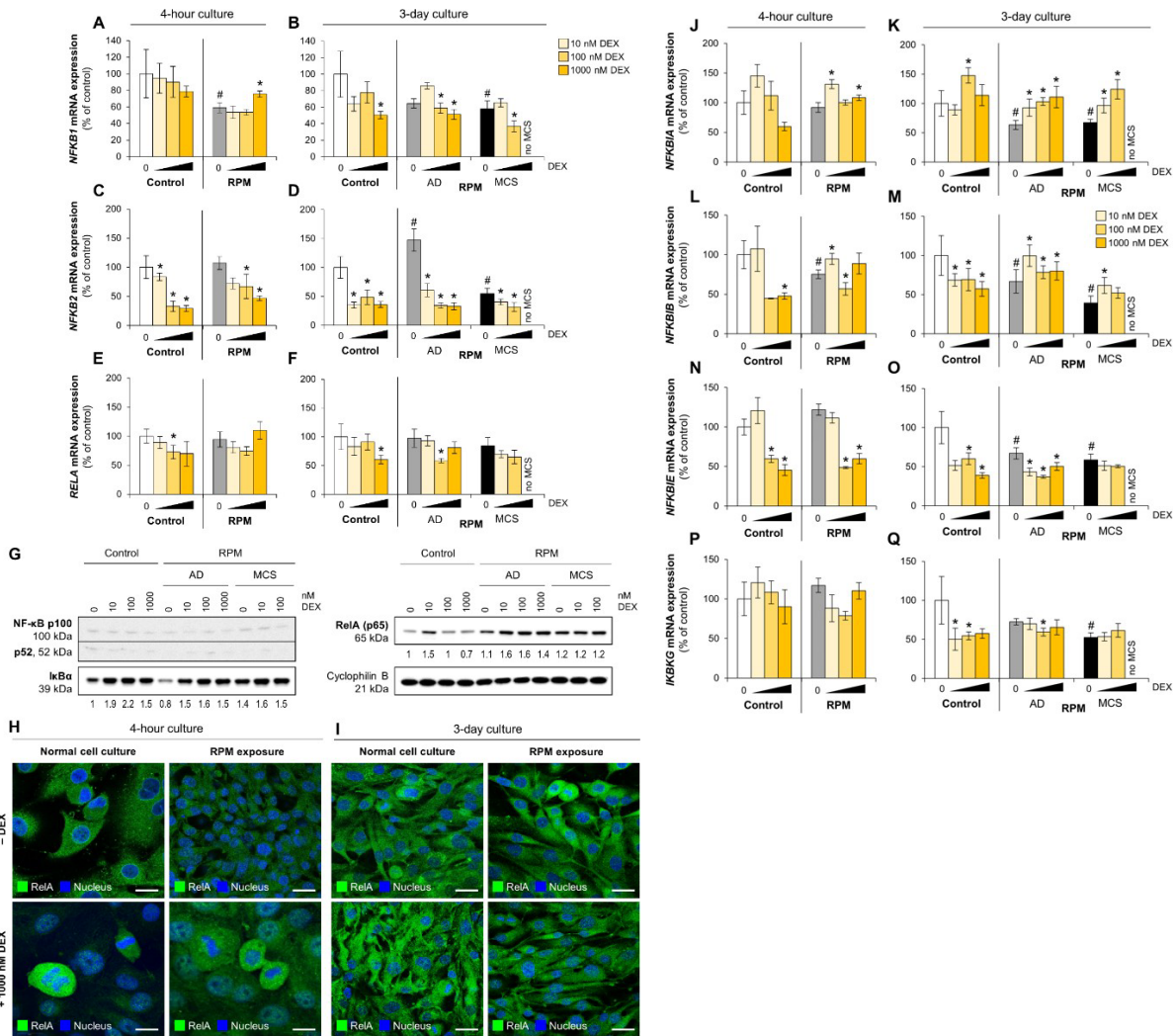


Abbildung 12. Einfluss von Dexamethason auf NF-κB FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen: (A-F) mRNA-Levels verschiedener NF-κB-Faktoren. (H,I) Die Immunfluoreszenz-Aufnahme von RelA (grün) zeigt keine Translokation in den Zellkern (blau) in FTC-133-Zellen. (J-Q) mRNA-Levels verschiedener NF-κB-Regulatoren. Größenbalken: 20 μm.

In einem ersten Schritt zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Dexamethason, haben wir wichtige Gene und Proteine untersucht, die Schlüsselereignisse in der Krebsentstehung und -entwicklung markieren, darunter die autokrine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Zellproliferation, epithelial-mesenchymal Transition und Anoikis.

Die Expressionsmuster von einzelnen Genen, denen zuvor schon eine Beteiligung an der Sphäroidbildung zugeschrieben wurde, wie z.B. *VEGFA*, *TGFβ1*, *BCL2*, *VIM* oder *NFKB2*, wurden von Dexamethason beeinflusst (Abb. 13).

Allerdings weisen unsere Daten auf einen komplexeren Regulationsmechanismus der Sphäroidbildung hin, bei dem auch andere Signalwege eine Rolle spielen könnten (z.B. Wnt/β-catenin, PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK), die auch durch Dexamethason beeinflusst werden.

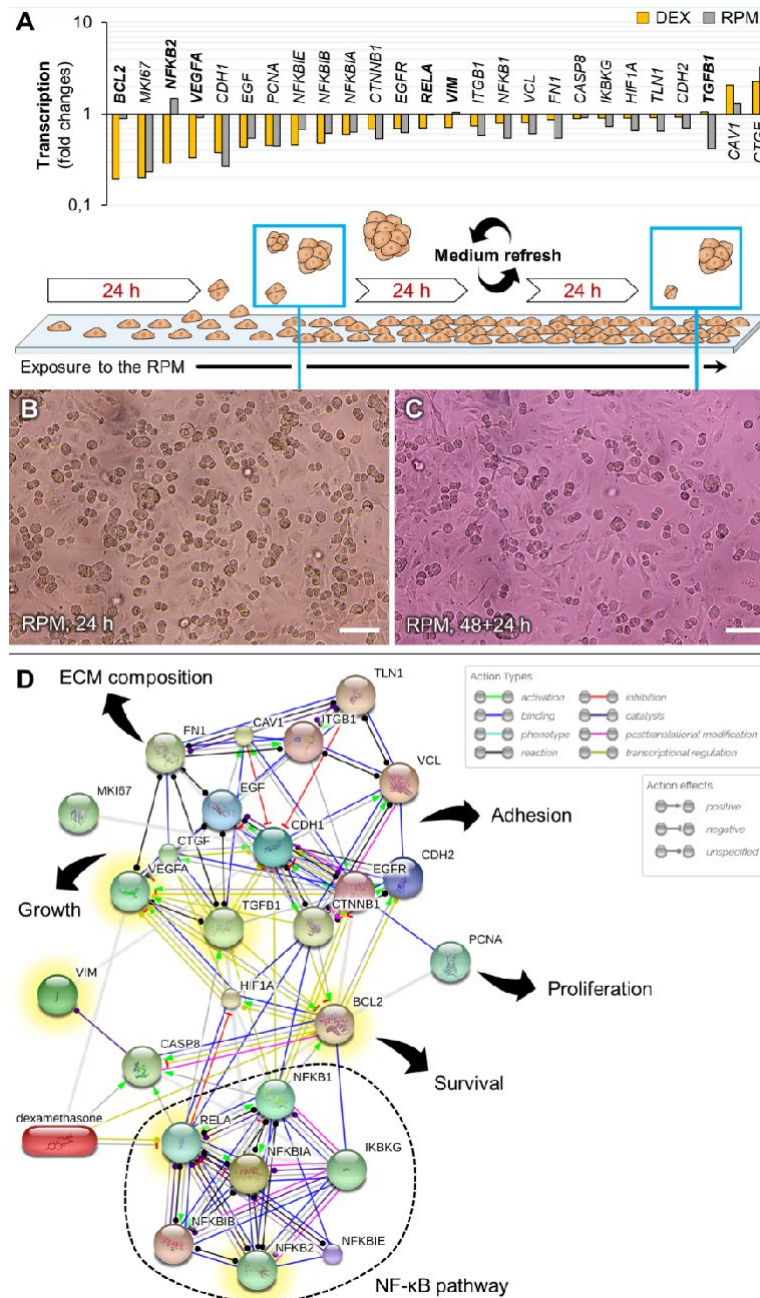


Abbildung 13. Sphäroid-„Bildfähigkeit“ von FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen: (A) Vergleich von Expressionsmustern 4 Stunden nach Dexamethason-Zugabe (gelbe Säulen) und nach 3 Tagen in Mikrogravitation (graue Säulen). Fett gedruckte Gene wiesen entweder einen fold change >2.5 auf oder eine Regulation in entgegengesetzte Richtungen. (B) FTC-133-Zellen 24 Stunden nachdem das RPM-Experiment gestartet wurde. (C) FTC-133-Zellen 24 Stunden nach einer ersten, zweitägigen RPM-Kultivierung. Das Medium mit den zuvor gebildeten Sphäroiden wurde nach zwei Tagen ausgetauscht. Auch wenn viele Gene nach Dexamethason-Zugabe ähnlich reguliert waren wie nach einem dreitägigen Aufenthalt auf der RPM, geht in Mikrogravitation – im Gegensatz zur DEX-Behandlung – die Fähigkeit zur Sphäroidbildung nicht verloren. Größenbalken: 100 µm. (D) Eine STITCH-Datenbankanalyse lieferte ein Interaktionsnetzwerk zwischen Dexamethason und den analysierten Proteinen. Die gelb hinterlegten Proteine zeigten unterschiedliches Regulationsverhalten in Mikrogravitation und nach Dexamethason-Zugabe.

Um nun den genauen Einfluss von Dexamethason auf das 3D-Wachstum von Schilddrüsen-tumorzellen zu klären sind weitere Transkriptom-Analysen notwendig, die in den kommenden Monaten durchgeführt werden. Weiterhin bedarf es der Klärung, ob Dexamethason nicht nur die Sphäroidbildung verhindert, sondern auch die Stabilität von bereits gebildeten Sphäroiden beeinflusst.

Zusammenfassung: Abschlussbericht FLUMIAS ISS

FLUMIAS Lebenserhaltungssystem (LSS) Tests

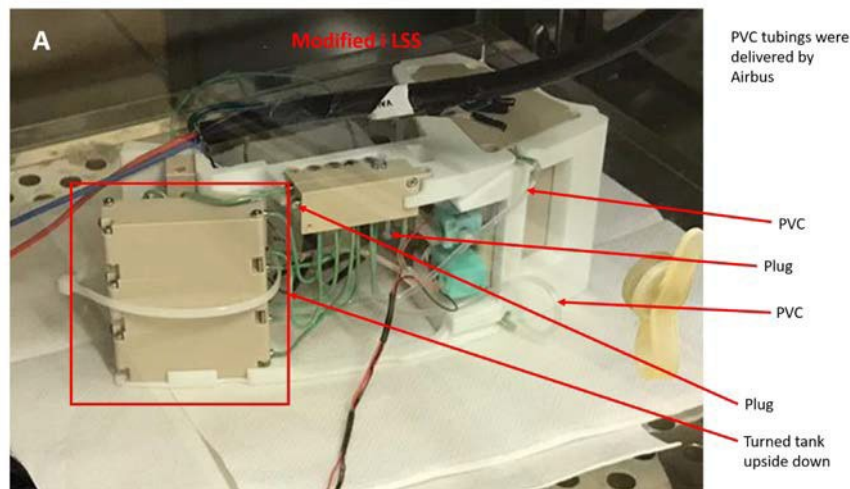


Abbildung 14: Das modifizierte LSS in unserem Magdeburger Labor.

Nach dem FLUMIAS Kick-off Meeting im Dezember 2019 hat sich unsere Forschungsabteilung dazu bereit erklärt, das FLUMIAS Mikroskop und das dazugehörige Lebenserhaltungssystem auf Funktionalität und Tauglichkeit zu testen.

Um eine qualitative Bewertung der Hardware abgeben zu können, standen wir ab Januar 2020 regelmäßig mit der Firma Airbus in Kontakt und haben nach Vorgaben des DLR- Leistungsverzeichnisses Testprotokolle erstellt. Die Vorbereitungen und Dokumentationen der Tests starteten im Februar 2020. Nach dem Erhalt der Hardware wurde diese entsprechend der Test-Spezifikationen mit unseren Zellsystemen über den Sommer hinweg getestet.

Mitte September wurde der detaillierte Testbericht zum Lebenserhaltungssystem beim DLR und der Firma Airbus eingereicht. Im Oktober 2020 wurde das FLUMIAS Breadboard-Mikroskop in unserem Labor getestet. Auch für diese Tests haben wir Testprotokolle geschrieben und versucht so viele Test-Spezifikationen wie möglich abzudecken.

Nachfolgend zeigen wir Beispiele unserer Tests. Die detaillierten Testberichte können bei Frau Dr. Catharina Carstens (DLR Raumfahrtmanagement, Bonn) eingesehen werden.

Die Test-Spezifikationen, festgelegt vom DLR, sollten prüfen, ob das Lebenserhaltungssystem in seiner Form dazu geeignet ist, humane Zellen unter den bestmöglichen Konditionen am Leben zu erhalten, um qualitativ hochwertige Experimentergebnisse liefern zu können.

Die Test-Spezifikationen sahen wie folgt aus:*Hardware-spezifisch:*

1. Test zur Eignung des aktuellen LSS-Designs für die Lebenserhaltung von Zellen
 - Nachweis, dass die Zellen mindestens zwei Wochen lang am Leben bleiben können
 - Nachweis, dass Gasblasen im System die Lebenserhaltung von Zellen nicht beeinflussen
 - Überprüfung, ob eine erhöhte CO₂-Umgebung erforderlich ist, um die Zellen am Leben erhalten zu können
2. Nachweis, dass die Leistung von Fluidik-Komponenten (Schläuchen, Pumpen, Ventilen) nach mindestens zwei Betriebswochen noch akzeptabel ist
3. Demonstration, dass Gasblasen im System die Zell-Bildgebung nicht beeinflussen
4. Demonstration, dass eine Färbung von Zellen mit anschließender Zell-Bildgebung durchgeführt werden kann

Zelltyp-spezifisch:

5. Toleranztest der Zellen gegenüber Temperaturen und Flüssigkeiten
6. Untersuchung des Zellverhaltens bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen
7. Untersuchung, ob das LSS mit anderen Zellsystemen verwendet werden kann

Die Testprotokolle wurden entsprechend dieser Spezifikationen erstellt und durchgeführt. Einen Ausschnitt der Ergebnisse zeigen wir im Folgenden:

Erste Tests sollten nachweisen, dass die verwendeten Zellsysteme in den Experiment-Containern ohne einen Nährmedium-Austausch maximal zwei Wochen lang überleben. Hierzu wurden identische Mengen von Zellen in die entsprechenden Container gesät und mit unterschiedlichen Nährmedium-Zusammensetzungen kultiviert. Die Zellen überlebten bis zu 7 Tage ohne Nährmedium in den Objektträgercontainern, vorausgesetzt man passte das initial zugeführte Nährmedium an.

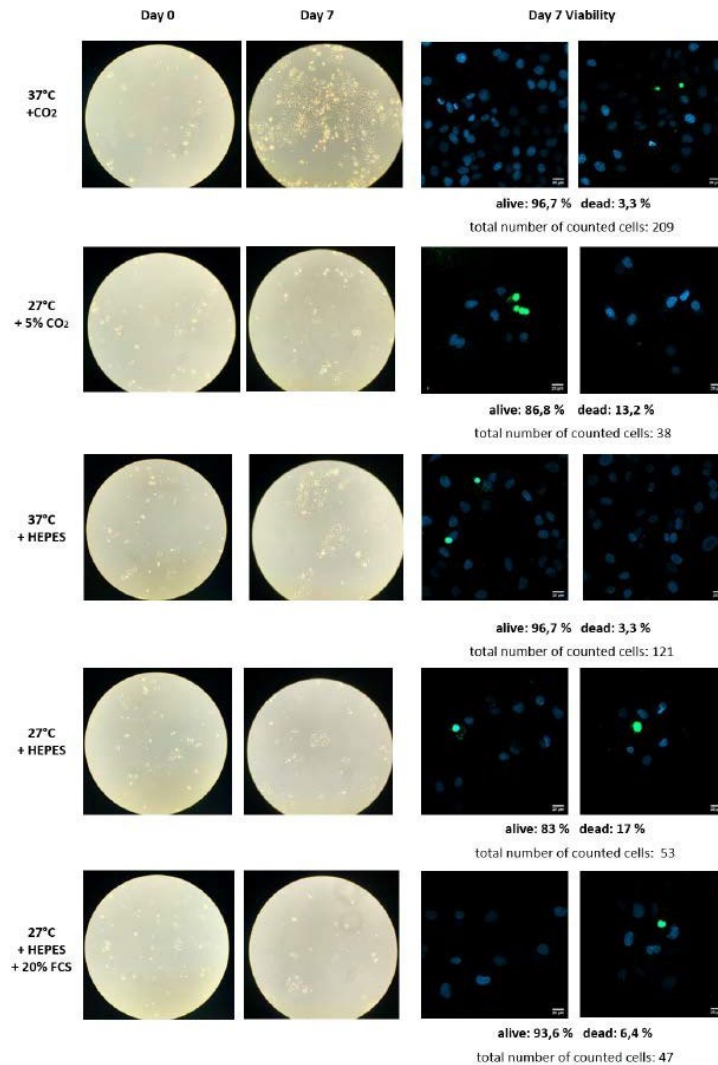


Abbildung 15: Proliferation von MCF-7 Zellen in den Objektträger-Containern ohne Mediumwechsel während 7 Tagen: Es wurden unterschiedliche Temperaturprofile und Mediumzusammensetzungen wurden getestet.

Wir testeten zudem, ob Zellen, die einem Nährstoff- und CO₂-Mangel ausgesetzt werden sich so erholen, dass die nachfolgenden Experimente auf der ISS nicht gefährdet werden.

Hier konnten wir zeigen, dass sich das von uns verwendete Zellsystem nach Nährstoff- und CO₂-Mangel regenerierte.

Ein weiteres Ziel war es, herauszufinden, wie lange man die Zellen in den Objektträger-Containern unter optimalen Bedingungen kultivieren kann.

Das Ziel sollte es sein, dass die Zellen eine vierwöchige Kultivierung mit einer Überlebensrate von 80% überstehen.

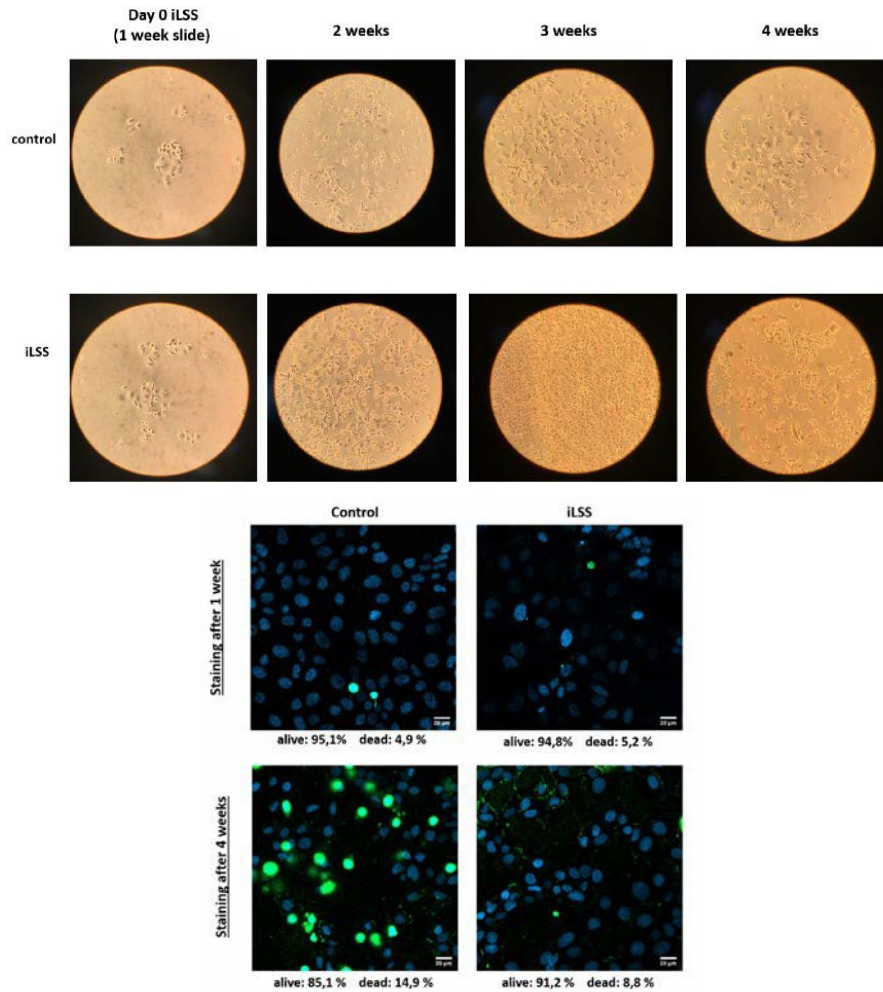


Abbildung 16: Proliferation der Zellen bis über 4 Wochen. Vitalität der Zellen bis über 4 Wochen.

Wir konnten zeigen, dass die Zellen in der Lage sind über vier Wochen hinweg zu proliferieren und dass nach dieser Zeit immer noch 91% der Zellen vital waren.

Ein weiter extrem wichtiger Punkt für das Gelingen des Experimentes war die Färbung der Zellen mittels Vitalfarbstoffen.

Daher haben wir Lebendfarbstoffe in die zusätzlichen Tanks gefüllt und mit Hilfe des LSS Systems automatisiert Färbeprotokolle durchgeführt. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass manche temperaturempfindlichen Farbstoffe durchaus auch nach zweiwöchiger Lagerung bei 37°C noch gute Ergebnisse generierten.

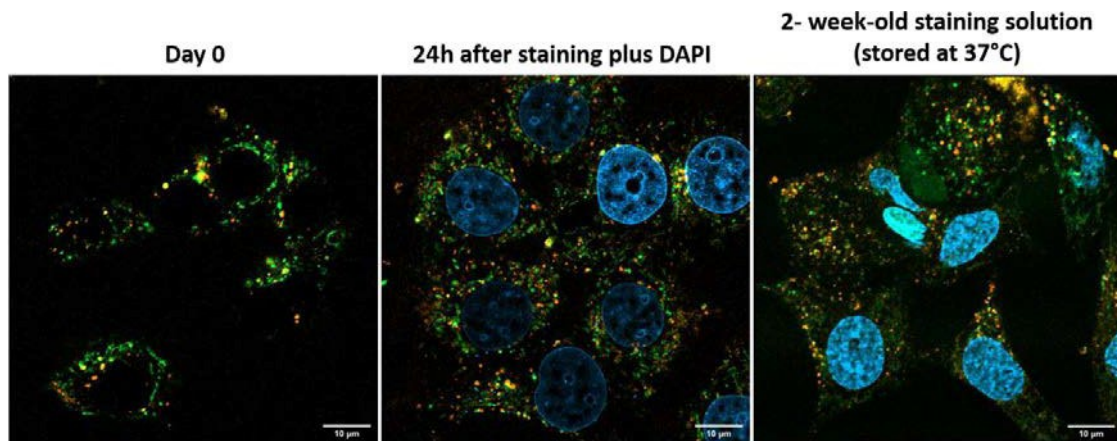


Abbildung 17: Die Färbungen wurden automatisiert über das Pumpensystem des LSS durchgeführt: Eine weitere Färbung erfolgte mit demselben Farbstoff nach zwei Wochen Lagerung bei 37°C.

Weitere Tests wurden durchgeführt, um die Test-Spezifikationen zu überprüfen. Beispiele sind u.a. Temperaturtoleranztests, Cross-Kontaminationstests, sowie Untersuchungen der Blasenbildung.

Letztendlich wurden diese Tests mit dem FLUMIAS LSS in einem Zeitraum von fast vier Monaten (Juli – September 2020) durchgeführt.

FLUMIAS Mikroskop-Tests

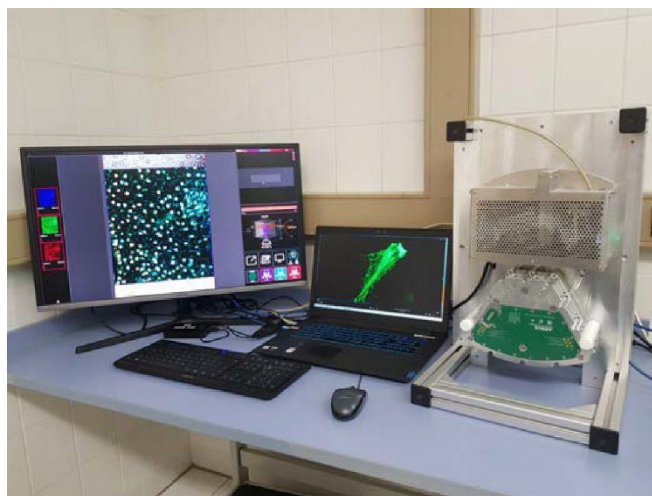


Abbildung 18: Im Oktober 2020 wurde das FLUMIAS Breadboard Mikroskop bei uns getestet.

Die nachfolgende Liste zeigt den Testplan: Legen Sie beschichtete Glasobjektträger mit MCF-7-Zellen in der folgenden Konfiguration in das Mikroskop ein, erfassen Sie Bilder und Videos und führen Sie anschließend eine 3D-Rekonstruktion durch:

1. lebendig, zweimal transfiziert, gefärbt mit mCherry (Anregung / Emission: 587 nm / 610 nm) und GFP (Anregung / Emission: 488 nm / 509 nm)
2. lebendig, gefärbt mit Premo Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP (Anregung / Emission: 488 nm / 509 nm) und Hoechst 33342 (Anregung / Emission: 350 nm / 461 nm)
3. lebendig, zweimal transfiziert, gefärbt mit mCherry (Anregung / Emission: 587 nm / 610 nm) und GFP (Anregung / Emission: 488 nm / 509 nm) und orangefarbenem CMTMROS (Anregung / Emission: 554 nm / 576 nm)
4. Wie 1., jedoch fixiert

5. Wie 2., jedoch fixiert
6. Wie 3., jedoch fixiert

Unterschiedliche Testprotokolle wurden mit dem Mikroskop durchgeführt (siehe hierzu: FLU-ADSF-TR-1000836040_2_Microscope BB Test Report).

Mit dem Mikroskop war es möglich, detaillierte Z-Stacks in sehr kurzer Zeit zu generieren. Die Polymerisierung von Aktinfilamenten war nachzuverfolgen. Die Auflösung reichte aus, um auch einzelne Bakterien erfassen zu können. Nachfolgend zeigen wir einige Beispielbilder:



Abbildung 19: Lebende MCF-7-Mammakarzinomzellen, doppelt transfiziert mit mCherry-Tubulin und LifeAct-GFP.

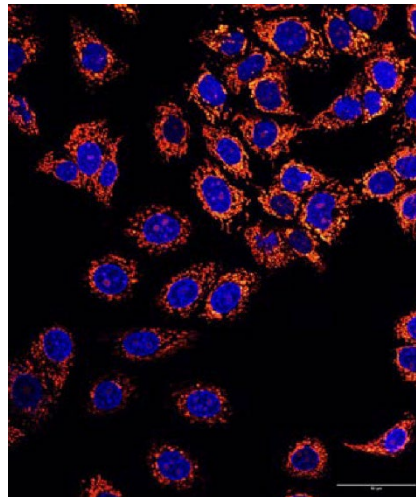


Abbildung 20: Lebende MCF-7-Zellen, gefärbt mit CMTMRos (Mitochondrien) und Hoechst 33342.

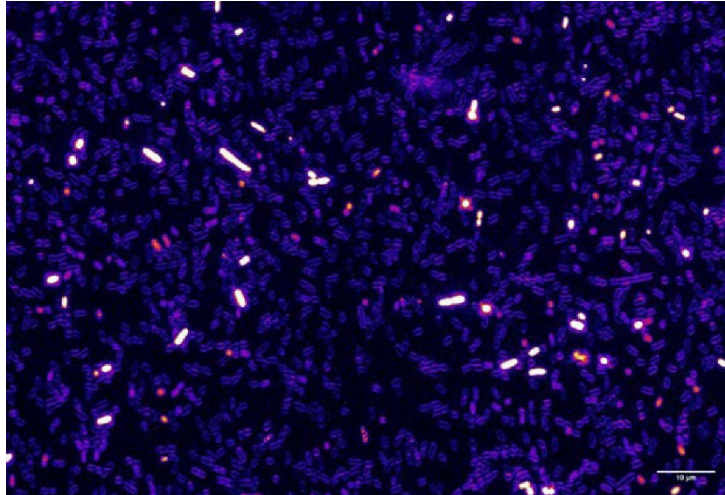


Abbildung 21: Lebende *E. coli* Bakterien gefärbt mit DAPI.

Zusammenfassung:

Veröffentlichung zu Prostatakarzinomzellen in simulierter Schwerelosigkeit

Die Publikation „*Simulated Microgravity Influences VEGF, MAPK, and PAM Signaling in Prostate Cancer Cells*“ wurde in der Zeitschrift *International Journal of Molecular Sciences* im Februar 2020 veröffentlicht

Hybel TE, Dietrichs D, Sahana J, Corydon TJ, Nassef MZ, Wehland M, Krüger M, Magnusson NE, Bauer J, Utpatel K, Infanger M, Grimm D, Kopp S. *Simulated Microgravity Influences VEGF, MAPK, and PAM Signaling in Prostate Cancer Cells. Int J Mol Sci. 2020 Feb 13;21(4):1263. doi: 10.3390/ijms21041263. PMID: 32070055; PMCID: PMC7072928.*

In diesem Artikel wird der breit gefächerte Einfluss der RPM-Exposition auf die humane Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Im Fokus standen Signalwege und Faktoren, die an der Bildung dreidimensionaler Sphäroide beteiligt zu sein scheinen. Sie spielen daher auch eine bedeutende Rolle bei Tumorprogression und Metastasierung.

Wir haben bereits zeigen können, dass Zellen, entsprechend ihres Ursprungsgewebes, während RPM-Exposition zwei Populationen bilden. Eine Population wächst weiterhin adhärent (AD), während die andere Population dreidimensionale Aggregate (MCS) bildet.

Auch hier konnten wir zeigen, dass dieses Phänomen auch auf die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 zutrifft (Abb. 22).

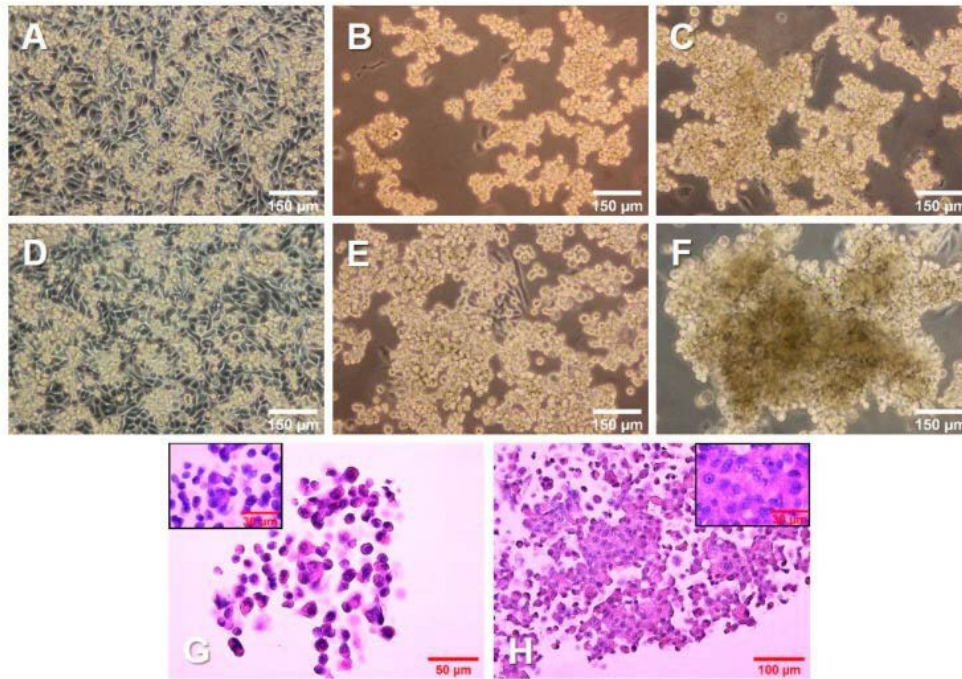


Abbildung 22: Phasenkontrastbilder der PC-3 Zellen: A, D: statische Kontrollen nach 3 und 5 Tagen. B, C: 3 Tage RPM. E, F: 5 Tage RPM. G, H: HE-Bilder nach 3 und 5 Tagen.

Eine Zusammenfassung der erhobenen Daten sieht man in Abbildung 23. Die verschiedenen durch quantitative real-time PCR (qPCR) analysierten Gene (Abb. 23A) wurden in μg -Proben (AD und RPM) unterschiedlich reguliert.

Ein genauere Blick auf die 3-Tage-Proben zeigt, dass die meisten Gene, die an der VEGF-Signalübertragung beteiligt sind (blaue Balken), in AD-Proben im Vergleich zu $1g$ hochreguliert sind, während die Genexpression in MCS ein heterogeneres Muster aufweist. Insbesondere sind *VEGFA*, *FLK1* und *LCN2* in den AD- und MCS-Proben nach 3 Tagen gleichermaßen reguliert.

Nach einer 5-tägigen RPM-Exposition sind die meisten der untersuchten VEGF-Signalmoleküle in den AD-Proben signifikant hochreguliert. Im Vergleich dazu zeigten 5-tägige MCS-Proben im Gegensatz zu den 3-tägigen Proben eine signifikante Regulation. Bemerkenswerterweise ist *VEGFA* in 5 Tage AD-Proben im Vergleich zu $1g$ Proben nicht reguliert. Darüber hinaus ist *LCN2* unter allen Bedingungen stark hochreguliert.

Die untersuchten Zytoskelettmoleküle (grüne Balken) sind nach 3 Tagen nicht reguliert. Nach 5 Tagen sind jedoch beide Bedingungen hochreguliert.

Die untersuchten EZM-Moleküle (violette Balken) zeigen nach 3-tägiger RPM-Exposition ein vergleichbares Bild in AD- und MCS-Proben, wobei *COL4A5* und *LAMA3* stark hochreguliert werden. Nach 5 Tagen zeigen AD-Zellen ein heterogenes Expressionsbild, während *LAMB2* auffallend hochreguliert ist. In MCS sind Kollagene jedoch deutlich erhöht, während *LAMB2* im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert wird.

Die Gene des fokalen Adhäsionsmolekülkomplexes (orangefarbene Balken), insbesondere die *CDH1*-mRNA, sind unter beiden 3-Tage-Bedingungen stark hochreguliert. Obwohl *CDH1* immer noch signifikant hochreguliert ist, scheint es unter 5-Tage-Bedingungen reduziert zu sein.

Die 23 untersuchten Gene wurden hinsichtlich ihrer 114 möglichen Interaktionen und gegenseitigen Expressionsabhängigkeiten untersucht. Eine Pathway-Analyse dieser Elemente, dargestellt im molekularen Aktionsmodus, ist in Abb. 22B dargestellt.

Die Analyse zeigt, dass die untersuchten Faktoren Teil eines Netzwerks sind, das die zentralen Faktoren *CDH1*, *VCL*, *TLN1*, *FN1*, *VEGFA*, *KDR*, *RAF1*, *ERK1 / 2*, *MAP2K1*, *MTOR*, *AKT1*, *PTK2* und *SRC1* umfasst. Von diesen Komponenten erscheint *CDH1* der Hauptknotenpunkt zu sein.

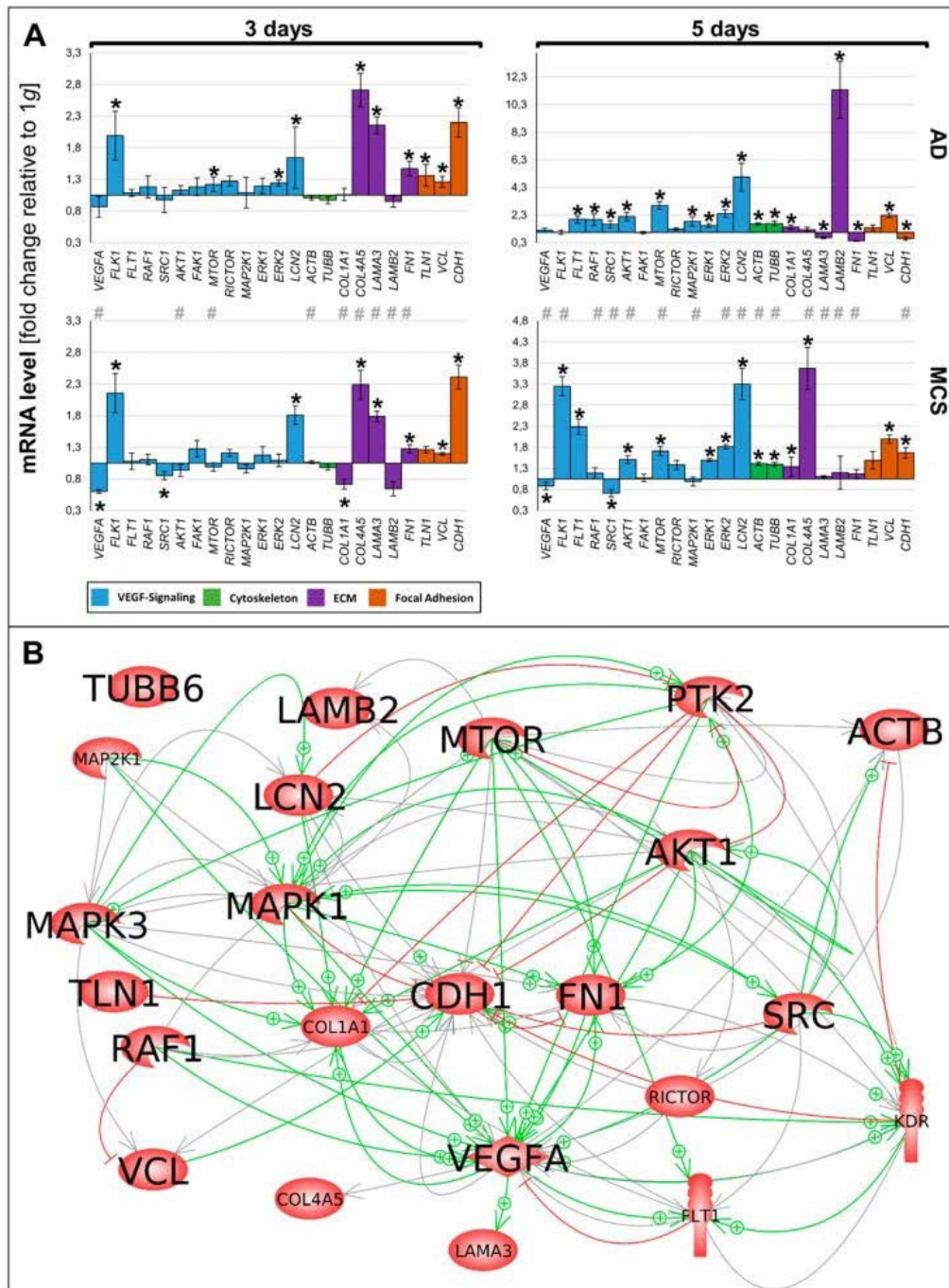


Abbildung 23: Genexpressionsanalyse von PC-3-Zellen: A: Zusammenfassung der Änderung der Genexpression von PC-3 Zellen, gemessen durch qPCR nach 3- und 5-tägiger RPM-Exposition. Dargestellt werden die in Bezug auf 1g ermittelten Ergebnisse von AD und MCS. Farbcodierte Balken repräsentieren Gene verwandter biologischer Prozesse. (B) Interaktionsnetzwerk ausgewählter Elemente auf Genexpressionsebene; 22 von 23 ausgewählten Genen, die durch qPCR analysiert wurden, tragen zu dem Netzwerk bei, das 114 Beziehungen umfasst. Grüne Pfeile symbolisieren Aktivierung, rote Pfeile Hemmung. Graue Linien zeigen an, dass Wechselwirkungen stattfinden, deren

Auswirkungen nicht geklärt wurden. Das Interaktionsnetzwerk wurde mit Elsevier Pathway Studio plus erstellt.

Zusammenfassend, führte $s\text{-}\mu\text{g}$ zur veränderten Regulation von Proteinen und Genen, die an der Angiogenese, Zellmorphologie, Migration, ECM und dem 3D-Wachstum beteiligt sind. Darüber hinaus bildeten die PC-3-Zellen Sphäroide, wenn sie unter $s\text{-}\mu\text{g}$ - Bedingungen kultiviert wurden. Diese 3D-Konstrukte könnten in zukünftigen Studien zur Ermittlung und zur Testung von potentiellen Krebsmedikamenten genutzt werden, da sie die zelluläre Umgebung bei der Metastasierung genauer nachahmen. Als Beispiel sei die Ermittlung der Diffusionsfähigkeit eines Wirkstoffes genannt. Während das Medikament auf einem monozellulären Zellrasen problemlos in die Zellen eindringen kann, wird dies bei der Diffusion in das Zentrum einer Metastase oder eines Sphäroides extrem erschwert und damit auch das Wirkprofil des Medikaments verändert.

Ein zukünftiges Projekt könnte darin bestehen, die Wirkungen von Arzneimitteln zu untersuchen, die auf die in den PC-3-Zellen regulierten Proteine abzielen, wenn sie der Mikrogravitation ausgesetzt werden.

Zusammenfassung:

Versuche zur pharmazeutischen Beeinflussung der Sphäroidbildung in Mikrogravitation

Die Ablösung eigentlich adhärent wachsender Zellen und die anschließende Bildung von Sphäroiden ist bei unterschiedlichen humanen Zelltypen, die unter dem Einfluss von Mikrogravitation gezüchtet werden, zu beobachten. Bei Tumorzellen zeigt dieser Prozess Ähnlichkeiten mit der Metastasierung im menschlichen Körper und kann somit wertvolle Erkenntnisse für die Entwicklung von Tumoren liefern. Diese Erkenntnisse wiederum können genutzt werden, um neue Wirkstoffe auszutesten und/oder Angriffspunkte für neuartige Medikamente zu finden.

Schilddrüsenkarzinom

Nachdem vergangene Experimente gezeigt haben, dass die Verwendung des synthetischen Glukokortikoides Dexamethason die Sphäroidbildung von FTC-133 Schilddrüsentumorzellen in simulierter Mikrogravitation hemmt, deuteten molekulare Untersuchungen auf einen komplexeren Regulationsmechanismus der Sphäroidbildung hin, bei dem verschiedene Signalwege eine Rolle spielen könnten (z.B. Wnt/ β -catenin, PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK).

Die ersten Daten dieser Untersuchungen wurden 2019 erhoben und im Februar 2020 in dem Artikel „*Dexamethasone Inhibits Spheroid Formation of Thyroid Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity*“ publiziert, der im Journal *Cells* erschienen ist (*Cells* 2020, 9(2), 367; doi:10.3390/cells9020367). Die Publikation wurde auf den Seiten 15-19 zusammengefasst.

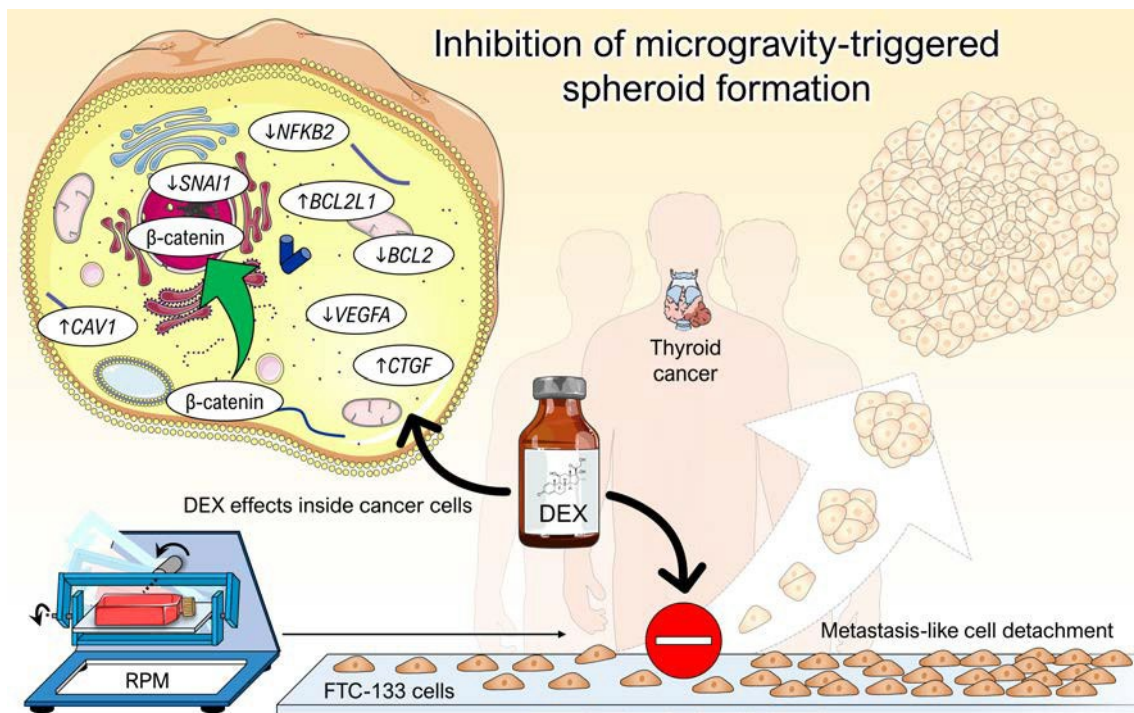


Abbildung 24: Graphical abstract: Grafische Zusammenfassung der Effekte, die eine Zugabe von Dexamethason bei einer Kultur von FTC-133-Schilddrüsenkarzinomzellen auf der RPM auslöst (Melnik et al., 2020).

Um nun den genauen Einfluss von Dexamethason auf das 3D-Wachstum von Schilddrüsen-tumorzellen aufzuklären, wurden im Jahr 2020 die molekularen Analysen fortgesetzt.

Einen Schwerpunkt bildete zunächst die Expression von Schlüsselgenen verschiedener Signalwege, darunter auch die durch Dexamethason direkt angesteuerte Steroidsigna-
ltransduktion (Abb. 25).

Besonders interessant hierbei ist der Hitzeschockprotein-90-(Hsp90)-Glukokortikoidrezeptor-
komplex, der an onkogenen Prozessen beteiligt ist, darunter auch an der epithelial-
mesenchymale Transition (EMT), einem Schlüsselprozess bei der Initiierung und Progression von
Krebserkrankungen. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen werden derzeit noch
untersucht.

Vor Kurzem wurde jedoch gezeigt, dass zwei Vertreter der Hsp90-bindenden Unterfamilie von
Immunophilinen, FKBP51 und FKBP52, mehrere zelluläre Prozesse der Karzinogenese steuern.
FKBP51, das Protein-Produkt des *FKBP5*-Gens, ist eines der Helferproteine (Cochaperone) im
Hsp90-Komplex, die die Signaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors beeinflussen. In
zellulären Tests reduziert dieses Cochaperon die Signaltransduktion des Glukokortikoid-
rezeptors. Wir konnten bestätigen, dass die Expression von FKBP51 durch Dexamethason
verstärkt wird. Die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors führt daher zur vermehrten Synthese
des inhibitorischen FKBP51. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen negativen,
intrazellulären Rückkopplungsmechanismus: Nach anfänglicher Stimulation führt seine erhöhte
Expression zur Desensitivierung des Glukokortikoidrezeptors (Abb. 25C).

Für FKBP52, das Protein-Produkt des *FKBP4*-Gens, konnten die Wissenschaftler zeigen, dass es
die Signaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors in eukaryotischen Zellen verstärkt bzw. dass
es die inhibitorische Wirkung von FKBP51 aufhebt.

Die Expression von *FKBP4* war erhöht in adhärenenten FTC-133-Zellen, wenn diese der simulierten
Mikrogravitation ausgesetzt waren (Abb. 25D).

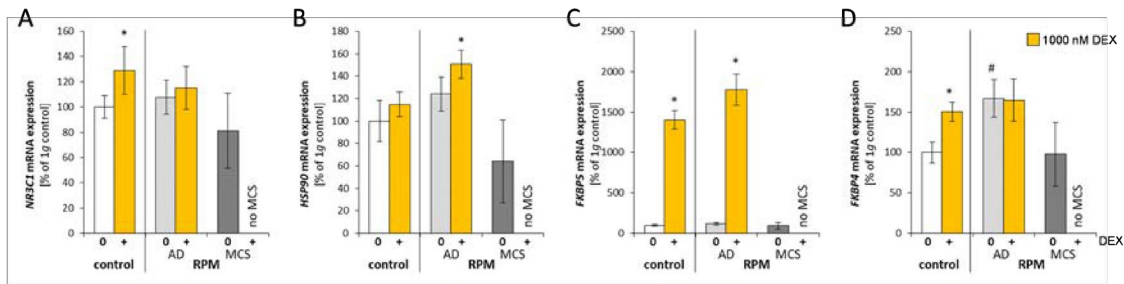


Abbildung 25: Glukokortikoidrezeptor-Signaltransduktion: Einfluss von Dexamethason auf die Signaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen unter normalen Zellkulturbedingungen und in simulierter Mikrogravitation. Relative Expression von (A) *NR3C1*, (B) *HSP90*, (C) *FKBP5*, (D) *FKBP4* in Ab- und Anwesenheit von 1 µM DEX nach 72 Stunden. * $p < 0,05$

Darüber hinaus wurden in ersten Transkriptom-Analysen eine Beteiligung des mTOR-Signalwegs und der p38 MAP-Kinase in FTC-133-Zellen nach Dexamethason-Behandlung gefunden (Abb. 26). Insbesondere bei den MAP-Kinasen verdichten sich die Hinweise einer entgegengesetzten Regulation durch Dexamethason und Mikrogravitation.

Hier wurden in 2021 weitere Untersuchungen durchgeführt, um die Beeinflussung der Sphäroidbildung durch Dexamethason aufzuklären.

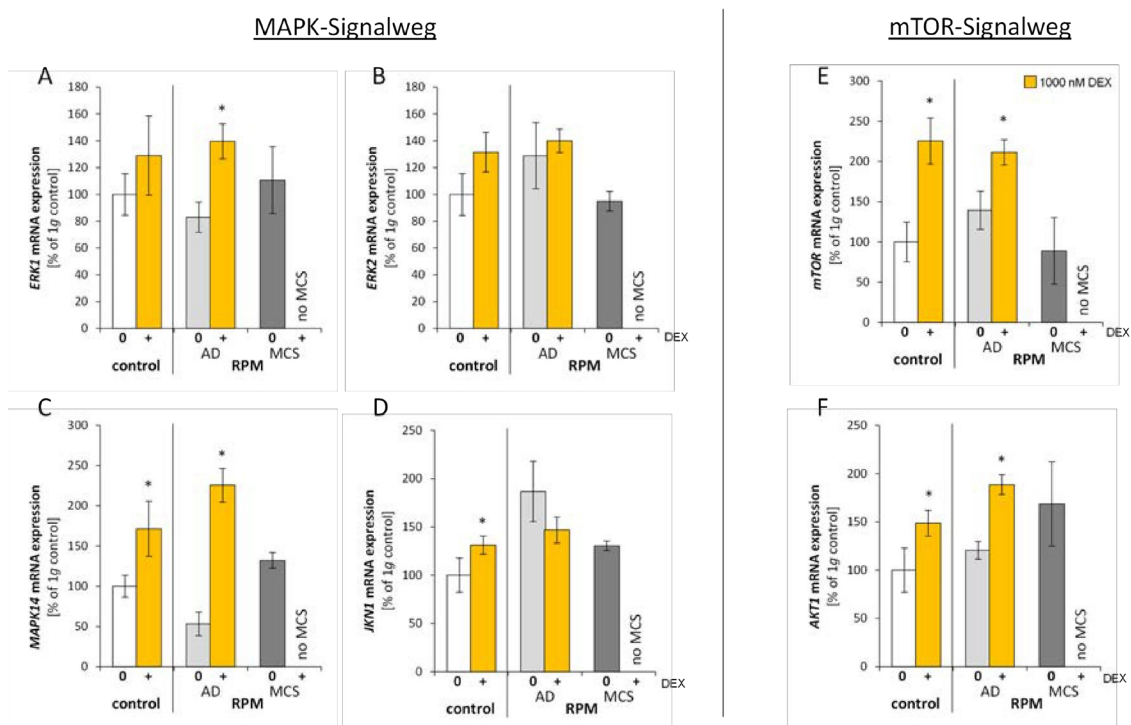


Abbildung 26: MAPK- und mTOR Signalwege: Einfluss von Dexamethason auf den mTOR-Signalweg und der p38 MAP-Kinase in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen unter normalen Zellkulturbedingungen und in simulierter Mikrogravitation. Relative Expression von (A) *ERK1*, (B) *ERK2*, (C) *MAPK14*, (D) *JNK1*, (E) *MTOR*, (F) *AKT1* in Ab- und Anwesenheit von 1 µM DEX nach 72 Stunden. * $p < 0,05$

Mammakarzinom

Ferner wurde die Wirkung von Curcumin auf Sphäroidbildung und Redifferenzierung von MCF-7-Mammakarzinomzellen untersucht.

Curcumin ist ein Polyphenol aus dem Rhizom von *Curcuma longa* und wurde in den vergangenen Jahren aufgrund seiner antiinflammatorischen und tumorhemmenden Wirkung intensiv untersucht. Die Substanz inhibiert sowohl die Initiation, Progression, als auch die Metastasierung

vieler Tumore u.a. durch die Supprimierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, insbesondere von NF- κ B, der von unserer Arbeitsgruppe bereits 2018 als wichtiger Faktor für die Sphäroidbildung von MCF-7-Zellen auf der RPM ausgemacht wurde (Kopp et al., 2018). Deshalb stand NF- κ B auch im Fokus der ersten Analysen.

Effekt von Curcumin auf die Sphäroidbildung

Die Zugabe von Curcumin hatte einen deutlichen Effekt auf die Sphäroidbildung. Nach 24 h waren im Vergleich zur Kontrolle nur wenige oder keine Sphäroide vorhanden, welche sich nach 72 h in ihrer Größe auch nicht signifikant veränderten (Abb. 27).

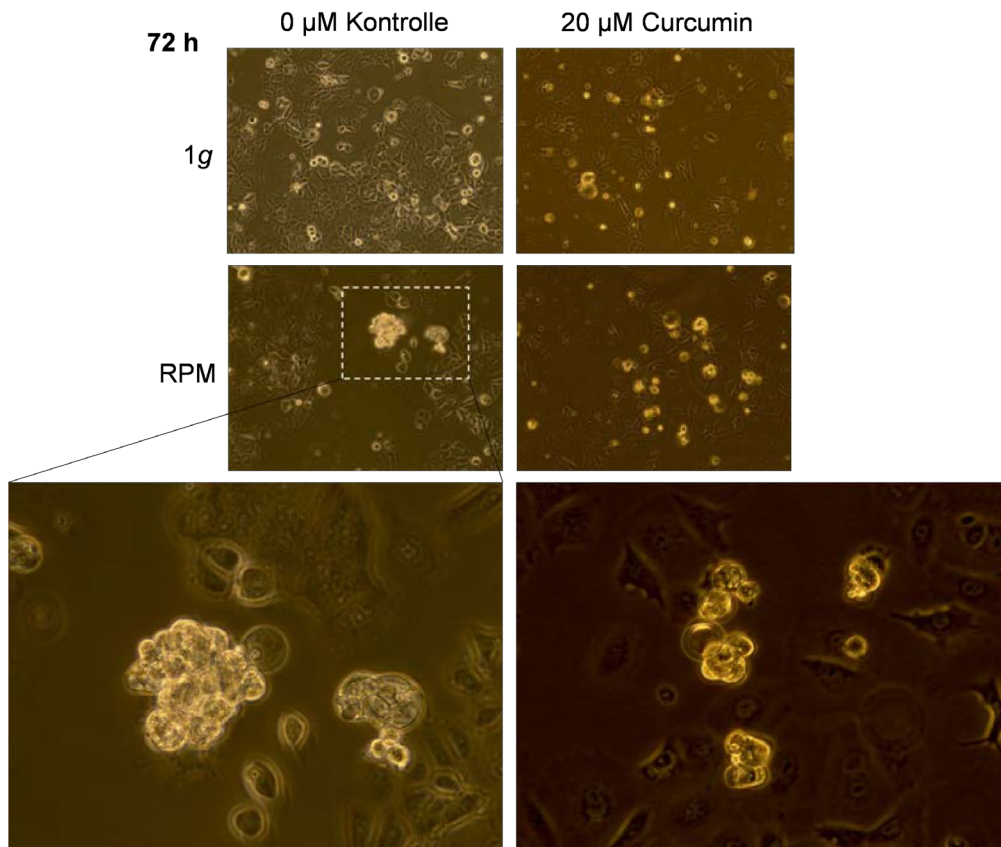


Abbildung 27: Phasenkonstrastmikroskopie: Einfluss von Curcumin auf die Sphäroidbildung und -morphologie von MCF-7-Mammakarzinomzellen in simulierter Mikrogravitation.

Effekt von Curcumin auf NF- κ B

Die Behandlung der MCF-7-Zellen mit Curcumin hat vor allem Einfluss auf den nicht-kanonischen NF- κ B Signalweg in den MCF-7-Sphäroiden, was die stark erhöhte Expression von *NFKB2* und *RELB* vermuten lässt (Abb. 28B,D).

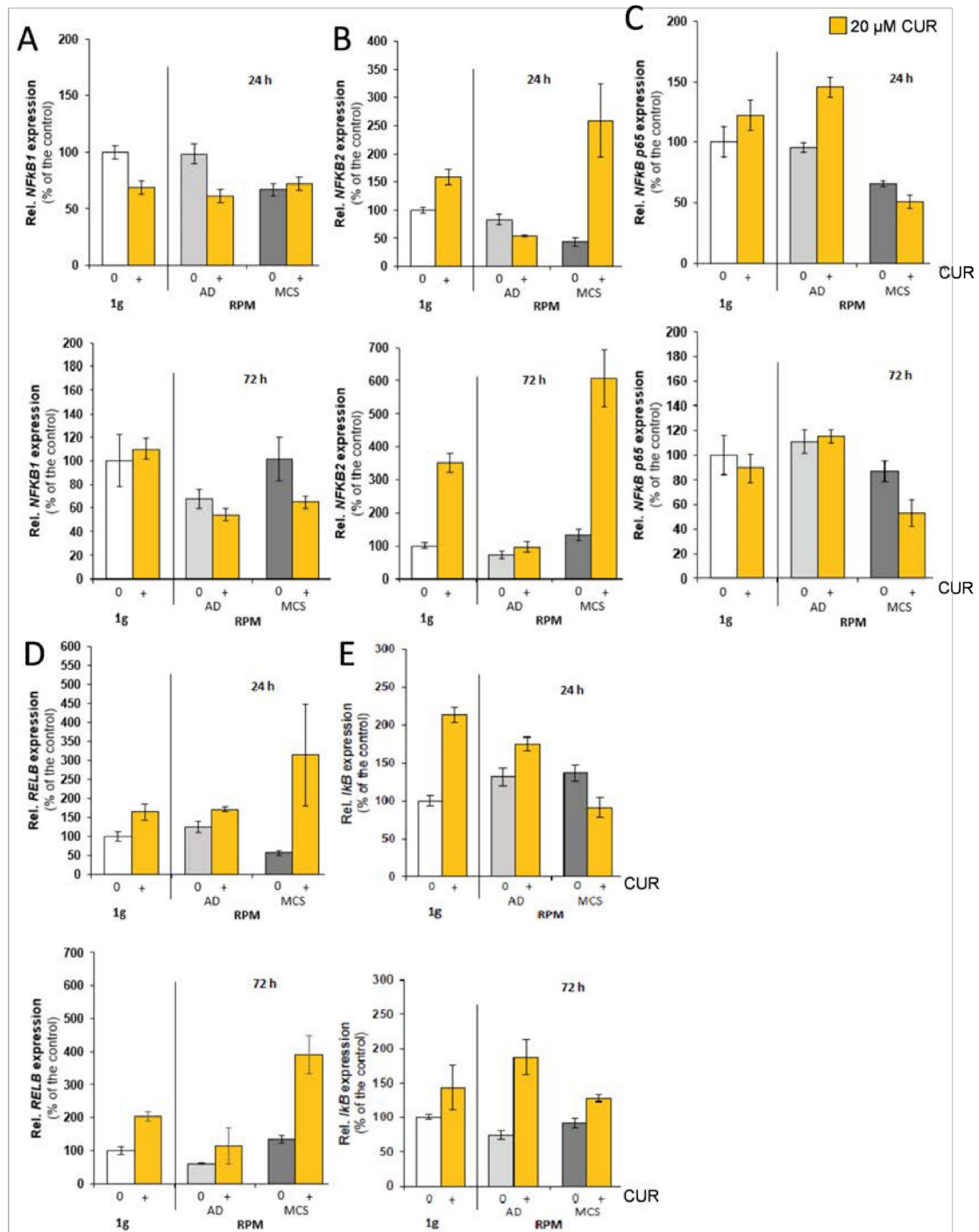


Abbildung 28: NFKB Signaltransduktion: Einfluss von Curcumin auf NF- κ B in MCF-7 Mammakarzinomzellen unter normalen Zellkulturbedingungen und in simulierter Mikrogravitation. Relative Expression von (A) *NFKB1*, (B) *NFKB2*, (C) *RELA*, (D) *RELB*, (E) *IKBKG* in Ab- und Anwesenheit von 20 μ M Curcumin nach 24 und 72 Stunden.

Effekt von Curcumin auf die Genexpression von Zelladhäsionsmolekülen

Eine Behandlung mit Curcumin führte zu einer deutlich verringerten Expression von E-Cadherin (*CDH1*) in Mikrogravitation. In den MCF-7-Sphäroiden führte die Zugabe von Curcumin nach 24 h zu einer vorübergehenden, aber deutlich reduzierten Expression von β -Catenin (*CTNNB1*), während unter 1g die Expression von β -Catenin nach Curcuminzugabe vorübergehend erhöht war (Abb. 29).

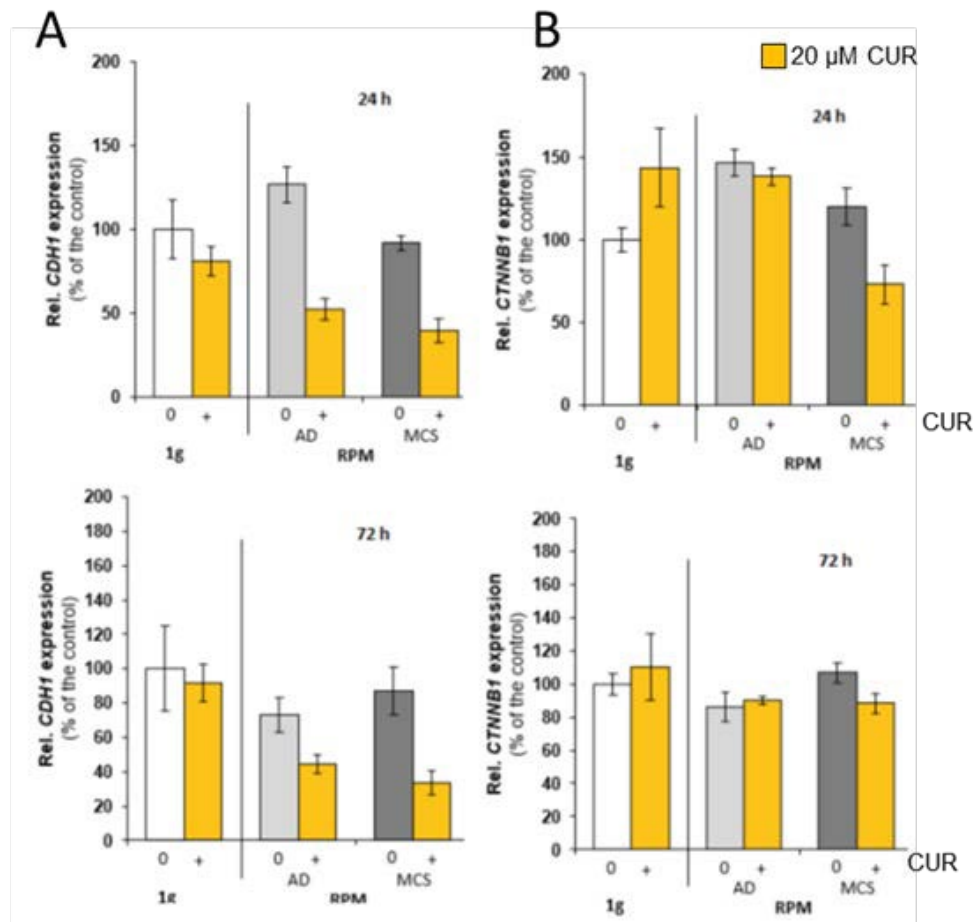


Abbildung 29: Zelladhäsion: Einfluss von Curcumin auf die Zelladhäsion in MCF-7 Mammakarzinomzellen unter normalen Zellkulturbedingungen und in simulierter Mikrogravitation. Relative Expression von (A) *CDH1*, (B) *CTNNB1* in Ab- und Anwesenheit von 20 µM Curcumin nach 24 und 72 Stunden.

Auch für dieses Teilprojekt wurden anschließend im Jahr 2021 ergänzende Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt, um die Beeinflussung der Sphäroidbildung durch Curcumin aufzuklären.

ABSOLVENTEN

Doktorarbeiten, begonnen (b), laufend (l) und abgeschlossen (a):

M.Sc. Mohamed Zakaria Nassef (Dr. rer. medic.) (l)
 M.Sc. Daniela Melnik (Dr. rer. medic.) (l)
 Christoph Buken (Dr. med.) (a)
 Dorothea Dietrichs (Dr. med.) (l)
 Sophia Gilger (Dr. med.) (l)
 Paul Steinwerth (Dr. med.) (l)
 Anna Heinrichs (Dr. med.) (l)

Masterarbeiten, laufend (l) und abgeschlossen (a)

Keine in 2020 (COVID-19 Pandemie)

Bachelorarbeiten, laufend (I) und abgeschlossen (a)

Ronni Baron (a)
Søren Lambæk Knudsen (a)
Rebecca Birkholm Hansen (a)
Jeppe Yeoman (a)
Briyanth Ravichandran (a)

Praktika

Externes Praktikum Jenny Graf, Master Zell-und Molekularbiologie, Universität Erlangen, Sommersemester 2020 (17.08. – 30.09.20)

Präsentationen 2020

- Arzneimitteltherapeutische Konferenz: Weltraummedizin: Besondere Aspekte der Pharmakologie
- Gravimeeting 2020: Hemmung der Sphäroidbildung - Experimente mit pharmazeutischen Wirkstoffen im 3D-Mikrogravitations-Metastasen-Modell
- FLUMIAS-ISS IWG Meeting: Präsentation des ISS Experimentes: WNT-signaling is involved in multicellular spheroid formation of breast cancer cells in microgravity

PUBLIKATIONEN 2020

1. Wehland M, Steinwerth P, Aleshcheva G, Sahana J, Hemmersbach R, Lützenberg R, Kopp S, Infanger M, Grimm D. Tissue Engineering of Cartilage Using a Random Positioning Machine. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 16;21(24):9596.
2. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, Infanger M, Corydon TJ. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2020 Dec;67(Pt 1):122-153.
3. Prasad B, Grimm D, Strauch SM, Erzinger GS, Corydon TJ, Lebert M, Magnusson NE, Infanger M, Richter P, Krüger M. Influence of Microgravity on Apoptosis in Cells, Tissues, and Other Systems In Vivo and In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 9;21(24):9373
4. Johnson IRD, Nguyen CT, Wise P, Grimm D. Implications of Altered Endosome and Lysosome Biology in Space Environments. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 2;21(21):8205.
5. Nassef MZ, Melnik D, Kopp S, Sahana J, Infanger M, Lützenberg R, Relja B, Wehland M, Grimm D, Krüger M. Breast Cancer Cells in Microgravity: New Aspects for Cancer Research. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 5;21(19):7345.
6. Krüger M, Kopp S, Wehland M, Corydon TJ, Grimm D. Science between Bioreactors and Space Research-Response to Comments by Joseph J. Bevelacqua et al. on "Dexamethasone Inhibits Spheroid Formation of Thyroid Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity". *Cells.* 2020 Jul 23;9(8):1763.
7. Prasad B, Richter P, Vadakedath N, Mancinelli R, Krüger M, Strauch SM, Grimm D, Darriet P, Chapel JP, Cohen J, Lebert M. Exploration of space to achieve scientific breakthroughs. *Biotechnol Adv.* 2020 Nov 1;43:107572.
8. Grimm D, Wehland M, Corydon TJ, Richter P, Prasad B, Bauer J, Egli M, Kopp S, Lebert M, Krüger M. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and

- cancer stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2020 Aug;9(8):882-894.
9. Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J Clin Med.* 2020 Mar 18;9(3):824.
 10. Bauer TJ, Gombocz E, Wehland M, Bauer J, Infanger M, Grimm D. Insight in Adhesion Protein Sialylation and Microgravity Dependent Cell Adhesion-An Omics Network Approach. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 4;21(5):1749.
 11. Wehland M, Simonsen U, Buus NH, Krüger M, Grimm D. An evaluation of the fixed dose combination sacubitril/valsartan for the treatment of arterial hypertension. *Expert Opin Pharmacother.* 2020 Jul;21(10):1133-1143.
 12. Hybel TE, Dietrichs D, Sahana J, Corydon TJ, Nassef MZ, Wehland M, Krüger M, Magnusson NE, Bauer J, Utpatel K, Infanger M, Grimm D, Kopp S. Simulated Microgravity Influences VEGF, MAPK, and PAM Signaling in Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 13;21(4):1263.
 13. Melnik D, Sahana J, Corydon TJ, Kopp S, Nassef MZ, Wehland M, Infanger M, Grimm D, Krüger M. Dexamethasone Inhibits Spheroid Formation of Thyroid Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity. *Cells.* 2020 Feb 5;9(2):367.
 14. Povlsen AL, Grimm D, Wehland M, Infanger M, Krüger M. The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. *J Clin Med.* 2020 Jan 18;9(1):267.
 15. Strube F, Infanger M, Wehland M, Delvinioti X, Romswinkel A, Dietz C, Kraus A. Alteration of Cytoskeleton Morphology and Gene Expression in Human Breast Cancer Cells under Simulated Microgravity. *Cell J.* 2020 Apr;22(1):106-114. doi: 10.22074/cellj.2020.6537. Epub 2019 Sep 8. PMID: 31606974; PMCID: PMC6791064.

1.1.3 Projektförderung vom 01.01.-31.12.2021:

Wegen der anhaltenden COVID-19 Pandemielage konnten einige beantragte Missionen/Reisen (1 x Bonn, 1 x Erlangen, 4 x Dänemark) im Jahr 2021 nicht durchgeführt werden. Die 37. Parabelflugkampagne der Deutschen Raumfahrtagentur im DLR fand vom 14. bis zum 24. Juli 2021 am Flughafen in Paderborn statt.

Unsere Arbeit war generell extrem eingeschränkt. Wir haben uns daher verstärkt auf die Erhebung von Daten auf „Ground-based Facilities“ konzentriert. Allerdings konnten wir 2021 die Anlagen des DLR in Köln nutzen und die geplanten Experimente durchführen.

Im Berichtszeitraum wurden ferner die Daten der Cellbox-1 und Cellbox-2 Missionen zusammengetragen, ergänzt und weiter analysiert und drei Publikationen in internationalen wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert (PMID: 33669943, PMID: 34445479 und PMID: 34884646).

Es fanden molekularbiologische Arbeiten an den Proben der 37. DLR PFC statt und es wurden Vibrationsuntersuchungen durchgeführt. RNAseq Daten wurden bioinformatisch ausgewertet.

Darüber hinaus wurde eine Veröffentlichung über die Daten, die im Rahmen der 34. DLR Parabelflugkampagne erhoben wurden, vorbereitet.

Zusammenfassung:

Veröffentlichung zu Mammakarzinomzellen in simulierter Schwerelosigkeit

Die Publikation "Alterations of Growth and Focal Adhesion Molecules in Human Breast Cancer Cells Exposed to the Random Positioning Machine" wurde in der Zeitschrift „Frontiers in Cell and

Developmental Biology' im Juni 2021 publiziert.

Sahana J, Corydon TJ, Wehland M, Krüger M, Kopp S, Melnik D, Kahlert S, Relja B, Infanger M, Grimm D. Alterations of Growth and Focal Adhesion Molecules in Human Breast Cancer Cells Exposed to the Random Positioning Machine. Front Cell Dev Biol. 2021 Jun 30;9:672098. doi: 10.3389/fcell.2021.672098. PMID: 34277614; PMCID: PMC8278480.

In diesem Artikel wurde der breit gefächerte Einfluss der RPM-Exposition auf humane Brustkrebszellen untersucht.

In dieser Studie evaluierten wir Veränderungen der fokalen Adhäsionen (FAs) bei zwei Arten von Mammakarzinomzelllinien (MKZ) (differenzierte MCF-7- und triple-negative MDA-MB-231-Zelllinie), die unter simulierter Mikrogravitation ($s\text{-}\mu\text{g}$, RPM) für 24 h kultiviert wurden.

Nach der Exposition änderten die MKZ ihr Wachstumsverhalten und zeigte in den RPM-Proben zwei unterschiedliche Phänotypen: Ein Teil der Zellen wuchs als normale zweidimensionale Monoschicht [adhärente (AD) MKZ], während der andere Teil dreidimensionale (3D) Sphäroide (MCS) bildete.

Nach 1 h 30 min (MDA-MB-231) und 1 h 40 min (MCF-7) hafteten die MCS vollständig am Boden des Objektträgers. Nach 2 h begannen MDA-MB-231-MCS-Zellen zu migrieren, und nach 6 h hatte eine große Anzahl der Zellen die MCS verlassen und wuchs in einem verstreuten Muster weiter, während MCF-7-Zellen als konfluenter Monolayer nach 6 h und 24 h wuchsen.

Wir untersuchten die mit dem Zytoskelett, der extrazellulären Matrix und mit den FA assoziierten Gene.

Die *ACTB*-, *TUBB*-, *FN1*-, *FAK1*- und *PXN*-Genexpressionsmuster waren bei MDA-MB-231-Zellen nicht signifikant verändert, aber wir beobachteten eine Herunterregulation von *LAMA3*, *ITGB1*-mRNAs in AD-Zellen und von *ITGB1*-, *TLN1*- und *VCL*-mRNAs in MDA-MB-231 MCS.

RPM-exponierte MCF-7-Zellen zeigten eine Herunterregulation der Genexpression von *FAK1*, *PXN*, *TLN1*, *VCL* und *CDH1* in AD-Zellen und *PXN*, *TLN* und *CDH1* in MCS.

Eine Interaktionsanalyse der untersuchten Gene, die am 3D-Wachstum und der Adhäsion beteiligt sind, zeigte eine zentrale Rolle von Fibronektin, Vinculin und E-Cadherin. Live-Cell-Imaging von eGFP-Vinculin in MCF-7-Zellen bestätigte diese Ergebnisse. β -Catenin-transfizierte MCF-7-Zellen zeigten eine nukleäre Expression in $1g$ - und RPM- AD-Zellen. Die Zielgene *BCL9*, *MYC* und *JUN* des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurden in RPM-exponierten MCF-7-Zellen differentiell exprimiert.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Vinculin und β -Catenin Schlüsselmediatoren für MKZ sind, um Sphäroide innerhalb von 24 Stunden auf der RPM zu bilden.

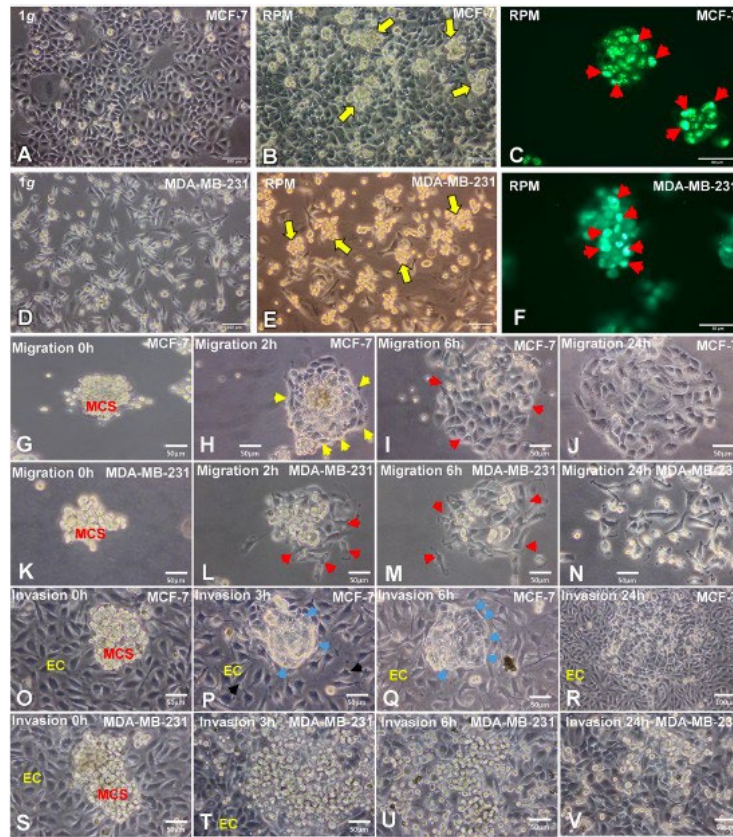


Abbildung 30: Phasenkontrastmikroskopie von MCF-7- und MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen (MKZ): (A) Charakteristische Epithelmorphologie der MCF-7-Zelllinie, kultiviert bei 1g. (B) Adhärenzte MCF-7-Zellen und mehrere kompakte multizelluläre Sphäroide (MCS, gelbe Pfeile) waren sichtbar, als die MCF-7-Zellen 24h lang der Random Positioning Machine (RPM) ausgesetzt wurden. (C) Ki-67- Immunfluoreszenzfärbung (IFS) von MCF-7 MCS. Die roten Pfeile zeigen Ki-67-positive Kerne. (D) MDA-MB-231 Zelllinie, die unter statischen 1g-Kontrollbedingungen bei 24 h kultiviert wurden. (E) MDA-MB-231-Zellen, die auf der RPM für 24h kultiviert wurden. Mehrere multizelluläre Sphäroide (gelbe Pfeile) sind ebenso sichtbar wie adhärenzte Zellen. Vergrößerung $\times 100$. Die gelben Pfeile zeigen, dass das MCS im Überstand der Zellkulturen schwimmt. (F) Ki-67 IFS von MDA-MB-231 MCS. Die roten Pfeile zeigen Ki-67-positive Kerne. (G) Migrationsverhalten der MCF-7-Zellen in Sphäroiden bei 0h, (H) 2h, die gelben Pfeile zeigen die Anheftung der MCS am Boden des Objektträgers und der Zellmembran an. (I) 6h; die roten Pfeile zeigen die Migrationsrichtungen an und (J) 24h. (K) Migrationsverhalten von MDA-MB-231-Zellen in Sphäroiden bei 0h, (L) 2h, die roten Pfeile zeigen die adhärenzten MCS und die Migration der Zellen (M) 6h, rote Pfeile zeigen migrierte Zellen und sowie nach (N) 24h. Zu diesem Zeitpunkt waren keine MCS mehr sichtbar. Invasionstest: Ko-Kulturen von EA.hy926 Endothelzellen und MCF-7 MCS: (O) 0h, (P,Q) 3h und 6h, die blauen Pfeile zeigen die Entstehung einer Zellmembran. (R) Nach 24h war das MCF-7 MCS in die Endothelzellen eingedrungen. Invasionstest: Ko-Kulturen von EA.hy926 Endothelzellen und MDA-MB-231 MCS. (S) 0h, (T) 3h, zu diesem Zeitpunkt waren die MDA-MB-231-Zellen bereits aus dem MCS ausgewandert und zeigten ein invasives Wachstum. (U) 6h und (V) 24h.

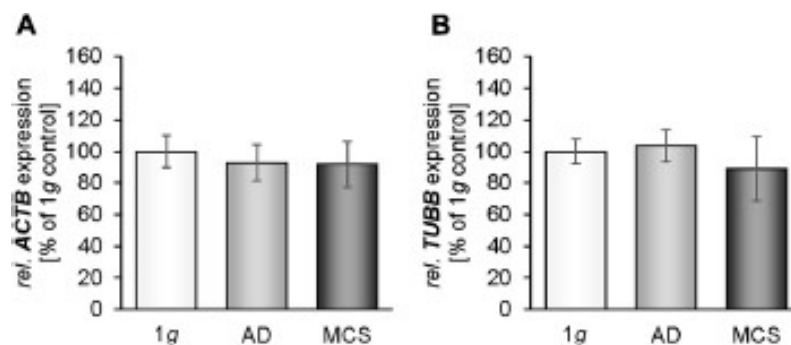


Abbildung 31: Zytoskelett: Genexpression von ACTB (A), TUBB (B) von MDA-MB-231 Zellen, die auf der RPM kultiviert wurden. * $p < 0.05$ 1g vs. adhärenz (AD) und/oder MCS und # $p < 0.05$ AD vs. MCS.

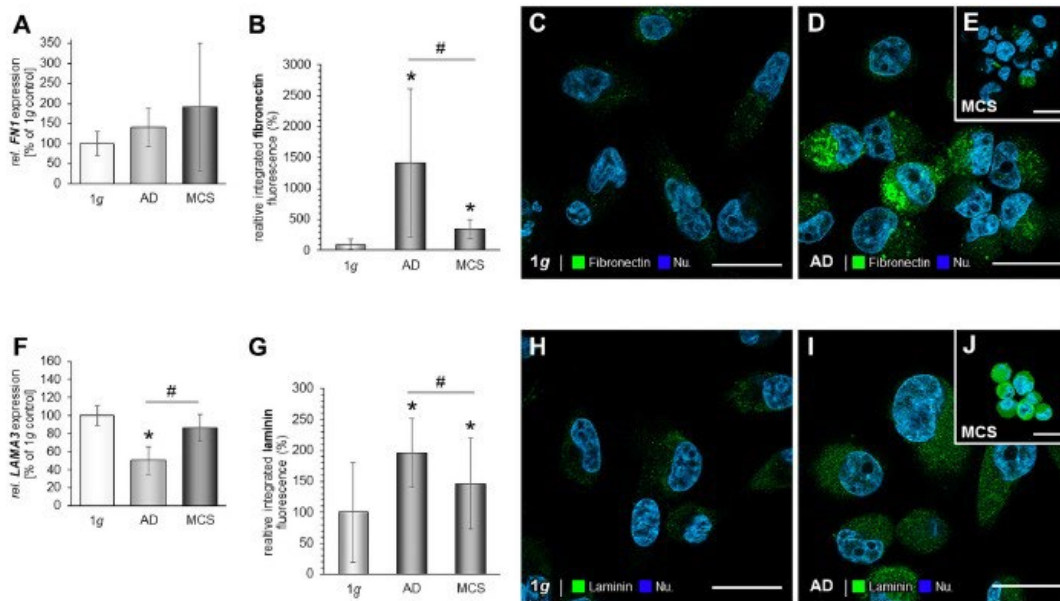


Abbildung 32: Extrazelluläre Matrix: Untersuchung von Fibronectin (A–E) und Laminin (F–J): Genexpression von *FN1* (A), Analyse der Fluoreszenzintensität von Fibronectin (B) und Immunfluoreszenzfärbung (IFS) von Fibronectin in 1g- Proben von MDA-MB-231-Zellen: (C), RPM-AD-Proben (D) und MCS (E); die *LAMA3*-mRNA-Expression (F) sowie Analyse der Fluoreszenzintensität von Fibronectin (G), der IFS von Laminin in 1g-Proben (H), RPM-AD-Proben (I) und MCS (J) von MDA-MB-231 Zellen, die auf der RPM kultiviert wurden. *p < 0,05 1g vs. AD und/oder MCS und #p < 0,05 AD vs. MCS.

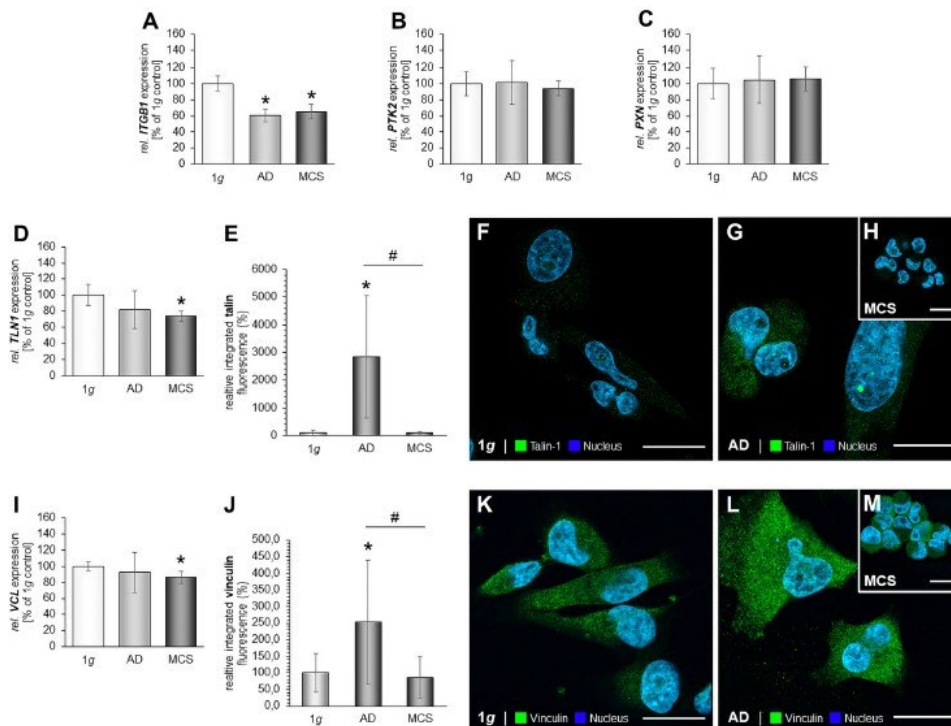


Abbildung 33: Fokale Adhäsionsmoleküle in MDA-MB-231-Zellen: Genexpression von *ITGB1* (A), *PTK2*-mRNA-Expression (B), *PAXN*-mRNA-Expression (C) von MDA-MB-231-Zellen, die auf der RPM kultiviert wurden. Genexpression von *TLN1* (D) und Analyse der Fluoreszenzintensität von Talin (E), IFS von 1g Kontrollzellen (F) und RPM-exponierte MDA-MB-231-Zellen [AD-Zellen: (G) und MCS: (H)]. Darüber hinaus sind die *VCL*-mRNA (I) und die Analyse der Fluoreszenzintensität

von Vinculin (J), der IFS von Vinculin in 1g-Kontrollzellen (K) und RPM-exponierten AD-Zellen (L) und MCS (M) gezeigt. *p < 0,05 1g vs. AD und/oder MCS und #p < 0,05 AD vs. MCS.

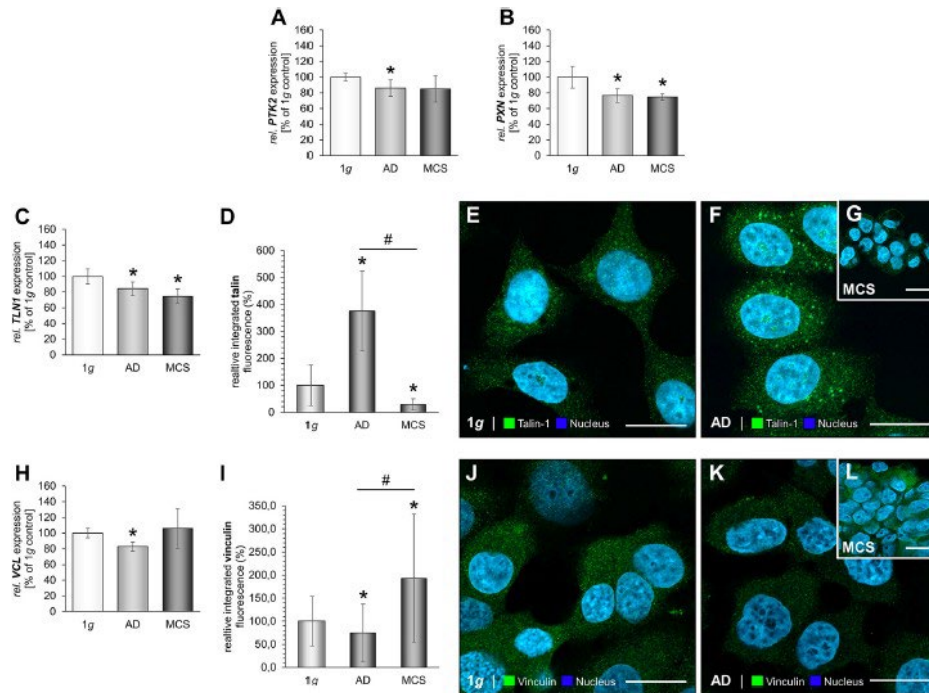


Abbildung 34: Fokale Adhäsionsmoleküle in MCF-7 MKZ: Die *PTK2*-mRNA-Expression (A), *PXN*-mRNA- Expression (B) von MCF-7-Zellen, die auf der RPM gezüchtet wurden. Darüber hinaus wurden die Genexpression von *TLN1* (C) und Analyse der Fluoreszenzintensität von Talin (D), IFS von 1g Kontrollzellen (E) und RPM-exponierten MCF-7 MKZ [AD: (F), MCS: (G)] gezeigt. Die *VCL* mRNA (H) und Analyse der Fluoreszenzintensität von Vinculin (I), die IFS von Vinculin sind in 1g Kontrollzellen (J) und RPM-exponierten Zellen [AD: (K), MCS: (L)] gezeigt. *p < 0,05 1g vs. AD und/oder MCS und #p < 0,05 AD vs. MCS.

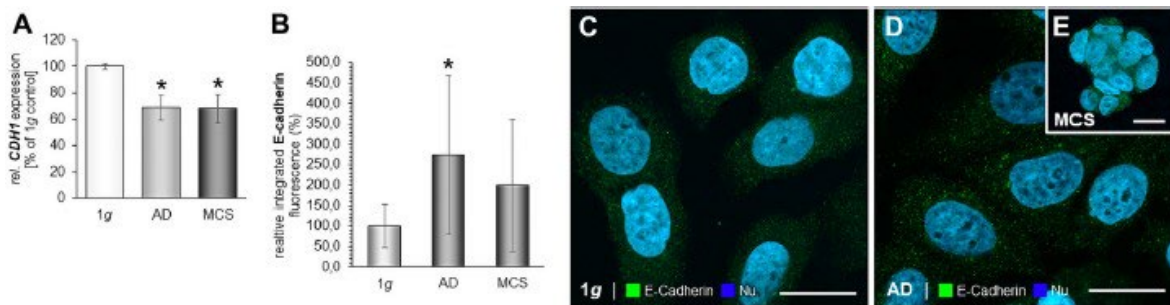


Abbildung 35: E-cadherin in RPM-exponierten MCF-7 MKZ: (A) *CDH1* Genexpression in MCF-7 Zellen exponiert zu 5-µg. (B) Analyse Fluoreszenzintensität von E-cadherin (C), IFS von E-cadherin bei 1g MCF-7 MKZ sowie RPM-exponierte MCF-7 Zellen [AD: (D), MCS: (E)]. *p < 0.05 1g vs. AD und/oder MCS.

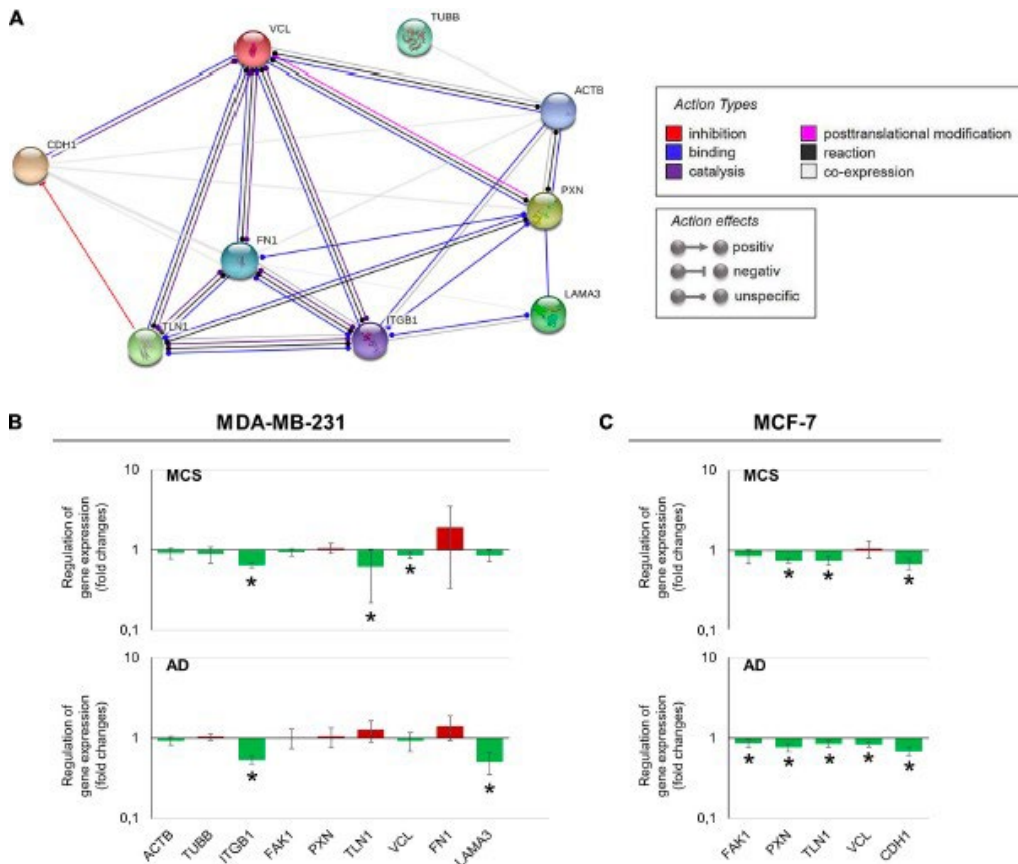


Abbildung 36: Zusammenfassung der Genexpressionsanalyse von Mammakarzinomzellen: (A) Netzwerk der funktionellen Interaktion von Genen und Proteinen, die in dieser Studie analysiert wurden. Die Analyse wurde mit der STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, v11.0) Software durchgeführt. Die Software wird vom STRING Consortium bereitgestellt (online verfügbar: <https://string-db.org/>). Das Ergebnis wird im Molekül-Aktionsmodus präsentiert. Gennamen sind angegeben. (B) Zusammenfassung der Änderung der Genexpression, gemessen durch qPCR von 24h RPM-exponierten MDA-MB-231-Proben. Es wurden Ergebnisse angegeben, die bei AD und MCS in Bezug auf 1g ermittelt wurden. Die rote Farbe zeigt hochregulierte Gene und die grüne Farbe herunterregulierte Gene an. (C) Zusammenfassung der Änderung der Genexpression, gemessen durch qPCR von 24h RPM-exponierten MCF-7-Proben. Der * zeigt eine signifikante Änderung des Fold Change an.

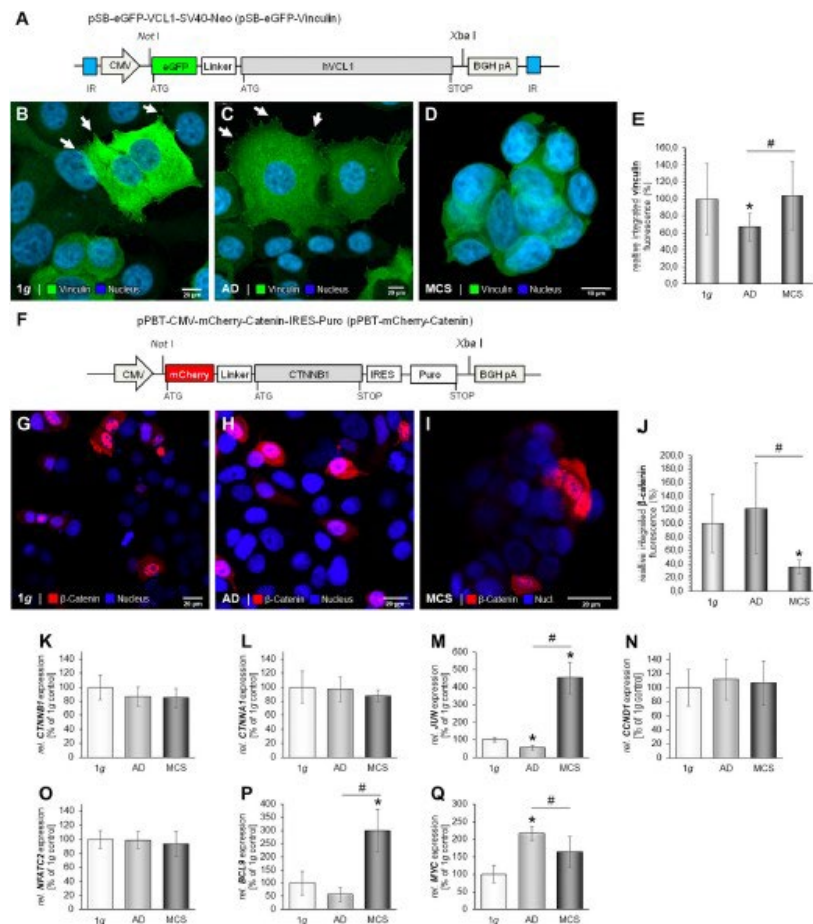


Abbildung 37: Stabile Expression von eGFP-Vinculin in MCF-7-Zellen: Nach der Kotretransfektion von pSB- eGFP-Vinculin und pCMV-SB100X wurden Zellen in Medium kultiviert, das G418 enthielt, um nur das Wachstum von stabil transfizierten Zellen zu ermöglichen. (A) Grafische Darstellung des pSB-eGFP-Vinculin-Plasmids, das die codierende Sequenz des eGFP-Vinculin-Fusionsproteins enthält, das von einem CMV-Promotor codiert wird. Promotoren, die für das Klonen verwendet werden, sind angegeben. BGH pA, Rinderwachstumshormon-Polyadenylierungsstelle; CMV, Cytomegalovirus-Promotor; IR, interne Wiederholungen. (B) Bild von eGFP-Vinculin in MCF-7-Zellen, die 1g ausgesetzt wurden. Die weißen Pfeile zeigen Lamellipodien und fokale Adhäsionspunkte von Vinculin. (C) Bild von eGFP-Vinculin in MCF-7-Zellen nach RPM-Exposition. Die weißen Pfeile zeigen Vinculin-Punkte. (D) Bild von eGFP-Vinculin in MCF-7 MCS nach RPM-Exposition. Maßstabsbalken 10 µm. Expression von mCherry-Catenin in MCF-7-Zellen. MCF-7-Zellen wurden mit pPBT-mCherry-Catenin transfiziert und die Bilder wurden 48 h nach der Transfektion erfasst. (E) Analyse der Fluoreszenzintensität von eGFP-Vinculin. (F) Grafische Darstellung des pSB-eGFP-Vinculin-Plasmids, das die codierende Sequenz des eGFP-Vinculin-Fusionsproteins enthält, das von einem CMV-Promotor codiert wird. Promotoren, die für das Klonen verwendet werden, sind angegeben. BGH pA, Rinderwachstumshormon-Polyadenylierungsstelle; CMV, Cytomegalovirus-Promotor. (G) Bild von MCF-7-Zellen, die mCherry-Catenin bei 1g exprimieren. (H) Bild von RPM-exponierten anhaftenden MCF-7-Zellen, die mCherry-Catenin nach Inkubation bei µg exprimieren. (I) Bild von MCF-7 MCS, das mCherry-Catenin nach Inkubation bei µg exprimiert. Maßstabsbalken 20 µm. (J) Analyse der Fluoreszenzintensität von mCherry-Catenin. Genexpressionen von *CTNNB1* (K); *CTNNA1* (L); *JUN1* (M); *CCND1* (N); *NFATC2* (O); *BCL9* (P) und *MYC*-mRNAs (Q), von MCF-7-Zellen, die unter s-µg gezüchtet wurden. *p < 0,05 1g vs. AD und/oder MCS und #p < 0,05 AD vs. MCS.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Zusammenfassend wurden Mammakarzinomzellen (MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen) für 24h s-µg-Bedingungen ausgesetzt, die durch eine RPM erzeugt wurden. Während der Zellkultivierung unter s-µg bildeten sich zwei Phänotypen. Ein Teil der Zellen wuchs weiter als adhärenter Monolayer, der andere Teil bildete gewebespezifische mehrzellige 3D-Sphäroide in vitro. Die RPM-exponierten Zellen zeigten Veränderungen der Zytoskelettproteine sowie der EZM-Komponenten und FA-Faktoren. Eine 24-stündige RPM-Exposition induzierte eine signifikante Herunterregulation der *ITGB*- und *LAMA3*-mRNAs in adhärenenten Zellen und in MCS der MDA-MB-231-Zelllinie. Darüber hinaus war die *VCL*-mRNA in MDA-MB-231-MCS-Zellen signifikant reduziert. Weiterhin war die

Genexpression von *FAK1*, *PXN*, *TLN1*, *VCL* und *CDH1* in adhärenenten MCF-7-Zellen, die für 24 h auf der RPM kultiviert wurden, signifikant herunterreguliert. Darüber hinaus waren auch *PXN*, *TLN1* und *CDH1* in MCS herunterreguliert, während *VCL*- und *LAMA3*-mRNAs in MCF-7-Zellen nicht verändert gemessen wurden.

Insgesamt liefert diese Studie neue Erkenntnisse über die Komplexität des Adhärenz-, Migrations- und Invasionsverhaltens menschlicher Mammakarzinom-Sphäroide, die mit Hilfe der s- μ g-Technologie hergestellt wurden. Weitere Untersuchungen, die auf FA- Proteine und Gene in Brustkrebszellen abzielen, die auf einem RPM kultiviert werden, werden hoffentlich auf neue Targets hinweisen, die interessante zukünftige Kandidaten für die Krebstherapie werden können.

Zusammenfassung:

Versuche zur pharmazeutischen Beeinflussung der Sphäroidbildung in Mikrogravitation

Um dem Phänomen der Sphäroidbildung von humanen Epithel- und Karzinomzellen in Mikrogravitation weiter auf den Grund zu gehen, wurde an Schilddrüsenkarzinomzellen der spezifische Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil eingesetzt. Die Rho-Kinase ist an der Regulation verschiedener Zellfunktionen beteiligt, wie der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Zelladhäsion, der Zellwanderung und der Zytokinese. Einige dieser Funktionen sind in Mikrogravitation beeinflusst, wie zahlreiche Experimente aus den letzten Jahren gezeigt haben. FTC-133-Zellen wurden hierfür in Anwesenheit von Fasudil 24 Stunden lang sowohl auf der RPM als auch auf einem Klinostaten kultiviert. Erste Daten weisen darauf hin, dass Fasudil das Wachstum der Tumorsphäroide auf der RPM eher stimuliert, während es das Wachstum der Tumorsphäroide auf dem Klinostaten eher inhibiert (Abb. 38). Es scheint so, als gäbe es bei den „*Ground Based Facilities*“ konvergente Wege, die zur Ausbildung von 3D-Aggregaten führen. Weiterführende Experimente und Analysen hierzu sind in Arbeit.

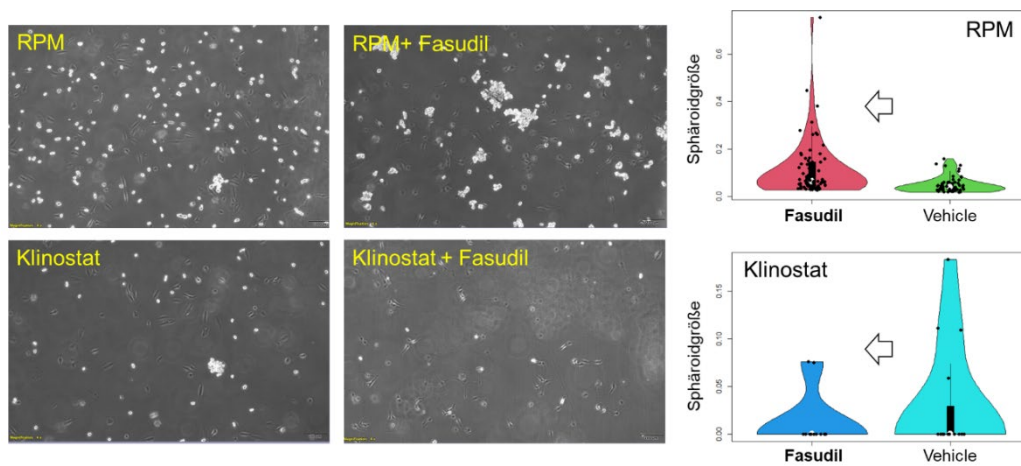


Abbildung 38: Phasenkontrastmikroskopie: Adhärenente FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen wurden auf der RPM (oben) und auf einem Klinostaten (unten) kultiviert. Nach 24 h waren 3D-Konstrukte im Überstand nachweisbar, wenngleich sie bei Klinorotation erheblich kleiner ausfielen. In Anwesenheit von 10 μ M Fasudil (rechte Spalte) war das Sphäroidwachstum der Zellen auf der RPM verstärkt, während es auf dem Klinostaten reduziert war.

Interessanterweise weisen auch die laufenden Experimente mit Dexamethason an FTC-133-Zellen darauf hin, dass es bei der Sphäroidbildung durch Zufallspositionierung (RPM) und Klinorotation Unterschiede zu geben scheint. Während Dexamethason die Sphäroidbildung von FTC-133-Zellen auf der RPM im real random-Modus effektiv unterdrückte (Melnik et al., 2020), war das bei einer RPM-Kultur im Klinostaten-Modus nicht der Fall (Abb. 39). Auch hier sind die molekularen bzw.

zellbiologischen Mechanismen bisher noch nicht entschlüsselt und Gegenstand weiterer Untersuchungen.

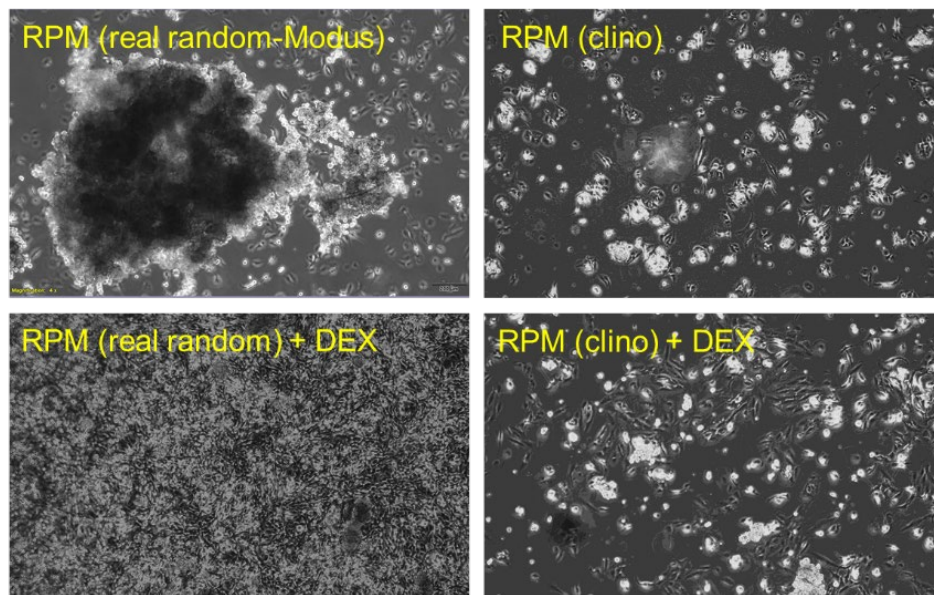


Abbildung 39: Phasenkontrastmikroskopie: Adhärenente FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen wurden auf der RPM sowohl in real random-Modus (links) als auch im Klinostaten-Modus (rechts) kultiviert. Nach 72 h waren 3D-Konstrukte im Überstand nachweisbar, allerdings waren die Sphäroide auch hier beim Klinostaten-Modus sehr viel kleiner. In Anwesenheit von 1 μ M Dexamethason (unten) war das Sphäroidwachstum der Zellen nur beim real random-Modus unterdrückt.

Zusammenfassung: CellBox-1 – Exosomen-Forschung

Nachfolgend werden folgende zwei im Jahr 2021 publizierte Manuskripte zusammengefasst.

1. Wise PM, Neviani P, Riwaldt S, Corydon TJ, Wehland M, Braun M, Krüger M, Infanger M, Grimm D. Changes in Exosome Release in Thyroid Cancer Cells after Prolonged Exposure to Real Microgravity in Space. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 21;22(4):2132. doi: 10.3390/ijms22042132. PMID: 33669943; PMCID: PMC7924847.
2. Wise PM, Neviani P, Riwaldt S, Corydon TJ, Wehland M, Braun M, Krüger M, Infanger M, Grimm D. Changes in Exosomal miRNA Composition in Thyroid Cancer Cells after Prolonged Exposure to Real Microgravity in Space. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 27;22(23):12841. doi: 10.3390/ijms222312841. PMID: 34884646; PMCID: PMC8657878.

Änderungen der Exosomenfreisetzung von Schilddrüsentumorzellen nach längerer Exposition in realer Mikrogravitation im Weltraum

Wir haben 2021 die Überstände aus dem CellBox-1-Experiment untersucht. Bei CellBox- 1 wurden menschliche niedrig differenzierte follikuläre FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen zur Internationalen Weltraumstation ISS mit der Frachtmission SpaceX CRS-3 geflogen.

Extrazelluläre Vesikel und insbesondere Exosomen sind wichtige Zell-Zell-Kommunikatoren, die von fast allen Zellen sezerniert werden und daher ein perfektes Ziel für die weitere Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen für die Anpassung des Organismus an die Mikrogravitation bieten.

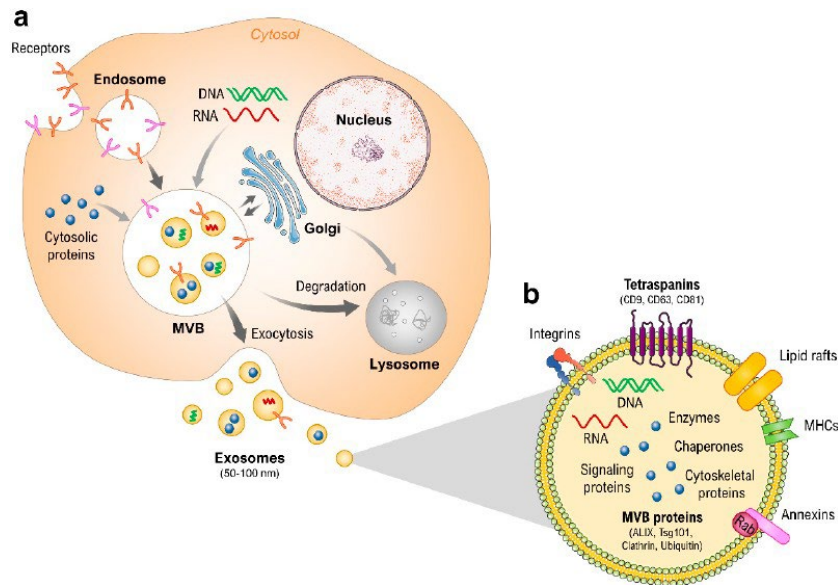


Abbildung 40: Exosomen: (a) Schematische Übersicht über die Biogenese und Sekretion der Exosomen. (b) Typische molekulare Bestandteile (u.a. DNA, RNA) eines Exosoms.

Die Überstände des CellBox-1-Experiments wurden weiter analysiert. Die ersten Ergebnisse zeigten Unterschiede in der Anzahl der sezernierten Exosomen sowie in der Verteilung der Subpopulationen hinsichtlich ihrer Oberflächenproteinexpression (Wise 1: PMID: 33669943).

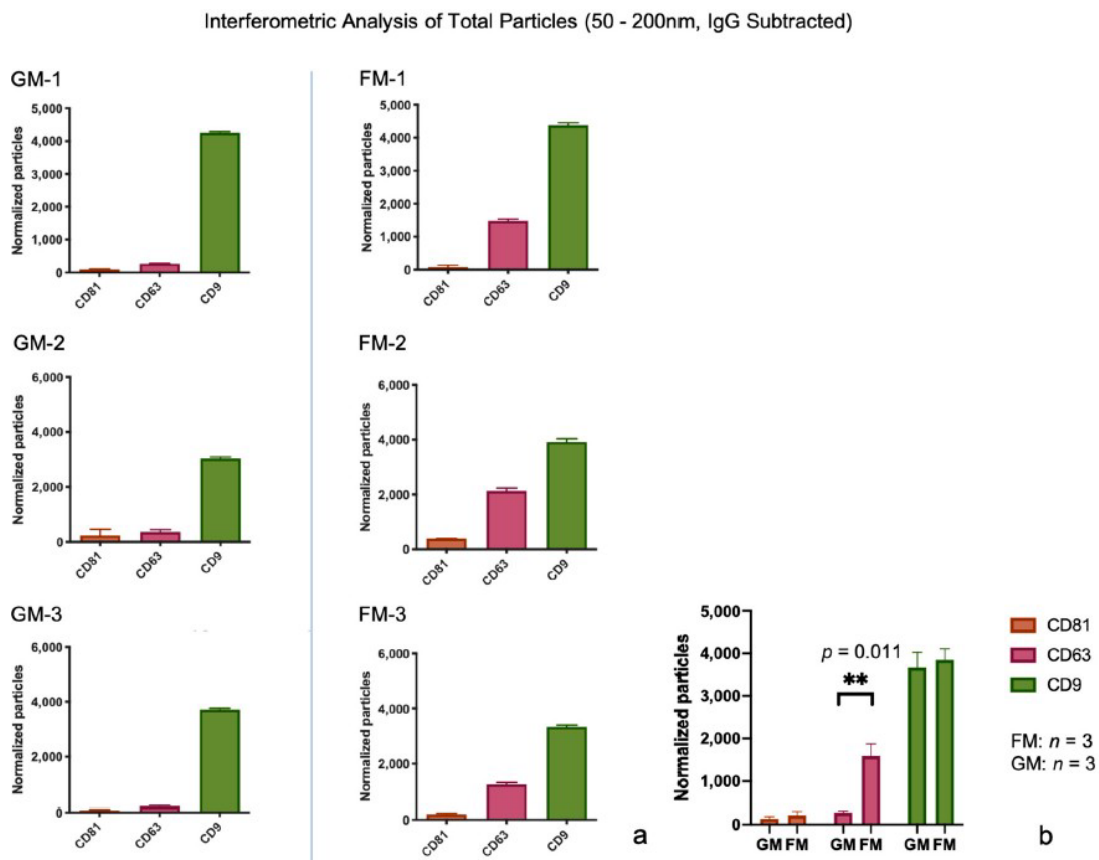


Abbildung 41: Exosomensekretion: (a) Gesamtzahl der gemessenen Partikel mithilfe interferometrischer Analyse, aus beiden Probenansätzen wie Bodenmodul (GM) und Flugmodul (FM). Die Messungen wurden dreifach durchgeführt. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. (b) Die statistische Analyse wurde mit dem ungepaarten t-Test durchgeführt, um die GM-Gruppe mit der FM-Gruppe auf verschiedenen Kartenpunkten zu vergleichen. Die statistische Signifikanz wird als ** ($p \leq 0,01$) angezeigt.

Bemerkenswerterweise wurde eine Veränderung ihrer Population in Bezug auf die Tetraspanin-Oberflächenexpression beobachtet. Transmembranproteine, von denen erwartet wird, dass sie in exosomalen Präparaten vorhanden sind, umfassen unter anderem Tetraspanine (CD9, CD63, CD81), Integrine und Wachstumsfaktorrezeptoren. Die Gruppe der erwarteten oder angereicherten zytosolischen Proteine umfasst endosom- oder membranbindende Proteine (TSG101) und Signaltransduktions- oder Gerüstproteine (Syntenin). Intrazelluläre Proteine, die in Exosomen fehlen oder unterrepräsentiert sind, aber in anderen Arten von EVs vorhanden sind, sind Proteine, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Calnexin) oder im Golgi-Apparat (GM130) gefunden werden.

Die große Mehrheit der Exosomen hat eine Größe im Bereich von 50–100 nm. Die relative Größenverteilung in Flug- und Bodenproben bleibt vergleichsweise gleich und der Modus der Partikelgrößen beträgt immer noch 60 nm, obwohl die Gesamtzahl auf allen Ebenen in den Flugproben gestiegen ist. Folglich war unsere Arbeitshypothese, dass die Änderung der Gravitationskräfte einen deutlichen Einfluss auf die Exosomenzahl sowie deren Oberflächenprotein- und Ladungszusammensetzung haben sollte, die die Anpassungen der Zellen widerspiegeln, die wir in diesem und früheren Experimenten beobachtet haben. Tatsächlich zeigte sich, dass sich die Anzahl der Vesikel und die Zusammensetzung von Subpopulationen hinsichtlich ihrer Oberflächen-Tetraspanin-Zusammensetzung unter dem Einfluss der realen Mikrogravitation erheblich ändert.

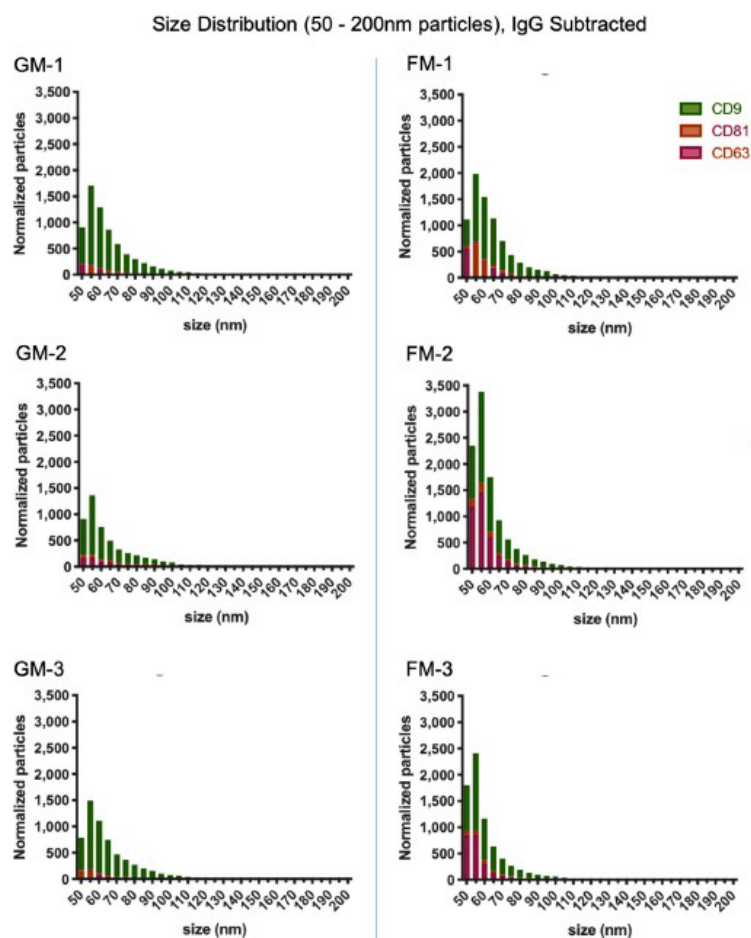


Abbildung 42: Partikelgrößenverteilung durch die interferometrische Analyse beider Probenansätze: Die Messungen wurden dreifach durchgeführt; die Ergebnisse wurden mit der IgG-Kontrolle normalisiert, der Größenbereich reicht von 50–200 nm.

Die Fluoreszenzanalyse der mit CD9, CD63 und CD81 gegengefärbten EVs unterstützt weiter die bisherigen interferometrischen Ergebnisse. Hier zeigen jedoch die Veränderungen der exprimierten Oberflächenproteine auch eine Veränderung der in den GM- und FM-Probensets vorhandenen Subpopulationen. Tetraspanine sind nicht nur wertvolle Biomarker, die in den Membranen von Exosomen angereichert sind, sondern eine Superfamilie von Proteinen, die an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind. Einige dieser Prozesse wurden in der weiteren Publikation näher untersucht.

Veränderungen der exosomalen miRNA-Zusammensetzung in Schilddrüsentumorzellen

Zu diesen Prozessen gehören Zelladhäsion, Motilität, Invasion und Membranfusion sowie Signalübertragung und Proteintransport. Tetraspanine bilden ein Netzwerk mit exosomalen und anderen Proteinen, die Signaltransduktionswege und die Bildung von prämetastasierten Stellen in der Tumormikroumgebung (TME) regulieren (Wise 2: PMID: 34884646). Tetraspanine spielen auch bei der Zielzellelektion für die Exosomenaufnahme und damit für die Reprogrammierung der Zielzelle eine entscheidende Rolle. CD9, CD63 und CD81 fördern in Verbindung mit anderen Tetraspaninen (in Verbindung mit Exosomen) die Motilität, Invasion, Metastasierung, Tumorentstehung, Förderung, Progression und Angiogenese von Krebszellen.

Ein Array-Scan von insgesamt 754 miRNA-Targets ergab 119 differentiell exprimierte miRNAs, von denen 19 erhöht, die restlichen 100 im direkten Vergleich von FMs zu GMs erniedrigt waren.

23 dieser differentiell exprimierten miRNAs wurden zuvor in der Pathogenese verschiedener Schilddrüsenkrebsarten beschrieben, und drei der herunterregulierten miRNAs, nämlich hsa-miR-429, hsa-miR-128-3p und hsa-miR-199, wurden weiter analysiert, um die Array-Ergebnisse zu bestätigen.

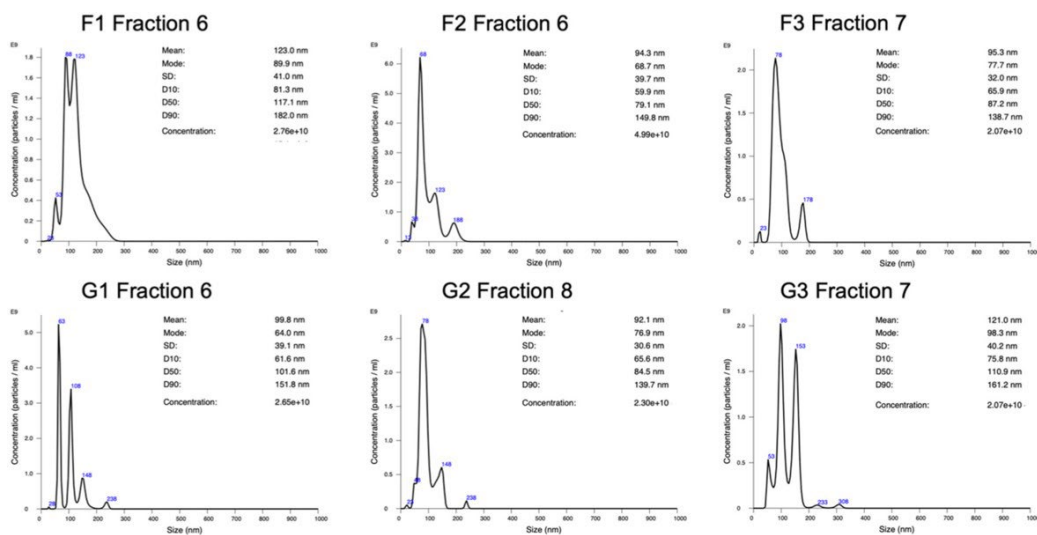


Abbildung 43: Größen- und Konzentrationsdiagramme einer von zwei Fraktionen pro Probe: Zu sehen ist die Fraktion mit der höheren Partikelkonzentration.

Tabelle 1: Differenziell exprimierte microRNAs in FM im Vergleich zu GM.

Target	RQ	% Change	Target	RQ	% Change
hsa-miR-553	5.476	448%	hsa-miR-28-5p	0.331	-67%
hsa-miR-941	2.382	138%	hsa-miR-1302	0.328	-67%
hsa-miR-1286	2.321	132%	hsa-miR-208b-3p	0.323	-68%
hsa-miR-548d-5p	2.191	119%	hsa-miR-30c-2-3p	0.320	-68%
hsa-miR-154-3p	1.944	94%	hsa-miR-367-3p	0.312	-69%
hsa-miR-548g-3p	1.913	91%	hsa-miR-1-3p	0.304	-70%
hsa-miR-500a-3p	1.827	83%	hsa-miR-452-5p	0.287	-71%
hsa-miR-583	1.814	81%	hsa-miR-197-3p	0.282	-72%
hsa-miR-221-5p	1.523	52%	hsa-miR-214-3p	0.276	-72%
hsa-miR-626	1.433	43%	hsa-miR-208a-3p	0.272	-73%
hsa-miR-16-5p	1.401	40%	hsa-miR-199a-5p	0.259	-74%
hsa-miR-1203	1.337	34%	hsa-miR-100-5p	0.259	-74%
hsa-miR-378a-3p	1.287	29%	hsa-miR-103a-3p	0.249	-75%
hsa-miR-452-3p	1.268	27%	hsa-miR-625-5p	0.247	-75%
hsa-miR-144-3p	1.180	18%	hsa-miR-376a-3p	0.246	-75%
hsa-miR-200a-5p	1.097	10%	hsa-miR-380-3p	0.242	-76%
hsa-miR-302d-3p	1.093	9%	hsa-miR-429	0.236	-76%
hsa-miR-646	1.084	8%	hsa-miR-125b-5p	0.235	-77%
hsa-miR-34b-3p	1.067	7%	hsa-miR-7-1-3p	0.231	-77%
hsa-miR-633	0.977	-2%	hsa-miR-128-3p	0.231	-77%
hsa-miR-1255a	0.952	-5%	hsa-miR-374b-5p	0.229	-77%
hsa-miR-524-3p	0.885	-11%	hsa-miR-323b-5p	0.229	-77%
hsa-miR-606	0.883	-12%	hsa-miR-653-5p	0.228	-77%
hsa-miR-1260a	0.875	-12%	hsa-miR-199a-3p	0.219	-78%
hsa-let-7b-3p	0.859	-14%	hsa-miR-199b-3p	0.218	-78%
hsa-miR-133b	0.842	-16%	hsa-miR-448	0.218	-78%
hsa-miR-645	0.841	-16%	hsa-miR-501-5p	0.217	-78%
hsa-miR-576-3p	0.839	-16%	hsa-miR-423-5p	0.197	-80%
hsa-miR-182-3p	0.823	-18%	hsa-miR-487a-3p	0.197	-80%
hsa-miR-548j-5p	0.816	-18%	hsa-miR-378a-5p	0.191	-81%
hsa-miR-27a-5p	0.806	-19%	hsa-miR-9-5p	0.191	-81%
hsa-miR-765	0.799	-20%	hsa-miR-374a-5p	0.191	-81%
hsa-miR-361-3p	0.787	-21%	hsa-miR-548a-3p	0.189	-81%
hsa-miR-628-3p	0.778	-22%	hsa-miR-325	0.186	-81%
hsa-miR-21-3p	0.761	-24%	hsa-miR-134-5p	0.184	-82%
hsa-miR-181c-3p	0.751	-25%	hsa-let-7d-5p	0.182	-82%
hsa-miR-770-5p	0.729	-27%	hsa-miR-31-5p	0.178	-82%
hsa-miR-34a-3p	0.725	-27%	hsa-miR-2110	0.170	-83%
hsa-miR-593-3p	0.660	-34%	hsa-miR-92a-3p	0.165	-83%
hsa-miR-548k	0.620	-38%	hsa-miR-148b-3p	0.164	-84%
hsa-miR-552-3p	0.612	-39%	hsa-miR-384	0.157	-84%
hsa-miR-562	0.594	-41%	hsa-miR-502-3p	0.155	-85%
hsa-miR-10b-3p	0.562	-44%	hsa-miR-148a-3p	0.149	-85%
hsa-miR-548n	0.544	-46%	hsa-miR-342-5p	0.145	-86%
hsa-miR-564	0.541	-46%	hsa-miR-200a-3p	0.138	-86%
hsa-miR-551a	0.521	-48%	hsa-miR-490-3p	0.138	-86%
hsa-miR-196a-5p	0.511	-49%	hsa-miR-200c-3p	0.136	-86%
hsa-miR-516b-5p	0.480	-52%	hsa-miR-744-5p	0.135	-87%
hsa-miR-190a-5p	0.467	-53%	hsa-miR-25-3p	0.122	-88%
hsa-miR-133a-3p	0.449	-55%	hsa-miR-450b-3p	0.118	-88%
hsa-miR-181b-5p	0.444	-56%	hsa-miR-27b-3p	0.108	-89%
hsa-miR-153-3p	0.417	-58%	hsa-miR-485-5p	0.100	-90%
hsa-miR-101-3p	0.417	-58%	hsa-miR-483-5p	0.098	-90%
hsa-miR-18a-3p	0.411	-59%	hsa-miR-518f-3p	0.097	-90%
hsa-miR-548e-3p	0.402	-60%	hsa-miR-525-3p	0.091	-91%
hsa-miR-147a	0.397	-60%	hsa-miR-567	0.089	-91%
hsa-miR-338-3p	0.368	-63%	hsa-miR-324-5p	0.084	-92%
hsa-miR-660-5p	0.346	-65%	hsa-miR-339-3p	0.070	-93%
hsa-miR-518c-3p	0.335	-66%	hsa-miR-518d-3p	0.069	-93%
hsa-miR-137	0.332	-67%	hsa-miR-501-3p	0.066	-93%

Differentially Expressed miRNAs FM/GM

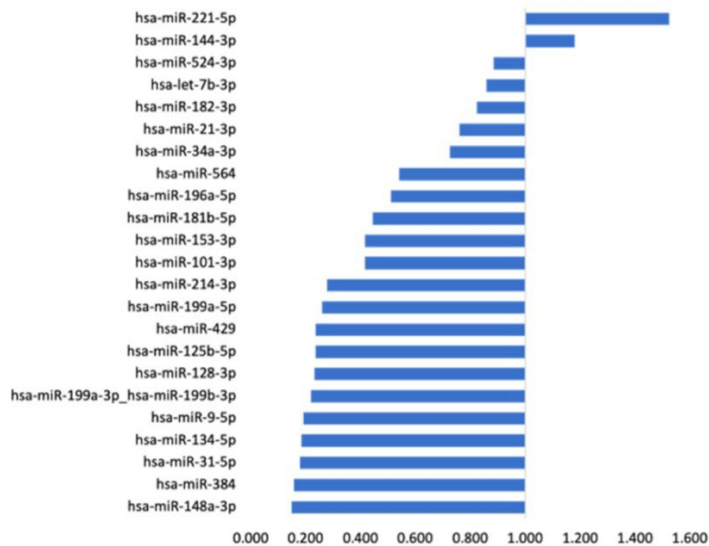


Abbildung 44: miRNAs: Differenziell exprimierte miRNAs beim Vergleich von FM mit GM mit TaqMan™ advanced miRNA mit den relevanten Auswirkungen beim Schilddrüsenkarzinom.

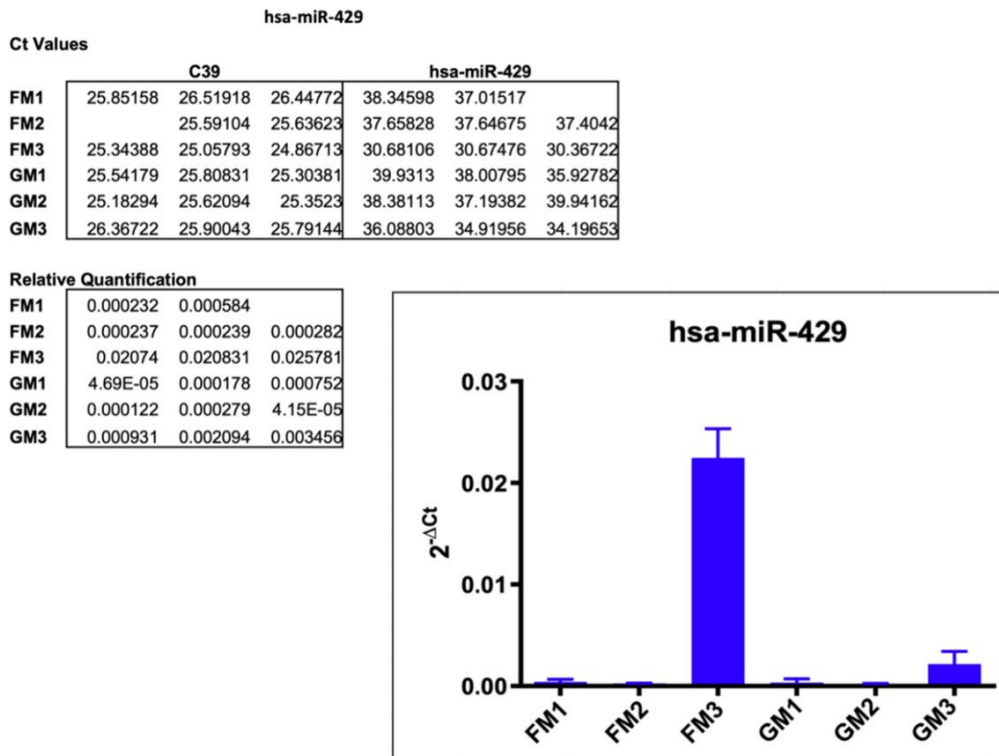


Abbildung 45: hsa-miR-429: Ergebnisse der Einzel-Assayanalyse von hsa-miR-429, einschließlich Ct-Werten, relativer Quantifizierung und der graphischen Darstellung der Ergebnisse. Leerstellen in den aufgeführten Ct-Werten führten zu keiner messbaren Verstärkung.

Schlussfolgerungen

Unsere Studienergebnisse zeigen, dass Exosomen und exosomale miRNAs entscheidende Werkzeuge sein können, um das bisher gesammelte Wissen der Mikrogravitationsforschung zusammenzuführen.

Obwohl sich diese Studie ausschließlich auf Schilddrüsenkarzinome konzentriert, ist die Bedeutung der Rolle von Exosomen und miRNAs für das Verständnis und die Validierung der zuvor beschriebenen Phänomene von herausragender Bedeutung.

Durch den Einsatz modernster Technologien konnten wir die zellulären Veränderungen, denen Raumfahrer auch noch Jahre nach der eigentlichen Mission ausgesetzt sind, weiter beschreiben. Darüber hinaus zeigen diese Analysen einmal mehr, wie anpassungsfähige Tumorzellen selbst auf kleinste Veränderungen in der Umgebung reagieren, sei es Schwerelosigkeit oder andere damit verbundene Stressoren.

Weitere Studien werden sicherlich die notwendigen Verbindungen auf dem Weg zur Suche nach einem Heilmittel für Krebs aufdecken und festigen.

Zusammenfassung:

Verschiedene Zelltypen der Haut, die unter simulierter Mikrogravitation kultiviert wurden –
 Vorbereitende Arbeiten für das ISS-Projekt 14-ILSRA_Prop-0043
 (*Wound Healing and Sutures in Unloading Conditions*)

Humane Keratinozyten

Wir etablierten menschliche Keratinozyten und kultivierten sie 72 Stunden lang auf der RPM zur Simulation von Mikrogravitation. Die Zellen wurden bei Provitro, Berlin, Deutschland gekauft (121 0512HKER-D sowie serum-freies Keratinozyten-Wachstumsmedium (203 0501)) und gemäß der Empfehlung des Unternehmens gezüchtet. Wir verwendeten Zellen der Passage 3, und T25-Zellkulturflaschen (Sarstedt) für das RPM-Experiment. Es wurde ein 3-tägiges RPM-Experiment durchgeführt.

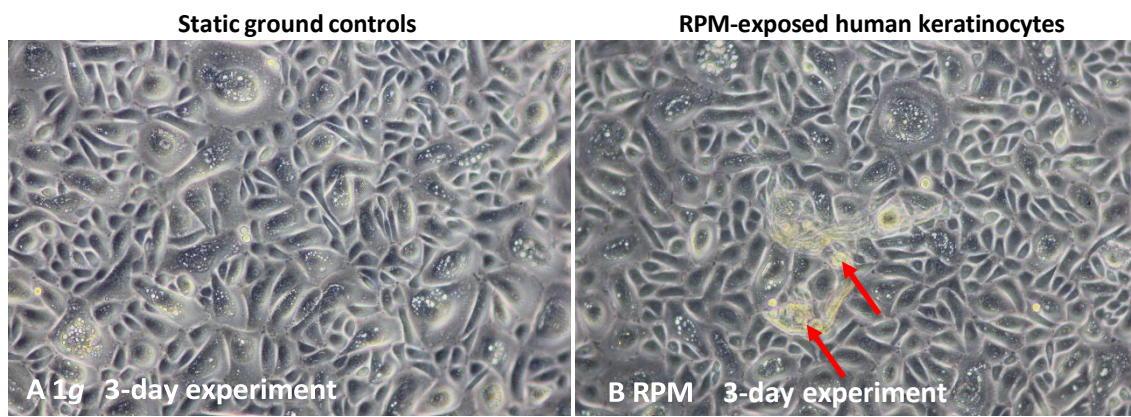


Abbildung 46: Phasenkontrastmikroskopie: Humane Keratinozyten (Provitro GmbH Berlin) wurden für drei Tage bei statischen 1g-Bedingungen (A) und auf der RPM kultiviert (B, RPM, s- μ g). 3D Konstrukte waren im Überstand nachweisbar (rote Pfeile). Am Tag 3 wurde das Experiment gestoppt und die Zellen wie zuvor beschrieben gesammelt (PMID: 29402845).

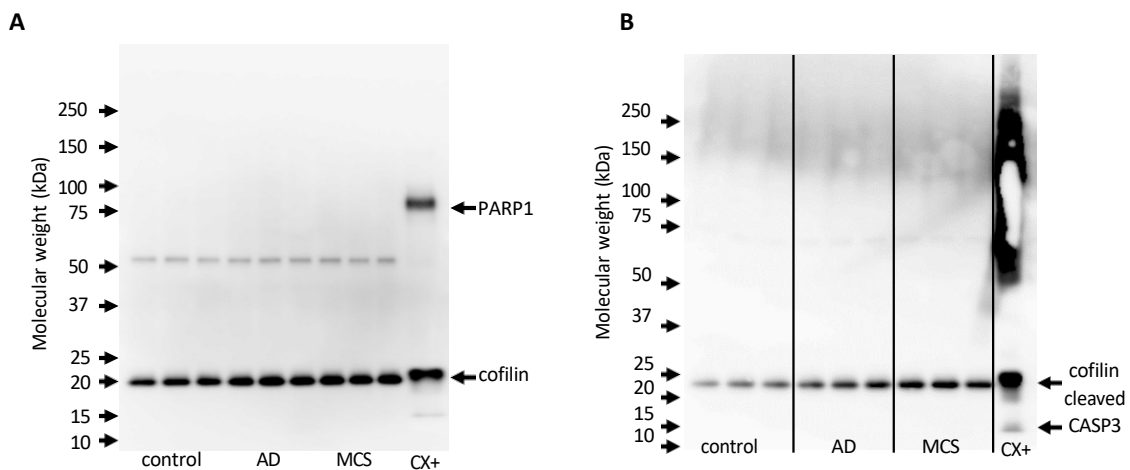


Abbildung 47: Western-Blot-Analysen: Western-Blot-Analyse von PARP (linke Seite; Cell Signaling, Katalog-Nr. 9542, Verdünnung 1:1000.) und aktivierter Caspase-3 (rechte Seite; ABCAM, 1:1000) von Keratinozyten, die 3 Tage lang auf der RPM gezüchtet wurden. Cofilin wurde als Ladekontrolle verwendet. Apoptose (gespaltene Caspase-3) wurde nur in CX+-Darmkrebszellen (PMID: 16038410) gefunden, die als Positivkontrolle dienen.

Humane adulte dermale Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten wurden von Provitro (121 0411 HFIB-D) gekauft und in 201 0401 Fibroblasten-Wachstumsmedium mit FCS gezüchtet. Das Experiment wurde wie zuvor ausführlich beschrieben durchgeführt (PMID: 31417174).

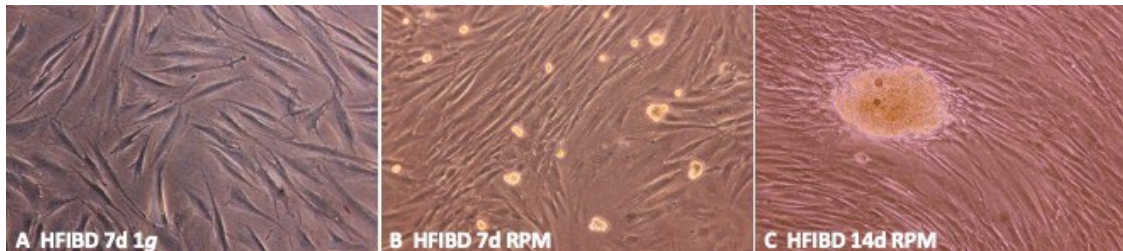


Abbildung 48: Phasenkontrastmikroskopie von adulten dermalen Fibroblasten: A: statische Kontrollzellen; B: 7-tägiges RPM-Experiment – mehrere kleine 3D-Aggregate wurden gefunden und C: 14-tägiges RPM- Experiment – große 3D-Aggregate waren nachweisbar.

Humane Endothelzellen

EA.hy926 Zelllinie

Die von der ATCC erworbene permanente humane Zelllinie EA.hy926 exprimiert Faktor-VIII-verwandtes Antigen, einen Marker der vaskulären Endothelfunktion. EA.hy926-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (Thermo Fisher Scientific, Deutschland), mit 10% fötalem Rinderserum (Sigma, Deutschland), 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Thermo Fisher Scientific), gezüchtet. Das Experiment wurde wie in (PMID: 29402845) beschrieben durchgeführt.

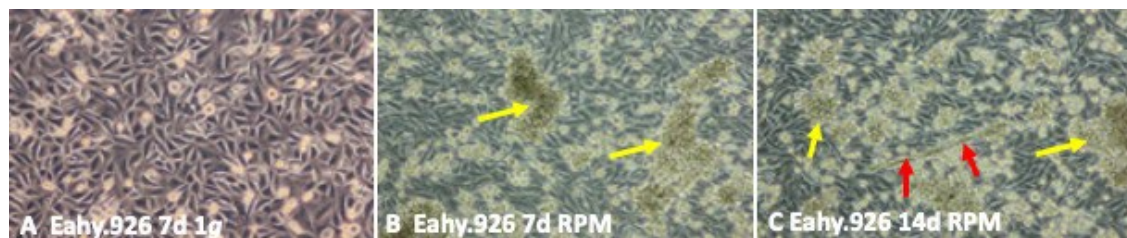


Abbildung 49: Phasenkontrastmikroskopie von Ea.hy926-Endothelzellen: A: 7d 1g; B: 7d RPM – große vielzellige Sphäroide sind sichtbar (gelbe Pfeile); C: 14d RPM – die roten Pfeile zeigen eine röhrenförmige Struktur (TUBE), die gelben Pfeile vielzellige Sphäroide (MCS).

Mikrovaskuläre Endothelzellen

Adulte humane mikrovaskuläre Endothelzellen, Dermis (111 0143 HMVEC-Da), wurden von Provitro, Berlin bezogen. Sie wurden gemäß der Empfehlung des Unternehmens in 201 1102 Microvascular Endothelial Cell Growth Medium, advanced, FCS gezüchtet.

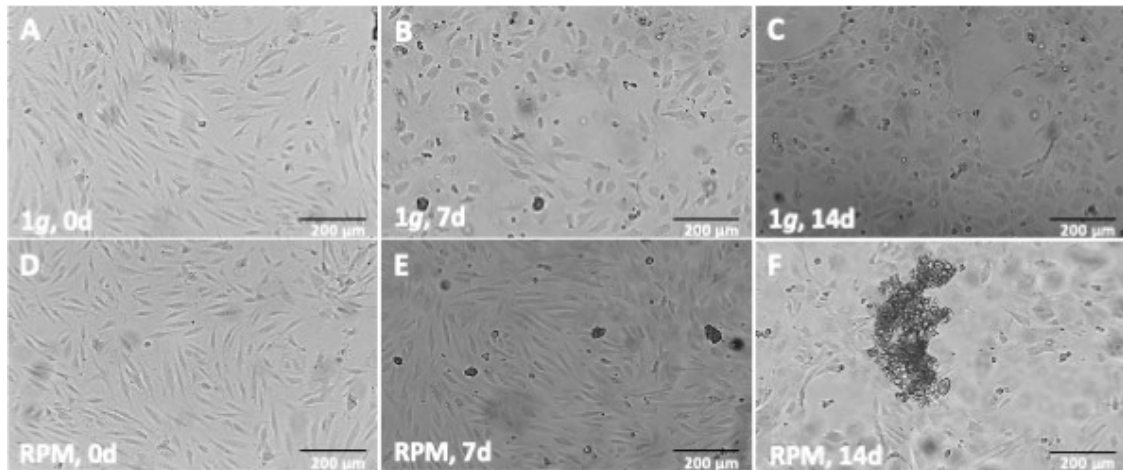


Abbildung 50: Phasenkontrastmikroskopie menschlicher dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen: A–C 1g Kontrollen 0d, 7d und 14d. D–F RPM-Proben: 0d (vor RPM- Exposition), 7d und 14d. F: 3D-Aggregate waren sichtbar.

Humane Lymphatische Endothelzellen (LECs)

Humane dermale lymphatische Endothelzellen wurden von Creative Bioarray bezogen. Sie werden aus menschlichem Hautgewebe isoliert. Sie wurden in T25-Zellkulturflaschen (Sarstedt) gezüchtet und in Creative Bioarray-Kulturkomplettmedium gezüchtet. Die verwendeten Zellen ($0,5 \times 10^6$) stammten aus den Passagen 4-5.

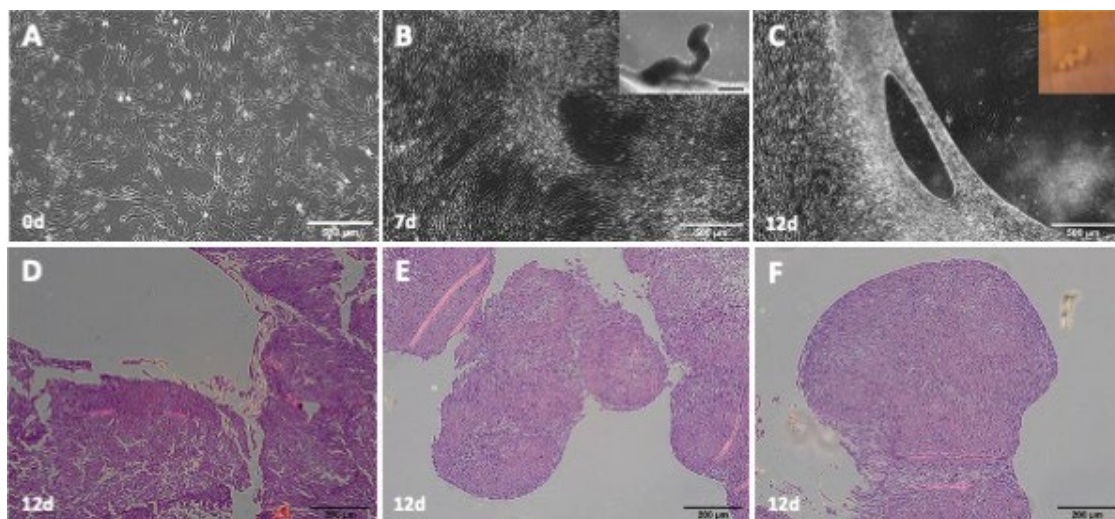


Abbildung 51: Mikroskopische Darstellung von LEC in Kultur und nach Färbung: A–C: Phasenkontrastmikroskopie von LECs: A: 1g Tag 0; B: 7d und C: 12d. Die Einsätze zeigen 3D-Strukturen. D–F: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von 12 Tage RPM-exponierten 3D-Geweben. 3D-Strukturen sind sichtbar (rote Pfeile).

Zusammenfassung:

Wir haben alle verfügbaren Zelltypen der Haut getestet und das Zellmaterial für die Western-Blot-Analyse und qPCR gesammelt. Der nächste Schritt ist die Analyse der Apoptose-Marker durch Western-Blot-Analyse, wie in Riwaldt et al. (PMID: 29207508) beschrieben.

Das ‚Wound Healing and Sutures in Unloading Conditions‘ ISS-Projekt wird voraussichtlich im Oktober 2022 zur ISS geflogen. Anschließend werden wir die Hautproben mit Fokus auf Apoptose Pathways untersuchen. Wir werden gemäß dem Ablauf des ISS-Experiments Hautproben und Zellproben auf der RPM untersucht und dann zum Vergleich mit den ISS Proben im Labor untersucht.

ABSOLVENTEN

Doktorarbeiten, begonnen (b), laufend (l) und abgeschlossen (a):

M.Sc. Mohamed Zakaria Nassef (Dr. rer. medic.) (a) am 25.01.2021
Christoph Buken (Dr. med.) (a) am 25.06.2021
M.Sc. Daniela Melnik (Dr. rer. medic.) (l)
MSc Jenny Graf (Dr. rer. medic.) (l)
MD José Luis Cortés Sánchez (Dr. med.) (l)
Dorothea Dietrichs (Dr. med.) (l)
Sophia Gilger (Dr. med.) (l)
Paul Steinwerth (Dr. med.) (l)
Anna Heinrichs (Dr. med.) (l)
Balkis Barkia (Dr. med.) (b)
Jakob Pfeiffer (Dr. med.) (b)
Michael Isensee (Dr. med.) (b)
Alaa Hakami (Dr. med.) (b)
Mikhail Ovchinnikov (Dr. med.) (b)

Masterarbeiten:

Zwei abgeschlossen in 2021:
Arthur Goby, Universität Straßburg (a)
Sebastian Garcia Campos TU Berlin (a)

Bachelorarbeiten:

Anne-Christine Kaae (a)
Emma Hansen (a)

PUBLIKATIONEN 2021

1. Wise PM, Neviani P, Riwaldt S, Corydon TJ, Wehland M, Braun M, Krüger M, Infanger M, Grimm D. Changes in Exosomal miRNA Composition in Thyroid Cancer Cells after Prolonged Exposure to Real Microgravity in Space. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 27;22(23):12841. doi: 10.3390/ijms222312841. PMID: 34884646; PMCID: PMC8657878.
2. Kaae AC, Kreissl MC, Krüger M, Infanger M, Grimm D, Wehland M. Kinase-Inhibitors in Iodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer-Focus on Occurrence, Mechanisms, and Management of Treatment-Related Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 12;22(22):12217
3. Moroni L, Tabury K, Stenuit H, Grimm D, Baatout S, Mironov V. What can biofabrication do for space and what can space do for biofabrication? *Trends Biotechnol.* 2021 Sep 17:S0167-7799(21)00195-5.
4. Melnik D, Krüger M, Schulz H, Kopp S, Wehland M, Bauer J, Baselet B, Vermeesen R, Baatout S, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D. The CellBox-2 Mission to the International Space Station: Thyroid Cancer Cells in Space. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22(16):8777.

5. Bauer J, Gombocz E, Schulz H, Hauslage J, Grimm D. Interaction Network Provides Clues on the Role of BCAR1 in Cellular Response to Changes in Gravity. *Computation*. 2021; 9(8):81.
6. Sahana J, Corydon TJ, Wehland M, Krüger M, Kopp S, Melnik D, Kahlert S, Relja B, Infanger M, Grimm D. Alterations of Growth and Focal Adhesion Molecules in Human Breast Cancer Cells Exposed to the Random Positioning Machine. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 30;9:672098.
7. Riwaldt S, Corydon TJ, Pantalone D, Sahana J, Wise P, Wehland M, Krüger M, Melnik D, Kopp S, Infanger M, Grimm D. Role of Apoptosis in Wound Healing and Apoptosis Alterations in Microgravity. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Jun 17;9:679650.
8. Grimm D. Microgravity and Space Medicine. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 22;22(13):6697.
9. Ravichandran B, Grimm D, Krüger M, Kopp S, Infanger M, Wehland M. SARS-CoV-2 and hypertension. *Physiol Rep*. 2021 Jun;9(11):e14800.
10. Grimm D. Cell and Molecular Biology of Thyroid Disorders 2.0. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 17;22(4):1990.
11. Wise PM, Neviani P, Riwaldt S, Corydon TJ, Wehland M, Braun M, Krüger M, Infanger M, Grimm D. Changes in Exosome Release in Thyroid Cancer Cells after Prolonged Exposure to Real Microgravity in Space. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 21;22(4):2132.
12. Baran R, Grimm D, Infanger M, Wehland M. The Effect of Continuous Positive Airway Pressure Therapy on Obstructive Sleep Apnea-Related Hypertension. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 25;22(5):2300.

MEETINGS/TAGUNGEN/PRÄSENTATIONEN

29.04.2021: Dr. Markus Wehland: Vortrag "**Human Cells in Microgravity**" CBBS GP. Ringleecture – *The CBBS neuroscience graduate program) is to connect students from the Otto von Guericke Universität, the Leibniz Institute for Neurobiology and the German Center for Neurodegenerative Diseases.*

18.05.2021: Dr. Markus Wehland: Arzneimitteltherapeutische Konferenz:
Weltraummedizin: Besondere Aspekte der Pharmakologie

03.09.2021 – 1. MARS Symposium der Magdeburger Arbeitsgemeinschaft für Raumfahrt-und Schwerelosigkeitsforschung: Die Mitglieder/innen der Arbeitsgemeinschaft MARS haben ihre aktuellen Arbeiten und Forschungsaktivitäten in Schwerelosigkeit präsentiert.

Vorträge:

- Prof. Daniela Grimm (MTRM), Prof. Ralf Stannarius (ANP):
Begrüßung
- Prof. Jessica Bertrand, Dr. Miriam Bollmann (EXOR):
Chondrocytes sense changes in gravity via the YAP/TAZ pathway
- Dr. Stefan Kahlert, Prof. Hermann-Josef Rothkötter (IANA):
Gravitation-Orientierung-Differenzierung – GOD
- Prof. Bernhard Sabel (IMP):
Vision problems in spaceflight: diagnosis, prevention and treatment of the neuro-ocular

- syndrome (SANS)*
- Prof. Heike Walles (CFTE)
Einfluss des Mikroenvironments auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen
 - Dr. Torsten Trittel (ANP):
Freischwebende flüssige Filme in Mikrogravitation
 - Dr. Kirsten Harth (IfP, TWMB):
Vielteilchensysteme in Mikrogravitation
 - Dr. Dmitry Puzyrev (ANP):
ML/KI-Methoden für Forschung an Granulaten unter Weltraumbedingungen
 - Team SmartDust (ANP):
Drop your thesis 2021: Smarte Sonden zur Aufzeichnung der Dynamik von Vielteilchensystemen in Schwerelosigkeit
 - Daniela Melnik, M.Sc. (MTRM):
CANCEROIDS: The FLUMIAS Project
 - Dr. Marcus Krüger (MTRM):
Zell- und Tumorbiologie in Schwerelosigkeit
 - Dr. Markus Wehland (MTRM):
Tissue Engineering in Schwerelosigkeit
 - Dr. Herbert Schulz (MTRM):
Epigenetics and Microgravity
 - Prof. Armin Kraus (MTRM, KCHP):
3D-Kultur von Tumorzellen unter simulierter Mikrogravitation
 - Prof. Manfred Infanger (MTRM, KCHP):
Implikation von Mikrogravitationsforschung in die Chirurgie
 - Dr. Petra Wise (Children's Hospital Los Angeles, MTRM)
Änderung der Exosomen-Expression in Tumorzellen unter Schwerelosigkeit

Frau Prof. Dr. Daniela Grimm hat die Koordination der Magdeburger Arbeitsgemeinschaft für Forschung unter Raumfahrt- und Schwerelosigkeitsbedingungen (MARS) offiziell übernommen.

VL Forschung in Mikrogravitation: Grundlagen, Methoden, Experimente

Wintersemester 2021/22, Raum: G28-027

- VL 5.10.2021 Daniela Grimm, Markus Wehland: Einführung in die Mikrogravitationsforschung, Alltag im Weltraum, Vorstellung von MARS
- VL 26.11.2021 Herbert Schulz: Geschichte der Weltraumwissenschaften (Mercury, Apollo, Vostok, MIR, Skylab)
- VL 03.12.2021 Marcus Krüger: Biologische Grundlagen: Die Zelle in Mikrogravitation, Wahrnehmung von Gravitation, Zellphysiologie unter Gravitationsstress, Gravitationsexperimente mit lebenden Organismen
- VL 17.12.2021 Markus Wehland: Der Mensch in Schwerelosigkeit II: Weltraum-Pharmakologie, Bettruhestudien, Training auf Raumstationen, Humanzentrifugen, Elektrostimulation

17.12.2021 Vortrag: Prof. Daniela Grimm hat im Rahmen der Jahrestagung der Sektion Schilddrüse einen Vortrag über "Schilddrüsenkarzinomzellen in der Schwerelosigkeit" gehalten.

1.1.4 Projektförderung vom 01.01.-31.03.2022:

Alle geplanten und beantragten Experimente wurden 2022 durchgeführt. Die RNAseq Daten der 34. DLR Parabelflugkampagne (Die Effekte von kurzzeitiger Mikrogravitation auf humane Prostatakarzinomzellen) wurde im ersten Quartal 2022 bioinformatisch ausgewertet und eine Publikation vorbereitet.

Darüber hinaus befinden sich die RNAseq Daten der 37. DLR Parabelflugkampagne (Die Effekte von kurzzeitiger Mikrogravitation auf humane Prostatakarzinomzellen - Reflight) in der Auswertung.

Aufgrund der COVID-19 Pandemie wurden im Jahr 2021 mehrere Review-Artikel geschrieben, die 2022 publiziert werden konnten.

Im Jahr 2021-2022 wurden Prostatakarzinomzellen der PC-3 Zelllinie auf der RPM untersucht. Die Ergebnisse wurden im Februar 2022 in der Zeitschrift ‚Frontiers in Cell and Developmental Biology‘ publiziert (IF6.684)

Zusammenfassung: Veröffentlichung zu Prostatakarzinomzellen in simulierter Mikrogravitation

Die Publikation „*Three-Dimensional Growth of Prostate Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity*“ wurde in der Zeitschrift ‚*Frontiers in Cell and Developmental Biology*‘ veröffentlicht: **Dietrichs D, Grimm D, Sahana J, Melnik D, Corydon TJ, Wehland M, Krüger M, Vermeesen R, Baselet B, Baatout S, Hybel TE, Kahlert S, Schulz H, Infanger M, Kopp S. *Three-Dimensional Growth of Prostate Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity. Front Cell Dev Biol. 2022 Feb 17;10:841017. doi: 10.3389/fcell.2022.841017. PMID: 35252204; PMCID: PMC8893349.***

Der Artikel beschreibt die Kurzzeitveränderungen von Prostatakarzinomzellen, die für 30 min, 2h, 4h, und 24h auf der ‚*Random Positioning Machine*‘ (RPM) kultiviert wurden.

Metastasen von Prostatakarzinomen haben einen enormen Einfluss auf die Sterblichkeit von Krebspatienten. Faktoren, die an der Progression und an der Metastasierung von Tumoren beteiligt sind, stehen daher im Mittelpunkt unseres Interesses.

Es ist bekannt, dass die Mikrogravitation (μg) zur Bildung von dreidimensionalen (3D) multizellulären Sphäroiden (MCS) führt. Wir untersuchten PC-3-Prostatatumorzellen für 30 min, 2, 4 und 24 Stunden auf einer *Random Positioning Machine* (RPM). Die RPM ist ein Gerät, das μg auf der Erde simuliert. Nach 24 Stunden RPM-Exposition zeigten sich zwei unterschiedliche Wachstumsformen: Ein Teil der PC-3 Zellen wuchs in Form von MCS, die im Zellüberstand frei umher schwammen, während der andere Teil der Zellen weiter als adhärenzte Schicht am Boden der Zellkulturflasche wuchs (AD). Es waren keine Anzeichen von Apoptose zu detektieren. Unter anderem konzentrierten wir uns auf Zytokine, die an der Metastasierung beteiligt sind sowie an der Bildung von MCS. Nach 24 Stunden fand sich in der MCS-Gruppe ein Anstieg der Genexpression von *ACTB*, *MSN*, *COL1A1*, *LAMA3*, *FN1*, *TIMP1*, *FLT1*, *EGFR1*, *IL1A*, *IL6*, *CXCL8* und *HIF1A* im Vergleich zu 1g-Proben. Darüber hinaus zeigte die AD-Gruppe eine Erhöhung der *LAMA3*, *COL1A1*, *FN1*, *MMP9*, *VEGFA*-, *IL6*- und *CXCL8* mRNA-Expression im Vergleich zu Proben, die statischen 1g-Bedingungen ausgesetzt wurden. Eine signifikante Reduktion der mRNA Expression in AD-Zellen fand sich für *TUBB*, *KRT8*, *IL1B*, *IL7*, *PIK3CB*, *AKT1* und *MTOR* nach 24 h. Ferner untersuchten wir die Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen und Zytokinen durch die PC-3 Zellen, die unter μg gezüchtet wurden. Die Sekretion von Kollagen-1 α 1 und Fibronectin-Protein in den Überstand war verringert, wohingegen die Sekretion von IL-6 in 24 h-RPM-Proben erhöht war. Die Sekretion von IL-1 α , IL-1 β , IL-7, IL-2, IL-8, IL-17, TNF- α , Laminin, MMP-2, TIMP-1, Osteopontin und EGF waren nach 24 h RPM-Exposition im Vergleich zu den 1g Proben nicht signifikant verändert.

Die Freisetzung löslicher Faktoren von RPM-exponierten PC-3 Zellen war signifikant *reduziert* nach 2 h (IL-1 α , IL-2, IL-7, IL-8, IL-17, TNF- α , Kollagen-1 α 1, MMP-2, Osteopontin) und signifikant erhöht nach 4 h (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, TNF- α , Laminin).

Wir konnten zeigen, dass simulierte μg das 3D-Wachstum von PC-3-Karzinomzellen fördert. Bei diesem Prozess zeigt sich eine veränderte Expression der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-8, die am Wachstum von Metastasen und der Progression von Prostatakarzinomzellen beteiligt sind.

Im Folgenden werden Auszüge des Artikels und einige Abbildungen gezeigt.

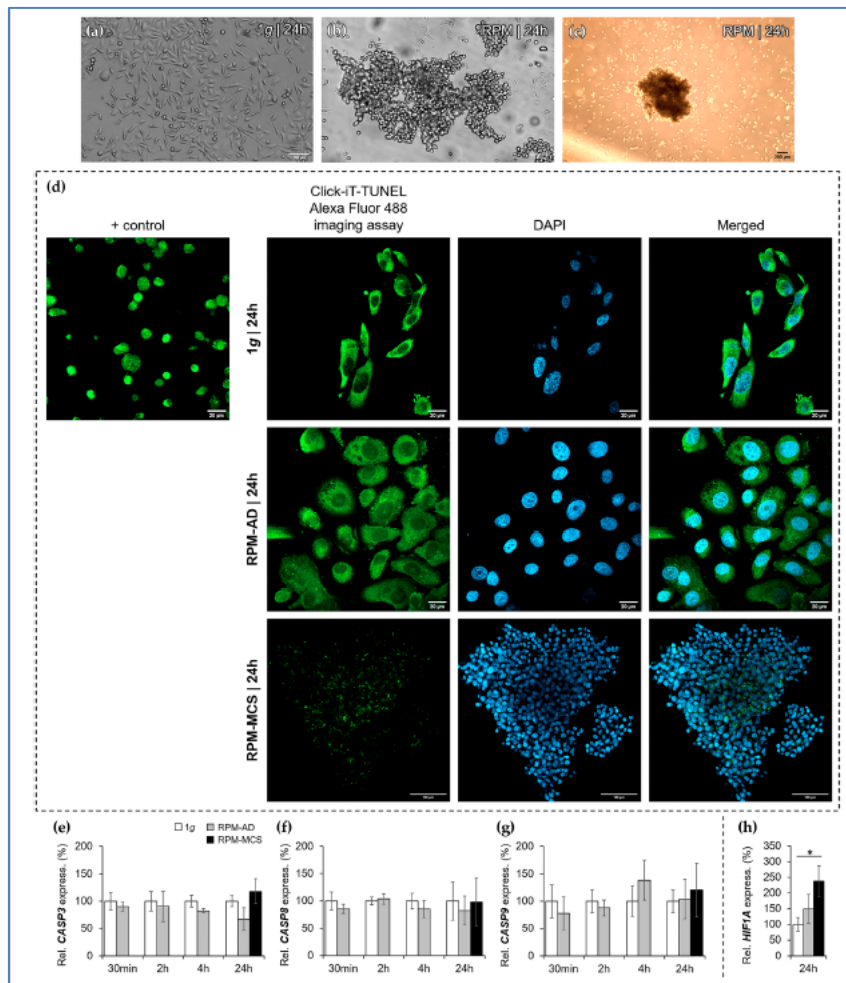


Abbildung 52: Vitalität (Suche nach Apoptose) bei RPM-Exponierten PC-3-Zellen: Phasenkontrastmikroskopie von PC-3-Zellen: (A) statische 1g-Kontrollzellen (Skalenbalken 100 µm) und (B, C) 24 h RPM-exponierte Proben, die neu gebildete Sphäroide zeigen, die über adhärenen Zellen schwimmen (Skalenbalken (B) 100 µm und (C) 200 µm). (D) Terminale Desoxynukleotidyltransferase dUTP-Nick-End labeling (TUNEL) Assay und die 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)-Färbung zeigten keine apoptotischen Zellen in 1g-Kontrollen (Skalenbalken 20 µm) und auch keine Apoptose in RPM-exponierten AD (Skalenbalken 20 µm und MCS-Zellen (Skalenbalken 100 µm) Die Positivkontrolle, induziert durch DNase, ist in der ersten Reihe angegeben (Skalenbalken 20 µm) (E, F, G) Die Genexpression von *CASP3*, *CASP8* und *CASP9* (30 min, 2, 4 und 24 h) war zu allen Zeitpunkten nicht signifikant verändert (H) Die Genexpression von *HIF1A* war nach 24 h in AD-Zellen nicht verändert, aber signifikant erhöht in den MCS im Vergleich zu 1g Kontrollzellen (n = 5).

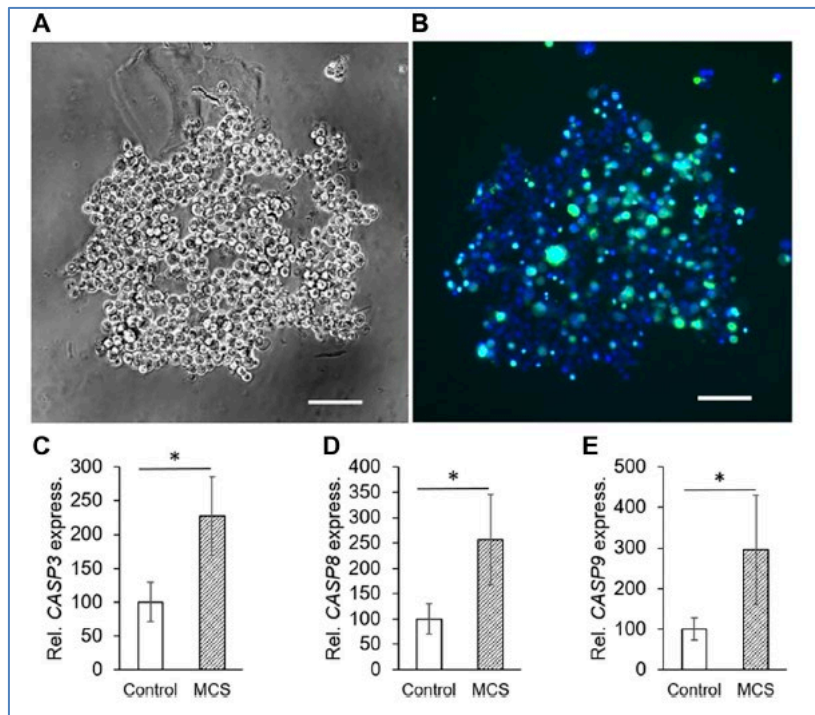


Abbildung 53: Apoptose in PC-3-Sphäroiden aus der Liquid-overlay-Technik. Phasenkontrastmikroskopie von PC-3-Zellen: (A) statisches 1g-MCS (produziert mithilfe der Liquid-overlay Technik) nach 24 h (Maßstab 100 µm) und Fluoreszenzmikroskopie (B) unter Verwendung derselben Probe: Live cell viability assay - Lebensfähigkeitstest vitaler Zellen, bei dem die blaue Farbe die gesunden lebenden Kerne aller Zellen anzeigt, während die grüne Farbe beeinträchtigte apoptotische Zellen anzeigt. (C,D,E) Die Genexpression von *CASP3*, *CASP8* und *CASP9* (24 h) war in den 1g-MCS nach 24 h (n = 5) im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant hochreguliert.

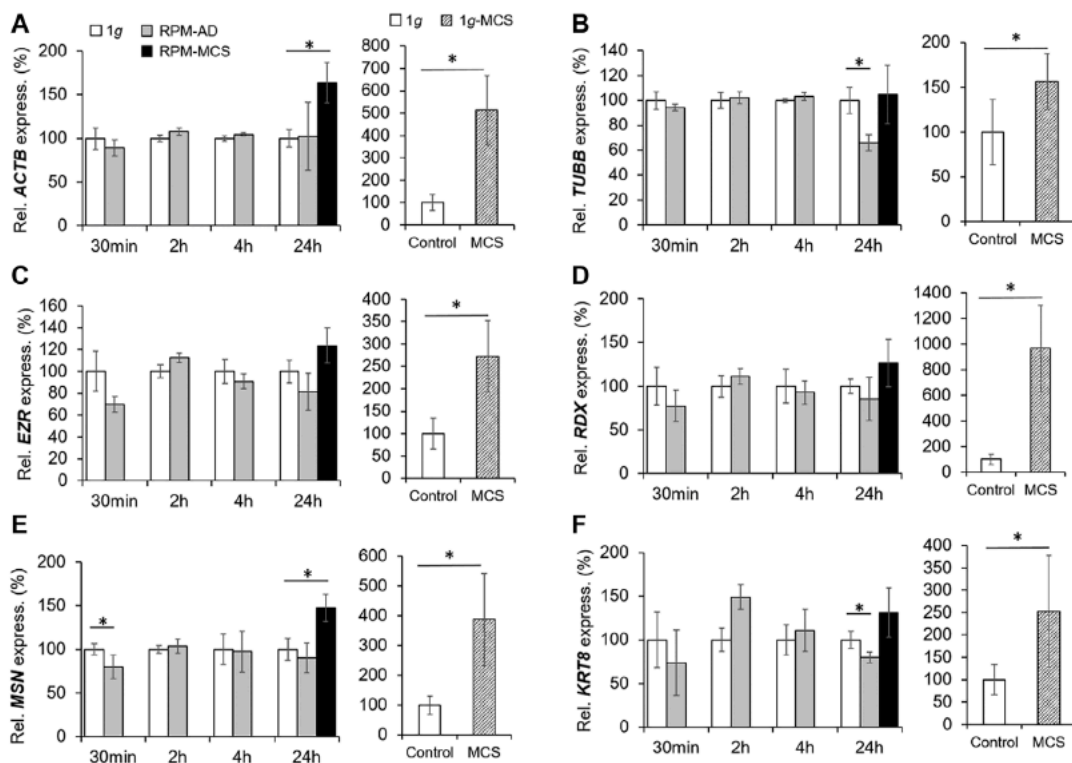


Abbildung 54: Genexpressionsvergleich RPM vs. Liquid-overlay Technik. Genexpression von (A) *ACTB*, (B) *TUBB*, (C) *EZR*, (D) *RDX*, (E) *MSN* und (F) *KRT8* von PC3-Zellen, die 30 min, 2, 4 und 24 h der RPM ausgesetzt wurden und 1g-MCS (Liquid-overlay Technik) nach 24 h. n = 5; *p < 0,05 gegenüber 1g.

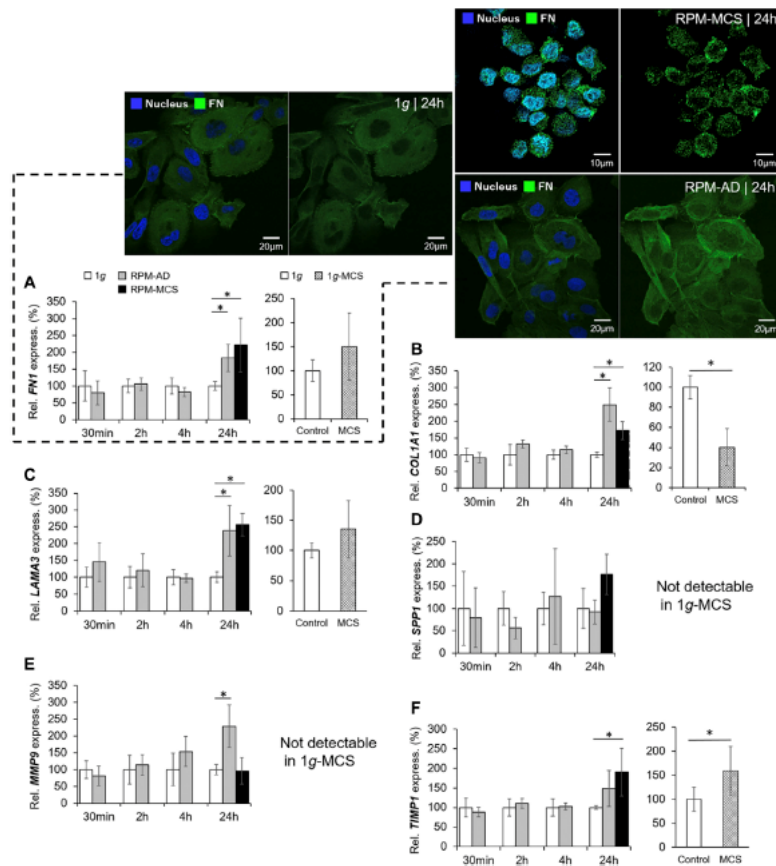


Abbildung 55: Extrazelluläre Matrix: Genexpression von (A) *FN1* und Immunfluoreszenz von Fibronectin: links zwei Bilder der 1g/24 h-Probe (merged Fibronectin and DAPI - linkes Bild und Fibronectin (AlexaFluor 488) - rechtes Bild), oben rechts zwei Bilder der RPM/24 h MCS-Proben (merged - linkes Bild und rechtes Bild - Fibronectin) und zwei Bilder unten: rechts der RPM/24 h AD-Proben (merged linkes Bild und rechtes Bild - Fibronectin), DAPI-gefärbter Kern (blau), (B) *COL1A1*, (C) *LAMA3*, (D) *SPP1*, (E) *MMP9* und (F) *TIMP1* von PC3-Zellen, die der RPM für 30 min, 2, 4 und 24 h ausgesetzt waren und 1g-MCS (Liquid-overlay Technik, 24 h) im Vergleich zu 1g adhärennten Kontrollzellen. n = 5; *p < 0,05 gegenüber 1g.

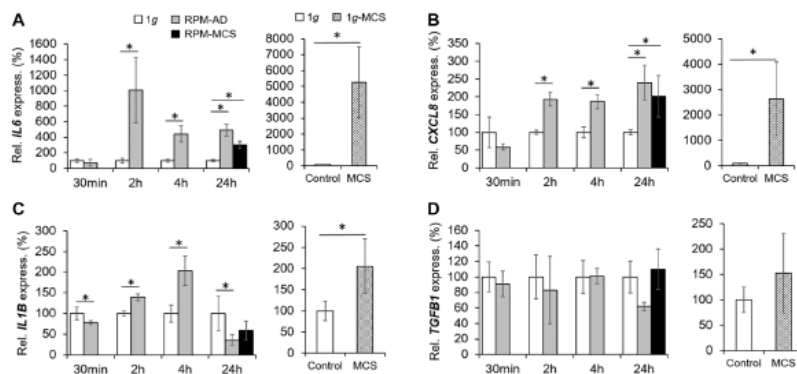
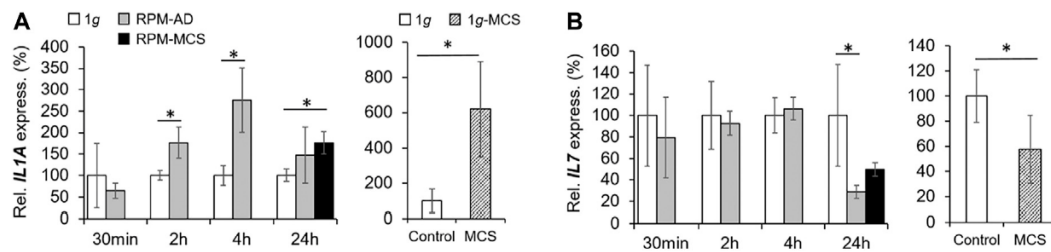


Abbildung 56: Inflammatorische Zytokine: Genexpression von (A) *IL6*- und (B) *CXCL8*-mRNA, (C) *IL1B* und (D) *TGFB1* von PC3-Zellen, die der RPM für 30 min, 2, 4 und 24 h ausgesetzt wurden und 1g-Liquid-overlay-MCS nach 24 Std. n = 5; *p < 0.05 gegenüber 1g.

Tabelle 2: Sezernierte Proteine durch PC-3 Zellen (pg/mL), n=5; p< 0.05 vs. 1g.

Protein	2 h		4 h		24 h	
	1g	RPM	1g	RPM	1g	RPM
IL-1 α	22 \pm 1	18 \pm 2*	23 \pm 2	25 \pm 1	49 \pm 8	42 \pm 3
IL-1 β	11 \pm 1	10 \pm 1	12 \pm 2	15 \pm 2*	22 \pm 5	20 \pm 2
IL-2	144 \pm 2	132 \pm 3*	146 \pm 3	154 \pm 3*	191 \pm 13	184 \pm 6
IL-6	13 \pm 1	21 \pm 3*	12 \pm 3	58 \pm 11*	59 \pm 23	169 \pm 42*
IL-7	14 \pm 0	12 \pm 0*	13 \pm 1	15 \pm 1*	21 \pm 3	19 \pm 2
IL-8	434 \pm 65	195 \pm 44*	519 \pm 147	1,154 \pm 208*	2,190 \pm 1,059	3,097 \pm 765
IL-17	39 \pm 1	32 \pm 4*	37 \pm 5	40 \pm 6	51 \pm 7	48 \pm 6
TNF- α	14 \pm 1	11 \pm 1*	14 \pm 1	16 \pm 1*	26 \pm 4	23 \pm 4
Fibronectin [ng/mL]	69 \pm 2	58 \pm 12	65 \pm 13	65 \pm 9	136 \pm 31	97 \pm 2*
Collagen I α 1	125 \pm 12	65 \pm 11*	135 \pm 33	138 \pm 25	285 \pm 101	163 \pm 30*
Laminin	95 \pm 9	145 \pm 15*	88 \pm 7	217 \pm 34*	178 \pm 17	233 \pm 48
MMP-2	1854 \pm 30	1786 \pm 36*	1847 \pm 39	1876 \pm 45	2,149 \pm 93	2068 \pm 46
TIMP-1	1703 \pm 208	1,334 \pm 329	2,174 \pm 695	1783 \pm 372	9,245 \pm 3,972	6,579 \pm 1,086
Osteopontin	6,010 \pm 154	5,441 \pm 400*	5,928 \pm 356	6,193 \pm 260	7,287 \pm 551	6,914 \pm 537
EGF	13 \pm 0	12 \pm 2	12 \pm 2	13 \pm 2	15 \pm 2	15 \pm 2

**Abbildung 57: Entzündungshemmende Zytokine:** Genexpression von (A) *IL1A* und (B) *IL17* von PC-3-Zellen, die auf der RPM für 30 min, 2, 4 und 24 h gezüchtet wurden und 1g-Liquid-Overlay-MCS (24 h). n = 5; *p < 0.05 gegenüber 1g.

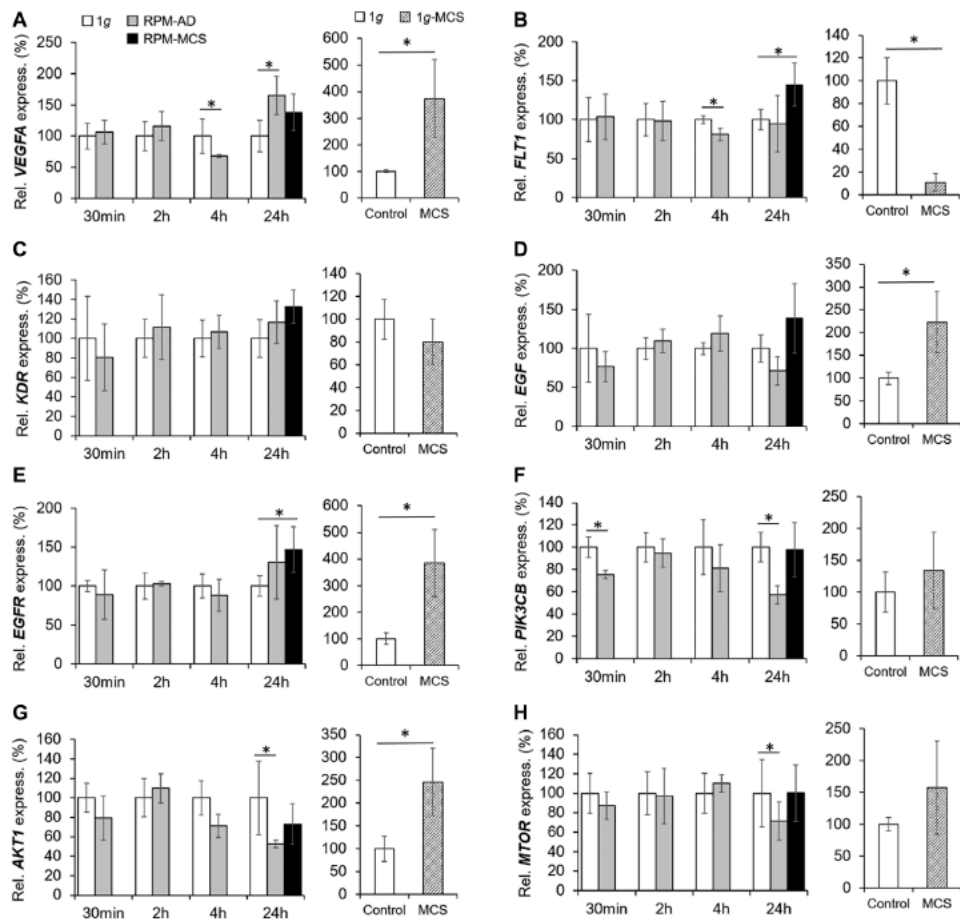


Abbildung 58: VEGF-, EGF- und PAM-Signaltransduktionswege: Genexpression von (A) *VEGFA*, (B) *FLT1*, (C) *KDR*, (D) *EGF*, (E) *EGFR*, (F) *PIK3CB*, (G) *AKT1* und (H) *MTOR* von PC3-Zellen, die auf der RPM für 30 min, 2, 4 und 24 h kultiviert wurden, und 1g-Liquid-overlay-MCS nach 24 h. n = 5 * p < 0.05 vs. 1g.

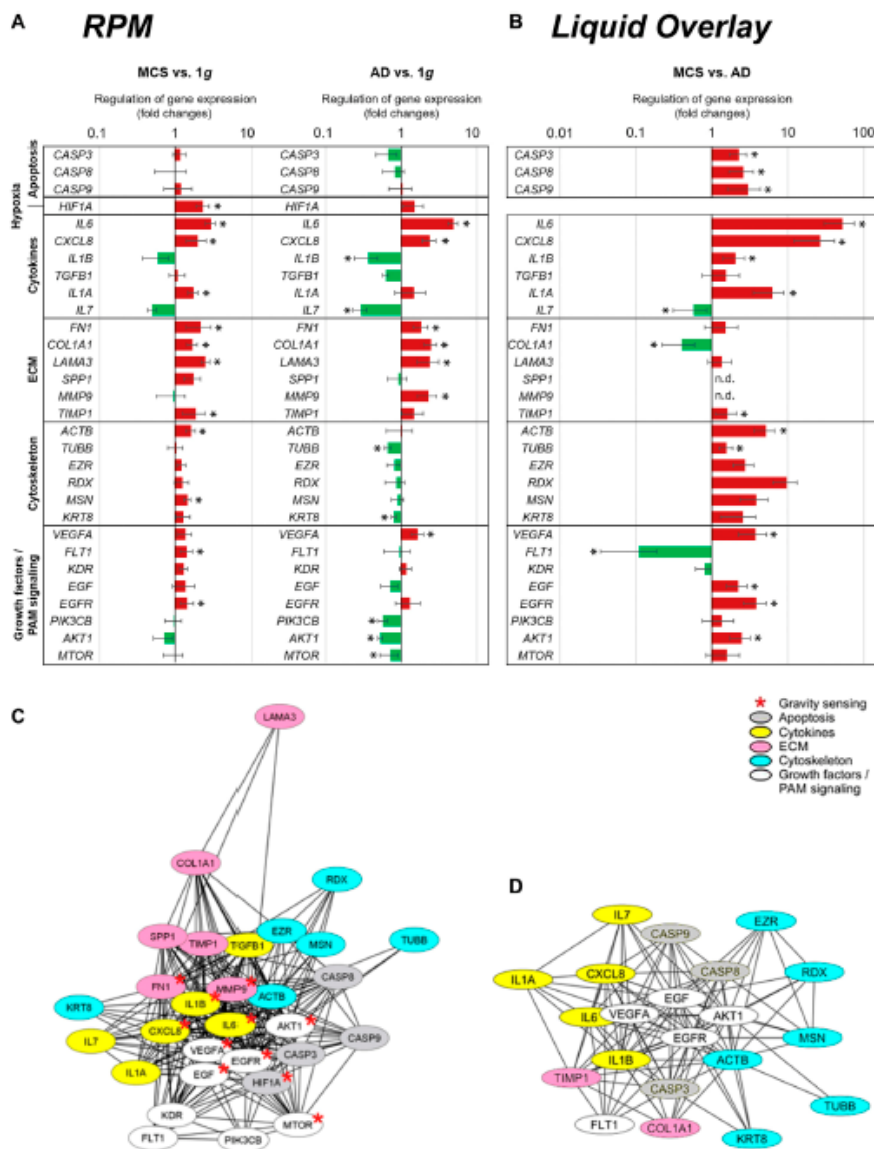


Abbildung 59: qPCR-Expressionsänderungen ausgewählter Gene und ihre Beziehung in STRING-Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken: (A) qPCR-Genexpression - fold changes der für 24 h RPM-exponierten PC3-Proben (AD und MCS) im Verhältnis zu 1g. Die roten und grünen Farben zeigen hochregulierte und herunterregulierte Gene an. RPM-exponierte Proben: Signifikante Regulierungen sind durch schwarze Sternchen gekennzeichnet ($p < 0.05$). (B) qPCR-Genexpression fold changes von Liquid-Overlay-MCS im Vergleich zu Kontrollen. (C, D) Netzwerk der funktionellen Interaktion von Genen und ihren Produkten (C), die in dieser Studie analysiert wurden und (D) in Liquid-Overlay-MCS differenziell reguliert sind. Die Analyse wurde mit STRING 11.0 (<https://string-db.org/>) durchgeführt und kombinierte Scores wurden von Cytoscape 3.8.2 visualisiert. Die Zugehörigkeit zu funktionellen Gengruppen ist farbcodiert. Rote Sternchen zeigen Gene an, von denen bekannt ist, dass sie am Gravi-Sensing von Prostatakarzinomen beteiligt sind.

Zusammenfassung

Zusammenfassend konzentrierte sich diese Studie auf die frühen Wirkungen von simulierter Mikrogravitation auf PC-3-Zellen. Simulierte Kurzzeitmikrogravitation beeinflusste das Wachstumsverhalten von PC-3-Zellen. Nach 24 Stunden fanden sich 3D MCS sowie adhärenente Zellen in den RPM-Kulturen. Es fanden sich keine Zeichen von Apoptose in den RPM-Kulturen. Es zeigten sich Veränderungen der Expression von Genen, die zum Zytoskelett, der ECM, den Zytokinen, sowie zu den VEGF-, EGFR- und PAM-Signalwegen gehören. Damit einher ging eine veränderte Sekretion von Zytokinen und ECM-Komponenten. Wir beobachteten einen signifikanten Anstieg der IL6- und CXCL8-Genexpression nach 2, 4 und 24 h in MCS, was auf eine Differenzierung zu einem aggressiveren Phänotyp bei Kurzzeit-Mikrogravitation hinweist. Außerdem war auch die Freisetzung von IL-6 in den

Zellüberstand erhöht.

Diese Ergebnisse passen sehr gut zu früheren Kurzzeitstudien (Parabelflugexperimente). Diese Experimente zeigten, dass Schilddrüsentumorzellen einen aggressiveren Phänotyp bei Kultivierung unter $r\text{-}\mu\text{g}$ aufweisen (PMID: 24196587). Dies ist ein Befund, der in Zukunft genauer untersucht werden soll.

Ein Teil der PC-3-Zellen begann innerhalb von 24 h während der $s\text{-}\mu\text{g}$ -Exposition 3D Aggregate/Sphäroide zu bilden. Der andere Teil wuchs weiter adhärent am Boden der Zellkulturflasche. Darüber hinaus kam es zu einer frühen Aktivierung des VEGF- und EGF Signalwegs sowie zu einer Herunterregulierung des PAM-Signaltransduktion. Außerdem waren Genexpression und Proteinsekretion der proinflammatorischen Zytokine IL1B, IL6 und CXCL8 deutlich hochreguliert. Sie scheinen bei der Bildung von Sphäroiden eine Rolle zu spielen.

Das macht sie zu interessanten Targets (Angriffszielen), um eine mögliche Hemmung der Entwicklung von Metastasen zu erzielen. HuMax-IL-8 (BMS-986253) ist ein neuer humaner monoklonaler Anti-IL-8-Antikörper. Er wurde kürzlich in verschiedenen Ländern eingeführt. Phase-I-Studien testen aktuell sein Anti-Tumor-Potenzial [NCT02536469, NCT03689699] (Bilusic et al., 2019). Diese Versuche wurden bei Patienten mit fortgeschrittenen, bereits metastasierten Tumoren durchgeführt.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Hemmung von IL-6 oder IL-8 bereits in frühen Tumorstadien von Vorteil sein kann.

Wir haben die unter simulierter Mikrogravitation entstandenen MCS mit durch Liquid-Overlay-Technik hergestellten $1g$ PC3-MCS verglichen. Es fanden sich bei den $1g$ PC3-MCS bereits nach 24 h apoptotische Zellen, was die Expression von Zytokinen, Zytoskelettgenen und anderen Faktoren beeinflussen kann.

Diese Erkenntnisse zeigen, dass mehrzellige in der Mikrogravitation entstandene Sphäroide ein neuartiges in vitro Modell für die Erforschung der Frühphase der Metastasierung darstellen. Die vorliegenden Ergebnisse können somit zusätzliche Erkenntnisse für die Auswahl neuer Targets und Medikamente bei fortschreitenden Prostatatumoren liefern.

Zusammenfassung: Experimente zur Sphäroid-Bildung im neuentwickelten ClinoStar Klinostaten
(in Kooperation mit CelVivo)

Im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Celvivo ApS (Odense, DK; <https://celvivo.com/>) wurde uns der neuentwickelte ClinoStar™ zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um ein per Tablet bedienbares Kombinationsgerät aus CO_2 -Inkubator und Klinostat, das Platz bietet für sechs individuell steuerbare Reaktoren (ClinoReactor™).



Abbildung 60: Der ClinoStar mit einem Clinoreactor (Bildquelle: https://celvivo.com/wp-content/uploads/2021/07/Clinostar_transparent_02.png, © CelVivo)

Mit unserer Expertise in 3D-Zellkultur sollten Standardprotokolle zur Sphäroidbildung aus verschiedenen Zellarten entwickelt werden. Dabei wurden benigne (Nthy-Ori 3-1) wie auch maligne Schilddrüsenzelllinien (FTC-133), Mammakarzinomzellen (MCF-7), Prostatakarzinomzellen (PC-3), Fibroblasten (NHDF4) sowie Chondrozyten (Primärzellen) eingesetzt. Bei einigen Zelllinien erfolgte ein Vergleich mit anderen Methoden zur Sphäroidbildung wie der Liquid Overlay Technik (LOT) oder der RPM-Exposition sowie mit statischen 2D-Kulturen.

Grundsätzlich zeigte sich, dass auf dem ClinoStar in kürzerer Zeit mehr und meist größere Sphäroide entstanden als in den LOT- oder RPM-Kontrollen, die zudem auch eine höhere und homogenere Dichte aufwiesen. Zusätzliche qPCR-Analysen bei den Schilddrüsenzelllinien zeigten, dass auch auf diesem System bekannte, in das 3D-Wachstum involvierte Gene differenziell exprimiert waren.

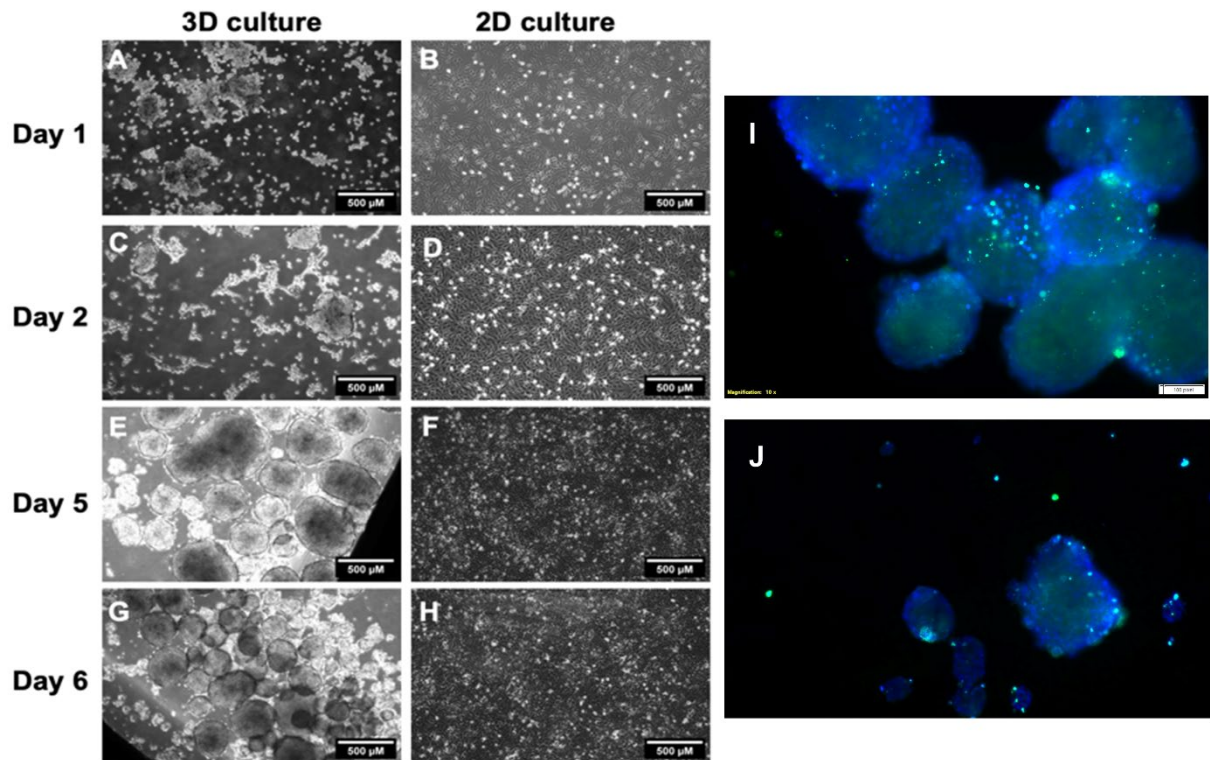


Abbildung 61: Vergleich ClinoStar vs. 2D statische Kultur vs. RPM für FTC-133-Zellen: (A-H) Darstellung des Zellwachstums von FTC-133-Zellen im ClinoStar (A, C, E, G) und in 1g-Kontrollen (B, D, F, H). (I) FTC-133-Sphäroid aus dem ClinoStar, (J) FTC-133-Sphäroid aus der RPM. I, J wurden mit NucBlue™ Live und NucGreen™ Dead ReadyProbes™ (ThermoFisher Scientific) gefärbt. Blau zeigt lebende, grün tote Zellen an.

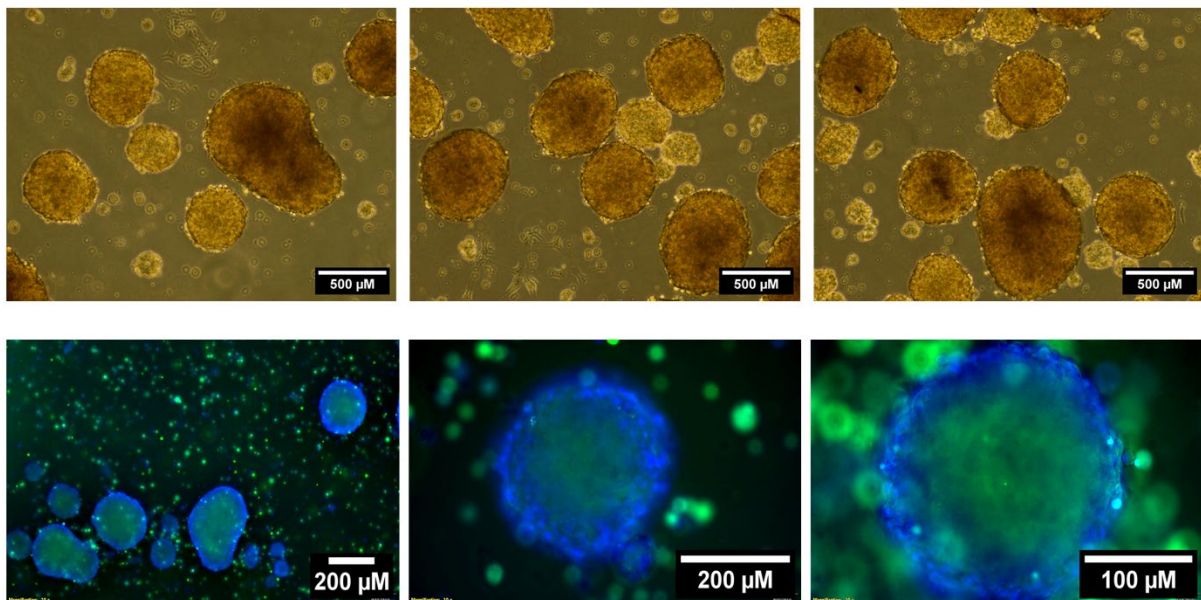


Abbildung 62: Morphologie und Viabilität von FTC-133-Sphäroiden nach 7 Tagen auf dem ClinoStar. Obere Bildreihe: Lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Sphäroide; untere Bildreihe: mit NucBlue™ Live und NucGreen™ Dead ReadyProbes™ (ThermoFisher Scientific) gefärbte representative Sphäroide. Blau zeigt lebende, grün tote Zellen an

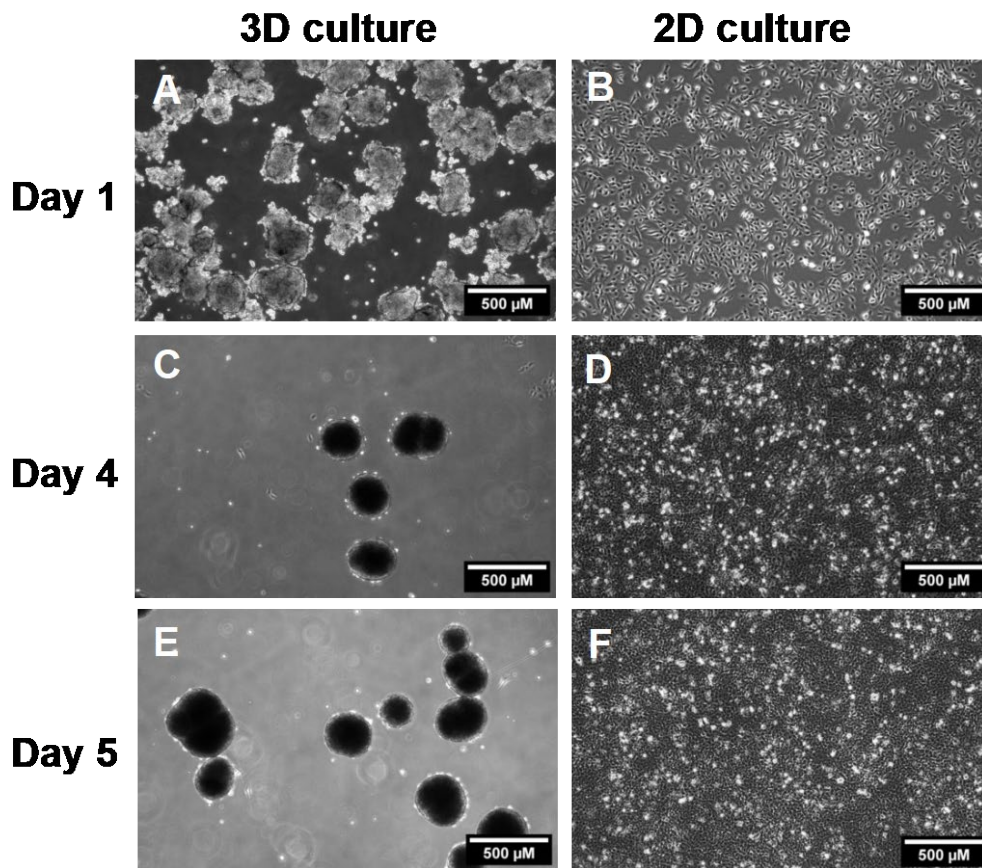


Abbildung 63: Vergleich ClinoStar vs. 2D statische Kultur Nthy-Ori 3-1-Zellen: (A-H) Darstellung des Zellwachstums von FTC-133-Zellen im ClinoStar (A, C, E) und in 1g-Kontrollen (B, D, F).

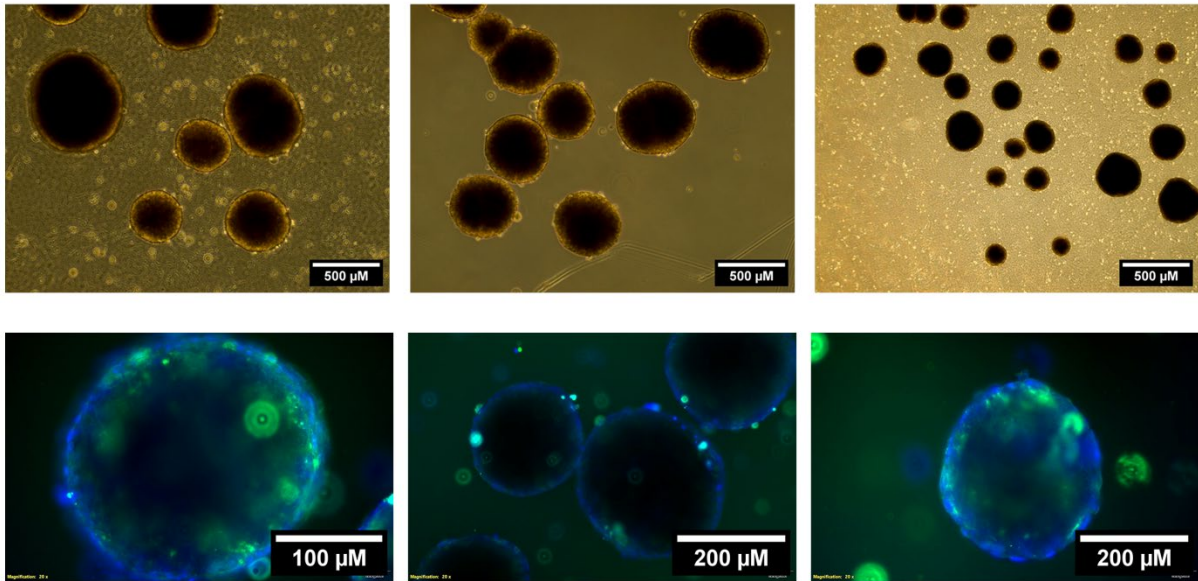


Abbildung 64: Morphologie und Viabilität von Nthy-Ori 3-1-Sphäroiden nach 7 Tagen auf dem ClinoStar: Obere Bildreihe: Lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Sphäroide; untere Bildreihe: mit NucBlue™ Live und NucGreen™ Dead ReadyProbes™ (ThermoFisher Scientific) gefärbte representative Sphäroide Blau zeigt lebende, grün tote Zellen an

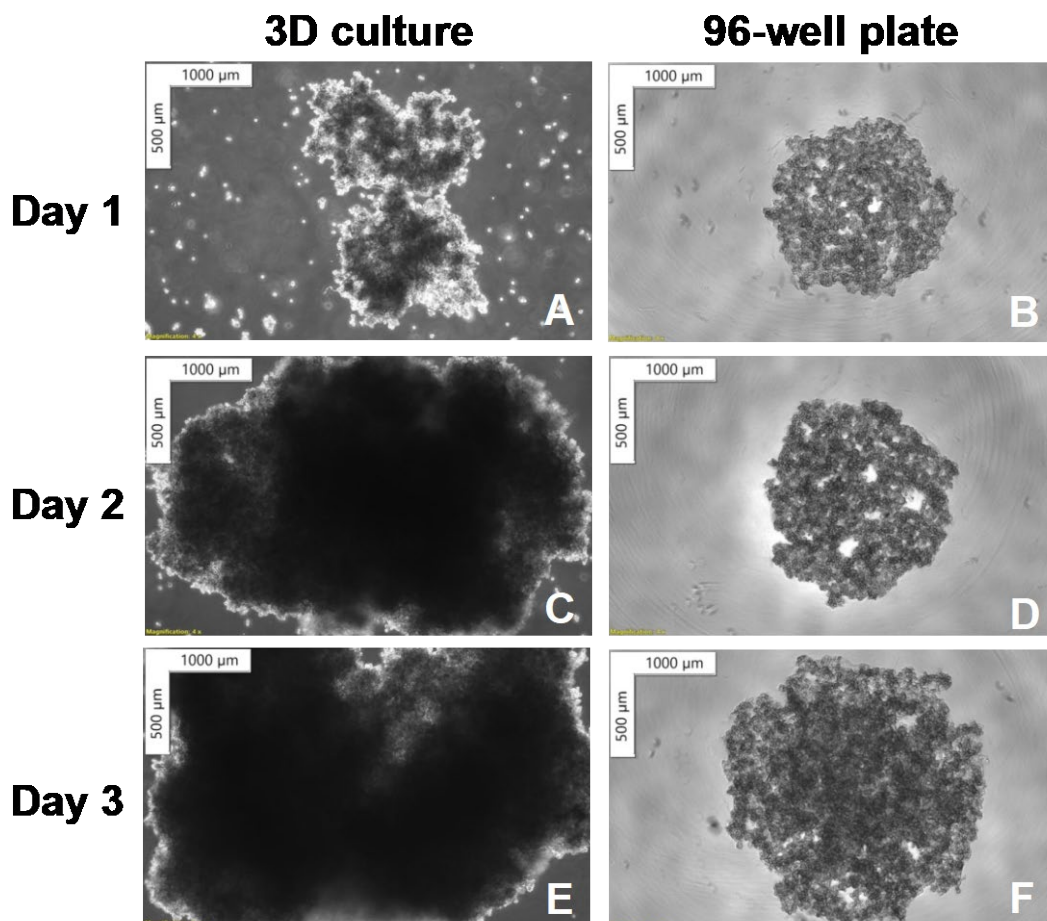


Abbildung 65: Vergleich ClinoStar vs. Liquid-overlay-Kultur PC3-Zellen: (A-H) Darstellung des Zellwachstums von PC-3-Zellen im ClinoStar (A, C, E) und in Liquid-overlay Zellkulturplatten (B, D, F)

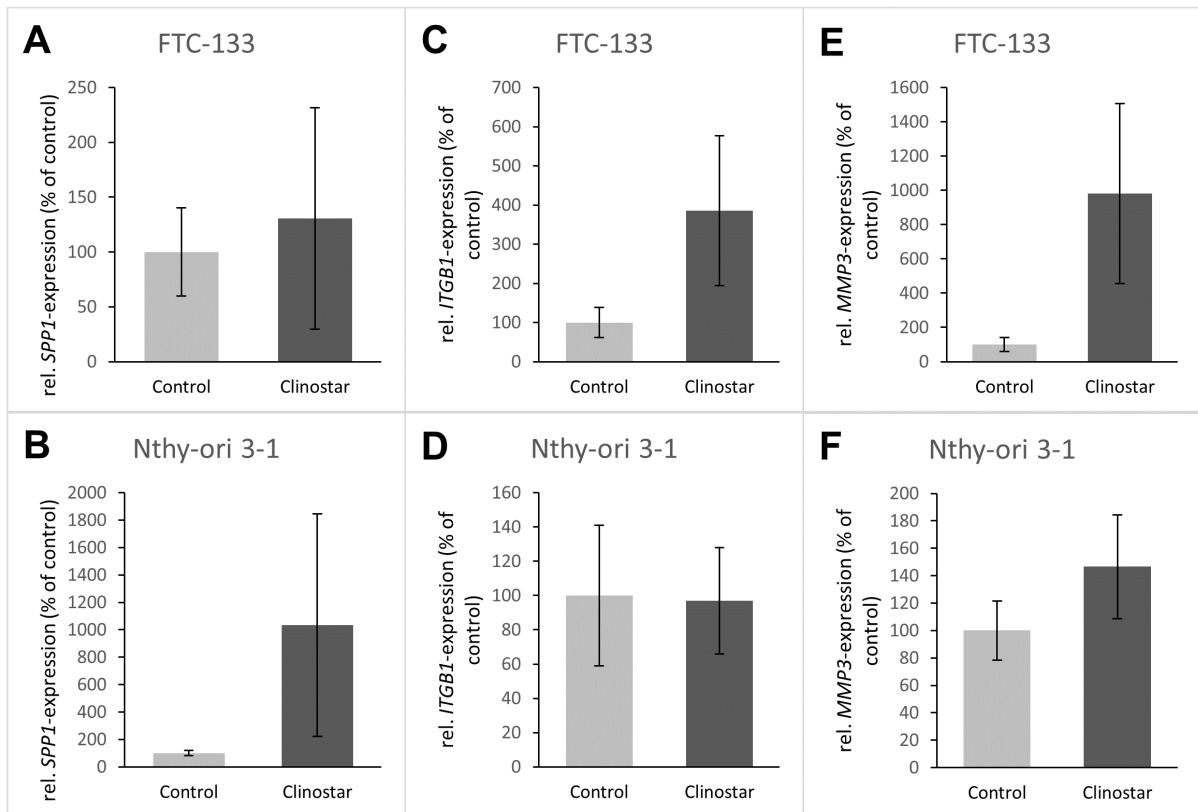


Abbildung 66: qPCR-Analyse von Genen der Extrazellulären Matrix in Schilddrüsenzellen (ClinoStar vs. statische Kontrolle): Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. n=2, daher haben diese Ergebnisse zunächst vorläufigen Charakter

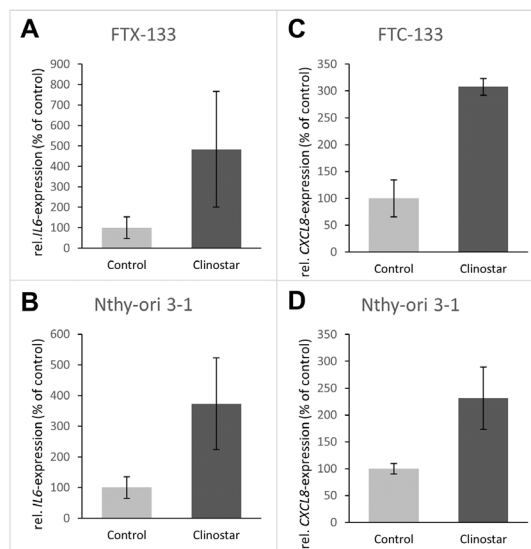


Abbildung 67: qPCR-Analyse von Genen proinflammatorischer Zytokine in Schilddrüsenzellen (ClinoStar vs. statische Kontrolle): Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. n=2, daher haben diese Ergebnisse zunächst vorläufigen Charakter

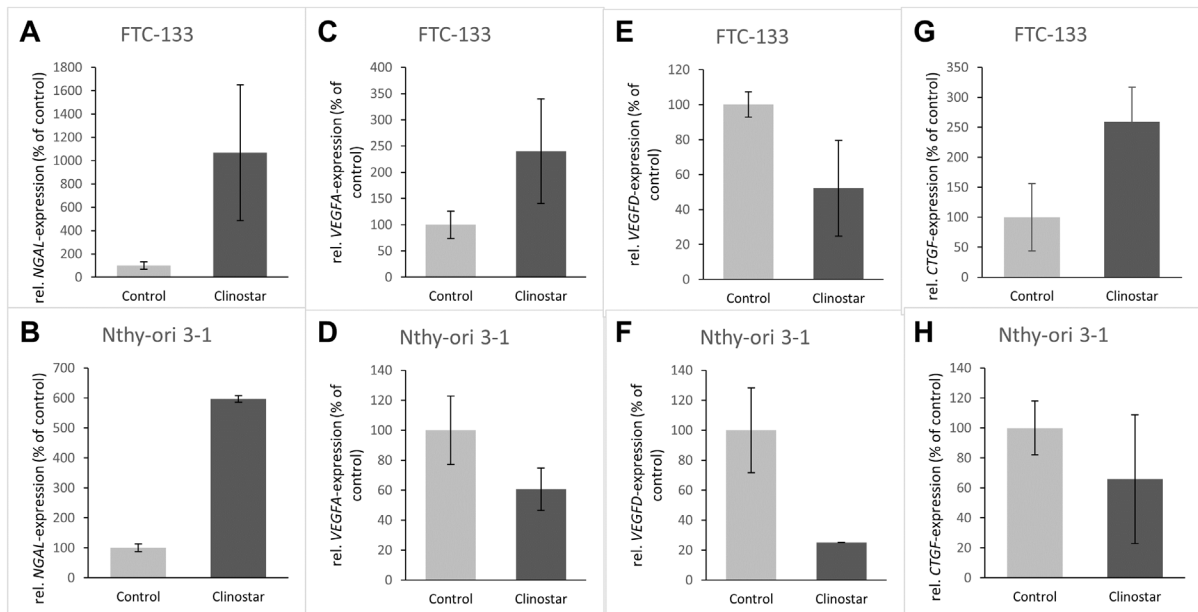




Abbildung 68: qPCR-Analyse von Genen der Angiogenese und des Tumorwachstums in Schilddrüsenzellen (ClinoStar vs. statische Kontrolle): Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. $n=2$, daher haben diese Ergebnisse zunächst vorläufigen Charakter

Die von uns erarbeiteten Protokolle können auf der Webseite von Celvivo unter <https://celvivo.com/resources/how-to-work/> nach vorheriger Registrierung heruntergeladen werden.

Als Beispiel ist das Protokoll für FTC-133-Zellen unten wiedergegeben.

Application Note

FTC-133 thyroid cancer multicellular spheroids in the ClinoStar system.

José Luis Cortés Sánchez, Research Scientist, Grimm Lab, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Michalina Maria Czaplicka, Research Scientist, Grimm Lab, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Louise Leth Hefting (PhD), Application Manager, CelVivo Aps

Introduction

This protocol describes the procedure for culturing the follicular thyroid cancer cell line FTC-133 in the CelVivo ClinoStar system from a single cell suspension subculture.

Reagents and Materials

- Equilibrated ClinoReactor (3x)
- 1 x T175 cm² normal cell culture flask with FTC-133 thyroid cancer cells, 70-90% confluency
- Cell counter
- Sigma Fetal bovine serum (FBS) (F7524)
- Gibco™ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (500 ml), supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin
- Trypsin-EDTA (0.5%)
- 0.4% Trypan-Blue
- 70% ethanol solution
- Gibco™ DPBS, no calcium, no magnesium (14190144)
- Invitrogen™ ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green (R37609)
- Invitrogen™ RNAiLATER™ (AM7021)

Additional Information

The general principle for cultivating spheroids is described in **01_Protocol_cultivating_Spheroids_and_Organoids** with references to relevant protocols. The cells used for the procedure were 70-90% confluent; see protocol **002_Protocol_Sub_cultivating_cells_in_2D**, which describes the sub-cultivation of cells, the protocol should be adjusted with the correct media composition as described here. The day prior to the experiment initiates the equilibration of the ClinoReactor®; see protocol **003_Protocol_Preparation_of_ClinoReactor**. The media change procedure is described in **004_Protocol_Cell_Culture_Media_Change_ClinoReactor**.


Protocol

Preparation of initial 2D cell culture

1. FTC-133 cells were thawed in RPMI 1640 medium (20% FBS, just for initial thawing)
2. The cell suspension was seeded into a T175 cm² cell culture flask
3. RPMI 1640 medium for monolayer cultures was changed every two days (48h, with RPMI 1640 media 10% FBS)
4. When the cells reached a confluence of 70-90%, they were sub-cultured
 - a. medium was removed from the culture flask
 - b. the cell surface was washed two times with Gibco™ DPBS (14190144) without calcium and magnesium

March 22 | 1

Abbildung 69: Protokoll FTC-133 Sphäroidzüchtung für den ClinoStar Seite 1.



c. 7 mL of RPMI 1640 medium 10% FBS was added, the cells were washed off the surface of the flask and the liquid was transferred into a 15 mL-centrifuge tube

d. the cell suspension was centrifuged at $400 \times g$ for 5 minutes. The supernatant was removed and 25 mL of RPMI 1640 medium with 10% FBS was used to re-suspend the cells

e. FTC-133 cells can be diluted up to 1:6, depending on the original confluence of the sub-cultured flask, the cells should be sub-cultured at least twice before transferring into the ClinoReactor

Culturing spheroids in the ClinoReactors

- The cells were trypsinized for 5 min in order to be counted and then transferred to the ClinoReactors®.
- One at least 80% confluent T175 cm² cell culture flask with FTC-133 was sub-cultured as described in the section above.
- The cells were diluted at 1:20 in RPMI 1640 medium and 10% FBS and counted.
- 1.5×10^6 cells were seeded per previously equilibrated ClinoReactor (**003_Protocol_Preparation_of_ClinoReactor**).
- Fresh pre-heated RPMI medium was added carefully with a syringe (10 mL) and needle 1.20 x 40 mm to maximum capacity to avoid bubbles in the cell chamber.
- Any bubbles or clumps present were removed to avoid excessive shear forces and to maintain only the spheroid culture.
- The spheroids were monitored daily, and their rotational speed of the ClinoReactors was adjusted to counteract their increasing size. The values used are shown in Table 1, and should be understood as an example for the experiment, but not intended to be used in every culture flask. The speed should be adjusted on an individual basis.

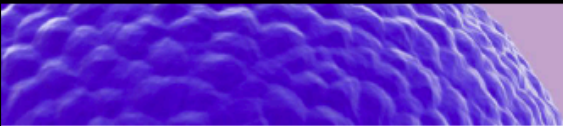

Day of experiment	Speed (RPM)
Day 1 (seeding Day)	2.5
Day 2	3.5
Day 3	5.0
Day 4	6.0
Day 5	6.0
Day 6	7.0
Day 7 (Harvesting)	7.5

Table 1. Speed examples for growing FTC-133 spheroids.

- The media was changed following the 48-72 hours scheme.
- To change the media, the bioreactors were removed from the ClinoStar, and left in an upright position in the laminar flow bench for 5 minutes, so the spheroids can sediment to the bottom of the bioreactor.
- Cell chambers were opened by the top plug and approximately 6 mL of medium were aspirated with a syringe and needle, avoiding touching the outer membrane of the bioreactor. The removal should be slow to avoid disturbing the spheroids.
- New pre-heated media was carefully added to the bioreactor without disturbing the spheroids. Medium was added to the very top to avoid bubbles in the cell chamber. The port was closed and 200 μ l of 70 % ethanol were added to the rim to avoid contamination.

March 22 | 2

Abbildung 70: Protokoll FTC-133 Sphäroidzüchtung für den ClinoStar, Seite 2.

Collecting the Spheroids:

1. On day 7, the bioreactors were removed from the ClinoStar and left for 5 min in the laminar flow bench in a standing position to let the spheroids sediment to the bottom of the bioreactor.
2. The bioreactor was put in the lying position and the Petri Dish was opened. 1 mL of cell suspension from each bioreactor was transferred into a 15 mL centrifuge tube.
3. 1 mL with the rest of the cells from each bioreactor was transferred into one well of a 24-well plate (other multi-well plates could also be used) for cell viability imaging.
4. The spheroid suspension in the 15 mL centrifuge tubes was centrifuged at $100 \times g$ for 5 minutes and the supernatant was removed. Subsequently 2 mL of RNA $_{later}$ ™ were added to each centrifuge tube. The tubes were later stored at 4 °C for further processing
5. Cell viability imaging - two drops of each staining (NucBlue Live for the nuclei of all cells, NucGreen Dead for the nuclei of dead cells) were added to every 1 mL well, the multi-well plate was incubated for 30 min before checking the viability under the microscope

Figures of spheroids

Below is shown how spheroids develop over time in ClinoReactors. The confocal pictures were taken every day for seven days of the experiment.

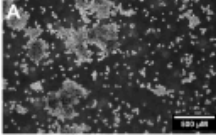
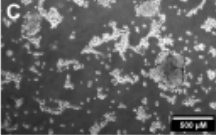
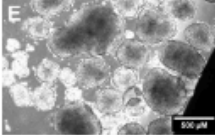
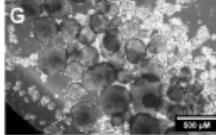
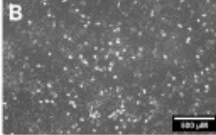
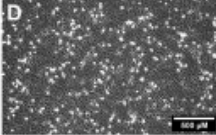
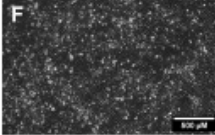
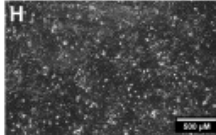
	Day 1	Day 2	Day 5	Day 6
ClinoStar 3D				
2D				

Figure 1 Confocal pictures of FTC-133 cell line on Day 1 (A,B), Day 2 (C,D), Day 5 (E,F) and Day 6 (G,H) cultured in the Clinostar system and in monolayer 2D culture. Scale bar 500 μ m

March 22 |
3

Abbildung 71: Protokoll FTC-133 Sphäroidzüchtung für den ClinoStar, Seite 3.

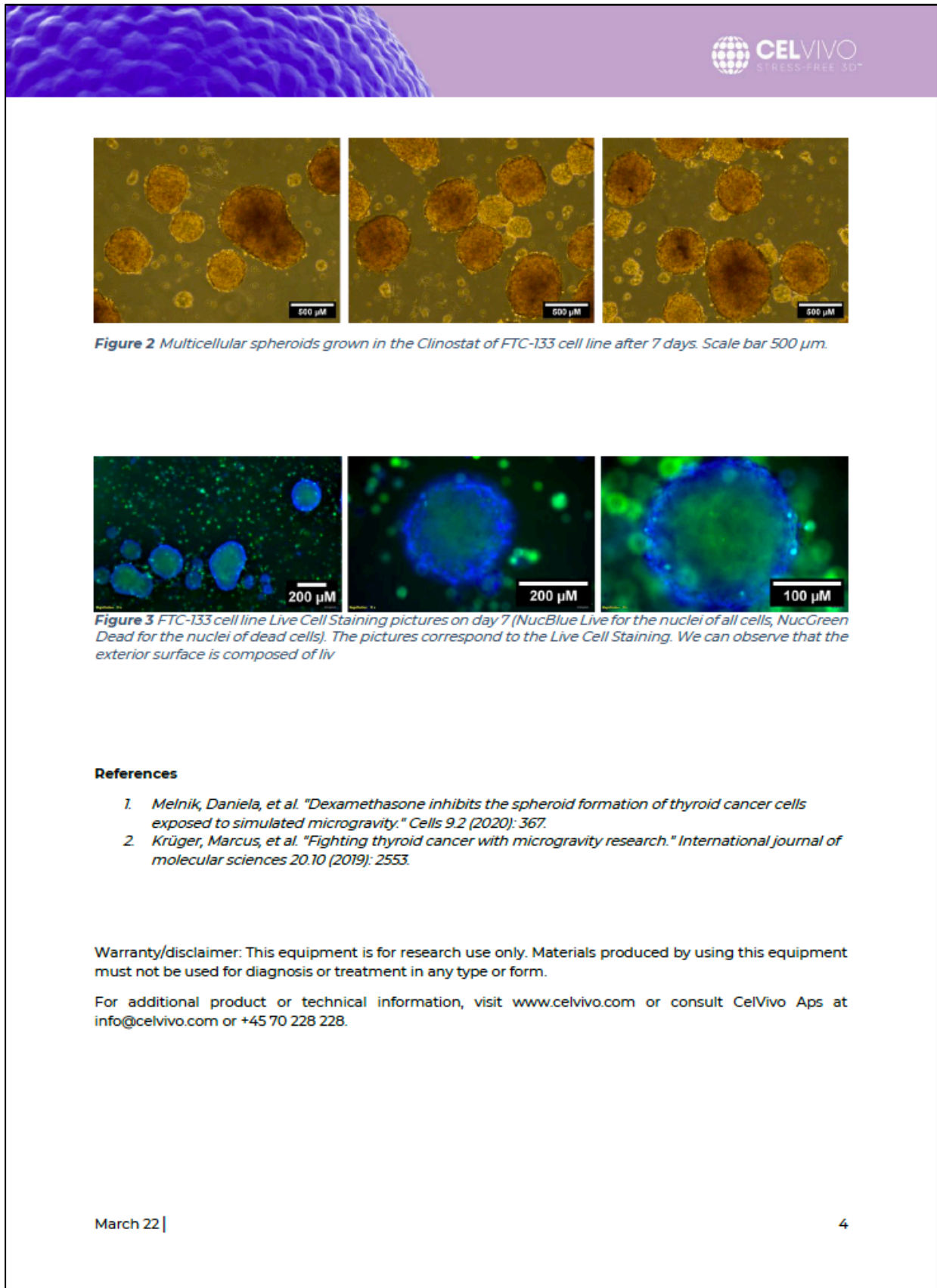


Abbildung 72: Protokoll FTC-133 Sphäroidzucht für den ClinoStar, Seite 4.

ABSOLVENTEN 2022

Doktorarbeiten abgeschlossen

keine

Doktorarbeiten begonnen und laufend:

M. Sc. Daniela Melnik (Dr. rer. medic.) (I)
Dorothea Dietrichs (Dr. med.) (I)
Sophia Gilger (Dr. med.) (I)
Paul Steinwerth (Dr. med.) (I)
Anna Heinrichs (Dr. med.) (I)
José Luis Cortés Sanchez (Dr. med.) (I)
Jenny Graf (Dr. rer. medic) (I)
Alaa Hakami (Dr. med.) (I)
Mikhail Ovchinnikov (Dr. med.) (I)
Balkis Barkia (Dr. med.) (I)
Michael Isensee (Dr. med.) (I)
Jakob Pfeiffer (Dr. med.) (I)

Masterarbeiten, laufend

Ronni Baran (I)
Michalina Czaplicka (I)

Bachelorarbeiten, abgeschlossen

Emma Hansen (a)

PUBLIKATIONEN 2022

1. Schulz, H.; Dietrichs, D.; Wehland, M.; Corydon, T.J.; Hemmersbach, R.; Liemersdorf, C.; Melnik, D.; Hübner, N.; Saar, K.; Infanger, M.; Grimm, D. In Prostate Cancer Cells Cytokines Are Early Responders to Gravitational Changes Occurring in Parabolic Flights. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7876. <https://doi.org/10.3390/ijms23147876>
2. Grimm D. Recent Advances in Thyroid Cancer Research. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 22;23(9):4631. doi: 10.3390/ijms23094631. PMID: 35563021; PMCID: PMC9104463.
3. Grimm D. Microgravity and Space Medicine 2.0. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 18;23(8):4456. doi: 10.3390/ijms23084456. PMID: 35457274; PMCID: PMC9029223.
4. Grimm D, Schulz H, Krüger M, Cortés-Sánchez JL, Egli M, Kraus A, Sahana J, Corydon TJ, Hemmersbach R, Wise PM, Infanger M, Wehland M. The Fight against Cancer by Microgravity: The Multicellular Spheroid as a Metastasis Model. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 12;23(6):3073. doi: 10.3390/ijms23063073. PMID: 35328492; PMCID: PMC8953941.
5. Dietrichs D, Grimm D, Sahana J, Melnik D, Corydon TJ, Wehland M, Krüger M, Vermeesen R, Baselet B, Baatout S, Hybel TE, Kahlert S, Schulz H, Infanger M, Kopp S. Three-dimensional Growth of Prostate Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 17;10:841017. doi: 10.3389/fcell.2022.841017. eCollection 2022. PMID: 35252204
6. Norre T, Grimm D, Simonsen U. Sacubitril/valsartan, sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors, and vericiguat for congestive heart failure therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2022 Apr;130(4):425-438. doi: 10.1111/bcpt.13714. Epub 2022 Feb 17. PMID: 35128801

7. Hansen E, Grimm D, Wehland M. Current Knowledge about the New Drug Firibastat in Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 27;23(3):1459. doi: 10.3390/ijms23031459.
8. Schulz H, Strauch SM, Richter P, Wehland M, Krüger M, Sahana J, Corydon TJ, Wise P, Baran R, Lebert M, Grimm D. Latest knowledge about changes in the proteome in microgravity. *Expert Rev Proteomics.* 2022 Jan;19(1):43-59. doi: 10.1080/14789450.2022.2030711. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35037812
9. Baran R, Marchal S, Garcia Campos S, Rehnberg E, Tabury K, Baselet B, Wehland M, Grimm D, Baatout S. The Cardiovascular System in Space: Focus on In Vivo and In Vitro Studies. *Biomedicines.* 2021 Dec 28;10(1):59. doi: 10.3390/biomedicines10010059.
10. Cortés-Sánchez JL, Callant J, Krüger M, Sahana J, Kraus A, Baselet B, Infanger M, Baatout S, Grimm D. Cancer Studies under Space Conditions: Finding Answers Abroad. *Biomedicines.* 2021 Dec 23;10(1):25. doi: 10.3390/biomedicines10010025. PMID: 35052703.

2. Eingehende Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der ZN Bericht wurde durch das Referat für Drittmittelverwaltung der OVGU, Fakultät für Medizin (FME), erstellt (siehe Anhang).

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit zur Erreichung der vorgegebenen Ziele für das Projekt war notwendig und angemessen. Sie wurde aber durch die COVID-19 Pandemie 2020 und 2021 extrem behindert, konnte aber durch Terminverschiebungen und Arbeit von maximal 2 gesunden, geimpften und getesteten Personen im Labor geleistet werden. Ein großes Problem waren Lieferschwierigkeiten und lange Lieferzeiten von Verbrauchsmaterialien. Ein weiterer Nachteil war die starke Einschränkung und teilweise Absage von Dienstreisen während der Pandemie.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

4.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Da es sich bei dem Vorhaben um Grundlagenforschung handelt, ist keine unmittelbare Verwertbarkeit zu erwarten und wird auch nur im Rahmen unserer Möglichkeiten angestrebt.

4.2 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

Aufgrund der langjährigen Erfahrung von Frau Professor Grimm im Bereich der Zellbiologie, der inneren Medizin (Kardiologie) sowie der allgemeinen Pharmakologie mit klinischer Pharmakologie konnten während der Pandemie zahlreiche Experimente erfolgreich durchgeführt werden, deren Ergebnisse im Antragszeitraum publiziert werden konnten (siehe Literaturverzeichnis Ref. 1-61). Mehrere Forschungsartikel und Übersichtsartikel aus den Bereichen Krebsforschung, Tissue Engineering, Wundheilung und Kardiologie wurden veröffentlicht.

Weiterhin wurden die Zellen in großem Umfang vermehrt, charakterisiert und getestet, sodass eine große Menge an Zellen der gleichen Passage vorliegt. Diese standen für die Untersuchungen im Antragszeitraum und stehen auch für zukünftige Projekte zur Verfügung.

Im Bereich der molekularen Genetik besteht seit mehreren Jahren eine enge Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Norbert Hübner vom MDC Berlin, Buch. Seit dem 1. März 2021 ist Dr. Herbert Schulz der neue Arbeitsgruppenleiter der AG Bioinformatik der Abteilung für Mikrogravitation und Translationale Regenerative Medizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Siehe <http://mtrm.med.ovgu.de/Forschung/Bioinformatik.html>

Unter anderem werden OMICS Studien in realer und simulierter Mikrogravitation durchgeführt. Erste Ergebnisse der 34. DLR Parabelflugkampfen wurden gerade publiziert.

Die technischen und wissenschaftlichen Erfolgsaussichten sind daher exzellent.

4.3 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Es handelt sich um ein Projekt der Grundlagenforschung, daher ist eine unmittelbare wirtschaftliche Verwertbarkeit weder gegeben noch wird sie aktiv angestrebt.

Die wissenschaftliche Anschlussfähigkeit ist dagegen sehr hoch. Die Daten sollen nach Auswertung auf Kongressen (national und international) vorgestellt und in hochrangigen internationalen wissenschaftlichen Journalen publiziert werden.

Langfristig bieten die Versuche vielen weiteren Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen die

Möglichkeit, Untersuchungen in den verschiedensten Bereichen der Grundlagenforschung durchzuführen, denn nur reale Schwerelosigkeit kann uns Antwort auf die Frage geben: Sind die unter simulierten Bedingungen der Mikrogravitation gefundenen Veränderungen auch im Weltraum zu beobachten? Wenn ja, ergeben sich hoffnungsvolle neue Behandlungsstrategien für den Bereich der Onkologie und des Tissue-Engineerings im Bereich der translationalen regenerativen Medizin (Unfallchirurgie, Plastische Chirurgie, Orthopädie in Form von *in vitro* erstellten autologen Gefäßtransplantaten oder neuer Strategien zur Knorpelregeneration).

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Keine

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

2022

1. Schulz, H.; Dietrichs, D.; Wehland, M.; Corydon, T.J.; Hemmersbach, R.; Liemersdorf, C.; Melnik, D.; Hübner, N.; Saar, K.; Infanger, M.; Grimm, D. In Prostate Cancer Cells Cytokines Are Early Responders to Gravitational Changes Occurring in Parabolic Flights. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7876. <https://doi.org/10.3390/ijms23147876>
2. Grimm D. Recent Advances in Thyroid Cancer Research. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 22;23(9):4631. doi: 10.3390/ijms23094631. PMID: 35563021; PMCID: PMC9104463.
3. Grimm D. Microgravity and Space Medicine 2.0. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 18;23(8):4456. doi: 10.3390/ijms23084456. PMID: 35457274; PMCID: PMC9029223.
4. Grimm D, Schulz H, Krüger M, Cortés-Sánchez JL, Egli M, Kraus A, Sahana J, Corydon TJ, Hemmersbach R, Wise PM, Infanger M, Wehland M. The Fight against Cancer by Microgravity: The Multicellular Spheroid as a Metastasis Model. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 12;23(6):3073. doi: 10.3390/ijms23063073. PMID: 35328492; PMCID: PMC8953941.
5. Dietrichs D, Grimm D, Sahana J, Melnik D, Corydon TJ, Wehland M, Krüger M, Vermeesen R, Baselet B, Baatout S, Hybel TE, Kahlert S, Schulz H, Infanger M, Kopp S. Three-dimensional Growth of Prostate Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 17;10:841017. doi: 10.3389/fcell.2022.841017. eCollection 2022. PMID: 35252204
6. Norre T, Grimm D, Simonsen U. Sacubitril/valsartan, sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors, and vericiguat for congestive heart failure therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2022 Apr;130(4):425-438. doi: 10.1111/bcpt.13714. Epub 2022 Feb 17. PMID: 35128801
7. Hansen E, Grimm D, Wehland M. Current Knowledge about the New Drug Firibastat in Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 27;23(3):1459. doi: 10.3390/ijms23031459.
8. Schulz H, Strauch SM, Richter P, Wehland M, Krüger M, Sahana J, Corydon TJ, Wise P, Baran R, Lebert M, Grimm D. Latest knowledge about changes in the proteome in microgravity. *Expert Rev Proteomics.* 2022 Jan;19(1):43-59. doi: 10.1080/14789450.2022.2030711. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35037812
9. Baran R, Marchal S, Garcia Campos S, Rehnberg E, Tabury K, Baselet B, Wehland M, Grimm D, Baatout S. The Cardiovascular System in Space: Focus on In Vivo and In Vitro Studies. *Biomedicines.* 2021 Dec 28;10(1):59. doi: 10.3390/biomedicines10010059.
10. Cortés-Sánchez JL, Callant J, Krüger M, Sahana J, Kraus A, Baselet B, Infanger M, Baatout S,

Grimm D. Cancer Studies under Space Conditions: Finding Answers Abroad. *Biomedicines*. 2021 Dec 23;10(1):25. doi: 10.3390/biomedicines10010025. PMID: 35052703.

2021

11. Wise PM, Neviani P, Riwaldt S, Corydon TJ, Wehland M, Braun M, Krüger M, Infanger M, Grimm D. Changes in Exosomal miRNA Composition in Thyroid Cancer Cells after Prolonged Exposure to Real Microgravity in Space. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 27;22(23):12841. doi: 10.3390/ijms222312841. PMID: 34884646; PMCID: PMC8657878.
12. Kaae AC, Kreissl MC, Krüger M, Infanger M, Grimm D, Wehland M. Kinase-Inhibitors in Iodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer-Focus on Occurrence, Mechanisms, and Management of Treatment-Related Hypertension. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 12;22(22):12217.
13. Moroni L, Tabury K, Stenuit H, Grimm D, Baatout S, Mironov V. What can biofabrication do for space and what can space do for biofabrication? *Trends Biotechnol*. 2021 Sep 17:S0167-7799(21)00195-5.
14. Melnik D, Krüger M, Schulz H, Kopp S, Wehland M, Bauer J, Baselet B, Vermeesen R, Baatout S, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D. The CellBox-2 Mission to the International Space Station: Thyroid Cancer Cells in Space. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(16):8777.
15. Bauer J, Gombocz E, Schulz H, Hauslage J, Grimm D. Interaction Network Provides Clues on the Role of BCAR1 in Cellular Response to Changes in Gravity. *Computation*. 2021; 9(8):81.
16. Sahana J, Corydon TJ, Wehland M, Krüger M, Kopp S, Melnik D, Kahlert S, Relja B, Infanger M, Grimm D. Alterations of Growth and Focal Adhesion Molecules in Human Breast Cancer Cells Exposed to the Random Positioning Machine. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 30;9:672098.
17. Riwaldt S, Corydon TJ, Pantalone D, Sahana J, Wise P, Wehland M, Krüger M, Melnik D, Kopp S, Infanger M, Grimm D. Role of Apoptosis in Wound Healing and Apoptosis Alterations in Microgravity. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Jun 17;9:679650.
18. Grimm D. Microgravity and Space Medicine. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 22;22(13):6697.
19. Ravichandran B, Grimm D, Krüger M, Kopp S, Infanger M, Wehland M. SARS-CoV-2 and hypertension. *Physiol Rep*. 2021 Jun;9(11):e14800.
20. Grimm D. Cell and Molecular Biology of Thyroid Disorders 2.0. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 17;22(4):1990.
21. Wise PM, Neviani P, Riwaldt S, Corydon TJ, Wehland M, Braun M, Krüger M, Infanger M, Grimm D. Changes in Exosome Release in Thyroid Cancer Cells after Prolonged Exposure to Real Microgravity in Space. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 21;22(4):2132.
22. Baran R, Grimm D, Infanger M, Wehland M. The Effect of Continuous Positive Airway Pressure Therapy on Obstructive Sleep Apnea-Related Hypertension. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 25;22(5):2300.

2020

23. Wehland M, Steinwerth P, Aleshcheva G, Sahana J, Hemmersbach R, Lützenberg R, Kopp S, Infanger M, Grimm D. Tissue Engineering of Cartilage Using a Random Positioning Machine. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 16;21(24):9596.
24. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, Infanger M, Corydon TJ. The

- role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2020 Dec;67(Pt 1):122-153.
25. Prasad B, Grimm D, Strauch SM, Erzinger GS, Corydon TJ, Lebert M, Magnusson NE, Infanger M, Richter P, Krüger M. Influence of Microgravity on Apoptosis in Cells, Tissues, and Other Systems In Vivo and In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 9;21(24):9373
26. Johnson IRD, Nguyen CT, Wise P, Grimm D. Implications of Altered Endosome and Lysosome Biology in Space Environments. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 2;21(21):8205.
27. Nassef MZ, Melnik D, Kopp S, Sahana J, Infanger M, Lützenberg R, Relja B, Wehland M, Grimm D, Krüger M. Breast Cancer Cells in Microgravity: New Aspects for Cancer Research. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 5;21(19):7345.
28. Krüger M, Kopp S, Wehland M, Corydon TJ, Grimm D. Science between Bioreactors and Space Research-Response to Comments by Joseph J. Bevelacqua et al. on "Dexamethasone Inhibits Spheroid Formation of Thyroid Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity". *Cells.* 2020 Jul 23;9(8):1763.
29. Prasad B, Richter P, Vadakedath N, Mancinelli R, Krüger M, Strauch SM, Grimm D, Darriet P, Chapel JP, Cohen J, Lebert M. Exploration of space to achieve scientific breakthroughs. *Biotechnol Adv.* 2020 Nov 1;43:107572.
30. Grimm D, Wehland M, Corydon TJ, Richter P, Prasad B, Bauer J, Egli M, Kopp S, Lebert M, Krüger M. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2020 Aug;9(8):882-894.
31. Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J Clin Med.* 2020 Mar 18;9(3):824.
32. Bauer TJ, Gombocz E, Wehland M, Bauer J, Infanger M, Grimm D. Insight in Adhesion Protein Sialylation and Microgravity Dependent Cell Adhesion-An Omics Network Approach. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 4;21(5):1749.
33. Wehland M, Simonsen U, Buus NH, Krüger M, Grimm D. An evaluation of the fixed dose combination sacubitril/valsartan for the treatment of arterial hypertension. *Expert Opin Pharmacother.* 2020 Jul;21(10):1133-1143.
34. Hybel TE, Dietrichs D, Sahana J, Corydon TJ, Nassef MZ, Wehland M, Krüger M, Magnusson NE, Bauer J, Utpatel K, Infanger M, Grimm D, Kopp S. Simulated Microgravity Influences VEGF, MAPK, and PAM Signaling in Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 13;21(4):1263.
35. Melnik D, Sahana J, Corydon TJ, Kopp S, Nassef MZ, Wehland M, Infanger M, Grimm D, Krüger M. Dexamethasone Inhibits Spheroid Formation of Thyroid Cancer Cells Exposed to Simulated Microgravity. *Cells.* 2020 Feb 5;9(2):367.
36. Povlsen AL, Grimm D, Wehland M, Infanger M, Krüger M. The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. *J Clin Med.* 2020 Jan 18;9(1):267.
37. Strube F, Infanger M, Wehland M, Delvinioti X, Romswinkel A, Dietz C, Kraus A. Alteration of Cytoskeleton Morphology and Gene Expression in Human Breast Cancer Cells under Simulated Microgravity. *Cell J.* 2020 Apr;22(1):106-114. doi: 10.22074/cellj.2020.6537. Epub 2019 Sep 8. PMID: 31606974; PMCID: PMC6791064.

38. Legarth C, Grimm D, Krüger M, Infanger M, Wehland M. Potential Beneficial Effects of Vitamin D in Coronary Artery Disease. *Nutrients*. 2019 Dec 30;12(1):99.
39. Ancker OV, Krüger M, Wehland M, Infanger M, Grimm D. Multikinase Inhibitor Treatment in Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 18;21(1):10.
40. Nassef MZ, Kopp S, Melnik D, Corydon TJ, Sahana J, Krüger M, Wehland M, Bauer TJ, Liemersdorf C, Hemmersbach R, Infanger M, Grimm D. Short-term Microgravity Influences Cell Adhesion in Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2019;20(22):573
41. Bauer TJ, Gombocz E, Krüger M, Sahana J, Corydon TJ, Bauer J, Infanger M, Grimm D. Augmenting cancer cell proteomics with cellular images – A semantic approach to understand focal adhesion. *J Biomed Inform* 2019;100:103320.
42. Deutch MR, Grimm D, Wehland M, Infanger M, Krüger M. Bioactive Candy: Effects of Licorice on the Cardiovascular System. *Foods* 2019;8(10):495.
43. Grimm D. Guest Edited Collection: Gravitational biology and space medicine. *Sci Rep*. 2019;9(1):14399.
44. Lützenberg R, Wehland M, Solano K, Nassef MZ, Buken C, Melnik D, Bauer J, Kopp S, Krüger M, Riwaldt S, Hemmersbach R, Schulz H, Infanger M, Grimm D. Beneficial Effects of Low Frequency Vibration on Human Chondrocytes in Vitro. *Cell Physiol* 2019;53:623-637.
45. Bæk Møller N, Budolfson C, Grimm D, Krüger M, Infanger M, Wehland M, Magnusson NE. Drug-Induced Hypertension Caused by Multikinase Inhibitors (Sorafenib, Sunitinib, Lenvatinib and Axitinib) in Renal Cell Carcinoma Treatment. *Int J Mol Sci* 2019;20(19):4712.
46. Lindegaard Pedersen M, Krüger M, Grimm D, Infanger M, Wehland M. The prostacyclin analogue treprostinil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019 Aug 12.
47. Buken C, Sahana J, Corydon TJ, Melnik D, Bauer J, Wehland M, Krüger M, Balk S, Abuagela N, Infanger M, Grimm D. Morphological and Molecular Changes in Juvenile Normal Human Fibroblasts Exposed to Simulated Microgravity. *Sci Rep* 2019;9(1):11882.
48. Khalaf D, Krüger M, Wehland M, Infanger M, Grimm D. The Effects of Oral LArginine and L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. *Nutrients* 2019;11(7):1679.
49. Nassef MZ, Kopp S, Wehland M, Melnik D, Sahana J, Krüger M, Corydon TJ, Oltmann H, Schmitz B, Schütte A, Bauer, TJ, Infanger M, Grimm D. Real Microgravity Influences the Cytoskeleton and Focal Adhesions in Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 2019;20(13):3156.
50. Toxvig AK, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. A Focus on Riociguat in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2019;125:202-214.
51. Grimm D. Cell and Molecular Biology of Thyroid Disorders. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):2895.
52. Krüger M, Melnik D, Kopp S, Buken C, Sahana J, Bauer J, Wehland M, Hemmersbach R, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D. Fighting Thyroid Cancer with Microgravity Research. *Int J Mol Sci* 2019;20(10):2553.
53. Olawi N, Krüger M, Grimm D, Infanger M, Wehland M. Nebivolol in the Treatment of Arterial Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2019;125:189-201.
54. Krüger M, Pietsch J, Bauer J, Kopp S, Carvalho DTO, Baatout S, Moreels M, Melnik D, Wehland M, Egli M, Sahana J, Kobberø SD, Corydon TJ, Nebuloni S, Gass S, Evert M, Infanger M, Grimm D. Growth of Endothelial Cells in Space and in Simulated Microgravity – A Comparison on the Secretory Level. *Cell Physiol Biochem* 2019;52(5):1039-1060.

55. Krüger M, Kopp S, Wehland M, Bauer J, Baatout S, Moreels M, Egli M, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D. Growing blood vessels in space: Preparation studies of the SPHEROIDS project using related ground-based studies. *Acta Astronaut* 2019;159:267-272.
56. Mann V, Grimm D, Corydon TJ, Krüger M, Wehland M, Riwaldt S, Sahana J, Kopp S, Bauer J, Reseland JE, Infanger M, Lian AM, Okoro E, Sundaresan A. Changes in Human Foetal Osteoblasts Exposed to the Random Positioning Machine and Bone Construct Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 2019; 20(6):1357.
57. Budolfson C, Faber J, Grimm D, Krüger M, Bauer J, Wehland M, Infanger M, Magnusson NE. Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Hypertension: Role of Hypertension as a Biomarker in Cancer Treatment. *Curr Vasc Pharmacol* 2019;17(6):618-634.
58. Strauch SM, Grimm D, Corydon TJ, Krüger M, Bauer J, Lebert M, Wise P, Infanger M, Richter P. Current knowledge about the impact of microgravity on the proteome. *Expert Rev Proteomics* 2019;16(1):1-12.
59. Romswinkel A, Infanger M, Dietz C, Strube F, Kraus A. The Role of C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4) in Cell Adherence and Spheroid Formation of Human Ewing's Sarcoma Cells under Simulated Microgravity. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 2;20(23):6073. doi: 10.3390/ijms20236073. PMID: 31810195; PMCID: PMC6929163.
60. 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 Jul 23;20(14):3601. doi: 10.3390/ijms20143601. PMID: 31340547; PMCID: PMC6678991.
61. Strube F, Infanger M, Dietz C, Romswinkel A, Kraus A. Short Term Effects of Simulated Microgravity on Morphology and Gene Expression in Human Breast Cancer Cells. *Physiol Int.* 2019 Dec 1;106(4):311-322

Wenn zur Wahrung berechtigter Interessen des ZE oder Dritter oder aus anderen sachlichen Gesichtspunkten bestimmte Einzelheiten aus dem Bericht vertraulich zu behandeln sind (z.B. zur Wahrung der Priorität bei Schutzrechtsanmeldungen), so hat der ZE den ZG ausdrücklich darauf hinzuweisen.

Keine

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Schlussbericht
3a. Titel des Berichts SPACEPATHWAY: Effekte der Schwerelosigkeit auf Gefäß- und Sphäroidbildung humaner Zellen sowie auf Wundheilung und Herzmorphologie	
3b. Titel der Publikation	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Prof. Dr. med. Grimm, Daniela Gabriele	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2022
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Abteilung für Mikrogravitation und Translationale Regenerative Medizin, Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie, Universitätsklinikum Magdeburg Fakultät für Medizin und Fakultät für Maschinenbau Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Universitätsplatz 2 / Pfälzer Straße 2 Gebäude 28 39106 Magdeburg	9. Ber.Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen ¹⁾ 50WB1924
	11a. Seitenzahl Bericht 80
	11b. Seitenzahl Publikation
	12. Literaturangaben 61
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Deutsche Raumfahrtagentur im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. Königswinterer Str. 522-524 53227 Bonn	14. Tabellen 2
	15. Abbildungen 72
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung: Unser vorrangiges Ziel ist es den Einfluss von Mikrogravitation (μg) auf benigne (Endothelzellen, Knorpelzellen, Fibroblasten etc.) und maligne Zellen (Schilddrüsentumorzellen, Mammakarzinom (MK)- und Prostatakarzinomzellen (PKZ)) näher zu untersuchen. Es wurden Untersuchungen zur Vorbereitung des ISS-Experiments Sutures (Projekt 14-ILSRA_ Prop-0043: „Wound Healing and Sutures in Unloading Conditions“) durchgeführt. Zur Vorbereitung des BION-M2 Weltraumfluges (<i>Veränderungen an Herzen und Gefäßen unter Langzeit-Mikrogravitation und kosmischer Strahlung im Weltraum</i>) wurde die aktuelle Literatur studiert und Übersichtsartikel mit Fokus auf Apoptose geschrieben. Die COVID-19 Pandemie und internationale Probleme hatten auch Einfluss auf die Forschung unter Weltraumbedingungen und führten zur Startverschiebung beider Experimente. Die Anwendung von μg auf Tumorzellen ist zu einer wichtigen neuen Technologie geworden, um das aktuelle Wissen über die Tumorbio-logie zu erweitern. Wir untersuchten die Mechanismen für 3D Wachstum in μg , sowie Veränderungen der Proteinsynthese, der Genexpression sowie der Sekretion näher studiert. Im Fokus stand die Untersuchung der PAM, MAPK und VEGF Signalwege, die an der Sphäroidbildung bei MK- und PC-3 PKZ beteiligt sind. Sie sind für die Metastasierungs-, Angiogenese und Survival von Tumoren bedeutend. Neben Untersuchungen an Ground-Based Facilities wurden Experimente in realer μg im Rahmen der 34. (PROSTATE-1 PC-3 Zellen) und 37. (PROSTATE-2 du-145 Zellen) DLR PFC durchgeführt. RNA-seq Analysen (PC-3 Zellen) ergaben, dass die stark unterschiedlich exprimierten Gene wie Zytokine und insbesondere Chemokine robust genug für einen künftigen diagnostischen Ansatz sind. Darüber hinaus ermöglicht die μg -Umgebung <i>in vitro</i> 3D-Tumormodelle (Sphäroide, Organoide) mit einem hohen Potenzial für das präklinische Targeting von Arzneimitteln, die Entwicklung von Krebsmedikamenten und die Untersuchung der Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung auf molekularer Ebene. Auf dem Gebiet des Tissue-Engineerings konnten auf der RPM makroskopische, „scaffold“-freie Knorpelfragmente aus humanen Chondrozyten hergestellt werden und detailliert charakterisiert werden. In enger Zusammenarbeit mit denen das neue FLUMIAS-ISS Mikroskop konstruierenden Firmen waren wir mit Biokompatibilitätstestungen an dessen Design beteiligt. Es wurden im Berichtszeitraum verschiedene Zellkulturexperimente für das geplante CANCEROIDS Projekt durchgeführt.	
19. Schlagwörter Tumorforschung, Tissue Engineering, Mikrogravitation, Endothelzellen, Knorpel, Random Positioning Machine, Parabellflug, Zytoskelett, ISS, Apoptose, Wundheilung, OMICS,	
20. Verlag	21. Preis

¹⁾ Hinweis für Bearbeiter/in: Auf das Förderkennzeichen des BMWi soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

--	--

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report FINAL REPORT
3a. Report Title SPACEPATHWAY: Effects of weightlessness on vessel and spheroid formation of human cells on wound healing as well as heart morphology	
3b. Title of Publication	
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s)) Professor Grimm, Daniela Gabriele	5. End of Project 31.03.2022
4b. Author(s) of the Publication (Family Name, First Name(s))	6. Publication Date
	7. Form of Publication
8. Performing Organization(s) (Name, Address) Department of Microgravity and Translational Regenerative Medicine, Clinic for Plastic, Aesthetic and Hand Surgery, University Hospital Magdeburg Faculty of Medicine and Faculty of Mechanical Engineering Otto-von-Guericke-University Magdeburg Universitätsplatz 2 / Pfälzer Straße 2 Bldg. 28 39106 Magdeburg Germany	9. Originator's Report No.
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Deutsche Raumfahrtagentur im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. Königswinterer Str. 522-524 53227 Bonn	10. Reference No. 50 WB1924
	11a. No. of Pages Report 80
	11b. No. of Pages Publication
	12. No. of References 61
	14. No. of Tables 2
	15. No. of Figures 72
16. Supplementary Notes	
17. Presented at (Title, Place, Date)	
18. Abstract The primary goal of our work is to investigate the influence of microgravity (μg) on benign (endothelial cells, cartilage cells, fibroblasts, etc.) and malignant cells (thyroid tumor cells, breast cancer (BC) and prostate cancer cells (PCC)). In addition, studies were carried out to prepare the ISS Experiments Sutures (Project 14-ILSRA_Prop-0043: " <i>Wound Healing and Sutures in Unloading Conditions</i> "). In preparation for the BION-M2 space flight (<i>changes in hearts and vessels under long-term microgravity and cosmic radiation in space</i>), the current literature was studied and review articles focused on apoptosis were written. The COVID-19 pandemic and international issues also impacted research in space and led to the postponement of both experiments. Application of μg to tumor cells has become an important emerging technology to advance the current knowledge of tumor biology. We examined the mechanisms for three-dimensional growth in μg , as well as changes in protein synthesis, gene expression and secretion of the cells. We focused on investigating the PAM, MAPK and VEGF signaling pathways involved in spheroid formation in BC and PC-3 PCC. They are important for metastasis, angiogenesis and survival of tumors. In addition to investigations at ground-based facilities, experiments in real μg were successfully carried out as part of the 34 th (PROSTATE-1 PC-3 cells) and 37 th (PROSTATE-2 du-145 cells) DLR parabolic flight campaign. RNAseq analyzes (PC-3 cells) showed that the highly differently expressed genes such as cytokines and especially chemokines are robust enough for a future diagnostic approach. Furthermore, the μg environment enables in vitro 3D tumor models (multicellular spheroids and organoids) with a high potential for preclinical drug targeting, anticancer drug development and studying the processes of tumor progression and metastasis at the molecular level. In the field of tissue engineering, macroscopic, 'scaffold'-free cartilage fragments could be produced from human chondrocytes on the RPM and characterized in detail. In close cooperation with the companies constructing the new FLUMIAS-ISS microscope, we were involved in its design with biocompatibility tests. During the reporting period, various cell culture experiments were carried out for the planned CANCEROIIDS project.	
19. Keywords Cancer Research, Tissue Engineering, Microgravity, Endothelial Cells, Cartilage, Random Positioning Machine, Parabolic Flight, Cytoskeleton, ISS, Apoptosis, Wound Healing, OMICS, Cardiovascular Changes	

20. Publisher	21. Price
---------------	-----------