

# **Vorbereitungen für das Biolab Experiment TRIPLE LUX A Hardwareentwicklung, Kalibrierung und biologische Bodenkontrollen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktoringenieurin / Doktoringenieur  
(Dr.-Ing.)**

von Dipl. Biol., M. Sc. Astrid Horn

geb. am 28.06.1981 in Ansbach

genehmigt durch die Fakultät Maschinenbau  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter:

Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Oliver Ullrich

Prof. Dr. rer.nat. Dr.-Ing.e.h. Ernst Messerschmid

Prof. Dr.-Ing. Karl-Heinrich Grote

Promotionskolloquium am 12.07.2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
2.1.  Schwerkraft .....	13
2.2.  Schwerkraftwahrnehmung.....	13
2.3.  Phagozytose .....	16
2.4.  Oxidativer Burst.....	19
2.5.  Forschungsplattformen.....	23
2.5.1.  Klinostaten – Simulation von Schwerelosigkeit.....	23
2.5.2.  Parabelflug .....	27
2.5.2.1.  Parabelflug Manöver .....	27
2.5.2.2.  Sequenz der Parabeln .....	28
2.5.3.  Internationale Raumstation (ISS).....	29
2.6.  Die Auswirkung von Schwerelosigkeit auf das Immunsystem.....	31
2.7.  Das Projekt TRIPLE-LUX .....	33
2.8.  Aufgabenstellung.....	37
<b>3 Grundlagen Klinostatenkonstruktion</b> .....	<b>39</b>
3.1.  Lumineszenz .....	39
3.2.  Messung der Lichtsignale.....	42
<b>4 Definieren der Aufgabenstellung - Klinostatenkonstruktion</b> .....	<b>43</b>
4.1.  Aufgabe A - Klinostatenkonstruktion .....	43
4.2.  Anforderungslisten .....	44
4.2.1.  Anforderungsprofil Klinostatenkonstruktion .....	45
4.2.2.  Anforderungsprofil Heizbox .....	46
4.2.3.  Anforderungsprofil Parabelflug .....	46
<b>5 Konzeptionsphase</b> .....	<b>48</b>
5.1.  Funktionsstruktur.....	48
5.2.  Morphologischer Kasten.....	50
5.3.  Bewertung der Wirkstrukturen .....	53
<b>6 Design</b> .....	<b>54</b>
6.1.  Schematisches Design.....	54
6.2.  Detailliertes Design der Hauptkomponenten .....	55
6.2.1.  Klinostat.....	55

---

6.2.2.	Heizbox.....	60
6.2.3.	Parabelflugrack.....	63
<b>7</b>	<b>Evaluierung.....</b>	<b>66</b>
7.1.	Evaluierung des Anforderungslisten (Aufgabe A-C).....	66
7.2.	Signalmessung (Aufgabe A).....	68
7.3.	Funktionalität der Heizbox (Aufgabe B).....	72
<b>8</b>	<b>Kalibrierung der Photomultiplier im Science Model.....</b>	<b>75</b>
8.1.	Grundlagen .....	75
8.1.1.	Äußerer Photoeffekt .....	75
8.1.2.	Photomultiplier Prinzip.....	76
8.2.	Photomultiplier Charakteristiken.....	76
8.2.1.	Photonenmessung.....	76
8.2.2.	Gain .....	77
8.2.3.	Quantenausbeute .....	78
8.2.4.	Dunkelstrom .....	78
8.2.5.	Schock und Vibration.....	80
8.2.6.	Magnetische Felder .....	80
8.3.	Photomultiplier im Sience Model .....	81
8.4.	Photomultiplier im Klinostaten .....	81
8.5.	Problemdarstellung .....	82
8.6.	Definieren der Aufgabenstellung – Kalibrierung der Photomultiplier .....	83
8.7.	Kalibrierung .....	84
8.7.1.	Dunkelstrom .....	84
8.7.2.	Signalmessung.....	85
8.7.3.	Gain .....	88
8.7.4.	Chemikalientest.....	90
8.7.5.	Externe LEDs .....	91
8.7.6.	Hysterese des Systems.....	93
8.7.7.	Magnetrührer .....	95
8.8.	Evaluierung der Kalibrierung (Aufgabe D) und Ausblick.....	97
<b>9</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>100</b>
9.1.	Chemikalien .....	100
9.2.	Verbrauchsmaterialien .....	101
9.3.	Geräte .....	102

---

9.4.	Puffer und Lösungen .....	103
9.5.	Zellkultur von permanenten Makrophagen .....	105
9.5.1.	Makrophagen-Zelllinie NR8383 .....	105
9.5.2.	Anpassung der Zellzahl vor dem Test .....	105
9.5.3.	Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	106
9.6.	Phagozytose-Assay .....	107
9.7.	Bioassays zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies .....	108
9.7.1.	Luminol-Assay .....	108
9.7.2.	NBT Assay .....	109
9.8.	Einfluss der Gravitation .....	111
9.8.1.	Klinorotation .....	111
9.8.1.1.	PMT Klinostat .....	111
9.8.1.2.	Pipettenklinostat .....	112
9.8.1.3.	Parabelflugexperimente .....	113
9.8.2.	Zentrifugen .....	114
9.8.2.1.	MuSIC (Multi-Sample Incubation Centrifuge) .....	114
9.8.2.2.	SAHC (Short Arm Human Centrifuge) .....	114
9.9.	Statistik und Auswertung .....	116
<b>10</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>117</b>
10.1.	Messung des oxidativen Bursts .....	117
10.1.1.	Kontrollen .....	117
10.1.1.1.	Mechanische Kontrollen .....	117
10.1.1.2.	Vibrationstest .....	117
10.1.1.3.	Schütteltest .....	118
10.1.1.4.	Quenching Kontrolle .....	119
10.1.2.	Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit .....	121
10.1.2.1.	Kinetik 1 g .....	121
10.1.2.2.	Kinetik 60 UpM .....	121
10.1.2.3.	Nicht aktivierte Zellen 60 UpM .....	122
10.1.2.4.	Kinetik 30 UpM .....	123
10.1.2.5.	Kinetik 2 UpM .....	125
10.1.2.6.	NBT Assay .....	129
10.1.3.	Profile .....	131
10.1.3.1.	60 UpM (20min) – 1 g (60Stop) .....	131

---

10.1.3.2.	1 g (20min) – 60 UpM (Stop60) .....	132
10.1.3.3.	PF Profil.....	133
10.1.3.4.	Zentrifugation (Hyper-g) bei 1.8 g auf der SAHC.....	134
10.1.3.5.	Parabelflug .....	139
10.2.	Messung der Phagozytose .....	142
10.3.	Evaluierung der biologischen Verifizierung (Aufgabe E).....	143
<b>11</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>144</b>
11.1.	Technische Voraussetzungen.....	144
11.2.	Wahrnehmung der Schwerkraft .....	144
11.2.1.	Kontrollversuche .....	145
11.2.2.	Modelle zur zellulären Schwerkraftwahrnehmung .....	148
11.2.3.	Die Rolle des Zytoskeletts .....	148
11.2.4.	Mögliche Rezeptoren: Ionenkanäle .....	150
11.3.	Verwendete Assays .....	151
11.4.	Änderung des Schwerkrafteinflusses.....	152
11.4.1.	Klinorotation.....	152
11.4.1.1.	Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit .....	152
11.4.1.2.	Profile .....	153
11.4.2.	Parabelflug .....	154
11.4.3.	Zentrifuge .....	155
11.5.	Klinorotation als Simulationsmethode.....	156
11.6.	Immunsystem in Schwerelosigkeit.....	157
11.7.	Fazit.....	158
<b>12</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>160</b>
<b>13</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>169</b>
<b>14</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>176</b>
	<b>Eigene Veröffentlichungen und Posterbeiträge.....</b>	<b>208</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>209</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>210</b>
	<b>Schriftliche Erklärung .....</b>	<b>211</b>

## Abkürzungen

$\mu g$	Mikrogravitation
1O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
a	Beschleunigung [m/s <sup>2</sup> ]
A	Auftrieb
ACP 5080R (AlMg4, 5Mn)	Aluminium
AL Mg Si 0.5	Aluminium Legierung
Al	Aluminium
ALMG3	Aluminium mit 3% Magnesium
Amp	Verstärker
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AUC	<i>Area under curve</i>
C	Kondensator
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD16	Oberflächenrezeptor von Makrophagen
CD64	Oberflächenrezeptor von Makrophagen
c-fos	Transkriptionsfaktor
c-jun	Transkriptionsfaktor
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CR	<i>Complement receptor</i>
CuZn	Messing
D	Diode
DAPI 4',6	Diamidino-2-phenylindol
DC	Dunkelstrom
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E	Energie [J]

EADS	<i>European Aeronautic Defence and Space Company</i>
ECSS-M-30A	<i>European Cooperation for Space Standardization</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EN	Europäischen Norm
ESA	<i>European Space Agency</i>
EtOH	Ethanol
f	Frequenz [Hz]
FA	Formaldehyd bzw. <i>focal adhesion</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	Zentrifugalkraft [N]
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
Fcγ-R	Antikörper-Rezeptor
FD	Flugtag
Fe	Eisen
FITC	Fluorescein
FM	Flight Model
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m·s <sup>-2</sup> )
G	Gewichtskraft
GD-Zn	Gadolinium-Zink
GM	Ground Model
GM-CSF	<i>Granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>
gp91	NADPH-Oxidase-Untereinheit
h	Plancksches Wirkungsquantum [Js]/ Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Ham's F12	Zellkulturmedium
hg	hypergravitation
HOCl	Hypochlorsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
hνA	Energie des Photons durch Absorption
hνF	Energie des Photons durch Fluoreszenz
hνP	Energie des Photons durch Phosphoreszenz

IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgD	Immunglobulin D
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IN	Industriefilz
ISO	Internationale Organisation für Normung
ISS	<i>International Space Station</i>
k	Boltzmann-Konstante
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kalilauge
Komp	Komparator
lag	“Verzögerung”
LED	Leuchtdiode
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Lipoteichonsäure
m	Masse [kg]
M	molar/ metrische ISO-Gewinde
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
Mir	russische Raumstation
ml	Milliliter
mM	millimolar
MuSIC	<i>Multi-Sample Incubation Centrifuge</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Wiederholungen
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
nM	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O $\cdot$ <sup>2-</sup>	Superoxidanion

OCI <sup>-</sup>	hypohalogenige Säure
OH ·	Hydroxylradikal
ONOO·	Peroxynitrit
P	Punkte/Potentiometer
p22phox	NADPH-Oxidase-Untereinheit
p40phox	NADPH-Oxidase-Untereinheit
p47phox	NADPH-Oxidase-Untereinheit
p67phox	NADPH-Oxidase-Untereinheit
PA-Gf	Polyamid- Glasfasern
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEI	Polyethylenimine
PF	Parabelflug
pH	Maß für Säuregrad
PI	Phagozytoseindex
PKC	Proteinkinase C
PMT	<i>Photomultiplier tube</i>
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PVC-U	Polyvinylchlorid, hart
r	Radius [m]
R	Widerstand
Rac	NADPH-Oxidase-Untereinheit, G-Protein
RAL	Deutsches Institut für Gütesicherung und Kennzeichnung
Ras	Proto-Oncogen, G-Protein
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
RLU	<i>Relative luminescence unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPM	<i>Random positioning machine</i>
s	Sekunden
S0	Singulet 0
S1	Singulet 1

S2	Singulet 2
S235JR	Baustahl
SAHC	Short arm human centrifuge
SBR	Styrol-Butadien-Kautschuk
SCN <sup>-</sup>	Thiocyanat
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SM	Science Model
SOD	Superoxiddismutase
Src	Mitglied der Familie der proto-onkogenen Kinasen
T	Periodendauer [s]
T	<i>time</i>
T1	Triplet 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UpM	Umdrehungen pro Minute
v	Rotationsgeschwindigkeit [1/s]
Var	Variante
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
W	Wertigkeit
X10CrNi18-8	Edelstahl
X5CrNi18-10	Edelstahl
ZNS	zentrales Nervensystem
$\alpha$	Signifikanzniveau
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	mikromolar
$\pi$	Kreiszahl (~3,1415)

# 1 Zusammenfassung

Die Bedingungen im Weltraum haben unterschiedliche Effekte, sowohl auf einzelne Zellen als auch auf den ganzen Organismus. Neben Dekonditionierungserscheinungen auf Muskel und Knochen von Astronauten wurden zudem auch negative Auswirkungen auf das Immunsystem festgestellt. Mehrere Untersuchungen zeigen einen Einfluss der Schwerkraft auf die Funktionsweise von Zellen des Immunsystems, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch unklar sind. Die vorliegende Arbeit diente der Vorbereitung des Weltraumexperiments TRIPLE LUX A, in dem der Einfluss von Schwerelosigkeit und Strahlung auf die angeborene Immunantwort untersucht wird. Dabei wurde die Fähigkeit der Radikalproduktion während des oxidativen Bursts in der Makrophagenzelllinie NR8383 untersucht. Diese Radikale, verschiedene reaktive Sauerstoffspezies (ROS), dienen der Zerstörung von, während der Phagozytose aufgenommenen, Fremdkörpern, wie Bakterien oder Viren. Dieser Vorgang ist ein entscheidender Teil der ersten Immunabwehr im Falle eines Angriffs des Körpers von außen.

Um am Boden kinetische Messungen, entsprechend der Messungen an Bord der ISS durchzuführen, wurde ein neues Messgerät benötigt.

Das Ziel der Dissertation war es, ein System zur Lumineszenzmessung zu entwickeln, basierend auf der Photomultiplier-Technik (PMT-Technik) der Flughardware, kombiniert mit einem Klinostaten zur Erzeugung „simulierter Schwerelosigkeit“. Weiterhin musste der konstruierte PMT-Klinostat für den Einsatz während eines Parabelfluges (Messung des Einflusses kurzzeitiger Mikrogravitation und Validierung der Bodensimulationen) und auf einer Zentrifuge technisch adaptiert werden.

Nach der technischen Validierung des PMT-Klinostaten wurden folgende Experimente durchgeführt mit:

1. Unterschiedlicher Klinorotationsgeschwindigkeiten (60 UpM, 30 UpM, 2 UpM)
2. Verschiedenen Klino-Rotationsprofilen
3. Zwei Parabelflugkampagnen
4. Hypergravitation auf der Zentrifuge

Es zeigte sich, dass die Radikalproduktion während des oxidativen Bursts durch Klinorotation signifikant und sofort reduziert wird. Dabei war das Ausmaß der

Reduktion von der Rotationsgeschwindigkeit abhängig. Während bei 60 UpM eine Signalreduktion um ca. 60 % im Vergleich zu 1 g erfolgte, waren bei 2 bzw. 30 UpM nur noch ca. 5 % der Lumineszenz im Vergleich zu 1 g zu messen. Kurzzeitige Klinorotation (60 UpM), wie auch die kurzzeitige reale Mikrogravitation im Parabelflug, führten zu einer Reduktion des Signals in vergleichbarem Ausmaß. Diese war reversibel, sobald sich die Zellen wieder in gewohnter 1 g Umgebung befanden. Hypergravitation (1.8 g) auf der Zentrifuge und im Parabelflug, sowie mechanische Reizung durch starkes Schütteln führten zu einer Erhöhung des Signals und damit der Radikalproduktion. Die Ergebnisse zeigen, dass Makrophagen direkt und ohne Zeitverzögerung auf veränderte Schwerkraftbedingungen reagieren. Weiterhin konnten die Funktionalität des konstruierten PMT Klinostaten sowie schnelle Klinorotation als geeignete Simulationsmethode für Schwerelosigkeitsbedingungen unter den gewählten Versuchsparametern nachgewiesen werden. Damit sind die Bodenreferenzexperimente abgeschlossen, der Einfluss kurzzeitiger realer und simulierter Schwerelosigkeit auf Makrophagen bekannt und das Weltraumexperiment TRIPLE LUX zur Durchführung auf der ISS flugbereit.

## 2 Einleitung

### 2.1. Schwerkraft

Schwerkraft ist die Kraft, die auf einen Körper im Schwerfeld wirkt. Die Schwerkraft auf der Erde wird Erdanziehungskraft genannt.

Sie setzt sich zusammen aus der Anziehungskraft, bedingt durch die Gravitation, abzüglich der Zentrifugalkraft, bewirkt durch die Rotation eines Körpers.

Die Gravitation ist eine der vier Grundkräfte der Physik.

Das Gravitationsgesetz nach Newton besagt, dass sich die Gravitationskraft  $F_G(R)$  mit der sich zwei Massenpunkte  $m$  und  $M$  anziehen proportional zum Quadrat ihres Abstandes  $r$  verhält (Formel 1).

$$F_G = -G \frac{m_1 m_2}{r^2} \quad \text{Formel 1}$$

mit  $F$  [N] als Kraft zwischen den Massepunkten,  $m_1$  [kg] als Masse des ersten Massepunktes,  $m_2$  [kg] die Masse des zweiten Massepunktes,  $r$  [m] der Abstand zwischen den Massepunkten und  $G$  [ $\text{Nm}^2/\text{kg}^2$ ] als Gravitationskonstante.

Das negative Vorzeichen der Kraft verdeutlicht, dass diese immer anziehend wirkt.

Die Gravitationskonstante ist eine Naturkonstante mit dem Wert:

$$G = 6,674 \cdot 10^{-11} \frac{\text{Nm}^2}{\text{kg}^2}$$

Die Gravitation ist die schwächste der vier physikalischen Wechselwirkungen. Allerdings ist sie immer anziehend und, nach heutigem Wissen, nicht abschirmbar. Sie ist daher die einzige Kraft, die ungehindert über große Entfernungen wirken kann. So ist die schwache Gravitation die wichtigste Kraft zur Erklärung von Vorgängen im Weltall (Meschede 2004, Paul und Mosca 2007)<sup>1</sup>.

### 2.2. Schwerkraftwahrnehmung

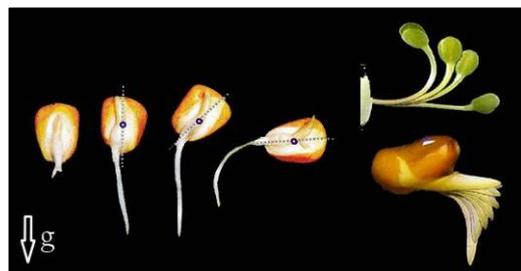
Die Schwerkraft ist einer der wenigen konstanten Faktoren in unserer Umwelt. Wir wissen, dass sie zu jeder Zeit und an jedem Ort gleich bleibend wirkt. Im Gegensatz zu anderen Umwelteinflüssen wie Licht, Temperatur und der Verfügbarkeit von

---

<sup>1</sup> Zur Erleichterung des Verständnisses der wissenschaftlichen Einleitung und der Diskussion wurde für diese Arbeit die für biologische Arbeiten übliche Zitiertechnik gewählt.

Wasser betrug die Schwerkraft während der gesamten Erdgeschichte konstant  $1\text{ g}$ , oder  $9,80665\text{m/s}^2$ .

Schwerkraft ist die Kraft, die uns davon abhält frei zu schweben und die unsere Atmosphäre auf dem Planeten hält. Schwerkraft ist aber auch die Kraft, die sicherstellt, dass Wurzeln nach unten in den Boden zu Wasser und Nährstoffen wachsen und Sprosse nach oben zum Licht. Sie stellt sicher, dass Fische geradeaus schwimmen können und Einzeller sich nach oben oder unten in optimale Lebensbereiche orientieren können, auch wenn andere Reizquellen wie Licht oder Nahrung nicht vorhanden sind (Häder *et al.* 2005).



**Abb. 1: Gravotropismus an Maiskoleoptilen**

Der Mechanismus, bei dem sich festsitzende Organismen nach dem Schwerevektor ausrichten wird Gravotropismus genannt, die räumliche Orientierung von freibeweglichen Organismen wird als Gravitaxis bezeichnet.

Charles Darwin war 1880 mit seinem berühmten Wurzelkappen-Experiment einer der ersten Menschen, die sich mit Gravotropismus beschäftigten (Darwin, 1981). Er fand heraus, dass sich Pflanzen entlang der Erdanziehung ausrichten (Abb. 1). Auch wenn die Wurzel umgedreht wird, wächst sie nach einiger Zeit immer zum Erdmittelpunkt hin (positiver Gravotropismus) und der Spross nach oben vom Erdmittelpunkt weg (negativer Gravotropismus).

Seitdem beschäftigt Wissenschaftler die Frage, welchen Einfluss die Schwerkraft auf Organismen haben kann.

Um auf einen äußeren Reiz – in diesem Fall den der Schwerkraft - zu reagieren besteht der erste Schritt in der Wahrnehmung (Perzeption) dieses Reizes. Dazu bildet ein Organismus in der Regel spezielle Sensoren (so genannte Rezeptoren) aus, so z. B. für Licht, Temperatur oder mechanische Stimuli. Es liegt daher nahe, dass auch Rezeptoren zur Schwerkraftwahrnehmung existieren.

Nach Björkman (1992) müssen für Gravirezeptoren folgende Grundprinzipien gelten:

- Gravitation übt Kraft auf eine Masse aus.
- Damit ein Rezeptor durch ein Signal verändert wird, muss Arbeit aufgewandt werden.
- Um Arbeit zu verrichten, muss Masse bewegt werden.
- Das stimulierende Signal muss vom Hintergrund unterscheidbar sein.

Mit der vorliegenden Dissertation soll ein Beitrag zur Klärung der Schwerkraftwahrnehmung in Zellen geleistet werden. Im folgenden Abschnitt werden bereits identifizierte Mechanismen näher erläutert:

Das in der Natur generell verwendete Prinzip der Schwerkraftwahrnehmung ist die Bewegung einer Masse, die an ein sensibles System gekoppelt ist.

Im Vestibularsystem im menschlichen Ohr werden die Bewegungen von Statolithen (Kalzium Kristalle), die an Haarzellen fixiert sind, benutzt, um die aktuelle Lage des Kopfes zu ermitteln (Gerzer *et al.* 2006).

In höheren Pflanzen ist nach der Stärke-Statolithen Theorie von Némec und Haberland (1990) die Verlagerung von Amyloplasten (Stärkeköerner) der erste Schritt zur Schwerkraftwahrnehmung. Diese stärkehaltigen, „schweren“ Körper sind in spezialisierten Zellen der Wurzel (Columnella) und des Sprosses (Endothermalgewebe) lokalisiert. Die Positionsänderung der Statolithen bewirkt letztlich ein asymmetrisches Wachstum an der Längsseite der Wurzel/des Sprosses und dadurch eine Krümmung der ganzen Pflanze (Kiss *et al.* 1989; Kuznetsov und Hasenstein, 1996).

Die Rezeptoren, die das Signal der Statolithen aufnehmen und weitergeben, sind jedoch weitgehend noch nicht bekannt. Als Komponenten der Signalweiterleitung werden das Aktin-Myosin Skelett (Braun 2002b) beschrieben sowie Ionenkanäle (Björkman und Cleland 1991, Sinclair und Trewavas 1997) und das Phytohormon Auxin (Ottenschläger *et al.* 2003).

Allerdings sind zur Schwerkraftwahrnehmung nicht zwangsläufig Statolithen notwendig. Ebenso können Zellorganelle, wie zum Beispiel der Nukleus, zur Perzeption verwendet werden (Hock und Häder 2006).

Bei Einzellern, wie zum Beispiel Paramecium, wird anstelle von Organellen der Dichteunterschied zwischen Zelle und Medium ( $1,04 \text{ g/cm}^3$  zu etwa  $1,00$ ) zur Graviperzeption genutzt. Die Sedimentation der Zellmasse (Zytoplasma) auf die Zellmembran stimuliert darin befindliche mechanosensitive Ionenkanäle. Darauf hin ändert sich das Membranpotential, welches wiederum den Cilienschlag in Bezug auf Richtung und Frequenz reguliert, und korrigiert damit die Orientierung des Einzellers im Raum (Hemmersbach *et al.* 2001).

Es stellt sich deshalb die Frage nach einem grundsätzlichen Mechanismus der Schwerkraftwahrnehmung in Zellen eines Organismus. So wird für Osteoblasten die Möglichkeit zur Schwerkraftwahrnehmung diskutiert (Hughes-Fulford und Lewis 1996). Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht erforscht.

Eine Modellvorstellung, das so genannte „*tensegrity model*“, nennt das Zytoskelett als Schlüsselfaktor für die Perzeption (Ingber 1999). Druck und Spannung wirken als Signal auf transmembrane Adhensionskomplexe, wie Integrin-Cluster (*focal adhesions*), Cadherine und Selektine. Diese stellen Bindeglieder zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix dar und geben die auftretenden Kräfte am Zytoskelett ins Innere der Zelle weiter. Diese Signale können verschiedenste Signalwege und damit multiple Reaktionen der Zelle auslösen.

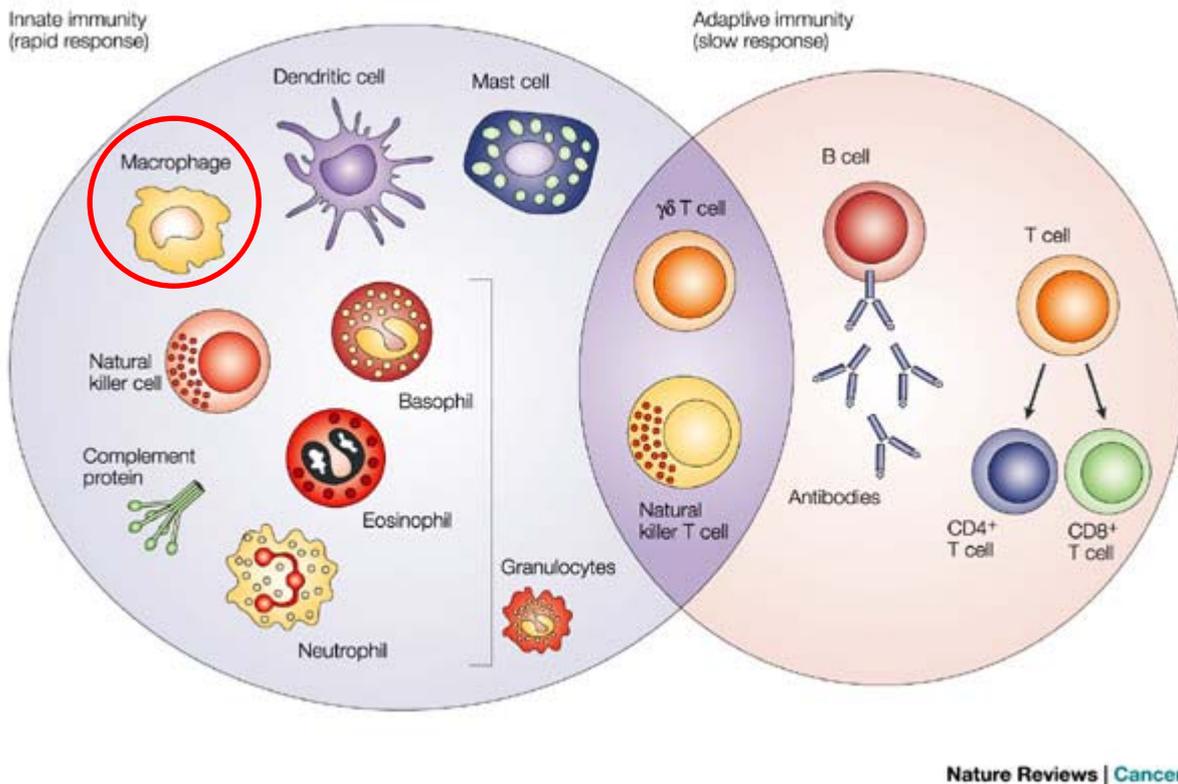
Die vorliegende Arbeit behandelt den Einfluss von Schwerkraft auf spezialisierte Zellen des Immunsystems, die Makrophagen, eine Art von Phagozyten (Fresszellen). Die im Rahmen der Arbeit untersuchten Immunreaktionen dieser Zellen werden in den folgenden Kapiteln kurz beschrieben.

### **2.3. Phagozytose**

Ein Organismus verfügt über zahlreiche Mechanismen, um Angriffe von außen durch Viren, Bakterien oder Pilze abzuwehren. Die Hauptaufgabe dabei übernimmt das Immunsystem.

Dieses gliedert sich in die angeborene Immunantwort und die anpassungsfähigere adaptive oder erworbene Immunantwort.

Humorale Bestandteile, wie Antikörper und Komplementfaktoren, und zelluläre Systeme, wie T-Zellen, B-Zellen und Phagozyten, arbeiten dabei zusammen (Abb. 2).



### Abb. 2: Zellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort

Die angeborene Immunantwort bildet die erste Verteidigungslinie gegen eine Infektion. Sie besteht aus löslichen Faktoren, wie Komplement-Faktoren und verschiedene zelluläre Komponenten, einschließlich der Granulozyten (Basophilen, Eosinophilen und Neutrophilen), Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen. Die adaptive Immunantwort ist langsamer aber zeigt eine erhöhte Antigen-Spezifität und eine Gedächtnisfunktion. Sie besteht aus Antikörpern, B-Zellen und CD4 + und CD8 + T-Lymphozyten. Natürliche Killerzellen T-Zellen und zytotoxische T-Zellen sind die Schnittstelle von angeborener und adaptiver Immunität (Drandorf 2004).

Eine der wichtigsten Abwehrmechanismen der angeborenen Immunabwehr bei Vertebraten ist das Erkennen und gezielte Vernichten von eingedrungenen Pathogenen. Dieser Prozess wird Phagozytose genannt (Janeway *et al.* 2005).

Voraussetzung dafür ist die Bindung des Fremdkörpers an die Zelloberfläche. Dabei erkennen die Phagozyten meist hoch konservierte, pathogen-assoziierte Strukturmerkmale (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) an Oberflächenstrukturen des Pathogens. Dies kann über den Kontakt von antigenspezifischen Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erreicht werden.

Beispiele für Rezeptoren sind der Mannose-Rezeptor welcher spezifisch Kohlenhydrate mit einem, für Mikroorganismen typischen, hohen Mannoseanteil bindet. (Fraser *et al.* 1998). Bakterielle Zellwandkomponenten wie

Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteichonsäuren (LTS) werden durch den Makrophagen-Scavenger-Rezeptor (CD14) erkannt (Husemann *et al.* 2002).

CR3 (*complement receptor 3*) bindet unter anderem  $\beta$ -Glucan-Strukturen an Zymosan, ein Polysaccharid der Hefezellwand (Ross *et al.* 1985).

Eine weitere Möglichkeit der Bindung geschieht über die Opsonierung von Fremdorganismen mittels der Immunglobuline IgG und IgD, an deren Fc-Segmente Monozyten mit Hilfe von Fc-Segment-Rezeptoren wie CD64 und CD16 binden.

Nach Erkennung eines Fremdkörpers wird dieser mit Pseudopodien eingeschlossen und durch Einstülpung der Zellmembran in das Phagosom, einem intrazellulären Vesikel, aufgenommen (Abb. 3).

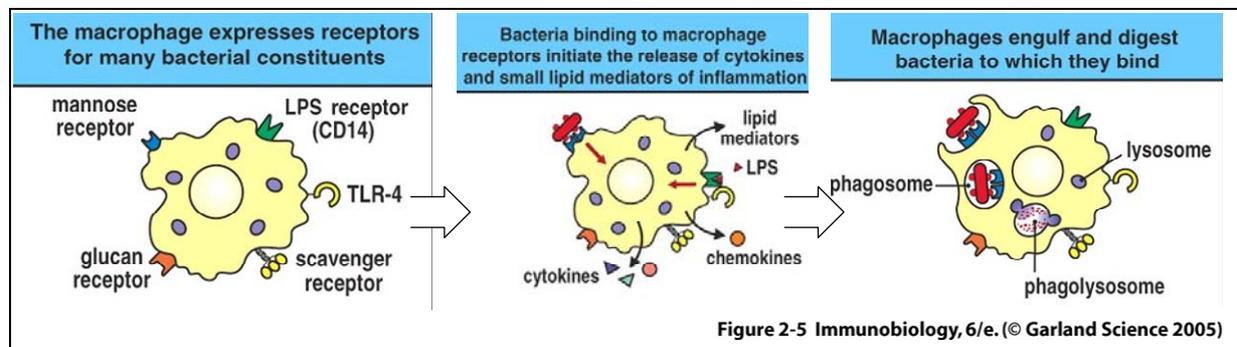


Figure 2-5 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abb. 3: Schema der Phagozytose. Eindringlinge werden an spezifischen Rezeptoren erkannt und aufgenommen. Anschließend wird der Partikel intrazellulär abgebaut (Janeway *et al.* 2005) Das Phagosom fusioniert mit Lysosomen aus dem Golgiapparat zu Phagolysosomen, in denen der Abbau der aufgenommenen Partikel stattfindet (Janeway *et al.* 2005).

Der Abbau kann über zwei Wege geschehen, einerseits *sauerstoffunabhängig* mit Hilfe bakterizider Agenzien (z. B. Lysozym, Lactoferrin, Cathepsin, Defensine) oder pH-Wert-Änderungen und andererseits *sauerstoffabhängig* durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff- Verbindungen (*reactive oxygen species* ROS, *reactive nitrogen species* RNS), den sogenannten **oxidativen Bursts**.

Während der Zerstörung des Fremdkörpers in den Phagolysosomen binden Proteinstücke des Pathogens an intrazelluläre MHC-Klasse-2 Moleküle. Dieser Komplex wird dann an der äußeren Zellmembran anderen Zellen wie T-Lymphozyten oder auch den B-Lymphozyten präsentiert (Janeway *et al.* 2005).

## 2.4. Oxidativer Burst

Der Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) ist ein häufig in der Biologie und Medizin benutzter Sammelbegriff und umfasst verschiedene **radikalische** und **nicht-radikalische** Sauerstoffabkömmlinge (Wiseman und Halliwell 1996).

Siehe Tabelle 1.

**Tabelle 1: Beispiele reaktiver Sauerstoffspezies**

Radikalische O <sub>2</sub> Verbindungen	nicht-radikalische O <sub>2</sub> Verbindungen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (Superoxidationenradikal)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)
OH (Hydroxylradikal)	O <sub>3</sub> (Ozon)
RO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (Peroxyradikal)	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> (Singulett-Sauerstoff)
RO <sup>-</sup> (Alkoxyradikal)	HOCl (hypochlorige Säure)
	ONOO <sup>-</sup> (Peroxynitrit)

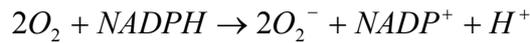
Phagozyten stellen ein breites Spektrum an reaktivem Sauerstoff her, entweder durch Zuhilfenahme von Enzymen oder enzymunabhängig (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Radikale des oxidativen Burst**

enzymabhängige Radikale des ox. Burst	enzymunabhängige Radikale des ox. Burst
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	•OH
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
NO	ONOO <sup>-</sup>
HOCL	Taurin-Chloraminsäure

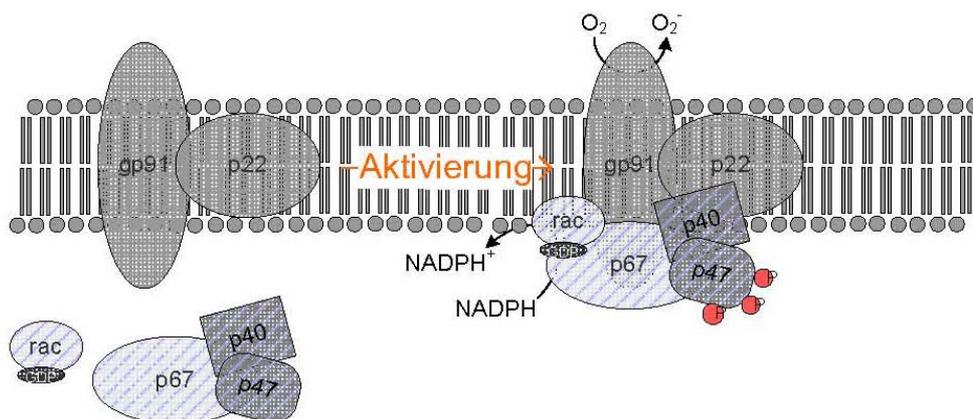
Die enzymabhängigen Radikale werden von vier Enzymen hergestellt: NADPH Oxidase, Superoxid-Dismutase, Stickstoffmonoxid-Synthase und Myeloperoxidase (Halliwell und Gutteridge 1999; Babior 2000).

Das wichtigste Enzym, die **NADPH Oxidase**, produziert O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Dieser ist Ausgangsmaterial für verschiedene weitere Reaktionen, die in oxidierten Halogenoinden, freien Radikalen und Singulett-sauerstoff resultieren.



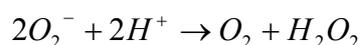
Die NADPH Oxidase ist ein membrangebundenes Enzym aus sechs Untereinheiten. Zwei davon, gp91 und p22, sind in der Membran verankert und vier, Rac(Gtpase), p40, p47 und p67, werden bei Aktivierung aus dem Zytosol rekrutiert (Decoursey und Ligeti 2005). Abb. 4. zeigt ein vereinfachtes Schema des Enzyms.

Die Aktivierung führt zur Phosphorylierung von p47. Dadurch wandern die zytosolischen Untereinheiten zur Membran und binden an Cytochrom b, wodurch das Enzym zusammengesetzt wird (Babior 1999). Die Untereinheiten fungieren als Elektronentransportkette und transferieren ein Elektron vom Donor NADPH zu einem Molekül Sauerstoff. Dabei entsteht ein Superoxidanion. Durch sekundäre Prozesse wird dieses in die reaktiven Sauerstoffradikale  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  und  $HOCl$  (letzteres durch die Myeloperoxidase) umgewandelt.

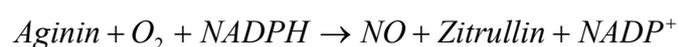


**Abb. 4: Schema der NADPH Oxidase** (nach Dusting *et al.* 2005). Nach der durch die Aktivierung hervorgerufenen Phosphorylierung wandern zytosolische Untereinheiten zur Membran und binden an zwei membrangebundene Untereinheiten, wodurch das Enzym zusammengesetzt wird.

Die **Superoxid-Dismutase** katalysiert die Reaktion von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (Fridovich 1995) :



Die **Stickstoffmonoxid-Synthase** stellt Stickstoffmonoxid (NO) aus Arginin, Sauerstoff und NADPH her (Marletta 1994). NO ist ein Beispiel für RNS.



Die **Myeloperoxidase** katalysiert die Oxidation von Halogeniden wie  $Cl^-$ ,  $Br^-$  und  $I^-$ , zu hypohalogeniden Säuren unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Hampton *et al.* 1998).

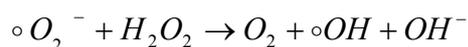
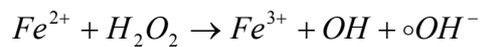
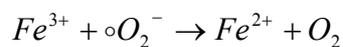


Das Enzym kann jede der drei aufgeführten Halogen-Ionen oxidieren, zusätzlich oxidiert es Thiocyanat ( $SCN^-$ ), ein Pseudohalogenid in der Speichelflüssigkeit. Auf Grund der hohen Konzentration von Chloridionen in Körperflüssigkeiten wird aber hauptsächlich  $OCl^-$  gebildet (Babior 2000).

Die genannten Enzymreaktionen produzieren vier Typen von Radikalen:  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO$ , und  $HOCl$ .

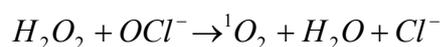
Weitere Produkte entstehen über nicht enzymatische Wege. Dabei spielen vor allem vier Reaktionen eine entscheidende Rolle:

In der **Haber Weiss Reaktion** entsteht ein Hydroxyl Radikal ( $OH$ ) aus Wasserstoffperoxid und Superoxid. Die Reaktion läuft sehr langsam ab, kann aber von Übergangsmetallen wie z. B.: Eisen katalysiert werden.

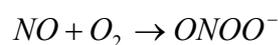


(Halliwell und Gutteridge 1999)

Wasserstoffperoxid reagiert mit Hypohalogenit, wodurch Singulett-Sauerstoff entsteht (Steinbeck *et al.* 1992):



Stickstoffmonoxid kann unter Anwesenheit von Superoxid zu Peroxynitrit reagieren. Dies findet in der Abwehr von Bakterien Anwendung (Pryor und Squadrito 1995).



Schwefelhaltige Amine wie Taurin reagieren mit hypochloriger Säure zu ebenfalls antibakteriell wirkender Chloraminsäure (Elstner 1990).

*HOCl + Taurin → Taurin - Chlorminsäure*

Bei den erwähnten Reaktionen entstehen die Radikale  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  und Amine wie Taurin-Chloraminsäure.

Die im oxidativen Burst entstandenen Radikale übernehmen mehrere Aufgaben. Sie dienen einerseits der Desintegration phagozytierter Partikel, andererseits aber auch der Zerstörung körpereigener Zellen, die apoptotisch, nekrotisch oder entartet sind. Die durch die Desintegration der Partikel entstehenden Peptide werden von MHC Klasse II-Molekülen gebunden und an der Oberfläche des Makrophagen präsentiert. Die Makrophagen können nun auch als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und weitere Zellen rekrutieren (Janeway 2005).

ROS und deren Nebenprodukte können allerdings auch körpereigenes Gewebe schädigen, indem sie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide oftmals irreversibel oxidieren (Stadtman *et al.* 1997).

Oxidativer Stress wird mit der Pathogenese vieler Erkrankungen wie z. B. Morbus Alzheimer (Good *et al.* 1996; Smith *et al.* 1996), Bluthochdruck (Kumar *et al.* 1993), Atherosklerose (Steinbrecher *et al.* 1990; Witztum und Steinberg 1991), Diabetes mellitus (Kubisch *et al.* 1994), Morbus Parkinson (Adams 1991) und verschiedenen Krebsarten (Babbs 1990) assoziiert. Daher ist die übermäßige Produktion von Radikalen zu vermeiden und eine Kontrolle des oxidativen Burst für den Organismus essentiell.

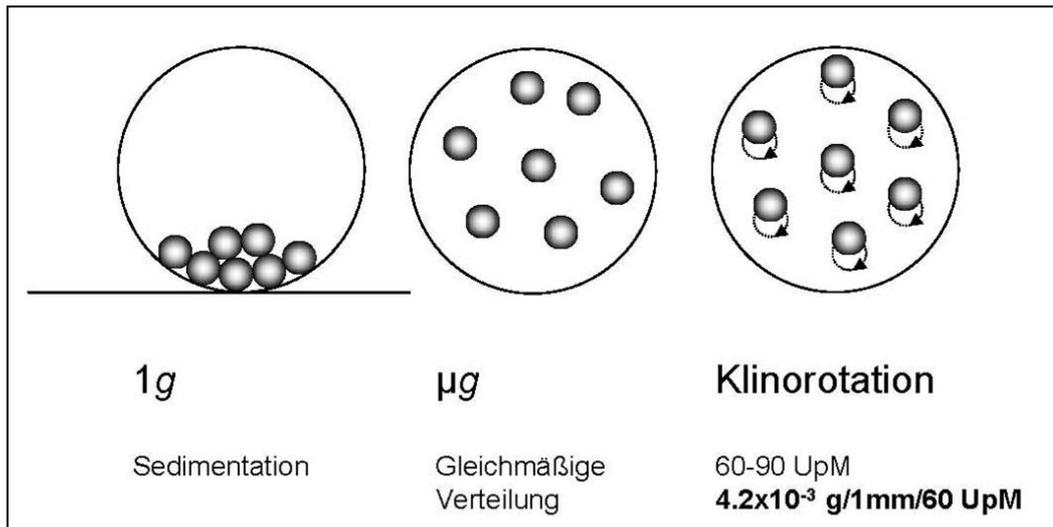
## **2.5. Forschungsplattformen**

Zur Untersuchung der Effekte hervorgerufen durch Mikrogravitationsbedingungen wurden folgende Forschungsplattformen verwendet:

### **2.5.1. Klinostaten – Simulation von Schwerelosigkeit**

Ein Gerät zur Erzeugung von Rotation mit konstantem Neigungswinkel senkrecht zum Schwerevektor wird Klinostat (= konstantes Neigen) genannt. Klinostaten werden seit Anfang des 18. Jahrhunderts dazu verwendet, Organismen in eine (konstante) horizontale Drehung zu versetzen und dadurch die Richtung des Schwerkraftvektors ständig zu verändern bzw. zu mitteln (Briegleb, 1992). Die Theorie besagt, dass der untersuchte Organismus durch die konstante Änderung des Schwerevektors diesen nicht mehr wahrnimmt bzw. dessen Richtung nicht mehr zuordnen kann und dadurch ähnlich reagiert wie bei einem Wegfall des Schwerevektors in realer Mikrogravitation (Briegleb, 1992). Klassische Klinostaten rotieren mit 1-3 UpM. Obwohl damit der Gravitropismus von Pflanzensystemen, die relativ langsam auf eine Änderung des  $g$ -Vektors reagieren, aufgehoben wird (Pfeffer 1897; Davenport 1908), zeigten spätere ultrastrukturelle Untersuchungen starke morphologische Veränderungen in den schwerkraftperzipierenden Zellen (Hensel 1982). Für schneller reagierende Systeme wurden Klinostaten mit Umdrehungsgeschwindigkeiten von 40-100 UpM entwickelt.

Das Prinzip der Wirkungsweise eines Klinostaten ist in Abb. 5 veranschaulicht. Durch die Mittlung des Gravitationsvektors wird ein Ausbleiben der Sedimentation ermöglicht, ähnlich der Situation in Schwerelosigkeit.



**Abb. 5: Klinorotation, Model**

Auf der Erde führt der Zustand von 1 g dazu, dass alle Partikel mit einer höheren Dichte als der des sie umgebenden Mediums sedimentieren. Ihre Position lässt sich aus dem Verhältnis ihrer Gewichtskraft (G) und ihres Auftriebes (A) ermitteln. In Schwerelosigkeit (µg), z. B. an Bord der Raumstation, folgen alle Partikel einer zufälligen Verteilung auf Grund der Brownschen Molekularbewegung. Wird das Bezugssystem in Rotation versetzt, vollführen die Partikel eine Kreisbewegung mit einem Radius proportional zu der Rotationsgeschwindigkeit und zu der Entfernung zur Rotationsachse (schnellere Rotation: kleinerer Radius), (Klinorotation).

Mit entsprechender Geschwindigkeit geht der Radius der Kreisbewegung gegen Null und die Partikel schweben somit auf der Stelle. Befindet sich das Teilchen nicht exakt auf der Rotationsachse, nimmt die wirkende Zentrifugalkraft proportional zum Quadrat der Geschwindigkeit zu:

$$F_Z = \frac{m \cdot v^2}{r}$$

**Formel 2**

Mit  $F_Z$  = Zentrifugalkraft [N],  $v$ = Rotationsgeschwindigkeit [m/s] und  $r$ = Entfernung zur Rotationsachse [m] und  $m$  = Masse [kg]

Die auftretende Kraft ist abhängig von der Entfernung zur Rotationsachse. Die resultierende Restbeschleunigung, maximal am Rand der Küvette, ergibt sich daher durch Formel 3:

$$a = \frac{v^2}{r} = \omega^2 \cdot r = (2\pi f)^2 \cdot r = \left(\frac{2\pi}{T}\right)^2 \cdot r$$

Formel 3

$$1g = 9.81 \cdot \frac{m}{s^2}$$

Mit  $a$  = Beschleunigung [m/s<sup>2</sup>],  $f$  = Frequenz [Hz],  $r$  = Entfernung zur Rotationsachse [m],  $T$  = Umlaufdauer [s] und  $\pi$  als Kreiszahl (~3,14159),  $g$  = mittlere Erdbeschleunigung [m/s<sup>2</sup>]

Folglich kann die Rotationsgeschwindigkeit nicht unbegrenzt erhöht werden. Zusätzlich sollte, wie aus Formel 2 ersichtlich, der Abstand zur Rotationsachse so klein wie möglich sein.

Durch genaues Abwägen von Radius und Rotationsgeschwindigkeit kann die resultierende Kraft aber sehr gering gehalten werden (Abb. 6).

Zusätzlich sollten, um Scherkräfte zu vermeiden, das Medium blasenfrei sein und die Messküvette rund.

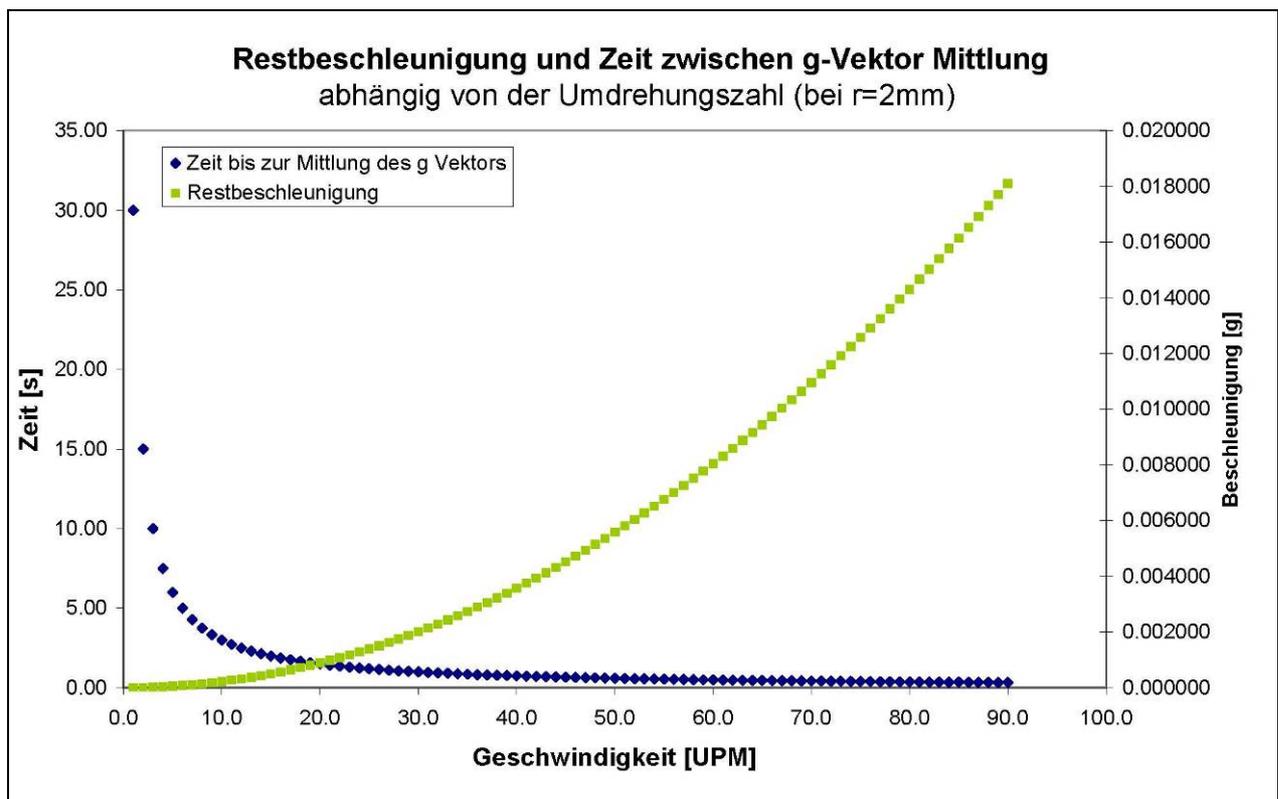
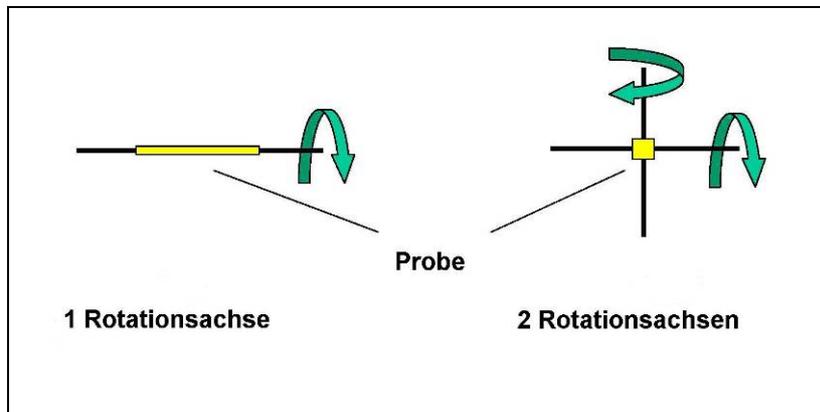


Abb. 6: Restbeschleunigung und Signaländerung in Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit: grün Restbeschleunigung, blau Zeit, in der das Objekt die Änderung des g-Vektors wahrnehmen kann

Abb. 6 zeigt die benötigte Zeit bis zur Mittlung des  $g$ -Vektors innerhalb einer Umdrehung (grün) abhängig von der Geschwindigkeit, mit der der Klinostat betrieben

wird. Liegt die Reaktionszeit des Organismus darüber, so registriert er die Änderung nicht, liegt sie darunter, so wird er permanent gestresst.



**Abb. 7: Vergleich zwischen Klinostaten mit einer Rotationsachse (links) und zwei Rotationsachsen (rechts)**

Je nach Anzahl der Rotationsachsen und dem Rotationsmodus gibt es heute verschiedene Klinostatentypen:

Neben Klinostaten mit nur einer Achse gibt es Klinostaten mit zwei Achsen (Abb. 7).

Des Weiteren ist eine Random positioning machine (RPM) im Handel erhältlich (Dutch Space, Leiden, Niederlande). Entsprechend zum einachsigen rotiert der zweiachsige Klinostat gleichzeitig um die X- und Y-Achsen. Dies soll eine bessere Simulation ermöglichen. Der Nachteil ist, dass durch die Rotation entstehende Scher- und Zugkräfte nicht mehr so einfach zu ermitteln sind wie im Klinostaten mit einer horizontalen Achse. Die RPM funktioniert ähnlich wie ein Klinostat mit zwei Achsen. Im Unterschied zu diesem rotiert sie aber nicht kontinuierlich um die Achsen sondern deckt die Oberfläche einer fiktiven Kugel nach einem Algorithmus zufällig ab (random) (van Loon 2007, Borst und van Loon 2008). Dabei kann es zu abrupten Wechseln in Richtung und Geschwindigkeit kommen, was zusätzliche Störfaktoren darstellen kann. Vergleichende Experimente sind geplant, aber nicht Inhalt der vorliegenden Arbeit.

## 2.5.2. Parabelflug

Kurze Phasen an Mikrogravitation werden während eines Parabelfluges erreicht. In dieser Arbeit konnte diese Möglichkeit zur Vorbereitung des Flugexperimentes genutzt werden.

Die Firma Novespace mit ihrem Sitz in Bordeaux, Frankreich, organisiert jedes Jahr mehrere Kampagnen mit den verschiedenen europäischen Raumfahrtagenturen. Für die Flüge wird ein umgebauter Airbus A300 verwendet (Abb. 8). Der Zustand der Mikrogravitation (Abb. 9) wird dabei in mehreren aufeinander folgenden Parabeln, normalerweise 31 an jedem der 3 oder, in Ausnahmefällen, 5 Flugtage, erreicht.



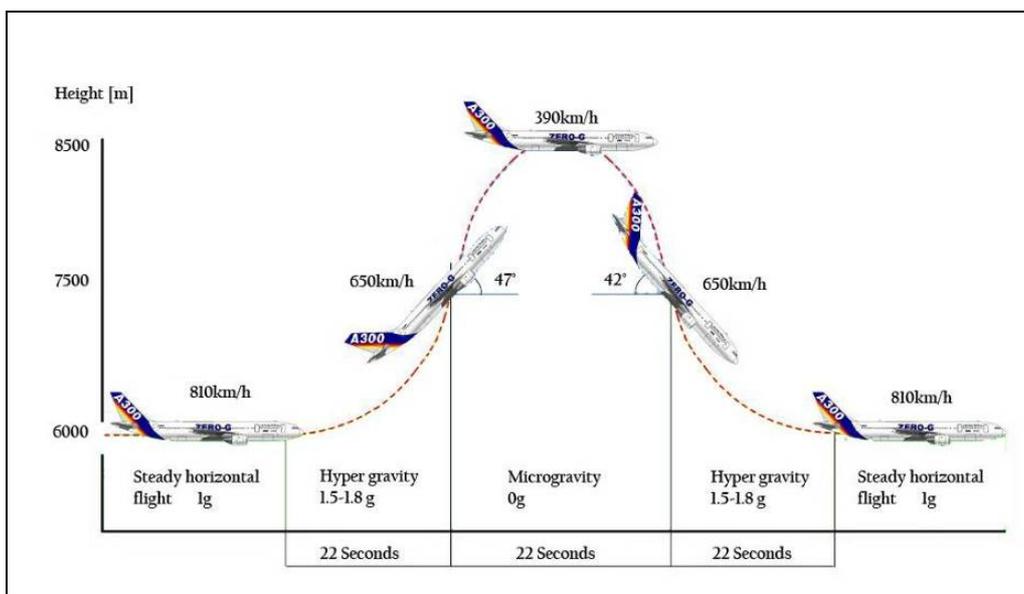
**Abb. 8: Parabelflugzeug A 300** ([http://www.helmholtz-berlin.de/media/media/oea/web/pm/2007/a300\\_zerog\\_blaue.jpg](http://www.helmholtz-berlin.de/media/media/oea/web/pm/2007/a300_zerog_blaue.jpg))

### 2.5.2.1. Parabelflug Manöver

Die Parabelflugkampagnen der Firma Novespace bieten für eine Dauer von zwei Flugstunden aufeinanderfolgend und im Wechsel Bedingungen von Hypergravitation (Hyper-g) und Mikrogravitation. Dabei fliegt das Flugzeug auf einer keplerschen Trajektorie, die einer Parabel ähnelt. Nach einem normalen horizontalen Flug beginnt das Flugzeug bei maximalem Schub in einem  $47^\circ$  Winkel von 6000 m auf 7500 m Höhe zu steigen (pull up). Die Beschleunigung steigt dabei für 22 s von 1 g auf ca. 1.8 g an. Anschließend werden die Motoren gedrosselt und fliegen nur noch gegen den Reibungswiderstand der Atmosphäre an, wodurch der Beginn des freien Falls

eingeleitet wird (injection). Die Drosselung der Triebwerke bewirkt ein Fortsetzen der Flugbahn des Flugzeuges auf einer idealen ballistischen Wurfparabel. Wie ein geworfener Stein im Vakuum befindet sich das Flugzeug im freien Fall. Die Beschleunigung aller mitfliegenden Personen und Geräte bezüglich des Bezugssystems Flugzeugkabine ist null. Dabei reduziert sich die Schwerkraft an Bord des Airbus auf  $10^{-2}g$ .

Das Flugzeug steigt noch weiter bis auf eine Flughöhe von 8500 m, von wo aus es dann in einem Winkel von  $42^\circ$  in den steilen Fall wechselt. Nach 22 s Mikrogravitation werden die Triebwerke wieder eingeschaltet (pull out) und damit, für 22 s, 1.8 g einleitet. Dadurch wird der Fall abgefangen und der horizontale Flug ca. 1 min nach dem Beginn der Parabel wieder hergestellt. Nach ungefähr 1 min Horizontalflug wird das Manöver wiederholt (Abb. 9).



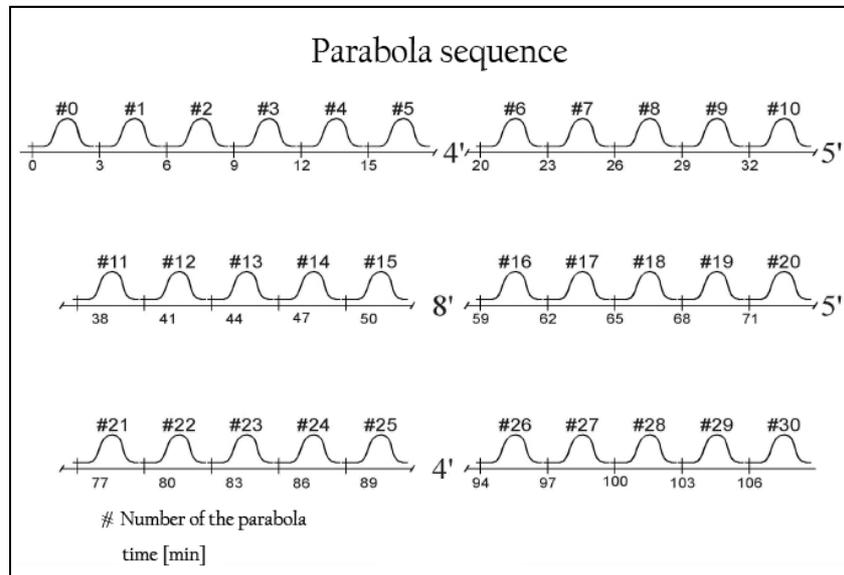
**Abb. 9: Parabelprofil des A 300 Zero-G**  
(Nach ESA European user guide to low gravity platforms, Ceglia 2005)

### 2.5.2.2. Sequenz der Parabeln

Eine Kampagne besteht normalerweise aus drei Flugtagen mit jeweils 31 aufeinander folgenden Parabeln. Nach einer ersten Parabel zur Eingewöhnung von Crew und Wissenschaftlern folgen jeweils 5 kontinuierlich geflogene Parabeln und anschließend eine kurze Pause.

Die erste und fünfte Pause dauern dabei 4 min, die zweite und vierte jeweils 5 min. Nach 16 Parabeln erfolgt eine Pause von 8 min (Abb. 10).

Mit einer Mikrogravitationszeit von 22 s pro Parabel resultieren daraus 12 Minuten Schwerelosigkeit pro Tag bzw. 36 Minuten pro Kampagne, zusammen mit 24 Minuten Hyper-g pro Tag bzw. 72 Minuten pro Kampagne.



**Abb. 10: Parabelsequenz** (Nach ESA European user guide to low gravity platforms, Ceglia 2005)

### 2.5.3. Internationale Raumstation (ISS)

Die Internationale Raumstation ISS (Abb. 11) ist in erster Linie ein Forschungslabor im Weltraum, das für Grundlagenwissenschaft, angewandte Forschung und Industrieforschung allen Disziplinen zur Verfügung steht.

Mikrogravitationsexperimente werden vor allem in den Labormodulen durchgeführt, in denen entsprechende Forschungseinrichtungen untergebracht sind. Auf den Außenplattformen stehen dagegen Anbringungsmöglichkeiten zur Erprobung neuer Technologien, zur Untersuchung von Strahlungseffekten und für Instrumente zur Beobachtung des Weltraums und der Erde zur Verfügung.



**Abb. 11: Die internationale Raumstation (ISS) mit dem Columbus Labor (Pfeil)**  
 (DLR: [http://www.dlr.de/iss/de/Portaldata/19/Resources/images/columbus/columbus\\_galerie/fly\\_around4\\_380.jpg](http://www.dlr.de/iss/de/Portaldata/19/Resources/images/columbus/columbus_galerie/fly_around4_380.jpg))

Das Raumlabor Columbus (Abb. 11) ist das europäische Forschungslabor für die internationale Raumstation. Biologische Experimente finden vor allem im Biolab Rack statt (Abb. 12), unter anderem auch das TRIPLE LUX Experiment. In speziellen Containern sollen die Rolle und der Einfluss der Gravitation auf verschiedene Ebenen des Lebens untersucht werden.



**Abb. 12: Das Biolab Modul.** Die TRIPLE LUX Experimente werden in speziellen Containern durchgeführt, wo die Daten während Zentrifugation (Referenz) oder unter Schwerelosigkeit erhoben und an die Erde geschickt werden. (ESA: [http://newsimg.bbc.co.uk/media/images/44392000/jpg/\\_44392205\\_biolab\\_esa\\_203.jpg](http://newsimg.bbc.co.uk/media/images/44392000/jpg/_44392205_biolab_esa_203.jpg))

Das folgende Kapitel fasst einige beobachtete Veränderungen bei Lymphozyten zusammen.

## 2.6. Die Auswirkung von Schwerelosigkeit auf das Immunsystem

Schwerelosigkeit hat einen starken Einfluss auf den menschlichen Körper. Schon nach kurzer Zeit zeigen Astronauten typische Anzeichen wie aufgedunsene Gesichter und dünne Beine durch die unterschiedliche Blutverteilung (Blomqvist *et al.* 1980). Eine Reduktion der Muskel und Knochenmasse durch die fehlende Belastung ist bekannt (Schneider *et al.* 1995). Zusätzlich werden Astronauten permanent auf Anzeichen von emotionalem oder physiologischem Stress untersucht.

Angesichts dessen liegt es nahe, dass auch das Immunsystem von Astronauten oder Vertebraten generell durch den Aufenthalt in Schwerelosigkeit beeinträchtigt ist (Konstantinova 1993, Criswell-Hudak 1991).

In Blutproben von Astronauten wurden erhöhte Konzentrationen der Stresshormone Catecholamin und Cortisol gefunden (Leach Huntoon *et al.* 1994; Mills *et al.* 2001), sowie eine daraus resultierende stark erhöhte Leukozytenzahl.

Abgesehen von den Effekten auf den ganzen Organismus konnten aber auch Veränderungen in Zellkulturen nachgewiesen werden:

Cogoli *et al.* (1984) zeigten in der Spacelab-1 und D-1 Mission, dass die Mitogen-Aktivierung von Lymphozyten in Schwerelosigkeit extrem gehemmt ist. Spätere Studien ergaben, dass zusätzlich die Apoptoserate erhöht ist (Lewis *et al.* 1998; Cubano und Lewis 2000). Sciola *et al.* (1999) konnten schließlich nachweisen, dass das Zytoskelett schon nach wenigen Sekunden in Mikrogravitation mit Strukturveränderungen reagiert. Während eines Experimentes auf der Höhenforschungsrakete Maxus konnten Strukturveränderungen an den Zytoskelettkomponenten Vimentin und Tubulin gezeigt werden (Lewis *et al.* 1998)

Weiterhin wurde eine verminderte Produktion von Zytokinen (IL-2, TNF- $\alpha$  und IL-2R) nachgewiesen (Cogoli 1993; Cogoli 1997; Cogoli und Cogoli-Greuter 1997).

Einige Untersuchungen zeigen verschiedenste Veränderungen in der Signaltransduktion von Lymphozyten. So beschreiben Limouse *et al.* (1991) und de Groot *et al.* (1990) eine Hemmung der Proteinkinase C sowie eine geminderte Expression von Onkogenen.

Talas *et al.* (1983) stellte fest, dass Lymphozyten auf der russischen Raumstation MIR nach Aktivierung fünf mal soviel Interferon  $\alpha$  produzierten als die zugehörigen Bodenkontrollen.

Bezüglich Phagozytose wurden bisher nur wenige Experimente in Mikrogravitation durchgeführt. Kaur *et al.* fand 2005 eine deutliche Reduktion der Phagozytoserate von *E. coli* und einen verminderten oxidativen Burst in Neutrophilen und in Monozyten (Kaur *et al.* 2005). Parabellugexperimente induzierten eine bis zu vierfache Erhöhung der Radikalproduktion von Superoxidanionen (Fleming *et al.* 1991).

Huber fand 2005 eine Reduktion der Phagozytose und der Radikalproduktion bei Klinorotation von 60 UpM bei stimulierten Makrophagen und eine Erhöhung der stressbedingten Radikalproduktion bei nicht aktivierten Zellen.

Ob neben der Phagozytose auch der oxidative Burst der untersuchten Makrophagenzelllinie durch Schwerelosigkeit beeinträchtigt ist sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

## 2.7. Das Projekt TRIPLE-LUX

Durch verschiedene Weltraumexperimente konnte nachgewiesen werden, dass Schwerelosigkeit einen Effekt auf den Körper hat: einerseits auf den ganzen Organismus, was sich zum Beispiel in Knochen- und Muskelschwund bei Astronauten zeigt (Fitts *et al.* 2001, Trappe *et al.* 2009), andererseits auch auf der Ebene einzelner Zellen (Kapitel 2.5), z. B. veränderte Genexpression in Immunzellen durch Mikrogravitation (Cogoli *et al.* 1984, Cogoli 1993). Ein weiterer Effekt von Weltraumeffekten sind induzierte DNA Schäden durch erhöhte Strahlung (Reitz *et al.* 1992).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Effekt von Schwerelosigkeit auf das Verhalten von Makrophagen, also auf Zellen der angeborenen Immunabwehr. Die Arbeit ist Teil des Projektes TRIPLE LUX. Drei Gruppen entwickeln dabei ein Biosensor-Testsystem zur Untersuchung schädlicher Einflüsse von Strahlung und Mikrogravitation auf das Immunsystem und das Erbgut (Rabbow *et al.* 2003; 2006). Die TRIPLE LUX Experimente sind die ersten automatisierten biologischen Experimente, die im Biologielabor (Biolab) der Internationalen Raumstation (ISS) durchgeführt werden (ISS, Abb. 11; Biolab, Abb. 11) (Brinckmann und Schiller 2002; Brinckmann 2003, 2004; Rabbow *et al.* 2003, 2006).

Die drei wissenschaftlichen Arbeitsgruppen im TRIPLE LUX Projekt verwenden unterschiedliche Modellsysteme: Bakterien (TRIPLE LUX C), Phagozyten (Fresszellen) von Invertebraten (TRIPLE LUX B) und Makrophagen von Säugern (TRIPLE LUX A) (Tabelle 3). Alle nutzen dieselbe Analyseverfahren basierend auf der Detektion von Biolumineszenz (Kapitel 3.1) auf Luminolbasis (Kapitel 3.2).

**Tabelle 3: Beteiligte Gruppen am TRIPLE LUX Experiment**

TEAM	ORGANISMUS UND NACHWEISVERFAHREN
<u>TRIPLE LUX A</u> Bertold Hock Oliver Ullrich Kathrin Huber	Säuger-Phagozyten - VERTEBRATEN  Bestimmung der phagozytose-induzierten <i>oxidativen Burst Reaktion</i> mittels Luminol-Assay

<p><u>TRIPLE LUX B</u> Peter-D. Hansen Eckehard Unruh</p>	<p>Muschel-Phagozyten - <b>INVERTEBRATEN</b>  Bestimmung des phagozytose-induzierten <i>oxidativen Burst Reaktion</i> mittels Luminol-Assay</p>
<p><u>TRIPLE LUX C</u> Petra Rettberg Elke Rabbow Corinna Panitz Christa Baumstark-Khan Günther Reitz</p>	<p>Bakterien mit Reporter gen - <b>BAKTERIEN</b>  SOS Lux Assay - Biolumineszenz  Bestimmung der Kinetik bei der Reparatur von DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung</p>

TRIPLE LUX A untersucht die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) der Makrophagen-Zelllinie NR8383 aus *Rattus norvegicus* während des oxidativen Bursts (Kapitel 0). Diese Radikalproduktion steht im engen Zusammenhang mit der Phagozytose (Kapitel 2.3), die einen wichtigen Schritt in der angeborenen Immunantwort darstellt und damit als Indikator für die Funktionalität des Immunsystems angesehen wird (Babior 2000, siehe Kapitel 2.5).

Mit Hilfe einer Kinetikmessung des oxidativen Bursts kann die Produktion der Radikale quantifiziert werden. Damit können mögliche Einflüsse durch die Schwerelosigkeit oder die kosmische Strahlung an Bord der ISS auf die Testsysteme ermittelt werden. Über einen Zeitraum von ca. 1.5 h wird das Lumineszenzsignal aufgezeichnet und dann zusammen mit Daten über die Zellvitalität (wie Lebendzellzahl, Totzellzahl und Morphologie) zur Erde gesandt, wo die Datenanalyse stattfindet. Verschiedene Kontrollmessungen sollen den Einfluss von Schwerelosigkeit und Strahlung separieren. Zum einen findet ein Parallelexperiment auf einer 1 g Referenzzentrifuge im Biolab statt, in der 1 g-Bedingungen erzeugt werden, aber die identische Strahlenbelastung wie bei den Flugproben vorliegt. Weiterhin werden mit denselben Zell- und Reagenzienchargen Kontrollexperimente auf der Erde durchgeführt, d.h. bei 1 g aber ohne Strahlungseinfluss.

Entwicklungsstufen der Hardware für TRIPLE LUX

In den folgenden Kapiteln ist von unterschiedlichen Hardwaremodellen die Rede. Daher folgt eine kurze Einführung in die Entwicklungsstufen eines Flugexperimentes mit der zugehörigen Hardware.

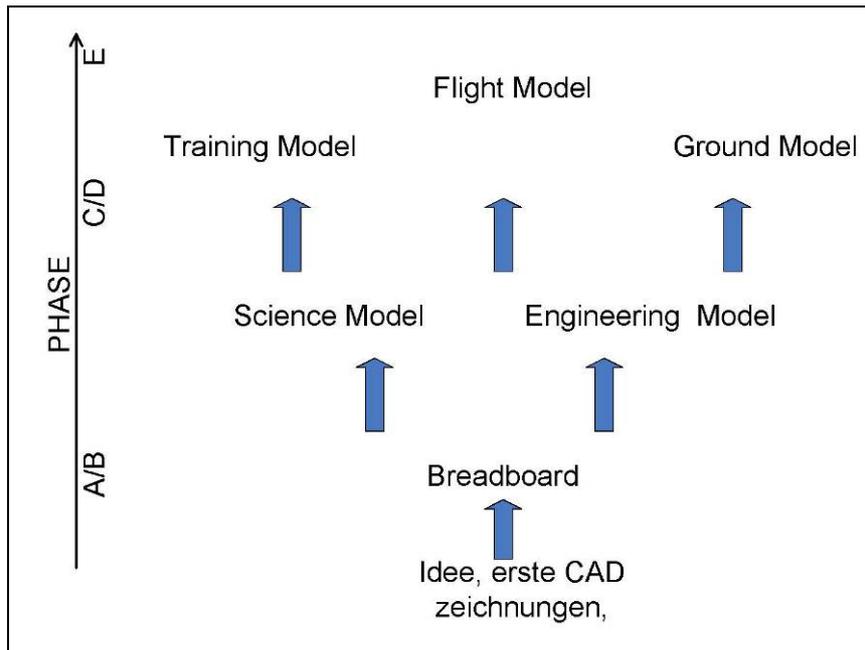
In Abb. 13 sind die Projektphasen eine Mission beschrieben, in Abb. 14 die dazugehörigen Stufen der Hardware des Experimentes.

Phase A	Missionsarchitektur
Phase B	Definitionsstudie (Komponenten und ihre Bauteile, Subsysteme, Kosten- und Machbarkeitsanalyse)
Phase C/D	Design, Bau, Integration, Test und Qualifikation
Phase E	Flugbetrieb

**Abb. 13: Phasen einer Raumfahrtmission**  
(modifiziert nach ECSS-M-30A, Raumfahrt-Projektmanagement,  
Projektphaseneinteilung und -planung, DLR)

Ein Experiment beginnt mit einer ersten Idee und ersten Zeichnungen (Phase A, Missionsarchitektur). Anschließend wird in Phase B die Mission näher definiert, Möglichkeiten für die in Phase A ausgewählten Komponenten und Bauteile werden verglichen und analysiert.

Aus den ausgewählten Komponenten wird ein Breadbord für erste Tests konstruiert. In Phase C und D erfolgt die endgültige Definition der verwendeten Komponenten und Systembestandteile des Systems. Ein Science Model und ein Engineering Model werden zur technischen Verifikation der Komponenten gegenüber den Anforderungen (Designqualifikation) sowie der wissenschaftlichen Gebrauchstauglichkeit für den Betrieb (Betriebsqualifikation) und des Systems (Bodenqualifikationstest) erstellt.



**Abb. 14: Hardwareentwicklung**, erstellt anhand persönlicher Informationen, EADS Astrium

Anschließend werden Design, die verwendeten Komponenten und Subsysteme endgültig festgelegt und nicht mehr verändert. Für den Flug werden drei identische Modelle konstruiert, ein „Flight Model“, das nur für den eigentlichen Flug verwendet wird, ein „Ground Model“ für Bodenkontroll-Experimente und technische Analysen bei auftretenden Problemen und ein „Training Model“ für das Missionstraining der Astronauten.

## 2.8. Aufgabenstellung

In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen fünf Aufgaben bearbeitet. Diese sind, für ein besseres Verständnis, mit Buchstaben von A bis E nummeriert. Im Text wird jeweils auf die aktuell bearbeitete Aufgabe verwiesen.

Eine Aufgabe (A) dieser Arbeit bestand in der Konstruktion eines Klinostaten mit der für TRIPLE LUX vorgesehenen Analytik.

Der Klinostat sollte die Messung von Lumineszenzsignalen (Kapitel 3.2) durch einen optischen Sensor mit den Möglichkeiten eines Klinostaten kombinieren. Der hierfür verwendete Sensor ist ein Photomultiplier (PMT).

Zur flexiblen Verwendung der Hardware sollte zusätzlich eine Heizbox konstruiert werden (Aufgabe B). Diese soll zu jeder Zeit und an jedem Ort eine konstante Temperatur für zellbiologische Experimente gewährleisten.

Die konstruierte Hardware und das biologische Experiment sollten, als Vorbereitung auf das spätere Flugexperiment, auf einem Parabelflug getestet werden. Daher musste der Klinostat mit der Heizbox in ein parabelflugtaugliches Rack integriert werden (Aufgabe C).

Das spätere Flugexperiment wird mit einer von EADS konstruierten Hardware durchgeführt. Für Bodenvorversuche existiert ein Science Model (SM) sehr ähnlich zu der später verwendeten Flughardware, das für die Wissenschaftler allerdings nur eingeschränkt zur Verfügung steht. Die Messungen in SM werden dabei ebenfalls mit Photomultipliern durchgeführt.

Für eine spätere Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den Klinostatenversuchen mit denen unter Einsatz der TRIPLE LUX Hardware an Bord der ISS und im SM war es nötig, die verwendeten Photomultiplier im Science Model genau zu charakterisieren und zu kalibrieren (Aufgabe D). Diese Arbeit wurde bei EADS Astrium in Friedrichshafen durchgeführt.

Nach der Fertigung der Hardware musste diese mit biologischen Experimenten sowohl am Boden als auch während des Parabelfluges getestet werden (Aufgabe E).

Daraus ergeben sich für die Aufgabenstellung im Wesentlichen folgende fünf Punkte:

- A. Konstruktion eines Klinostaten zur Lumineszenzmessung
- B. Konstruktion einer Heizbox für den Klinostaten
- C. Konstruktion eines parabelflugtauglichen Racks für A und B
- D. Kalibrierung der Photomultiplier im TRIPLE LUX Science Model
- E. Biologische Verifizierung des Gerätes und Bodenexperimente

Diese Vorexperimente am Boden sowie in kurzzeitiger Schwerelosigkeit bei Parabelflügen zusammen mit dem im Herbst 2011 geplanten ISS Experiment sollen die Frage nach dem Einfluss von Schwerelosigkeit und Strahlung auf Makrophagen klären.

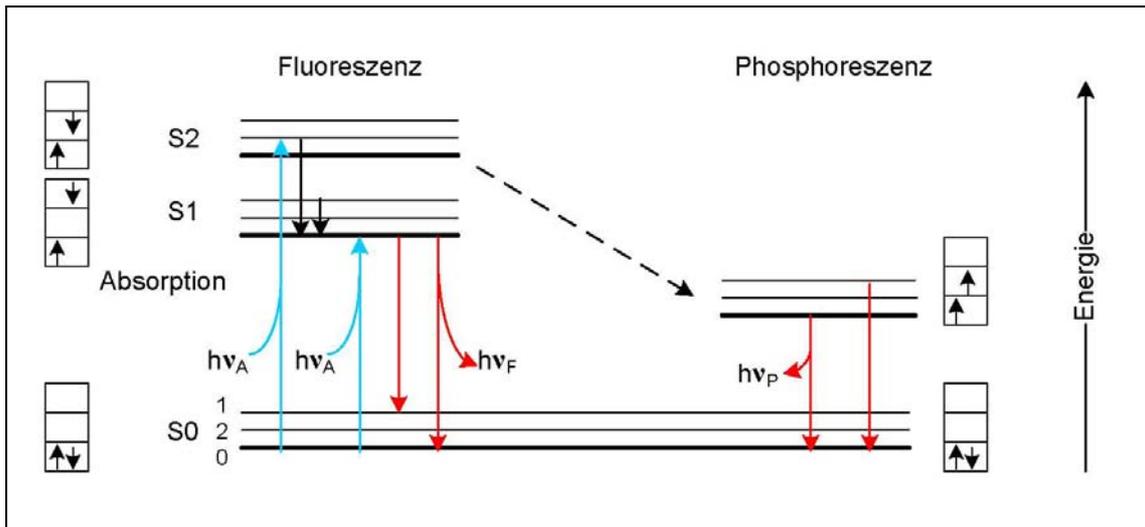
### 3 Grundlagen Klinostatenkonstruktion

Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen für die Konstruktion eines Klinostaten zur Lumineszenzmessung näher erläutert.

#### 3.1. Lumineszenz

Die bei TRIPLE LUX verwendete Analysemethode basiert auf der Messung von Biolumineszenzsignalen. Bei chemischen Reaktionen wird entweder Energie verbraucht (endotherme Reaktion) oder Wärmeenergie frei (exotherme Reaktion). In seltenen Fällen wird diese Energie nicht nur in Form von Wärme, sondern auch in Form von Licht (Photonen) abgegeben. Beispiele hierfür sind das Leuchten von gelbem Phosphor im Dunkeln (Oxidation des Phosphors) und das Leuchten des Glühwürmchens. Diese Vorgänge werden Chemilumineszenz bzw. Biolumineszenz genannt (White *et al.* 2006, Latsche *et al.* 2002). Die entstandene Energie regt dabei einzelne Elektronen an. Beim Rückfall der Elektronen von energetisch höheren Zuständen auf niedrigere Energieniveaus wird die überschüssige Energie als Strahlung emittiert (Abb. 15). Dabei wird zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden, je nachdem ob das Aufleuchten mit Beendigung der Energieeinwirkung erlischt (Fluoreszenz) oder weiterhin anhält (Phosphoreszenz).

Bei der Fluoreszenz wird normalerweise die Energie einer Lichtquelle absorbiert, und innerhalb von ca.  $10^{-7}$  s mit einem Lichtimpuls wieder abgegeben. Das emittierte Licht hat dabei eine charakteristische Farbe, die durch den Anregungszustand des Elektrons bestimmt wird. Bei der Phosphoreszenz ist der angeregte Zustand stabiler. Die Abgabe der Energie dauert länger, was zu einem Nachglühen über mehrere Stunden führen kann (Abb. 15).



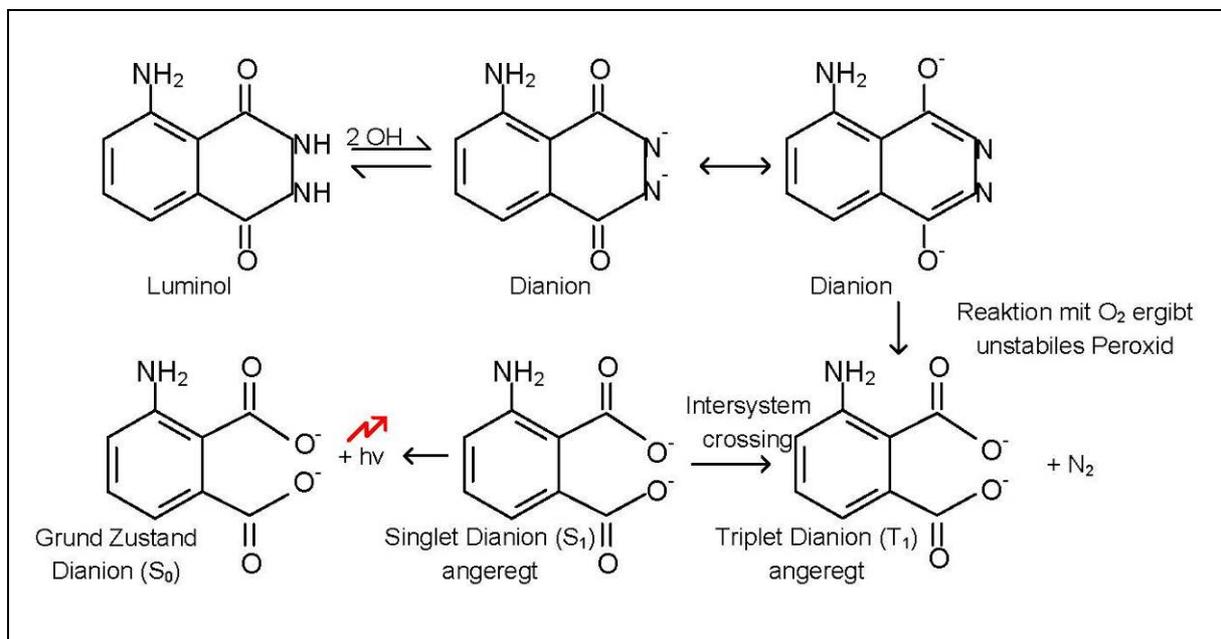
**Abb. 15: Jablonski-Diagramm zur Erläuterung von Fluoreszenz und Phosphoreszenz.** Nach Anregung des Elektrons auf ein höheres Energieniveau (S2, S1), dargestellt durch die blauen Pfeile, springt das Elektron wieder zurück (rote Pfeile) und gibt dabei Energie ( $= h\nu$ ) ab. Bei der Phosphoreszenz kommt es zusätzlich zu einer Spinänderung (schwarze Pfeile, Kästen links/rechts); daher ist der angeregte Zustand stabiler und die Energieabgabe länger.

Nach: <http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/jablonski.jpg>

Bei der Chemilumineszenz wird das Elektron nicht durch Licht, sondern durch die Energie aus einer chemischen Reaktion in den angeregten Zustand versetzt. Ausgangsstoffe für Chemilumineszenz-Reaktionen sind meist Dicarbonylverbindungen (1,2- und 1,4-Dione) wie Oxalsäureester (z. B. Diphenyloxalat und dessen Derivate) und Luminol (3-Amino-Phthalsäurehydrazid).

Die wohl bekannteste Chemilumineszenz-Reaktion ist die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid in Gegenwart von katalysierenden Eisen- oder Manganionen. Diese Reaktion wird in der Kriminalistik zum Sichtbarmachen von Blutspuren genutzt wird (der Blutfarbstoff Hämoglobin enthält  $Fe^{2+}$ -Ionen). Das oxidierte Luminolmolekül dient dabei gleichzeitig als Sensibilisator. Die Lumineszenz von Luminol ist in Abb. 16 dargestellt. Luminol wird zuerst in einer Lauge gelöst und reagiert als Säure mit den Hydroxidionen der Lauge unter Abspaltung von Wasserstoff. Dabei handelt es sich um eine reversible Gleichgewichtsreaktion. Die entstandenen Dianionen werden durch Mesomerie stabilisiert. Die Dianionen werden bei Vorhandensein einer Säure (meist Wasserstoffperoxid) oxidiert. Dabei entsteht ein Phthalat (das 3-Aminophthalat) als instabiles Intermediat im angeregten Triplett-Zustand ( $T_1$ ). Das Molekül geht zuerst strahlungslos in den Singulett Zustand ( $S_1$ )

und anschließend in den Grundzustand ( $S_0$ ) über. Dabei wird Energie in Form eines Photons im blauen Bereich des Spektrums frei.



**Abb. 16: Schema der Chemilumineszenz der Luminolreaktion**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Luminolreaktion als Analysemethode eingesetzt. Dabei dienen anstelle von Wasserstoffperoxid die von Immunzellen produzierten Radikale (reaktive Sauerstoffspezies) als Oxidationsmittel. Als Katalysator wurde Meerrettichperoxidase (HPR) eingesetzt. Da sowohl der Katalysator als auch das Luminol im Überschuss zugegeben werden, d.h. keinen Einfluss auf das Messergebnis haben können, bedeutet eine höhere Lumineszenz automatisch eine stärkere Radikalproduktion durch die Zellen.



**Abb. 17: Beispiele von Biolumineszenz (links Glühwürmchen) und Chemilumineszenz (rechts Luminolreaktion)**

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2b/Lampyris\\_noctiluca.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2b/Lampyris_noctiluca.jpg)

### 3.2. Messung der Lichtsignale

Die Messung der Lumineszenzsignale ermöglicht die Vergleichbarkeit Radikalproduktion der Zellen unter verschiedenen Einflüssen.

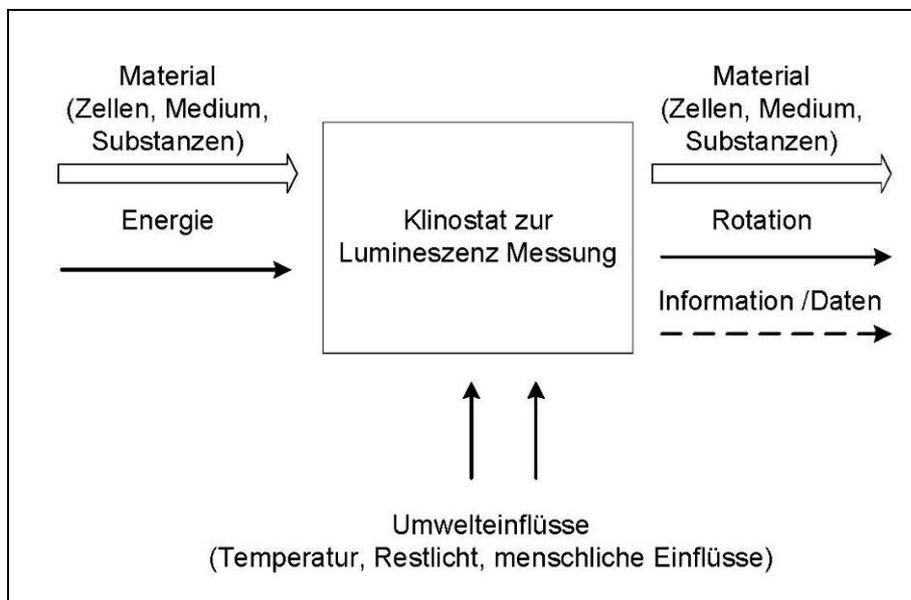
Es sind verschiedene Methoden zur Messung von Lichtsignalen bekannt. Relativ einfach ist die Messung von Licht mit handelsüblichen Photodioden oder Phototransistoren. Diese wandeln das ankommende Licht durch den „inneren Photoeffekt“ in elektrischen Strom um. „Innerer Photoeffekt“ bedeutet, dass das ankommende Licht die Leitfähigkeit eines Halbleiters vergrößert, so dass bei Lichteinfall Strom fließen kann. Dieser Stromfluss kann entsprechend gemessen werden. Bei dieser Methode sind Lichtsignale mit einer gewissen Minimalenergie nötig.

Um schwächere Lichtsignale bis hin zu einzelnen Photonen messen zu können, eignen sich so genannte Photomultiplier. Diese bedienen sich des „äußeren Photoeffekts“. Bei diesem werden, angeregt durch Photonen, Elektronen aus einer Metalloberfläche heraus geschlagen und die Anzahl der herausgeschlagenen Elektronen gemessen. Der Hauptvorteil besteht in einer mehrmaligen Messverstärkung des Eingangssignals (Photonen) durch Sekundäremissionen von Elektronen. Dadurch wird eine Signalverstärkung (Gain) des Ursprungssignals um etwa  $10^3$  bis zu  $10^8$  erzielt. Das Endsignal ist somit gut messbar und proportional zum Eingangssignal. Zur Messung der Zellreaktion im Rahmen von TRIPLE LUX A wurden Photomultiplier der Firma Hamamatsu (Japan) verwendet. Eine nähere Beschreibung der Sensoren erfolgt in den Kapiteln 8.3 und 8.4.

## 4 Definieren der Aufgabenstellung - Klinostatenkonstruktion

### 4.1. Aufgabe A - Klinostatenkonstruktion

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Konstruktion eines Klinostaten zur Validierung der Bodenkontrollen für TRIPLE LUX A (Aufgabe A). Dieser sollte dasselbe Messprinzip, analog zum Flugmodell beinhalten. D.h., es sollte eine Kombination aus der Photomultiplier (PMT) Technologie der Flughardware und einem Klinostaten entstehen (PMT- Klinostat). Abb. 18 zeigt ein Blackbox Model des Systems.



#### Abb. 18: Blackbox Model des Systems.

Zellen, Medium und Aktivatoren werden zugegeben und gegebenenfalls rotiert. Dabei wird das entstehende Lumineszenzsignal gemessen.

Gestrichelte Linien bedeuten Informationsfluss, durchgezogene Linien Energiefluss und breite Linien bedeuten Stofffluss. Die Kästchen stellen die Teilfunktionen dar, der große gestrichelte Kasten umfasst das Gesamtsystem

Weiterhin soll die Maschine zur flexibleren Verwendung in einer Heizbox untergebracht werden (Aufgabe B), die eine konstante Umgebungstemperatur gewährleistet.

Für eine Kontrolluntersuchung während eines Parabelfluges muss das ganze System zusätzlich in ein Parabelflugrack eingesetzt werden (Aufgabe C).

Der konstruierte Klinostat wurde anschließend mit dem Zellsystem getestet. Die Versuche wurden dabei am Boden mit unterschiedlichen

Rotationsgeschwindigkeiten, auf einer Zentrifuge und während zweier Parabelflüge durchgeführt (Aufgabe E).

Für die Konstruktion des Klinostaten ergeben sich daher drei Aufgaben:

- A Konstruktion eines Klinostaten zur Lumineszenzmessung
- B Konstruktion einer Heizbox für den Klinostaten
- C Konstruktion eines parabelflugtauglichen Racks für A und B

## **4.2. Anforderungslisten**

Der konstruktive Teil der Dissertationsschrift wurde methodisch bearbeitet. Die Basis dafür bildeten die VDI Richtlinien 2221 und 2222 (Pahl *et al.* 2005).

Das Anforderungsprofil dient der Darstellung und Bewertung eines technischen Problems. Alle erforderlichen Anforderungen, wurden erarbeitet und qualitativ und quantitativ präzisiert. Die Darstellung erfolgt entsprechend den gültigen Richtlinien mit Hilfe einer Anforderungsliste.

### 4.2.1. Anforderungsprofil Klinostatenkonstruktion

Ein Auszug der Anforderungsliste des Klinostaten ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Auszug aus der Anforderungsprofil des Klinostaten, vollständige Ausarbeitung Horn 2009a**

PRODUKT PMT KLINOSTAT		DATUM			
PRODUKTENTWICKLUNG	ANFORDERUNGEN			QUELLEN VERANT- WORTLICH	
	NR.	BESCHREIBENDE ANGABEN	ZAHLENGABEN/BEMERKUNGEN		
	1	Zielstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>Entwicklung einer Moduleinheit zur Lumineszenzmessung bei gleichzeitiger Rotation der Proben</li> <li>Messung der biologischen Lichtsignale</li> <li>Rotation der Proben</li> </ul>		
	2	Umgebungsbedingungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Temperatur: 0-40°C, in der Regel 37 °C</li> <li>Luftfeuchtigkeit 0-100%, in der Regel 95%</li> </ul>		
	3	Zu erzielende Parameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sensitivität: 350 – 600 nm</li> <li>Rotation mit 0 – 100 UpM</li> <li>flexible und stufenlose Änderung der Rotationsgeschwindigkeit</li> </ul>		
	4	Masse der Experimentmodule	Maximal 4 kg		
	5	Montage der Proben	leichte, aber trotzdem stabile Fixierung der Proben in 30s, 1 Person		
	6	Energieversorgung	Netzteil für Sensor und Motor		
• • •					
	12	Weitere Anforderungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Die Konstruktion soll als eine Einheit aus- bzw. einbaubar sein</li> <li>Vermeidung von Streulicht</li> <li>überlappende Anordnung der Wandsegmente</li> <li>kostengünstig (&lt; 5000 €)</li> <li>Konstruktion einer transportablen Einheit zur flexiblen Verwendung</li> <li>möglichst ähnlicher Versuchsaufbau zum späteren Weltraumexperiment (gleiche Messmethode, ähnlich Sensoren)</li> </ul>		

Tabelle 4 fasst alle Forderungen an die gesamte Konstruktion zusammen. Inwieweit alle Forderungen an dem zu konstruierenden Klinostaten erfüllt werden können, wird später in der Bewertung und Auswahl des Lösungskonzepts diskutiert. Tabelle 5 enthält die zusätzlichen Forderungen an die Heizbox.

#### 4.2.2. Anforderungsprofil Heizbox

**Tabelle 5: Auszug aus den Anforderungsprofil der Heizbox, vollständige Ausarbeitung Horn 2009a**

	PRODUKT HEIZBOX		DATUM	
<b>PRODUKTENTWICKLUNG</b>	<b>ANFORDERUNGEN</b>			<b>QUELLEN</b>
	<b>NR.</b>	<b>BESCHREIBENDE ANGABEN</b>	<b>ZAHLENGABEN/BEMERKUNGEN</b>	<b>VERANTWORTLICH</b>
	1	Zielstellung	Entwicklung einer Heizbox zur Aufnahme des Kinostaten	
	2	Umgebungsbedingungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatur: 0-40°C, in</li> <li>• Luftfeuchtigkeit 0-100%,</li> </ul>	
	3	Zu erzielende Parameter	Temperieren der Zellflüssigkeit auf konstante 37°C ± 1°C	
	4	Masse der Experimentmodule	maximal 4 kg	
	5	Funktionsüberwachung	von außen lesbarer Temperatursensor	
	6	Oberflächentemperatur	max. 70 °C	
	7	Energieversorgung	eigenes Netzteil Max. 24 V	

#### 4.2.3. Anforderungsprofil Parabelflug

Zur Testung des Systems gab es die Möglichkeit, die konstruierte Hardware (Klinostat, Rack und Heizbox) in kurzzeitiger Mikrogravitation auf einem Parabelflug zu erproben. Daher mussten für die Konstruktion weitere Anforderungen - vorgegeben durch die Firma Novespace (Mérignac, Frankreich) – im Hinblick auf einen Parabelflug an Bord des A 300 Zero G berücksichtigt werden. Die Konstruktion des Parabelflugarcks ist durch die Bedingungen im Benutzerhandbuch für

Parabelflüge des Flugzeugbetreibers Novespace festgelegt. Dieses Dokument enthält die erlaubten Begrenzungen für Größe, Gewicht, max. Belastungen, Energieversorgung, erlaubte Materialien etc. Alle Teile der Konstruktion mussten daher diese Bedingungen erfüllen.

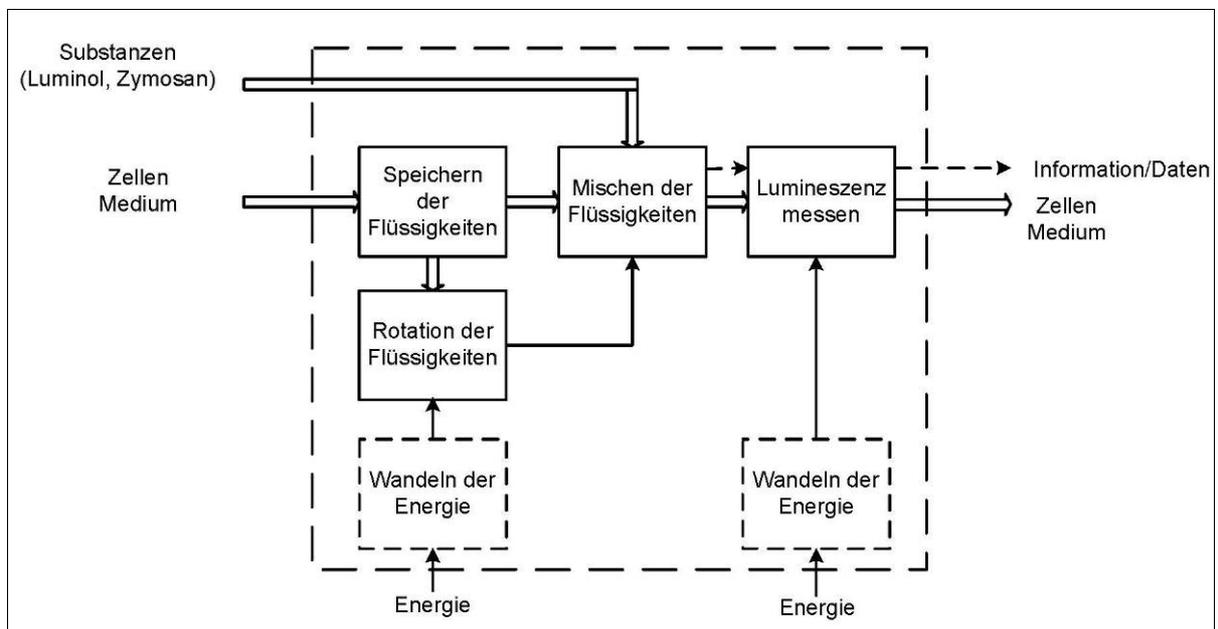
**Tabelle 6: Auszug aus den Anforderungen der Hardware für die Parabelflugtauglichkeit, vollständige Ausarbeitung Horn 2009b**

	PRODUKT PARABELFLUGRACK		DATUM	
<b>PRODUKTENTWICKLUNG</b>	<b>ANFORDERUNGEN</b>			<b>QUELLEN</b>
	<b>NR.</b>	<b>BESCHREIBENDE ANGABEN</b>	<b>ZAHLENGABEN/BEMERKUNGEN</b>	<b>VERANTWORTLICH</b>
	1	Zielstellung	Entwicklung Parabelflugracks für PMT Klinostat mit Heizbox	
	2	Flugzeugtürbreite	1,07 m	
	3	Flugzeugtürhöhe	1,93 m	
	4	Kabinenlänge	20 m	
	5	maximale Höhe	1.500 m	
	6	Befestigungspunkte für experimentellen Aufbau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mittlerer Schienenabstand (y-Achse) 503 mm</li> <li>• Bohrung für Schraube M10 = 12 mm</li> <li>• Bohrung in x-Richtung</li> <li>• = n x 25,4 mm &gt; 20 inches</li> <li>• (1 inch = 25,4 mm)</li> </ul>	
	7	maximale Flächenlast auf 1m Befestigungsschienenlänge	100 kg	
8	Rackaufbau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grundplatte oder Rahmenkonstruktion, die mit Sitzschienensystem des Flugzeugs verbunden ist</li> </ul>		

## 5 Konzeptionsphase

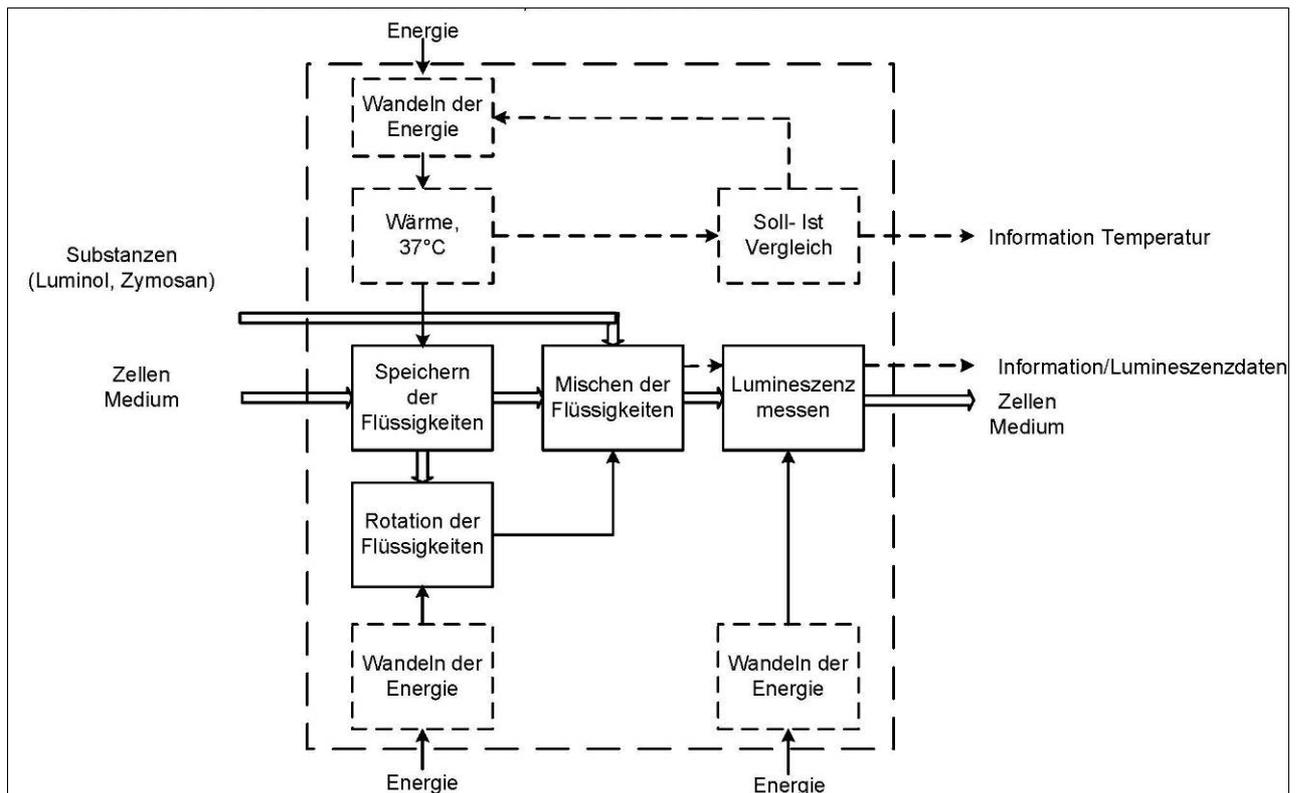
### 5.1. Funktionsstruktur

In der Konzeptionsphase wird die Gesamtfunktion in Teilfunktionen unterteilt. Das Ergebnis ist eine so genannte Funktionsstruktur (s. Abb. 19). Die einzelnen Aufgaben (z. B. Mischen, Rotieren, Heizen) werden einzeln betrachtet. Abgesehen von dem Modell des Klinostaten wurde zusätzliche eine Einheit aus Klinostat und einer Heizbox zur Möglichkeit einer Temperaturregelung entworfen, so dass die Maschine bei konstanter Temperatur überall flexibel einsetzbar ist (s. Abb. 20).



**Abb. 19: Funktionsstruktur, PMT Klinostat**

Gestrichelte Linien bedeuten Informationsfluss, durchgezogene Energiefluss und breite Linien bedeuten Stofffluss. Die Kästchen stellen die Teilfunktionen dar, der große gestrichelte Kasten umfasst das Gesamtsystem.



**Abb. 20: Funktionsstruktur, Einheit PMT Klinostat mit Heizbox.**

Gestrichelte Linien bedeuten Informationsfluss, durchgezogene Energiefluss und breite Linien bedeuten Stofffluss. Die Kästchen stellen die Teilfunktionen dar, der große gestrichelte Kasten umfasst das Gesamtsystem.

Diese Vorgehensweise ermöglicht eine optimale Analyse des gesamten Systems. Basierend auf der erwünschten Funktion wird das System in Komponenten unterteilt. Anschließend erfolgt die Aufteilung der einzelnen Komponenten in Subsysteme. In dieser Arbeit wurden folgende Subsysteme identifiziert:

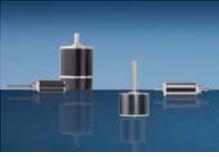
- Motor zur Rotationserzeugung
- Küvette zur Aufbewahrung der Substanzen
- Sensor zur Messung der Signale
- Heizelement zu Gewährleistung einer konstanten Temperatur

Mögliche Varianten für diese Subsysteme werden ermittelt und mit geometrischen und Materialeigenschaften kombiniert. Diese werden in einem Klassifikationsdiagramm dargestellt. In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck der morphologische Kasten gewählt.

## 5.2. Morphologischer Kasten

Tabelle 7 zeigt einen morphologischen Kasten für die Kombination Klinostat mit Heizbox.

**Tabelle 7: Auszug aus dem Morphologischer Kasten, PMT Klinostat, vollständige Ausarbeitung Horn 2009a**

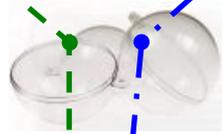
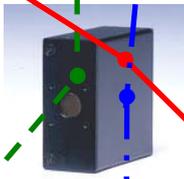
		PRODUKT: PMT KLINOSTAT+ HEIZBOX		
		MORPHOLOGISCHER KASTEN		
Variante		Variante 1	Variante 2	Variante 3
Teil- funktion				
Wandeln von elektrischer in mechanische Energie		mechanischer Motor 	elektrischer Motor 	hydraulischer Motor 
Speichern der Zellflüssigkeit		Glas, Zylinder 	Plexiglas, Kugel 	PVC, Kubus 
Messen der Lumineszenz (Daten)		Photodioden 	PMT 	Phototransistoren 
Erwärmen der Zellflüssigkeit		Wärmekissen (chemisch) 	Patronenheizkörper 	Heizfolien 

Die möglichen Komponenten müssen nun zu so genannten Wirkstrukturen zusammengefügt werden. Eine Wirkstruktur ist ein Gang durch den morphologischen Kasten, wobei pro Gang jeweils eine Variante jeder Funktion gewählt wird (Tabelle 7). Einige der Komponenten sind durch die vorgegebenen Bedingungen (Flugtauglichkeit, Platzangebot, Sicherheit, nicht zugelassene Materialien schon klar definiert (s. Tabelle 6). Alle Teile der Konstruktion mussten daher diese Bedingungen erfüllen. Ebenso hatte das TRIPLE LUX Science Model einen großen Einfluss auf die Auswahl des Sensors, da dieser möglichst ähnlich zu dem im Flug verwendeten sein sollte.

Da das finale Ziel der Einsatz auf der ISS im Rahmen des TRIPLE LUX Experimentes ist, wurde der Sensor entsprechend dem für den Flug vorgesehenen ausgewählt.

Anhand dieser Vorgaben wurden nun drei mögliche Wirkstrukturen innerhalb des morphologischen Kastens gewählt (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Gang durch den morphologischen Kasten. Auszug (vollständige Ausarbeitung Horn 2009a)**

		PRODUKT: PMT KLINOSTAT + HEIZBOX		
		MORPHOLOGISCHER KASTEN		
Variante		Variante 1	Variante 2	Variante 3
Funktion				
Wandeln von elektrischer in mechanische Energie		mechanischer Motor 	elektrischer Motor 	hydraulischer Motor 
Speichern der Zellflüssigkeit		Glas, Zylinder 	Plexiglas, Kugel 	PVC, Kubus 
Messen der Lumineszenz (Daten)		Photodioden 	PMT 	Phototransistoren 
Erwärmen der Zellflüssigkeit		Wärmekissen (chemisch) 	Patronenheizkörper 	Heizfolien 

-  Wirkstruktur 1
-  Wirkstruktur 2
-  Wirkstruktur 3

### 5.3. Bewertung der Wirkstrukturen

Um die drei möglichen Wirkstrukturen näher zu analysieren und ihre Funktionalität zu bewerten wurden eine Reihe von Bewertungskriterien mit unterschiedlicher Gewichtung erstellt. Die wichtigsten Bewertungskriterien sind in Tabelle 9 dargestellt.

Die Bewertung der einzelnen generierten Wirkstrukturen erfolgte nach der VDI Richtlinie 2225.

Die vergebenen Punkte für das jeweilige Kriterium wurden mit der Gewichtung für das Gesamtprojekt in Prozent multipliziert.

**Tabelle 9: Auszug aus den Bewertungskriterien für den PMT Klinostaten, vollständige Ausarbeitung Horn 2009a**

Bewertungskriterien	Wertigkeit (W)	Var. 1 (P)	WxP	Var. 2 (P)	WxP	Var. 2 (P)	WxP
Messen der Lumineszenz	0,16	2,00	<b>0,31</b>	4,00	<b>0,63</b>	2,00	<b>0,31</b>
stufenlose gleichmäßige Rotation	0,13	3,00	<b>0,38</b>	4,00	<b>0,50</b>	3,00	<b>0,38</b>
wenig Scherkräfte/Turbulenzen in der Flüssigkeit	0,09	4,00	<b>0,38</b>	4,00	<b>0,38</b>	2,00	<b>0,19</b>
⋮							
Biokompatibilität des Materials	0,09	3,00	<b>0,28</b>	3,00	<b>0,28</b>	3,00	<b>0,28</b>
geringer Energiebedarf	0,06	4,00	<b>0,25</b>	3,00	<b>0,19</b>	3,00	<b>0,19</b>
geringe Masse	0,06	4,00	<b>0,25</b>	4,00	<b>0,25</b>	2,00	<b>0,13</b>
37 °C homogen in der Box verteilt	0,13	3,00	<b>0,38</b>	4,00	<b>0,50</b>	2,00	<b>0,25</b>
<b>Summe</b>	<b>1</b>	44,00	<b>2,94</b>	52,00	<b>3,66</b>	41,00	<b>2,56</b>
<b>Prozent</b>		0,69	<b>0,73</b>	0,81	<b>0,91</b>	0,64	<b>0,64</b>

W = Wertigkeit; P = Punkte; Var. = Variante

Als Ergebnis wurde mit der Wirkstruktur mit der höchsten Gesamtpunktzahl weitergearbeitet, in diesem Falle Variante 2. Das Projekt ging nun in die Design Phase über.

## 6 Design

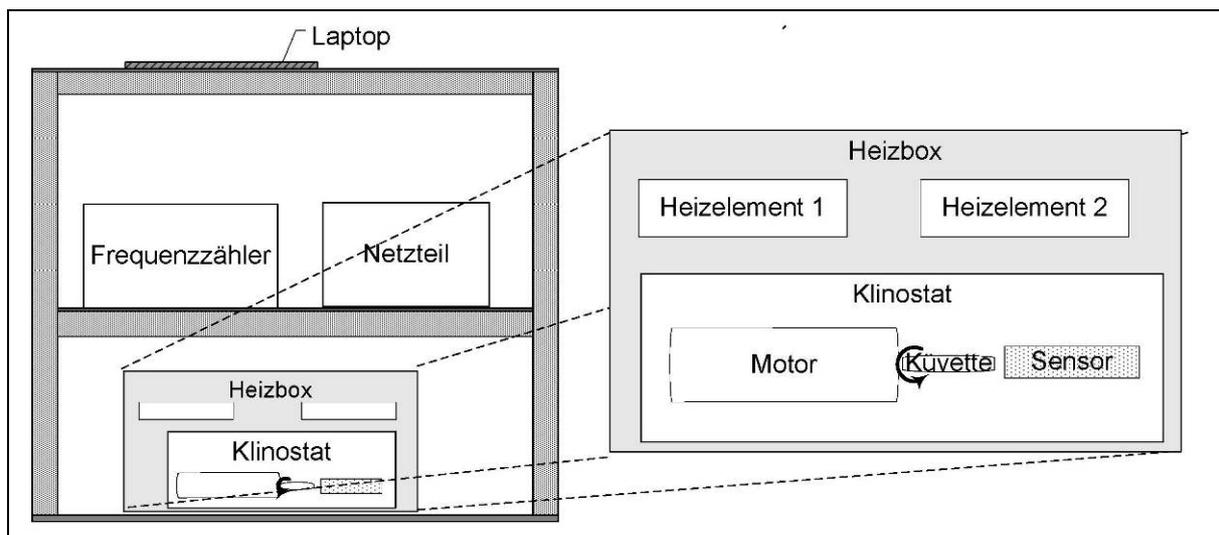
Die Design Phase gliedert sich in drei Unterpunkte:

- schematisches Design
- detailliertes Design
- Vervollständigung und Evaluierung.

### 6.1. Schematisches Design

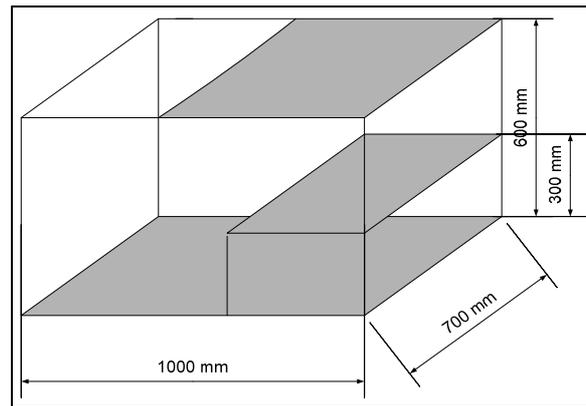
Ausgehend von den Ergebnissen der Konzeptionsphasen wurde ein Schema der Hauptkomponenten entworfen, anhand dessen weitergearbeitet werden konnte.

Abb. 21 zeigt ein mögliches Konzept. Die Hauptkomponente ist der Klinostat in der Heizbox (rechts). Für die Verwendung im Parabelflug wurde diese in einem Rahmen angeordnet, in diesem Rahmen wurden auch die zusätzlich benötigten Hardwarekomponenten (Frequenzzähler, Netzteil und Laptop) untergebracht.



**Abb. 21: Schema der Bestandteile des Racks (links) und des Klinostaten in der Heizbox (rechts)**

Das Rack, welches das Equipment während des Parabelfluges beherbergt, ist in Abb. 22 schematisch dargestellt.

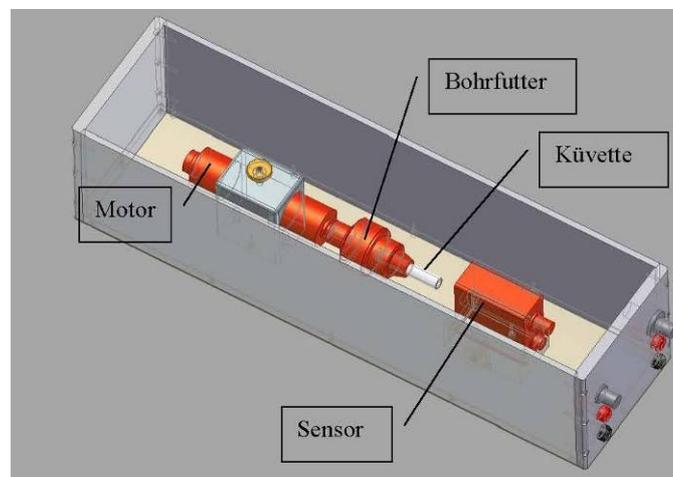


**Abb. 22: Schema der Rackstruktur**

## 6.2. Detailliertes Design der Hauptkomponenten

### 6.2.1. Klinostat

Der Klinostat ist in einer schwarzen Aluminiumbox mit den Dimensionen 370x100x100 mm untergebracht. Er besteht aus einem Schrittmotor (Faulhaber, Getriebe 1:66, Tacho:265 steps/s), einer Einspannvorrichtung für die Küvette und dem Sensor (Abb. 23).

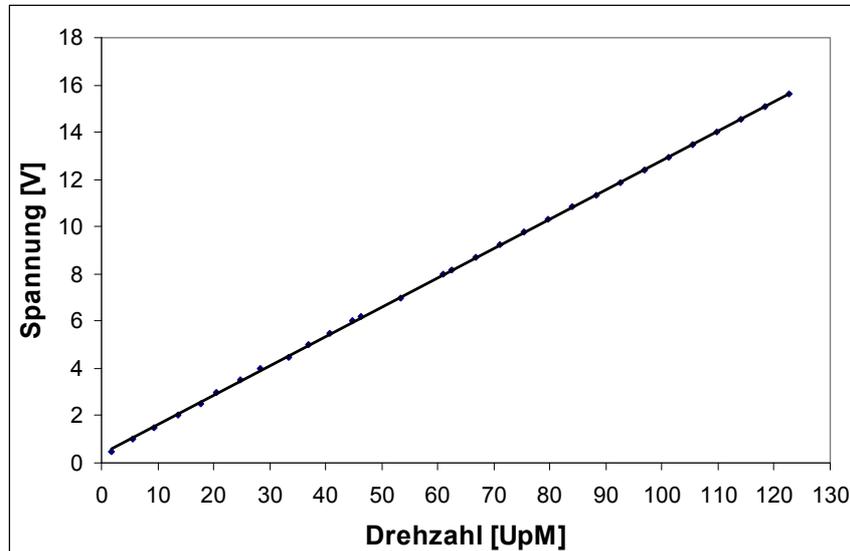


**Abb. 23: Klinostat, Bestandteile**

Der elektrische Motor wird mit einem Netzteil der Marke Voltkraft betrieben. Durch das Einstellen der benötigten Eingangsspannung kann der Klinostat mit Geschwindigkeiten zwischen 0 und 100 UpM betrieben werden

Die Geschwindigkeit ist über die Spannungszufuhr am Netzteil stufenlos regulierbar. Für die Qualität der biologischen Messung ist eine stufenlose Einstellung der Rotationsgeschwindigkeit und Kontrolle derselben von essentieller Bedeutung.

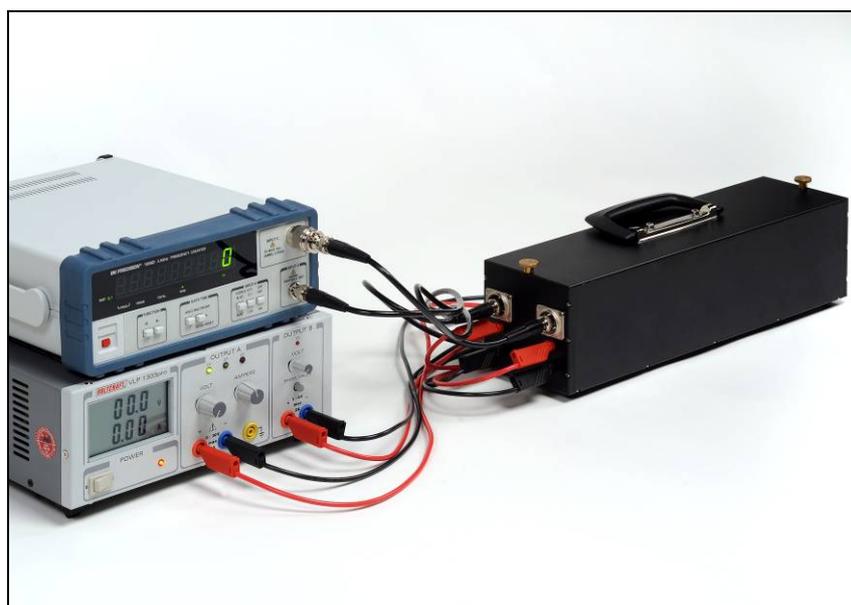
Die zugehörige Spannung zu der gewünschten Rotationsgeschwindigkeit ist Abb. 24 zu entnehmen (Abweichung unter 1 %).



**Abb. 24: Drehzahl des Klinostaten in Abhängigkeit von der Eingangsspannung**

Die aktuelle Geschwindigkeit kann zusätzlich jederzeit durch Messung des Tachosignals überprüft werden. Durch Variieren der Eingangsspannung ist es außerdem möglich, die Rotationsgeschwindigkeit innerhalb von Sekunden zu verändern.

Für eine Referenzmessung bei normalen 1 *g*-Bedingungen kann die Maschine ohne Drehung betrieben werden.



**Abb. 25: Klinostat (rechts) mit Frequenzzähler (links unten) und Netzteil (links oben)**

An dem Klinostatenmotor ist ein Bohrfutter der Firma Bosch (Gerlingen, Deutschland) angebracht. In diesem können alle Arten von Küvetten mit einem Durchmesser zwischen 3 und 20 mm fixiert werden (Abb. 23). Das Zentrum der Rotationsachse entspricht dabei der Drehachse des Motors. In der gleichen Flucht liegt das Messfenster des Photomultipliers. So ist gewährleistet, dass sich alle Proben sowohl im Zentrum des Messfensters, als auch möglichst nahe an der Rotationsachse befinden.

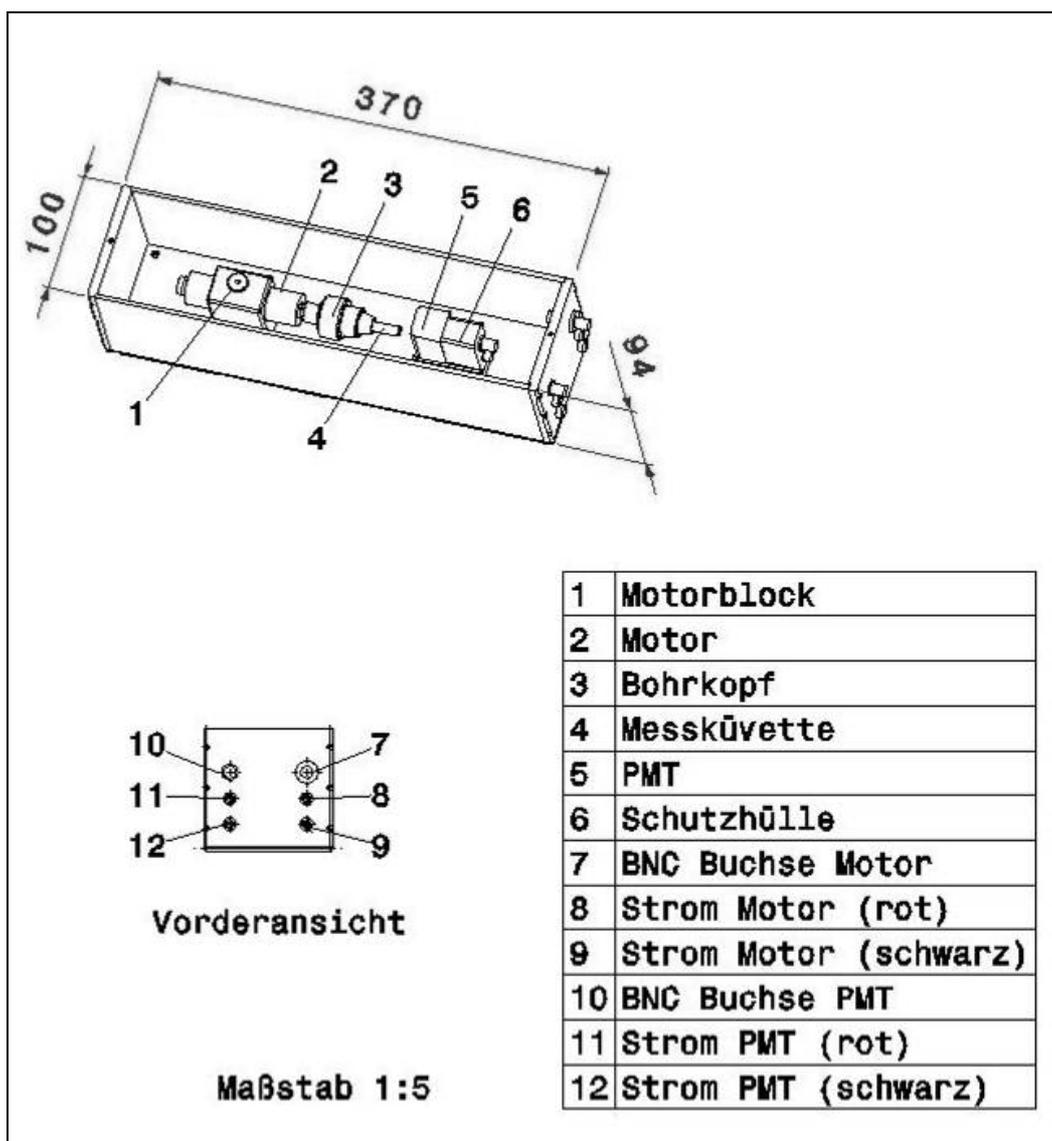
Für diese Arbeit wurden 50 mm lange Glasküvetten mit 2 mm Radius verwendet (s. Abb. 26). Mit Ausnahme des Messfensters an der Spitze ist die Küvette innen weiß (Zur besseren Reflexion des Lumineszenzsignals) und außen schwarz gefärbt (zur Reduzierung von Streulicht in dem Klinostaten). Ebenso befindet sich der Klinostat in einer schwarz eloxierten Metallkiste, zusätzlich sind die Wandsegmente der Kiste überlappend angeordnet, um das Eindringen von Restlicht zu minimieren.



**Abb. 26: Messküvette mit Verschlusskappe**

Der Abstand zwischen Küvette und Messfenster kann individuell reguliert werden (s. Abb. 27 ), indem der Motor (2) in dem zugehörigen Motorblock (1) in die erwünschte Position geschoben und über eine Rändelschraube fixiert wird.

Zusätzlich kann die Position des PMTs über eine Schiene entlang der Rotationsachse, verändert werden. Dies ermöglicht das Einspannen von Küvetten (4) bis zu 120 mm Länge.



**Abb. 27: PMT Klinostat Skizze. Isometrische Ansicht (oben) und Vorderansicht (unten).** Weitere Skizzen und die Stückliste s. Anhang. Vollständige Ausarbeitung Horn 2009a

Der verwendete Sensor zur Lumineszenzmessung ist ein Photomultiplier (PMT) der Marke Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan, H 7155, s. Abb. 28).

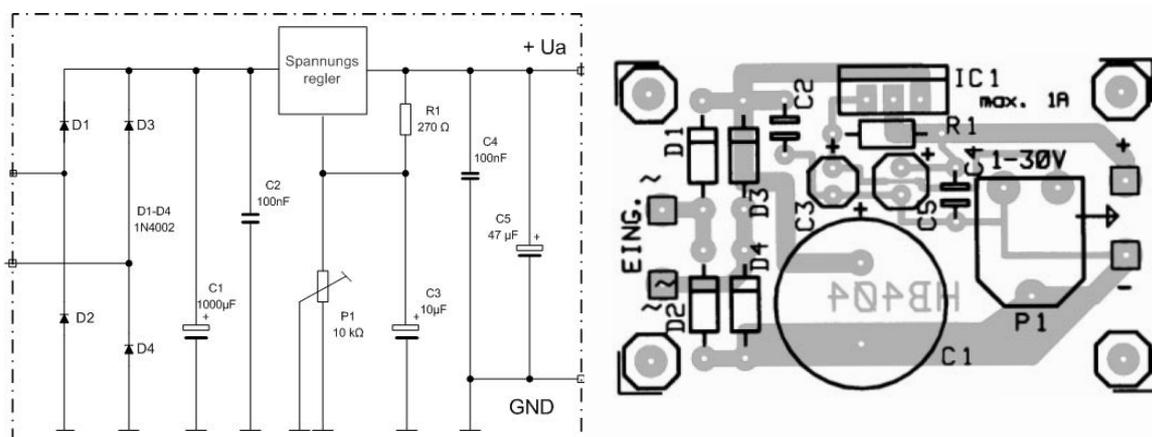
Das Messspektrum des Gerätes liegt zwischen 300 und 650 nm.



**Abb. 28: Photomultiplier (PMT), Bild Hamamatsu**

Der PMT wird mit einem Frequenzzähler der Marke BK Perscion (Yorba Linda, USA) (s. Abb. 25) bei einer Eingangsspannung von 5 V ausgelesen.

Da die Eingangsspannung des PMTs Auswirkungen auf den Verstärkungsfaktor und somit auf das Ausgangssignal haben kann, ist durch einen Spannungsregler eine konstante Eingangsspannung von 5 V sichergestellt. Abb. 29 zeigt den Schaltplan und den Stückplan der verwendeten Einheit.

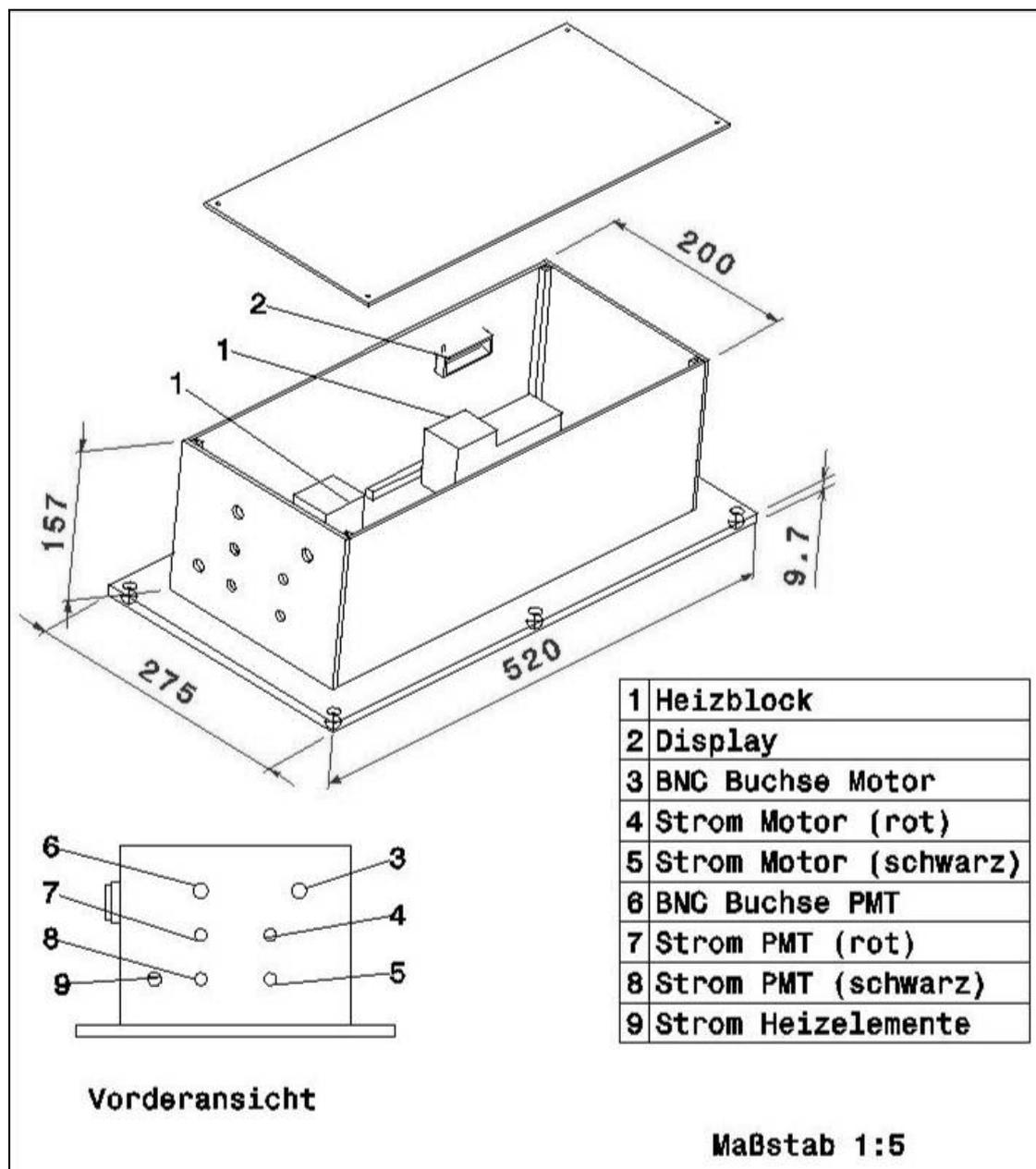


**Abb. 29: Schaltplan (links) und Stückplan (rechts) des Spannungsreglers**  
Mit C= Kondensator. D= Diode, P= Potentiometer und R= Widerstand  
aus *Bedienungsanleitung für Netzteil LM 7805, Conrad Electronics*

Mit Hilfe eines Laptops, einer serieller Schnittstelle (RS232) und des dem Frequenzzähler zugehörigen Programms COUNTER können der erwünschte Auslesemodus eingestellt und die Daten direkt auf den Computer in Form einer \*.csv Datei gespeichert werden. Die schnellste Rate der Messung entspricht 1 Hz.

## 6.2.2. Heizbox

Für Messungen außerhalb des Inkubators wurde eine Heizbox konstruiert, mit deren Hilfe eine konstante Temperatur von 37°C gewährleistet werden konnte (s. Abb. 30).

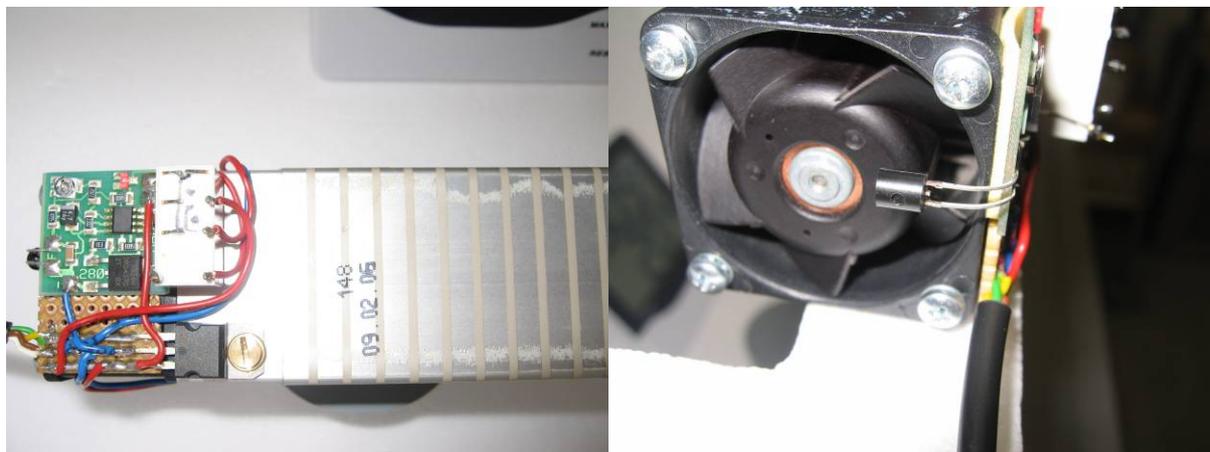


**Abb. 30: Skizze, Heizbox. Isometrische Ansicht (oben) und Vorderansicht (unten).** Weitere Skizzen und die Stückliste s. Anhang, vollständige Ausarbeitung Horn 2009a

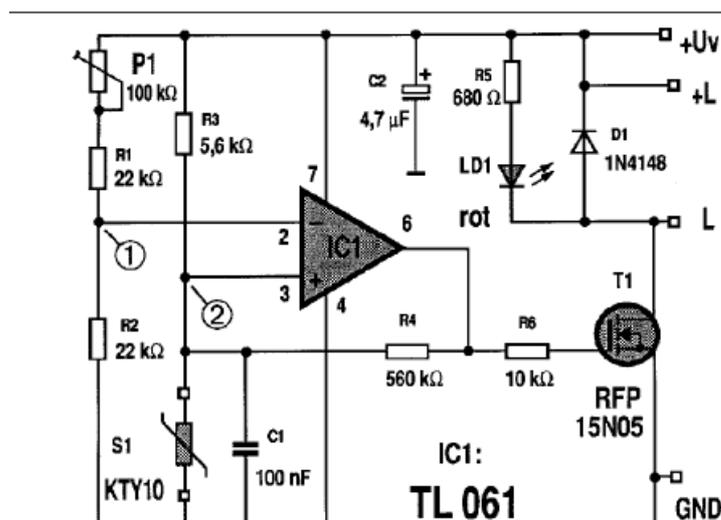
Die Box mit den Maßen 400x200x150 mm besteht aus 4 mm dicken PVC. Im Inneren können der PMT Klinostat und zwei Heizblöcke (1) befestigt werden.

Diese (Abb. 31) bestehen aus einer 12 V Heizfolie die auf einen hohlen Aluminiumblock (zur Luftzirkulation) geklebt wurde. An dem Block ist ein Ventilator angebracht, der die warme Luft gleichmäßig verteilt. Ein Temperaturregelelement hält eine konstante Temperatur von  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  aufrecht. Dabei wird die aktuelle Temperatur gemessen und über einen Temperaturregler (Abb. 32) gesteuert.

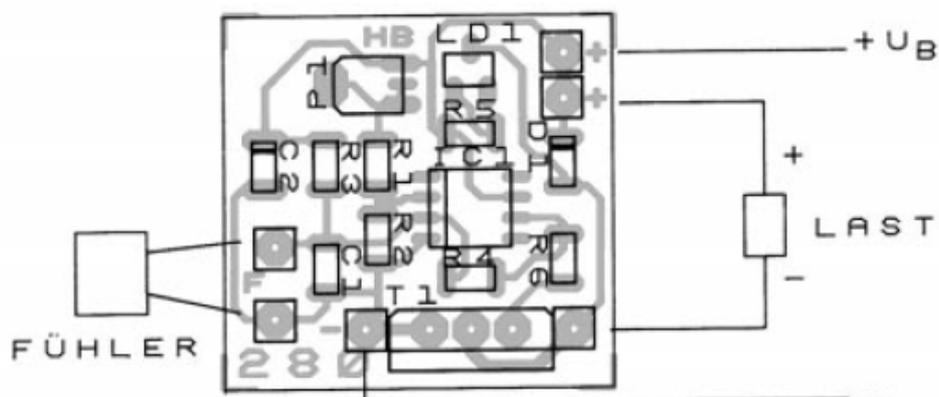
Zur zusätzlichen Kontrolle ist ein Temperatursensor innerhalb der Heizbox angebracht, so dass über ein externes Display (2) die aktuelle Temperatur jederzeit abgelesen werden kann (Abb. 30). Für den Parabelflug wurden zur weiteren Absicherung noch zusätzlich zwei Schmelzsicherungen (Conrad Electronics, No. 770.000) direkt auf die Heizfolie angebracht. Übersteigt eine der Heizfolien  $72^{\circ}\text{C}$ , würden beide Heizelemente damit sofort ausgeschaltet.



**Abb. 31: Heizblock (links), Ventilator mit Temperatursensor (rechts)**



Das RC-Glied im Rückkopplungsweig beruhigt den empfindlichen Operationsverstärker im Umschalt Augenblick. Durch die Rückführung auf den Plus-Eingang handelt es sich hier um eine Mitkopplung.



**Abb. 32 Schaltplan (oben) und Stückplan (unten) des Temperaturschalters**  
mit C= Kondensator, D= Diode, P= Potentiometer und R= Widerstand  
Aus Bauanleitung SMD Temperaturschalter, Conrad Electronics

Um die Box noch zusätzlich zu isolieren, wurde die Innenseite der Box mit Rettungsfolie verkleidet und die Außenseite mit Moosgummi beklebt (s. Abb. 33).



**Abb. 33: Heizbox mit Moss Gummi (links) und Rettungsfolie (rechts) zur Isolation**

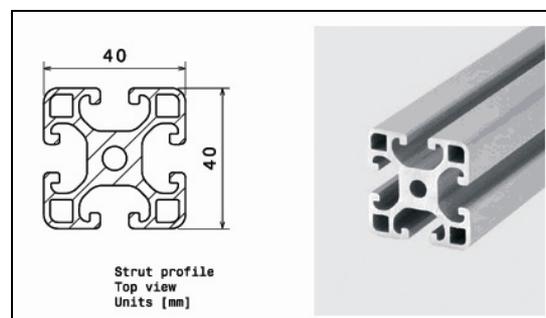
Die Box kann wahlweise mit 4 Rändelschrauben oder einem Spanngurt verschlossen werden.

### 6.2.3. Parabelflugrack

#### *Konstruktion des Racks*

Für den Einsatz der Hardware auf zwei Parabelflugkampagnen (13. DLR- Kampagne, Feb. 09., 51. ESA-Kampagne, Okt. 09) wurde eine Struktur zum Einbau in den A-300-Zero-g konstruiert (Aufgabe C).

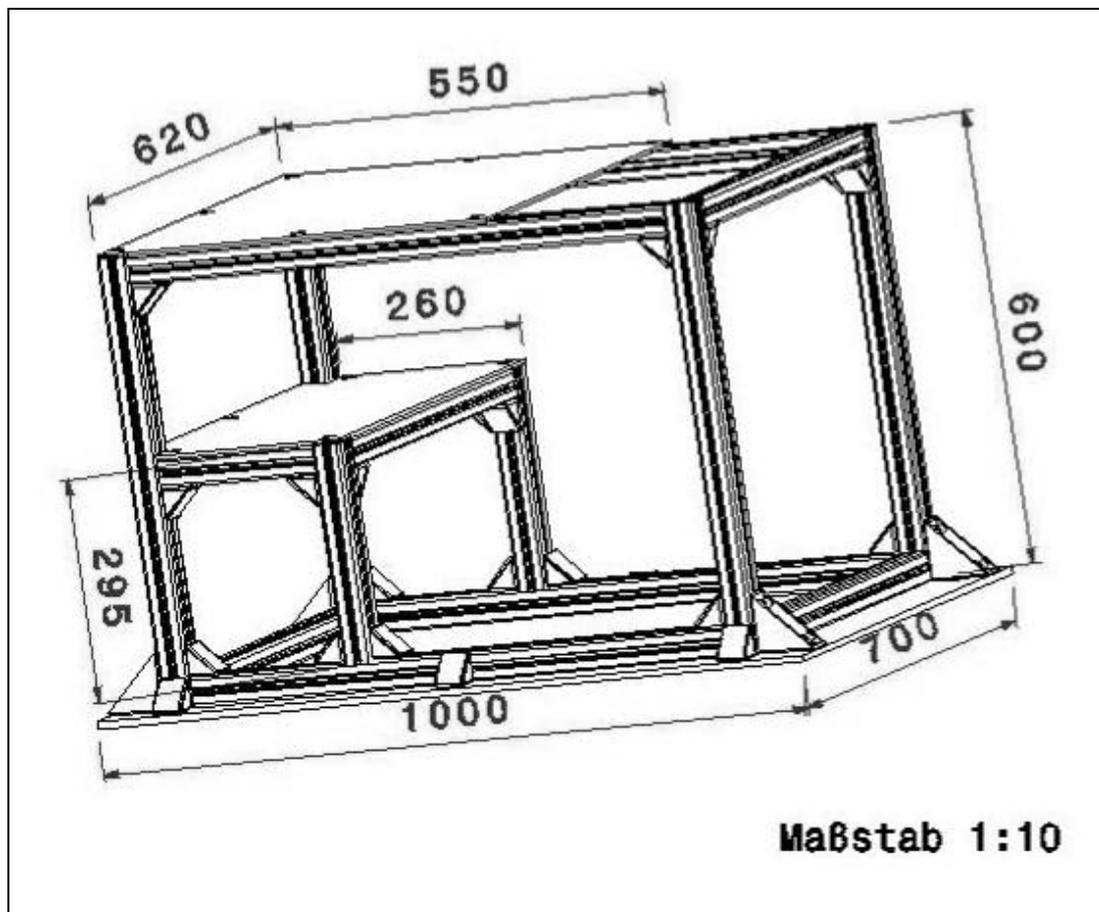
Als Grundbauteile wurden eloxierte Aluminiumprofile der Firma Item (Solingen, Deutschland) verwendet (Profil 8, 40x40 mm, s. Abb. 34, Herstellerdaten s. Anhang Tabelle 16).



**Abb. 34: Item Profil**

Die Wahl der Profilgröße und Länge ergab sich aus den berechneten Belastungen und den Dimensionsvorgaben für Hardware und den Flugzeuginnenraum (Tabelle 6).

Die Profile wurden auf eine 10 mm dicke Aluminiumplatte montiert. Zur Unterbringung des Equipments wurden außerdem noch eine mittlere und obere Platte von jeweils 5 mm Dicke angebracht. Die Gesamtgröße des Rack betrug  $1000 \times 700 \times 600 \text{ mm}^3$ . Abb. 35 zeigt eine Skizze des Racks.



**Abb. 35: Skizze, Parabelflugrack. Isometrische Ansicht.** Weitere Skizzen und die Stückliste siehe Anhang, vollständige Ausarbeitung Horn 2009b

### *Belastungen*

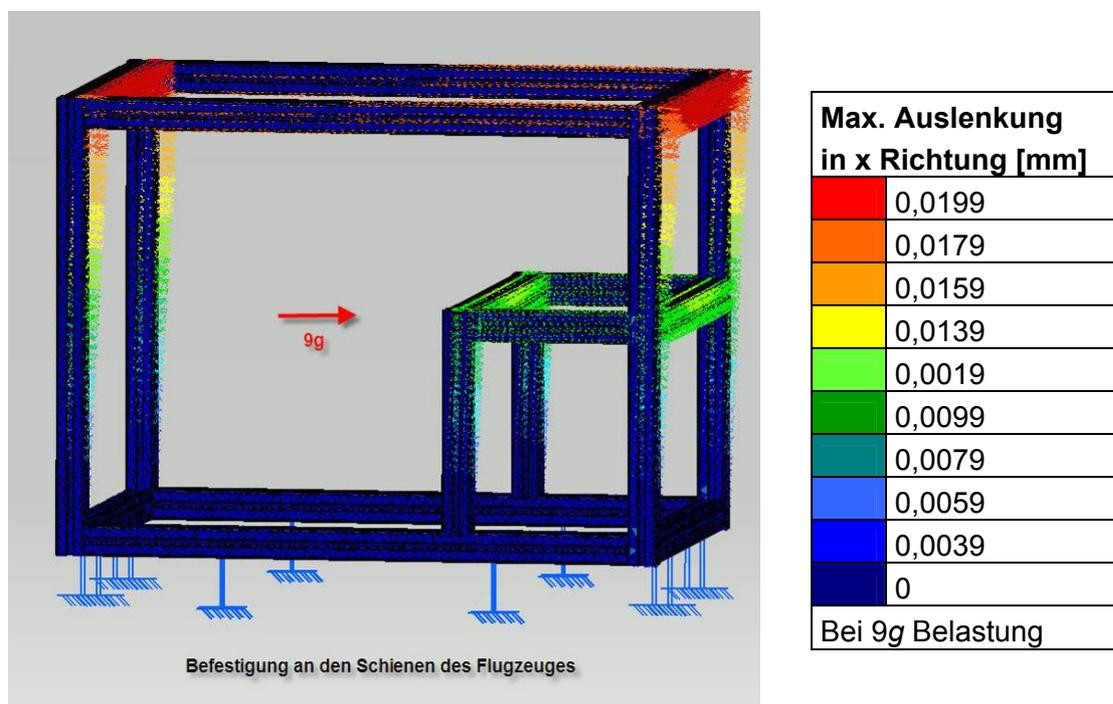
Für eine Zulassung zum Flug musste das Rack die Sicherheitskriterien der Firma Novespace erfüllen. So musste die Versuchsanlage für den Fall eines Aufprallens des Flugzeugs einer Belastung von 9g in x-Richtung standhalten.

Die Berechnungen der Belastungsgrenzen wurden nach den Vorlagen der Sicherheitskriterien von NOVSPACE (Rules and Guidelines for the A300 ZERO-G) durchgeführt. Ein Überblick über die Belastungen und die Sicherheitsfaktoren ist in Tabelle 10 dargestellt. Die detaillierten Berechnungen befinden sich im Anhang (Strukturberechnungen).

**Tabelle 10: Überblick über die strukturellen Daten des Racks.** Berechnungen nach NOVESPACE (Rules and Guidelines for the A300 ZERO-G).  
\*Berechnungen siehe Anhang

ALLGEMEINE DATEN				
	ohne Equipment	mit Equipment		
Masse	52 kg	78 kg		
Dimensionen	1000x700x600mm			
Schwerpunkt	201mm (z- Richtung)			
BELASTUNGEN, SICHERHEITSBERECHNUNGEN				
	Belastung	Strukturelle Belastung unter 9 g	Maximale erlaubte Belastung	Sicherheitsfaktor
Befestigungsschrauben	Scherkraft	$F_s=1721.655\text{N}$	$F_{s\text{max}}=348000\text{ N}$	SF=20.21
	Zugkraft	$F_{\text{tot}}=29057\text{ N}$	$F_{\text{adm}}=58000\text{ N}$	SF=2
Senkrechte Profile	Biegemoment	$M_b=346000\text{ N}$	$M_{b\text{max}}=1125000\text{ N}$	SF=3.3

Für den schlimmsten Fall, den eines Aufpralles des Flugzeugs, wurde eine Belastung von 9 g in x-Richtung auf die Struktur des Racks in Catia V5 simuliert (Abb. 36).



**Abb. 36: Maximale Auslenkung des Racks bei 9 g Belastung**

## 7 Evaluierung

Zur Evaluierung der konstruierten Hardware wurden folgende Methoden herangezogen:

1. Überprüfung der generellen Kriterien anhand der vorher erstellten Anforderungsliste
2. Testung der Funktionalität der Hardware:
  - Die Heizbox wurde mit Hilfe eines Temperaturloggers getestet.
  - Die Signalmessung im Klinostaten wurde mittels einer chemischen Leuchtreaktion getestet.
  - Mit denselben Chemikalien wurde anschließend eine mechanische Kontrolle durchgeführt um den Einfluß von Vibrationen durch die Rotation des Motors auszuschließen
  - Schließlich wurden die biologischen Messreihen mit Zellen durchgeführt siehe Kapitel 9 .

### 7.1. Evaluierung des Anforderungslisten (Aufgabe A-C)

Nach abgeschlossener Konstruktion des Gerätes (PMT Klinostat) wurden nun die einzelnen Punkte der zu Anfangs erstellte Anforderungsliste zur Evaluierung herangezogen (s. Tabelle 11).

**Tabelle 11: Evaluierung der erstellten Anforderungsliste des PMT Klinostaten, Auszug.** Die jeweilige Umsetzung ist in der sechsten Spalte beschrieben. Vollständige Ausarbeitung Horn 2009a

	PRODUKT PMT KLINOSTAT	DATUM		
PRODUKTENTWICKLUNG	<b>ANFORDERUNGEN</b>			<b>QUELLEN VERANT- WORTLICH</b>
	<b>NR.</b>	<b>BESCHREIBENDE ANGABEN</b>	<b>ZAHLENANGABEN/BEMERKUNGEN</b>	<b>ERGEBNIS</b>
	1	Zielstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entwicklung einer Moduleinheit zur Lumineszenzmessung bei gleichzeitiger Rotation der Proben</li> <li>• Messung der biologischen Lichtsignale</li> <li>• Rotation der Proben</li> </ul>	gewährleistet
	2	Umgebungsbedin- g-ungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatur: 0-40°C, in der Regel 37 °C</li> </ul>	gewährleistet

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luftfeuchtigkeit 0-100%, in der Regel 95%</li> </ul>		
	3	Zu erzielende Parameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitivität: 350 – 600 nm</li> <li>• Rotation mit 0 – 100 UpM</li> <li>• flexible und stufenlose Änderung der Rotationsgeschwindigkeit</li> </ul>		300-600 nm 0->100 UpM
	4	Masse der Experiment-module	Maximal 4 kg		gewährleistet m<3000g
	5	Montage der Proben	Leichte, aber trotzdem stabile Fixierung der Proben in 30s, 1 Person		gewährleistet
	6	Energieversorgung	Netzteil für Sensor und Motor		gewährleistet

- 
- 
- 

<b>PRODUKTENTWICKLUNG</b>	12	Weitere Anforderungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Konstruktion soll als eine Einheit aus- bzw. einbaubar sein</li> <li>• Vermeidung von Streulicht</li> <li>• überlappende Anordnung der Wandsegmente</li> <li>• kostengünstig (&lt; 5000 €)</li> <li>• Konstruktion einer transportablen Einheit zur flexiblen Verwendung</li> <li>• möglichst ähnlicher Versuchsaufbau zum späteren Weltraumexperiment (gleiche Messmethode, ähnlich Sensoren)</li> <li>• identischer Versuchsaufbau zum späteren Weltraumexperiment</li> </ul>		gewährleistet  gewährleistet gewährleistet gewährleistet (K. ~4000 €) gewährleistet  gewährleistet nicht gewährleistet
---------------------------	----	-----------------------	--	--	---

Alle Festforderungen konnten erfüllt werden. Das einzige nicht erfüllte Kriterium war das eines identischen Aufbaus zum späteren Weltraumexperiment. Aus Kostengründen war dies leider nicht realisierbar, da allein die Materialkosten der vier Sensoren das Budget überstiegen hätten. Es wurde daher auf einen möglichst ähnlichen Aufbau Wert gelegt und nur eine Messküvette, anstelle der vier im Flugmodell, verwendet. Der Sensor entspricht einem im Breadboard des SM verwendeten Sensortyps und ist sehr ähnlich zu den später im Flug verwendeten Sensoren. Messmethode und Dauer der Messung entsprechen dem späteren Flugversuch (Kapitel 9.8.1.3).

Die Anforderungslisten der Heizbox und des Parabelflugracks (Aufgaben B und C) wurden entsprechend evaluiert (Vollständige Ausarbeitung Horn 2009a). Alle Festforderungen konnten erfüllt werden.

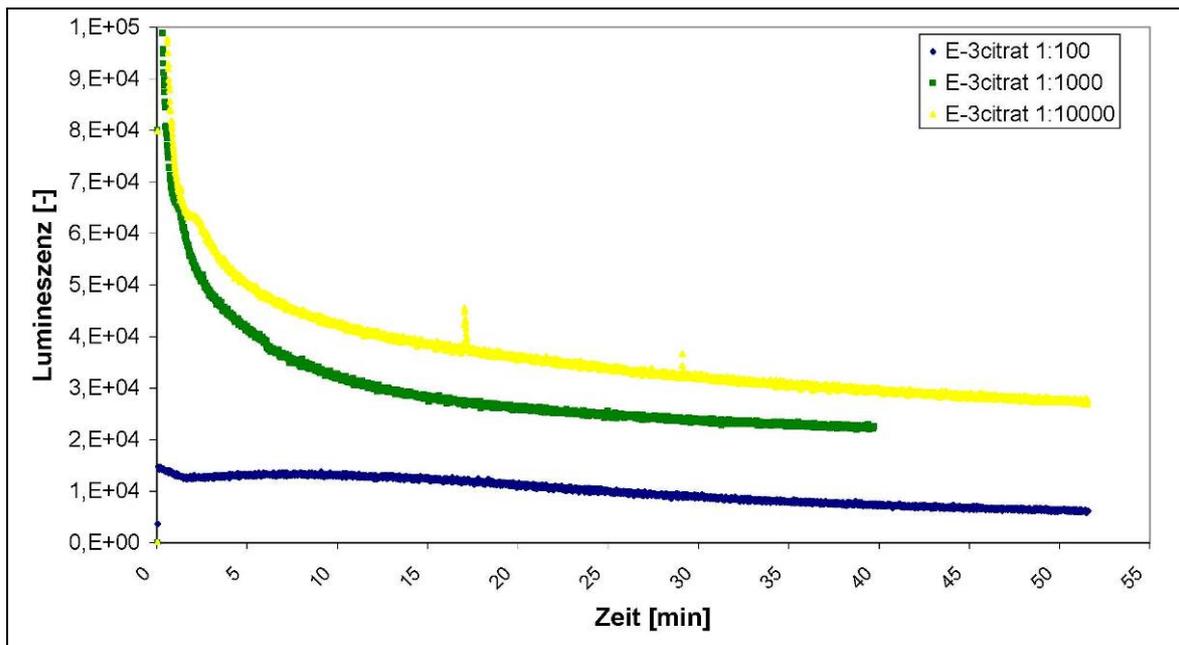
Die Tests der Funktionalität der Heizbox und einer ausreichenden Signalmessung des Photomultipliers sind in den folgenden zwei Kapiteln beschrieben.

## **7.2. Signalmessung (Aufgabe A)**

Die Sensitivität des Photomultipliers ist einerseits durch die Herstellerdaten gegeben, andererseits wurde sie mit Leuchtdioden von EADS Astrium bereits ausführlich am Breadbord des Science Models getestet und konnte daher als gewährleistet angesehen werden (detaillierte Beschreibung der Funktionsweise der PMTs und deren Kalibrierung s. Kapitel 8.2).

Um den PMT Klinostaten zu überprüfen wurden Lumineszenzen in der Höhe der Zellsignalstärke mit chemischen Substanzen nachgestellt. (benötigte Mischverhältnisse und Chemikalien: persönliche Information K. Huber).

Um sicher zu sein, dass später alle Signale erfasst werden können, wurden Leuchtstärken der Chemikalien gewählt, die um den Faktor 10 bis 100 niedriger waren als die zu erwartenden Signale der Zellen. Die Substanzen wurden in die Messküvette gefüllt und die Signale gemessen. Damit konnte die Funktionalität des Gerätes bei möglichst versuchnahen Bedingungen getestet werden.



**Abb. 37: Test der Signalmessung mit Hilfe einer chemischen Leuchtreaktion**

Abb. 37. zeigt ein Beispiel dieser Testreihen. Getestet wurde die Reaktion von Luminol in Gegenwart von Eisenzitat und Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Die genauen Bezeichnungen und die Bezugsfirma der verwendeten Chemikalien ist in Kapitel 9.1 aufgelistet.

Folgende Lösungen wurden pro Messküvette verwendet.

- 165 µl Luminollösung
- 230 µl Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung
- 560 µl Ammonium Eisen-3 Zitat Lösung

Die Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

#### Luminollösung:

Stock: Luminol in DMSO (100 mM)

17.7 mg Luminol in 1000 µl DMSO

Die Lösung wurde zu je 100 µl aliquotieren (6 Monate bei -20 °C lagerbar)

vor Gebrauch

100 µl Stock + 500 µl H<sub>2</sub>O + 500 µl NaOH (5 %)

(ist innerhalb weniger Stunden zu verwenden, da Luminol zerfällt)

Ammonium Eisen 3 Ziträt:

Es wurde eine gesättigte Lösung hergestellt und diese mit destilliertem Wasser auf die gewünschte Verdünnung (1: 100, 1:1000 bzw. 1:10000) eingestellt.

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):

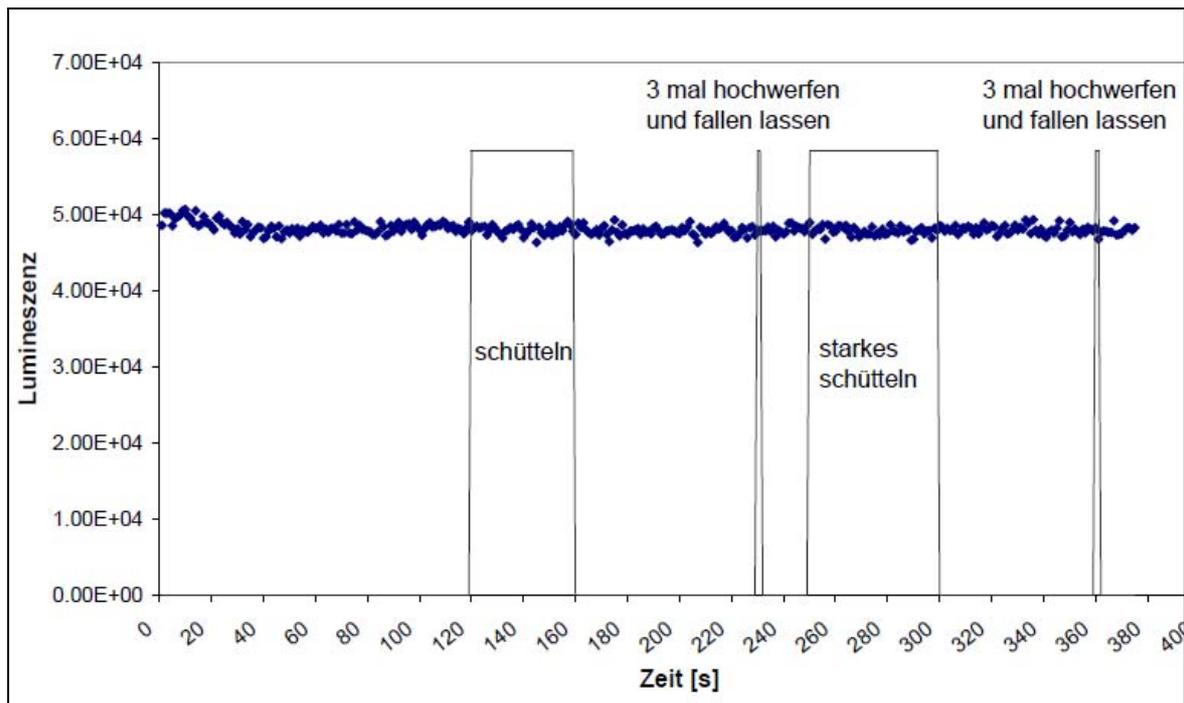
0,3% Lösung

In die Messküvette wurden jeweils 560 µl der Ammonium Eisen-3 Ziträt Lösung, 165 µl der Luminollösung und 230 µl der Wasserstoffperoxidlösung gefüllt.

Nach einem Anfangspeak, initiiert durch die Zugabe des Oxidationsmittels, ist ein stabiles Signal auch über einen Zeitraum von mehr als 50 Minuten zu messen. Alle drei Signalstärken konnten ohne Probleme detektiert werden. Da diese weit unter der Signalstärke der Zellen lagen (Faktor 10 bis 100 niedriger) ist davon auszugehen, dass die „biologischen“ Signale in der Hardware gut messbar sind.

Bei einigen Versuchen, z.B. während des Parabelfluges und auf der Zentrifuge, sind Vibrationen zu erwarten. Daher musste eine Signaländerung aufgrund eines mechanischen Effektes ausgeschlossen werden. Ebenso musste sichergestellt werden, dass sich die Signalstärke nicht allein durch Drehung des Klinostaten verändert.

Für eine mechanische Kontrolle wurden wiederum die hergestellten Chemikalien in die Küvette gefüllt und die Reaktionsstärke gemessen. Dabei wurde die Ammonium Eisenzitratlösung mit der Verdünnung 1:1000 verwendet. Nach Erreichen des stabilen Signals, nach ca. 15 min (Abb. 37), wurde der Klinostat mehrfach stark geschüttelt und hochgeworfen (mechanische Kontrolle) und bei einer weiteren Messreihe mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten (Motorkontrolle) gedreht.



**Abb. 38: Mechanischer Test mit Chemikalien**

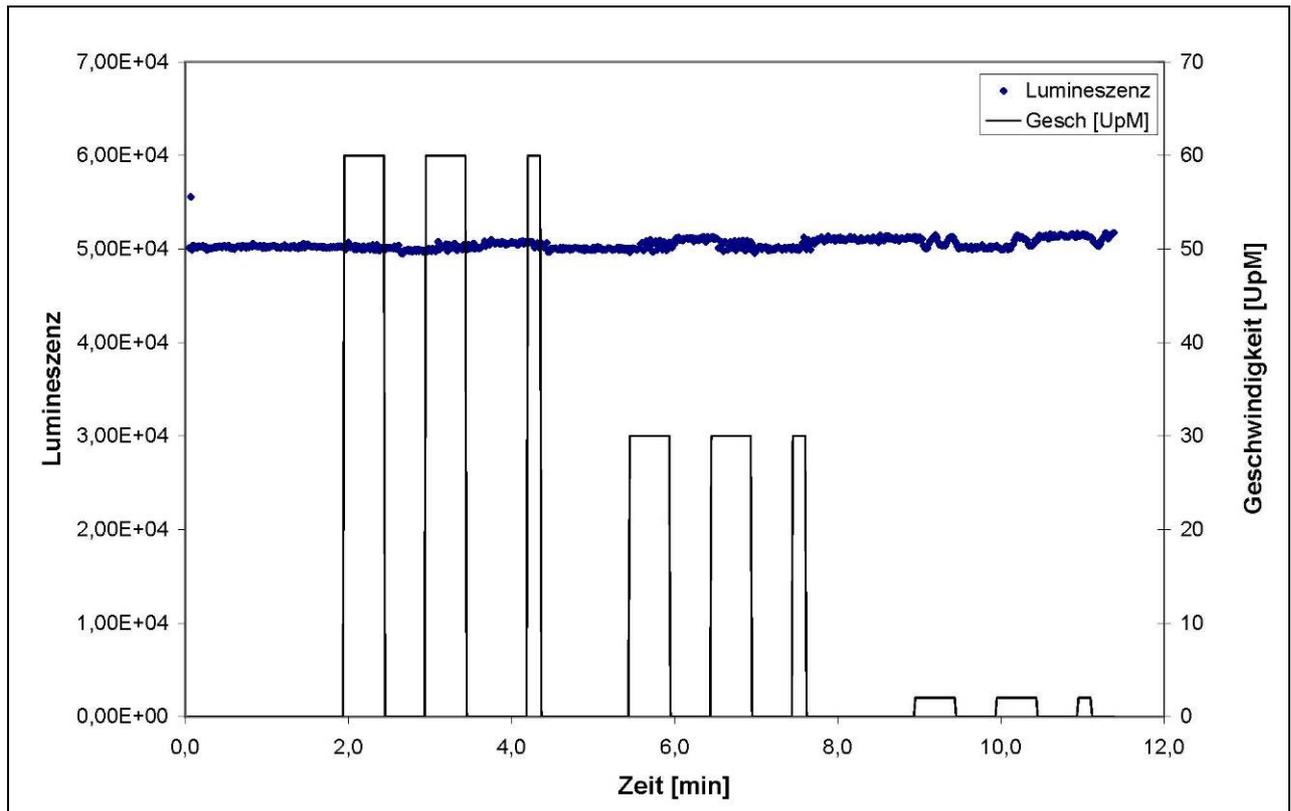
Abb. 38 zeigt das Ergebnis eines solchen Tests mit starken mechanischen Einflüssen.

Das Signal zeigt keinerlei Veränderungen durch die mechanische Stimulation. Weder Schütteln noch mehrmaliges Hochwerfen haben einen Einfluss auf die Lumineszenz.

Abb. 39 zeigt das Ergebnis des Rotationstests. Es wurde jeweils für 30 bzw. 10 Sekunden rotiert. Dabei wurden drei Geschwindigkeiten getestet (60, 30 und 2 UpM). Bei 60 UpM zeigt sich keinerlei Einfluss auf das Signal.

Bei 30 und 2 UpM sind leichte Unregelmäßigkeiten zu erkennen, wahrscheinlich verursacht durch die Durchmischung der Chemikalien. Die maximale Abweichung beträgt jedoch max. 1% der Signalstärke (500 bezogen auf  $5 \times 10^4$  Signale/s).

Die Tests zeigen, dass weder durch die Rotation des Klinostaten noch durch die mechanische Stimulation ein nennenswerter Einfluss auf die Signalmessung erkennbar ist.



**Abb. 39: Rotationstest mit Chemikalien**

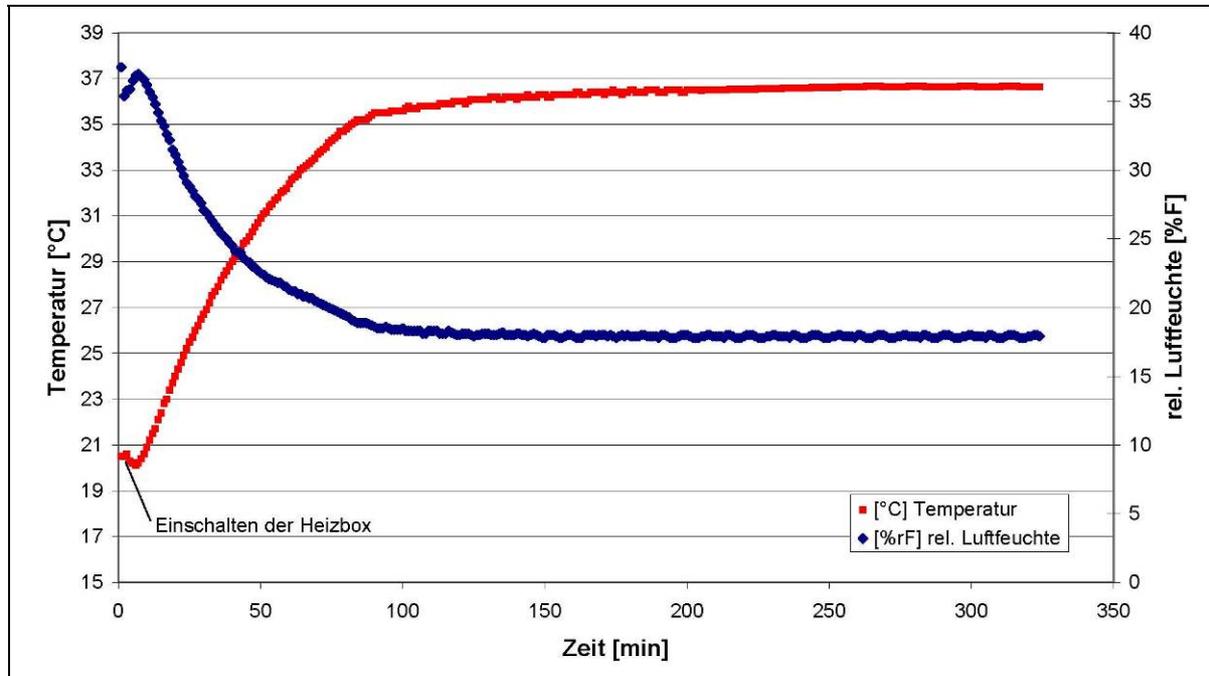
Nach den mechanischen Kontrollversuchen wurde mit der Durchführung der biologischen Bodenexperimente begonnen, die in den Kapiteln 9 bis 11 beschrieben sind.

### 7.3. Funktionalität der Heizbox (Aufgabe B)

Die Funktionalität der Heizbox (Aufgabe B) wurde mit Hilfe eines Temperaturloggers überprüft. Dieser wurde in die ausgeschaltete Box gelegt. Die Temperatur wurde während des Aufheizens und anschließend für fünf Stunden aufgezeichnet. Eine Messung erfolgte dabei jede Minute. Die Raumtemperatur außerhalb der Heizbox betrug 20,5 °C.

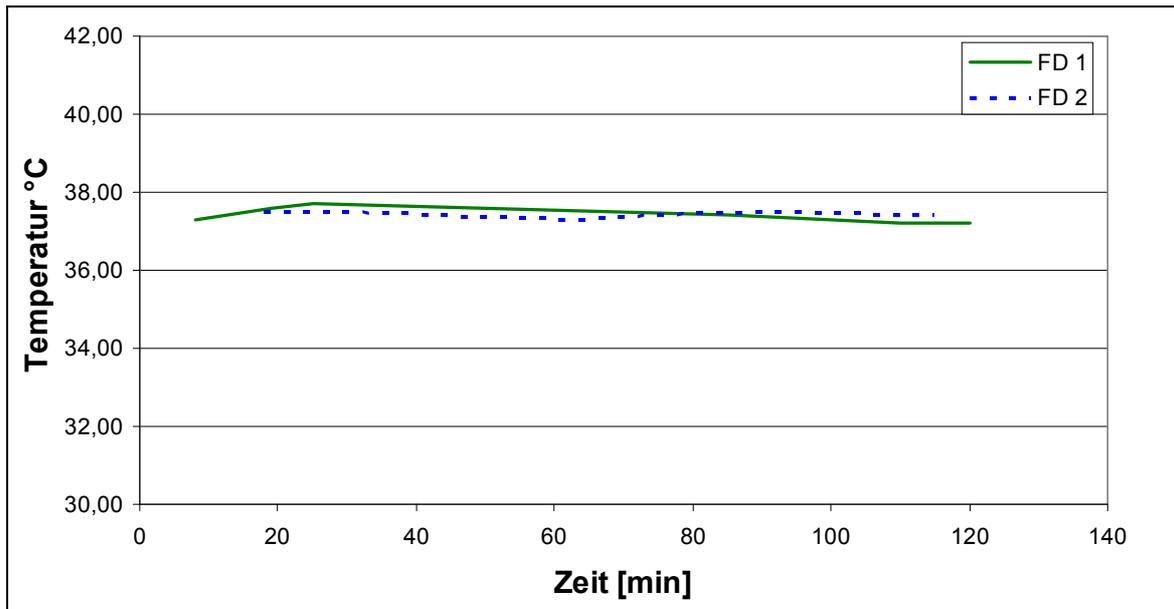
Das Ergebnis der Messung mit zusätzlicher Messung der Luftfeuchte ist in Abb. 40 dargestellt. Anfänglich erfolgt ein kurzes Absinken der Temperatur, da mit Einschalten der Heizelemente der Lüfter anspringt und die noch kalte Luft um den Metallblock verteilt. Nach etwa 200 min ist die Temperatur von 36,5 °C erreicht und bleibt innerhalb der Box konstant. Die Luftfeuchte sinkt entsprechend dazu ab.

Die Graphik zeigt, dass das Aufheizen und das Beibehalten einer konstanten Temperatur unter alleiniger Verwendung der Heizelemente möglich sind. Dieser Prozess dauert jedoch mehr als 2 Stunden. Um das Aufheizen zu beschleunigen, wurde die Luft durch mit heißem Wasser gefüllte Wärmeflaschen vorgewärmt.



**Abb. 40: Temperaturverlauf nach Einschalten der Heizbox**

Während des Parabelfluges wurde die aktuelle Temperatur während eines Flugtages mehrmals aufgezeichnet (siehe Abb. 41). Gezeigt ist der Temperaturverlauf an zwei aufeinander folgenden Flugtagen.



**Abb. 41: Temperaturverlauf während des Parabelfluges an zwei Flugtagen**

Abb. 41. zeigt erneut dass die erwünschte Temperatur von 37°C erreicht werden konnte und auch während des dreistündigen Fluges konstant blieb. Die geringen Schwankungen entstehen durch das Öffnen und Schließen der Box (bedingt durch den Wechsel der Proben) während des Fluges. Aufgabe B, die Konstruktion einer Heizbox, konnte auch erfüllt werden.

## 8 Kalibrierung der Photomultiplier im Science Model

Ein wichtiger Teil der Arbeit war die Kalibrierung der Photomultiplier im TRIPLE LUX Science Model (Aufgabe D). Diese Arbeit wurde bei EADS Astrium, Friedrichshafen, durchgeführt.

Aus Zeitgründen konnte nur ein Teil der gesamten Kalibrierung in diese Arbeit einfließen. Die Kalibrierung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Duncan Goult und Markus Franz durchgeführt, welche den Kalibrierungsprozess auch zu Ende geführt haben und die Fertigstellung der Hardware bis zum vorgesehenen ISS Flug begleiten werden.

### 8.1. Grundlagen

#### 8.1.1. Äußerer Photoeffekt

Die Grundlagen des Photoeffektes gehen auf Einsteins Gleichung zurück.

Mit Hilfe der Formel 4 kann die Maximalenergie eines emittierten Photons berechnet werden:

$$E = \frac{1}{2}mv^2 = h\nu$$

**Formel 4**

mit  $m$  = Masse [kg],  $v$  = Geschwindigkeit [m/s<sup>2</sup>],  $\nu$  = Frequenz [1/s],  $h$  = Plancksches Wirkungsquantum ( $h = 6,626 \times 10^{-34}$  [Js]) und  $E$  = Energie [J]

Die Formel besagt dass die maximale Energie des emittierten Photons direkt proportional zu der Energie des abgegebenen Lichtquants und damit zu dessen Wellenlänge ist.

Diese Energie muss genauso groß sein wie die Energie, die benötigt wird, damit das Elektron aus der Oberfläche des Metalls geschlagen werden kann. Das heißt sie entspricht in etwa der Energie der Valenzelektronen auf der äußersten Schale.

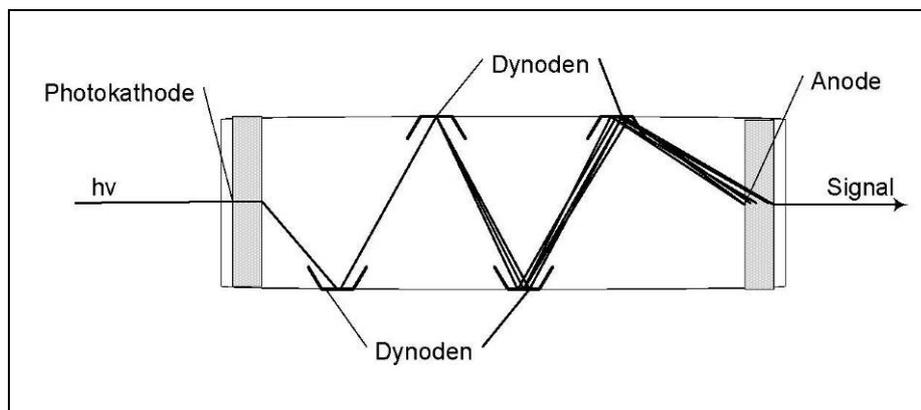
Die Energie wird in Elektronenvolt angegeben (eV) und ist für jedes Material charakteristisch, ebenso wie die Farbe des abgegeben Lichtquants (Meschede 2004, Paul und Mosca 2007).

### 8.1.2. Photomultiplier Prinzip

Abb. 42 zeigt eine Skizze des Wirkungsprinzips eines Photomultipliers.

Nach einem schmalen Eintrittsfenster folgt eine *Photokathode*. Diese besteht aus einem Material mit nur schwach gebundenen Valenzelektronen (Austrittsarbeit wenige eV) z. B. Cs-I oder Bialkali (Sb-Rb-Cs, Sb-K-Cs). Fast jedes einfallende Photon erzeugt somit, durch den Photoeffekt ein Elektron. Hinter der Kathode sind eine Reihe so genannter *Dynoden* angebracht, wobei das Potential von Dynode zu Dynode um ca. 100 bis 200 V ansteigt.

Dadurch beschleunigt jede Dynode die erzeugten Elektronen bis zur nächsten und fügt durch Sekundäremission ein Vielfaches an weiteren Elektronen hinzu. In einem Photomultiplier befinden sich, je nach gewünschter Signalverstärkung, zwischen 6 bis 14 solcher Dynodenstufen. Damit ist eine Gesamtverstärkung  $G_{\text{gesamt}} = G^n$  ( $n$ : Anzahl der Stufen) von  $10^3$  bis  $10^8$  möglich. Am Ende wird das Signal an einer Anode aufgefangen (Sze 1981, Hamamtsu 2001, 2006).



**Abb. 42: Schema Photomultiplier**

## 8.2. Photomultiplier Charakteristiken

### 8.2.1. Photonenmessung

Eine Methode einen PMT zu nutzen ist das Zählen einzelner ankommender Photonen. Selbst bei den besten PMTs wird nur etwa ein Drittel der ankommenden Photonen auch detektiert. Diese Methode setzt voraus, dass die Rate der ankommenden Photonen kleiner ist als die Zeit der Output Pulslänge des PMTs. Kommen mehrere Photonen innerhalb dieser Zeit an, so wird nur das erste detektiert.

Das Zählen einzelner Photonen ist daher eine gängige Methode, wenn es um die Messung von relativ niedrigen Signalen geht, wie z. B. in der Raman-Spektroskopie, Astronomischen Photometrie oder der Biolumineszenz Messung (Hamamatsu, 2006).

### 8.2.2. Gain

Der Gain ist der Verstärkungsfaktor, der durch die Sekundäremissionen der Dynoden erreicht wird.

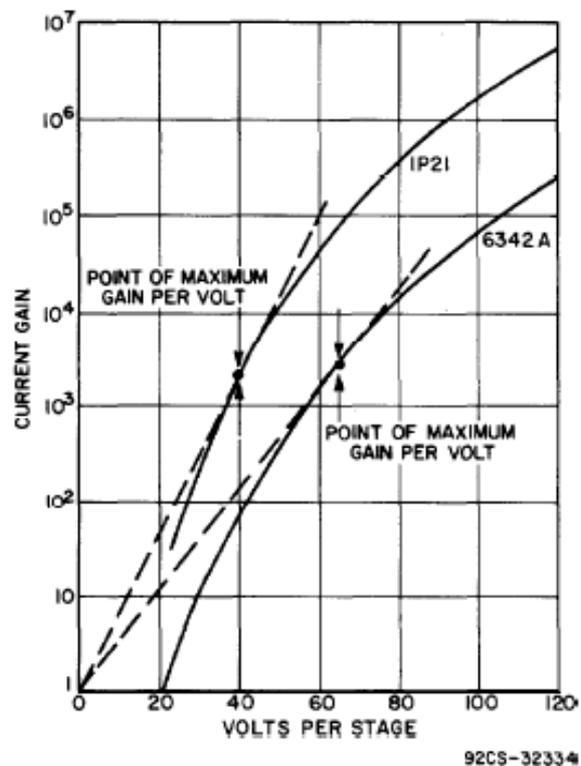
Der maximale Gain ist daher

$$G = \delta^n,$$

wobei  $n$  die Anzahl an Dynoden und  $\delta$  der Verstärkungsfaktor an jeder Dynode ist (Anzahl emittierter Sekundärelektronen pro einfallende Elektronen/Photonen).

Theoretisch müsste daher der Gain immer genau ein Vielfaches der eingegangenen Photonen sein, abhängig von der Anzahl der Dynoden. In der Praxis kann es sein, dass einige Elektronen nicht alle Dynoden passieren, oder aber sich verlaufen, da sie auf unwirksame Zonen in dem Dynodenmaterial treffen (Hamamatsu 2001, 2006).

Üblicherweise wird der Gain als eine Funktion der angelegten Spannung beschrieben.



**Abb. 43: PMT Gain im Verhältnis zu angelegter Spannung, aus Hamamatsu (2001)**

Abb. 43 zeigt ein solches spannungsabhängiges Verhältnis auf einer halblogarithmischen Skala für zwei verschiedene Photomultiplier.

Die Abbildung zeigt auch, wie wichtig es ist, den PMT mit einer gut regulierten Spannung zu betreiben, da kleine Spannungsunterschiede das Ergebnis durch den Unterschied im Verstärkungsfaktor stark verfälschen können.

### 8.2.3. Quantenausbeute

Die Quantenausbeute  $\eta$  ist ein Maß für die Kathode eines Photomultipliers. Es ist die Anzahl der von der Photokathode emittierten Photoelektronen, geteilt durch die Anzahl der eintreffenden Photonen.

$$\eta = \frac{\#emitiertePhotonen}{\#gezähltePhotonen}$$

Formel 5

Die Quantenausbeute gibt daher an, welcher Bruchteil der auf einen Photodetektor fallenden Photonen vom Material absorbiert und in freie Elektronen umgewandelt wird. Fallen  $n$  Photonen pro  $\text{cm}^2$  und Sekunde auf das Material, tragen  $\eta \times n$  nach der Verstärkung durch die Dynoden zum Signal bei.

Die Quantenausbeute ist abhängig von

- dem Detektormaterial
- den Abmessungen des Detektors
- der Photonenwellenlänge  $\lambda$

Bei den besten Photokathoden beträgt  $\eta$  ca. 30%, beim Maximum der Empfindlichkeit (Hamamatsu 2001, 2006).

### 8.2.4. Dunkelstrom

Der Dunkelstrom der Anode ist der relativ geringe Strom, der an photosensitiven Sensoren wie Photomultipliern oder Photodioden anliegt, selbst wenn keinerlei Licht auf den Detektor trifft. Physikalisch ist der Dunkelstrom das zufällige Auftreten von Löchern und Elektronen in der Raumladungszone (Sperrschicht) des Sensors.

Es gibt verschiedene Ursachen für Dunkelstrom innerhalb eines PMTs. Die Hauptursache ist die Auslösung von Elektronen an der Kathode durch Wärmebewegungen im Metall (Sze, 1981, Hamamatsu 2001, Hamamatsu 2006).

Da jedes emittierte Primärelektron an der Kathode durch die Sekundäremissionen multipliziert wird, ist der erhaltene Output in der Größenordnung eines Elektrons multipliziert mit dem Verstärkungsfaktor (Gain) des PMTs.

Diese Elektronenemission ist abhängig von der Temperatur, erfolgt aber zufällig. Daher ist es nicht möglich, diese Art des Dunkelstroms aus dem Signal herauszufiltern.

Der Dunkelstrom und das mit ihm einhergehende thermische Rauschen ist folglich eine der Hauptursachen für elektrisches Rauschen und der limitierende Faktor bei der Messung von niedrigen Signalen (Hamamatsu 2006).

Andere Faktoren für thermisches Rauschen sind das Schrotrauschen durch Fluktuationen in den freien Ladungsträgern und das  $1/f$  Rauschen proportional zur Frequenz, welches noch nicht näher erforscht ist (Hamamatsu 2006).

### **8.2.5. Schock und Vibration**

Die meisten handelsüblichen PMTs überstehen nur kleinere Erschütterungen und Vibrationen ( $\leq 10 g$ , Hamamatsu 2001). Für spezielle Anwendungen in extremer Umgebung gibt es PMTs die bei bis zu 30 bis 1500g noch funktionstüchtig sind. Aus diesem Grund empfiehlt es, sich exzessive Stöße und Vibrationen zu verhindern. Sollte dies nicht möglich sein, muss gegebenenfalls eine Dämpfung integriert werden (Hamamatsu 2001).

Die im Flug Model verwendeten PMTs müssen in der Lage sein, einen Shuttlestart mit Vibrationen zwischen 2 bis 3 g (Linnarsson *et al.* 1998) unbeschadet zu überstehen. Beim Start sind alle experimentspezifischen Instrumente ausgeschaltet, so dass lediglich eine nachhaltige Beschädigung der Sensoren verhindert werden muss. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die Vibrationen beim Start die Voreinstellungen verändern. Eine Möglichkeit zur Fernkalibrierung ist daher sinnvoll. Der PMT Klinostat sollte auch auf einer Zentrifuge und während eines Parabelfluges in Betrieb genommen werden können. Folglich muss der Sensor in der Lage sein, trotz auftretender Vibrationen zu operieren. Dass die Vibrationen im Flugzeug keinen Einfluss auf den Signaloutput des PMTs haben, ist in den Kapiteln 7.2 und 10.1.1 beschrieben.

### **8.2.6. Magnetische Felder**

Magnetfelder können einen Einfluss auf den Signaloutput eines PMTs haben:

In Photomultipliern bewegen sich schwach energetische Elektronen im Vakuum. Diese können daher leicht von Magnetfeldern abgelenkt werden und erreichen die erste Dynode dadurch langsamer oder überhaupt nicht. Die Anodensensitivität ist schon bei Magnetfeldern von 0.1 T bis zu Millitesla bei vielen Photomultipliern um bis zu 50% reduziert (Hamamatsu 2006). Zur Verwendung von Photomultipliern in der Nähe von Magnetfeldern wird daher der Sensor besonders geschützt, einerseits durch die Verwendung von speziellen Dynodentypen (Netz-Typ) und andererseits durch das Anbringen einer magnetischen Schutzhülle (Hamamatsu 2006).

Da in der Biolab Hardware auch ein magnetischer Rührer zur Vermischung der Zellen zum Einsatz kommt, wurde bei den im SM und im Klinostaten verwendeten

Photomultipliern darauf geachtet, dass die verwendeten Sensoren unempfindlich gegenüber Magnetfeldern sind.

### **8.3. Photomultiplier im Sience Model**

Im Sience und Flight Model wurden/werden Photomultiplier des Typs R7400P der Marke Hamamats (Japan, Hamamatsu) verwendet. Dies ist ein Photomultiplier mit 8 Dynoden-Stufen und einem Isolationsschutz über dem Metallgehäuse des Sensors. Integriert ist außerdem ein Schaltkreis zur Hochspannungserzeugung. Mit dem Gehäuse ist der Sensor 22x22x50 mm groß. Der Messbereich liegt zwischen 300 und 650 nm. Das Messfenster ist aus Borosilicat, der Kathodentyp besteht aus Bialkali.

Der hier verwendete Typ R7400P wurde speziell für das Zählen einzelner Photonen bei sehr geringen Lichtstärken entwickelt.

Ein weiterer Vorteil dieses PMTs ist die Unempfindlichkeit gegenüber Magnetfeldern (Hamamatsu, Tech. Info. 1998).

Die Einstellungen für den Verstärkungsfaktor (Gain) und der Eingangsspannung können variiert werden. Dadurch ist es möglich den Photomultiplier optimal auf die gewünschte Messung einzustellen.

### **8.4. Photomultiplier im Klinostaten**

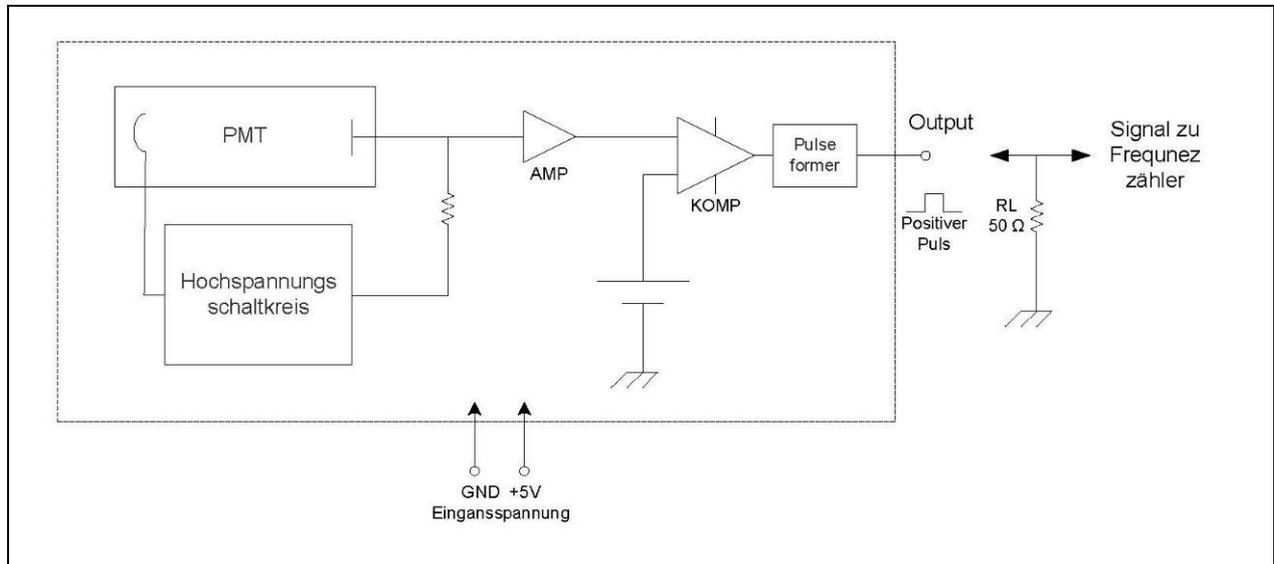
Der im Klinostaten verwendete Photomultiplier ist Typ H7155, ebenfalls von der Marke Hamamatsu (Japan, Hamamatsu). Er besitzt auch einen Isolationsschutz und hat mit dem Gehäuse die Dimensionen 50x22x50 mm. Integriert ist ebenfalls ein Schaltkreis für Hochspannungsgenerierung.

Genau wie bei dem im Sience Modell verwendeten PMTs liegt der Messbereich zwischen 300 und 650 nm. Das Messfenster ist ebenfalls aus Borosilikatglas, der Kathodentyp besteht aus Bialkali. Betrieben wird der Sensor mit 5 V Eingangsspannung (Hamamatsu Tech, Info. 1998).

Alle Einstellungen (Gain, Eingangsspannung etc.) sind im Optimum voreingestellt, es ist jedoch nicht möglich, diese nachträglich zu verändern.

Abb. 44 zeigt die in beiden Photomultipliern integrierte Schaltung. An dem PMT selbst liegt eine generierte Hochspannung an. Das herausgehende Signal wird nach

einer Verstärkungsstufe (AMP) an einen Komperator (KOMP) gegeben. Dieser vergleicht die erhaltene Spannung mit der gesetzten Mindestspannung, die überschritten werden muss um ein Signal zu messen. Nach einem Pulsshaper wird die gemessene Spannung als einfache Treppenfunktion (step function) an den Frequenzzähler ausgegeben.



**Abb. 44: Blockdiagramm des im PMT integrierten Schaltkreises**

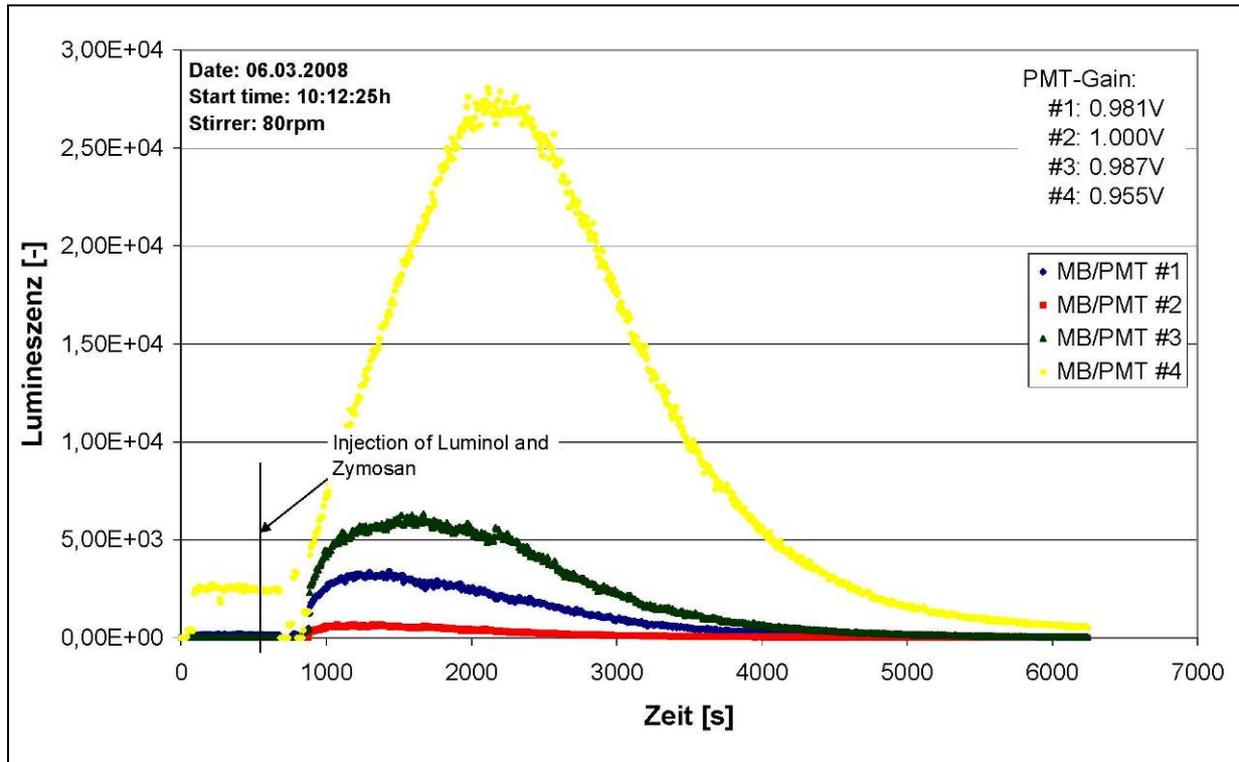
Im Folgenden ist nun ein Auszug der Charakterisierung und Kalibrierung der Photomultiplier des Science Model bei EADS Astrium dargestellt:

### 8.5. Problemdarstellung

Abb. 45 zeigt das Ergebnis eines Science Model Tests mit biologischen Proben zur Messung des Lumineszenz-Verhaltens der Zellen am Anatomischen Institut der Universität Zürich im März 2008.

Gemessen wurde die Lumineszenz in vier Küvetten des TRIPLE LUX Science Models mit Zellen der Makrophagenzelllinie NR 8383 in Medium. Jeder Küvette ist ein Photomultiplier zur Signalmessung zugeteilt. In jeder Küvette befanden sich 2,8 ml Zellen in Medium (Ham F12 (Biochrom), 10% FCS (Biochrom), 0,1% Mercaptoethanol (Gibco) der Konzentration  $c = 3 \times 10^5$ /ml. Nach Messung des Grundsignales wurden jeweils 0,825 ml Luminol (Sigma) und 1,125 ml Zymosan (Sigma) mit Peroxidase (Merck) zugegeben.

Die Proben wurden wie später im Flug vorgesehen behandelt, außer dass die Substanzen (Luminol und Zymosan) nicht mittels des internen Pumpsystems zugegeben wurden, sondern per Hand mit Hilfe einer Spritze.



**Abb. 45: Hardware Test mit dem TRIPLE LUX Science Model, PMT Signal,**  
Graphik von Markus Franz, EADS

Die Zellen wurden gleich behandelt und vor dem Experiment aus derselben Kulturflasche entnommen und auf die erwünschte Konzentration eingestellt. Die Varianz in der Signalstärke sollte daher relativ gering (unter 10%) ausfallen.

Abb. 45 zeigt das Ergebnis der Messung. Alle vier PMTs konnten eine Kurve dedektieren, deren grundsätzlicher Verlauf sich ähnelt, d.h. die Intensität steigt erst an, erreicht nach ca. 1500 s (~ 25 min) einen Höhepunkt und fällt dann wieder ab. Nach ca. 1 Stunde ist die Reaktion abgeklungen. Dies entspricht dem standardmäßigen Verlauf der biologischen Reaktion bei 1 g (siehe Abb. 69).

Die generelle Funktionalität der Hardware ist somit gewährleistet. Die Signalhöhe zwischen den einzelnen Kurven variiert jedoch extrem stark, was auf ein Problem der Sensitivität der vier Photomultiplier hindeutet.

## 8.6. Definieren der Aufgabenstellung – Kalibrierung der Photomultiplier

Die Aufgabe war daher die vier PMTs bei identischem Eingangssignal auf den gleichen Output einzustellen, so dass ein qualitativer Vergleich zwischen den vier

Küvetten möglich ist (Aufgabe C). Zusätzlich sollte der Einfluss der Magnetrührer sowie der verschiedenen Einstellungen des Sensors (Gain, Threshold) und der Temperatur untersucht werden. Tabelle 12 zeigt einen Auszug der erstellten Anforderungsliste an die Kalibrierung.

Anforderungsliste PMT (Science Model):

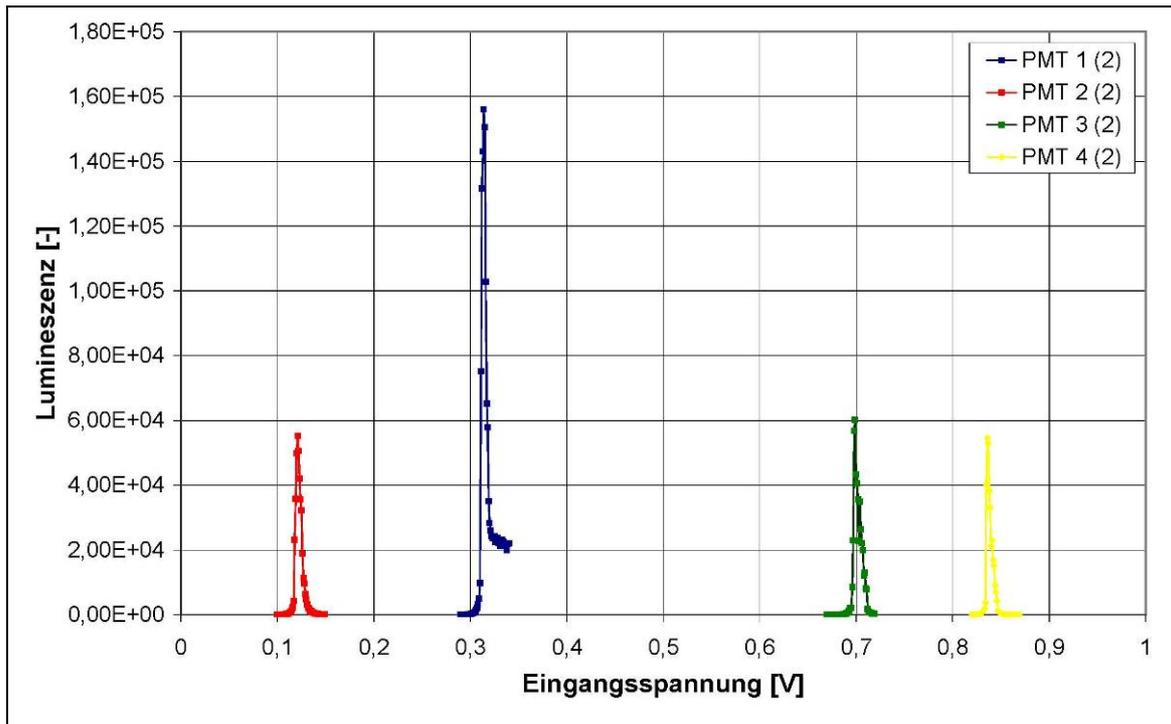
**Tabelle 12: Auszug aus den Anforderungen der PMT, vollständige Ausarbeitung Horn 2009c**

PRODUKT SCIENCE MODEL PMT-KALIBRIERUNG		DATUM		
PRODUKTENTWICKLUNG	ANFORDERUNGEN			QUELLEN
	NR.	BESCHREIBENDE ANGABEN	ZAHLENGABEN/BEMERKUNGEN	VERANTWORTLICH
	1	Zielstellung	Messung der Signal biologischer Proben	
	2	Umgebungsbedingungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Temperatur: 0-40°C, in der Regel 37 °C bzw. 18 °C</li> </ul>	
	3	zu erzielende Parameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sensitivität: 300 – 600 nm</li> <li>unter 10 % Abweichung der Messung zwischen den vier PMTs</li> </ul>	
4	Weitere Anforderungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>kalkulierbarer Einfluss durch die Magnetrührer</li> </ul>		

## 8.7. Kalibrierung

### 8.7.1. Dunkelstrom

Zuerst wurde der Dunkelstrom der Photomultiplier gemessen. Hierzu wurde das gemessene Signal bei völliger Dunkelheit aufgezeichnet, wobei die Eingangsspannung in Schritten von 0,1 V bzw. 0,01 V erhöht wurde. Der Gain betrug 0,8 V für alle PMTs. Abb. 46 zeigt das Ergebnis dieser Messung:



**Abb. 46: Dunkelstrom der vier PMTs, Gain 0,8 V**

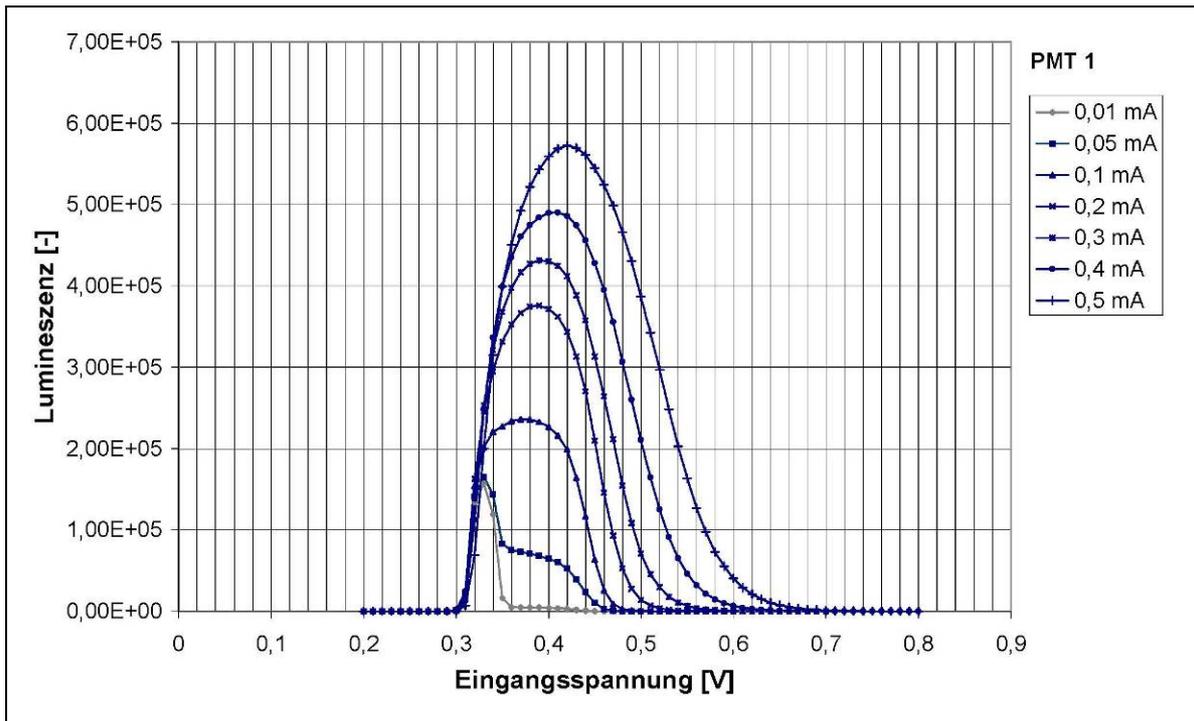
Die PMTs 2, 3 und 4 zeigen einen relativ ähnlichen Verlauf des Dunkelstroms jedoch bei unterschiedlicher Eingangsspannung. PMT 2 hat einen fast doppelt so hohen maximalen Dunkelstrom.

Die Kenntnis der Eingangsspannung, die mit dem Maximum des Dunkelstroms korreliert, ist notwendig für die spätere Einstellung. Bei Messungen genau im Bereich des DCs kann dieser das Signal verfälschen oder überdecken. Für eine gute Signalausbeute sollte daher mit einer Eingangsspannung, die etwas höher als der DC liegt, gearbeitet werden. Dies muss, wie in Abb. 46 ersichtlich, für jeden PMT individuell eingestellt werden.

### 8.7.2. Signalmessung

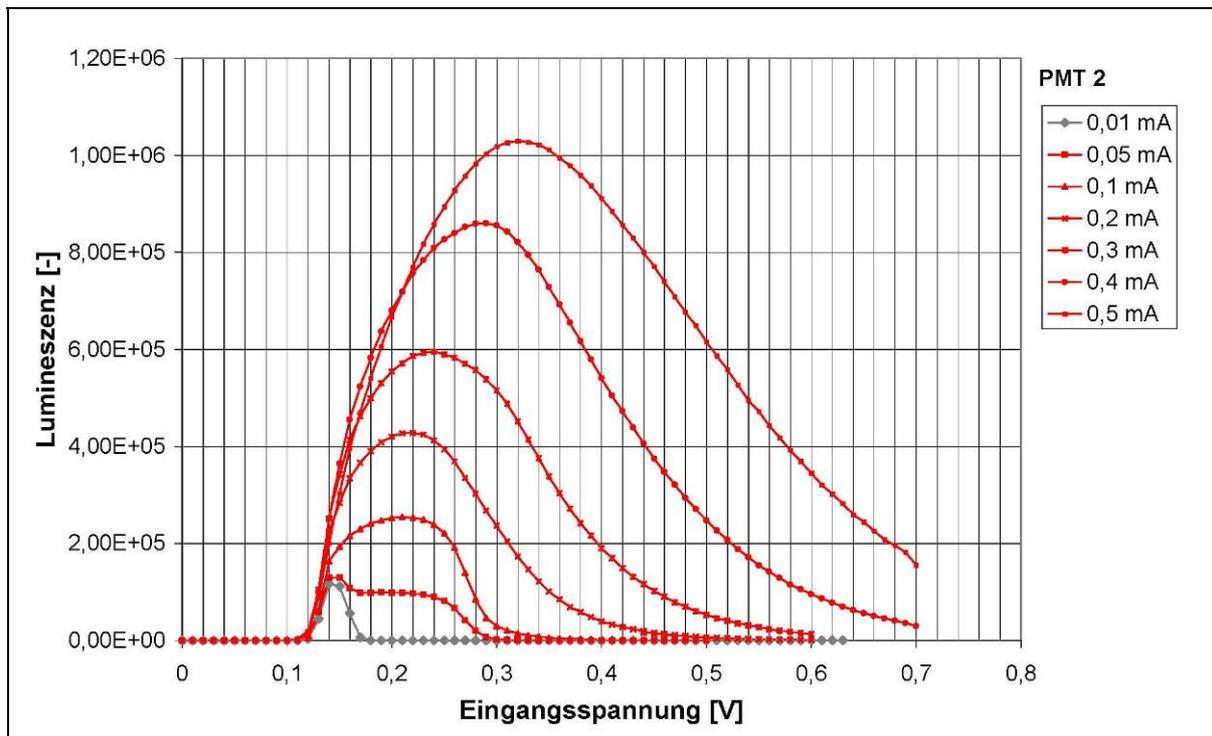
Anschließend wurden die internen LEDs des SMs zur Messung herangezogen.

Das Ausgangssignal wurde bei verschiedenen Lichtintensitäten (0,01 - 0,5 mA) gemessen. Dabei wurde die Eingangsspannung am PMT für jede Lichtintensität stufenweise hoch reguliert. Die graue Kurve (0,01mA) entspricht dabei jeweils dem Dunkelstrom, da die LED bei dieser Spannung gerade noch nicht leuchtet (s. Abb. 47 - Abb. 50).



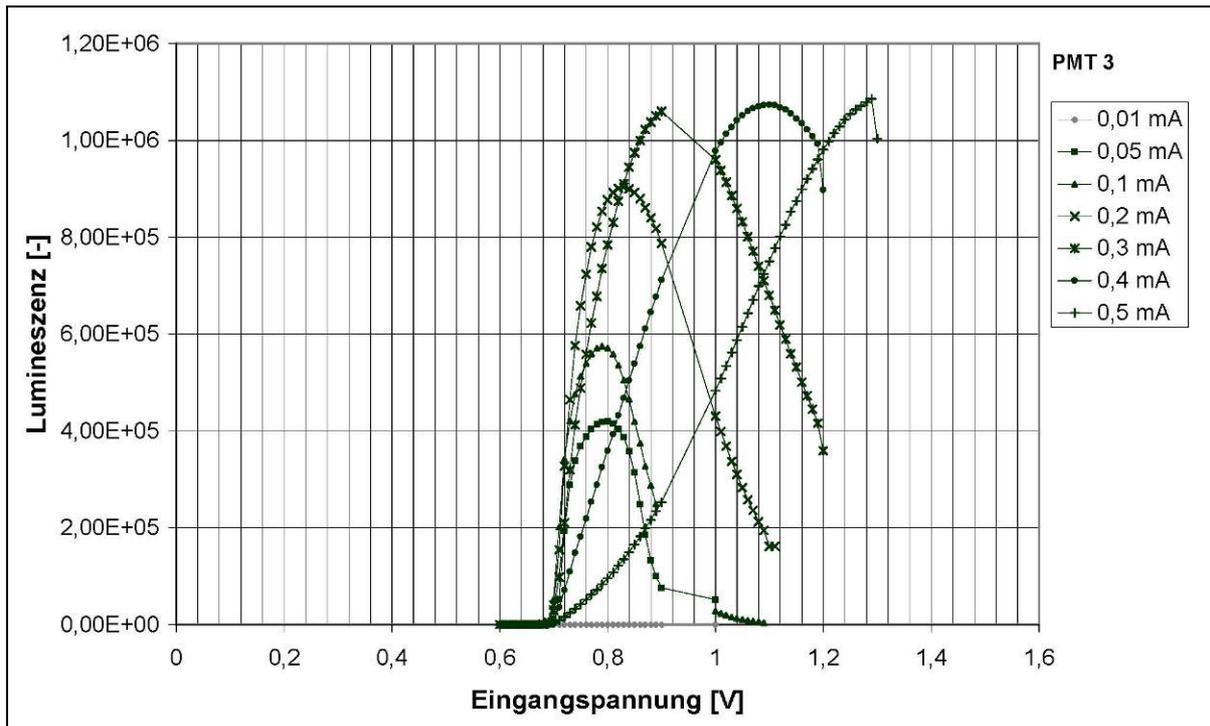
**Abb. 47: Signalstärke bei variierender Lichtintensität, PMT 1**

Die Eingangsspannung an der LED und damit die Leuchtstärke wurde schrittweise hochreguliert, die graue Kurve entspricht dem Dunkelstrom



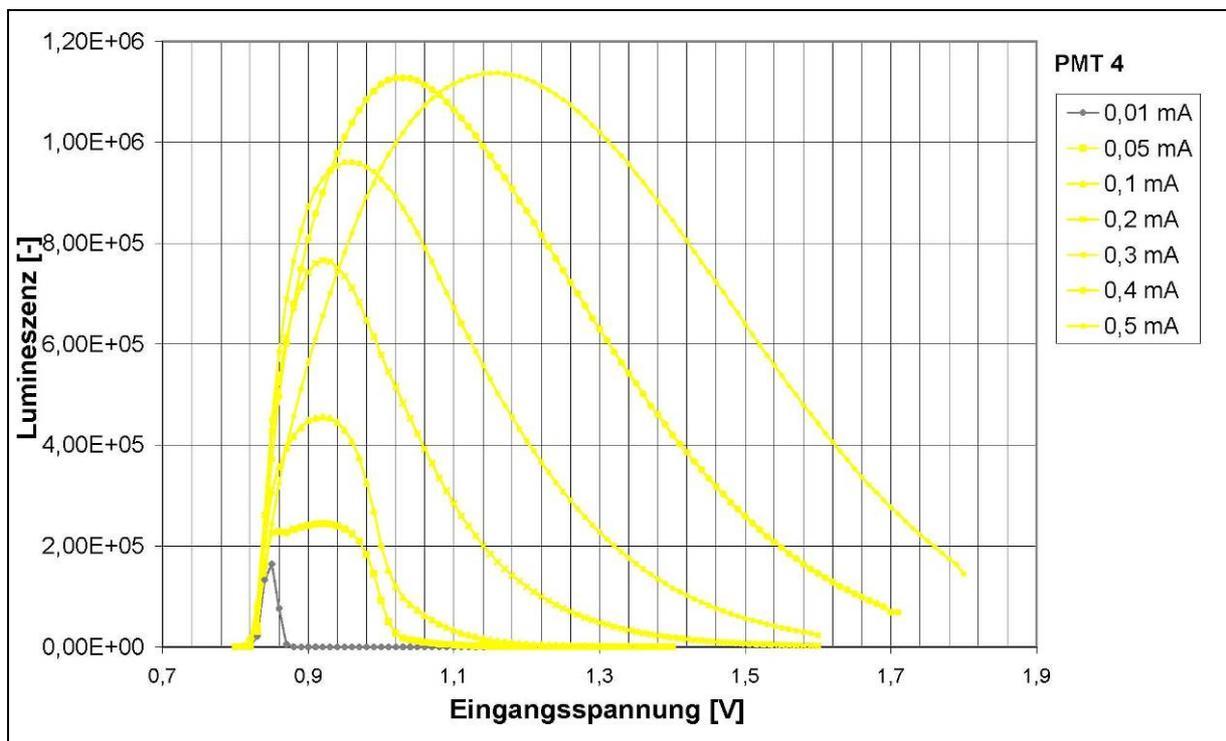
**Abb. 48: Signalstärke bei variierender Lichtintensität, PMT 2**

Die Eingangsspannung an der LED und damit die Leuchtstärke wurde schrittweise hochreguliert, die graue Kurve entspricht dem Dunkelstrom



**Abb. 49: Signalstärke bei variierender Lichtintensität, PMT 3**

Die Eingangsspannung an der LED und damit die Leuchtstärke wurde schrittweise hochreguliert, die graue Kurve entspricht dem Dunkelstrom



**Abb. 50: Signalstärke bei variierender Lichtintensität, PMT 4**

Die Eingangsspannung an der LED und damit die Leuchtstärke wurde schrittweise hochreguliert, die graue Kurve entspricht dem Dunkelstrom

In Abb. 47 bis Abb. 50 werden mehrere Aspekte deutlich: zum einen schwankt das Maximum der Signalausbeute bei gleichem Eingangssignal (gleiche Signalstärke der

LED) zwischen knapp 60000 (PMT 1) und knapp 1200000 (PMT 4). Dies ist ein möglicher Faktor für die unterschiedlich hohen Signale bei annähernd gleichem Eingangssignal während des Tests in Zürich (Abb. 45). Weiterhin sind einige PMTs bei 0,5 mA LED Spannung schon gesättigt, d.h. ab einem gewissen Punkt ergibt eine Erhöhung der Spannung keine Erhöhung des Ausgangssignals mehr.

Da die erwarteten Signale der Zellen allerdings bei Weitem unter diesem Wert liegen, stellt diese Sättigung für das Experiment kein Problem dar.

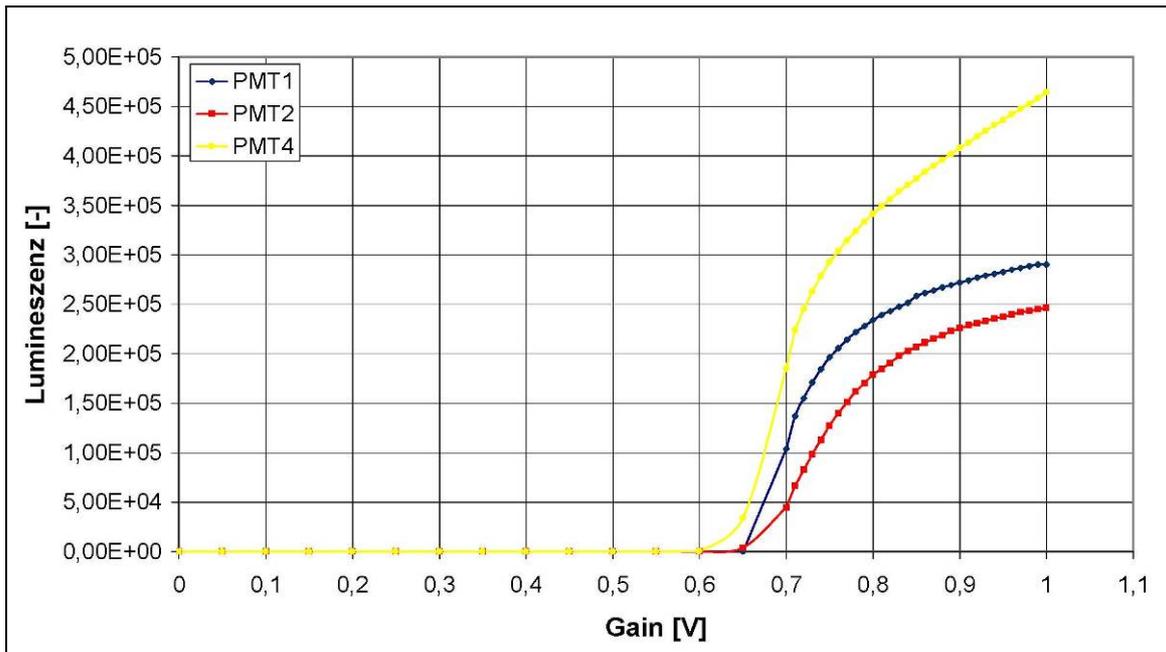
Des Weiteren ist die benötigte Eingangsspannung für das Erreichen des Maximums für jeden PMT unterschiedlich. Für PMT 1 liefert bei 0,02 mA LED Spannung eine Eingangsspannung von 0,38 V das maximale Signal, für PMT 4 sind das bei der gleichen LED Spannung 0,93 V.

Zusätzlich variiert die optimale Eingangsspannung je nach gegebener Intensität der LED. Bei allen vier PMTs verschiebt sich das Maximum des Signals mit zunehmender LED Intensität nach rechts, d.h. es wird eine höhere Eingangsspannung benötigt.

Der PMT sollte jeweils so betrieben werden, dass die gesetzte Eingangsspannung in dem linear aufsteigenden Teil der Kurve liegt. So ist eine gute Proportionalität zwischen Eingangsspannung und Signalstärke gewährleistet. Zusätzlich sollte die Eingangsspannung kurz über dem Maximum des Dunkelstroms liegen, damit dieser nicht in die Messung mit aufgenommen wird. Die Graphen zeigen deutlich, dass diese Einstellung für jeden Sensor und die zu erwartende Signalstärke individuell gefunden werden muss.

### **8.7.3. Gain**

Nun wurde das Verhalten des Verstärkungsfaktors (Gain) untersucht, indem dieser in Schritten von 0,01V bei 0.1mA LED Spannung erhöht wurde (Abb. 51). PMT 2 (grün) wies bei dieser Messung technische Probleme auf und konnte daher nicht gemessen werden.



**Abb. 51: Gain Scan,**  
Eingangsspannung in Schritten von 0,01V erhöht, LED 0,1mA

Wieder fällt ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen PMTs auf.

Die Messungen zeigen, dass die Sensitivität der PMTs sich auch bei baugleichen Teilen stark unterscheidet (Abb. 51). Die Signalstärke ist weiterhin abhängig von der gesetzten Eingangsspannung und dem gesetzten Gain. Zusätzlich ist auch kein direkter linearer Zusammenhang zwischen dem Gain und der Signalthöhe ersichtlich. Daher muss jeder Photomultiplier auch für den Gain individuell charakterisiert und eingestellt werden.

Das Ziel war es nun, bei bekannter Signalthöhe die Werte von Eingangsspannung und Gain für jeden PMT so zu setzen dass alle vier PMTs für die gleiche Signalstärke das gleiche Ausgangssignal bieten.

#### 8.7.4. Chemikaliertest

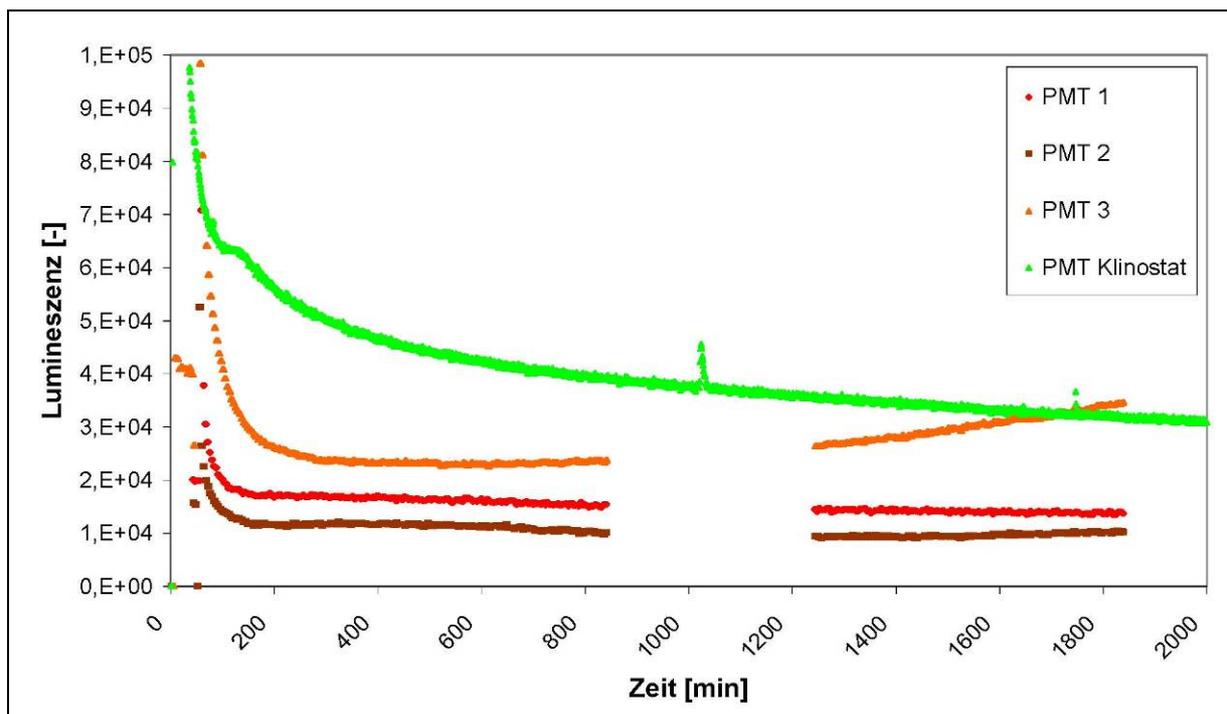
Um die ungefähre Signalstärke der Zellen zu ermitteln wurde ein Test mit Chemikalien durchgeführt. Dazu wurde die schon vorher verwendete Lösung von Eisen 3-Zitrat (Verdünnung 1:10000) und Wasserstoffperoxid hergestellt, die im PMT Klinostaten eine ähnliche Leuchtkraft aufwies wie die Zellen (Kapitel 7.2).

Es wurde eine Signalstärke gewählt, die etwas niedriger war als die der Zellen um sicherzugehen, dass das zu erwartende Signal auch detektierbar ist (PMT Klinostat Zellen  $\sim 10^6$  bei 1 g,  $\sim 10^5$  bei 60 UpM, Chemikalien  $\sim 10^4$ ).

Die hergestellte Lösung wurde dann in die Küvetten des Science Models gefüllt und getestet. Dabei wurden pro Messküvette jeweils 2,8 ml Ammonium Eisen 3-Zitrat Lösung, 0,825 ml Luminollösung und 1,125 ml Wasserstoffperoxidlösung verwendet (die Herstellung der Lösungen ist in Kapitel 7.2 näher beschrieben).

Die PMTs wurden dabei mit den Werkseinstellungen und einem Gain von 0.8 V betrieben.

Das gemessene Signal im PMT- Klinostaten (RLU  $\sim 40000$ ) liegt etwas über den Signalen im SM (10000-30000). Die Differenz in der Signalstärke zwischen den PMTs des SM entstand dadurch, dass diese nicht kalibriert waren, sondern mit den Grundeinstellungen betrieben wurden. Mit kalibrierten PMTs wäre auch hier ein höheres Signal zu erwarten gewesen. Es ging aber vorerst nur darum, die Größenordnung der zu erwartenden Signalstärke zu ermitteln, um mit diesen Einstellungen dann weiter zu arbeiten.



**Abb. 52: Test mit Chemikalien, Vergleich Science Model (PMT1-3) und PMT Klinostat, Ammonium-3 Eisenzitat Verdünnung 1:10000**

Im Vergleich der Chemikalienkurven mit der Messung der Signalintensität (Abb. 47 bis Abb. 50) fällt auf, dass selbst die niedrigste Einstellung für die internen LEDs (0,05 mA) ein Signal von etwa  $2 \times 10^5$  liefert, welches wiederum viel höher ist als das durch die Lumineszenz zu erwartende Signal von ca.  $2 \times 10^4$ . Daher musste zum direkten Vergleich eine andere Leuchtquelle herangezogen werden.

### 8.7.5. Externe LEDs

Da die internen LEDs selbst bei niedrigster Einstellung sehr viel heller waren als das erwartete Biolumineszenzsignal, wurden für einen weiteren Test externe, schwächere LEDs verwendet, die in das Sience Model eingebaut werden konnten. Gain und Eingangsspannung wurden nach den Daten der vorhergehenden Tests ausgewählt.

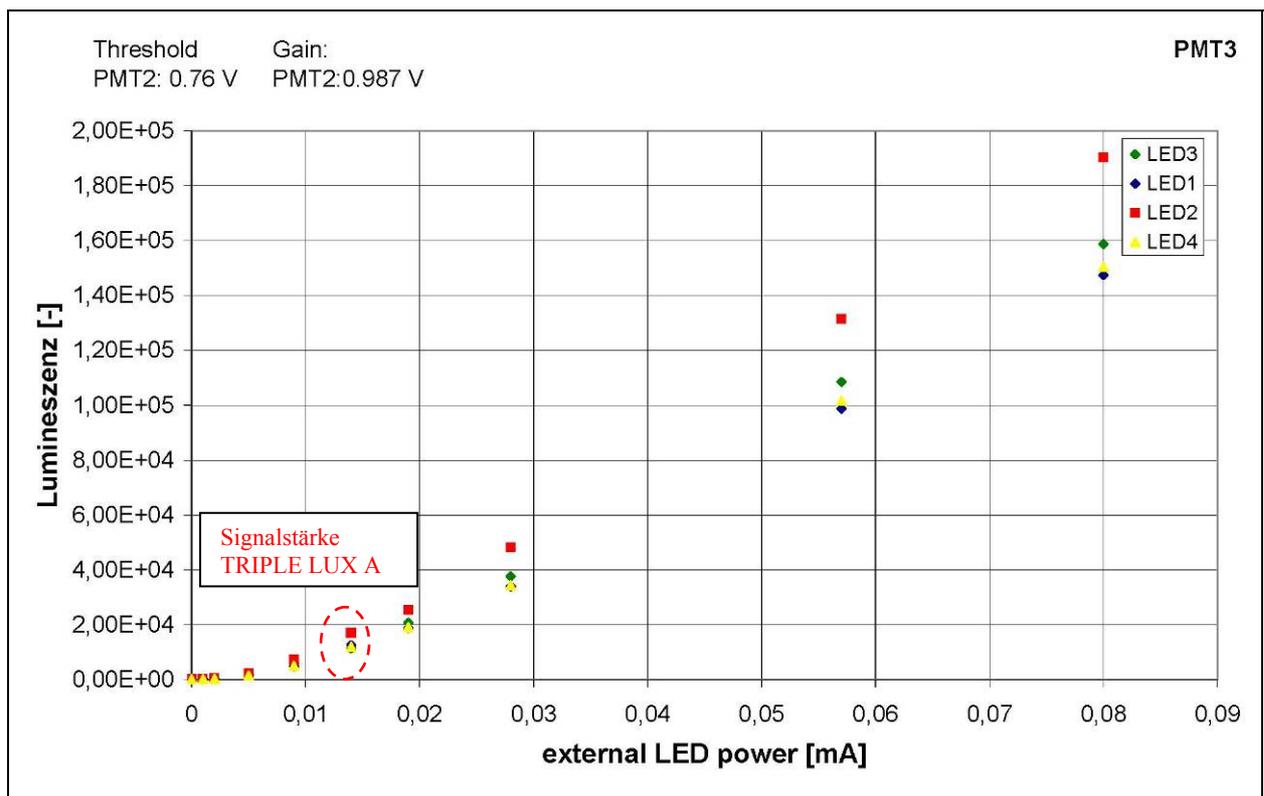
Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet:

**Tabelle 13: Einstellungen der PMTs**

	Eingangsspannung [V]	Gain [V]
<b>PMT 1</b>	0,38	0,981
<b>PMT 2</b>	0,2	1,000
<b>PMT 3</b>	0,76	0,987
<b>PMT 4</b>	0,89	0,955

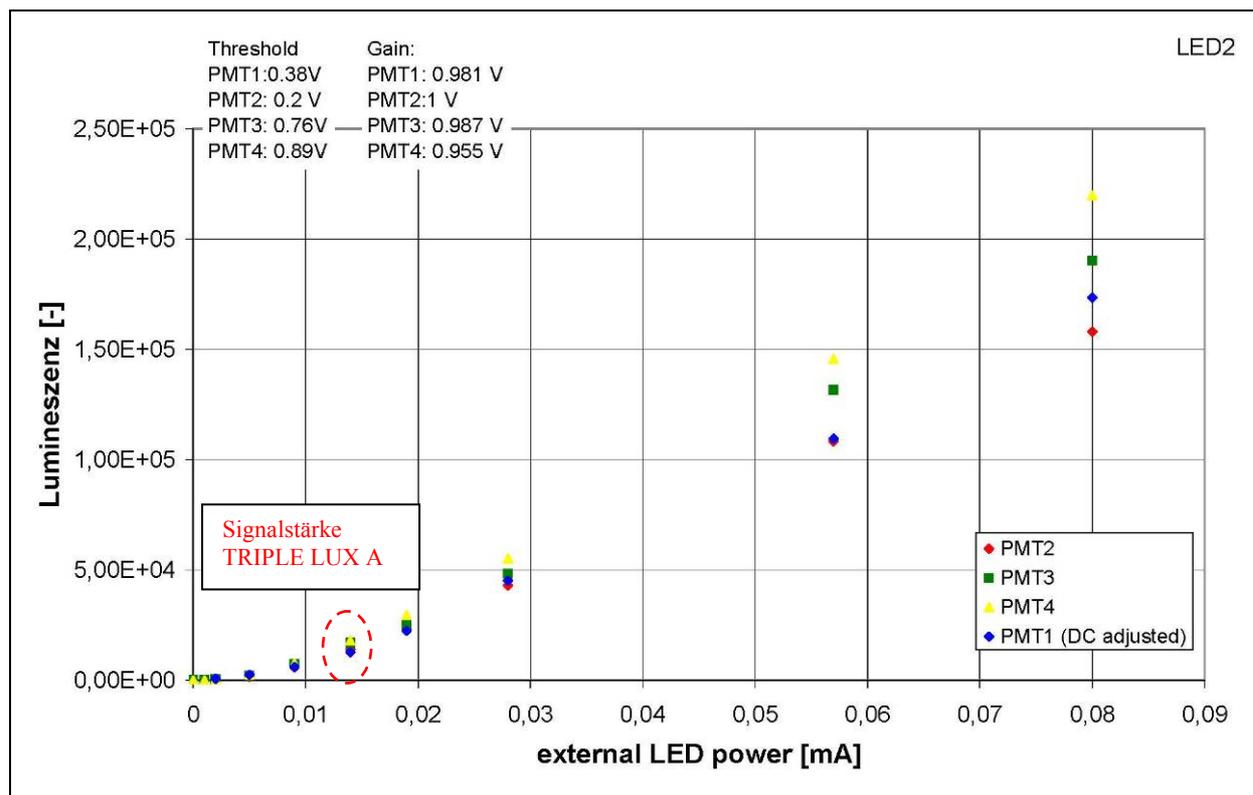
Die Spannung an den LEDs wurde stufenweise von 0 bis 0,8 mA erhöht. Bei jeder Spannung wurde der Mittelwert des gemessenen Signals von 5 Messwerten errechnet. Die Standardabweichung zwischen den Messungen lag dabei immer unter 12 %, ab 0,05 mA Eingangsstrom unter 5 %. Um Unterschiede zwischen den LEDs auszuschließen, wurden alle vier LEDs durchgetauscht, so dass die Messwerte von jeder LED an jedem PMT miteinander verglichen werden konnten.

In Abb. 54 ist exemplarisch PMT 3 mit allen LEDs und einmal LED 2 mit allen vier PMTs dargestellt. Die weiteren Graphiken, sowie die genaue Angabe der erhaltenen Messwerte und der eingestellten Größen befinden sich in Anhang Abb. 101 bis Abb. 108.



**Abb. 53: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 3.**

Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht. Die zu erwartende Signalstärke von TRIPLE LUX ist rot markiert



**Abb. 54: Vergleich der Signalstärke von LED 2 an PMT 1 -4.**

Die Signalstärke der LED wurde dabei stufenweise erhöht. Die zu erwartende Signalstärke von TRIPLE LUX A ist rot markiert

Die beiden Beispiele zeigen deutlich, dass die Differenzen der Ausgangsstärke zwischen den vier PMTs sehr viel geringer sind im Vergleich zu den Tests in Zürich.

Die erwartete Signalstärke von TRIPLELUX A (~20000) konnte mit den externen LEDs bei einer Stromstärke von 0,019 mA ab einer Spannung of 1,59 V erreicht werden (siehe rote Markierung). In diesem Bereich lag die Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen an einer LED unter 1 %.

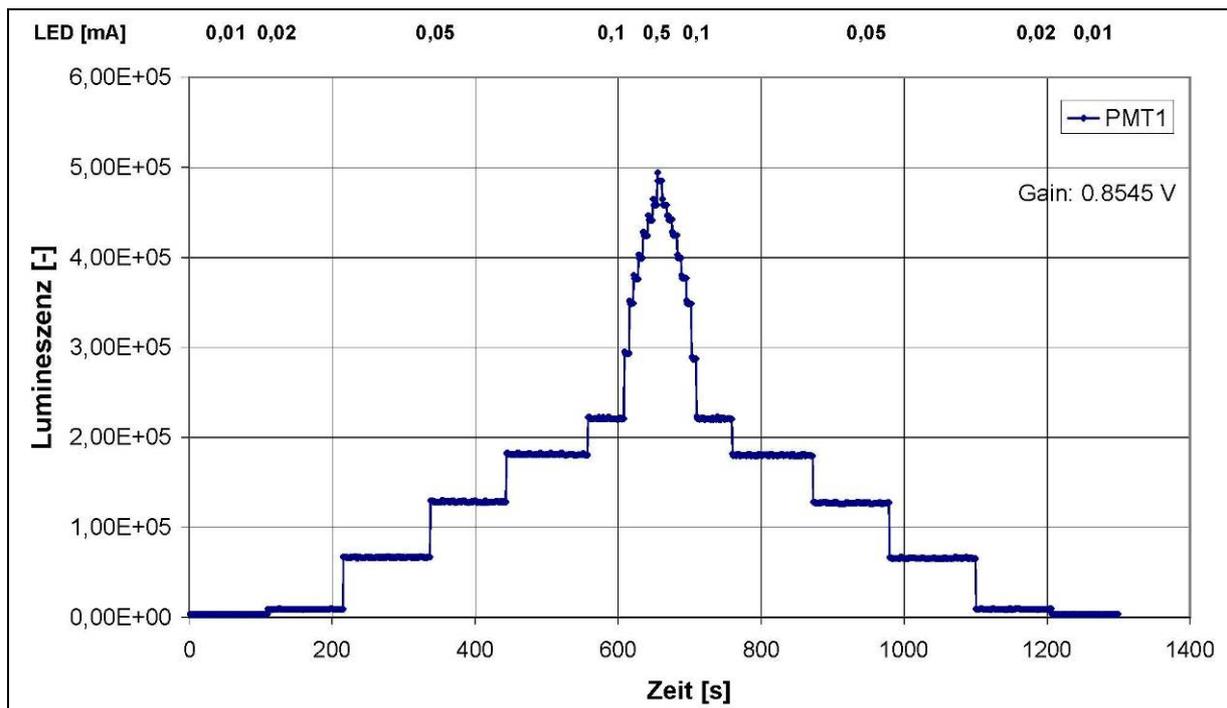
Zwischen den vier PMTs war es durch das Justieren das Gains und der Eingangsspannung möglich, bei dieser Signalstärke eine Varianz des Ausgangssignals unter 20 % zu erreichen.

Durch Feinjustierung der Einstellungen ist sicherlich noch eine weitere Verbesserung zu erwarten. Dies ist eine erhebliche Verbesserung zu der anfänglichen starken Variabilität innerhalb des Signals.

### 8.7.6. Hysterese des Systems

Anschließend wurde die Hysterese des Gesamtsystems untersucht, d.h. die Frage, ob die PMTs bei mehrmaliger Messung und nach stärkerer Beleuchtung zu stark

angeregt werden. Dann würden die PMTs Schwankungen im Ausgangssignal zeigen. Dazu wurde in einer 3,5 h Messung die Lichtintensität in Schritten von 0,01 V stufenweise erhöht und anschließend stufenweise wieder erniedrigt. Abb. 55 zeigt ein Beispiel dieses Tests an PMT 1, Kurven für PMT 2 und 4 finden sich in Anhang Abb. 98 bis Abb. 100. PMT 3 konnte aufgrund des Ausfalls des Sensors für diese Messung nicht herangezogen werden.



**Abb. 55: System Hysterse an PMT 1.** Stufenweise Erhöhung und anschließende Erniedrigung der Lichtintensität

Die Kurve ist sehr symmetrisch, d.h. der Photomultiplier zeigt keinerlei Hysterese und eine Verfälschung des Signals durch zu starke Anregung ist bei dieser Lichtintensität nicht zu erwarten. Die anderen PMTs zeigen ein ähnliches Verhalten, wobei sie jedoch für die ersten 1 bis 2 Sekunden nach Erhöhung oder Erniedrigung des Signals eine Hysterese aufzeigen.

Bei diesen Signalstärken kann nach 2 Sekunden Erholungszeit auch nach Anregung eine Messung erfolgen. Da die Lumineszenzsignale der Zellen noch niedriger sind, kann eine Verfälschung durch die vorherige Messung ausgeschlossen werden.

Trotzdem ist darauf zu achten, dass ein PMT nicht zu viel Licht empfängt, z. B.: beim Öffnen und Schließen der Küvetten, da bei starkem Lichteinfall eine Anregung des

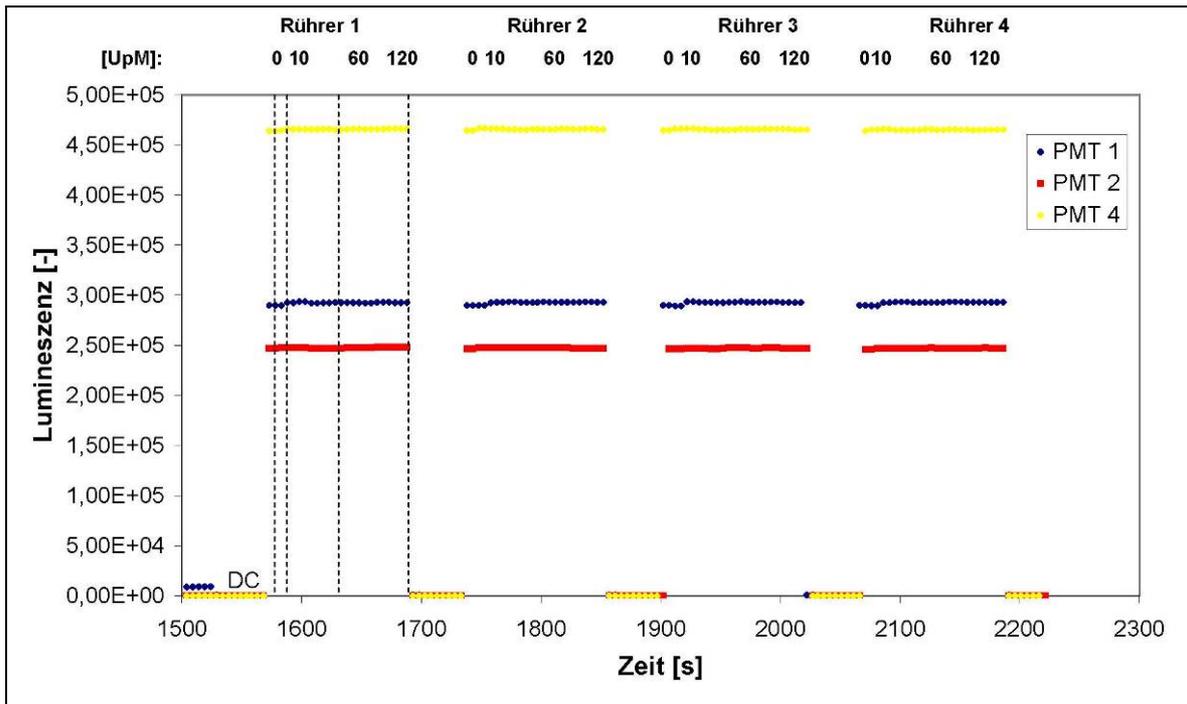
PMTs für mehrere Stunden zu erwarten ist. Nach Ein- bzw. Umbau sollte mit den Sensoren daher für mind. 3 Stunden keine Messung vorgenommen werden um eine Signalverfälschung zu verhindern.

### **8.7.7. Magnetrührer**

Photomultiplier können empfindlich auf Änderungen im Magnetfeld reagieren (s. Kapitel 8.2.6). Um zu verhindern, dass die Zellen der 1 g Kontrolle sedimentieren, werden diese mit kleinen Magnetrührern langsam durchmischt. Dies kann mit Geschwindigkeiten von 0 bis 120 UpM geschehen. Die genaue Größenordnung das dabei erzeugten Magnetfeldes ist nicht bekannt.

Daher musste untersucht werden, ob Magnetfelder in dieser Stärke einen Einfluss auf die PMTs ausüben. Hierzu wurden bei einer LED Stärke von 0.1 mA nacheinander jeweils ein Rührer angeschaltet. Nach einer Messung bei 0 UpM wurde die Umdrehungsgeschwindigkeit stufenweise um 10 UpM bis 120 UpM erhöht (s. Abb. 56). PMT 3 wies Funktionsstörungen auf und konnte nicht in die Messung mit einfließen.

Allgemein gibt es nur einen geringen Einfluss der Rührer auf die Signalhöhe. Alle PMTs zeigen bei 0 und 10 UpM ein geringfügig niedrigeres Signal, die Abweichung liegt selbst im bei PMT 2 unter 2 % und ist daher nicht relevant. Interessanterweise scheint es keinen Einfluss zu haben welcher der Rührer eingeschaltet ist. Vielmehr zeigt sich bei jedem das gleiche Ergebnis (Abb. 56). Offensichtlich sind die Abstände zwischen PMT und Rührer innerhalb des SM zu gering (<150 mm bei max. Entfernung von diagonal zueinander liegenden Küvetten), als dass diese Entfernung eine Rolle spielt.



**Abb. 56: Einfluss der Magnetrührer auf den Signaloutput, LED 0.1 mA.**  
 Die Umdrehungsgeschwindigkeit der Rührer wurde stufenweise jeweils um 10 UpM erhöht

### 8.8. Evaluierung der Kalibrierung (Aufgabe D) und Ausblick

Tabelle 14 zeigt die Umsetzung der gestellten Anforderungen an die Kalibrierung der Sensoren.

**Tabelle 14: Evaluierung der erstellten Anforderungsliste der Kalibrierung der PMTs des Science Models, Auszug.** Die jeweilige Umsetzung ist in der sechsten Spalte beschrieben. Vollständige Ausarbeitung Horn 2009c

PRODUKT SCIENCE MODEL PMT- KALIBRIERUNG		DATUM			
PRODUKTENTWICKLUNG	ANFORDERUNGEN			QUELLEN VERANTWORTLICH	
	NR.	BESCHREIBENDE ANGABEN	ZAHLENANGABEN/BEMERKUNGEN	ERGEBNISSE	
	1	Zielstellung	Messung der Signal biologischer Proben		Messung in Höhe der biologischen Signale möglich
	2	Umgebungsbedingungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Temperatur: 0-40°C, in der Regel 37 °C bzw. 18 °C</li> </ul>		
	3	Zu erzielende Parameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sensitivität: 300 – 600 nm</li> <li>unter 10 % Abweichung der Messung zwischen den vier PMTs</li> </ul>		300-650 nm Messungen innerhalb einer Abweichung von 20% erreicht, weitere Kalibrierung durch EADS Astrium
4	Weitere Anforderungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>kalkulierbarer Einfluss durch die Magnetruhrer</li> </ul>		gewährleistet	

Die anfänglichen starken Schwankungen im Signaloutput der vier PMTs konnten durch gut gewählte Einstellungen von Gain und Eingangsspannung stark reduziert werden (unter 20 % Schwankungen zwischen der vier PMTs). Durch weitere Test bei EADS Astrium konnten die PMTs noch weiter angepasst werden, so dass mittlerweile eine Differenz von unter 10 % zwischen den PMTs bei gleichem Eingangssignal gewährleistet ist (*Persönliche Information Duncan Goulty*).

Mit dem Chemikalientest konnte gezeigt werden, dass die zu erwarteten Signale mit der vorhandenen Hardware detektierbar sind. Da bei Versuchen mit dem PMT Klinostaten sowohl während Klinorotation als auch bei Schwerelosigkeit während eines Parabelfluges eine Signalreduktion zu erkennen war (siehe Kapitel 10.1.2 und

10.1.3.5), wurde ein entsprechend niedriges Referenzsignal gewählt. Dieses mit externen LEDs erzeugte Signal war im Science Model messbar. Bei einer eventuell ähnlichen Reduktion der Signalhöhe in Mikrogravitation ist daher die Detektion der Signale sichergestellt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass das System, zumindest bei geringen Signalstärken, kaum Hysterese aufweist, und auch die Einflüsse seitens der Magnetrüher vernachlässigbar sind.

Die Aufgabe D (Kalibrierung der PMTs des Science Models) konnte weitgehend bearbeitet werden. Die Grundlage für eine erfolgreiche Kalibrierung konnte gelegt werden. Die weiteren Arbeiten die in diesem Bereich notwendig sind übersteigen den Umfang dieser Arbeit, und werden bei EADS Astrium, Friedrichshafen durchgeführt. Anbei ein kurzer Überblick über das geplante Vorhaben:

Für das weitere Testen und die Konstruktion des Flightmodels, also der Hardware die auf die ISS gebracht werden soll, ist es wichtig einen Kalibrierungsprozess zu entwickeln, der für jeden neu eingesetzten Sensor durchzuführen ist. Da sich die Sensoren selbst bei fabrikgleichen Bauteilen als sehr unterschiedlich herausstellten (s. Abb. 45), muss die Kalibrierung für jeden Sensor individuell erfolgen. Bei diesem Prozess werden die Charakteristiken des Sensors ermittelt (Dunkelstrom, Empfindlichkeit des Gains) und die erforderlichen Werte von Eingangsspannung und Gain für die zu erwartete Signalhöhe ermittelt und eingestellt. Nach diesem Prozess sollten alle Sensoren, bei gleicher Eingangssignalhöhe, einen konstanten Wert liefern.

Weiterhin ist es möglich, dass sich die Sensoren während des ISS Experimentes verstellen, einerseits durch den Shuttlestart, andererseits durch die Zeitspanne zwischen den einzelnen Experimenten. Daher muss ein Programm entwickelt werden, mit dem die PMTs an Bord der ISS vom Boden aus nachjustiert werden können. Dafür sind zwei Versionen vorgesehen, einerseits eine detaillierte Kalibrierung zwischen den Messungen, andererseits ein kurzer Check des Systems, des derzeitigen Dunkelstroms und der Nulllinie des Signals direkt vor jeder Messung.

Nach der erfolgreichen Konstruktion der Hardware für den Klinostaten (Aufgabe A), der Heizbox (Aufgabe B) und des Racks (Aufgabe C) zusammen mit der Kalibrierung der Photomultiplier (Aufgabe D) war der technische Teil der Arbeit erfüllt. Die konstruierte Hardware wurde nun mit biologischen Experimenten am Boden als auch während des Parabelfluges getestet (Aufgabe E).

## 9 Material und Methoden

### 9.1. Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Gibco 31350
3-Aminophthalhydrazid (Luminol)	Sigma A4685
4-6-Diamidino-2-phenylindol-d-hydrochlorid (DAPI)	Sigma D9542
Antibiotic Antimycotic Solution (100X) stabilized	Sigma A5955
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Merck 1.00165
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck 2388
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma D-8779
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O)	Merck 1.06579
di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O)	Merck 1.06308
Donor Horse Serum	Biochrom S9135
Ethanol	Zefa Z 98005
Ethanol absolut	Merck 1.00983
Fluorescein (FITC)	Fluka 46950
Formaldehyd	Merck 1.04002
Fötale Kälberserum (FCS) (Glutamin	Biochrom S0115
HAMS F12	Cell concept R-L1000-H)
Isopropanol	Biochrom FG0815
Kaliumchlorid (KCl)	Zefa Z 03075.100
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck 1.04936
Klarlack Base Coat	Merck 4873
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Manhattan
Meerrettichperoxidase	Fluka 63136
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck 1.16216
Natriumchlorid (NaCl)	Merck 6392
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O)	Merck 6404
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck 1.06346
PEI	Merck 1.06329
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Merck SAFA482595
Propidiumjodid	Sigma P8139
	Fluka 81845

Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma T-8154
Zymosan A	Sigma Z4250

## 9.2. Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	AL 9.161.01
Kanülen	Rose 0603
0,9 / 120mm gelb 100	VWR 612-0203
0,6 /25mm	VWR 612-0136
Kryoröhrchen	Greiner bio-one 2010-01
Mikrotiterplatten transparent	Greiner bio-one 655061
Objektträger	Roth 2109
Parafilm	Brand 291-1213
Pipettenspitzen 0,5 – 20 µl	Eppendorf 003.0000.854
Pipettenspitzen 1000 – 5000 µl	Eppendorf 003.0000.978
Pipettenspitzen 2 – 200 µl	Eppendorf 003.0000.870
Pipettenspitzen 50 – 1000 µl	Eppendorf 003.0000.919
Pipettenspitzen 500 – 250 µl	Eppendorf 003.0000.951
Reaktionsgefäße, Safe-Lock 0,5 ml	Eppendorf 0030 121.708
Reaktionsgefäße, Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf 0030 121.708
Reaktionsgefäße, Safe-Lock 2,0 ml	Eppendorf 0030 121.708
Serologische Pipetten steril, Plastik 1 ml	VWR 612-1240
Serologische Pipetten steril, Plastik 10 ml	VWR 612-1279
Serologische Pipetten steril, Plastik 25 ml	VWR 612-1270
Serologische Pipetten steril, Plastik 5 ml	VWR 612-1245
Serologische Pipetten steril, Plastik 50 ml	VWR 734-0351
Spritzen (2, 5, 10 ml)	Braun 4606108V
Sterilfilter Millex ( <i>kleiner</i> )	Millipore SLGP033RB
Zellkulturflasche 175 cm <sup>2</sup> BD falcon	Sarstedt 83.1812.302
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup> BD falcon	Sarstedt 83.1813.302
Zellschaber	
groß	TPP 99002
klein	TPP 99004
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner 188261

Zentrifugenröhrchen 50 ml

Greiner 2272612

### 9.3. Geräte

Autoklav

Varioklav 25T

Brutschrank

Labotect C60

Brutschrank

Binder 210M/CB

Einfrierbox

Nalgene

Fluoreszenzphotometer/Luminometer

SpectraFluorPlus Tecan

Gefrierschrank -80°C

Profiline Taurus

Inverses Mikroskop

Leitz

Konfokales Mikroskop C80i

Nikon

pH Meter

Schott

Mikroskop

Zeiss Axiovert 10

MuSIC (Zentrifuge)

Deutsches Zentrum für  
Luft- und Raumfahrt

Parabelflug-Rack

Deutsches Zentrum für  
Luft- und Raumfahrt

Pipetten

Eppendorf Reference

PMT Klinostat

Deutsches Zentrum für  
Luft- und Raumfahrt

Schnelldrehender 2D Küvettenklinostat

Deutsches Zentrum für  
Luft- und Raumfahrt

Sterilbank

Telstar Bio II-A

Short Arm Human Centrifuge (SAHC)

ESA

Sunrise ELISA Mikrotiterplattenreader

Dynex Releventions

Röntgenröhre

Deutsches Zentrum für  
Luft- und Raumfahrt

Wasserbad

Köttermann

Zählkammer (Neubauer)

Brand

Zentrifuge

Heraus, Fresco 21

Zentrifuge

Heraeus, Biofuge  
Primo R

## 9.4. Puffer und Lösungen

Im Nachfolgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

### Zellkulturmedium für Makrophagen-Zelllinie NR8383

Hams F12

10 % FCS

1 % Antibiotic-Antimycotic Solution (steril filtered, 10,000 units penicillin, 10 mg streptomycin and 25 µg amphotericin B per mL)

0,1 % 2-Mercaptoethanol

### Einfrriermedium

70 mL Hams F12

20 mL FCS

12 mL DMSO

100 µl 2-Mercaptoethanol

### PBS

80 mM, pH 7,6

1,38 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

12,46 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

8,50 g/l NaCl

### Boratpuffer, pH 9

1,24 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$

7,63 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$

ad 1 l dH<sub>2</sub>O

### Luminollösung

Stammlösung 100 mM Luminol in DMSO, Lagerung bei -20°C

Verdünnung 1:10 in Boratpuffer, pH 9 vor Testansatz

### Opsoniertes Zymosan A

Nach Allen (1986 S. 458)

- Zymosan A aus *Saccharomyces cerevisiae* in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 % w/v) 250 mg/dl, in kochendem Wasserbad 20 min erhitzen
- Abkühlung auf 22° C
- 10 min bei 300 UpM zentrifugieren, Überstand verwerfen, Rückstand in 200 ml Donor Horse Serum resuspendieren
- 20 min bei 22° C leicht bewegen, erneut zentrifugieren
- Die letzten zwei Schritte wiederholen, Überstand verwerfen
- zweimaliges Waschen des Rückstands in je 500 ml Kochsalzlösung (zur vollständigen Entfernung von Proteasen)
- auf die Originalkonzentration einstellen (250 mg/dl), zu je 2 ml aliquotieren; lagerbar bei -20° C
- Die Suspension enthält  $600 \pm 200$  Zymosanpartikel pro  $\mu\text{l}$ .

### FITC-Zymosan

Frisches opsoniertes Zymosan (siehe oben) mit 0,4 % (w/v) FITC für 30 min bei 37°C dunkel inkubieren, 6 x mit PBS waschen; aliquotieren; Lagerung bei -20°C.

Alternativ:

FITC-Zymosan in 500  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O resuspendieren; mischen, 1h dunkel bei 37°C inkubieren; 3 ml PBS zugeben, bei 3000 UpM und 4°C für 10 min zentrifugieren; zweimal in 3 ml PBS waschen, in 1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendieren; Partikelzahl in Neubauer-Zählkammer bestimmen; aliquotieren; Lagerung bei -20°C; für Phagozytoseassay 5 – 20 Partikel pro Zelle einsetzen.

### NBT-Zymosan

Opsoniertes Zymosan (siehe oben) mit 0,2 % (w/v) NBT für 2 h bei 37°C inkubieren, frisch verwenden

Kontrolllösung: 0,2 % NBT (w/v) in PBS.

### Meerrettichperoxidase (HRP)

500 U/ml in PBS, Lagerung bei -20°C.

## **9.5. Zellkultur von permanenten Makrophagen**

NR8383 [AgC11x3A; NR8383, 1] ATCC (American Type Culture Collection), USA

Die alveolare Ratten-Makrophagenzelllinie NR8383 wurde für alle Experimente verwendet. Sie ist eine der wenigen Zelllinien, die im Luminolassay ein ausreichendes Signal liefert und wurde daher für das TRIPLE LUX Projekt ausgewählt.

Es handelt sich um eine Mischkultur aus adhärennten und suspendierten Zellen die aus *Rattus Norvegicus* (Sprang-Dawley) isoliert wurden.

### **9.5.1. Makrophagen-Zelllinie NR8383**

Die Zellen wurden in BD Falcon Zellkulturflaschen in supplementiertem Ham's F12 Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Die Zellkultur wurde bei einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  –  $1.5 \times 10^7$  Zellen /ml gehalten und wenn nötig verdünnt. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt und durch frisches ersetzt.

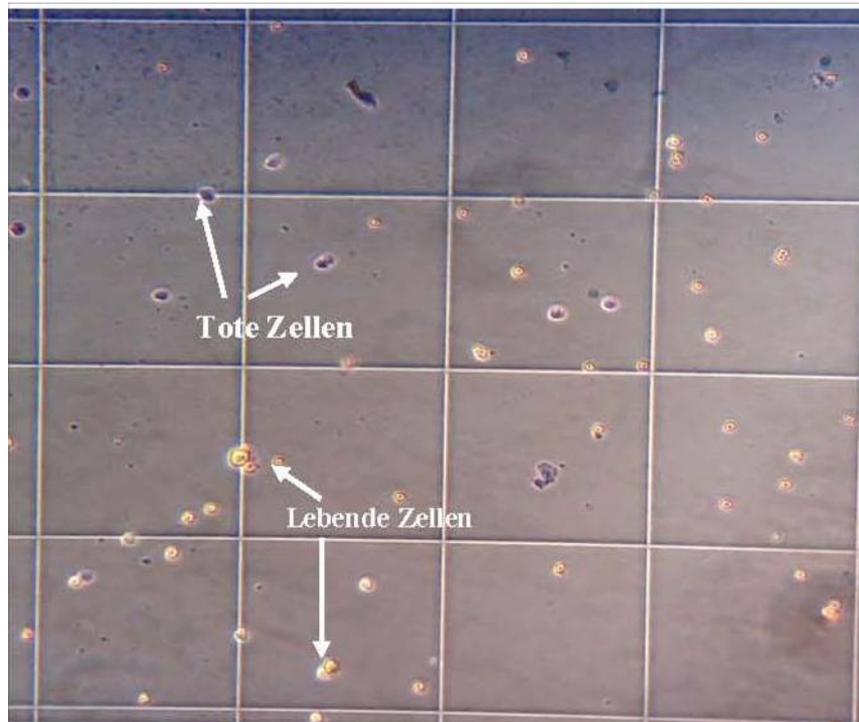
Vor jedem Test wurden die Zellen durch Abschaben oder Aufklopfen geerntet. Teilweise wurden auch Zellen direkt nach dem Auftauen aus vorher abgezählten und eingefrorenen Stammlösungen verwendet. Nach dem Auftauen bzw. Mediumwechsel regenerieren die Zellen für einige Stunden bei 37°C, bevor sie verwendet werden.

### **9.5.2. Anpassung der Zellzahl vor dem Test**

Um bei jedem Test eine konstante Zellzahl zu gewährleisten wurden die Lebendzellzahl bestimmt und die Suspension dann auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Die Zellzahl/ml wurde in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Suspension wurde mit 0,4 % Trypanblaulösung verdünnt (je nach Ausgangskonzentration 1:1 bis 1:10). Trypanblau hat die Eigenschaft in tote Zellen einzudringen und diese blau zu färben. Lebende bleiben davon unbeeinträchtigt, da sie die Substanz permanent aktiv wieder heraustransportieren. Lebende erscheinen

unter dem Mikroskop durchsichtig (s. Abb. 57). Im Mikroskop wurden die Gesamtzellzahl und die Lebendzellzahl in 4 Großquadraten ausgezählt und gemittelt. Da das Volumen eines Großquadrates  $1 \times 10^{-4}$  ml ist, errechnet sich die Konzentration folgendermaßen:

$$\# \text{Zellen} / \text{ml} = MW \text{ gezählter Zellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$$



**Abb. 57: Zellen in Neubauer Zählkammer, blau tote Zellen, weiß lebende Zellen**

### 9.5.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

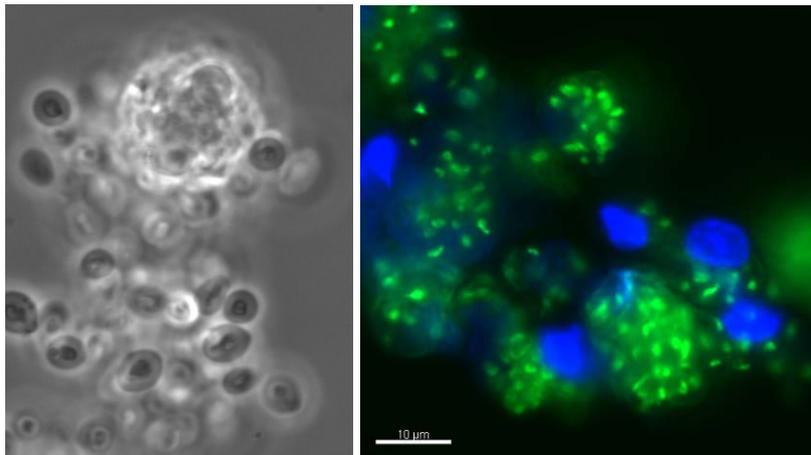
Zu Lagerung wurden die Zellen bei  $-196$  °C (in flüssigen Stickstoff) aufbewahrt. Dazu wurden die Zellen geerntet, nach einem Zentrifugationsschritt in einem Milliliter Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden sofort in der Isopropanolbox in  $-80$  °C überführt. Nach mindestens 4 Stunden wurden die Röhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurde die gefrorene Lösung direkt in 10 ml frischem, kaltem Medium gelöst. Nach 10 min wurden die Zellen abzentrifugiert und in  $37$  °C warmes Medium überführt. Nach ein paar Stunden Regenerationszeit konnten die so gewonnenen Zellen direkt verwendet werden.

## 9.6. Phagozytose-Assay

Die Bestimmung der Phagozytoserate erfolgte mit FITC-markierten Zymosanpartikeln (s. Abb. 58). Durch die Aufnahmen dieser durch die Zellen konnte anhand der Fluoreszenz der Phagozytoseindex ermittelt werden.

Die eingesetzten Zellkonzentrationen betragen ca.  $1 \times 10^6$  pro ml. Von den FITC-Zymosan Bioparticles wurden ca. 5 bis 20 Partikel pro Zelle zugegeben.



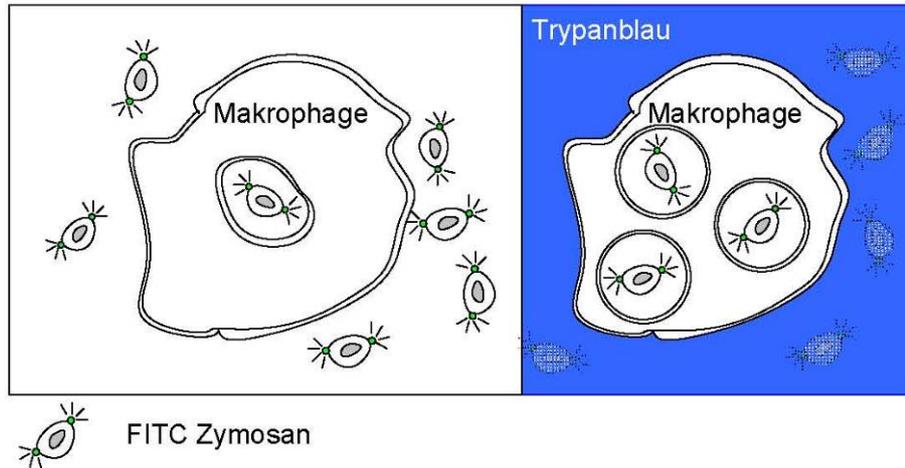
**Abb. 58: Zelllinie NR8383 mit phagozytierten FITC-Zymosan-Partikeln.** Links Durchlicht, rechts Färbung mit FITC (Zymosan) und Dapi (Kerne)

Die Auswertung erfolgte in Mikrotiterplatten.

Nach dem Versuch wurde die verwendete Suspension abzentrifugiert, in 250 ml PBS gelöst und in transparente Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) überführt. Pro Kavität wurden mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen (für Proportionalität der Signalstärke) und höchstens  $3 \times 10^5$  Zellen (zur Vermeidung von Signalauslöschung) verwendet. Hinzu kamen 80 µl 0,4 %ige Trypanblaulösung zum *Quenchen* der extrazellulären Fluoreszenz (siehe Abb. 59). Um die Phagozytose zu Stoppen wurde die Platte auf Eis befüllt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregung von 485 nm und 535 nm Emission im Dynex Releations-Reader gemessen.

Die relative Fluoreszenzintensität (RFU) nach ca. 5 bis 10 min *quenching* entsprach der Menge phagozytierter Partikel.

Als Referenz diente eine Kavität mit gleicher Menge an FITC-Zymosan-Lösung, jedoch ohne Zellen. Der Fluoreszenzwert der „gequenchten“ FITC-Zymosan-Lösung diente als Maß für die Hintergrundfluoreszenz.



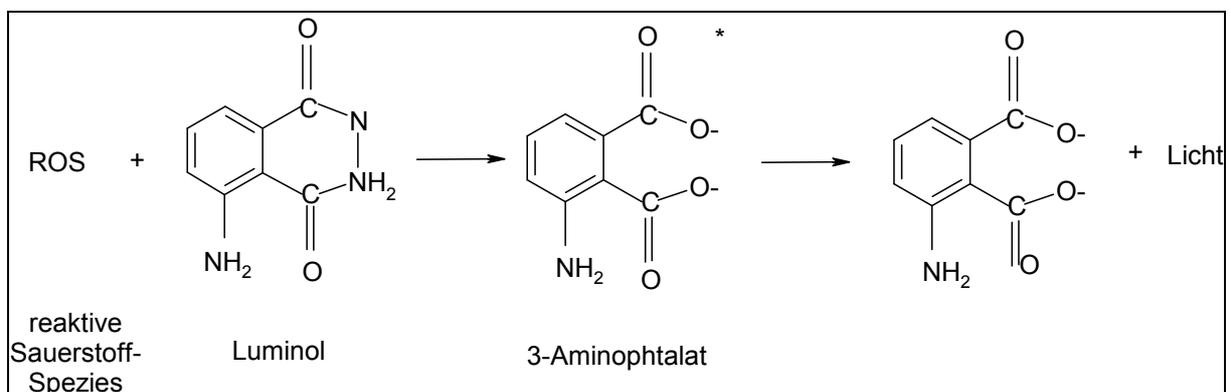
**Abb. 59. Quenching der extrazellulären Fluoreszenz mittels Trypanblau.** Bild nach Vorlage von Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA.)

## 9.7. Bioassays zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Zum Nachweis der von den Zellen gebildeten reaktiven Sauerstoffradikale eignen sich unterschiedliche Detektionssysteme. In dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche Assays zur Anwendung.

### 9.7.1. Luminol-Assay

Luminol wird von verschiedenen Radikalen oxidiert (Abb.11). Es hat den Vorteil, dass es membranpermeabel ist und damit sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommende Radikale detektiert werden können. Bei Anwesenheit eines Oxidationsmittels und eines geeigneten Katalysators durchläuft Luminol eine Konformationsänderung, die mit der Abgabe von Energie in Form von blauem Licht einhergeht (Abb. 60).



**Abb. 60: Luminolreaktion**

Der Luminolassay wurde nach Allen (1986) und Huber (2005) übernommen.

Der Nachweis wurde mit dem speziell dafür konstruierten PMT Klinostaten durchgeführt. Hierzu wurden 560  $\mu$ l Zellsuspension mit einer Konzentration von  $7 \times 10^5$  ml in die Messküvette gefüllt. Hinzu kamen 165  $\mu$ l 1mM Luminollösung (100mM kurz vor der Messung im Verhältnis 1:10 verdünnt in Boratpuffer), 33  $\mu$ l Meerrettichperoxidase (500 U/ml) und unmittelbar vor der Messung 230  $\mu$ l opsoniertes Zymosan (250 mg/dl). Daraufhin wurde die Lumineszenz bei 37°C für 1-2 Stunden im PMT Klinostaten gemessen. Als Referenz diente eine Lösung nicht aktivierter Zellen mit PBS anstelle des Zymosans.

Alternativ wurden die Zellen auch mit FITC - Zymosan aktiviert. Nach der Messung wurde die Phagozytose mit eiskalten PBS gestoppt oder mit 37% FA fixiert und anschließend die Fluoreszenz bestimmt (s.o.).

Für die Auswertung der Kinetiken wurden aus jeder erhaltenen Einzelkurve verschiedene Parameter zur Charakterisierung und Quantifizierung des *oxidative Burst* bestimmt:

- Die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) durch Integration der Funktionsgleichung (sie entspricht der Totalproduktion an reaktiven Sauerstoffspezies)
- Die maximale *peak*-Höhe (Maximum ermittelt in relativen Lumineszenzeinheiten RLU, sie zeigt die maximal vorhandene Radikalkonzentration)
- Die Zeit bis zum Maximum (Peak [min] gibt Auskunft darüber, in welcher Zeit die maximale Konzentration nach Stimulation der Zellen erreicht ist)

### **9.7.2. NBT Assay**

Diese Methode wurde von Sierra *et al.* (2005) etabliert und von Huber (2005) an semiadhärente Zellen adaptiert.

NBT dient in erster Linie zum Nachweis von Superoxid. Es wird direkt an Zymosan gekoppelt und von der Zelle aufgenommen. Somit ist es vor allem ein Nachweis für intrazellulär produziertes Superoxid. Allerdings kann es auch in Lösungen oxidiert werden und fällt dann in der Zelle als Formazan aus.

Für eine Messung werden jeweils 500  $\mu$ l Suspension eingesetzt, bestehend aus: 250  $\mu$ l Medium mit einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml und 250  $\mu$ l NBT-Zymosan bzw. NBT-PBS. Diese wurden jeweils 15, 30, 60 und 120 min inkubiert. Anschließend wurde die Suspension direkt in 1 ml eiskaltes PBS überführt, um die Phagozytose zu stoppen.

Nach einer Zentrifugation bei 2000 UpM für 2 min wurde der Rückstand in 500  $\mu$ l 70 %igem Methanol fixiert und erneut zentrifugiert. Der Zellrückstand wurde zunächst vorsichtig in 120  $\mu$ l 2 M KOH lysiert und schließlich mit 140  $\mu$ l DMSO vermischt. Dabei sollte eine blaue Färbung auftreten, die auf intrazelluläre  $O_2$  zurückzuführen ist.

Nach Überführen des Ansatzes in eine Mikrotiterplatte erfolgte die Absorptionsmessung bei 630 nm im ELISA-Reader Tecan Sunrise.

Als Basiswert wurde eine Mischung aus 120  $\mu$ l 2 M KOH und 140  $\mu$ l DMSO verwendet. Dieser Wert wurde von allen Ergebnissen subtrahiert. Zur Überprüfung der „Grundstimulation“ der Zellen dienten nicht phagozytierende Zellen, bei denen anstelle des NBT-Zymosans NBT-PBS zugegeben wurde.

## 9.8. Einfluss der Gravitation

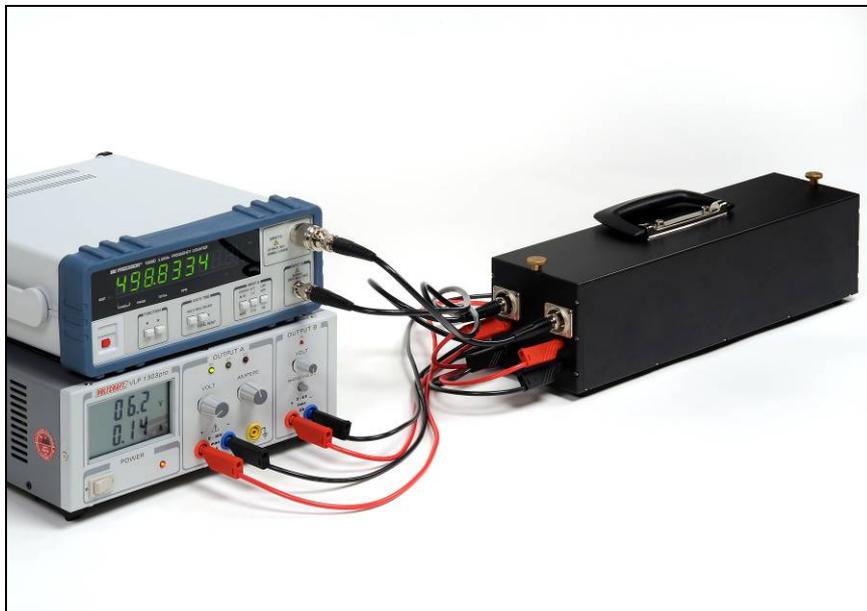
Auf der Erde herrscht seit ihrer Entstehung eine konstante Gravitation von 1  $g$ . Um auf der Erde Konsequenzen dieser Reizänderung auf ein System nachzuvollziehen, gibt es verschiedene Methoden diese Situation zu simulieren. Drei davon wurden in dieser Arbeit verwendet.

### 9.8.1. Klinorotation

Zur Simulation der Weltraumbedingungen wurde die Wirkung von reduzierter Schwerkraft auf das Verhalten der verwendeten Zellen untersucht.

In dieser Arbeit wurden zwei Klinostaten genutzt:

#### 9.8.1.1. PMT Klinostat



**Abb. 61: PMT-Klinostat (rechts) mit Frequenzzähler (links oben) und Netzteil (links unten)**

Der PMT Klinostat (s. Abb. 61) diente zum Nachweis des oxidativen Bursts der Zellen. Die Zellen wurden entsprechend des Luminolassays vorbereitet (Kapitel 9.7.1). Die Messung dauert zwischen 60 und 120 min. Ausgewertet wurden jeweils

die Daten der ersten 3100 s bzw. der ersten 7000 s bei dem Langzeitversuch von 120 min.

Der Klinostat konnte dabei mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten als auch bei 1 g betrieben werden. Zusätzlich konnte die Geschwindigkeit auch während der Messung geändert, bzw. die Rotation gestoppt werden. Durch Stoppen und erneutes Starten der Rotation konnten verschiedene Beschleunigungsprofile untersucht werden. Mithilfe der zugehörigen Heizbox wurde immer eine konstante Temperatur von 37 °C gewährleistet. Dadurch konnte der Klinostat auch für Experimente auf der Zentrifuge und während der Parabelflüge verwendet werden. Für ausführlichere Informationen siehe Kapitel 9.8.2.2 u. 9.8.1.3.

### **9.8.1.2. Pipettenklinostat**

Der Pipettenklinostat (s. Abb. 62) diente zur Nachweis der Phagozytose. Die Pipetten waren mit 500 µl befüllt und enthielten  $5 \times 10^5$  frisch geerntete Zellen. Jeweils 250 µl davon wurde an NBT-Zymosan/ NBT-PBS Lösung bzw. FITC-Zymosan/ FITC-PBS (selbst hergestellt) zugegeben und die Zellen bei 37°C für 30, 60 und 90 min klinorotiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Suspension während der Rotation entleert. Zum Stoppen der Phagozytose erfolgte die Überführung in 1 ml eiskaltes PBS und anschließend, wie oben beschrieben, die weitere Verarbeitung der Proben. Die 1 g Kontrolle wurde entsprechend gleich behandelt und für die Dauer der Inkubation in den Klinostaten gelegt.



**Abb. 62: DLR Pipettenklinostat (Design Jens Hauslage) im Inkubator**

### **9.8.1.3. Parabelflugexperimente**

Der Parabelflug wurde genutzt, um das *oxidative Burst* Verhalten bei „realer“ Schwerelosigkeit zu untersuchen. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die identische Hardware, d.h. der PMT Klinostat entsprechend der Bodenversuche verwendet. Zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur wurde eine Heizbox konstruiert, in die der Klinostat integriert werden konnte ( 6.2.2).

Während des Fluges wurde der oxidative Burst in der Parabelflugsituation untersucht, also ohne Drehung des Klinostaten.

Zusätzlich wurde die Funktionalität der Rotation als Simulationsmethode getestet. Dazu wurde am jeweils letzten Flugtag der Klinostat kontinuierlich bzw. nur während der Mikrogravitationsphasen und in einem weiteren Experiment durchgängig bei 60 UpM rotiert.

## 9.8.2. Zentrifugen

Zur Untersuchung der Wirkung von erhöhter Schwerkraft wurden in dieser Arbeit Experimente auf zwei verschiedenen Zentrifugentypen durchgeführt.

### 9.8.2.1. MuSIC (Multi-Sample Incubation Centrifuge)



Abb. 63: Zentrifuge MuSIC, DLR Köln

Mit Hilfe der Zentrifuge MuSIC des DLR (s. Abb. 63) wurde die Phagozytose bei erhöhter Schwerkraft untersucht.

Hierzu wurden Kryoröhrchen mit 500  $\mu$ l Suspension bestehend aus 250 ml Zellmedium  $5 \times 10^5$  frisch geernteter Zellen und jeweils 250  $\mu$ l FITC – Zymosan oder FITC-PBS befüllt. Die Zellen wurden 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend weiter prozessiert (9.6).

### 9.8.2.2. SAHC (Short Arm Human Centrifuge)

Zur Erforschung der oxidative Burst Reaktion wurde ebenfalls die SAHC des DLR (s. Abb. 64) eingesetzt. Dazu wurde der PMT Klinostat auf die Liegeplattform der Zentrifuge geschraubt, so dass der  $g$ -Vektor horizontal zu der Rotationsachse des

Klinostaten (entsprechend des „normalen“ 1 g Vektors) anlag. Der Klinostat wurde wie beschrieben befüllt.

Eine konstante Temperatur von 37 °C wurde durch die konstruierte Heizbox gewährleistet. Die Zentrifuge wurde jeweils für 45 min bei einer Geschwindigkeit von 26,7 UpM rotiert. Dies entspricht einer Beschleunigung von ca. 1.8 g an der Position der Küvette.



**Abb. 64: Short Arm Human Centrifuge, DLR Köln**

## 9.9. Statistik und Auswertung

Alle Versuche wurden mit mindestens fünf unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

Im Ergebnisteil dieser Arbeit ist jeweils ein typisches Versuchsergebnis stellvertretend für alle unabhängigen Versuche dargestellt. Negativkontrollen ohne Stimulation der Zellen sind im Ergebnisteil in der Regel nicht gesondert aufgeführt, wenn sie kein außergewöhnliches Signal lieferten. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus den Parallelen mit zugehörigem Standardfehler ( $\pm SE$ ;  $SE = SD/\sqrt{n}$ ), wobei SE dem Standardfehler, SD der Standardabweichung und n der Anzahl der Wiederholungen entspricht.

Die Durchführung aller statistischen Analysen erfolgte unter Verwendung der Software PASW Statistics 18. Tests auf Normalverteilung wurden nach Shapiro-Wilk durchgeführt. Ausreißer wurden in Ausnahmefällen nach Grubbs ermittelt (Sachs 2004).

Die Mittelwerte aller Rohdaten mit zugehörigem Standardfehler finden sich zu sämtlichen Experimenten in Tabellenform in Anhang Tabelle 24-Tabelle 32.

Signifikante Unterschiede zwischen Behandlungen wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Anschließend wurde ein Mittelwertsvergleich nach Tukey durchgeführt.

Bei dem Vergleich von zwei Gruppen wurde mit einem ungepaarten Student t-Test geprüft. Signifikanzniveaus sind:  $\alpha < 0,05$  (\*),  $\alpha < 0,01$  (\*\*) und  $\alpha < 0,001$  (\*\*\*). Dies bedeutet für die berechneten Unterschiede, dass sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %, 99 % oder 99,9 % signifikant sind.

Für eine anschauliche graphische Darstellung wurden alle Datensätze normalisiert, wobei die Mittelwerte der nicht exponierten Kontrollen stets dem Wert 1 entsprachen. Sämtliche Einzeldaten wurden anschließend zu den Mittelwerten der Kontrollen ins Verhältnis gesetzt.

## 10 Ergebnisse

### 10.1. Messung des oxidativen Bursts

Die Radikalproduktion durch den oxidativen Burst wurde mit Hilfe des PMT Klinostaten eingehend studiert. Dabei wurde einerseits Kinorotation bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten, andererseits verschiedene Profile mit kurzzeitigen Rotationsphasen von 60 UpM untersucht. Weiterhin wurde die Radikalproduktion bei 1,8 g auf der SAHC und während zweier Parabelflüge bestimmt.

#### 10.1.1. Kontrollen

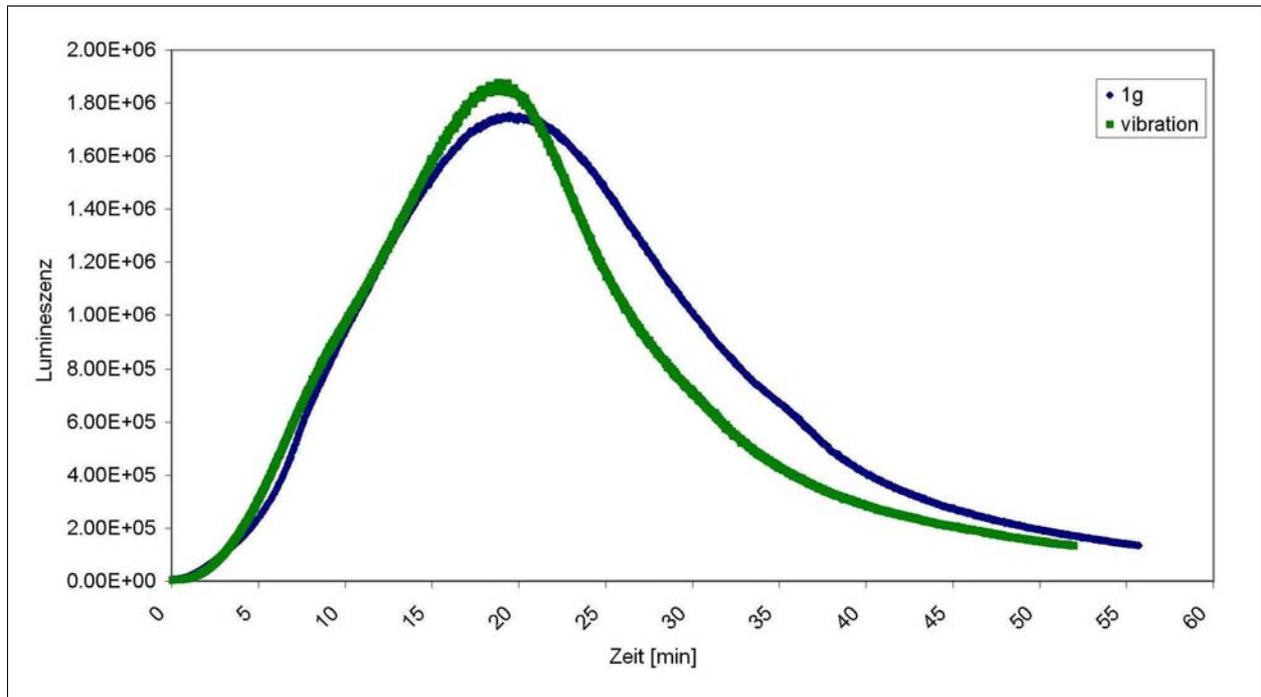
Im folgenden Abschnitt werden die durchgeführten Kontrollen kurz dargestellt. Alle Experimente wurden mit mindestens drei Wiederholungen durchgeführt. Zur Veranschaulichung ist jeweils eine exemplarische Kurve demonstriert.

##### 10.1.1.1. Mechanische Kontrollen

Die Ergebnisse der mechanischen Kontrollen finden sich in Kapitel 7.2 (Hardwareentwicklung).

##### 10.1.1.2. Vibrationstest

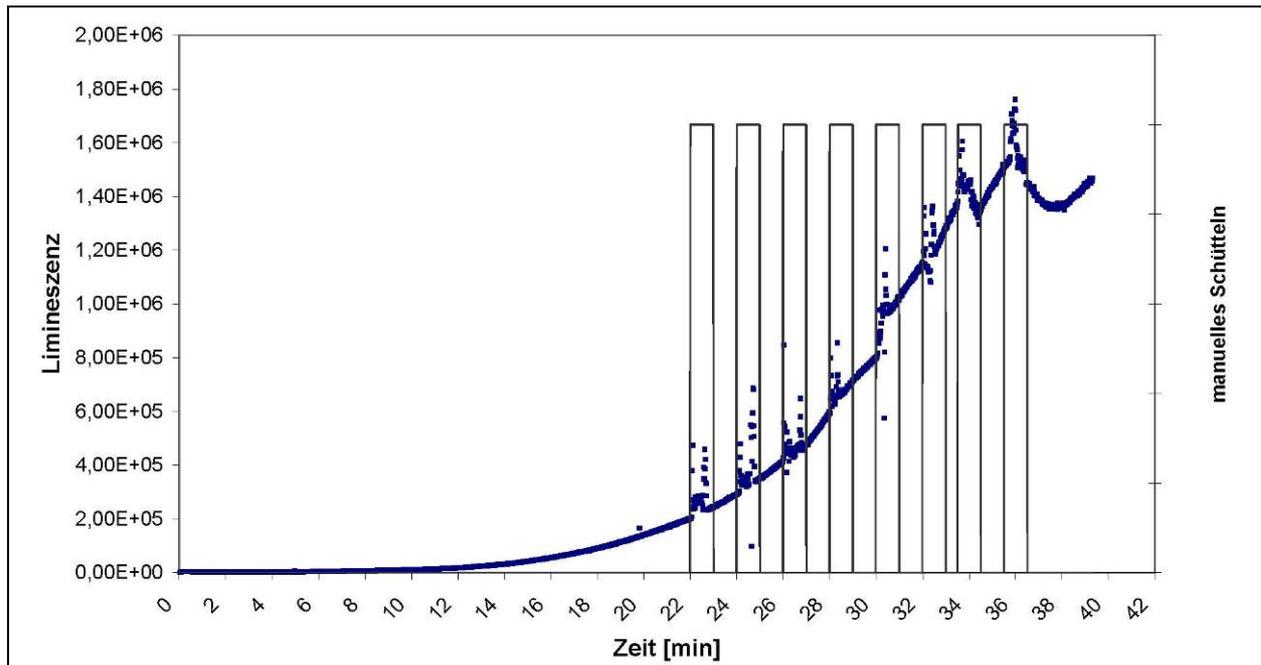
Um auszuschließen, dass die im Parabelflugzeug herrschenden Vibrationen einen Einfluss auf die Zellen haben könnten, wurden Kontrollen mit einer Vibrationsplattform (Vibraplex, DLR Köln) durchgeführt. Dabei wurde die im Flugzeug durch den Motor induzierten Vibrationen simuliert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Vibrationen keinen offensichtlichen Einfluss auf den oxidativen Burst der Makrophagen haben (Abb. 65).



**Abb. 65: Vibrationstest auf der Vibraplex (DLR). Die Zellen wurden entsprechend der während des Parabelfluges entstehenden Vibrationen geschüttelt. Blau : 1 g Kontrolle; grün: vibrierte Zellen**

### 10.1.1.3. Schütteltest

Als weiterer Kontrollversuch zum Einfluss starker Vibrationen wurde der gesamte Klinostat mit aktivierten Zellen manuell stark geschüttelt (Abb. 66). Der Klinostat wurde dabei jeweils zu den markierten Zeitpunkten für ca. eine Minute innerhalb des Inkubators geschüttelt. Die Zellen zeigen bei den Schüttelperioden einen Anstieg in der Signalhöhe. Im Gegensatz zu den Klinorotations- und den Parabelflugexperimenten fallen die Signale durch die erzeugte Beschleunigung allerdings nie ab.



**Abb. 66: Kontrolle aktivierter Zellen. Starke Vibrations erzeugt durch manuelles Schütteln des Klinostaten.** Die schwarze Linie markiert die Punkte an denen, jeweils für 1 min manuell geschüttelt wurde

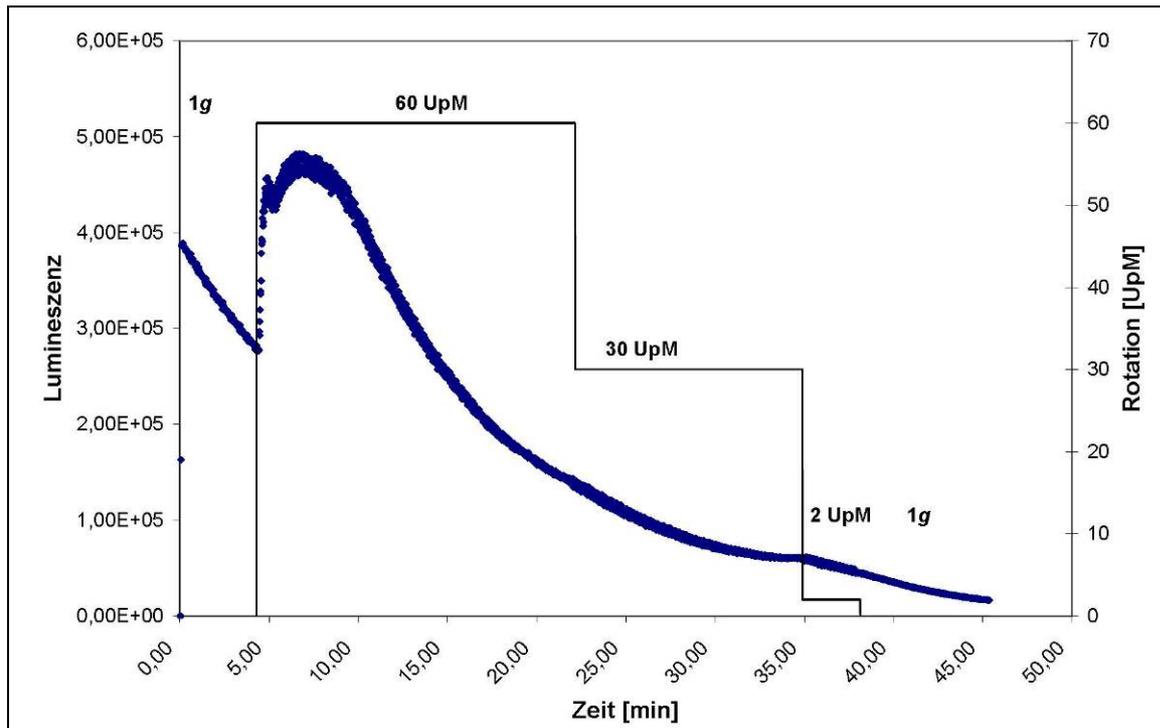
#### 10.1.1.4. Quenching Kontrolle

Eine Möglichkeit der Signalreduktion wäre eine Abschwächung des Signals durch die in Klinorotation schwebenden Zellen (Quenching vgl. Abb. 93). D.h. Zellen die sich näher am PMT befinden absorbieren bzw. reflektieren das Signal der weiter hinten schwebenden Zellen, so dass effektiv weniger am Sensor ankommt.

Um ein Quenching des Signals durch die Zellen auszuschließen, wurden tote, nicht aktivierte Zellen in lumineszenter Lösung gemessen.

Dazu wurden Chemikalien aus einem handelsüblichen Knicklicht (*Euro-lite*, Behr Angelsport, Ladenburg) entnommen und im Verhältnis 1:98 mit PBS vermisch. In diese Lösung wurden tote Zellen in einer Konzentration von  $7 \times 10^5$  gegeben.

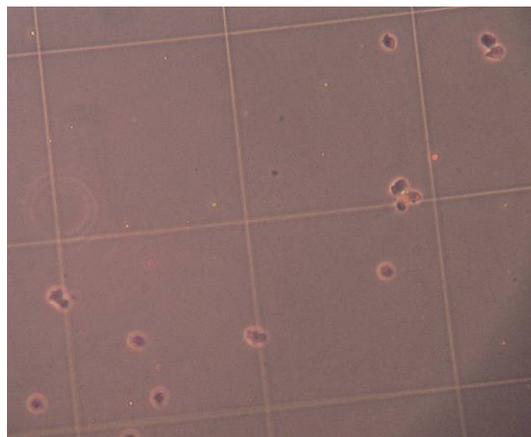
Die Lumineszenz wurde bei 1 g und Rotation von 60, 30 und 2 UpM gemessen.



**Abb. 67: Quenching Kontrolle mit toten Zellen und Chemikalien**

Vor und nach der Messung wurden Morphologie und Vitalität der Zellen in einer Trypanblaufärbung überprüft. Die Zellen waren tot, jedoch morphologisch intakt (Abb. 68).

Abb. 67 zeigt ein Ergebnis einer solchen Messung. Die Reaktion sinkt von Anfang an ab, da die Chemikalien verbraucht werden.



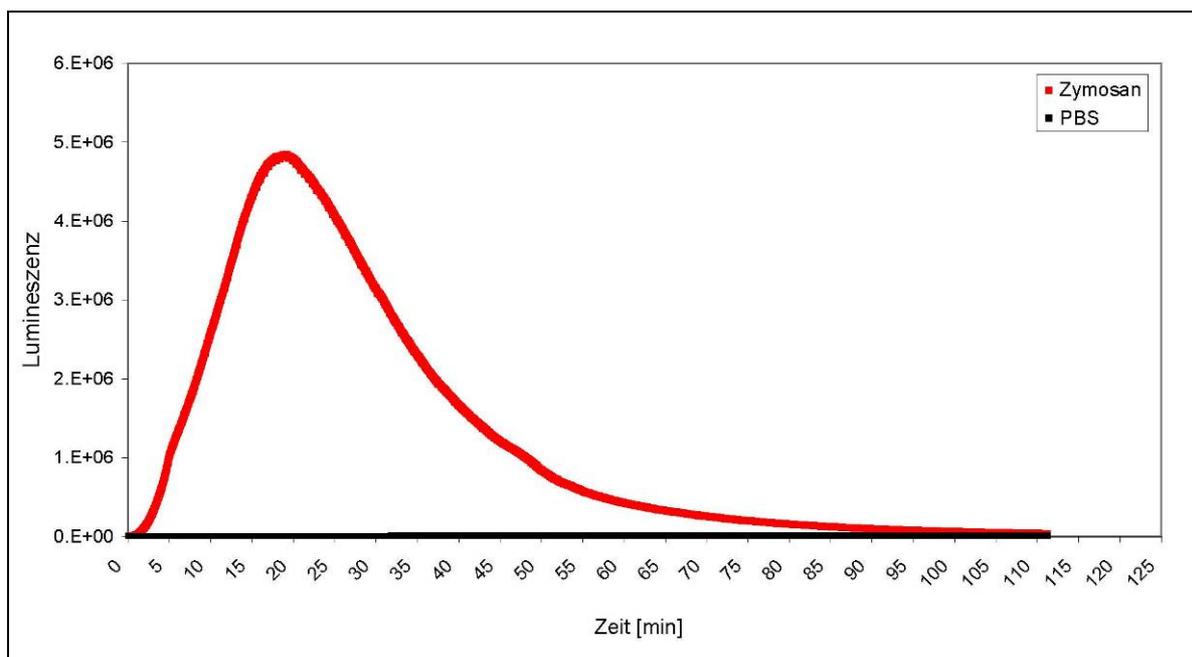
**Abb. 68: Zur Quenching Kontrolle verwendete tote Zellen**

Nach Starten der Rotation ist ein Signalanstieg zu sehen, bedingt durch die Vermischung der Chemikalien. Anschließend sinkt die Signalkurve wieder ab. Zu keinem Zeitpunkt ist eine Reduktion der Signalstärke durch die Rotation zu erkennen.

## 10.1.2. Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit

### 10.1.2.1. Kinetik 1 g

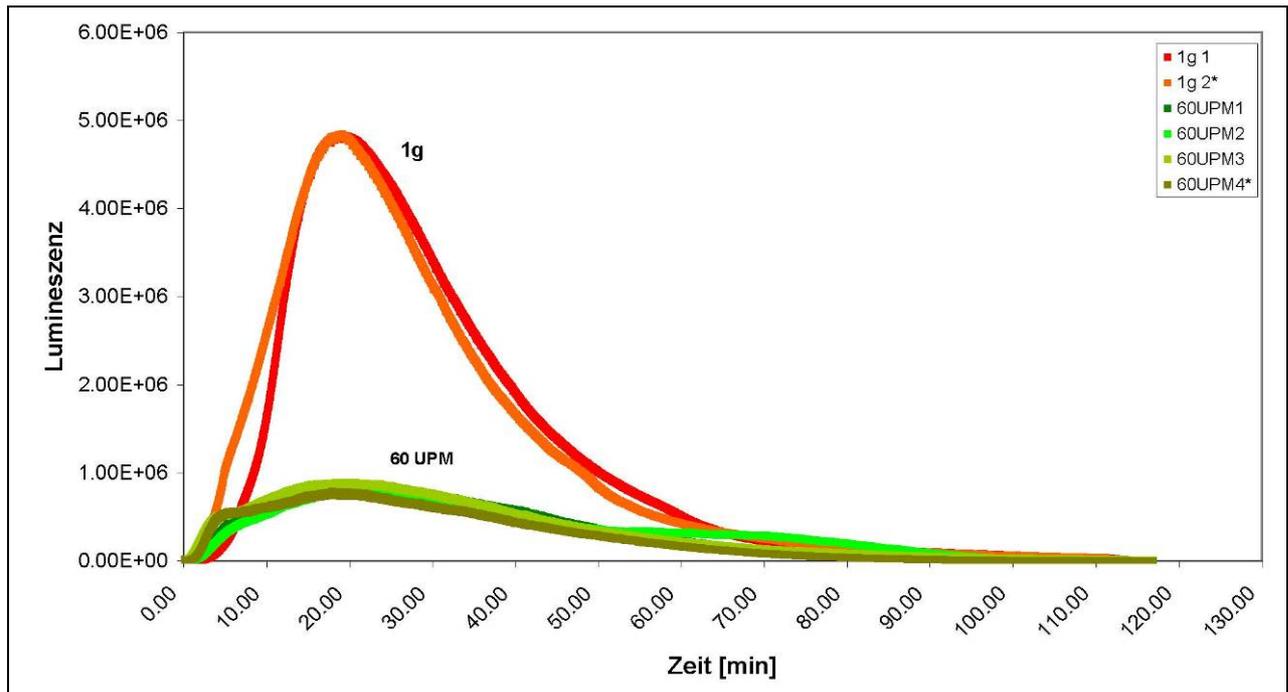
Abb. 69 zeigt die normale Kinetik bei 1 g (rote Kurve). Die Zellen wurden bei  $t = 0$  mit Zymosan aktiviert und sofort danach ist die oxidative Burst Reaktion erkennbar. Die Reaktion erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 20 min. Danach nimmt die Reaktion wieder ab, was zu einem typischen parabelförmigen Verlauf der Kurve führt. Nach ca. 60 bis 70 min ist die Reaktion nicht mehr messbar, und die Zellen zeigen kaum noch Radikalproduktion. Die schwarze Linie, parallel zur Zeitachse, zeigt die Reaktion von nicht aktivierten Zellen. Die Messungen der Referenz der nicht aktivierten Zellen werden im Weiteren nur erwähnt, wenn diese ein zu Abb. 69 unterschiedliches Ergebnis aufwiesen.



**Abb. 69: Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Typische 1 g Kinetik des oxidativen Bursts durch mit Zymosan aktivierte Makrophagen (rot). Die schwarze Kurve zeigt nichtaktivierte, mit PBS behandelte Zellen**

### 10.1.2.2. Kinetik 60 UpM

Abb. 70 zeigt die normale Kinetik bei 1 g im Vergleich zu der Kinetik bei Klinorotation von 60 UpM. Die Aktivität der Zellen ist deutlich reduziert, der Peak ist um einen Anteil von 5/6 niedriger als bei 1 g. Die allgemeine Kinetik mit einem Maximum nach ca. 20 min und anschließenden Abfall ist aber ähnlich.

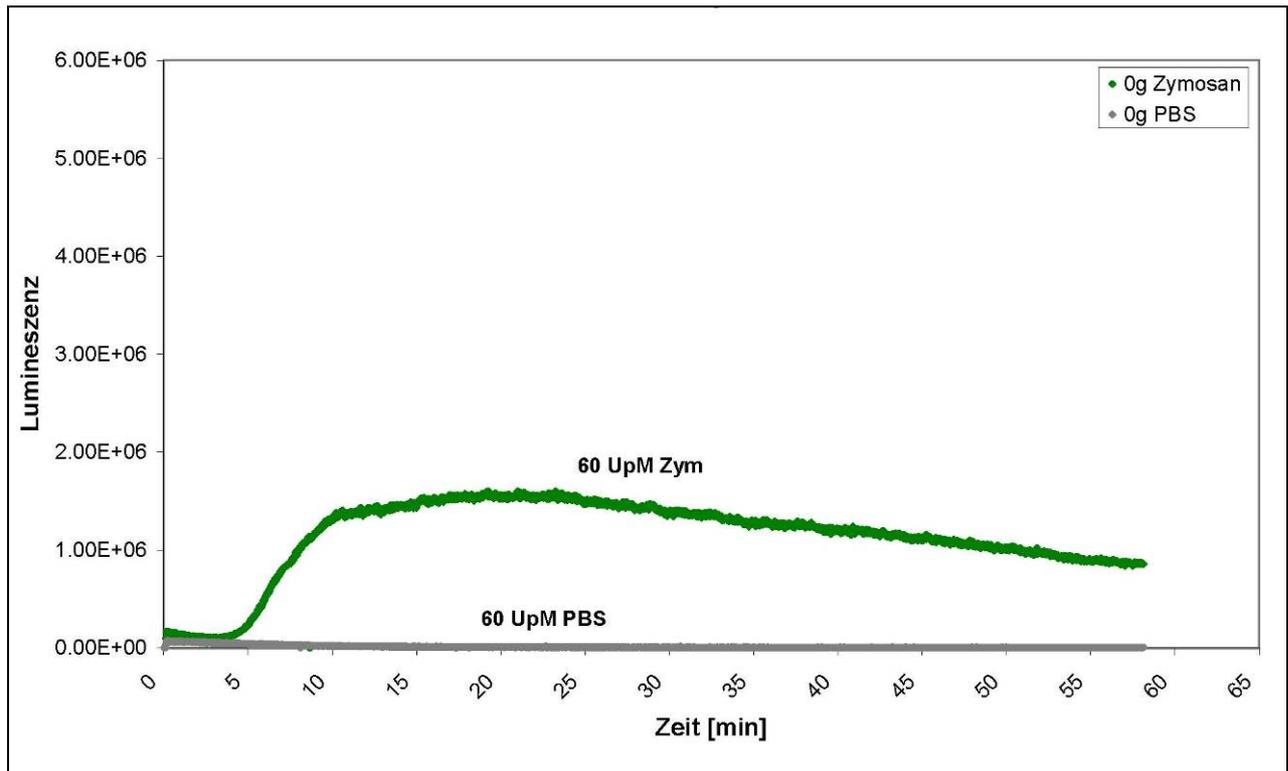


**Abb. 70: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen bei Rotation von 60 UpM und 1 g. \*Messungen wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert**

### 10.1.2.3. Nicht aktivierte Zellen 60 UpM

Um eine Stressreaktion auszuschließen, wurden entsprechend der Kontrollen bei 1 g bei 60 UpM ebenfalls Kontrollen mit PBS, d.h. nicht aktivierten Zellen durchgeführt. Abb. 71 zeigt ein Beispiel einer solchen Messung. Entsprechend zu den 1 g Kontrollen (Abb. 69) zeigen auch die mit 60 UpM rotierten nicht aktivierten Zellen keinerlei Reaktion.

Bei den weiteren Messungen werden diese Kontrollen aus Übersichtsgründen nicht erwähnt solange sie kein zu Abb. 71 unterschiedliches Ergebnis aufweisen.

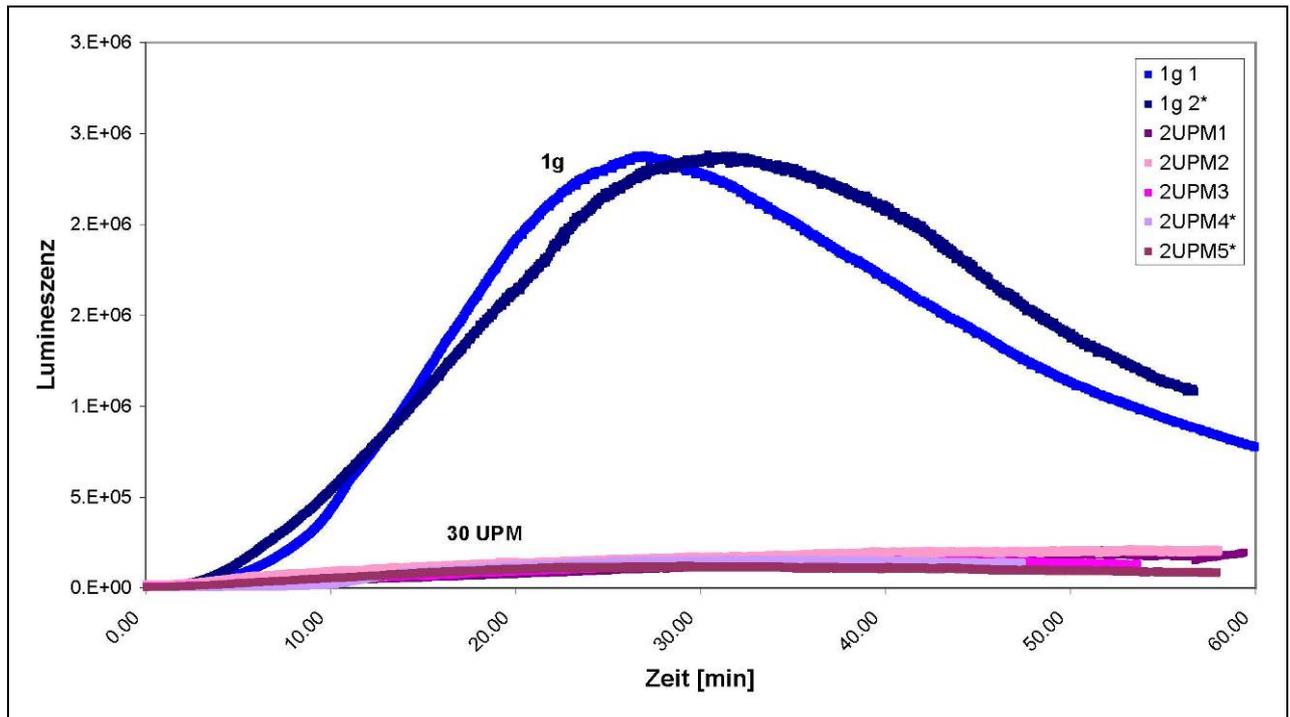


**Abb. 71: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich zwischen aktivierten Makrophagen bei 60 UpM und nicht aktivierten, mit PBS behandelten Zellen ebenfalls bei 60 UpM**

#### 10.1.2.4. Kinetik 30 UpM

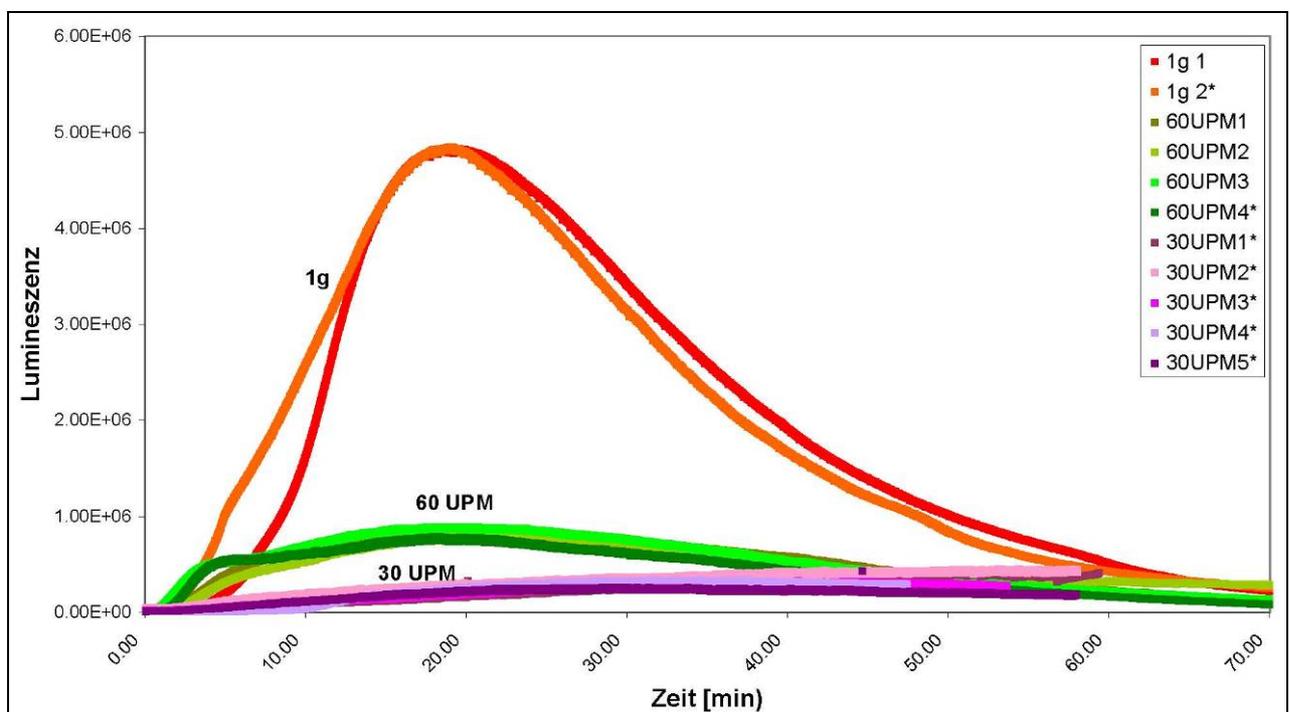
Abb. 71 zeigt einen Vergleich von aktivierten Makrophagen bei 1 g mit 30 UpM klinorotierten Zellen. Man erkennt keinerlei Aktivierungsschema (Anstieg zum Peak etc.) im Vergleich zu 60 UpM und 30 UpM in Abb. 72. Die Signalhöhe liegt signifikant unter dem Maximum bei 60 UpM.

Im Folgenden ist jeweils ein exemplarisches Beispiel als Vergleich zur Kurve bei 1 g dargestellt. Eine statistische Auswertung ist in Abb. 75, Abb. 77 und Abb. 78 zu sehen. Dabei wurden jeweils die Fläche unter der Kurve (AUC: gesamte Radikalproduktion), das Maximum der Kurve (RLU: maximale Radikalproduktion) und die Zeit bis zum Erreichen des Maximums (lag time) zwischen den einzelnen Versuchsreihen verglichen. Es wurden jeweils mindestens 5 Wiederholungen durchgeführt.



**Abb. 72: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen bei Rotation von 30 UpM (violett) und 1 g (blau).**

\*Messungen wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert

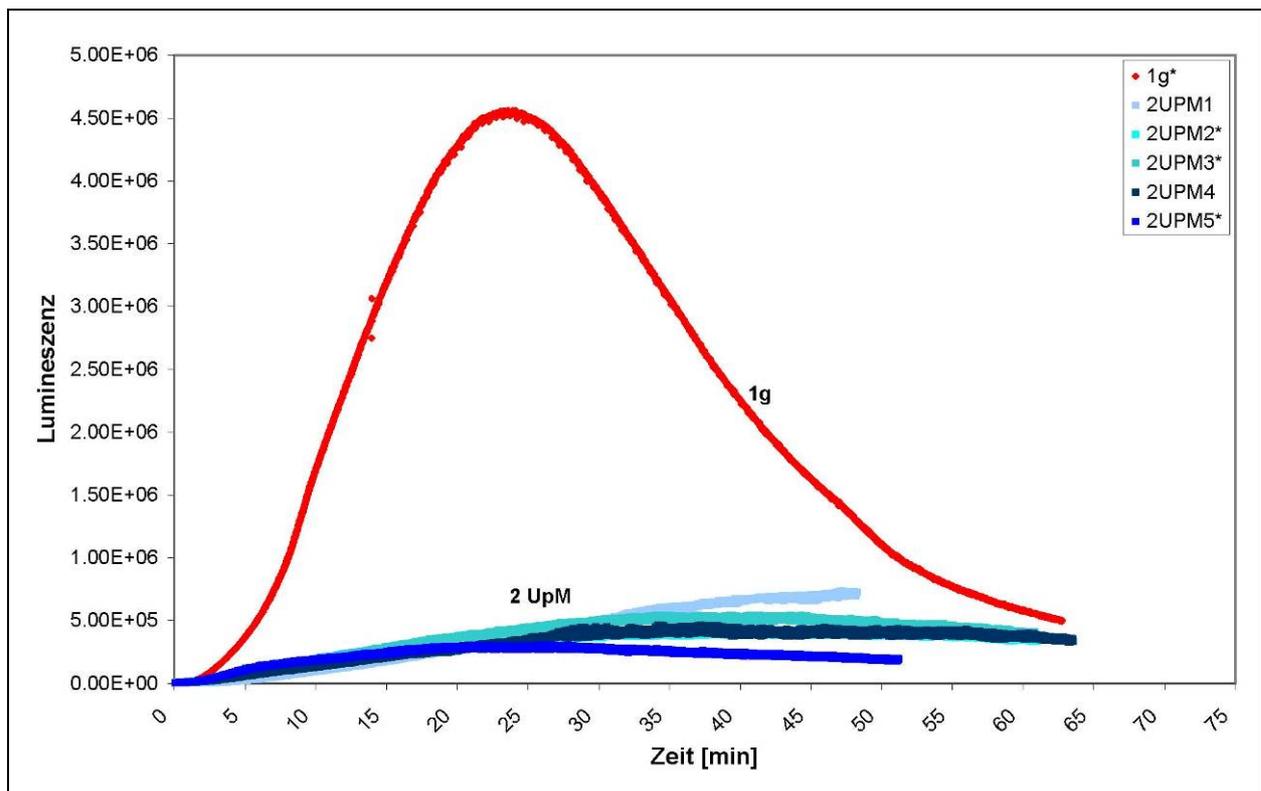


**Abb. 73: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen bei Rotation von 60 UpM (grün) und 30 UpM (violett).**

\*Messungen wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert

### 10.1.2.5. Kinetik 2 UpM

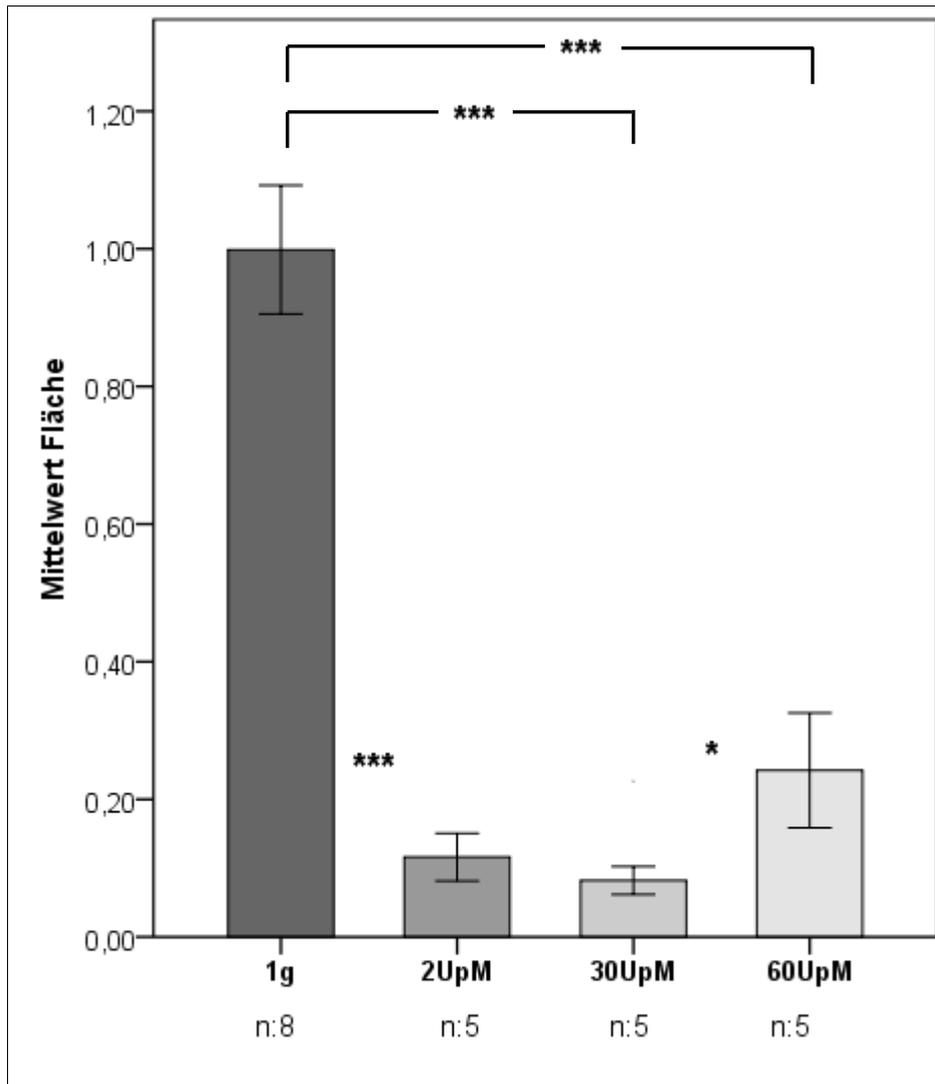
Abb. 74 zeigt einen Vergleich von einer 1 g Messung zu aktivierten Makrophagen die mit 2 UpM klinorotiert wurden. Wie bei 30 UpM ist nahezu kein Aktivierungsschema (Anstieg zum Peak etc.) mehr zu erkennen.



**Abb. 74: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen Rotation von 2 UpM (blau) und 1 g (rot). \*Messung wurde an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert**

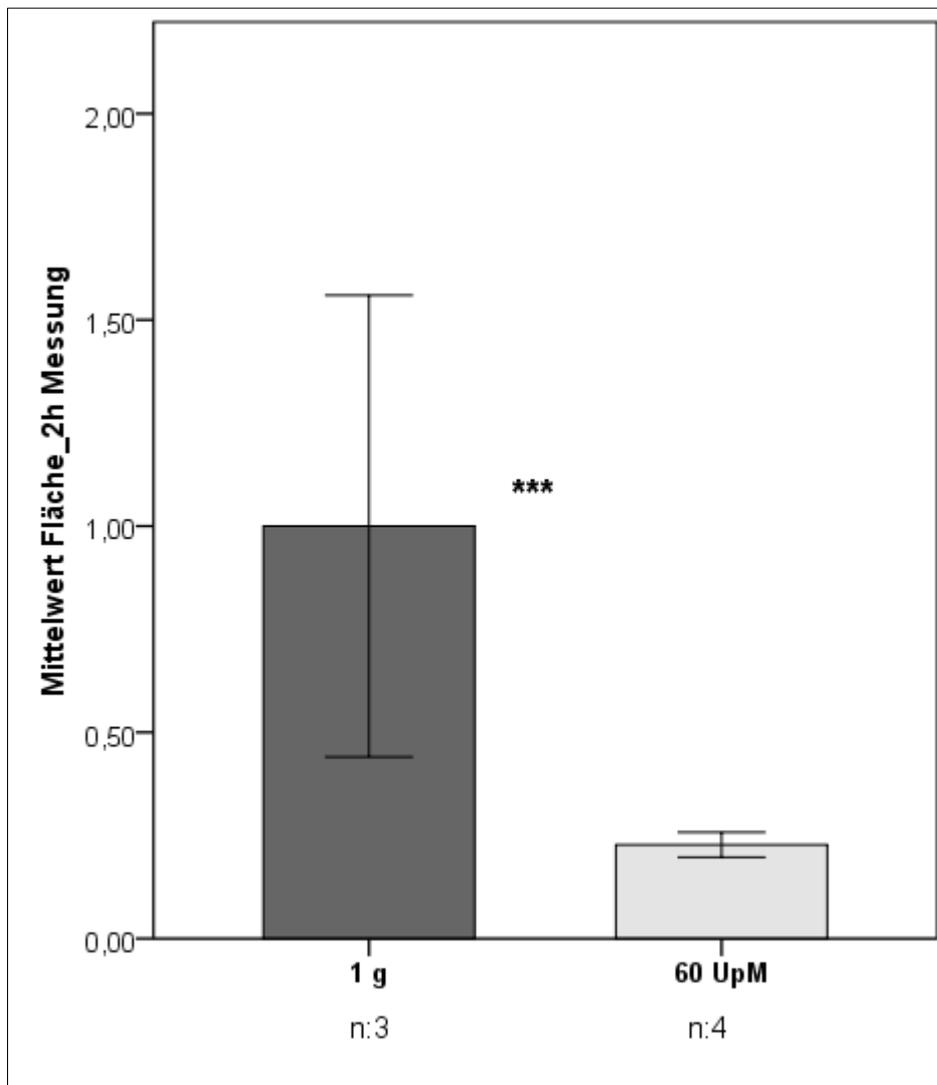
Abb. 75 bis Abb. 77 zeigen eine statistische Analyse der Ergebnisse der unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardabweichung. Signifikanzniveaus sind  $\alpha < 0,05$  (\*),  $\alpha < 0,01$  (\*\*) und  $\alpha < 0,001$  (\*\*).

Die gesamte Radikalproduktion (Abb. 75) wie auch die maximale Radikalproduktion (Abb. 77) ist bei den rotierten Proben jeweils signifikant niedriger als bei der 1 g Kontrolle. Weiterhin ist erkennbar, dass beide Reaktionen bei 30 UpM signifikant niedriger als bei 60 UpM sind.

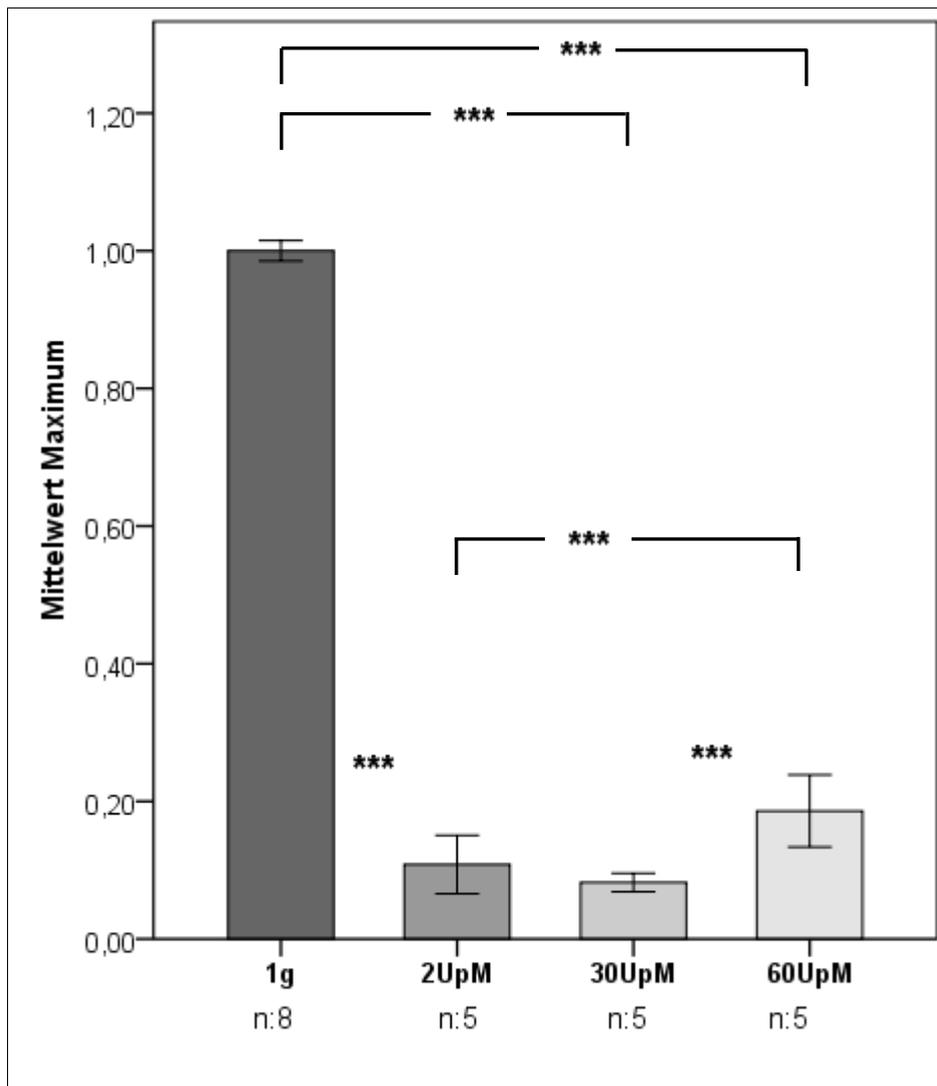


**Abb. 75.:** Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Fläche unter der Kurve (=gesamte Radikalproduktion) zwischen den verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten (60 UpM, 30 UpM, 2 UpM) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte

Bei den 120 min dauernden Versuchen (Abb. 70 und Abb. 76), bei den mit 60 UpM rotiert wurde, war die Gesamtradikalproduktion der Zellen bei Rotation ebenfalls signifikant niedriger als bei 1 g.

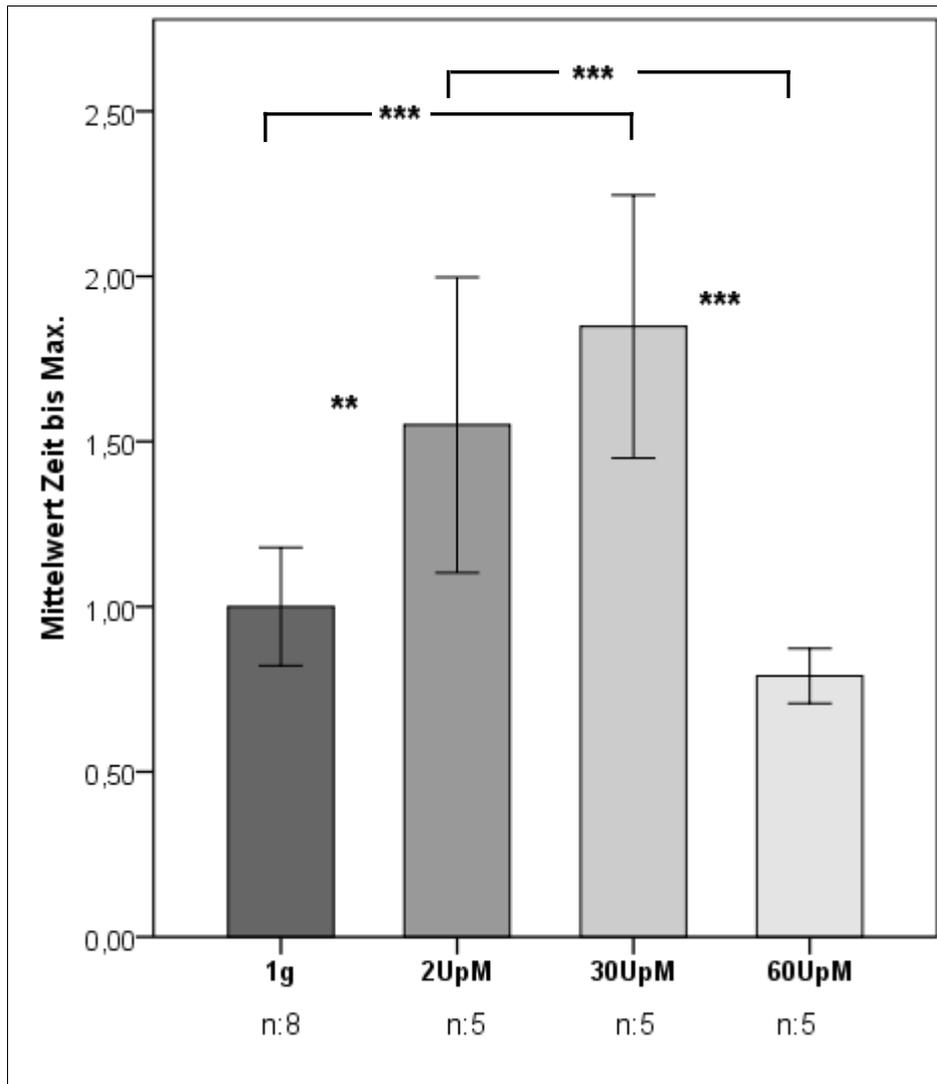


**Abb. 76: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Fläche unter der Kurve (=gesamte Radikalproduktion) zwischen 60 UpM Experimenten und der 1 g Kontrolle. 120 Minuten Messung. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte**



**Abb. 77: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Maxima der Kurve (=max. Radikalproduktion) bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten (60 UpM, 30 UpM, 2 UpM) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte**

Im Vergleich der Zeit bis zum Erreichen des Maximums (Abb. 78) fällt auf, dass bei Rotation mit 2 UpM und bei 30 UpM der Peak signifikant später als bei 1 g erreicht wird. Allerdings gibt es bei den langsamen Umdrehungszeiten nicht mehr den normalen, parabelförmigen Verlauf der Reaktion und auch kein deutliches Maximum (Abb. 72 und Abb. 74).



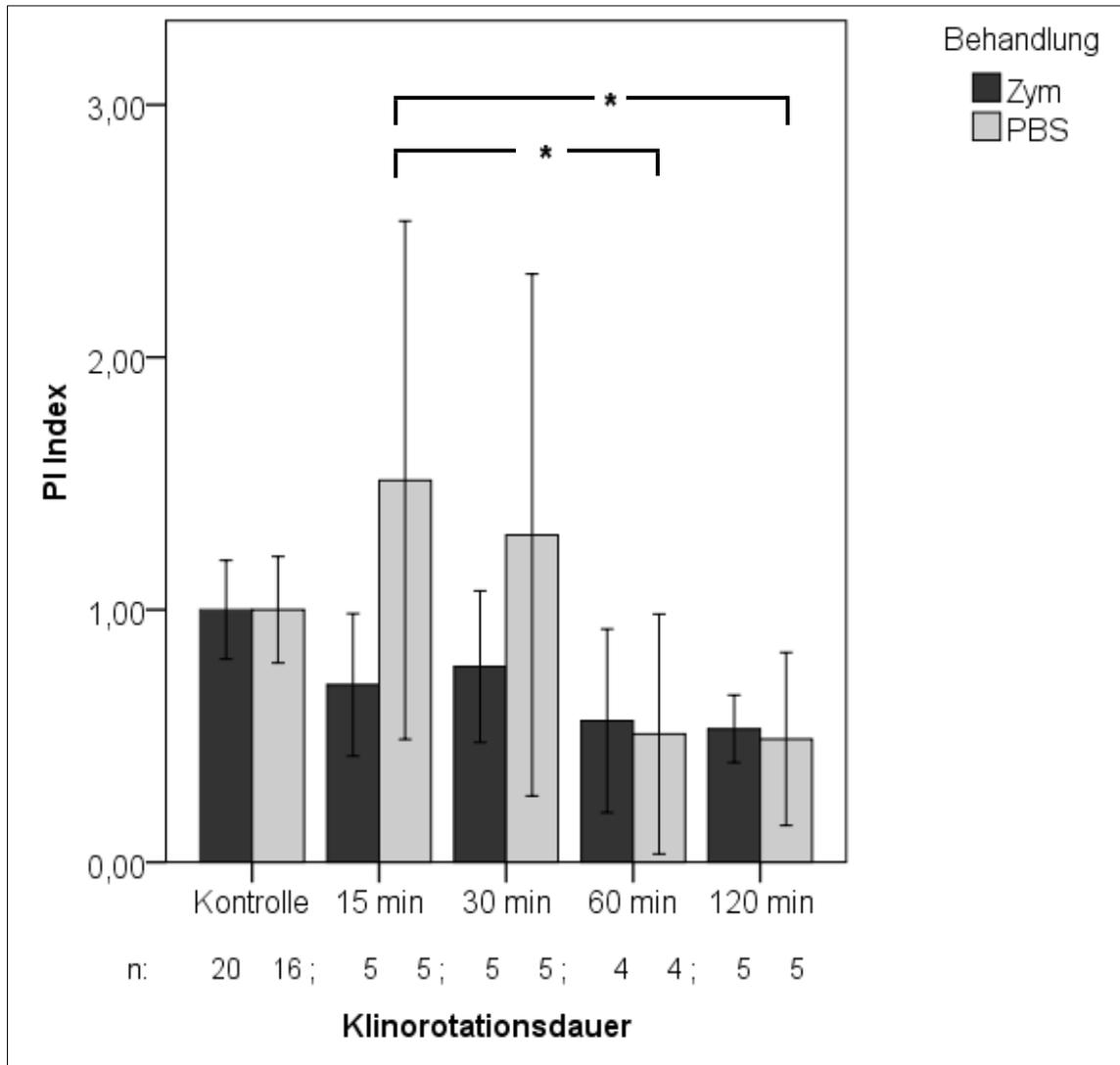
**Abb. 78: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Zeit bis zum Erreichen des Maximum der Kurve (=lag time) bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten (60 UpM, 30 UpM, 2 UpM) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte. Bei 1g ist die Zeit bis zum Erreichen des Peaks ca. 20 min.**

### 10.1.2.6. NBT Assay

Zur Vergleichbarkeit mit früheren Experimenten von Huber (2005) wurde die Radikalproduktion mit einem NBT-Assay im Küvettenklinostat ermittelt.

Während der Inkubation im 2D-Küvettenklinostaten ist keine kinetische Messung möglich. Stattdessen wurde zu mehreren Zeitpunkten eine Endpunktmessung durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen 15, 30, 60 und 120 min (Abb. 79).

Die Radikalproduktion wurde durch die Oxidation von NBT nach der Aufnahme von NBT-Zyosan ermittelt, der Phagozytoseindex wurde fluorimetrisch im Mikrotiterplattenreader bestimmt.



**Abb. 79: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383 ermittelt über die Oxidation von NBT-Zyosan. Endpunktmessungen nach verschiedenen Rotationszeiten. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte**

Abb. 79 zeigt eine generelle Tendenz zur Verminderung der Radikalproduktion bei aktivierten Zellen durch Klinorotation und eine Erhöhung der stressbedingten Radikalproduktion bei nicht aktivierten Zellen nach 15 und 30 min Inkubation. Die Messwerte wiesen allerdings starke Streuungen auf.

### 10.1.3. Profile

Nach den Untersuchungen zur Rotationsgeschwindigkeit wurden verschiedene Profile getestet um die Kinetik der Radikalproduktion besser zu verstehen.

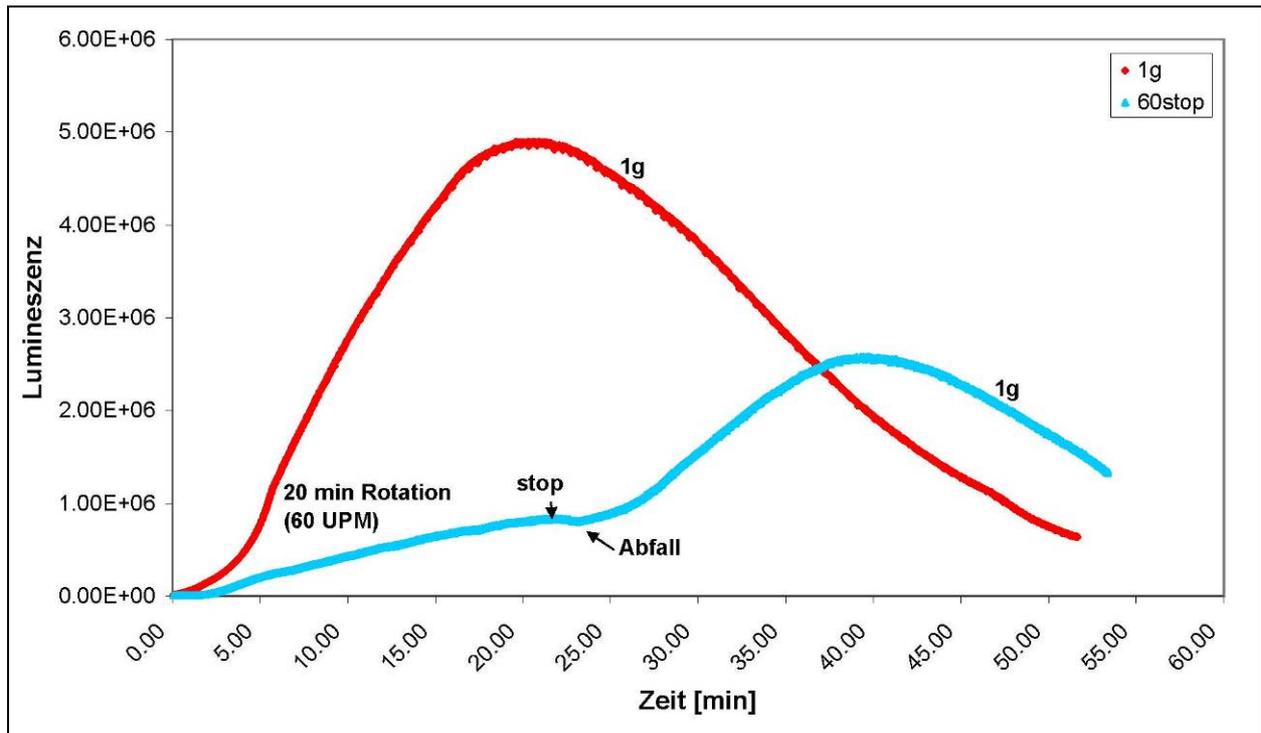
Im Folgenden werden zur Vereinfachung bei der Erklärung der Profile oft deren Kürzel dargestellt. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Profile.

**Tabelle 15: Durchgeführte Profile**

NAME DES PROFILS	DURCHFÜHRUNG
60Stop	Rotation mit 60 UpM für 20 min, anschließend Stoppen der Rotation. Messung bei 1 g für weitere 30 min
Stop60	Reaktion bei 1 g für 20 min. Anschließend Starten der Rotation und Messung bei 60 UpM für weitere 30 min
PF-Profil	Rotation für 22 s bei min: 10, 12, 14, 16, 18, 23, 25, 27, 29, 31, 37, 39, 41, 45; Stopp der Messung nach 50 min

#### 10.1.3.1. 60 UpM (20min) – 1 g (60Stop)

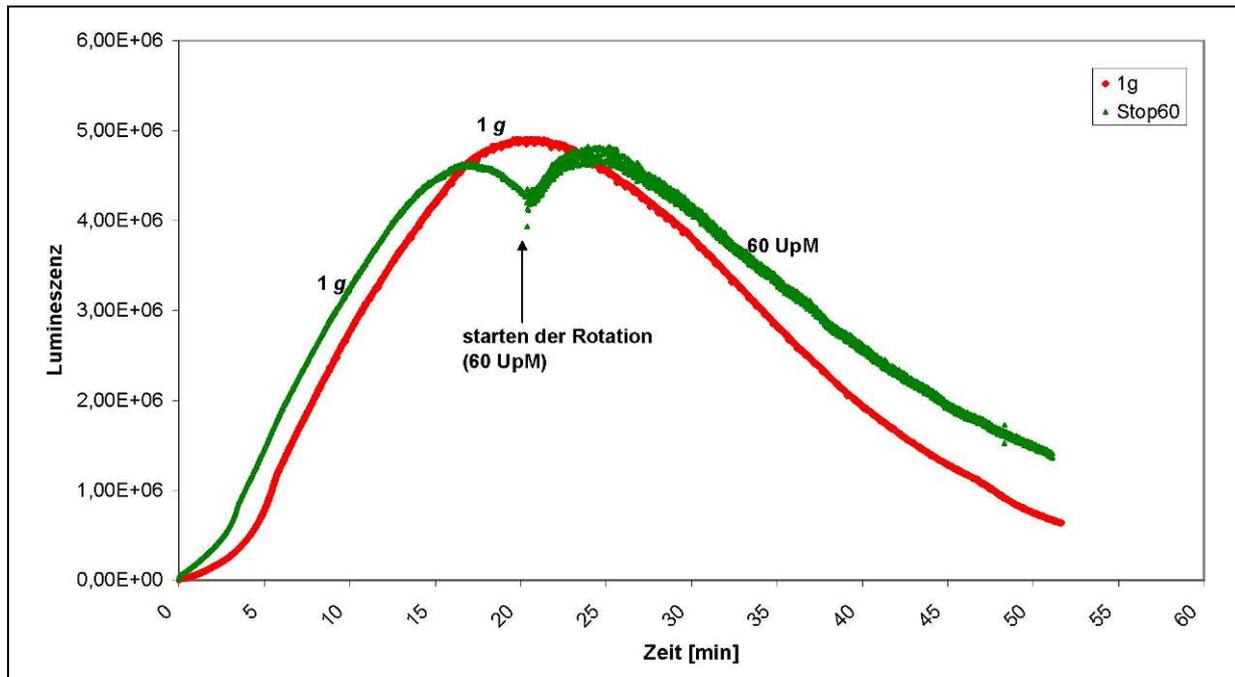
Die Zellen wurden nun für 20 min bei 60 UpM klinorotiert. Anschließend wurde die Rotation gestoppt und die Messung bei 1 g für 30 min fortgeführt (Abb. 80). Die Zellen zeigen bei Klinorotation die gewohnte Suppression der Signalstärke. Nach dem Stopp des Klinostaten ist ein kurzer Einbruch des Signals zu sehen, danach zeigt sich ein Anstieg ähnlich der 1 g Kinetik, der allerdings unter dem normalen Maximum bleibt.



**Abb. 80: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen bei 60 UpM klinorotiert für 20 min. Danach Stoppen der Rotation und Fortsetzen der Messung bei 1 g. 1 g Kontrolle in rot. \*Messung wurde an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert**

### 10.1.3.2. 1 g (20min) – 60 UpM (Stop60)

Nach 20 min Messung bei 1 g wurde der Klinostat gestartet und die Messung für 30 min bei 60 UpM fortgeführt (Abb. 81). Die Makrophagen zeigen bis zum Start der Rotation die normale 1 g Kinetik; nach Rotationsbeginn ist ein kleiner Abfall der Lumineszenz zu sehen, anschließend wird die normale Kinetik fortgeführt. Bis auf den Abfall ist der Verlauf annähernd wie bei Zellen in normaler Schwerkraft. Allerdings ist die Streuung des Signals nach dem Start der Klinorotation erhöht verglichen mit der Streuung vorher und auch mit den von Anfang an klinorotierten Zellen (Abb. 70).

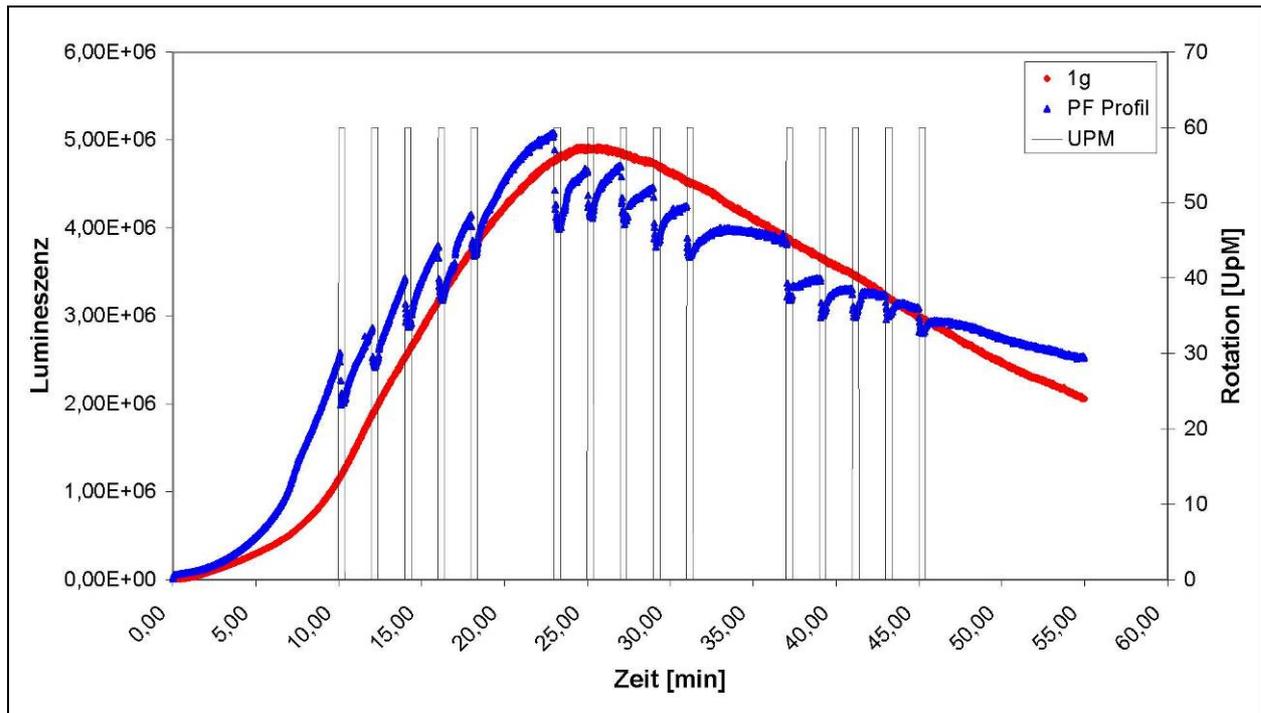


**Abb. 81: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen bei normalen 1 g für 20 min. Danach Starten der Rotation bei 60 UpM. 1 g Kontrolle in rot. \*Messung wurde an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert**

### 10.1.3.3. Parabelflug (PF) Profil

Der zeitliche Verlauf der  $\mu$ g-Phasen des Parabelflugprofils wurden am Boden durch Klinorotation simuliert. Entsprechend dazu wurde jeweils für 22 s bei 60 UpM rotiert, gefolgt von einer Pause von 98 s. Rotiert wurde nach folgendem Profil:

Rotation min: 10, 12, 14, 16, 18; Pause; 23, 25, 27, 29, 31; Pause; 37, 39, 41, 45; Stopp der Messung nach 50 min.



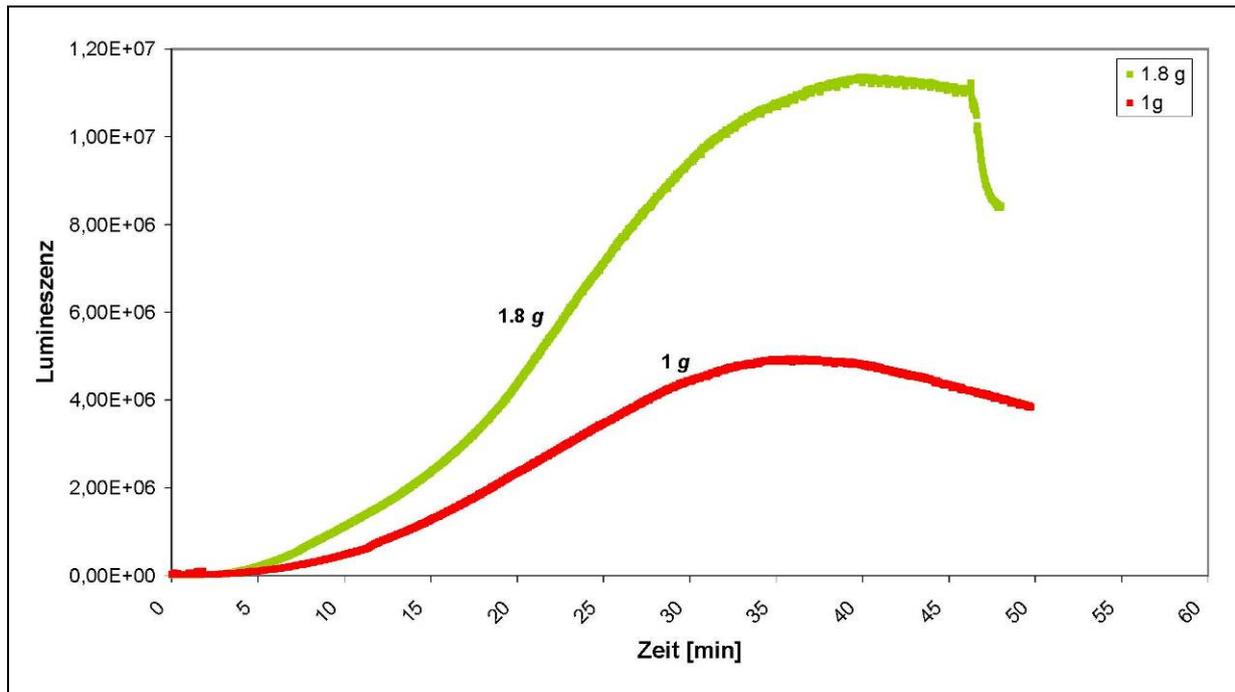
**Abb. 82: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Simuliertes Parabelflugprofil mit aktivierten Makrophagen. 1 g Kontrolle in rot. Rotationsprofil in grau unterlegt**

Die Zellen zeigen jeweils zu Beginn der Rotation einen Signalabfall (Abb. 82), vergleichbar mit dem Signalabfall beim Parabelflug (Abb. 88). Bezogen auf die maximale Peakhöhe entspricht der Abfall ca. 10% des Signals.

Bei Stoppen der Rotation geht die Kurve sofort wieder in die 1 g Kinetik über.

#### 10.1.3.4. Zentrifugation (Hyper-g) bei 1.8 g auf der SAHC

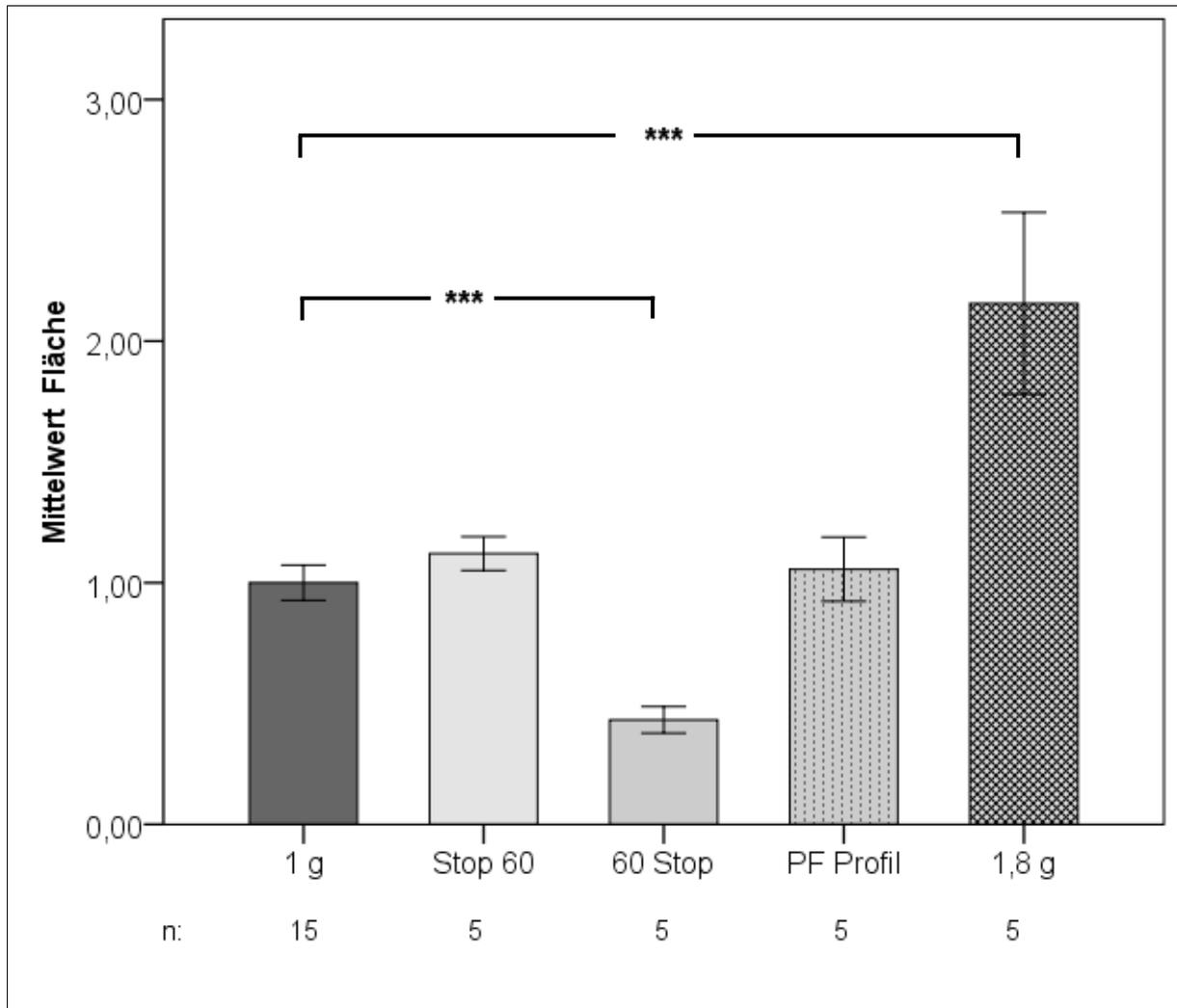
Abb. 83 zeigt die normale Kinetik bei 1 g im Vergleich zu der Kinetik bei 1.8 g auf der SAHC (Short Arm Human Centrifuge). Die Aktivität der Zellen ist unter Hypergravitation deutlich erhöht, das Maximum entspricht dem doppelten Wert im Vergleich zum 1 g-Experiment. Die allgemeine Kinetik mit einem Maximum nach ca. 20 min und anschließenden Abfall ist dem 1 g-Verlauf jedoch ähnlich. Nach dem Stopp der Zentrifuge erfolgt ein deutlicher Abfall der Lumineszenz.



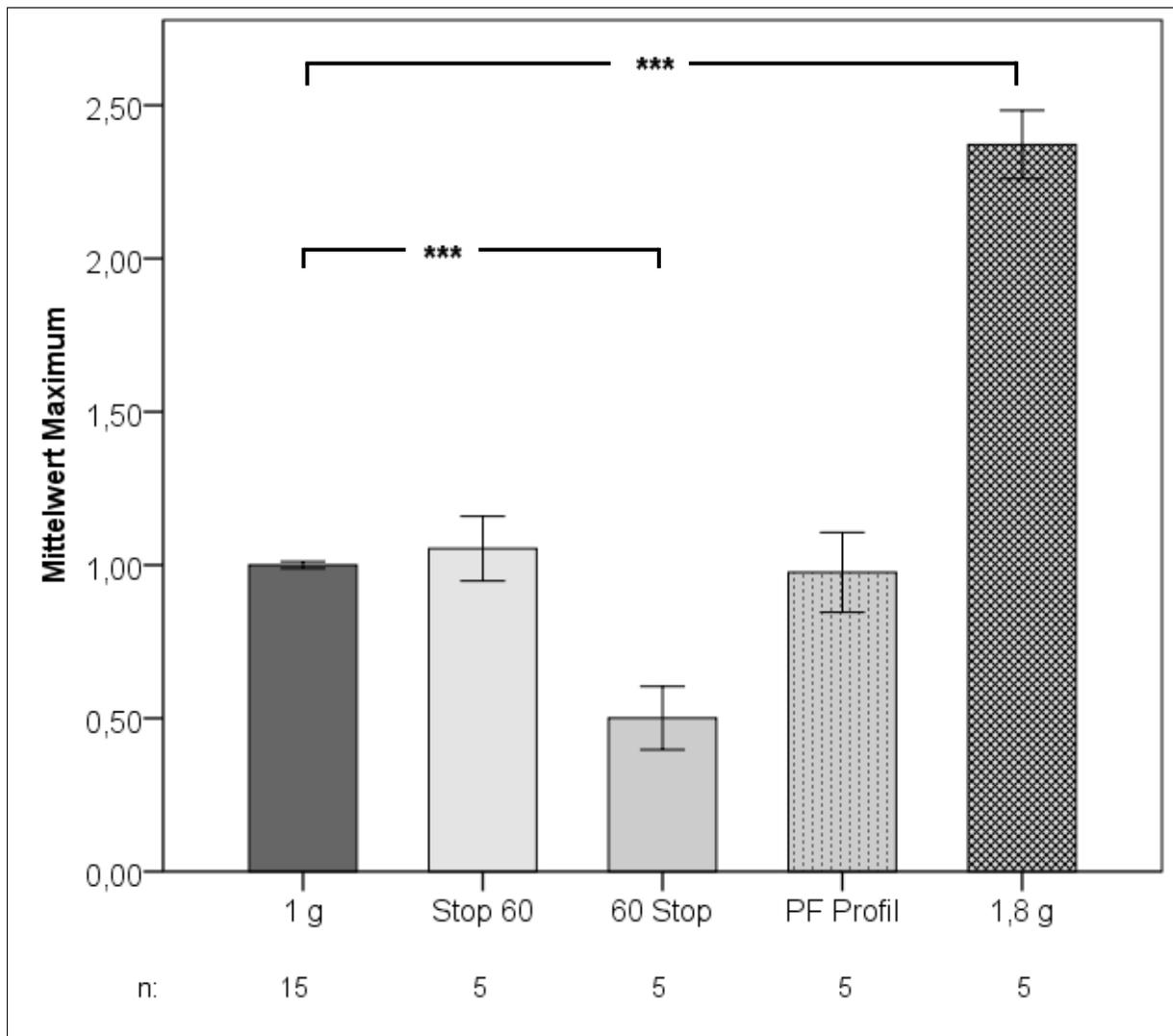
**Abb. 83: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen bei 1.8 g (grün) und bei 1 g (rot)**

Abb. 84 - Abb. 86 zeigen die Ergebnisse einer statistischen Auswertung der unterschiedlichen Profile in graphischer Darstellung. Verglichen wurde jeweils das Maximum, die Fläche unter der Kurve (AUC: Gesamtradikalproduktion) und die Zeit bis zum Erreichen des Maximums (lag time). Für alle Versuche wurden mindestens 5 unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardabweichung. Signifikanzniveaus sind:  $\alpha < 0,05$  (\*),  $\alpha < 0,01$  (\*\*) und  $\alpha < 0,001$  (\*\*).

Die gesamte wie auch die maximale Radikalproduktion durch den oxidativen Burst ist bei 1.8 g auf der Zentrifuge signifikant höher als unter 1 g Bedingungen. Bei Rotation mit 60 UpM und anschließendem Stoppen der Rotation sind beide Parameter signifikant niedriger als unter 1 g. Bei dem durch Rotation nachgestellten Parabelflugprofil und bei der nach 20 min beginnenden Rotation von 60 UpM ist dagegen kein Unterschied bei Maximum und bei der Fläche der Kurve festzustellen (Abb. 84 und Abb. 85).

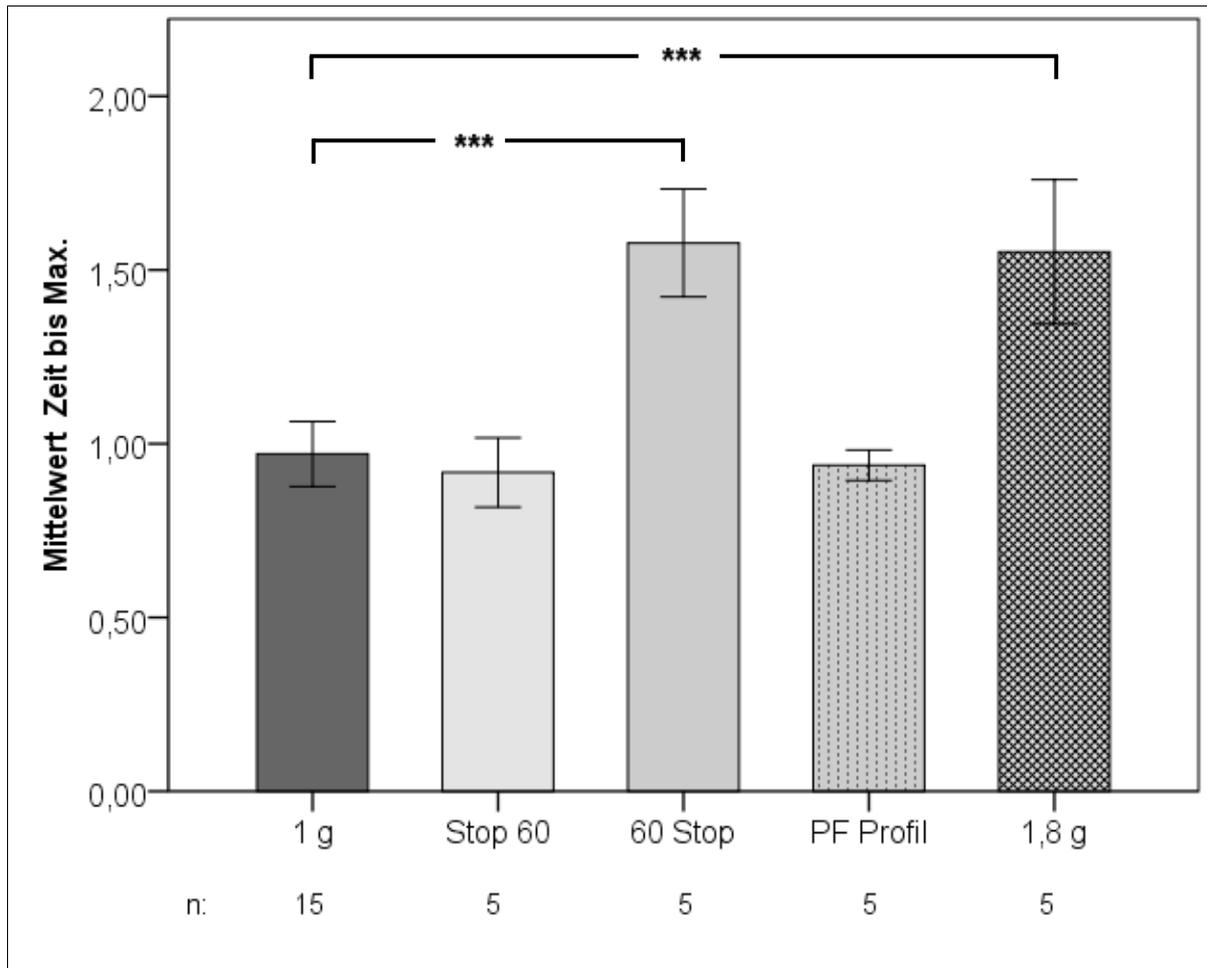


**Abb. 84: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Fläche unter der Kurve (=gesamte Radikalproduktion) bei verschiedenen Profilen (Stop (1 g) 60 UpM, 60 UpM –Stop (1 g), Parabelflug Profil und 1,8 g) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte**



**Abb. 85: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Maxima der Kurve (=gesamte Radikalproduktion) bei verschiedenen Profilen (Stop (1 g) 60 UpM, 60 UpM – Stop (1 g), Parabelflug Profil und 1,8 g) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte**

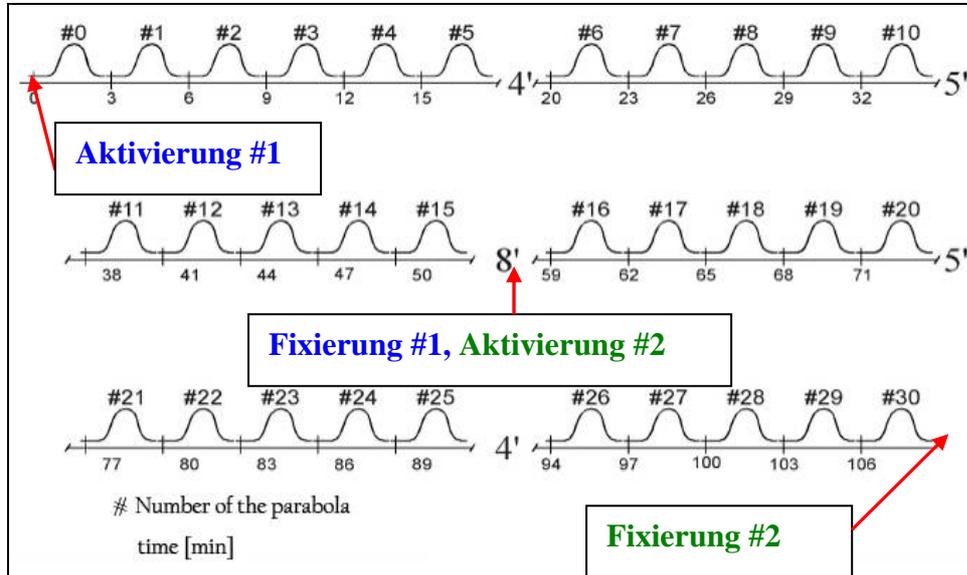
Im Vergleich der Zeit bis zum Erreichen der maximalen Radikalproduktion (Abb. 86), so ist erkennbar, dass das Maximum bei 1,8 g und bei 20 min Rotation von 60 UpM und anschließenden 1 g-Bedingungen signifikant später erreicht wird als bei normaler Erdschwerkraft.



**Abb. 86: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Zeit bis zum Erreichen des Maximums der Kurve (= gesamte Radikalproduktion) bei verschiedenen Profilen (Stop (1 g) 60 UpM, 60 UpM – Stop (1 g), Parabelflug Profil und 1,8 g) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte**

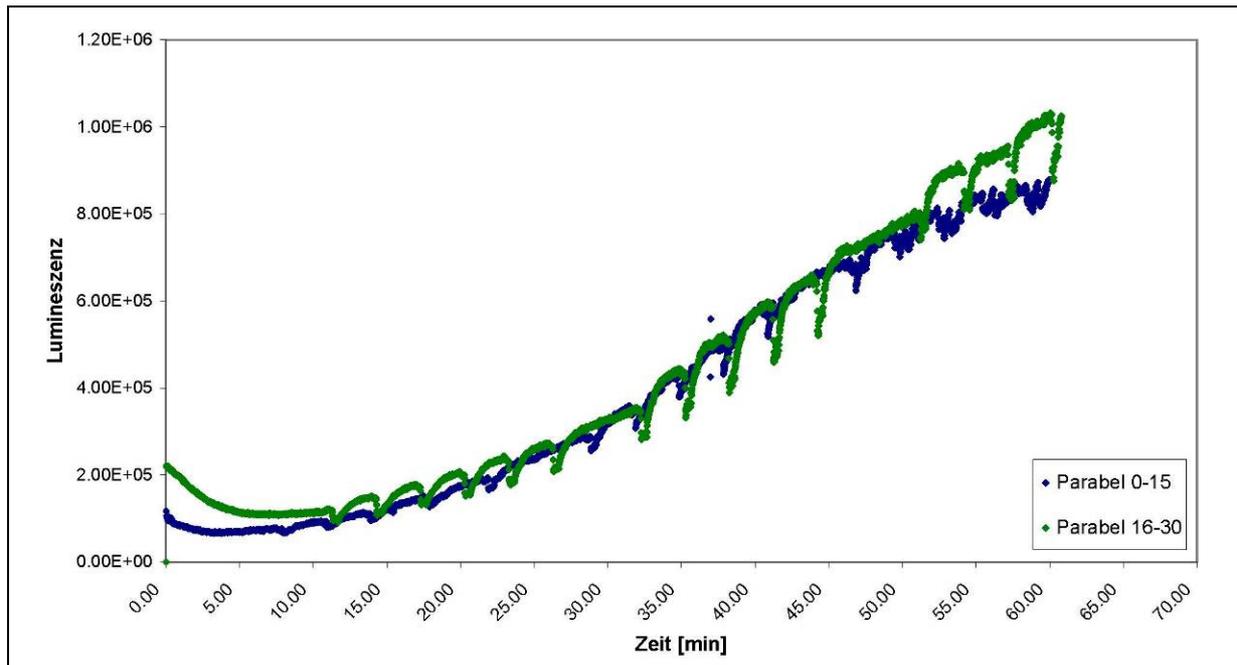
### 10.1.3.5. Parabelflug

#### Messung ohne Rotation (jeweils erster und zweiter Flugtag)

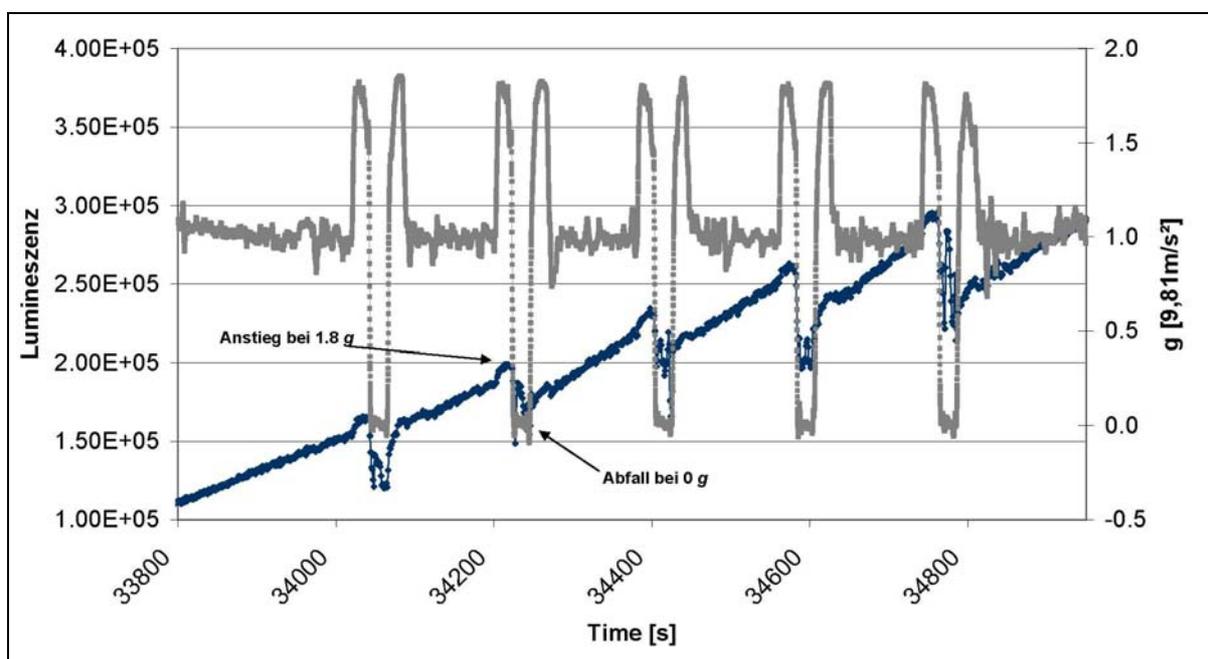


**Abb. 87: Schema des Versuchsablaufs. Bei den Parabelflügen.** Die erste Probe wurde vor Parabel 0 aktiviert, bis nach Parabel 15 gemessen und anschließend fixiert (blau); für die zweite Messung wurden die Zellen nach Parabel 15 aktiviert und bis einschließlich Parabel 30 gemessen (grün)

Abb. 88 zeigt exemplarisch zwei Messungen während eines Parabelflugtages. Bei der Ersten wurden die Zellen vor Parabel 0 aktiviert, bis nach Parabel 15 gemessen und anschließend fixiert (blaue Kurve); für die zweite Messung wurden die Zellen nach Parabel 15 aktiviert und die Radikalproduktion bis einschließlich Parabel 30 gemessen. Bei grober Betrachtung ergibt sich der normale parabelförmige Signalanstieg nach Aktivierung. Zusätzlich fallen in beiden Experimenten sich wiederholende Signalabfälle auf, die mit den Zeiten der geflogenen Parabel korrelieren (Vergleich Signalkurve mit dem  $g$ -Profil; Abb. 89). Bei Detailbetrachtung fällt zudem ein Signalanstieg auf, der mit den jeweiligen Hyper- $g$  Phasen der Parabeln korreliert (Abb. 89). Weiterhin startet das Signal nicht wie bei den Messungen am Boden bei nahezu 0. Die Zellen weisen schon vor, bzw. sofort nach der Aktivierung eine geringe Radikalproduktion auf. In den ersten 10 min der Messung fällt das Signal ab, und steigt dann nach ca. 10 min wieder an.



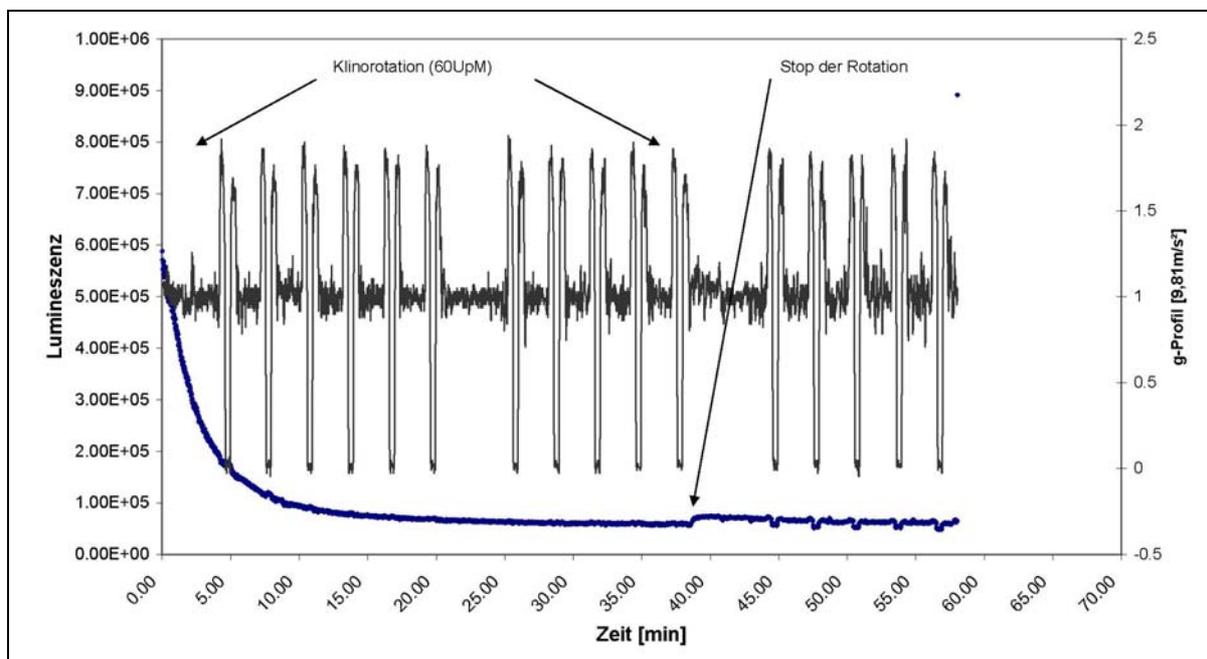
**Abb. 88: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 10.02.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16**



**Abb. 89: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 10.02.2009, aktiviert vor Parabel 0, Detail Parabel 6-10 mit g-Profil (grau)**

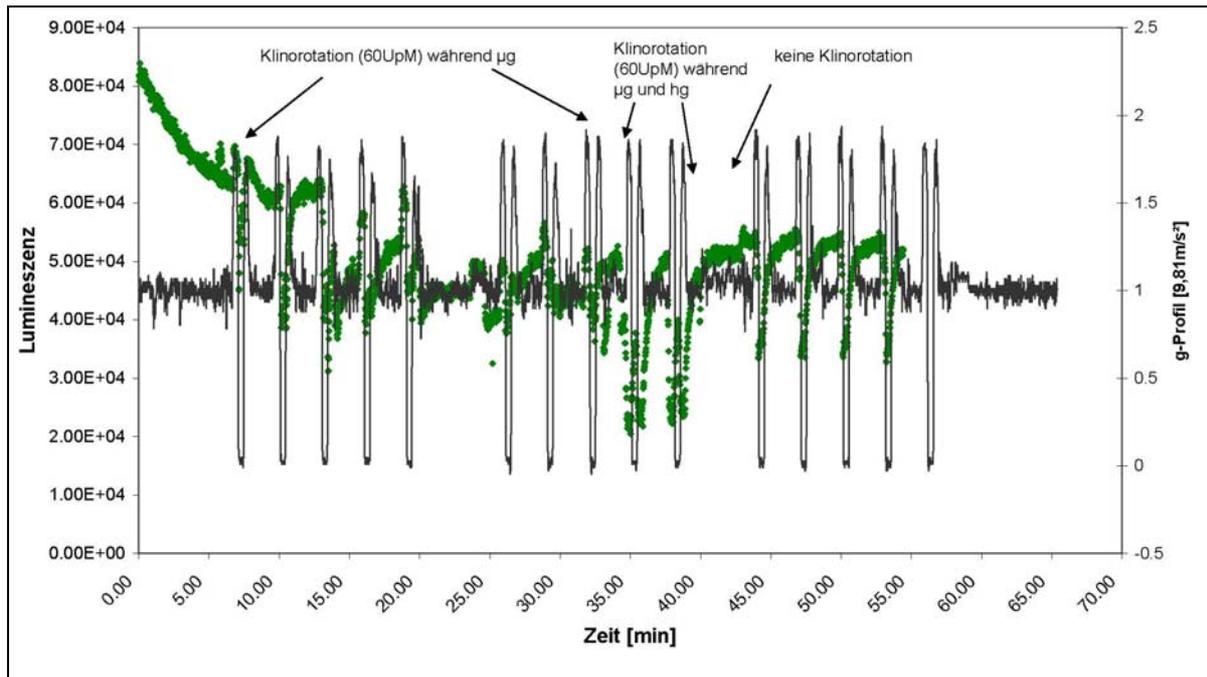
Rotation während des Fluges (dritter Flugtag)

Im ersten Durchlauf wurde während der ersten 11 Parabeln bei 60 UpM durchgehend klinorotiert, danach während der Parabeln 10 bis 15 mit nicht -rotierendem Klinostaten gemessen, so dass die Zellen in dieser Zeit dem normalen Parabelflugprofil ausgesetzt waren. Nach dem Starten der Klinorotation erfolgt eine sofortige Reduktion der Lumineszenz und es zeigt sich kein Effekt durch die gleichzeitig stattfindenden Parabeln. Allenfalls sind winzige Ausschläge zu erkennen. Die letzten 5 Parabeln nach Stoppen der Rotation zeigen wieder den gewohnten Verlauf, Abfall in Mikrogravitation ( $\mu g$ ) und Anstieg in Hypergravitation (hg). Der parabelförmige Verlauf, der unter 1 g-Bedingungen auftritt, ist hier nicht zu erkennen.



**Abb. 90: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem g-Profil (grau). FD3, 12.02.2009 Parabel 0-15. Klinorotiert mit 60 UpM**

Ab Parabel 16 bis 30 wurde anschließend eine neue Messung gestartet und in den ersten 8 Parabeln bei den  $\mu g$  Phasen mit 60 UpM klinorotiert (Abb. 91). Es ergibt sich ein Signalabfall während der Klinorotation und einen Signalanstieg in den hyper-g Phasen. Bei Parabel 9 und 10 wurde während der gesamten Parabel rotiert, dabei ist kein Signalanstieg mehr zu erkennen. Nach Abschalten der Rotation erfolgt ein kurzer Signalanstieg, die restlichen 5 Parabeln sind wieder klar zu identifizieren.

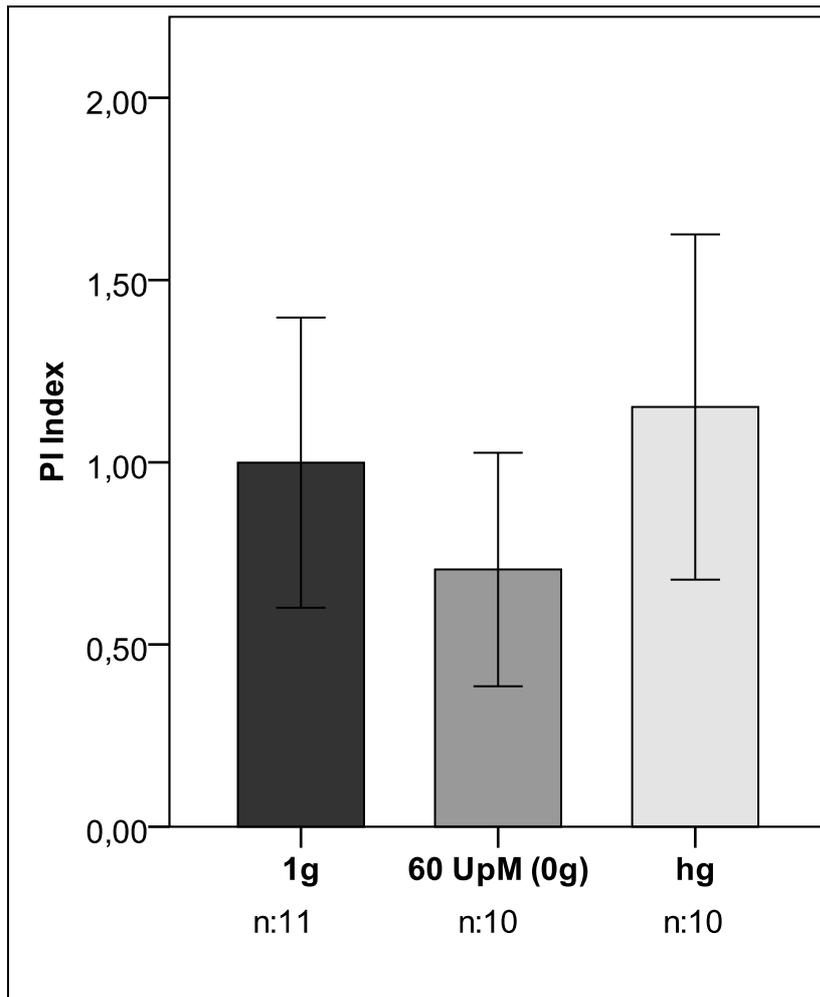


**Abb. 91: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol.** Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem g-Profil (grau). FD3, 12.02.2009. Parabel 16-30 - klinorotiert mit 60 UpM in den 0 g Phasen bis zur 8. Parabel; P 9-10 - klinorotiert in hg und µg Phasen; P 11-15 ohne Rotation

## 10.2. Messung der Phagozytose

Als Kontrollexperiment zu den Untersuchungen des oxidativen Bursts wurde der Einfluss wechselnder Schwerkraftbedingungen auf die Phagozytoseaktivität der Zelllinie NR8383 überprüft. Hierzu wurden die Zellen für 45 min bei wahlweise 1 g, 60 UpM im Klinostaten oder 1,8 g auf der Zentrifuge (MuSIC) inkubiert und die Phagozytose (anhand der aufgenommenen FITC-markierten Zymosanpartikeln) anschließend fluorimetrisch im Mikroplattenreader gemessen (Abb. 92).

Es traten starke Schwankungen innerhalb der Messungen auf, und es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Jedoch ist tendenziell eine niedrigere Phagozytoserate bei 60 UpM und eine höhere Phagozytoserate bei 1 g zu erkennen.



**Abb. 92 Einfluss von wechselnden Schwerkraftbedingungen auf die Phagozytoserate der Zelllinie NR8383 fluorimetrisch ermittelt im Mikrotiterplattenreader. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte**

### 10.3. Evaluierung der biologischen Verifizierung (Aufgabe E)

Aufgabe war es, die Funktionalität der konstruierten Hardware (PMT-Klinostat, Heizbox und Parabelflugrack) anhand biologischer Testreihen zu verifizieren (Aufgabe E). Dies konnte in den beschriebenen Experimentreihen unter Beweis gestellt werden.

Der Klinostat wurde im Labor mit verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten erfolgreich betrieben. Die gesamte Konstruktion wurde bei zwei Parabelflügen eingesetzt. Zusätzlich kam die Heizbox bei einem Versuch auf der *Short Arm Human Centrifuge* zum Einsatz.

Aufgabe E ist daher zufrieden stellend abgeschlossen worden.

## 11 Diskussion

### 11.1. Technische Voraussetzungen

Die Funktionalität der Hardware konnte durch die Kontrollversuche (Kapitel 7.2 und 10.1.1) nachgewiesen werden (siehe auch Evaluierung Kapitel 0). Es war sowohl möglich, das entstehende Signal mit der erforderlichen Genauigkeit im PMT Klinostaten zu messen (Abb. 37) als auch mit der gewünschten Geschwindigkeit zu rotieren und die Rotation zu jedem Zeitpunkt zu stoppen bzw. zu verändern. Die konstruierte Heizbox gewährleistete das Einhalten einer konstanten Temperatur, so dass Messungen außerhalb des Labors während eines Parabelfluges und auf der Zentrifuge möglich waren (Kapitel 10.1.3.4 und 10.1.3.5). Damit waren die technischen Voraussetzungen zur Durchführung der Experimente erfüllt (Aufgaben A bis D).

### 11.2. Wahrnehmung der Schwerkraft

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Radikalproduktion während des oxidativen Bursts der Makrophagenzelllinie NR8383 unter veränderten Schwerkraftbedingungen analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Variation des Schwerkrafteinflusses - mittels Klinostat, Parabelflug oder Zentrifugation - einen Effekt auf die Radikalproduktion der Makrophagen hat. Allerdings ist nicht bekannt, ob es sich dabei um einen *direkten* Effekt auf die Zellen handelt und damit der Nachweis eines physiologischen „Gravisensing“ Mechanismus erbracht wäre, oder ob der Effekt *indirekt* erfolgt. Nach dem „*extracellular-transport model*“ gehen viele der beobachteten Effekte in Zellkulturen auf die fehlende schwerkraftgetriebene Konvektion in Schwerelosigkeit zurück, wodurch die Objekte (Bakterien, evt. auch Zellen) nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden und sich an der Plasmamembran Ausscheidungsprodukte ansammeln, welche die Zellen negativ beeinflussen (Todd und Klaus 1996).

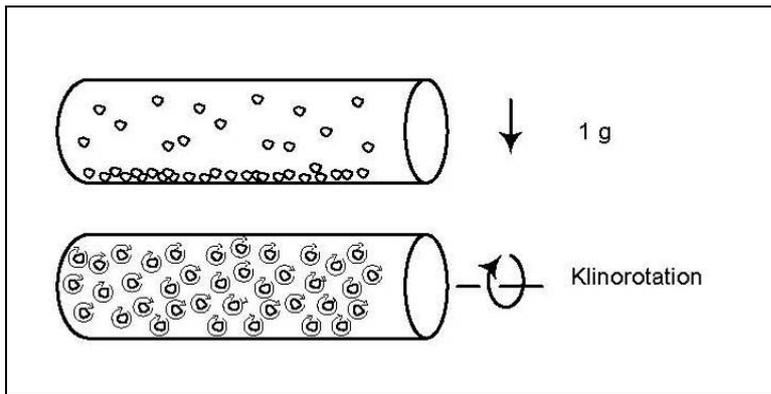
Dass spezialisierte Zellen Schwerkraft wahrnehmen und darauf reagieren können ist für einige Zelltypen bekannt (Lambert *et al.* 2007, Gridley *et al.* 2009 Häder *et al.* 2005). *Loxodes* (Einzeller) oder *Chara* (Armleuchteralge) besitzen für die

Wahrnehmung sogar spezialisierte Organelle (Hemmersbach *et al.* 1996, Braun 2002a). Andere Systeme, wie *Paramecium* (Einzeller), nutzen die Masse des Zytoplasmas und den Dichteunterschied zum umgebenden Medium (Hemmersbach *et al.* 2001, Hemmersbach-Krause *et al.* 1993) als Signal, welches eine nachfolgende Signaltransduktionskette induziert. Unter Inaktivierung der intrazellulären Rezeptoren wurde gezeigt, dass beide Mechanismen parallel vorkommen können und dass die Fähigkeit zur Schwerkraftwahrnehmung ohne spezifische Organelle, wie Statolithen, der ältere Mechanismus ist (Häder *et al.* 2005, Kiss *et al.* 1998). Dies könnte bedeuten, dass alle Zellen prinzipiell die Fähigkeit zur Graviperzeption haben, falls diese nicht im Laufe der Evolution verloren gegangen ist.

### 11.2.1. Kontrollversuche

Einflüsse seitens der Hardware als Ursache für die Signaländerung konnten durch die Kontrollversuche mit Eisenzitrat (Abb. 38 und Abb. 39) ausgeschlossen werden. Auf mechanischen Stress (Schüttelversuche, Abb. 66; Vibrationen Abb. 31) reagierten die Zellen allenfalls mit einer Signalerhöhung, nie mit einer Signalreduktion.

Quenching: Eine weitere theoretische Ursache für den Effekt der Signalreduktion besteht darin, dass auch bei unveränderter Radikalproduktion seitens der Zellen ein vermindertes Signal gemessen wird, da schwebende Zellen die Lumineszenz von dahinterliegenden Zellen absorbieren oder reflektieren (Quenching) und dadurch weniger Signal bei dem Sensor ankommt (Abb. 93). Da einerseits nicht bekannt ist, ob der Sensor hauptsächlich primäres Licht oder primäres und reflektiertes Licht misst und andererseits auch die physikalischen Prozesse innerhalb der Küvette nicht genau beschrieben werden können, musste die Möglichkeit des Quenchings experimentell ausgeschlossen werden (10.1.1.4).



**Abb. 93: Lage der Zellen in 1 g bzw. während Klinorotation**

Die in Kapitel 8.7.4 beschriebene Eisen-4 Zitrat Lösung konnte für die Kontrolle nicht verwendet werden, da sich die Zellen in der Chemikalienlösung bereits nach 15 min vollständig auflösten.

Stattdessen wurde eine Kontrollmessung mit lumineszenten Substanzen aus einem Knicklicht und toten Zellen durchgeführt (Abb. 67). Diese Reaktion liefert allerdings kein konstantes Signal, sondern das Signal fällt von Anfang an langsam stetig ab, ausgelöst durch den Verbrauch der Chemikalien.

Nach anfänglichem Signalanstieg verursacht durch das Starten der Rotation und die damit einhergehende Vermischung der Chemikalien, sinkt das Signal.

Der Signalabfall ist eine Folge der chemischen Reaktion und nicht der Rotation, andernfalls wäre ein abrupter Signalabfall zu erwarten. Auch steigt das Signal nach Stoppen der Rotation nicht wieder an. Der Einfluss der Signalstärke durch ein Quenching kann daher als vernachlässigbar angesehen werden.

Zusätzlich zu der genannten Kontrollmessung gibt es noch weitere Argumente, die gegen ein mögliches Quenching sprechen:

- Die Zellen sollten zumindest bei 30 UpM und 60 UpM innerhalb der Küvette kreisförmige Bahnen beschreiben und daher nicht sedimentieren, so dass es keinen Unterschied in der Signalthöhe gibt, falls die Signalreduktion ausschließlich durch Quenching zustande kommt. Die bei 30 UpM rotierten Zellen zeigen jedoch ein signifikant niedrigeres Signal als die bei 60 UpM rotierten.
- Weiterhin müsste sich das Signal in den Experimenten bei jedem Stoppen der Rotation um den gleichen Prozentsatz abschwächen und zwar in dem Maß, das der Reduktion zwischen 1 g und 60 UpM entspricht, also ca. 4/5 des Gesamtsignals. Bei kurzzeitiger Rotation ist der Abfall jedoch geringer und bei

Zellen, die erst nach 20 min rotiert wurden, läuft die Reaktion normal weiter, abgesehen von einem kurzzeitigen Einbruch (Abb. 81). Sollten die rotierenden

- (= schwebenden) Zellen tatsächlich einen Großteil des Signals absorbieren, so müssten sie während der Rotation deutlich mehr Radikale produzieren, um ein gleich hohes Signal zu erhalten. Dies würde allen anderen Versuchen widersprechen. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass der Signalabfall durch ein Quenching verursacht wird.
- Ein weiteres Argument ist, dass die Zellen im Science Model eine normale 1 *g*-Kinetik aufweisen (Abb. 45). Um ein Sedimentieren zu verhindern, wird während der Messung die Zelllösung gerührt. Dies müsste, im Falle des Quenchings, einen ähnlichen Effekt haben wie die Rotation im Klinostaten.

### Behinderung der Phagozytose

Weiterhin ist es möglich, dass die Klinorotation eine Aufnahme der Zymosanpartikel seitens der Zellen erschwert oder sogar unmöglich macht, da der Kontakt Partikel – Zelle gestört ist. Videoanalysen, die Messung der Phagozytose (Abb. 92) und die Daten von Huber (2005) zeigen, dass Makrophagen bei 60 UpM in der Lage sind zu phagozytieren, wenn auch weniger als bei 1 *g* Bedingungen.

Denkbar ist, dass die Zellen durch die Rotation einen erschwerten Zugang zu den Zymosanpartikeln haben und dadurch einfach erheblich langsamer phagozytieren als bei 1 *g*; andererseits könnte, durch die Rotation, auch eine bessere, omnilaterale Verfügbarkeit der Nahrungspartikel bei Klinorotation auftreten.

Die Langzeitexperimente über 120 min liefern wichtige Argumente. Unter 1 *g*-Bedingungen ist die maximale Phagozytoseaktivität nach 45 min erreicht (Huber 2005). Wäre die Rotation die Phagozytose nur erschwert bzw. verlangsamt, sollte die Gesamtradikalproduktion gleich bleiben, wenn die Zellen genügend Zeit haben. Dies war jedoch nicht der Fall. Auch nach 120 min waren die gesamte als auch die maximale Radikalproduktion signifikant niedriger als unter 1 *g* (Abb. 76). Folglich muss der oxidative Burst und damit die Immunreaktion erniedrigt und nicht nur verlangsamt sein, die Phagozytose aber prinzipiell ablaufen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Arbeiten von Rijken *et al.* (1993), nach denen die Bindung von EGF an die Zelle auch in Mikrogravitation normal erfolgt, d.h. der Kontakt Zelle-Partikel nicht gestört ist.

### 11.2.2. Modelle zur zellulären Schwerkraftwahrnehmung

Ingber beschrieb 1999 ein mögliches Modell zur zellulären Schwerkraftperzeption. Er ging davon aus, dass Zellen eine druckabhängige Architektur zur Organisation des Zytoskeletts nutzen (*Tensegrity model*). Danach nehmen Zellen mechanischen Stress, also auch den durch Schwerkraft induzierten, mittels Veränderungen des Kräftegleichgewichtes zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix wahr. Durch die mechanische Belastung wird die extrazelluläre Matrix bewegt. Diese ist durch transmembrane Rezeptoren, die Integrine, mit dem Zytoskelett verbunden, welches dann die Information weiterleiten kann (Ingber 1991). Es wird also kein direkter Rezeptor aktiviert, vielmehr wird die Schwerkraft als Ergebnis der stressbedingten Veränderungen in Zell-, Gewebs- oder Organstruktur wahrgenommen. Dies wiederum resultiert in Modifizierungen der extrazellulären Matrix, der Zellform und der Organisation des Zytoskeletts.

Nach dem *Bifurkations-Modell* ist der Symmetrieverlust des Zytoskeletts die entscheidende Information für die Zellen (Kondepudi 1989; Kondepudi 1991; Mesland 1992; Tabony und Job 1992).

Einige Modelle streiten auch einen direkten Einfluss von Mikrogravitation auf das Verhalten eines Organismus ab. Nach dem „*extracellular-transport model*“ gehen die meisten beobachteten Effekte auf die fehlende schwerkraftgetriebene Konvektion in Schwerelosigkeit zurück (Todd und Klaus 1996). Dadurch werden die Zellen nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt, zusätzlich sammeln sich an der Plasmamembran Ausscheidungsprodukte an, welche die Zellen negativ beeinflussen. Demnach müssten Zellen, die durch zu hohe Zelldichten ähnliche Bedingungen aufweisen, analoge Effekte zeigen wie in Schwerelosigkeit.

### 11.2.3. Die Rolle des Zytoskeletts

Einige der beschriebenen Modelle zur Schwerkraftwahrnehmung (Kapitel 11.2.2) gehen davon aus, dass das Zytoskelett eine entscheidende Rolle spielt.

Higashibata *et al.* beschrieb 2006 gravierende Veränderung des Zytoskeletts nach 72 Stunden Klinorotation. Sciola *et al.* (1999) zeigte das Auftreten von

Strukturveränderungen des Zytoskeletts bereits nach wenigen Sekunden in Schwerelosigkeit.

Schatten *et al.* (2001) berichteten vom vollständigen Zusammenbruch des Zytoskeletts, insbesondere des Mikrotubuli-Systems von T-Zellen bei einer Space Shuttle Mission. Auch bei thyroiden Karzinomazellen waren nach 30 min Inkubation auf einer Random Positioning Machine massive Veränderungen des Zytoskeletts festzustellen (Infanger *et al.* 2006).

Da das Zytoskelett einen essentiellen Anteil an vielen zellulären Prozessen, wie Zellmigration, Mitose und Signalweiterleitung hat (Janeway 2005), ist eine komplette Desorganisation eher unwahrscheinlich, da bisher keine gravierenden Funktionsverluste von Zellen in Schwerelosigkeit beschrieben wurden. Dagegen sind Druck-, Zug-, Strukturveränderungen am Zytoskelett mit Kopplung an eine Signalkaskade durchaus denkbar. Transmembrane Adhäsionskomplexe wie Integrin-Cluster (*focal adhesions*) oder Cadherine und Selektine dienen dabei als Mechanorezeptoren. Sie verbinden das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix und geben die Zugsignale ins Zellinnere weiter.

Wenn Zellen keinen spezialisierten intrazellulären Gravisensor besitzen, sondern die gesamte Masse des Zytoplasmas zur Wahrnehmung der Gravitation nutzen, so ist der Dichteunterschied zwischen Zelle und umgebendem Medium von entscheidender Bedeutung (Häder *et al.* 2005). So konnte bei gravitaktischen Einzellern, deren Dichte speziesabhängig etwa 2-5 % über der des Mediums liegt (Taneda *et al.* 1987, Lebert und Häder 1996) gezeigt werden, dass durch Manipulation dieses Dichteverhältnisses entweder durch Füttern schwerer Substanzen (Watzke *et al.* 1998) oder durch Verdickung des Mediums (Lebert und Häder 1996, Hemmersbach *et al.* 1998) eine Neutralisation oder Richtungsumkehr der Graviorientierung (Gravitaxis) erfolgte. Die Dichte einer Vertebraten-Immunzelle beträgt zwischen  $\rho \sim 1,06$  bis  $1,10$  g/ml (nach GE Healthcare technical information); das Medium hat ungefähr die Dichte von Wasser, also  $\sim 1$  g/ml. Demnach besteht ein Dichteunterschied von über 5 % im Vergleich zum umgebenden Medium, und eine Wahrnehmung über Rezeptoren in der Zellmembran oder dort inserierende Zytoskelettelemente ist prinzipiell möglich.

Sollten Makrophagen diesen Mechanismus zur Schwerkraftwahrnehmung besitzen, so müsste eine Verdickung des Mediums einen direkten Einfluss auf den oxidativen Burst bzw. das Phagozytoseverhalten haben. In 0,2 % methylzellulosehaltigem Medium, in dem die Zellen langsamer sedimentierten, wurde eine geringere Phagozytoserate bei 60 UpM Klinorotation im Vergleich zu 1 g-Bedingungen (Huber *et al.* 2005) festgestellt. Der Effekt war signifikant, jedoch nicht so ausgeprägt wie unter normalen Dichte-Bedingungen. Versuche mit Medien unterschiedlicher Dichte könnten in Zukunft Aufschluss über diese Frage bringen.

#### 11.2.4. Mögliche Rezeptoren: Ionenkanäle

In vielen Fällen der Graviperzeption spielen Ionenkanäle eine entscheidende Rolle. Bei gravitaktischen Einzellern wie *Euglena* oder *Paramecium* werden durch den oben genannten Dichteunterschied zwischen Zelle und Medium mechanosensitive Ionenkanäle in der Zellmembran stimuliert (Häder und Hemmersbach 1997; Hemmersbach *et al.* 1993). Bei *Arabidopsis* werden zugabhängige Ionenkanäle für die Schwerkraftwahrnehmung diskutiert (Perbal *et al.* 1997). Goldermann und Hanke (2001) zeigten eine direkte Aktivierung von Ionenkanälen in *E. coli*, ausgelöst durch Schwerkraftsänderungen.

Analog dazu ist auch eine Mitwirkung von Ionenkanälen bei der Verminderung der Phagozytose bzw. des oxidativen Bursts denkbar. Karen und Lu-li fanden einen Zusammenhang zwischen Oberflächenbeschaffenheit, der Dichte der angebotenen Partikel und der Phagozytosekapazität von Makrophagen (2001). Polyacrylamid-Kügelchen mit höherer Dichte wurden bevorzugt phagozytiert. Im Umkehrschluss könnte auch ein durch die Schwerelosigkeit reduzierter Reiz der Zymosanpartikel eine reduzierte Phagozytose und damit einen reduzierten oxidativen Burst verursachen.

Bisher sind bei Immunzellen allerdings noch keine Ionenkanäle identifiziert, die spezifisch für die Schwerkraftwahrnehmung verwendet werden.

### 11.3. Verwendete Assays

In der vorliegenden Arbeit wurde mit unterschiedlichen Assays gearbeitet. Hauptsächlich wurde die Kinetik des oxidativen Burst durch das Luminolassay im PMT Klinostaten untersucht (Kapitel 10.2). Zur Bestätigung der Ergebnisse und zum Vergleich mit den Daten von K. Huber wurde die intrazelluläre Radikalproduktion im NBT-Assay, sowie die tatsächliche Phagozytose mittels FITC-Zymosan (Kapitel 10.1.2.6 und 10.1.3.5) untersucht.

Der genaue Verlauf der Luminolreaktion und die daran beteiligten Radikale sind noch nicht vollständig verstanden. Nach Van Dyke *et al.* (2003) dient Luminol zum Nachweis von Peroxynitrit. Faulkner und Fridovich (1993) postulierten, dass Superoxid erst im zweiten Oxidationsschritt mit Luminol reagiert und dass daher Luminol wegen einer möglichen Autooxidation durch selbst generiertes Superoxid nicht zu dessen Nachweis geeignet ist.

Um eine Autooxidation auszuschließen und zur Kontrolle, ob die Zellen auch ohne Aktivierung stressbedingt Radikale produzieren, wurden zu jedem Test Kontrollen mit nicht-aktivierten Zellen (PBS statt Zymosan) durchgeführt. Alle Versuche wiesen jedoch nur ein sehr geringes Signal auf (Abb. 69, Abb. 71). Aus diesem Grund kann sowohl eine Autooxidation als auch eine Stressreaktion seitens der Zellen ausgeschlossen werden.

Die Luminolmessung erwies sich als sensibler und konstanter als die NBT-Messung (Abb. 79) bzw. die Messung der Phagozytose (Abb. 92), welche beide eine erhebliche Streuung der Daten aufwiesen. Effekte waren dadurch deutlicher zu erkennen. Die Tendenz, dass sich das Signal durch Rotation reduziert, war jedoch in allen Versuchen zu finden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Huber (2005), bei denen ebenfalls das Luminolassay sensibler reagierte und weniger Abweichungen aufwies.

Im Unterschied zu den Versuchen mit Luminol ergeben die Messungen mit NBT-Zymosan (Abb. 79), ebenfalls übereinstimmend mit Huber (2005), einen Anstieg der ROS-Produktion bei nicht aktivierten Zellen durch die Klinorotation. Dieser Effekt ist am stärksten nach 15 bzw. 13 min und kann als eine Stressreaktion der Zellen

gedeutet werden. Bei dem Luminolassay war dies in keinem der Versuche zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass durch NBT bzw. Luminol unterschiedliche Radikale detektiert werden.

## **11.4. Änderung des Schwerkräfteinflusses**

### **11.4.1. Klinorotation**

Das Prinzip Klinorotation beruht auf der Aufhebung von Sedimentation durch Rotation in einem Probengefäß mit sehr kleinem Radius von wenigen Millimetern (Kapitel 2.5.1). Dadurch können die rotierten Partikel nicht mehr sedimentieren und verhalten sich ähnlich zu frei schwebenden Partikeln in Schwerelosigkeit. In dieser Arbeit wurden Versuche mit unterschiedlicher Rotationsgeschwindigkeit und verschiedenen Rotationsprofilen durchgeführt.

#### **11.4.1.1. Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit**

Allgemein war bei allen Versuchen eine Signalreduktion durch die Rotation zu beobachten. Im Luminolassay im PMT Klinostaten war bei 60 UpM eine signifikante Reduktion des Signals um das 4- bis 5-fache zu beobachten (Abb. 71, Abb. 75, Abb. 76, Abb. 77, Abb. 78 RLU von  $\sim 5 \times 10^6$  auf  $1 \times 10^6$ ). Der oxidative Burst wird durch Klinorotation offensichtlich dramatisch gestört.

Die Versuche mit unterschiedlichen Umdrehungsgeschwindigkeiten des Klinostaten zeigten aber auch, dass die Geschwindigkeit einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktion ausübt. Während Zellen, die mit 60 UpM rotiert wurden, zwar ein erniedrigtes, aber trotz allem klar erkennbares Signal mit Anstieg, Maximum und Abfall aufwiesen, war bei den mit 30 UpM und 2 UpM rotierten Zellen kein solcher Verlauf mehr zu sehen. Zusätzlich war das verbleibende Signal signifikant niedriger als das bei 60 UpM und lag bei nur mehr ca. 5 % verglichen zu der Signalstärke bei 1 g (Abb. 72, Abb. 73, Abb. 74).

Bei 60 UpM dauert es 1 s, bis sich die Küvette einmal um die eigene Achse gedreht hat, bei 30 UpM 2 s und bei 2 UpM sogar 30 s (Abb. 6). Es ist möglich, dass die Zellen bei 30 bzw. 2 UpM die permanente Änderung des  $g$ -Vektors wahrnehmen und dadurch dauerhaft gestresst werden, so dass statt der erwarteten Immunreaktion

eine Stressreaktion abläuft. Möglicherweise sind die Kreisbahnen bei 30 bzw. 2 UpM aber auch so groß, dass die Zellen an den Rand der Küvette stoßen und dadurch zusätzlich gestresst werden.

Für zukünftige Versuche ist daher entscheidend, die Rotationsgeschwindigkeit für jeden Versuch kritisch zu wählen, abhängig von dem verwendeten Objekt und der zu untersuchenden Reaktion.

### **11.4.1.2. Profile**

#### 60 UpM-Stop

Die Zellen reagieren anfänglich wie bei konstanten 60 UpM. Nach Abschalten der Rotation erfolgt erst ein kurzer Signaleinbruch, wahrscheinlich ausgelöst durch die Bewegung im Medium und die dadurch hervorgerufene mechanische Reizung der Zellen (Abb. 80). Anschließend folgt eine Kurve, die optisch der normalen Reaktion bei 1 g entspricht, jedoch mit einem niedrigeren maximalen Wert. Die gesamte Radikalproduktion (Fläche unter der Kurve) ist signifikant niedriger als bei 1 g, aber signifikant höher als bei konstanten 60 UpM (Abb. 84, Abb. 85, Abb. 86).

#### Stop-60 UpM

Wenn die Zellen nach der Aktivierung erst für 20 min bei normal 1 g reagieren können und dann die Rotation startet, so läuft die Reaktion, nach einem kurzen Einbruch, normal weiter (Abb. 81). Der Einbruch beruht wahrscheinlich ebenfalls auf der mechanischen Reizung durch die plötzliche Bewegung in der Küvette. Sowohl die gesamte Radikalproduktion als auch die maximale Radikalproduktion zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den konstant bei 1 g inkubierten Zellen (Abb. 84, Abb. 85, Abb. 86). Möglicherweise hatten die Zellen in den ersten 20 min bereits ausreichend Zeit Zymosanpartikel aufzunehmen, die oxidative Burst-Reaktion zu starten und dann die normale Reaktion weiterzuführen. Mikroskopische Untersuchungen bestätigen, dass die Zellen bereits nach 20 min Zymosanpartikel phagozytiert haben.

### PF-Profil

Weiterhin wurde ein Parabelflugprofil untersucht, bei dem, entsprechend zu den  $\mu g$  Phasen während eines Fluges, der Klinostat jeweils für 22 s mit 60 UpM gedreht wurde (Abb. 82). Das Signal zeigt einen Signalabfall bei jeder Rotationsphase. Der Vergleich mit den Ergebnissen des Parabelfluges (Abb. 88) zeigt, dass der Verlauf exakt nachgestellt werden konnte, es fehlen lediglich die Hyper-g Phasen und das erhöhte Anfangssignal während des Parabelfluges.

Sowohl die gesamte Radikalproduktion, als auch die maximale Radikalproduktion zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den konstant bei 1 g inkubierten Zellen. Zusammen mit den Ergebnissen von Zellen, die 20 min bei 1 g inkubiert wurden, bevor die Klinorotation gestartet wurde (Stop60, Abb. 81) zeigt dies, dass eine permanente Rotation bzw. Schwerelosigkeit nötig ist, um die Radikalproduktion dauerhaft zu reduzieren. Werden die Zellen zu Beginn der Reaktion einige Zeit bei 1 g-Bedingungen gehalten, so sind sie in der Lage, die normale Radikalproduktion aufrechtzuerhalten. Auch nach 20 min Rotation (60Stop) zeigten die Zellen sofort eine, wenn auch erniedrigte, typische Reaktion (Abb. 80). Ob diese Rekonstitution auch nach längerer Mikrogravitationszeit, wie sie auf der ISS möglich ist, erfolgt, wird in dem TRIPLE LUX Weltraumexperiment untersucht werden.

#### **11.4.2. Parabelflug**

Der oxidative Burst wurde während zweier Parabelflugexperimente untersucht. Dabei wurde einerseits das Verhalten der Zellen während der Mikro- und Hypergravitationsphasen im PF beobachtet und andererseits die Wirkungsweise des Klinostaten während des Parabelfluges getestet.

Bei allen Versuchen ist zu beachten, dass wegen der fehlenden Möglichkeiten zum sterilen Arbeiten am Flughafen Bordeaux alle Experimente mit frisch aufgetauten Zellen durchgeführt wurden. Dies führt zum einen zu einer stärkeren Varianz zwischen den Messungen, deshalb konnte auch keine statistische Analyse durchgeführt werden. Zum anderen reagieren frisch aufgetaute Zellen sehr viel langsamer, d.h. der Anstieg zum Signalmaximum dauert länger als bei Zellen, die in Kultur waren. Durch die limitierte Messdauer von ca. 45 min konnte daher jeweils nur der Signalanstieg untersucht werden. Alle Messungen zeigen aber dieselben Tendenzen, wodurch die beobachtete Reaktion fundiert bekannt ist.

Das Lumineszenzverhalten der Zellen während des Fluges zeigt ein sehr auffälliges Muster. Der normale „parabelförmige“ Verlauf der Kurve ist noch gut zu erkennen, aber bei jeder Parabel gibt es einen Signalabfall in den Mikro-g Phasen und einen Anstieg in den Hyper-g Phasen (Abb. 88 und Abb. 89). Dieser Verlauf wiederholte sich bei jeder Parabel an jedem der getesteten Flugtage. Der Vergleich von Lumineszenzkurve mit dem g-Profil zeigt außerdem, dass der Effekt praktisch ohne Zeitverzögerung, eintritt.

Die erhöhte Signalstärke zu Anfang der Messung deutet auf einen Stressfaktor vor der Aktivierung hin, z. B. durch die Startphase und daraus resultierenden Vibrationen des Flugzeuges.

### 11.4.3. Zentrifuge

Da während des Parabelfluges in den Hyper-g Phasen eine Signalerhöhung beobachtet werden konnte, wurden Experimente bei konstanten 1.8 g auf der Humanzentrifuge (SAHC) des DLR Köln durchgeführt (Abb. 64).

Die Messung ergibt eine deutliche Signalerhöhung um annähernd 50 % (Abb. 83 RLU  $1.2 \times 10^7$  statt  $5 \times 10^6$  gemessene Lumineszenz). Auch bei der Messung der Phagozytose mit FITC-Zymosan war eine Tendenz zu einer erhöhten Phagozytoserate zu erkennen (Abb. 92).

Eine Erhöhung der ROS Produktion oder der Phagozytoserate (wird allgemein als Zeichen für Stress angesehen. (Huber *et al.* 2006, Finkel und Holbrook 2000, Apel und Hirt 2004, Huber *et al.* 2005).

Dass Zentrifugation eine Stressreaktion auslösen kann, ist bekannt. So verloren Ratten unter Zentrifugation signifikant an Körpergewicht (Pitts *et al.* 1972), obwohl die Muskelmasse unter erhöhtem Druck zunimmt (Ueno *et al.* 2004). Fukuda und Schmid-Schönbein fanden 2002 bei zentrifugierten Leukozyten eine Abschwächung des normalen Pseudopodienrückzugsverhaltens unter laminarer Schubspannung (shear stress). Sojabonen, die durch Zentrifugation unter erhöhter Schwerkraft gewachsen sind, zeigten ein reduziertes Wachstum einhergehend mit einer erhöhten Stärkekonzentration in den Koleoptilen (Brown und Piatuch 1973).

Im Gegensatz zu Gewebszellen sollten Makrophagen eigentlich durch den Transport im Blutstrom an erhöhte Beschleunigungen von bis zu 3-4 g gewöhnt sein. Ihr tatsächlicher Einsatzort ist jedoch nicht im Blutstrom sondern im entzündeten Gewebe, hinzukommt eine große Anzahl gewebsständiger Makrophagen (Janeway

2005). Dort sind wesentlich geringere Beschleunigungen zu erwarten, so dass eine Erhöhung der Schwerkraft möglicherweise ihr Verhalten beeinflusst.

Um dieses Phänomen näher zu erklären und eventuelle Schwellenwerte zu definieren, sind weitere Messungen mit unterschiedlichen Beschleunigungen und eventuell ähnlichen Profilen wie bei den Klinorotationsversuchen nötig. Weiterhin sollten Messungen mit nicht-aktivierten Zellen zur Untersuchung einer direkten Stressreaktion durchgeführt werden.

### **11.5. Klinorotation als Simulationsmethode**

Klinorotation ist als Simulation für Schwerelosigkeitseffekte immer noch umstritten und nicht für jeden Organismus und jede Messung geeignet. Bei langsam drehenden Klinostaten wurde eine Stressreaktion, ausgelöst durch die omnilaterale Reizung, nachgewiesen (Hensel und Sievers 1980, Hensel und Iversen 1980). Sehr viel schneller drehende Klinostaten (60-90 UpM) sollen dieses Problem umgehen, indem die Dauer einer Umdrehung unterhalb der Reaktionszeit des Organismus liegt (Müller 1959). Mit dieser Methode wurde die Verhaltensweise von kleinen Organismen in „simulierter Schwerelosigkeit“ untersucht (Briegleb 1988,1992, Klaus *et al.* 1997).

Auch wenn die Schwerkraft noch vorhanden ist, sollte der Organismus sie durch die ständige Reorientierung des Vektors nicht mehr wahrnehmen. Als Störfaktoren und mögliche Einflüsse auf die Proben werden Rotation, Scherkräfte im Medium, mechanische Störungen und das Erdmagnetfeld diskutiert (Nauman *et al.* 2007, Albrecht- Bühler 1991, Ayed *et al.* 1992).

Vergleiche der Reaktion von Organismen auf Klinostaten und auf reale Mikrogravitation demonstrieren in vielen Fällen dieselbe Tendenz (Klaus *et al.* 1998). Die vorliegenden Ergebnisse aus dem Parabelflug zusammen mit den Ergebnissen des durch Rotation simulierten PF-Profiles (Abb. 88, Abb. 82) zeigen, dass der Klinostat bei dem Luminolassay mit der Makrophagenzelllinie NR8383, zumindest der Umdrehungsgeschwindigkeit von 60 UpM, ähnliche Effekte hervorruft wie der Parabelflug und demzufolge für die gewählte Fragestellung eine geeignete Simulationsmethode darstellt.

## 11.6. Immunsystem in Schwerelosigkeit

Die vorliegende Arbeit bestätigt eine suppressive Wirkung der Schwerelosigkeit auf das Phagozytose- und das oxidative Burst Verhalten der Makrophagen.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Huber 2005 mit derselben Zelllinie.

Weitere Experimente deuten ebenfalls auf eine reduzierte Immunantwort in Schwerelosigkeit hin.

So fanden Kaur *et al.* eine signifikante Reduktion der Phagozytose bei Phagozyten und Monozyten im Blut von Astronauten (Kaur *et al.* 2005).

Cogoli *et al.* (1984) zeigten unter Mikrogravitationsbedingungen eine extreme Reduktion der Mitogen-Aktivierung von T-Lymphozyten. Die untersuchten Lymphozyten wiesen generell eine bedeutend höhere Schädigung auf als unter 1 g Bedingungen.

Limouse *et al.* (1991) und de Groot *et al.* (1990) fanden eine Hemmung der Signaltransduktion von Lymphozyten bei der Proteinkinase C, sowie bei der Expression von Onkogenen.

Zusammengenommen könnten all diese Faktoren in einer Reduktion der Immunabwehr des gesamten Organismus resultieren.

Dies bedeutet eine höhere Anfälligkeit der Astronauten für Infektionen und Autoimmunerkrankungen und daher ein höheres Risiko für die Crew. Auch in Anbetracht auf geplante Langzeitmissionen stellt eine reduzierte Immunantwort ein essentielles Problem dar. Weitere Studien, auch in Hinblick auf mögliche Gegenmaßnahmen, sind daher von enormer Bedeutung.

## 11.7. Fazit

Die vorliegende Arbeit liefert einen Nachweis für den Einfluss von veränderten Schwerkraftbedingungen auf den oxidativen Burst der verwendeten Makrophagen. Sie untermauert damit die Ergebnisse von Huber 2007. Dieser auf Zellebene nachgewiesene Effekt könnte einen Faktor für eine reduzierte Immunabwehr im Gesamtorganismus darstellen, wie zum Beispiel von Astronauten.

Ob die beobachtete Reaktion eine direkte oder eine indirekte Antwort der Makrophagen auf die veränderte Schwerkraftsituation darstellt, ist noch nicht eindeutig belegt.

Mechanische Ursachen für eine Reduktion des oxidativen Bursts konnten durch die Kontrollexperimente (Kapitel 10.1.1) ausgeschlossen werden.

Daneben bleibt noch die Möglichkeit eines rein physikalischen Effekts. Die Form der Makrophagen wird durch die Schwerelosigkeit beeinflusst und es herrschen andere Druck- und Spannungsverhältnisse. Weiterhin wird die Aufnahme der Partikel durch den Schwebezustand zumindest verändert, wenn nicht erschwert.

All diese Faktoren können durch sekundäre Effekte die Radikalproduktion hemmen, ohne dass die Zelle aktiv die Schwerkraft, bzw. deren Änderung, wahrnimmt.

Ferner könnte die Schwerelosigkeit einfach einen Stressfaktor unter vielen darstellen. Dieser wird von der Zelle wahrgenommen und sie beginnt mit ihrer normalen Stressantwort. Dagegen spricht allerdings, dass in allen Schwerelosigkeitssimulationen, und auch während des Parabelfluges, eine Reduktion des Signales zu beobachten war. Die meisten Stressfaktoren verursachen aber eine Erhöhung der ROS-Produktion (Huber *et al.* 2006, Finkel und Holbrook 2000, Apel und Hirt 2004, Huber *et al.* 2005). Eine Erniedrigung der Radikalproduktion ist eher ungewöhnlich und deutet auf eine spezifische Reaktion auf den Faktor Schwerkraft hin.

Wenn man nun davon ausgeht, dass die Zelle Schwerelosigkeit von anderen Stressfaktoren differenziert, schließt sich direkt die Frage nach der Perzeption dieses Reizes an. Makrophagen müssten demnach eine Möglichkeit besitzen die Veränderung der Schwerkraft zu detektieren. Offensichtliche Organellen zur Perzeption, wie zum Beispiel Statholithen bei Pflanzen, kann man ausschliessen. Ein spezifischer Rezeptor für die Detektion von Schwerkraft wurde bisher nicht gefunden.

Falls dieser nicht rudimentär in allen Zellen vorhanden ist, erscheint es sehr aufwendig einen derartigen Rezeptor auszubilden, da dieser kaum einen natürlichen Selektionsdruck unterliegt. Eine natürliche permanente Veränderung der Schwerkraft tritt kaum auf. Kurzzeitige Variation wie zum Beispiel im Blutstrom oder bei Bewegung des gesamten Organismus können zwar erfolgen, sind jedoch vom Zustand des Organismus (bakterielle/viruelle Infektion, Krebszellen etc.) weitgehend unabhängig und sollten daher keinerlei Einfluss auf den oxidativen Burst der Makrophagen haben.

Sehr viel naheliegender erscheint es, dass die Kraftveränderung auf den gesamten Zellkörper wahrgenommen wird, wie von Ingber (1999) und Vogel und Sheetz (2006) beschrieben. Die durch Schwerelosigkeit veränderten Zug-, Spannungs- und Druckkräfte auf das Zytoskelett werden perzipiert und in das Zellinnere weitergegeben. Die Kraft wird dann in biochemische Signale umgewandelt und weitergeleitet.

Vogel und Sheetz beschreiben 2006 anschaulich wie Zellen auf sie wirkende Kräfte, umgebende Geometrie und Oberflächenstruktur wahrnehmen und darauf reagieren können (*Mechanosensing/geometric sensing*). Diese Reaktion geht von einfachen Strukturveränderung aus bis hin zu Modifikationen in Zellwachstum, Zellform und Differenzierung.

Ein guter Kandidat für die Umsetzung dieser im Zytoskelett wahrgenommenen Kräfte in biochemische Signale ist die NADPH-Oxidase.

Sie sitzt direkt in der Zellmembran, um schnell einsatzfähig zu sein (s. Kapitel 2.4). Strukturveränderungen im Zytoskelett könnten daher einen direkten Einfluss auf die Aktivierung der NADPH-Oxidase haben. Ein kurzer Weg zwischen Signalperzeption und Signalantwort ist gewährleistet. Eine Möglichkeit ist, dass Zug- und Spannkkräfte die Rekrutierung der NADPH-Oxidase Untereinheiten beeinflussen.

Eine gestörte Rekrutierung der Untereinheiten könnte zu einer Reduktion der ROS-Synthese und damit zu einem verminderten oxidativen Burst führen.

Diese Theorie des Mechanosensings, kombiniert mit Veränderungen an der NADPH-Oxidase, liefert eine Erklärung für die bei Klinorotation und Parabellflug gefundenen Ergebnisse. Sie erklärt ebenfalls die sehr schnelle Antwort der Zellen auf die Gravitationsänderung, sowie die Reversibilität der Reaktion.

## 12 Literaturverzeichnis

- Adams, J.D. Jr. and Odunze, I.N.** (1991) Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 10(2): 161-9
- Albrecht-Bühler G.** (1991) Possible mechanisms of indirect gravisensing by cells. *ASGSB Bulletin* 4: 25-34
- Allen, R. C.** (1986). Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* 133: 449-493
- Apel K. und H. Hirt** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Review of Plant Biology.* 55: 373-399
- Ayed M., O. Pironneau, H. Planel, G. Gasset und G. Richoilley** (1992) Theoretical and experimental investigations on the fast rotating clinostat. *Microgravity Sci. Technol.* 5(2): 98-102
- Babbs, C.F.** (1990) Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 8(2): 191-200
- Babior B. M.** (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93(5): 1464-76
- Babior B. M.** (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109(1): 33-44
- Björkman T. und R.E. Cleland** (1991) The role of extracellular free-calcium gradients in gravitropic signalling in maize roots. *Planta* 185: 379-384
- Björkmann, T.** (1992) Perception of gravity by plants. *Adv. Space Res.* 12: 195 - 201
- Blomqvist C.G., J.V. Nixon, R.L. Jr Johnson und J.H. Mitchell** (1980) Early cardiovascular adaptation to zero gravity simulated by headdown tilt. *Acta Astronautica* 7: 543-553
- Borst A. G., J.W. A. van Loon** (2009) Technology and Developments for the Random Positioning Machine, RPM. *Microgravity Sci. Technol* 21: 287–292
- Braun M.** (2002a) Gravity perception requires statoliths settled on specific plasma membrane areas in characean rhizoids and protonemata. *Protoplasma* 219 (3-4): 150-159
- Braun M.** (2002b) Actomyosin-mediated statolith positioning in gravisensing plant cells studies in microgravity. *J. Plant Growth Regulation* 21: 137-145
- Briegleb W.** (1988) Ground borne methods and results in gravitational cell biology. *The Physiologist* 31: 44-47
- Briegleb W.** (1992) Some qualitative and quantitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. *ASGSB Bulletin* 5(2): 23-30

- Brinckmann E.** (2003) New facilities and instruments for developmental biology research in space. *Adv. Space Biol. Med.* 9: 253-80
- Brinckmann, E.** (2004). BIOLAB, EPU and EMCS for cell culture experiments on the ISS. *J. Gravit. Physiol.* 11(1): 67-74
- Brinckmann, E.** und **P. Schiller** (2002) Experiments with small animals in BIOLAB and EMCS on the International Space Station. *Adv. Space Res.* 30(4): 809-14
- Brown C. S.** und **W.C. Piastuch** (1973) Starch metabolism in germinating soybean cotyledons is sensitive to clinorotation and centrifugation. *Plant Cell and Environment.* 17 (3): 341-344
- Ceglia E.** (2005) European user guide to low gravity platforms. ESA. Ref. UIC-ESA-UM-0001, Issue 2, Revision 0
- Cogoli A.** (1993) The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. *J. Leukoc. Biol.* 54(3): 259-68
- Cogoli A.** (1997). Signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *Gravit. Space Biol. Bull.* 10(2): 5-16
- Cogoli A.** und **M. Cogoli-Greuter** (1997) Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv. Space Biol. Med.* 6: 33-79
- Cogoli, A., A. Tschopp** und **P. Fuchs-Bislin** (1984) Cell sensitivity to gravity. *Science* 225(4658): 228-30
- Criswell-Hudak B.S.** (1991) Immune response during space flight. *Experimental Gerontology* 26(2-3): 289-296
- Cubano, L. A.** und **M. L. Lewis** (2000) Fas/APO-1 protein is increased in spaceflown lymphocytes (Jurkat). *Exp. Gerontol.* 35(3): 389-400
- Dranoff G.** (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 4: 11-22
- Darwin C. R.** (1881) Das Bewegungsvermögen der Pflanzen. Übersetzt von J. Victor Carus. E. Schweizerbart'sche Verlagshandlung und Druckerei (E. Koch), Stuttgart
- Davenport, C. B.** (1908) Experimental Morphology. 3. Auflage. New York, Macmillan Publishing Co.
- de Groot, R. P., P. J. Rijken, J. den Hertog, J. Boonstra, A. J. Verkleij, S. W. de Laat** und **W. Kruijer** (1990) Microgravity decreases c-fos induction and serum response element activity. *J. Cell Sci.* 97 (1): 33-38
- Decoursey T. E.,** und **E. Ligeti** (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol. Life Sci.* 62(19-20): 2173-93
- Dusting G.F, S. Selemidis** und **F. Jiang** (2005). Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100 (1): 97-103

- Elstner, E. F.** (1990) Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. Mannheim-Wien-Zürich, BI Verlagsgesellschaft
- Faulkner, K. und I. Fridovich** (1993) Luminol and lucigenin as detectors for O<sup>2</sup>?. *Free Radic. Biol. Med.* 15(4): 447-451
- Finkel T. und N. J. Holbrook** (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247
- Fitts R. H. , D. R. Riley und J. J. Widrick** (2001). Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *J. Exp. Biol.* 204: 3201-3208
- Fleming, S. D., L. S. Edelman und S. K. Chapes** (1991) Effects of corticosterone and microgravity on inflammatory cell production of superoxide. *J. Leukoc. Biol.* 50(1): 69-76
- Fraser, I. P., H. Koziel und R. A. Ezekowitz** (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 10(5): 363-72
- Fridovich I.** (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112
- Fukuda S. und G. W. Schmid-Schönbein** (2002) Centrifugation attenuates the fluid shear response of circulating leukocytes. *J. Leuco. Biol.* 72: 133-139
- Gerzer, R., R. Hemmersbach und G. Horneck** (2006) Life Sciences. In: Utilization of Space. Today and Tomorrow. B. Feuerbacher und H. Stoewer (Eds). Berlin Heidelberg New York, Springer: 341- 373
- GE Healthcare technical information:**  
[http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/cellpreparation\\_home~products\\_cell~density\\_gradient\\_media~percoll?OpenDocument&moduleid=167165](http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/cellpreparation_home~products_cell~density_gradient_media~percoll?OpenDocument&moduleid=167165)
- Goldermann M. und Hanke W.** (2001) Ion Channels are sensitive to gravity changes. *Micrograv. Science and Technol.* 13(1): 35-38
- Good, P.F. Werner, P. Hsu, A. Olanow, C.W. und Perl, D.P.** (1996) Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 149(1): 21-8
- Gridley D. S., Slater J. M., Luo-Owen X., Rizvi A., Chapes S. K., Stodieck L. S., Ferguson V. L. und Pecaut M. J.** (2009) Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J. Appl. Physiol.* 106(1): 194 – 202
- Haberland, G.** (1900) Über die Perzeption des geotropischen Reizes. *Ber. Dtsch Bot. Ges.* 18: 261-272
- Häder D. P., R. Hemmersbach und M. Lebert** (2005) Gravity and the Behaviour of Unicellular Organisms. *Cambridge University Press* , Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paul
- Häder, D.- P. und R. Hemmersbach** (1997) Graviperception and graviorientation in flagellates. *Planta* 203: 7 - 10

- Halliwell B.** und **Gutteridge J. M. C.** (1999) Free radicals in biology and medicine. 3. Auflage. Oxford, Oxford University Press
- Hamamatsu**, Metal package PMT, photon counting head H7155 Series, Technical information, Japan
- Hamamatsu Photonic K. K.**, Photocounting using photomultiplier tubes, (2001), Technical information, Japan
- Hamamatsu Photonics K. K.**, Photomultiplier tubes, basics and applications, (2006), Katalog
- Hamamatsu**, Metal package photomultiplier tubes R7400U series and subminiature photosensor modules, (1998), Technical information, Japan
- Hampton M. B., Kettle A. J.** und **C. C. Winterbourn** (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92(9): 3007-17
- Hemmersbach, R., Bromeis, B., Block, I., Bräucker, R., Krause, M., Freiburger, N., Stieber, C.** und **M. Wilczek** (2001) *Paramecium* – a model system for studying cellular graviperception. *Adv. Space Res.* 27, 31-34
- Hemmersbach, R., R. Voormanns, B. Bromeis, N. Schmidt, H. Rabien** und **K. Ivanova** (1998) Comparative studies of the graviresponses of *Paramecium* and *Loxodes*. *Adv. Space Res.* 21 (8/9): 1285-1289
- Hemmersbach, R., R. Voormanns, W. Briegleb, N. Rieder** und **D.-P. Häder** (1996) Influence of accelerations on the spatial orientation of *Loxodes* and *Paramecium*. *J. Biotech.* 47: 271-278
- Hemmersbach-Krause, R., W. Briegleb, D.-P. Häder, K. Vogel, D. Grothe** und **I. Meyer** (1993) Orientation of *Paramecium* under the conditions of weightlessness. *J. Euk. Microbiol.* 40 (4): 439-446
- Hensel W.** (1982) Der klassische Klinostat in der modernen Gravitropismus-Forschung. *Biologie in unserer Zeit* 6: 173-178
- Hensel W.** und **A. Iversen** (1980) Effect of prolonged omnilateral gravistimulation on the ultrastructure of statocytes and the graviresponse of roots. *Planta* 150: 338-346
- Hensel W.** und **A. Sievers** (1980) Ethylen production during clinostat rotation and effect on root geotropism. *Z. Pflanzenphys.* 97: 343-352
- Higashibata, A., Imamizo-Sato, M., Seki, M., Yamazaki T.** und **Ishioka N.** (2006) Influence of simulated microgravity on the activation of the small GTPase Rho involved in cytoskeletal formation – molecular cloning and sequencing of bovine leukemia-associated guanine nucleotide exchange factor. *BMC Biochemistry* 7: 19-28
- Husemann, J., J. D. Loike, R. Anankov, M. Febbraio** und **S. C. Silverstein** (2002). Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40(2): 195-205

- Hock, B.** und **D. P. Häder** (2006). Graviresponses in fungi and slime molds. *Signal Transduction* 6: 443 - 448
- Horn A.** (2009a). Konstruktion PMT Klinostat- Dokumentation. *Firmeninterne Daten, DLR, Köln*
- Horn A.** (2009b). Konstruktion Parabelflugrack- Dokumentation. *Firmeninterne Daten, DLR, Köln*
- Horn A.** (2009c). Kalibrierung PMTs Science Model, Arbeitsunterlagen. *Firmeninterne Daten, EADS Astrium, Friedrichshafen*
- Huber, K.** (2005) Phagozytose und oxidativer Burst als Biomarker für Immunotoxizität. Technische Universität München. Dissertation
- Huber, K., Krotz-Fahning, M.** und **B. Hock** (2006) Respiratory burst as a biomarker for stress responses. *Protoplasma* 229(2-4): 221-224
- Huber, K., M. Krötz-Fahning** und **B. Hock** (2005) Phagocytosis as a biomarker for stress responses. *J. Gravit. Physiol.* 12(1): 265-266
- Hughes-Fulford M** und **M. L. Lewis M. L** (1996) Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp Cell Res.:* 224(1): 103-9
- Infanger, M., P. Kossmehl, M. Shakibaei, J. Bauer, S. Kossmehl-Zorn, A. Cogoli, F. Curcio, A. Oksche, M. Wehland, R. Kreutz, M. Paul** und **D. Grimm** (2006) Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res.* 324(2): 267-277
- Ingber D. E.** (1991) Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:841-848
- Ingber, D.** (1999) How cells (might) sense microgravity. *Faseb J.* 13: 3-15
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport,** und **S. M. Shlomchik** (2005) Immunologie. 6th Edition, *Garland Science Publishing, New York, London*
- Karen, A. B.** und **Yu-li, W.** (2002) FC-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J. Cell Science* 115, 849 - 856
- Kaur, I., E. R. Simons, V. A. Castro, C. M. Ott** und **D. L. Pierson** (2005) Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain Behav. Immun.* 19(6): 547-554
- Kaur, I., E. R. Simons, V. A. Castro, C. Mark Ott** und **D. L. Pierson** (2004) Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain Behav. Immun.* 18(5): 443-450
- Kiss, J. Z., W. J. Katembe** und **R. E. Edelmann** (1998) Gravitropism and development of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis* during space flight. *Physiol. Plant* 102(4): 493-502
- Kiss, J. Z., R. Hertel** und **F. D. Sack** (1989) Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 177: 198-206

- Klaus, D. M., P. Todd** und **A. Schatz** (1998) Functional weightlessness during clinorotation of cell suspensions. *Adv. Space Res.* 21: 1315-131
- Klaus, D., J. Neubert, M. Höfer** und **P. Todd** (1997) Investigation of space flight effects on *Echerichia coli* growth kinetics: a definition of "functional weightlessness" and a comparison of of clinostat an space fligh tresults. *Naturwissenschaften* 143: 449 - 455
- Konstantinova I. V., M. P Rykova, A.T. Lesnyak** und **E. A. Antropova** (1993) Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* 54: 189-201
- Kondepudi, D. K.** (1989) State selection dynamics in symmetry-breaking transitions. In: Noise in Nonlinear Dynamical Systems. F. Moss und P. V. E. McClintock (Eds). *Cambridge University Press.* 2: 251 – 267
- Kondepudi, D. K.** (1991) Detection of gravity through nonequilibrium mechanisms. *ASGSB Bull* 4(2): 119-124
- Kubisch, H. M. Wang, J. Luche, R. Carlson, E. Bray, T. M. Epstein, C. J.** und **J. P. Phillips** (1994) Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(21): 9956-9
- Kumar, K.V.** und **U. N. Das** (1993) Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic. Res. Commun.* 19(1): 59-66
- Kuznetsov O. A.** und **K. H. Hasenstein** (1996) Magnetophoric induction of root curvature. *Planta* 198: 87-94
- Lambert, C. A., Lapiere C. M.** und **Nusgens B. V.** (2007) Biology of adherent cells in microgravity. *Biology in Space and Life on Earth.* Wiley-Vich, Weinheim, 193-221
- Latsche, H. A., H. P. Klein** und **U. Kazmaier** (2002) *Organische Chemie.* 5. Auflage Springer, Berlin
- Leach, Huntoon, C., N. Cintron** und **P. A. Whitson** (1994) Endocrine and biochemical functions. In: *Space Physiology and Medicine.* A. E. Nicogossian, C. E. Leach Huntoon und S. L.Pool (Eds). Philadelphia, Lea & Febiger - a Waverly Company: 334 - 350
- Lebert, M.** und **D.- P. Häder** (1996) How Euglene tells up from down. *Nature* 379: 590
- Lewis, M. L., Reynolds, J. L. Cubano, Hatton, L. A. J. P. Lawless, B. D.** und **E. H. Piepmeier** (1998) Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *Faseb J.* 12(11): 1007-1018
- Limouse, M., S. Manie, I. Konstantinova, B. Ferrua** und **L. Schaffar** (1991) Inhibition of phorbol ester-induced cell activation in microgravity. *Exp. Cell Res.* 197(1): 82-86
- Linnarsson D., Tedner B.** und **Lindborg B.** (1998) Lower leg fluid displacement during a simulated space shuttle launch. *Eur. J. Appl. Physiol.* 78: 65 - 68

- Marletta M. A.** (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78: 927–930
- Meschede D.** (2004) Gerthsen Physik, 22. Auflage, Springer Berlin Heidelberg New York; S. 449
- Mesland, D. A.** (1992) Mechanisms of gravity effects on cells: are there gravity-sensitive windows? *Adv. Space Biol. Med.* 2: 211-228
- Mills, P. J., J. V. Meck, W. W. Waters, D. D'Aunno und M. G. Ziegler** (2001) Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration. *Psychosom. Med.* 63(6): 886-890
- Müller H. J.** (1959) Approximation to a gravity-free situation for the human organism achievable at moderate expense. *Science* 128: 772
- Nauman E. A., C. M. Mark Ott, E. Sander, D. L. Tucker, D. Pierson, J. W. Wilson und C. A. Nickerson** (2007) Novel quantitative biosystem for modeling physiological fluid shear stress on cells. *Applied and Environm. Microbiol.* 73 (3): 699-705
- Nemec, B.** (1900) Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. *Ber Dtsch Bot Ges* 18: 241-245
- Ottenschläger I., P. Wolff, C. Wolverson, R.P. Bhalerao, G. Sandberg, H. Ishikawa, M. Evans und K. Palme** (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *PNAS* 100: 2987–2991
- Pahl, G. , W. Beitz, J. Feldhusen, K.-H Grote** (2005) Konstruktionslehre: Grundlagen erfolgreicher Produktentwicklung; Methoden und Anwendung. 6. Aufl. Berlin: Springer-Verlag
- Paul A. und Mosca, G.** (2007) Physik. Für Wissenschaftler und Ingenieure. *Tipler*, 2. Auflage, Spektrum Verlag München, 992 ff.
- Perbal G., Driss-Ecole D., Tewinkel M. und Volkmann D.** (1997) Statocyte polarity and gravisensitivity in seedling roots grown in microgravity. *Planta.* 203: 57-62
- Pfeffer, W.** (1897) Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 15: 524 - 533
- Pitts G. C., L. S. Bull und J. Oyma** (1972) Effect of chronic centrifugation on body composition in the rat. *Am. J. Physiol.* 223(5): 1044-1048
- Pryor, W. A. und G. L. Squadrito** (1995) The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268 (1): 699-722
- Rabbow, E., N. Stojicic, D. Walrafen, C. Baumstark-Khan, P. Rettberg, D. Schulze-Varnholt, M. Franz und G. Reitz** (2006) The SOS-LUX-Toxicity-test on the International Space Station. *Res. Microbiol.* 157(1): 30-36
- Rabbow, E., P. Rettberg, C. Baumstark-Khan und G. Horneck** (2003) The SOS-LUX-LACFLUORO-Toxicity-test on the International Space Station (ISS). *Adv. Space Res.* 31(6): 1513-1524

- Reitz, G., Bücker, H., Lindberg, C., Hiendl, O. C., Rüter, W., Graul, E. H., Beaujean, R., Alpatov, A. M., Ushakov, I. A. und Y. H. Zachvatkin, Y. H.** (1992) Radiation and microgravity effects observed in the insect system *Carausius morosus*. *Nucl. Tracks Radiat. Meas.* 1: 233-239.
- Rijken P.J., R.P. de Groot, N. van Belzen, S.W. de Laat, J. Boonstra und A.J. Verkleij** (1993) Inhibition of EGF-induced signal transduction by microgravity is independent of EGF receptor redistribution in the plasma membrane of human A431 cells. *Exp Cell Res.* 204(2): 373-7
- Ross, G. D., J. A. Cain und P. J. Lachmann** (1985) Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J. Immunol.* 134(5): 3307-15
- Sachs, L** (2004) *Angewandte Statistik*. 11. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag
- Schatten, H., M. L. Lewis und A. Chakrabarti** (2001) Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells. *Acta Astronautica* 49(3-10): 399-418
- Schneider V., V. Oganov, A. LeBlanc, A. Rakmonov, L. Taggart, A. Bakulin, C. Huntoon, A. Grigoriev und L. Varonin** (1995) Bone and body mass changes during space flight. *Acta Astronautica* 36 (8-12): 463-466
- Sciola, L., M. Cogoli-Greuter, A. Cogoli, A. Spano und P. Pippia** (1999) Influence of microgravity on mitogen binding and cytoskeleton in Jurkat cells. *Adv Space Res.* 24(6): 801-805
- Sierra, C., R. Lascurain, A. Pereyra, J. Guevara, G. Martinez, C. Agundis, E. Zenteno und L. Vazquez** (2005) Participation of serum and membrane lectins on the oxidative burst regulation in *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 29(2): 113-121
- Sinclair W. und A. J. Trewavas** (1997) Calcium in gravitropism. A re-examination. *Planta* 203: 85 - 90
- Smith, M. A., G. Perry, P. L. Richey, L. M. Sayre, V. E. Anderson, M. F. Beal, und N. Kowall**, (1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382(6587): 120-121
- Stadtman, E. R. und B.S. Berlett**, (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res Toxicol.* 10(5): 485-494
- Steinbeck, M. J., A. U. Khan und M. J. Karnovsky** (1992) Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* 267(19): 13425-33
- Steinbrecher, U. P. Zhang, H. F. und Lougheed, M.** (1990) Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 9(2): 155-168
- Sze S. M.** (1981) *Physics of Semiconductor Devices*. 2. Auflage. John Wiley and Sons, Inc, New York

- Tabony, J. und D. Job** (1992) Gravitational symmetry breaking in microtubular dissipative structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(15): 6948-52
- Talas, M., L. Batkai, I. Stöger, K. Nagy, L. Hiros, I. Konstantinova, M. Rykova, J. Mozogovava, O. Guseva und V. Kozharinov** (1983) Results of the space experiment program "Interferon". *Acta Astronautica* 11: 379–386.
- Taneda K., S. Miyata und A. Shiota** (1987) Geotactic behavior in *Paramecium caudatum*. II Geotaxis assay in a population of the specimens. *Zool. Sci.* 4.:789 - 795
- Todd, P. und D. M. Klaus** (1996) Theories and models on the biology of cells in space. *Adv. Space Res.* 17(6-7): 3-10
- Trappe S, D. Costill, P. M. Gallagher, A. Creer, J. R. Peters, H. Evans, D. A. Riley und R. H. Fitts** (2009) Exercise in: Space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J. Appl. Physiol.* 106(4): 1159-68
- Ueno S., K. Yokoyama, M. Okuno, R.-S Wang., Y. Fujioka und Y. Kobayashi** (2004) Effects of static load on the weight and protein content in the leg muscles of the mouse: a simulation of prolonged standing in the workplace. *Ind. Health.* 42 (4): 401 - 407
- Van Dyke, K., S. Patel und V. Vallyathan** (2003) Lucigenin chemiluminescence assay as an adjunctive tool for assessment of various stages of inflammation: a study of quiescent inflammatory cells. *J. Biosci.* 28(1): 115-119
- van Loon J.** (2007) Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Adv. Space Res.* 39 (7): 1161-1165
- VDI-Richtlinie2221** (1993) Methodik zum Entwickeln und Konstruieren technischer Systeme und Produkte. VDI-Verlag, Düsseldorf
- VDI-Richtlinie2222** (1997) Methodisches Entwickeln von Lösungsprinzipien. VDI-Verlag, Düsseldorf
- VDI-Richtlinie2225** (1969) Technisch Wissenschaftliches konstruieren. VDI-Verlag, Düsseldorf
- Vogel V., M. Sheetz** (2006) Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews (Molecular cell biology)*. 7 265-274
- Watzke D., R. Bräucker und H. Machemer.** (1998) Graviresponses in iron fed *Paramecium* under hypergravity. *Europ. J. Protistol.* 34: 82-92
- White E.H., J. D. Miano, C. J. Watkins und E. J. Breaux** (2006) Chemisch erzeugte angeregte Zustände. *Angewandte Chemie* 86 (8): 292-307
- Wiseman, H. und B. Halliwell** (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313: 17 - 29
- Witztum, J. L. und D. Steinberg** (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88(6): 1785-1792

## 13 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gravitropismus an Maiskoleoptilen.....	14
Abb. 2: Zellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort.....	17
Abb. 3: Schema der Phagozytose. Eindringlinge werden an spezifischen Rezeptoren erkannt und aufgenommen. Anschließend wird der Partikel intrazellulär abgebaut (Janeway <i>et al.</i> 2005).....	18
Abb. 4: Schema der NADPH Oxidase (nach Dusting <i>et al.</i> 2005). Nach der durch die Aktivierung hervorgerufenen Phosphorylierung, wandern zytosolische Untereinheiten zur Membran und binden an zwei membrangebundene Untereinheiten, wodurch das Enzym zusammengesetzt wird.....	20
Abb. 5: Klinorotation, Model.....	24
Abb. 6: Restbeschleunigung und Signaländerung in Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit: grün Restbeschleunigung, blau Zeit, in der das Objekt die Änderung des g-Vektors wahrnehmen kann.....	25
Abb. 7: Vergleich zwischen Klinostaten mit einer Rotationsachse (links) und zwei Rotationsachsen (rechts).....	26
Abb. 8: Parabelflugzeug A 300 ( <a href="http://www.helmholtz-berlin.de/media/media/oea/web/pm/2007/a300_zerog_blau_jpg.jpg">http://www.helmholtz-berlin.de/media/media/oea/web/pm/2007/a300_zerog_blau_jpg.jpg</a> ).....	27
Abb. 9: Parabelprofil des A 300 Zero-G.....	28
Abb. 10: Parabelsequenz (Nach ESA European user guide to low gravity platforms, Ceglia 2005).....	29
Abb. 11: Die internationale Raumstation (ISS) mit dem Columbus Labor (Pfeil).....	30
Abb. 12: Das Biolab Modul. Die TRIPEL LUX Experimente werden in speziellen Containern durchgeführt, wo die Daten während Zentrifugation (Referenz) oder unter Schwerelosigkeit erhoben und an die Erde geschickt werden.	30
Abb. 13: Phasen einer Raumfahrtmission.....	35
Abb. 14: Hardwareentwicklung, erstellt anhand persönlicher Informationen, EADS Astrium.....	36
Abb. 15: Jablonski-Diagramm zur Erläuterung von Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Nach Anregung des Elektrons auf ein höheres Energieniveau (S2, S1), dargestellt durch die blauen Pfeile, springt das Elektron wieder zurück (rote Pfeile) und gibt dabei Energie (= $h\nu$ ) ab. Bei der Phosphoreszenz kommt es zusätzlich zu einer Spinänderung (schwarze Pfeile, Kasten links/rechts); daher ist der angeregte Zustand stabiler und die Energieabgabe länger.....	40
Abb. 16: Schema der Chemilumineszenz der Luminolreaktion.....	41
Abb. 17: Beispiele von Biolumineszenz (links Glühwürmchen) und Chemilumineszenz (rechts Luminolreaktion).....	41
Abb. 18: Blackbox Model des Systems.....	43
Abb. 19: Funktionsstruktur, PMT Klinostat.....	48
Abb. 20: Funktionsstruktur, Einheit PMT Klinostat mit Heizbox.....	49

Abb. 21: Schema der Bestandteile des Racks (links) und des Klinostaten in der Heizbox (rechts).....	54
Abb. 22: Schema der Rackstruktur.....	55
Abb. 23: Klinostat, Bestandteile .....	55
Abb. 24: Drehzahl des Klinostaten in Abhängigkeit von der Eingangsspannung .....	56
Abb. 25: Klinostat (rechts) mit Frequenzzähler (links unten) und Netzteil (links oben) .....	56
Abb. 26: Messküvette mit Verschlusskappe .....	57
Abb. 27: PMT Klinostat Skizze. Isometrische Ansicht (oben) und Vorderansicht (unten). Weitere Skizzen und die Stückliste s. Anhang. Vollständige Ausarbeitung Horn 2009a .....	58
Abb. 28: Photomultiplier (PMT), <i>Bild Hamamatsu</i> .....	59
Abb. 29: Schaltplan (links) und Stückplan (rechts) des Spannungsreglers .....	59
Abb. 30: Skizze, Heizbox. Isometrische Ansicht (oben)und Vorderansicht (unten). Weitere Skizzen und die Stückliste s. Anhang, vollständige Ausarbeitung Horn 2009a .....	60
Abb. 31: Heizblock (links), Ventilator mit Temperatursensor (rechts).....	61
Abb. 32 Schaltplan (oben) und Stückplan (unten) des Temperaturschalters .....	62
Abb. 33: Heizbox mit Mossgummi (links) und Rettungsfolie (rechts) zur Isolation.....	63
Abb. 34: Item Profil .....	63
Abb. 35: Skizze, Parabelfluggack. Isometrische Ansicht. Weitere Skizzen und die Stückliste siehe Anhang, vollständige Ausarbeitung Horn 2009b .....	64
Abb. 36: Maximale Auslenkung des Racks bei 9 g Belastung.....	65
Abb. 39: Test der Signalmessung mit Hilfe einer chemischen Leuchtreaktion .....	69
Abb. 40: Mechanischer Test mit Chemikalien.....	71
Abb. 41: Rotationstest mit Chemikalien .....	72
Abb. 37: Temperaturverlauf nach Einschalten der Heizbox .....	73
Abb. 38: Temperaturverlauf während des Parabelfluges an zwei Flugtagen .....	74
Abb. 42: Schema Photomultiplier.....	76
Abb. 43: PMT Gain im Verhältnis zu angelegten Spannung,.....	77
Abb. 44: Blockdiagramm des im PMT integrierten Schaltkreises.....	82
Abb. 45: Hardware Test mit dem TRIPLE LUX Science Model, PMT Signal,.....	83
Abb. 46: Dunkelstrom der vier PMTs, Gain 0,8 V .....	85
Abb. 47: Signalstärke bei variierender Lichtintensität, PMT 1.....	86
Abb. 48: Signalstärke bei variierender Lichtintensität, PMT 2.....	86
Abb. 49: Signalstärke bei variierender Lichtintensität, PMT 3.....	87
Abb. 50: Signalstärke bei variierender Lichtintensität, PMT 4.....	87
Abb. 51: Gain Scan, .....	89

Abb. 52: Test mit Chemikalien, Vergleich Sience Model (PMT1-3) und PMT Klinostat, Ammonium-3 Eisenzitrat Verdünnung 1:10000.....	91
Abb. 53: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 3.....	92
Abb. 54: Vergleich der Signalstärke von LED 2 an PMT 1 -4.....	93
Abb. 55: System Hysterse an PMT 1. Stufenweise Erhöhung und anschließende Erniedrigung der Lichtintensität.....	94
Abb. 56: Einfluss der Magnetrührer auf den Signaloutput, LED 0.1 mA.....	96
Abb. 57: Zellen in Neubauer Zählkammer, blau tote Zellen, weiß lebende Zellen ...	106
Abb. 58: Zelllinie NR8383 mit phagozytierten FITC-Zyosan-Partikeln.....	107
Abb. 59: Quenching der extrazellulären Fluoreszenz mittels Trypanblau. Bild nach Vorlage von Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA.) .....	108
Abb. 60: Luminolreaktion.....	108
Abb. 61: PMT-Klinostat (rechts) mit Frequenzzähler (links oben) und Netzteil (links unten).....	111
Abb. 62: DLR Pipettenklinostat (Design Jens Hauslage) im Inkubator .....	113
Abb. 63: Zentrifuge MuSIC, DLR Köln .....	114
Abb. 64: Short Arm Human Centrifuge, DLR Köln .....	115
Abb. 65: Vibrationstest auf der Vibraplex (DLR). Die Zellen wurden entsprechend der während des Parabelfluges entstehenden Vibrationen geschüttelt. Blau : 1 g Kontrolle; grün: vibrierte Zellen .....	118
Abb. 66: Kontrolle aktivierter Zellen. Starke Vibrationen erzeugt durch manuelles Schütteln des Klinostaten. Die schwarze Linie markiert die Punkte an denen, jeweils für 1 min manuell geschüttelt wurde.....	119
Abb. 67: Quenching Kontrolle mit toten Zellen und Chemikalien .....	120
Abb. 68: Zur Quenching Kontrolle verwendete tote Zellen.....	120
Abb. 69: Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Typische 1 g Kinetik des oxidativen Bursts durch mit Zyosan aktivierte Makrophagen (rot). Die schwarze Kurve zeigt nichtaktivierte, mit PBS behandelte Zellen.....	121
Abb. 70: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen bei Rotation von 60 UpM und 1 g. *Messungen wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert .....	122
Abb. 71: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich zwischen aktivierten Makrophagen bei 60 UpM und nicht aktivierten, mit PBS behandelten Zellen ebenfalls bei 60 UpM .....	123
Abb. 72: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen bei Rotation von 30 UpM (violett) und 1 g (blau). *Messungen wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert .....	124
Abb. 73: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten	

Zellen bei Rotation von 60 UpM (grün) und 30 UpM (violett). \*Messungen wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert ..... 124

Abb. 74: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen Rotation von 2 UpM (blau) und 1 g (rot). \*Messung wurde an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert ..... 125

Abb. 75.: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Fläche unter der Kurve (=gesamte Radikalproduktion) zwischen den verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten (60 UpM, 30 UpM, 2 UpM) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 126

Abb. 76: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Fläche unter der Kurve (=gesamte Radikalproduktion) zwischen 60 UpM Experimenten und der 1 g Kontrolle. 120 Minuten Messung. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 127

Abb. 77: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Maxima der Kurve (=max. Radikalproduktion) bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten (60 UpM, 30 UpM, 2 UpM) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 128

Abb. 78: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Zeit bis zum Erreichen des Maximum der Kurve (=lag time) bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten (60 UpM, 30 UpM, 2 UpM) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 129

Abb. 79: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383 ermittelt über die Oxidation von NBT-Zymosan. Endpunktmessungen nach verschiedenen Rotationszeiten. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 130

Abb. 80: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen bei 60 UpM klinorotiert für 20 min. Danach Stoppen der Rotation und Fortsetzen der Messung bei 1 g. 1 g Kontrolle in rot. \*Messung wurde an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert ..... 132

Abb. 81: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen bei normalen 1 g für 20 min. Danach Starten der Rotation bei 60 UpM. 1 g Kontrolle in rot. \*Messung wurde an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und normalisiert.... 133

Abb. 82: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Simuliertes Parabelflugprofil mit aktivierten Makrophagen. 1 g Kontrolle in rot. Rotationsprofil in grau unterlegt. 134

Abb. 83: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich von aktivierten Zellen bei 1.8 g (grün) und bei 1 g (rot) ..... 135

Abb. 84: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Fläche unter der Kurve (=gesamte Radikalproduktion) bei verschiedenen Profilen (Stop (1 g) 60

UpM, 60 UpM –Stop (1 g), Parabelflug Profil und 1,8 g) und der 1 g Kontrolle.  
Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 136

Abb. 85: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Maxima der Kurve (=gesamte Radikalproduktion) bei verschiedenen Profilen (Stop (1 g) 60 UpM, 60 UpM – Stop (1 g), Parabelflug Profil und 1,8 g) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 137

Abb. 86: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Vergleich der Zeit bis zum Erreichen des Maximums der Kurve (= gesamte Radikalproduktion) bei verschiedenen Profilen (Stop (1 g) 60 UpM, 60 UpM – Stop (1 g), Parabelflug Profil und 1,8 g) und der 1 g Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 138

Abb. 87: Schema des Versuchsablauf. Bei den Parabelflügen. Die erste Probe wurde vor Parabel 0 aktiviert, bis nach Parabel 15 gemessen und anschließend fixiert (blau); für die zweite Messung wurden die Zellen nach Parabel 15 aktiviert und bis einschließlich Parabel 30 gemessen (grün) ..... 139

Abb. 88: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 10.02.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16 ..... 140

Abb. 89: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 10.02.2009, aktiviert vor Parabel 0, Detail Parabel 6-10 mit g-Profil (grau) ..... 140

Abb. 90: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem g-Profil (grau). FD3, 12.02.2009 Parabel 0-15. Klinorotiert mit 60 UpM ..... 141

Abb. 91: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem g-Profil (grau). FD3, 12.02.2009. Parabel 16-30 - klinorotiert mit 60 UpM in den 0 g Phasen bis zur 8. Parabel; P 9-10 - klinorotiert in hg und  $\mu$ g Phasen; P 11-15 ohne Rotation ..... 142

Abb. 92 Einfluss von wechselnden Schwerkraftbedingungen auf die Phagozytoserate der Zelllinie NR8383 fluorimetrisch ermittelt im Mikrotiterplattenreader. Mittelwerte  $\pm$ SE. Normalisierte Werte ..... 143

Abb. 93: Lage der Zellen in 1 g bzw. während Klinorotation ..... 146

Abb. 94: Bodenplatte mit Befestigungspunkten ..... 178

Abb. 95: PMT Klinostat, Skizze, vollständige Zeichnungen Horn 2009a ..... 182

Abb. 96: Skizze der Heizbox, vollständige Zeichnungen Horn 2009a ..... 185

Abb. 97: Skizze der Heizbox, vollständige Zeichnungen Horn 2009b ..... 188

Abb. 98: System Hysterse an PMT 1, stufenweise Erhöhung und anschließende Erniedrigung der Lichtintensität ..... 190

Abb. 99: System Hysterse an PMT 2, stufenweise Erhöhung und anschließende Erniedrigung der Lichtintensität ..... 191

Abb. 100: System Hysterse an PMT 4, stufenweise Erhöhung und anschließende Erniedrigung der Lichtintensität.....	191
Abb. 101: Vergleich der Signalstärke von PMT 1-4 an LED 1. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht .....	194
Abb. 102: Vergleich der Signalstärke von PMT 1-4 an LED 2. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht.....	195
Abb. 103: Vergleich der Signalstärke von PMT 1-4 an LED 3. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht.....	195
Abb. 104: Vergleich der Signalstärke von PMT 1-4 an LED 4. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht.....	196
Abb. 105: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 1. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht.....	196
Abb. 106: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 2. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht.....	197
Abb. 107: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 3. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht.....	197
Abb. 108: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 4. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht.....	198
Abb. 109: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 10.02.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16 .....	204
Abb. 110: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD2, 11.02.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16 .....	204
Abb. 111: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 02.11.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16 .....	205
Abb. 112: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 03.11.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16 .....	205
Abb. 113: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem <i>g</i> -Profil (grau). FD3, 12.02.2009 Parabel 0-15. Klinorotiert mit 60 UpM bis Parabel 10. Parabel 11-15 ohne Rotation .....	206
Abb. 114: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem <i>g</i> -Profil (grau). FD3, 12.02.2009 Parabel 16-30. Klinorotiert mit 60 UpM in den 0 <i>g</i> Phasen bis zur 8. Parabel. Parabel 9-10 klinorotiert in hg und µg Phasen. Parabel 11-15 ohne Rotation.....	206
Abb. 115: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im	

Parabelflug hinterlegt mit dem *g*-Profil (grau). FD3, 04.11.2009 Parabel 0-15.  
 Klinorotiert mit 60 UpM bis Parabel 10. Parabel 11-15 ohne Rotation ..... 207

Abb. 116: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie  
 NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im  
 Parabelflug hinterlegt mit dem *g*-Profil (grau). FD3, 04.11.2009 Parabel 16-30.  
 Klinorotiert mit 60 UpM in den 0*g* Phasen bis zur 8. Parabel. Parabel 9-10 klinorotiert  
 in hg und  $\mu$ g Phasen. Parabel 11-15 ohne Rotation..... 207

## 14 Anhang

### Strukturberechnungen Parabelflugrack

#### Struktur:

Profile (www.item24.com):

Material: AL Mg Si 0,5

Zugfestigkeit:  $R = 250\text{N/mm}^2$

Streckfestigkeit (0.2%)  $R_{0,2} = 200\text{N/mm}^2$

**Tabelle 16: Aluminiumprofile, Herstellerdaten** (www.item24.com)

Produkteigenschaften Profile 8 40x40 leicht, natur		
Material		Al, eloxiert
Eigenschaft		natur
Höhe	h	40 mm
Breite	b	40 mm
Fläche	A	6,46 cm <sup>2</sup>
Flächenträgheitsmoment Biegung	I	9 cm <sup>4</sup>
Flächenträgheitsmoment Torsion	I <sub>t</sub>	1.12 cm <sup>4</sup>
Widerstandsmoment Biegung	W	4.5 cm <sup>3</sup>
Gewicht spez. Länge [kg/m]	m	1,74 kg/m

Länge der Profile.

$$L = 0,54 \cdot 4 + 0,54 \cdot 6 + 0,6 \cdot 4 + 0,295 \cdot 2 + 0,22 \cdot 2$$

$$L = 9,71\text{m}$$

Gewicht der Profile:

$$m = 9,1 \cdot 1,74$$

$$m = 16,9\text{kg}$$

Winkel:

Die vier senkrechten Streben wurden in x-Richtung mit 40x80 [mm] Winkeln befestigt. Gewicht  $m = 0,36 \text{ g}$  (pro Winkel)

In y- Richtung wurde sie, genau wie alle anderen Profile, mit 40x40 [mm] Winkeln, Gewicht  $m = 0,15 \text{ g}$  (pro Winkel) fixiert.

Aluminium Platten:

Die Bodenplatte bestand aus 10 mm dicken Aluminium ( $\rho=2,7\text{kg/mm}^3$ ):

$$V_{base} = 100,0 \cdot 70,0 \cdot 1,0$$

$$V_{base} = 7000\text{cm}^3$$

$$m = V \cdot \rho = 18,9\text{kg}$$

Die obere Platte bestand aus 5 mm dicken Aluminium ( $\rho=2,7\text{kg/mm}^3$ ):

$$V_{base} = 55,0 \cdot 70,0 \cdot 0,5$$

$$V_{base} = 1925\text{cm}^3$$

$$m = V \cdot \rho = 5,2\text{kg}$$

Die mittlere Platte bestand aus 5 mm dicken Aluminium ( $\rho=2,7\text{kg/mm}^3$ ):

$$V_{base} = 35,0 \cdot 70,0 \cdot 0,5 - 4,0 \cdot 8,0$$

$$V_{base} = 1193\text{cm}^3$$

$$m = V \cdot \rho = 3,22\text{kg}$$

Gewicht:

$$m_{struc} = m_{profile} + m_{plates} + m_{elbows+screws} = (16,9 + 27,32 + 8,52) \text{ kg}$$

$$m_{struc} = 52,74\text{kg}$$

Equipment:

Auf dem Rack befanden sich ein Laptop  $m = 3$  kg, der PMT Klinostat in der zugehörigen Heizbox, Frequenzzähler und Netzteil  $m = 22$  kg.

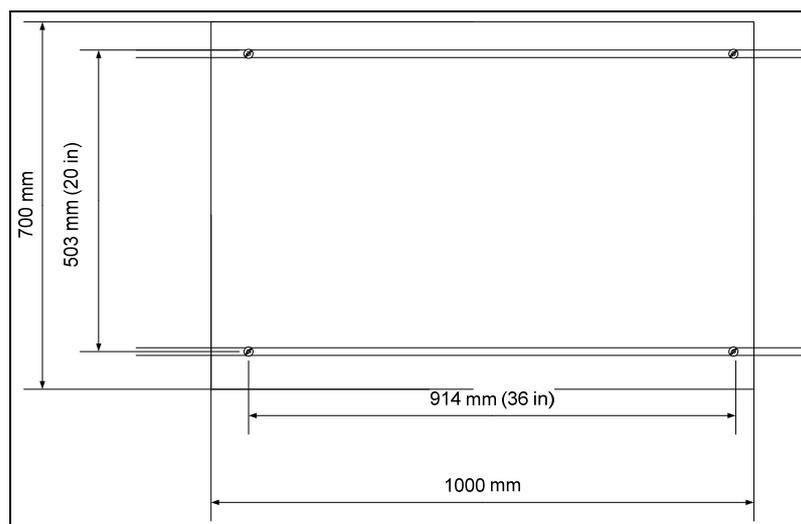
Das Gesamtgewicht des Equipments war daher:

$$m_{\text{equip}} = (3+22) \text{ kg} = 25 \text{ kg}$$

Gesamtgewicht des Experimentes:

$$m_{\text{tot}} = m_{\text{struc}} + m_{\text{equip}} = 25 \text{ kg} + 52,74 \text{ kg} = 77,74 \text{ kg} \approx 78 \text{ kg}$$

Die Bodenplatte wurde über 4 Kontaktpunkte mit je einer M12 Schraube an den Schienen des Flugzeuges befestigt (Abb. 94).



**Abb. 94: Bodenplatte mit Befestigungspunkten**

Belastungsgrenzen:

Die Berechnungen der Belastungsgrenzen wurden nach den Vorlagen der Sicherheitskriterien von NOVESPACE (rules and guidelines for the A300 ZERO-G) durchgeführt.

Schwerpunkt:

Der Schwerpunkt wurde mit Hilfe von Catia V5 berechnet. Zusätzlich wurde der Scherpunkt noch mal anhand der Vorgaben des Novespace menu for rules and guidelines for the A300 ZERO-G überprüft:

**Tabelle 17: Schwerpunktsberechnung**, M= Masse [kg], H= Schwerpunkt [mm<sup>3</sup>]. Bezugspunkt ist dabei der Mittelpunkt der Unterseite der Bodenplatte.

Schwerpunkt H	x [mm]	y [mm]	z [mm]	M[kg]
Rack	52,767	0	200,362	52,74
Rack mit Equipment	55	5	201	77,74

### Lineare Belastung der Schienen:

$$d = 36 \text{ inch}$$

$$H = 201 \text{ mm}$$

$$RL = \frac{m_{tot}}{N_{befestigt}} = \frac{78kg}{4} = 18.5kg / \text{Schraube}$$

Die Distanz zwischen den Schrauben ist 36 Inches und der Schwerpunkt des Racks ist unter 677 mm (in z-Richtung). Daher muss die maximale lineare Belastung der Schienen unter 100 kg/ Schraube liegen (Novespace menu for rules and guidelines for the A300 ZERO-G). Dies kann hiermit garantiert werden.

### Scherkraft:

$$m = 78 \text{ kg (Gesamtmasse)}$$

$$N_{attach} = 4$$

Die Scherkraft bei einer Belastung von 9 g in x Richtung ist demnach:

$$F_s = \frac{9gm}{N_{attach}} = \frac{9 \cdot 9,81 \cdot 78}{4}$$

$$F_s = 1721,655N$$

Der Sicherheitsfaktor auf jede Schraube bei dieser Belastung ist:

$$SF = \frac{F_{s\max}}{F_s} = \frac{34800}{1721,655}$$

$$SF = 20,21$$

**Zugkraft:**

$$m = 78 \text{ kg}$$

$$H = 201 \text{ mm}$$

$$N_{\text{rear attach}} = 2$$

$$D = 914 \text{ mm}$$

Die Zugkraft bei einer Belastung von 9g in x Richtung ist demnach:

$$F_t = \frac{9gmH}{N_{\text{rearattach}} \cdot d} = \frac{9 \cdot 9,81 \cdot 78 \cdot 201}{2 \cdot 914,4} \text{ N}$$

$$F_t = 757 \text{ N}$$

Für die gesamte Zugkraft, die auf jede Schraube wirkt, muss die Belastung durch das Drehmoment das auf Schraube wirkt addiert werden ( $F_{\text{load}} = 28300 \text{ N}$ )

$$F_{\text{ttot}} = F_t + F_{\text{load}} = 29057 \text{ N}$$

Der Sicherheitsfaktor auf jede Schraube für die Zugkraft ist:

$$SF = \frac{F_{t\max}}{F_{\text{ttot}}} = \frac{58000}{29057} = 2,00$$

**Biegemoment:**

$$m = 78 \text{ kg}$$

$$H = 201 \text{ mm}$$

$$N_{\text{up}} = 4$$

$$R = 250 \text{ Nmm}^{-2}$$

$$W_{(\text{Item})} = 4.5 \times 10^3 \text{ mm}^3$$

Das maximale Biegemoment bei einer Belastung von 9 g ist:

$$M_b = \frac{9gmH}{N_{\text{up}}} = \frac{9 \cdot 9,81 \cdot 78 \cdot 201}{4} = 346 \text{ kN}$$

Das maximal erlaubte Biegemoment ist:

$$M_{b_{\max}} = R W = 250 \cdot 4,5 \cdot 10^3 \text{ Nmm}$$

$$M_{b_{\max}} = 1125 \text{ kNmm}$$

Der Sicherheitsfaktor für das Biegemoment auf eine Senkrechte ist:

$$SF = \frac{M_{b_{\max}}}{M_b} = \frac{1125 \text{ kN}}{346 \text{ kN}} = 3,3$$

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert die nachfolgende Tabelle:

**Tabelle 18: Zusammenfassung, Sicherheitsberechnungen nach Novespace Rules and Guidelines**

<b>Allgemeine Daten</b>				
	ohne Equipment	mit Equipment		
Masse	52 kg	78 kg		
Dimensionen	1000x700x600 mm			
Schwerpunkt	201mm [z Richtung]			
<b>Belastungen, Sicherheitsberechnungen</b>				
	Belastung	strukturelle Belastung unter 9g	maximale erlaubte Belastung	Sicherheitsfaktor
Befestigungsschrauben	Scherkraft	$F_s = 1721,655 \text{ N}$	$F_{s_{\max}} = 348000 \text{ N}$	SF = 20,21
	Zugkraft	$F_{\text{tot}} = 29057 \text{ N}$	$F_{\text{adm}} = 58000 \text{ N}$	SF = 2
senkrechte Profile	Biegemoment	$M_b = 346000 \text{ N}$	$M_{b_{\max}} = 1125000 \text{ N}$	SF = 3,3

PMT Klinostat, Skizze

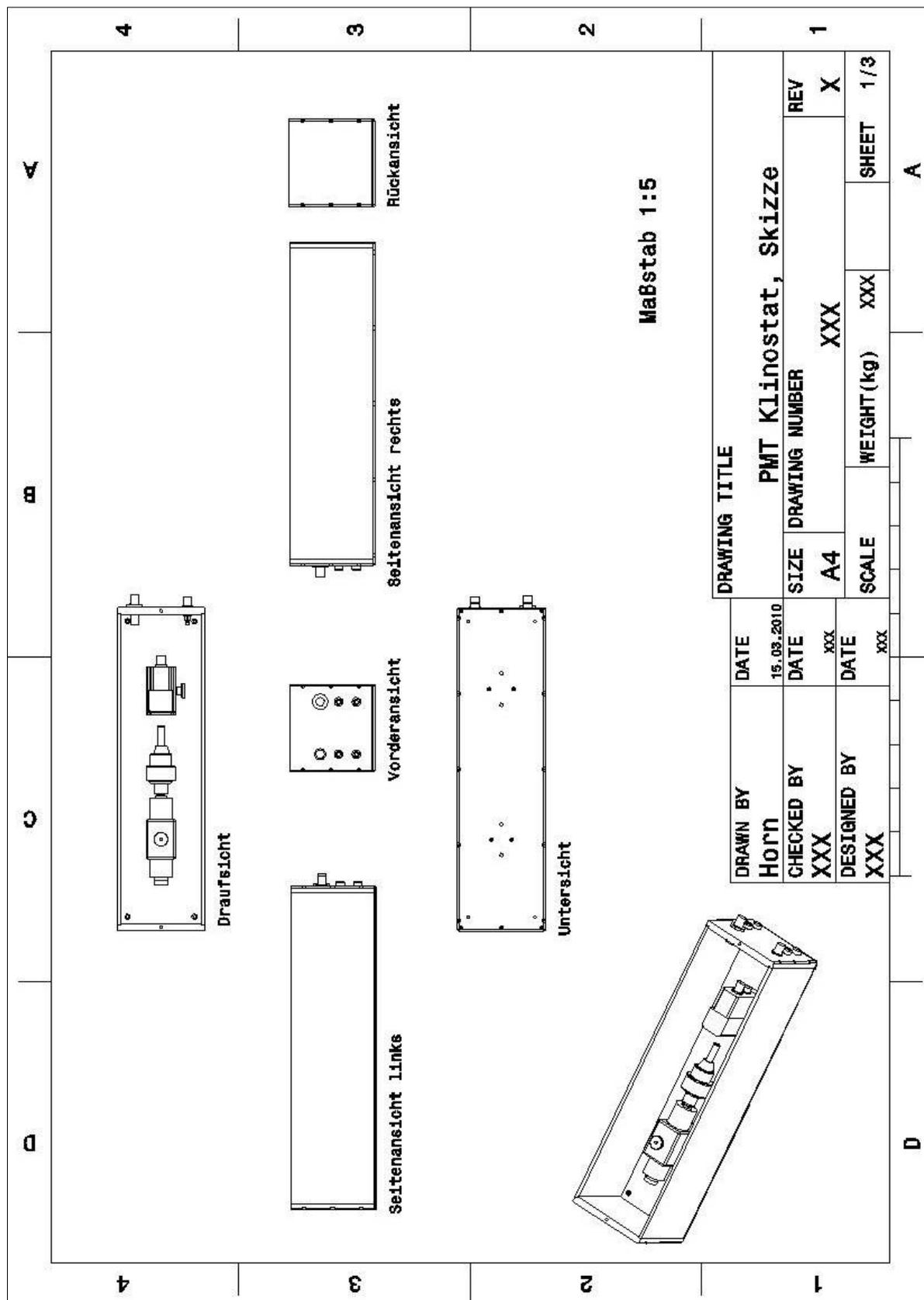


Abb. 95: PMT Klinostat, Skizze, vollständige Zeichnungen Horn 2009a

## PMT Klinostat, Stückliste

Tabelle 19: Stückliste des Klinostaten vollständige Ausarbeitung Horn 2009a

1	2	3	4	5	6	7
Pos.	Stck	Benennung	Z.-Nr.	Werkstoff	Bemerkung	Norm
	1	PMT-Klinostat	100			
1	1	Grundplatte	-1	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
2	1	Deckel (-003 / -004 / - 005 / -006)	-2	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
3	1	Seitenwand (links) (- 001)	-3	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
4	1	Seitenwand (rechts) (- 001)	4	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
5	1	Vorderwand (-001)	-5	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
6	1	Rückwand (-001)	-6	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
7	1	PMT -Halter (-001)	-7	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
8	1	Rändelschraube (-007)	-8	CuZn/X10CrN i1B-8		DIN EN 121631/ DIN EN 10088-3
9	1	Motorbock (-001)	-9	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
10	1	Rändelschraube (-009)	-10	CuZnIX10CrNi1B-8		DIN EN 121631/ DIN EN 10088-3
11	1	Schutzblech {-023}	-11	ALMG3	schwarz/matt (eloxiert)	DIN EN 754-2
12	2	Rändelschraube (-002)	-12	CuZn/X10CrNi1B-8		DIN EN 121631 / DIN EN 10088-3
13	1	Griff (Bohrfutterschlüssel) (- 025)	-13	ALMG3		DIN EN 121631 / DIN EN 10088-3
14	10	Flachkopfschraube (- 005 / -006)	-14	X10CrNi18-8	M2x8	DIN EN ISO 7045
15	11	Flachkopfschraube (- 003/004)	-15	X10CrNi18-8	M2x12	DIN EN ISO 7045
16	4	Flachkopfschraube (- 001 1-0	-16	X10CrNi18-8	M3x10	DIN EN ISO 7045
17	4	Senkkopfschraube (- 031 103	-17	X10CrNi18-8	M3x5	DIN EN ISO 2009
18	4	Zylinderkopfschraube - 028)	-18	X10CrNi18-8	M4x20	DIN EN ISO 4762
19	4	Zylinderstift (gehärtet) (-001 1-007/-009)	-19	S235JR	4x10 C1	DIN EN ISO 8734
20	1	Gewindestift (-013 / - 025)	-20	S235JR	M3x3	DIN 913
21	2	Sechskantmutter (-028)	-21	X10CrNi18-8	M4	DIN EN ISO 4032
22	1	DC-Kleinstmotor / Getriebe (-005)	-22	-	Serie 2642 CR / 26/1	www.faulhaber.com
23	1	Photomultiplier	-23	-	Hamamtsu H7155	-

24	1	1 Zahnkranz-Bohrfutter (-009)	-24	S235JR	Typ 8-1/2 (Innengewinde)	www.qoedde.de
25	1	Schüssel (-024	-25	S235JR	Typ 8-1/2	www.oedde.de
26	1	Adapterstück (-022 1-024)	-26	CuZn	-	-
27	4	Puffer (-001)	-27	Arabicum	08x8 (M3 Innengewinde)	DIN 38412-L 15
28	1	Tragegriff (-002	-28	-	-	-
29	2	Buchse (-004)	-29	-	Farbe: Rot	-
30	2	Buchse (-004)	-30	-	Farbe: Schwarz	-
31	1	BNC Stecker (-004)	-31	-	Durchgangsstecker	www.conrad.de
32	1	BNC Stecker (-004)	-32	-	Einfachstecker	www.conrad.de
33	1	Netzteil-Bausatz	-33	-	11 5576	www.conrad.de
34	2	Spannungskabel	-34	-	Farbe: Rot 1 m	-
35	2	Spannungskabel	-35	-	Farbe: Schwarz 11m	-
36	2	BNC-Kabel	-36	-	1m	-
37	1	BNC-Kabel	-37	-	0,2m	-
38	1	Spannungsregler	-38	-	-	-
				Benennung	Blatt 1/1	
				<b>PMT-Klinostat</b>		

Heizbox, Skizze

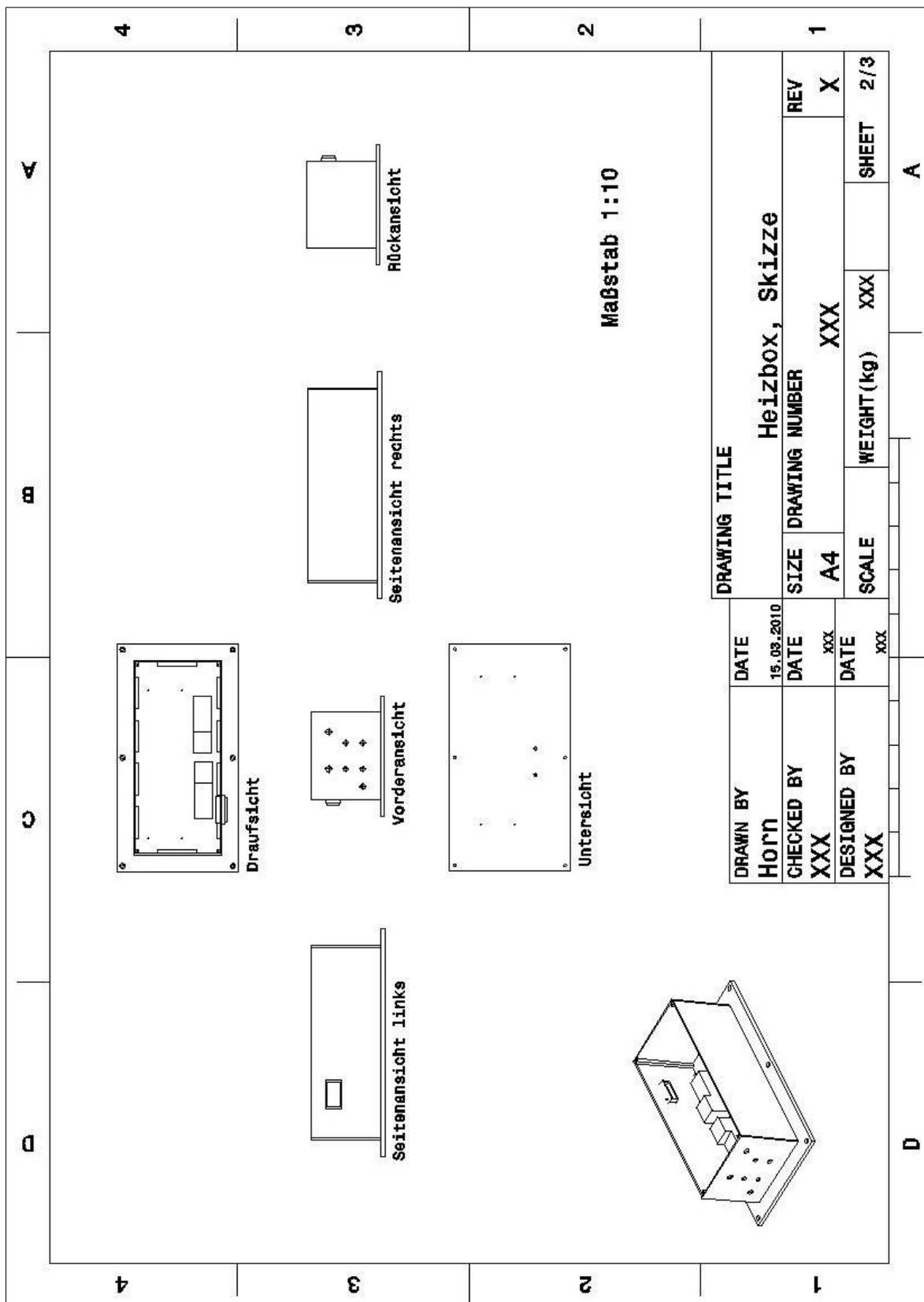


Abb. 96: Skizze der Heizbox, vollständige Zeichnungen Horn 2009a

## Heizbox, Stückliste

Tabelle 20: Stückliste der Heizbox, vollständige Ausarbeitung Horn 2009a

1	2	3	4	5	6	7
Pos.	Stck	Benennung	Z.-Nr.	Werkstoff	Bemerkung	Norm
	1	Isolations-Box				
1	1	Grundplatte	006	PVC-U	Farbe: Rot	DIN EN ISO 1043-1
2	2	Vorderwand	004/005	PVC-U	Farbe: Rot	DIN EN ISO 1043-1
3	2	Seitenwand	002/003	PVC-U	Farbe: Rot	DIN EN ISO 1043-1
4	1	Deckel	001	PVC-U	Farbe: Rot	DIN EN ISO 1043-1
5	4	Stabilisator	008	PVC-U	Farbe: Rot	DIN EN ISO 1043-1
6	8	Stabilisator	009	PVC-U	Farbe: Rot	DIN EN ISO 1043-1
7	4	Winkel		AIMG3		DIN EN 754-2
8	1	Sterngriff			L 21 x 32 / Farbe: Schwarz	DIN 6336
9	1	Zylinderschraube (Innensechskant)		X10CrNi18- 8	M6x16	DIN EN ISO 4762
10	8	Senkkopfschraube (Schlitz)		X10CrNi18- 8	M4x20	DIN EN ISO 2009
11	8	Unterlegscheibe		X10CrNi18- 8	Ø4	DIN EN ISO 7092
12	8	Sechskantmutter		X10CrNi18- 8	M4	DIN EN ISO 4032
13	4	Senkschraube (Innensechskant)		X10CrNi18- 8	M4x16	DIN 7991
14	4	Gewindestift		X10CrNi18- 8	M2x8	DIN 913
15	6	Zylinderschraube (Innensechskant)		X10CrNi18- 8	M6x20	DIN EN ISO 4762
16	2	Heizelement				
17	1	Thermometer (Digital)				
18	1	Strombuchse				
19	2	BNC-Stecker				www.conrad.de
20	2	Bananenbuchse			Farbe: Rot	
21	2	Bananenbuchse			Farbe: Schwarz	
22		Folie		Al		

23	Moosgummi	SBR			
24	Filz	IN			-
25	Kabelhalter				
				Benennung Heizbox	Blatt 1/1
					

Parabelflugrack, Skizze

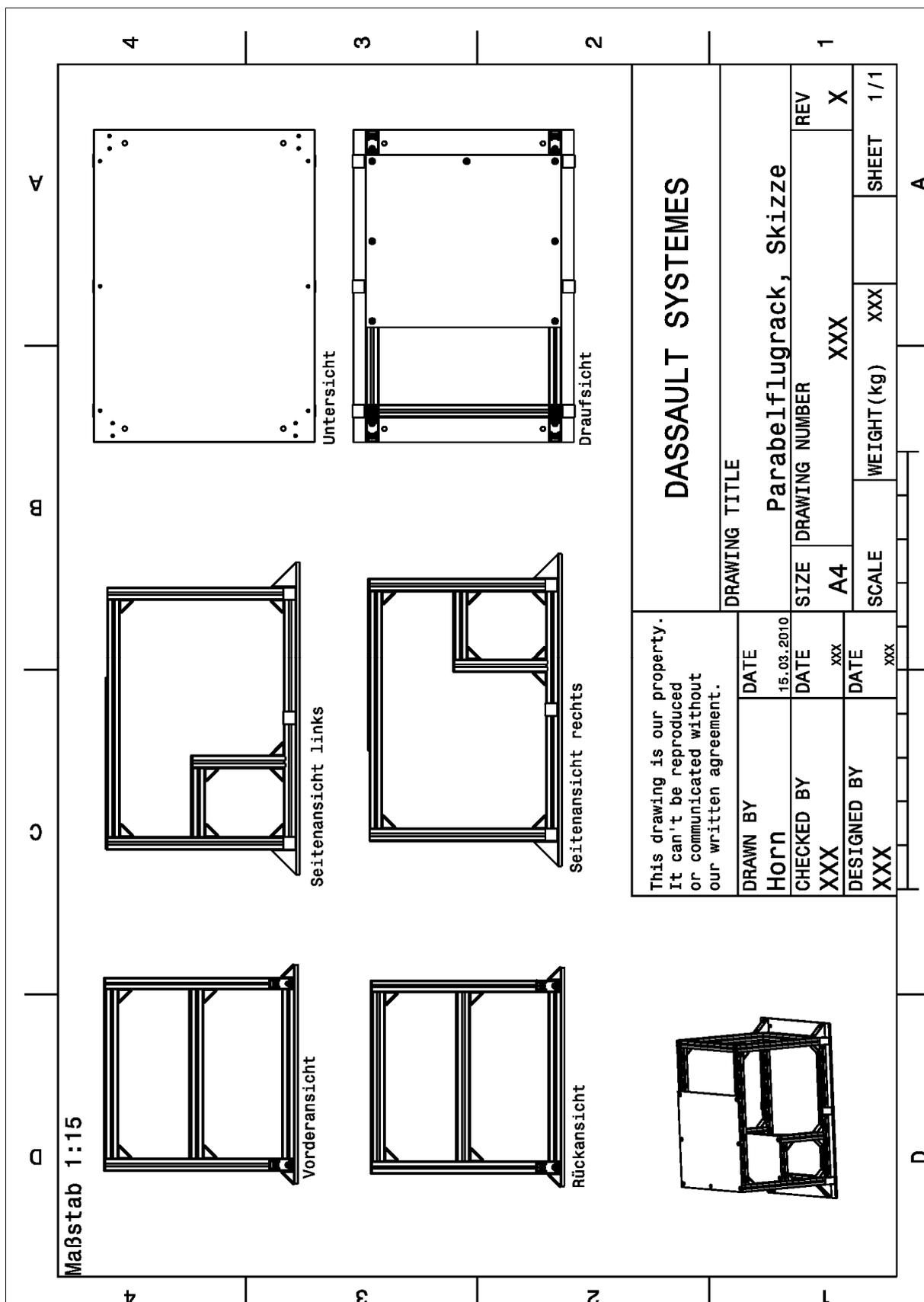


Abb. 97: Skizze der Heizbox, vollständige Zeichnungen Horn 2009b

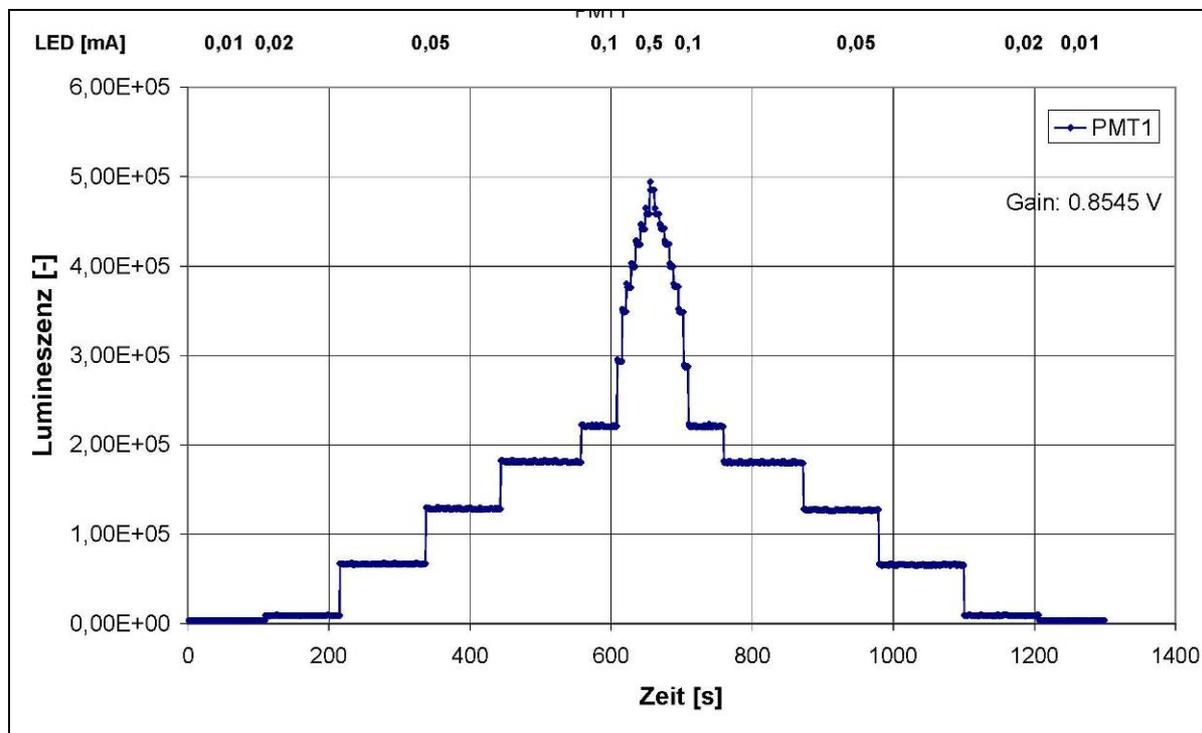
**Parabelflugrack, Stückliste**

**Tabelle 21:Stückliste des Parabelflugracks, vollständige Ausarbeitung Horn 2009b**

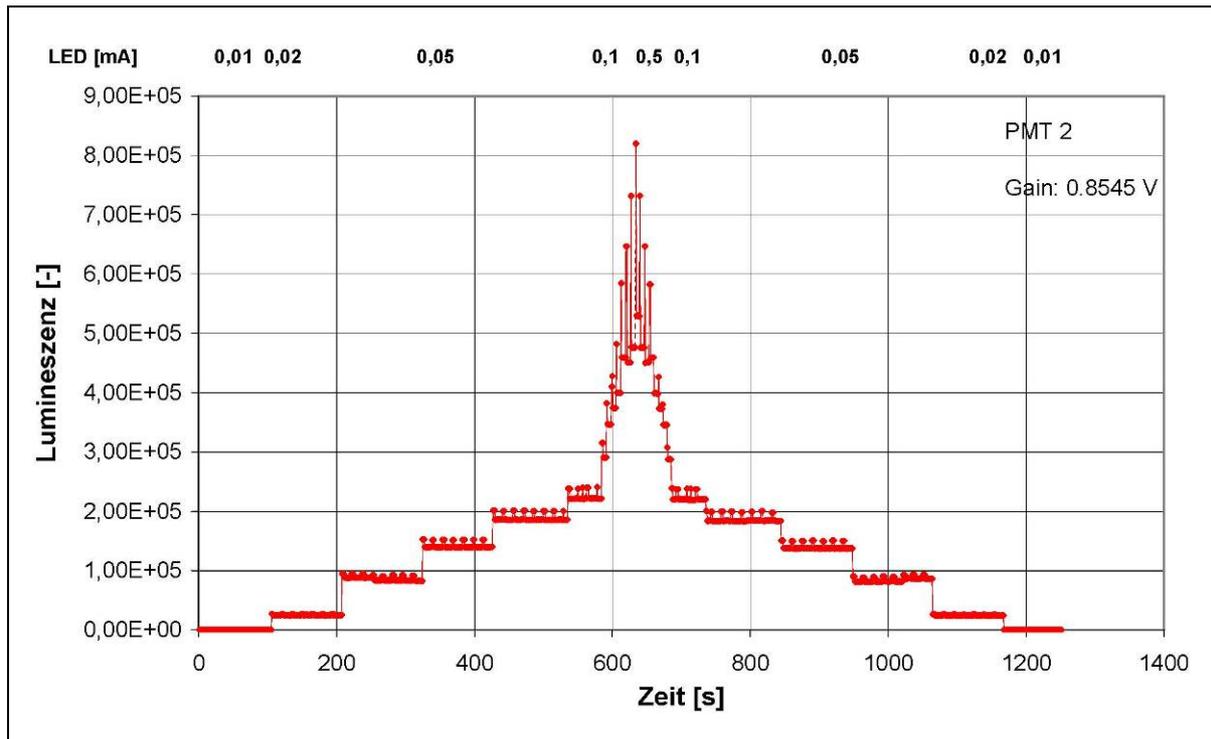
1	2	3	4	5	6	7
Pos.	Stck	Benennung	Z.-Nr.	Werkstoff	Bemerkung	Norm
	1	Parabelflugrack				
		Bodenplatte		ACP 5080R		DIN EN ISO
1	1	10x700x1000 mm		AlMg4, 5Mn		573-3
		Obere Platte		ACP 5080R		DIN EN ISO
2	1	5x300x620		AlMg4, 5Mn		573-3
		Mittlere Platte		ACP 5080R		DIN EN ISO
3	1	5x500x620		AlMg4, 5Mn		573-3
		Profil 8leicht				
4	6	540x40x40		AL Mg Si 0.5	natur 0.0.026.33	
		Profil 8leicht				
5	2	220x40x40		AL Mg Si 0.5	natur 0.0.026.33	
		Profil 8leicht				
6	4	600x40x40		AL Mg Si 0.5	natur 0.0.026.33	
		Profil 8leicht				
7	2	295x40x40		AL Mg Si 0.5	natur 0.0.026.33	
					weißaluminium	
					ähnlich	
8	35	Winkelsatz 40x40		GD-Zn	RAL 9006	
	je	1 Winkel- Abdeckkappe		PA-Gf	8 40x40	DIN EN
		2 Halbrundschauben		X5CrNi18-10	M8x18 verzinkt	ISO 7380
		2 Scheiben		X5CrNi18-10	13,9x13,9x2 verzinkt	
		2 Nutensteine		X5CrNi18-10	8 St M8 verzinkt	
					weißaluminium	
					ähnlich	
9	8	Winkelsatz 80x80		GD-Zn	RAL 9006	
	je	4 Halbrundschauben		X5CrNi18-10	M8x18 verzinkt	DIN EN
		1 Winkel- Abdeckkappe		Pa- Gf	80x80	ISO 7380
		4 Scheiben		X5CrNi18-10	13,9x13,9x2 verzinkt	
		4 Nutensteine		X5CrNi18-10	M8x18 verzinkt	
				Benennung		
				<b>Parabelflugrack</b>		
					Blatt 1/1	

## Kalibrierung der Photomultiplier

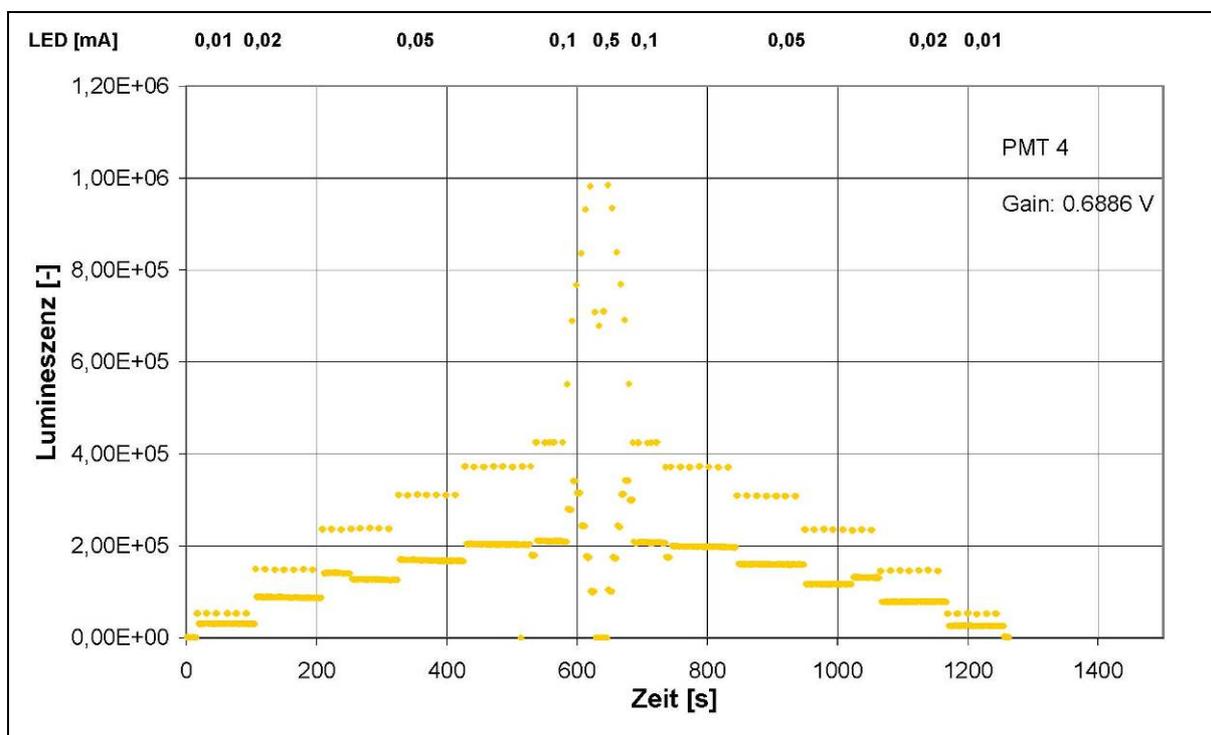
Hysteresese



**Abb. 98: System Hysterese an PMT 1, stufenweise Erhöhung und anschließende Erniedrigung der Lichtintensität**



**Abb. 99: System Hysterse an PMT 2, stufenweise Erhöhung und anschließende Erniedrigung der Lichtintensität**



**Abb. 100: System Hysterse an PMT 4, stufenweise Erhöhung und anschließende Erniedrigung der Lichtintensität**

## Kalibrierung- externe LEDs

Gemessen wurden vier verschiedenen Positionen (PO1-PO4) so dass jeder PMT mit jeder LED gemessen wurde. An jeder Position wurde der Strom an den LEDs und damit die Leuchtstärke stufenweise hoch reguliert. Bei jeder Position und Spannung wurden jeweils 5 Messungen durchgeführt, aus denen der Mittelwert gebildet wurde.

Die LEDs waren bei der jeweiligen Position nach folgender Tabelle zugeteilt:

**Tabelle 22: Positionen der PMTs und LEDs**

<b>PO1</b>	<b>PMT</b>	<b>LED</b>
	1	2
	2	1
	3	3
	4	4
	<b>PMT</b>	<b>LED</b>
	1	4
	2	2
<b>PO2</b>	3	1
	4	3
	<b>PMT</b>	<b>LED</b>
	1	3
<b>PO3</b>	2	4
	3	2
	4	1
	<b>PMT</b>	<b>LED</b>
<b>PO4</b>	1	1
	2	3
	3	4
	4	2

Einstellungen

Die verwendeten Einstellungen für Gain und Spannung waren:

**Tabelle 23: Einstellungen für Gain und Eingangsspannung**

PMT	Gain [V]	Eingangsspannung (PMT) [V]
1	0,981	0,38
2	1	0,2
3	0,987	0,76
4	0,955	0,89

Mittelwerte der Messung**Tabelle 24: Mittelwerte der Lumineszenz aus jeweils 5 Messungen,**

Standartabweichung liegt jeweils unter 12 %, ab 0.005 mA unter 5 %. Bei PMT 1 lag die Messung unglücklicherweise im Bereich des Dunkelstroms, daher musste dieser von den Messwerten abgezogen werden. Dies führte dazu das die ersten 2-3 Messwerte leider nicht verwendbar sind.

	Spannung (LED) [V]	LED Strom [mA]	PMT 1	PMT 2	PMT 3	PMT 4	PMT1 (-DC)
<b>PO 1</b>	0	0	28897	60	107	37	
	1,42	0,001	28471	120	143	69	-426
	1,47	0,002	29596	211	359	359	699
	1,52	0,005	31470	1429	1892	1521	2573
	1,55	0,009	34988	4108	5954	5185	6091
	1,57	0,014	41527	9992	11328	11472	12630
	1,59	0,019	51348	15884	20794	20038	22451
	1,6	0,028	74003	30350	37638	36264	45106
	1,64	0,057	138481	82352	108502	108072	109584
	1,66	0,08	202385	130943	158655	130747	173488
<b>PO2</b>	0	0	33522	44	124	18	
	1,42	0,001	33144	85	154	58	-378
	1,47	0,002	32549	338	357	257	-973
	1,52	0,005	33543	1672	1678	1434	21
	1,55	0,009	35476	5819	4958	4964	1954
	1,57	0,014	39179	13972	12550	10901	5657
	1,59	0,019	47801	23402	18848	18684	14279
	1,6	0,028	62002	42839	33965	36703	28480
	1,64	0,057	119377	108268	98815	104428	85855
	1,66	0,08	167182	158156	147478	165187	133660
<b>PO3</b>	0	0	33294	26	97	37	
	1,42	0,001	34163	42	161	75	869
	1,47	0,002	31611	245	435	301	-1683
	1,52	0,005	34044	1257	2232	1541	750
	1,55	0,009	37680	3876	7352	5186	4386

	1,57	0,014	42235	9271	16955	12512	8941
	1,59	0,019	50369	15136	25277	21430	17075
	1,6	0,028	66456	29333	48194	38929	33162
	1,64	0,057	128007	82287	131500	112266	94713
	1,66	0,08	170788	121045	190270	171348	137494
<b>PO4</b>	0	0	33515	25	96	45	
	1,42	0,001	31311	56	114	74	-2204
	1,47	0,002	33810	178	286	340	295
	1,52	0,005	35927	1382	1542	2847	2412
	1,55	0,009	37794	4802	5017	7552	4279
	1,57	0,014	45161	9917	11965	18145	11646
	1,59	0,019	59844	17128	19143	29644	26329
	1,6	0,028	63933	30659	34367	55180	30418
	1,64	0,057	117883	88250	101485	145815	84368
	1,66	0,08	165525	134274	150405	219816	132010

### Externe LEDs Graphen

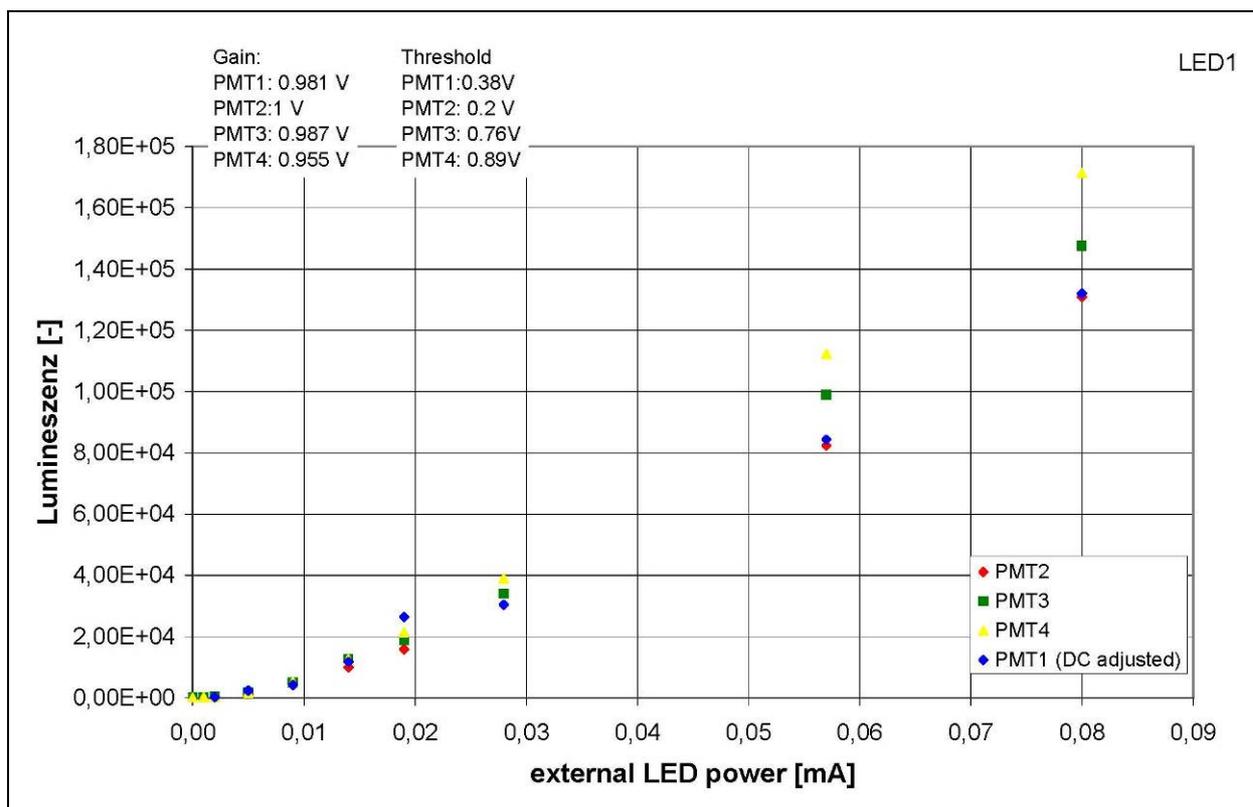


Abb. 101: Vergleich der Signalstärke von PMT 1-4 an LED 1. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht

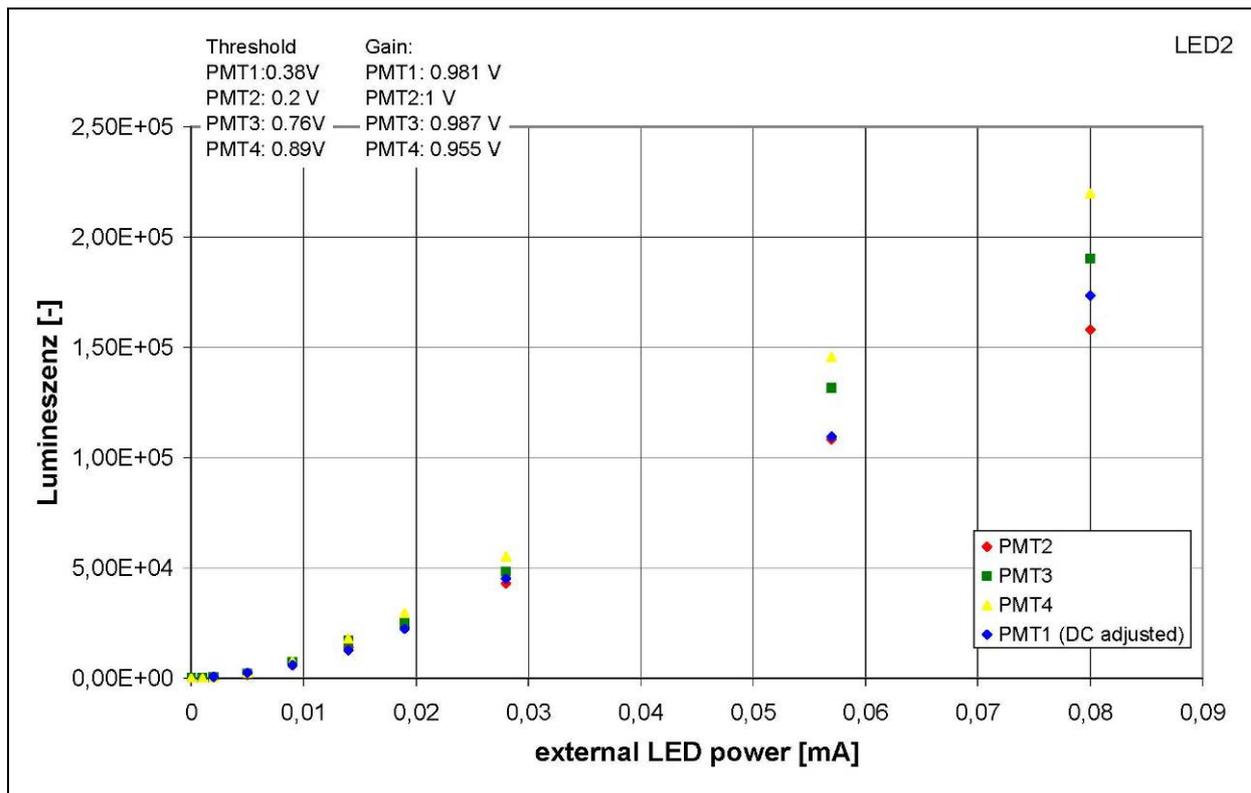


Abb. 102: Vergleich der Signalstärke von PMT 1-4 an LED 2. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht

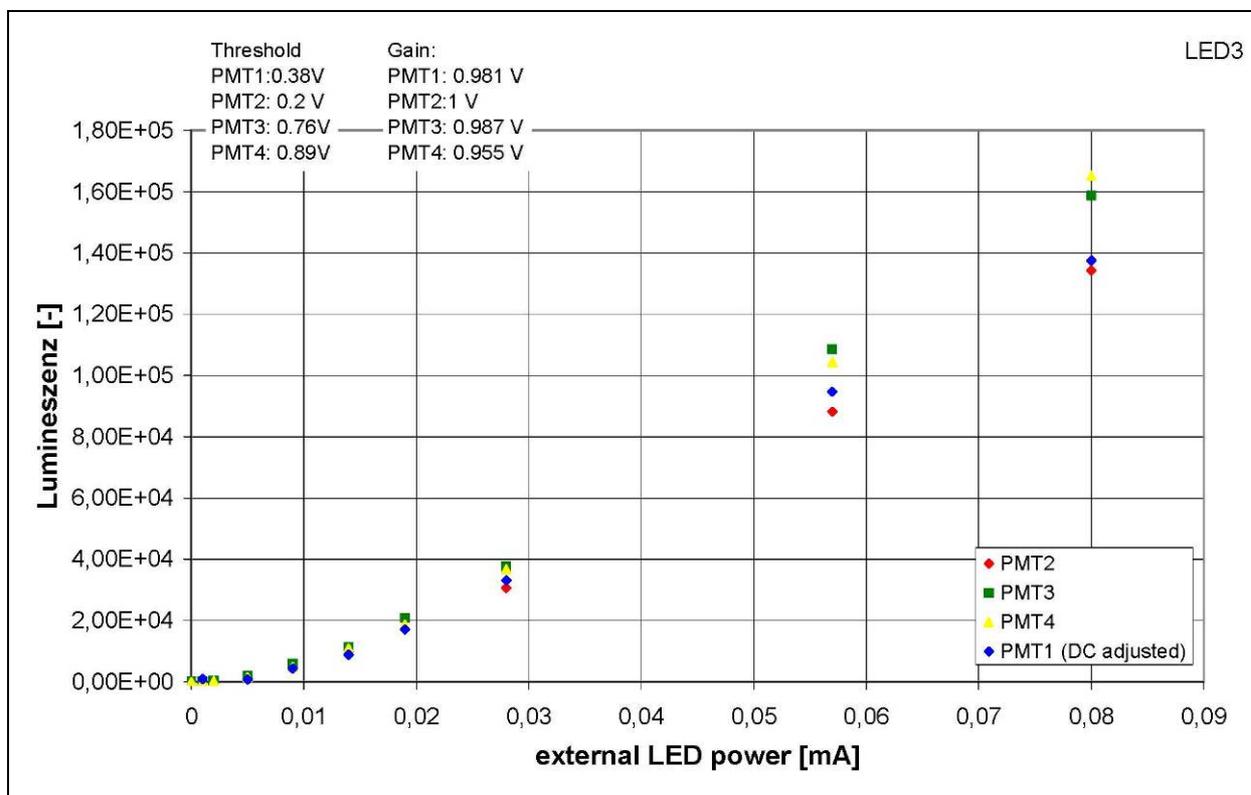
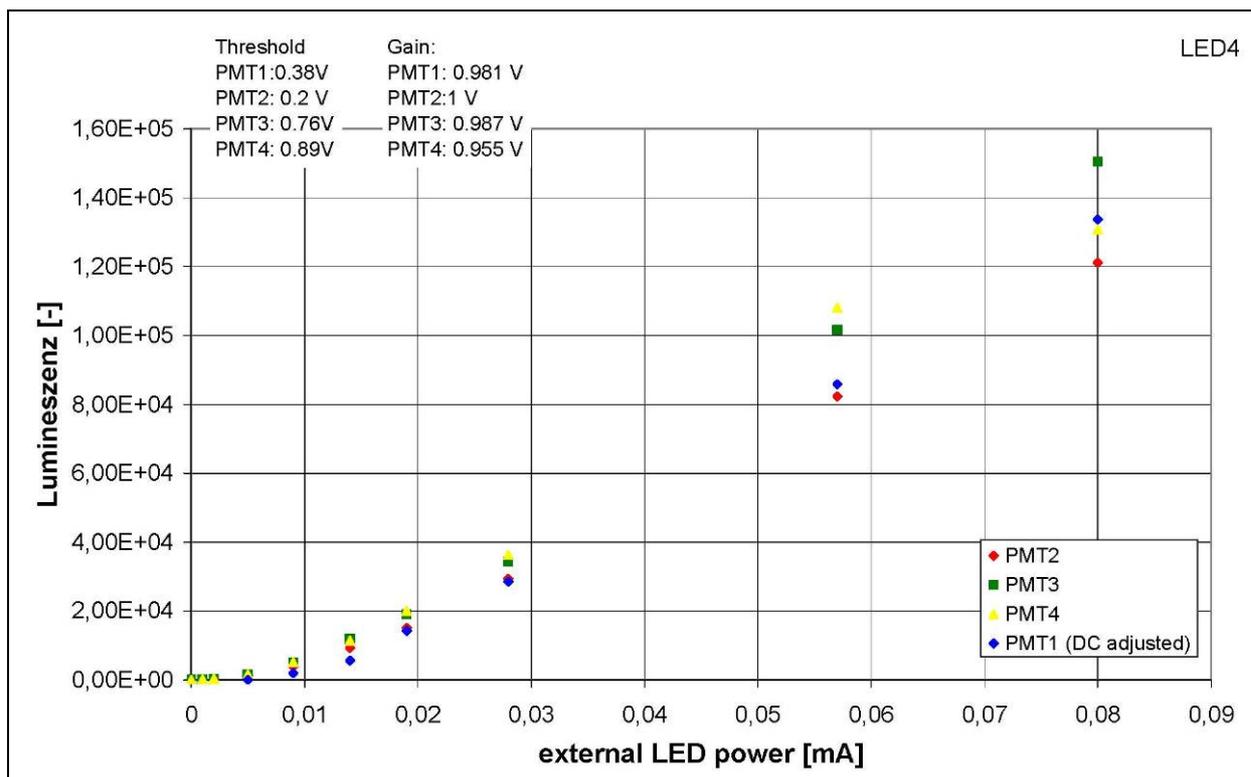
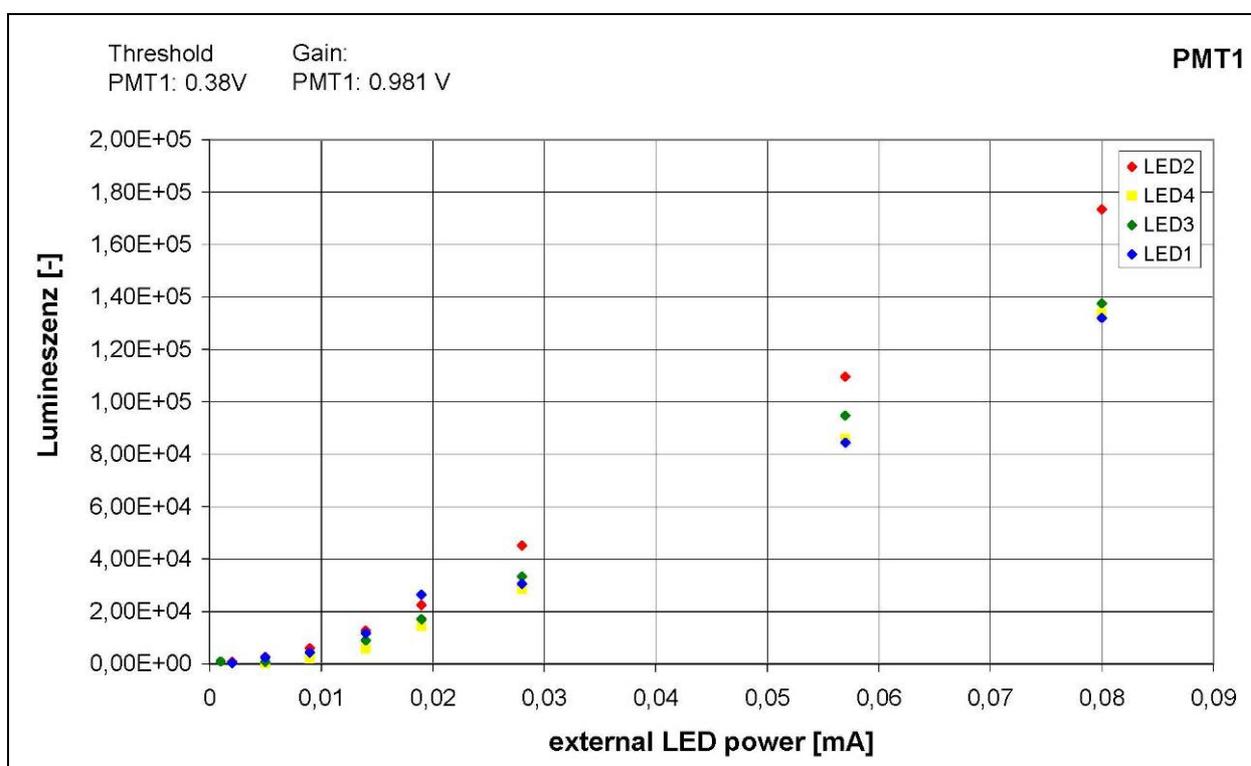


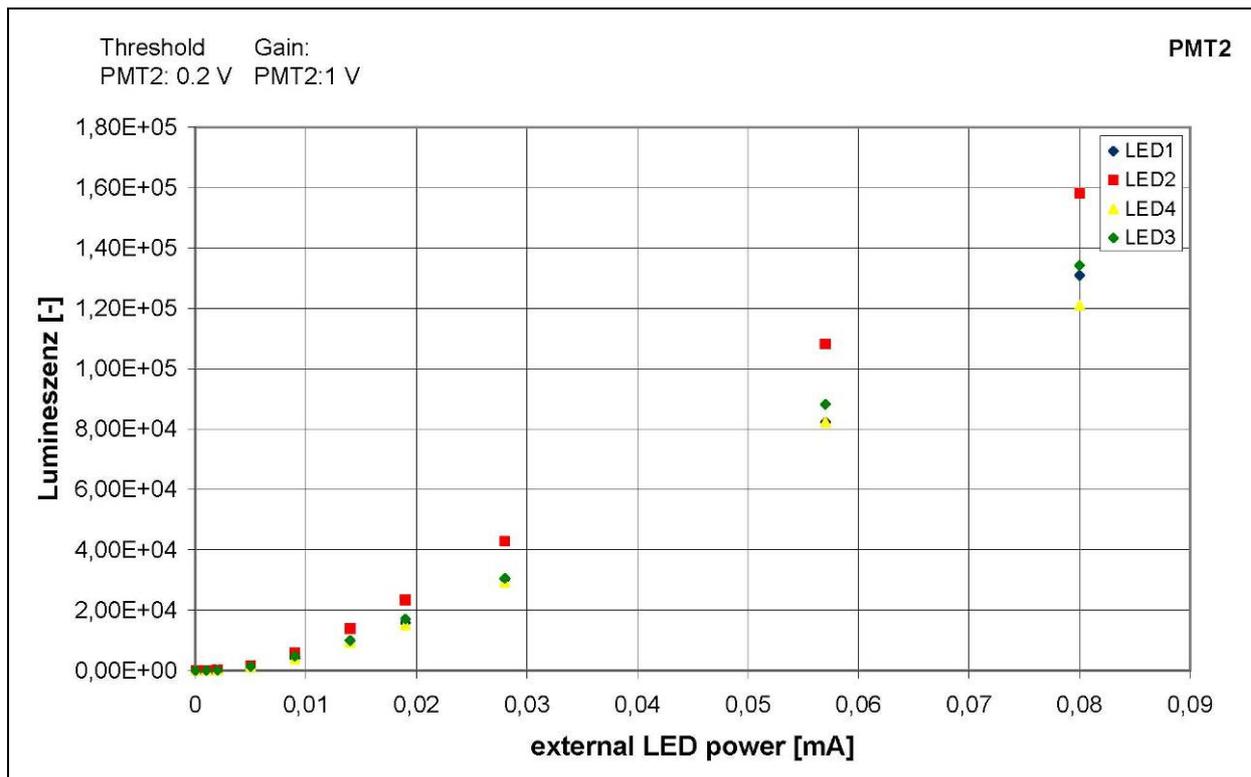
Abb. 103: Vergleich der Signalstärke von PMT 1-4 an LED 3. Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht



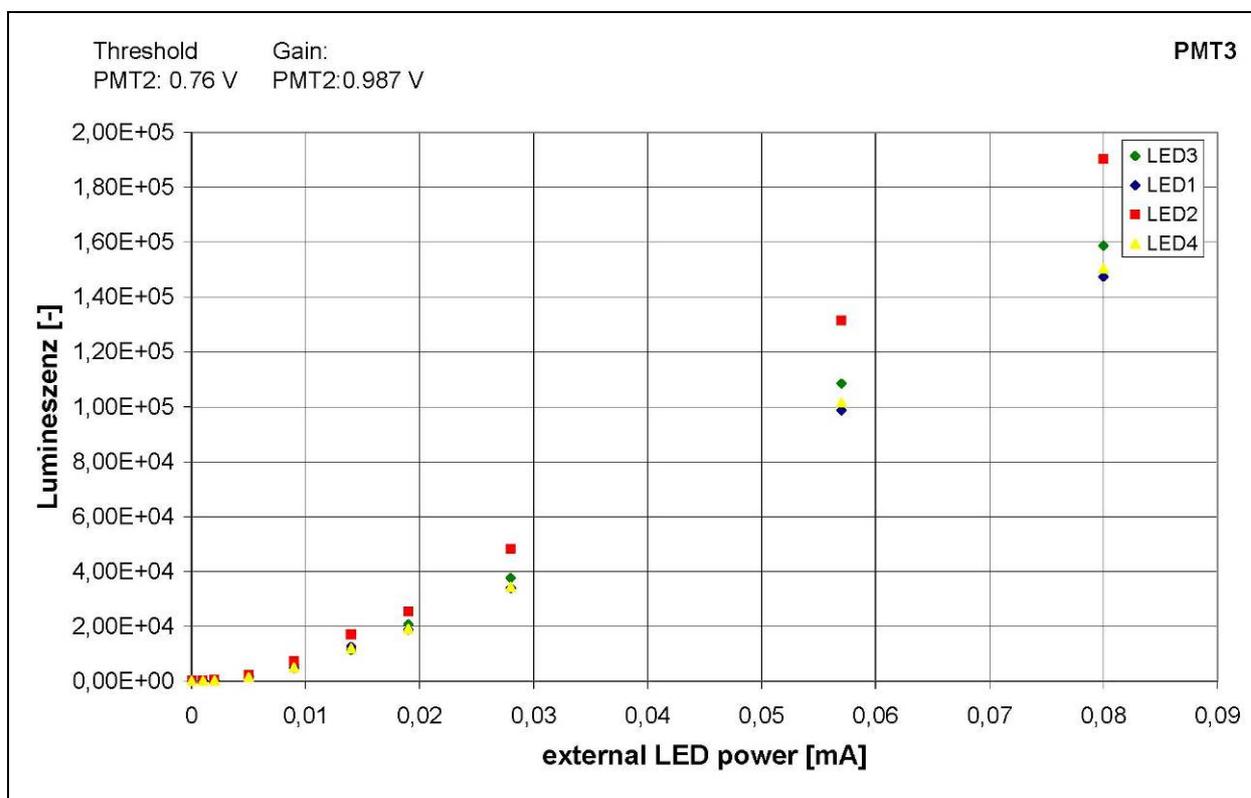
**Abb. 104: Vergleich der Signalstärke von PMT 1-4 an LED 4.** Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht



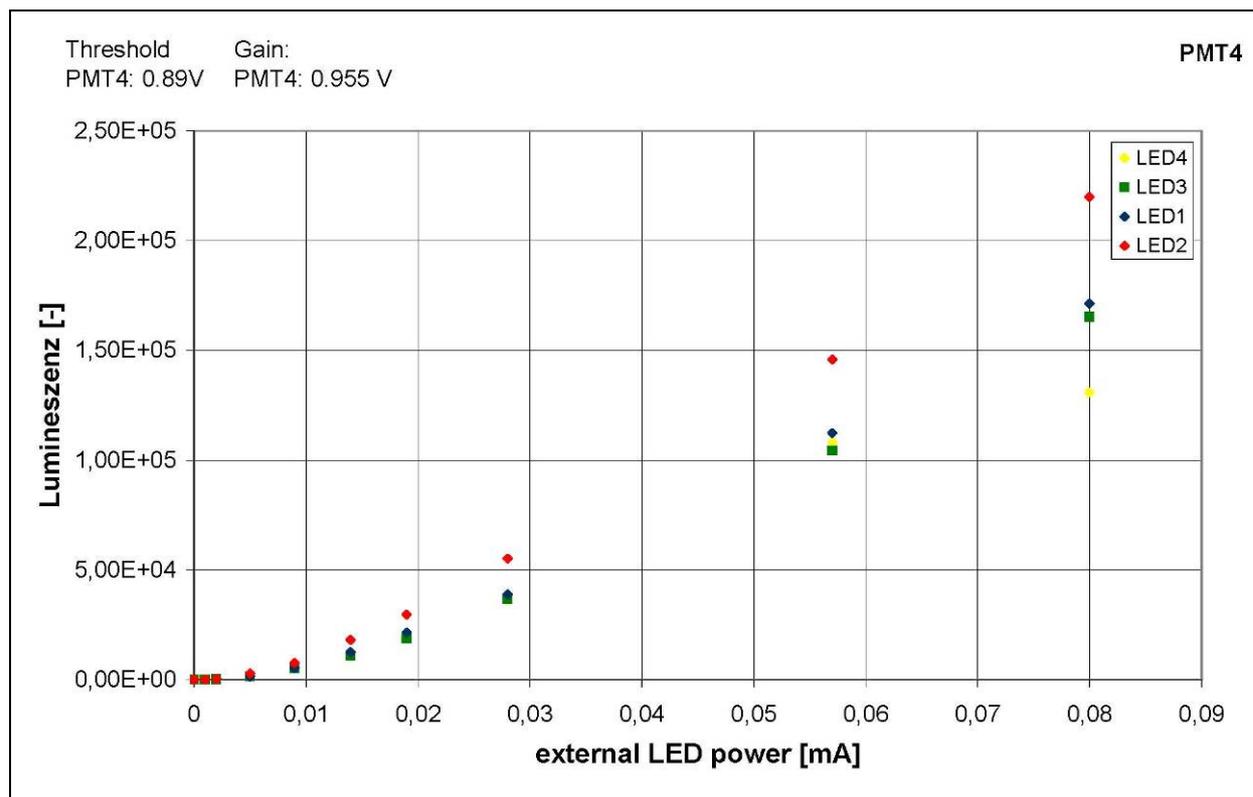
**Abb. 105: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 1.** Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht



**Abb. 106: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 2.** Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht



**Abb. 107: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 3.** Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht



**Abb. 108: Vergleich der Signalstärke von LED 1-4 an PMT 4.** Die Signalstärke der LEDs wurde dabei stufenweise erhöht

**Statistik**

**Tabelle 25: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383.** Aufgelistet sind normalisierte Ergebnisse der Radikalbildung (PMT Messung) bei Phagozytose-vermitteltem sowie bei stressbedingtem oxidative Burst. Alle Werte sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet

NR 8383 c=7x10exp5		ox. Burst Luminol		
		Fläche	Maximum	Zeit bis Maximum
Kontrolle	MW	8293244733	4929150	1460,75
	±SE	935032480	77803	309,71
	n	8	8	8
60 UpM	MW	2018358313	923671	1150,20
	±SE	574629233	204481	99,42
	n	5	5	5
30 UpM	MW	688282581	397974	2699,60
	±SE	139745127	61892	466,17
	n	5	5	5
2 UpM	MW	956587519	534807	2263,80
	±SE	230447434	176393	527,38
	n	5	5	5

**Tabelle 26: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383.** Aufgelistet sind normalisierte Ergebnisse der Radikalbildung (PMT Messung) bei Phagozytose-vermitteltem sowie bei stressbedingtem oxidative Burst. Messung über 120 min Alle Werte sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet

NR 8383 c=7x10exp5		ox. Burst 2 h Messung Luminol		
		Fläche	Maximum	Zeit bis Maximum
Kontrolle lang	MW	9498230063	4897197	1306
	±SE	2135303690	99877	269
	n	3	3	3
60 UpM lang	MW	2158985447	834209	1179,25
	±SE	194688329	48920	87
	n	4	4	4

**Tabelle 27: Einfluss von Klinorotation, verschiedene Profile und Zentrifugation (1.8 g) auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383.** Aufgelistet sind normalisierte Ergebnisse der Radikalbildung (PMT Messung) bei Phagozytose-vermitteltem sowie bei stressbedingtem oxidative Burst. Alle Werte sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet

NR 8383 c=7x10exp5		ox. Burst Luminol		
		Fläche	Maximum	Zeit bis Maximum
Kontrolle	MW	8750669848	4946100	1462
	±SE	1151580523	101211	255
	n	15	15	15
60UpMstop	MW	3784575841	2476726	2377
	±SE	389686291	411176	188
	n	5	5	5
stop60UpM	MW	9807343407	5211433	1382
	±SE	492287332	419108	121
	n	5	5	5
PF profil	MW	9241240447	4826909	1413
	±SE	935625878	518891	53
	n	5	5	5
Zentrifuge	MW	18867748089	11732458	2338
	±SE	2654166856	442477	252
	n	5	5	5

**Tabelle 28: Einfluss von Klinorotation auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383.** Aufgelistet sind normalisierte Ergebnisse der Radikalbildung (Absorption bei 630 nm) bei Phagozytose-vermitteltem sowie bei stressbedingtem oxidative Burst. Alle Werte sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR 8383		Ox. Burst			
c=1x10exp6		NBT_Zymosan			
Rotation[60UpM]		Absorption 630 nm			
15 [min]		0g + Zym	0g - Zym	1g + Zym	1g - Zym
	MW	0,36	0,5	0,51	0,33
	±SE	0,12	0,21	0,14	0,25
	n	5	4	5	4
30 [min]		0g + Zym	0g - Zym	1g + Zym	1g - Zym
	MW	0,83	0,7	1,08	0,54
	±SE	0,26	0,45	0,41	0,14
	n	5	5	5	5
60 [min]		0g + Zym	0g - Zym	1g + Zym	1g - Zym
	MW	0,67	0,54	1,2	1,06
	±SE	0,27	0,32	0,43	0,22
	n	4	4	54	
120 [min]		0g + Zym	0g - Zym	1g + Zym	1g - Zym
	MW	0,2	0,13	0,38	0,26
	±SE	0,04	0,07	0,26	0,07
	n	5	5	5	3

**Tabelle 29: Einfluss von veränderter Schwerkraft auf die Phagozytose der Zelllinie NR8383.** Aufgelistet sind normalisierte Ergebnisse der Phagozytoserate (RFU). Alle Werte sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet

NR 8383		Phagozytose FITC_Zymosan		
c=1x10exp6		RFU (485/530)		
		1g	60 UpM	hg (1,8g)
	MW	103,64	73,2	121,7
	±SE	67,12	45,22	79,2
	n	11	10	10

Kolmogorov Smirov Test auf Normalverteilung:

**Tabelle 30: Kolmogorov Smirnov Anpassungstest Test** auf Normalverteilung der Rohdaten der einzelnen Messreihen, oxidativen Burst Messungen im PMT Klinostaten

**KS test ox. Burst (PMT)**

	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Area_1g	15	0,87
Area_Stop60UpM	5	0,95
Area_60UpMStop	5	1
Area_PFProfil	5	1
Area_Zentrifuge	5	0,98
Max_1g	15	0,86
Max_Stop60UpM	5	0,99
Max_60UpMStop	5	0,99
Max_PFProfil	5	0,37
Max_Zentrifuge	5	0,81
Zeit_1g	15	0,91
Zeit_Stop60UpM	5	1
Zeit_60UpMStop	5	1
Zeit_PFProfil	5	0,68
Zeit_Zentrifuge	5	0,97

	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Area 1g	8	0,99
Area 2 UpM	5	0,96
Area 30 UpM	5	0,58
Area 60 UpM	5	0,5
Area 1g long	3	0,81
Area 60UpM long	4	0,86
Max_1g	8	0,72
Max_2 UpM	5	0,99
Max_30 UpM	5	0,51
Max_60 UpM	5	0,55
Zeit_1g	8	0,96
Zeit_2 UpM	5	0,91
Zeit_30 UpM	5	0,98
Zeit_60 UpM	5	1

**Tabelle 31: Kolmogorov Smirnov Anpassungstest Test** auf Normalverteilung der Rohdaten der einzelnen Messreihen, NBT Messungen

**KS Test  
NBT**

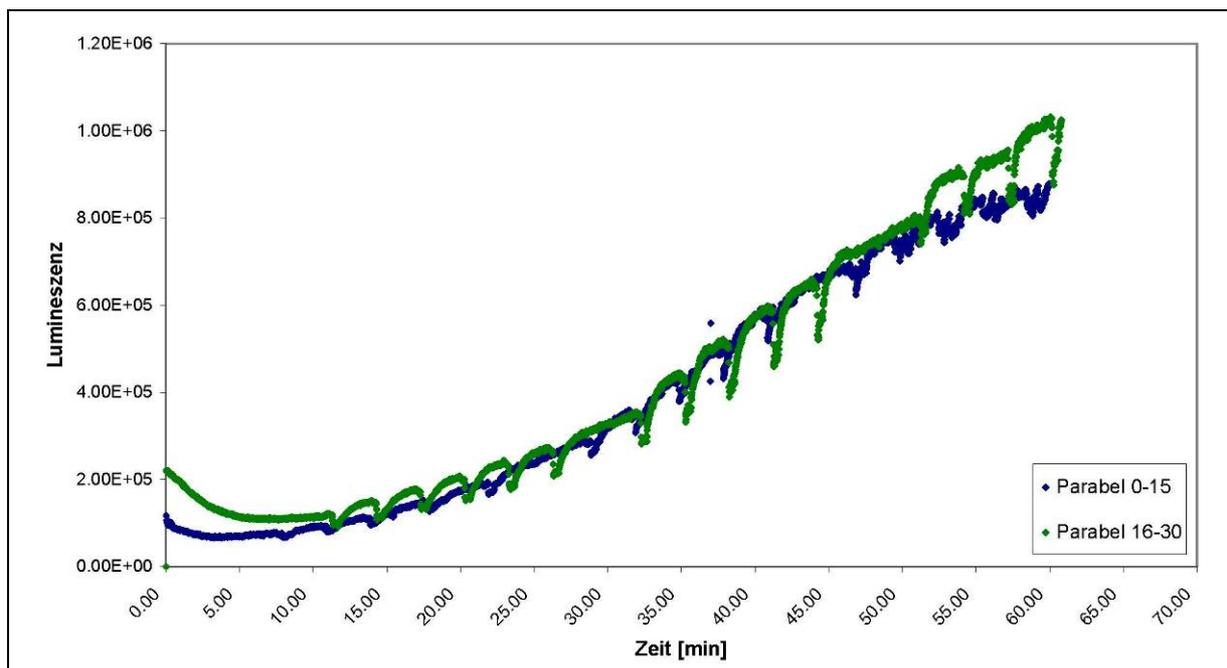
		n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
15	1g + Zym	5	0,36
	1g - Zym	4	0,99
30	1g + Zym	5	0,99
	1g - Zym	5	0,99
60	1g + Zym	5	0,66
	1g - Zym	4	0,94
120	1g + Zym	5	0,74
	0g - Zym	3	0,94
15	1g + Zym	5	0,98
	1g - Zym	4	0,94
30	1g + Zym	5	1
	1g - Zym	5	0,99
60	1g + Zym	4	0,93
	1g - Zym	4	0,9
120	1g + Zym	5	1
	0g - Zym	5	0,96

**Tabelle 32: Kolmogorov Smirnov Anpassungstest Test** auf Normalverteilung der Rohdaten der einzelnen Messreihen, Phagozytose Messungen

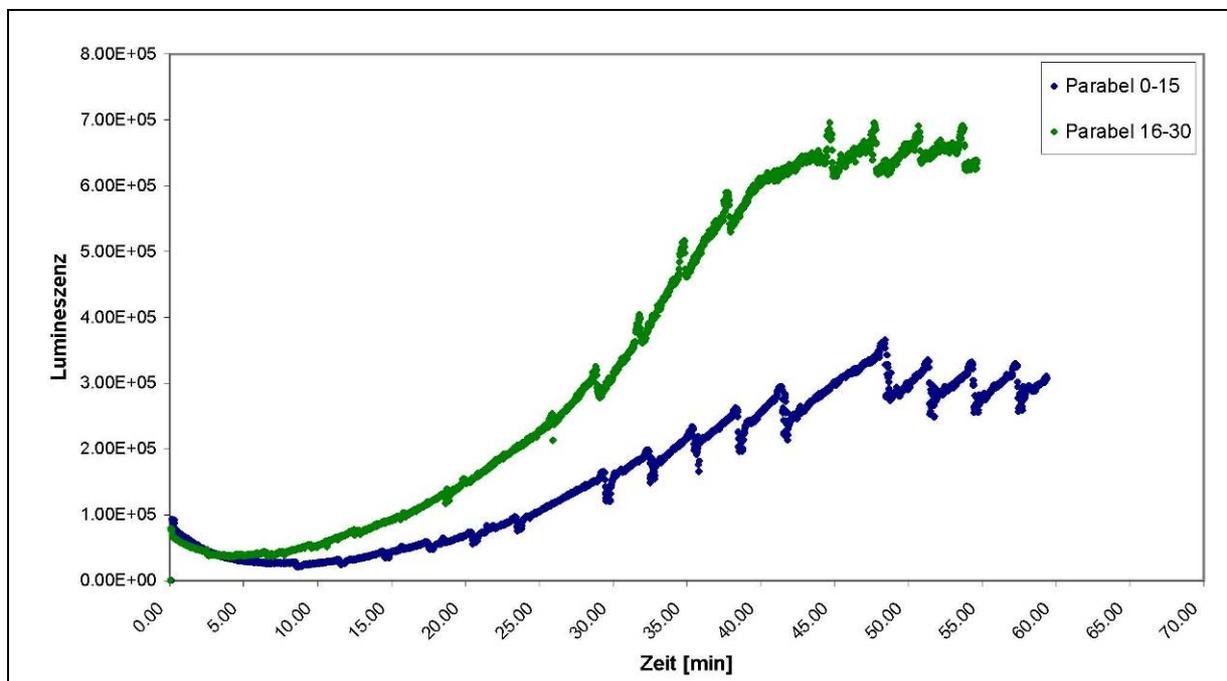
**KS Test PI  
Index**

	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
1g_1	5	0,88
0g_1	4	0,95
hg_1	4	0,99
1g_2	6	1
0g_2	6	0,69
hg_2	6	0,89

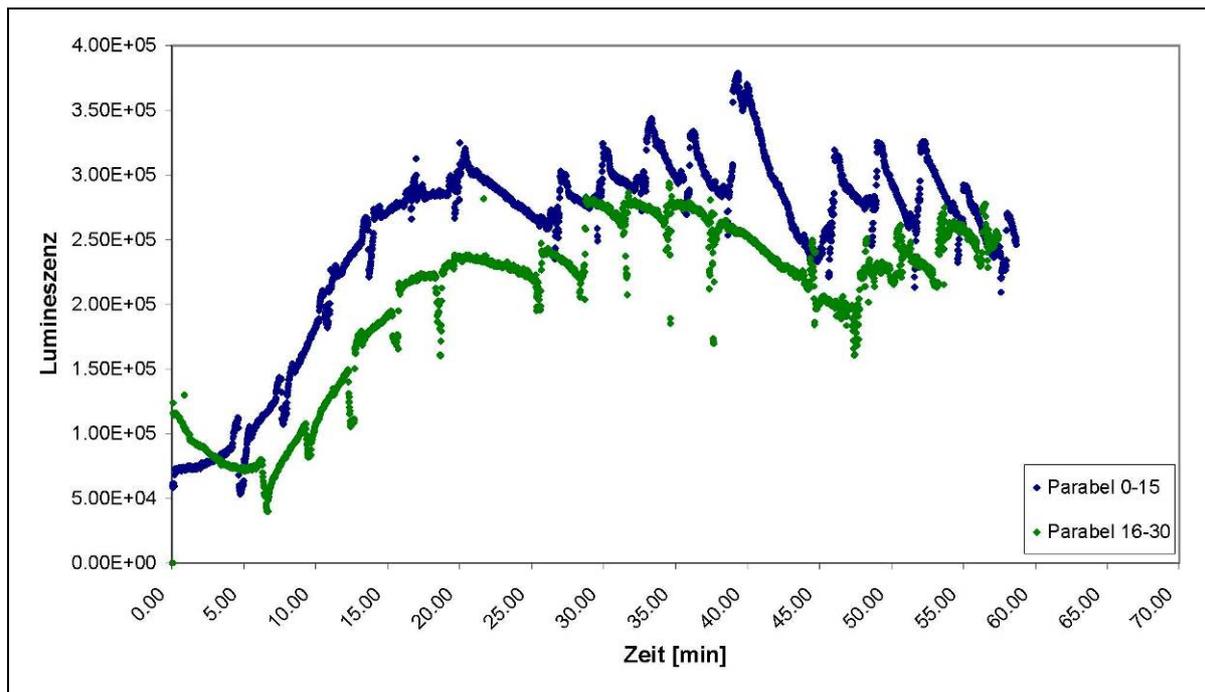
## Parabelflug Graphen



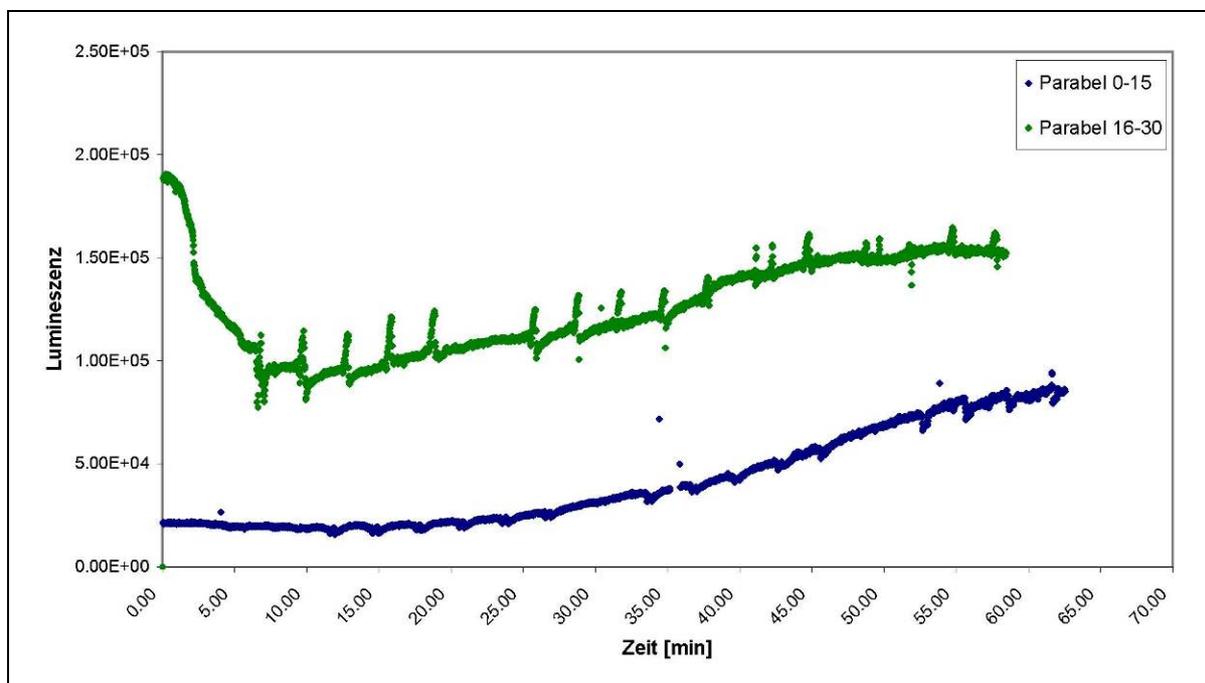
**Abb. 109: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 10.02.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16**



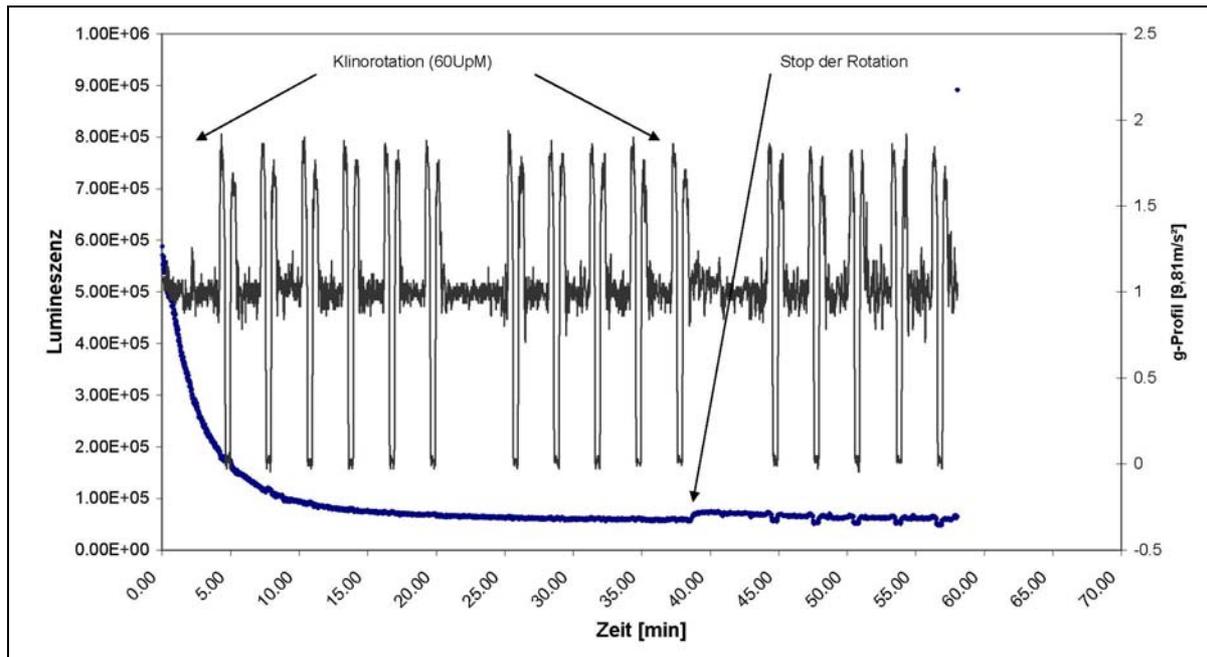
**Abb. 110: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD2, 11.02.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16**



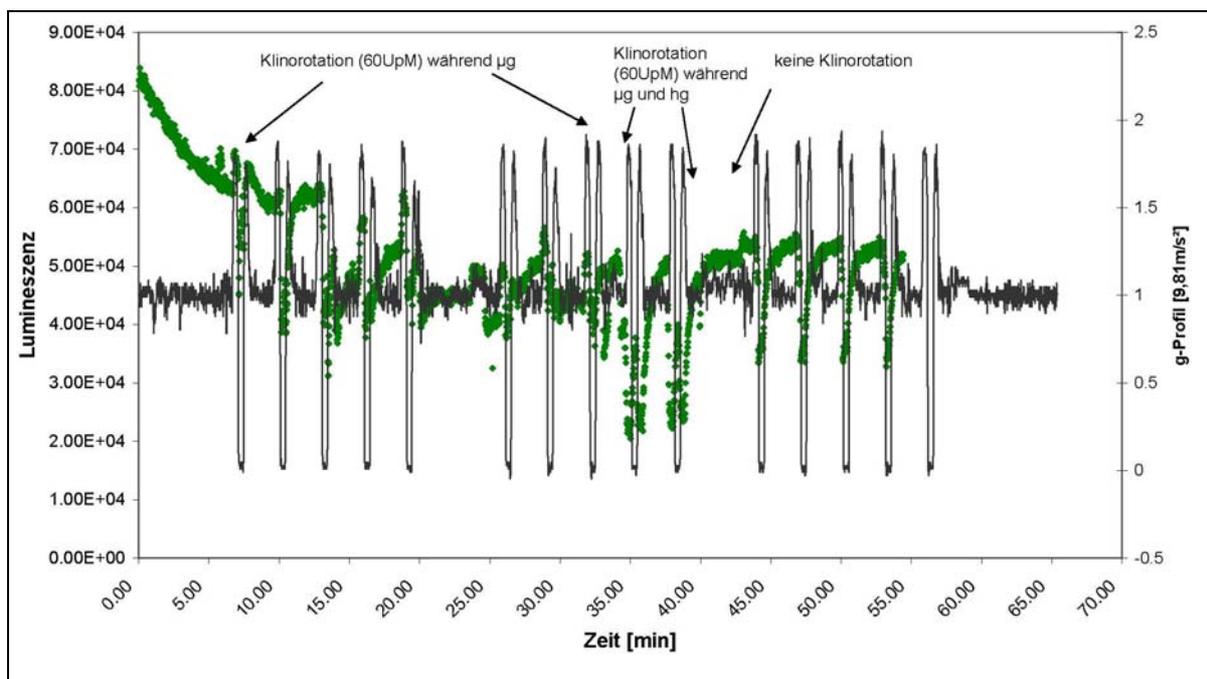
**Abb. 111: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 02.11.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16**



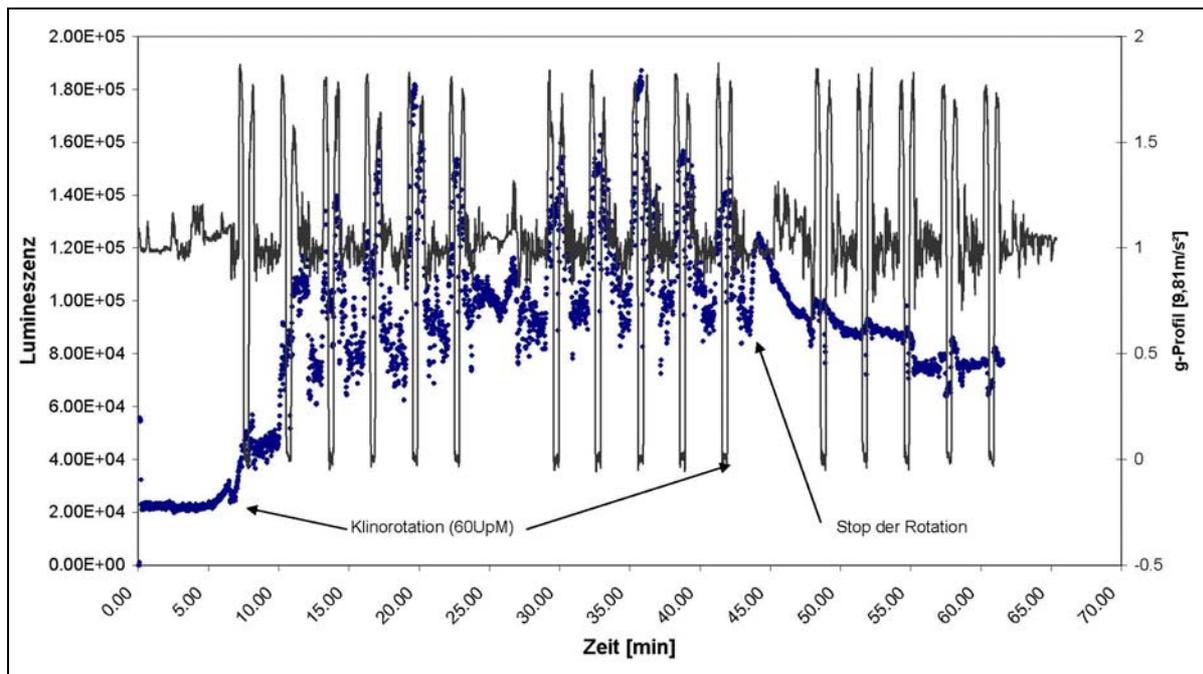
**Abb. 112: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug, FD1, 03.11.2009, zwei unabhängige Messungen. blau: aktiviert vor Parabel 0, grün: aktiviert vor Parabel 16**



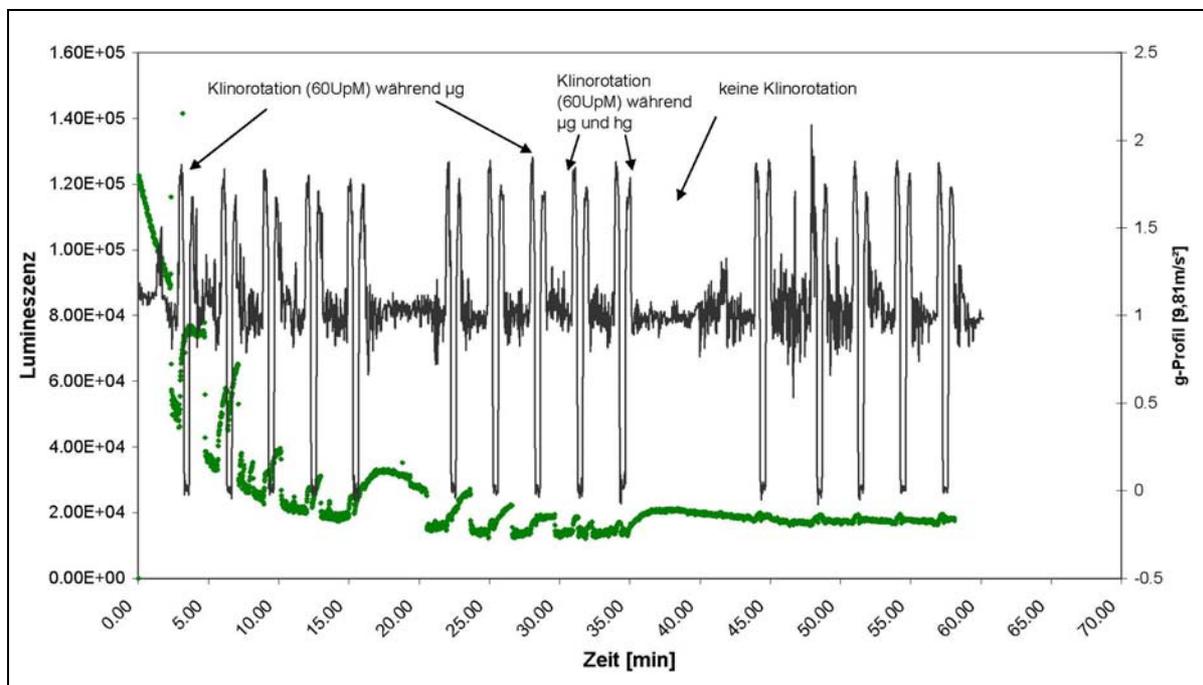
**Abb. 113: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem g-Profil (grau). FD3, 12.02.2009 Parabel 0-15. Klinorotiert mit 60 UpM bis Parabel 10. Parabel 11-15 ohne Rotation**



**Abb. 114: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem g-Profil (grau). FD3, 12.02.2009 Parabel 16-30. Klinorotiert mit 60 UpM in den 0 g Phasen bis zur 8. Parabel. Parabel 9-10 klinorotiert in hg und µg Phasen. Parabel 11-15 ohne Rotation**



**Abb. 115: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem g-Profil (grau). FD3, 04.11.2009 Parabel 0-15. Klinorotiert mit 60 UpM bis Parabel 10. Parabel 11-15 ohne Rotation**



**Abb. 116: Einfluss eines Parabelfluges auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383. Lumineszenzmessung durch die Oxidation von Luminol. Aktivierte Zellen im Parabelflug hinterlegt mit dem g-Profil (grau). FD3, 04.11.2009 Parabel 16-30. Klinorotiert mit 60 UpM in den 0g Phasen bis zur 8. Parabel. Parabel 9-10 klinorotiert in hg und µg Phasen. Parabel 11-15 ohne Rotation**

## Eigene Veröffentlichungen und Posterbeiträge

### Paper

Hemmingsson T., Horn A. and Linnarsson D.

**Respiratory Physiology & Neurobiology**

Measuring Exhaled Nitric Oxide at High Altitude, 167(3): 292-8. Epub Jun 11 2009

Horn A., Ullrich O., Huber K., Hemmersbach R.

**Microgravity Science and Technology**

PMT (Photomultiplier) Clinostat, pp. 1-5-5, online first: 15 Sep 2010

### Präsentationen

Design and testing of innovative hardware for biological experiments in space

**2nd Sino-German Symposium on Space Life Sciences**. Beijing, China 13. –18. 10. 2008

*Horn A., Huber K., Hauslage J., Franz M., Kübler U., Ullrich O., Hemmersbach R.*

Bodenkontrollen und Flugvorbereitung des ISS-Experimentes TRIPLE LUX A. **Erlanger Gravimeeting** 2008, Erlangen, 27.-28.11.2008

*Horn A., Huber K., Kübler U., Ullrich O., Hemmersbach R.*

Kinetic measurements of immune cell graviresponses on a clinostat (TRIPLE LUX). **17<sup>th</sup> IAA Humans in Space Symposium, Moscow**, Russia, 07.-11.06.2009, Book of Abstracts, p. 53

*Horn A., Huber K., Kübler U., Ullrich O., Hemmersbach R.*

Triple Lux A: Ground controls and preparation of the Biolab experiment. **ELGRA Biennial Symposium and General Assembly „In the Footsteps of Columbus“**, Bonn, Germany, 01.-04.09.2009, ELGRA News, Vol.26, 2009, p. 157

*Horn A., Huber K., Kübler U., Hemmersbach R.*

Investigation of molecular mechanisms and functions of immune cells in microgravity. **ESA Parabolic Flight Symposium**, “25 Years of ESA Parabolic Flights and 20 Years of Parabolic Flights in Europe”, ESTEC, Noordwijk, The Netherlands, 19.-20.11.2009

*Horn A., Ullrich O.*

TRIPLE LUX A - Bodenkontrollen: Klinorotation als Simulationsmethode für µg-Experimente? **Erlanger Gravimeeting** 2009, Erlangen, 26.-27.11.2009

*Horn A., Huber K., Kübler U., Ullrich O., Hemmersbach R.*

### Poster

Online analysis of graviresponses of immune cells (phagocytes) by a 2D clinostat microscope (TRIPLE LUX). **ESA life Science Symposium**, Angers. 23-26 Juni 2008

*Horn A., Huber K., Hauslage J., Franz M., Kübler U., Ullrich O., Hemmersbach R.*

FENO with NIOX MINO at extreme altitude. **American Society meeting**, Toronto, 16 -21 May 2008

*Hemmingsson T., Horn A., Linnarsson D.*

## Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Mein allerherzlichster Dank gilt **PD. Dr. Ruth Hemmersbach** für die fachliche Hilfestellung, die große Unterstützung und die jederzeitige Bereitschaft zum Gespräch.

Bei **Prof. Dr. Dr. Oliver Ullrich** bedanke ich mich für die Unterstützung dieser Arbeit am Lehrstuhl für Maschinenbau der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und für die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich **Dr. Kathrin Schoppmann** danken. Dafür dass sie mir alles über Zellbiologie beigebracht hat und ich soviel Spaß dabei hatte, für die zahllosen Anregungen und Diskussionen und die endlose Geduld.

Die finanzielle Unterstützung dieses Projektes leistete das Deutsche Zentrum für Luft- und Raumfahrt (**DLR**) zusammen mit **EADS Astrium**, außerdem wird das TRIPLE LUX Projekt durch die Europäische Weltraumagentur (**ESA**) finanziert. Bei **EADS Astrium GmbH** bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Hardware, besonders bei **Markus Franz** und **Dr. Duncan Gouly** und bei **Ulrich Kübler** dafür diese Arbeit durchführen zu können.

Vielen Dank an meine Kollegen am DLR für zahllose Kaffeepausen mit Diskussionen und vielen Ideen. **Dr. Jens Hauslage** für die Unterstützung bei der Hardwarekonstruktion, **Sonja Brungs** für die NBT Versuche, **Maik Kirchgäßner** für die Hilfe bei der Parabelflugkampagne sowie **Kai Wasser** und **Silke Müller**.

**Prof. Dr. R. Gerzer** möchte ich besonders für die Möglichkeit danken, die Einrichtungen und Labore des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrtmedizin zu nutzen.

Dem **Team der SAHC** des DLR danke ich, dass sie mir trotz aller Widrigkeiten ermöglicht haben, die Versuche auf der Zentrifuge durchzuführen und mich tatkräftig dabei unterstützt haben.

Vielen vielen Dank an **Thomas**, dass er mich auch in all den stressigen Phasen ertragen und unterstützt hat und mir viele hilfreiche Anregungen aus einer unwissenschaftlichen Sichtweise geliefert hat. Und natürlich herzlichen Dank an meine **Familie**, die mir dieses Studium ermöglicht hat und immer hinter mir gestanden hat.

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Geburtstag	28 Juni 1981
Geburtsort	Ansbach, Deutschland
Nationalität	Deutsch

### PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN

12/2007 – 11/ 2009      Wissenschaftliche Experimentbetreuung für EADS Astrium, FH  
**Triple Lux, Genara A, Gravi 2, Waico, Multigen,**

#### Parabelflug Kampagnen:

10 - 11/ 2009	<b>51. ESA, CoI PHOX II</b>
02/ 2009	<b>13. DLR, PHOX</b>
10/ 2008	<b>10. DLR Carbocryonix</b>

01/ 2009 – 01/ 2010      ISS Crew Ausbilder: Vorlesung in Mikrobiologie, Praktisches  
 Training in Zellbiologie

08/ 2006                  Praktikum am Karonliska Institute, Stockholm (Prof. D. Linnarsson)

### AUSBILDUNG

Daten	Seit Feb. 2008 Voraussichtliche Abgabe Dez. 2011
Qualifikationen	<b>Ph.D. (Dr. Ing)</b>
Organisation	Universität Magdeburg, in Zusammenarbeit mit DLR (Köln) and EADS Astrium

Daten	Okt. 2005 – Okt. 2007
Qualifikationen	<b>Master of Space Science (Schwedischer Master)</b> <b>Master of Technology (Deutscher Master)</b>
Organisation	Lulea University of Technology, Kiruna Julius Maximilian University, Würzburg

Daten	Okt. 2000 – Okt. 2005
Qualifikationen	<b>Diplom Biologie</b>
Organisation	Julius Maximilian Universität, Würzburg

## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

(O r t, D a t u m)

(Unterschrift)