

**Untersuchungen zur Eignung des zweidimensionalen Klinostaten und der
Random Positioning Machine zur Simulation von Mikrogravitation für
gravitaktische Protozoen**

Diplomarbeit
Zur
Erlangung des Grades eines Diplombiologen
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sascha Hoppe

aus Köln

Bonn 2013

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Referentin: PD Dr. R. Hemmersbach

Koreferent: Prof. Dr. W. Alt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	5
1.1	Effekt der Schwerkraft auf die belebte Umwelt	6
1.2	Simulation von Schwerelosigkeit.....	11
1.3	Klinostat	11
1.4	RPM	12
1.5	Ziele der Arbeit.....	13
2.	Material und Methoden.....	14
2.1	Material	14
2.1.1	Klinostatenmikroskop.....	14
2.1.2	Random Positioning Machine	15
2.1.3	Chemikalien	15
2.1.4	Verbrauchsmaterial	16
2.1.5	Geräte	16
2.1.6	Software.....	16
2.1.7	Versuchskammern	16
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Kultivierung von <i>Paramecium biaurelia</i> und <i>Euglena gracilis</i>	17
2.2.2	Glasbeads	19
2.2.3	Zellimmobilisierung	19
2.2.4	Versuchsbedingungen	19
2.3	Versuchsdurchführung	21
2.4	Auswertungsverfahren mittels computergestützter Bildverarbeitung.....	21
2.5	Statistik der erfassten Daten.....	25
2.6	Signifikanztest.....	25
2.7	Berechnung der Gravikinese (nach Machemer 1999).....	26
3.	Ergebnisse	27

3.1 Glasbeads zur Analyse der vorherrschenden Beschleunigungen.....	27
3.2 Sedimentationgeschwindigkeiten von <i>Paramecium</i> und <i>Euglena</i>	28
3.3 Erhebung der 1g Referenzwerte von <i>Paramecium</i> sowie <i>Euglena</i>.....	29
3.4 2D-Modus: Klinostat vs. RPM getestet mit <i>Paramecium</i>.....	32
3.5 2D-Modus: Klinostat vs. RPM mit <i>Euglena</i> als getesteten Organismus	36
3.6 3D-Modus der RPM	41
3.7 Real Random Mode mit Random Direction und Random Interval	46
4. Diskussion	50
4.1 Glasbeads zeigen die vorherrschenden Beschleunigungen.....	51
4.2 Wahl der Versuchsparameter – 1xg Referenzexperimente	51
4.3 Verhalten im 2D Klinostatenmodus.....	54
4.4 Verhalten im 3D Klinostatenmodus.....	55
4.5 Verhalten im Real Random Modus mit Random Interval und Random Direction	
55	
4.6 Fazit der Untersuchungen.....	56
5. Zusammenfassung:	58
6 Literaturverzeichnis	60
7 Anhang:.....	64
Danksagung.....	70

Abkürzungsverzeichnis

ca.	Circa
Ca^{2+}	Calciumionen
CCD	Charge-coupled Device
cm	Zentimeter
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
et al.	Et alia (und andere)
fps	Frames per second (Bilder pro Sekunde)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²
Ghz	Gigahertz
GB	Gigabyte
ISS	International Space Station
km	Kilometer
l	Liter
LED	Licht-emittierende Diode
M	Mittelwert
m	Meter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
PAL	Phase-Alternation-Line-Verfahren
RPM	Random Positioning Machine

rpm	Revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
TEXUS	Technologische Experimente unter Schwerelosigkeit (Höhenforschungsrakete)
USB	Universal Serial Bus
VGA	Video Graphics Array
z.B.	zum Beispiel
2D	zwei dimensional x-, y-Achse
3D	drei dimensional x-, y-, z-Achse
μm	Mikrometer
$\mu\text{m}/\text{s}$	Mikrometer pro Sekunde
$^\circ$	Grad
$^\circ\text{C}$	Grad Celsius

1. Einleitung

Den Einfluss der Schwerkraft erleben wir jeden Tag. Wir können sie wahrnehmen und uns an ihr orientieren. Sie ist auf der Erde überall konstant und wirkt permanent auf alles, was eine Masse besitzt. Um aber die Einflüsse dieses Reizes (hier Kraft) auf die belebte Umgebung untersuchen zu können, müssen Wege zur Regulation der Kraft, welche den Reiz auslöst, gefunden werden. Der Reiz kann relativ einfach erhöht werden, indem die Gravitationskraft mit einer weiteren Kraft, der Zentrifugalkraft, überlagert wird. Zentrifugen generieren durch ihre Rotation diese Zentrifugalkraft, welche versucht, jede Masse, die sich in einer kreisförmigen Bewegung befindet, aus ihrer Umlaufbahn zu werfen. Dies resultiert in einer Beschleunigung der Masse vom Drehzentrum weg und hat somit einen ähnlichen Effekt auf einen Körper wie die Schwerkraft selbst. Aus der o.a. Überlagerung von Gravitation und Zentrifugalkraft resultiert eine Erhöhung der auf das untersuchte Objekt wirkenden Kräfte. Dieser Zustand wird als Hypergravitation bezeichnet. Untersuchungen, die eine reduzierte Schwerkraft voraussetzen, sind ebenfalls möglich, jedoch wesentlich aufwändiger. Höhenforschungsraketen, Freifalltürme, Satelliten oder auch die Raumstation ISS bieten eine Umgebung, in der die Wirkung der Schwerkraft auf ein Minimum reduziert wird. Versuche auf diesen Plattformen sind kostenintensiv und brauchen eine lange Vorbereitungszeit. Wissenschaftler und Techniker sind daher bestrebt, Geräte zur Simulation von Schwerelosigkeit auf der Erde zu entwickeln (Herranz et al. 2013; Hemmersbach et al. 2006), um erste Hinweise zu bekommen, wie sich ein Organismus in realer Schwerelosigkeit verhalten wird.

Gravitation ist eine fundamentale Kraft, die seit Milliarden von Jahren auf unserem Planeten unverändert wirkt und somit eine für die Evolution des Lebens bedeutende konstante Umweltbedingung ist.

Nach Isaac Newton ist die Gravitation eine Kraft F , definiert als ein Vektor mit Betrag und Richtung, der auf jeden Punkt des Universums zwischen zwei Massen m_1 und m_2 mit dem Abstand r wirkt.

$$F = G \frac{m_1 m_2}{r^2}$$

Dabei ist G die universelle Gravitationskonstante mit dem Wert $6,67 \times 10^{-11} \frac{\text{m}^3}{\text{kg} \times \text{s}^2}$. Die Gravitation wird durch die Massen der beiden Objekte sowie deren Distanz zueinander beeinflusst. Sie wirkt proportional als das Produkt der Massen und umgekehrt proportional als

das Quadrat ihrer Distanz zueinander (Holton 2003). Die im Verhältnis größte Masse mit der geringsten Distanz zu allem, was auf der Erde existiert, ist unser Planet selbst. Gravitation in Bezug auf unsere Umgebung, auch Schwerkraft oder Gewichtskraft genannt, ist definiert als Masse des Objekts multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung und gibt so das Gewicht eines Objekts an. Das Resultat der Gewichtskraft ist die Beschleunigung eines Objekts, die Gravitationsbeschleunigung $a = G \frac{M}{d^2}$, welche für die Erde $9,81 \text{ m/s}^2$ beträgt und als 1 xg definiert ist.

Da sich ein Körper immer in Reichweite eines anderen Körpers befindet, kann nach Newtons Gravitationsgesetz kein Körper im Universum wirklich schwerelos, also befreit von jeglicher auf ihn wirkenden Kraft sein, sondern sich nur diesem Punkt annähern. Richtigerweise wird daher von Mikrogravitation gesprochen, einen Wert von $10^{-6} \times g$, der allerdings erst in ~ 1000 Erdradien oder $6,37 \times 10^6 \text{ km}$ Entfernung zur Erde erreicht ist. In der Literatur wird der Begriff Mikrogravitation allgemein für Gravitationsbedingungen $< 1 \text{ xg}$ benutzt. Um den Zustand der Mikrogravitation zu erreichen, muss eine zusätzliche Kraft vorhanden sein, denn nach Einsteins Äquivalenzprinzip können sich Kräfte gegenseitig aufheben. Eine Kraft F ist definiert als Masse m mal Beschleunigung a ($F = m \times a$). Nach Newtons zweitem Satz der Axiome, dem Aktionsprinzip, wird der Umkehrschluss beschrieben. Wenn eine Kraft auf einen Körper mit einer Masse wirkt, beschleunigt sie ihn mit $a = \frac{F}{m}$. Also gibt es zwei Zustände, zwischen denen sich ein Objekt befinden kann: Bewegungs- und Gewichtslosigkeit. Ist ein Körper nicht von einer Beschleunigung betroffen, wirkt die Gewichtskraft vollständig. Ist hingegen eine Beschleunigung gegeben, die der Erdbeschleunigung entgegengesetzt ist und ihr vom Betrag entspricht, ist er gewichtslos. So kann z.B. ein freier Fall oder die ISS auf ihrer Umlaufbahn eine Mikrogravitationsumgebung bieten. Da aber Versuche in dieser Umgebung entweder zeitlich sehr begrenzt oder sehr kostenintensiv sind, wurden Methoden entwickelt, um den Reiz der Schwerkraft auf einen Organismus zu minimieren mit dem Ziel, „simulierte Mikrogravitation“ zu erreichen.

1.1 Effekt der Schwerkraft auf die belebte Umwelt

Organismen können auf vielfältige Weise die Reize ihrer Umwelt wahrnehmen. Gravitation als eine gerichtete, konstante Kraft ist der phylogenetisch älteste Bezugspunkt für einen Organismus, sich im Raum zu orientieren. Welche Einflüsse Gravitation auf Organismen ausübt, interessiert Biologen schon seit langer Zeit. Gegenstand der Forschung war zunächst der einfach zu beobachtende Gravitropismus von Pflanzen, d.h. ihre Fähigkeit, ihr Wachstum in Bezug zum Gravitationsvektor auszurichten (als Review siehe Hemmersbach et al. 1999).

Weiterhin wurde bereits um 1900 die Gravitaxis von Protozoen beschrieben (Jennings 1962; Machemer und Bräucker 1992). Allgemein wird eine freie, gerichtete Bewegung eines Organismus entlang eines Umweltgradienten als Taxis bezeichnet. Ist diese Bewegung zu einer Reizquelle hin orientiert, wird sie als positive Taxis bezeichnet, eine von der Reizquelle weg gerichtete Bewegung als negative Taxis. Folglich ist eine negative Gravitaxis eine Bewegung vom Gravitationsreiz weg. Die negative Gravitaxis, früher als Geotaxis bezeichnet, wurde für *Paramecium* bereits von Verworn (1889) und Lyon (1905) entdeckt. Seitdem wurde diese Tatsache oft bestätigt (als Review siehe Machemer und Bräucker 1992, Häder et al. 2005a). Kontrovers wurden die zugrundeliegenden Mechanismen diskutiert, wobei entweder aktive, physiologische oder passive, physikalische Mechanismen postuliert wurden. Die Evolution führte bei manchen Protozoen zur Bildung von statocystenähnlichen Strukturen, wie den Müllersche Organellen von *Loxodes*, die für die Wahrnehmung der Gravitation dieses Einzellers verantwortlich sind (Fenchel und Finlay 1986; Hemmersbach und Braun 2007). Aber auch Protozoen ohne Müllersche Organellen zeigen Gravitaxis. Dazu gehören die beiden in dieser Arbeit untersuchten Protozoen, das heterotrophe *Paramecium* sowie die auch autotroph lebende *Euglena* (als Review siehe Häder et al. 2005a).

Protozoen wie *Euglena* und *Paramecium* haben sich als Modellorganismen in der Gravitationsbiologie etabliert. Als „schwimmende sensorische Zellen“ bezeichneten Machemer und de Peyer (1977) das *Paramecium*. Gravitaktische Einzeller sind deshalb so interessant für die Gravitationsbiologie, da sich Reizaufnahme, Reizverarbeitung und Reizreaktion innerhalb einer Zelle abspielen. Protozoen können die Gravitation auch zur Regulation ihrer Schwimmgeschwindigkeit nutzen. Diese sogenannte Gravikinese beschreibt, dass die Einzeller nach unten langsamer schwimmen als beim Aufwärtsschwimmen und so zumindest einen Teil ihrer Sedimentation kompensieren (Machemer et al. 1991; Machemer und Bräucker 1992; Oya et al. 1992).

Der in vorliegender Arbeit verwendete eukaryotische Organismus *Paramecium biaurelia* ist ein Ciliat der Ordnung der Holotricha. *Paramecium* ist ein freischwimmender einzelliger Organismus mit einer Länge von 130-200 μm . *Paramecium* schwimmt vorwärts in einer links gedrehten Helix, mit einer durchschnittlichen Schwimmgeschwindigkeit je nach Art von etwa 500 $\mu\text{m}/\text{s}$ (Hemmersbach-Krause et al. 1993 b). Eine Koordination des Cilienschlags ist für diese Bewegung verantwortlich. Das Schwimmverhalten resultiert aus zwei Mechanismen: Die Richtung des Kraftschlags der Cilie reguliert hierbei die Schwimmrichtung, aus der

gegebenen Frequenz des Kraftschlags resultiert die Schwimmgeschwindigkeit (Machemer und Bräucker 1992)

Verschiedene Ursachen werden für das gravitaktische Verhalten von *Paramecium* diskutiert. Zum einen, dass die Gravitaxis von *Paramecium* auf der Grundlage des Bojeneffekts (Fukui und Asai 1985) beruht. Dies ist ein rein physikalisches Phänomen, welches unter anderem bei jungen *Paramecium* Kulturen zu finden ist. Durch eine höhere Dichte des posterioren Zellpolys von *Paramecium*, etwa durch Ansammlungen von Verdauungsvakuolen (Fukui and Asai 1985), sedimentiert der Organismus schneller an diesem Ende, was zu einer Aufrichtung des Organismus führt. Das Resultat ist ein Aufstellen des Organismus in Bezug zur Reizrichtung (Mogami et al. 2001). Durch die hinzukommende Schwimmbewegung tendiert der Organismus dazu, nach oben zu schwimmen. Dieses physikalische Prinzip ist eine Grundlage zur Orientierung in Bezug zum Gravitationsvektor. Weiterhin wird ein physiologischer Mechanismus für die Gravitaxis erörtert. Da *Paramecium* keine für die Perzeption der Schwerkraft spezialisierten statocystenähnlichen Strukturen aufweist, wird angenommen, dass die Graviperzeption über mechanosensitive Ionenkanäle in der Zellmembran erfolgt (Machemer und Bräucker 1992; Häder et al. 2005a), die bipolar verteilt sind.

Für *Paramecium* wurde gezeigt, dass sich bei ihnen die mechanosensitiven Calciumkanäle in erhöhter Konzentration am anterioren Zellpol befinden, mechanosensitive Kaliumkanäle hingegen findet man vermehrt posterior (Machemer and Deitmer 1985; Krause et al. 2010). Dieses Ungleichgewicht bei der Verteilung der Ionenkanäle beeinflusst bei mechanischer Reizung der Kanäle das Membranpotential des Einzellers. Die mechanische Reizung erfolgt durch die leicht erhöhte Dichte des Zytoplasmas mit seinen Organellen im *Paramecium* von $1,054\text{g/cm}^3$ gegenüber dem umgebenden Medium mit einer Dichte von ca. 1g/cm^3 (Lebert und Häder 1996). Die erhöhte Dichte lässt das Innere der Organismen sedimentieren. Eine mechanische Reizung der nach unten gerichteten Membranregion ist die Folge. Im Fall eines nach unten schwimmenden *Parameciums* erfolgt eine Reizung der am vorderen Ende gelegenen mechanosensitiven Calciumkanäle und als Folge eine Depolarisation der Zellmembran, daraufhin eine Verminderung der Schwimmgeschwindigkeit und je nach Höhe der Depolarisation ein Stopp des Individuums bis hin zum Rückwärtsschwimmen. Die Reaktionszeit der Ionenkanäle bei extern gegebenem Stimulus liegt bei 5-10ms (Machemer 1999). Die Dauer der Depolarisation wird mit 70ms angegeben, wobei sie bei der Rückwärtsbewegung 600ms andauert. Bis zum Wiederauftreten einer normalen Cilienaktivität vergehen weitere 400ms.

Euglena gracilis gehört zu der Abteilung der Euglenophyta, Klasse Euglenophyceae. Da der untersuchte Organismus tierische sowie auch pflanzliche Charakteristika aufweist, werden seine verwandtschaftlichen Beziehungen als Komplex angesehen (Richter 2000). Zum einen hat er eine für tierische Zellen typische Cortexstruktur (Bouck und Ngo 1996) und auch der strukturelle Aufbau der Tubuline weist auf eine verwandtschaftliche Beziehung zum Tierreich hin (Levasser et al. 1994). Zum anderen sind die Organismen der Art *E. gracilis* mit Chloroplasten ausgestattet, die eine autotrophe Ernährung ermöglichen, was für eine botanische Einordnung spricht. Da die Chloroplasten von einer Dreifachmembran umgeben sind, wird davon ausgegangen, dass die Entstehung der Chloroplasten durch eine sekundäre Endosymbiose mit eukaryotischen Algen zustande gekommen ist (Endosymbiontentheorie) (Gibbs 1998). Für die phototrophe Lebensweise ist *Euglena* auf Sonnenlicht als Energiequelle angewiesen. Hierfür ist es notwendig, dass *Euglena* sich tagsüber im oberen Bereich eines Gewässers aufhält, sodass eine ausreichende Sonnenlichteinstrahlung zur Energieaufnahme gewährleistet ist. Eine positive Phototaxis konnte nachgewiesen werden (Häder et al. 2005a), wobei diese sich bei zu starker Bestrahlung in eine negative Phototaxis umwandeln kann. So wird eine Überlastung des Photosystems vermieden, die schädlich für den Organismus sein kann. Als Reaktion auf zu starke Sonnenlichteinstrahlung bewegen sich die Organismen in einen Bereich, in dem sie der optimalen Lichtintensität für die Photosynthese ausgesetzt sind. Aber auch bei in Dunkelheit gehaltenen *Euglena* Kulturen ist eine tageszeitliche Abhängigkeit der Orientierung nachgewiesen (Lebert et al. 1999). In der Nacht entfernen sich die Organismen von der Wasseroberfläche. Diese Tatsache lässt sich gut nachvollziehen, wenn man bedenkt, dass *Euglena* Zellen sich nachts teilen. Hierbei runden sich die Zellen ab und ihre Beweglichkeit lässt nach, was zur Sedimentation der Organismen führt. Zum Morgen hin bewegen sich die Organismen wieder an die Oberfläche, damit sie die Energie der ersten Sonnenstrahlen einfangen können. Aber auch eine heterotrophe Lebensweise ist für *Euglena* möglich. Hierbei nehmen die Organismen gelöste organische Stoffe über ihre Pellicula, der äußeren Abgrenzung der Zelle, auf. Diese besteht aus einer Proteinmatrix, welche intrazellulär mit Mikrotubuli assoziiert ist und somit eine Verbindung zum Cytoskelett darstellt (Storch und Welsch 2002; Leedale 1982). *Euglena* bewegt sich mit Hilfe eines einzelnen Flagellums in Form einer Schleppgeißel fort. Dieses befindet sich am vorderen Ende des Organismus und wird über ein Motorprotein angetrieben. Das Motorprotein dreht sich unter ATP-Verbrauch und erzeugt so den Vortrieb des Organismus. Hierbei wird das Flagellum vom vorderen Pol des Organismus durch die undulierende Membran, einer Membranfalte in der die Geißel verläuft, über den Körper hinweg zum hinteren Ende des

Organismus geleitet, wo es durch seine Rotation den Vortrieb erzeugt (Goldstein 1992). Bei freischwimmenden Euglenen sorgt dieser Kraftschlag bedingt durch das vom ihn erzeugte Drehmoment für eine Rotation des Organismen in entgegengesetzter Richtung zum Geißelschlag. Die hieraus resultierende Schwimmbahn des Organismus ist helikal gewunden. Die Pellicula ist aufgebaut aus Pelliculastreifen die beweglich miteinander verbunden sind. Durch die Beweglichkeit der Pellicularstreifen zueinander kann *Euglena* seine äußere Gestalt stark verändern.

Für *Euglena* ist eine negative Gravitaxis beschrieben, deren Präzision unterschiedlich ausgeprägt sein kann und u.a. vom Kulturalter abhängt (Stallwitz und Häder 1994). Ob *Euglena* eine Gravikinese besitzt wird für *Euglena* kontrovers diskutiert (Häder et al. 1997; Machemer-Röhnisch et al. 1999). Nach Lebert und Häder (1996) und Häder et al. (2005b) kann das gravitaktische Verhalten von *Euglena* nicht alleine durch den physikalisch bedingten Boyeneffekt erklärt werden (Lebert und Häder 1996), er wird als Unterstützung für einen physiologischen Mechanismus postuliert. Die Perzeption der Gravitation soll über die Sedimentation des Cytoplasmas als „schwere“ Masse erfolgen und wie bei *Paramecium* an mechanoinsensitive Kanäle gekoppelt sein. Für *Euglena* wurde beschrieben, dass sich die Calciumkanäle einseitig an der Längsseite am Vorderpol des Organismus befinden. Durch die helikale Schwimmbahn werden bei horizontal ausgerichteten Organismen die mechanoinsensitiven Ionenkanäle immer dann gereizt, wenn diese zum Schwerkraftvektor hin ausgerichtet sind, also unten liegen. Bei aufgerichteten Organismen hingegen findet keine Reizung dieser Ionenkanäle statt, wobei hierbei die Organismen ihre Orientierung beihalten (Lebert und Häder 1996). Als Nachweis für das Vorhandensein Mechano- (gravi) sensitiver Kanäle bei *Euglena* wird der Verlust der Gravitaxis nach Blockierung mit Gadolinium angesehen, da das generelle Schwimmverhalten nicht beeinflusst wurde (Lebert und Häder 1996, Lebert et al. 1997).

Das Verhalten von *Paramecium* und *Euglena* in Mikrogravitation

Ziel der Arbeit ist eine Validierung von Simulationsanlagen für Mikrogravitation mit Hilfe von gravitaktischen Protozoen. Folglich sind Vergleichsdaten über das Verhalten der eingesetzten Modellsysteme in realer Mikrogravitation notwendig. Für *Paramecium* und *Euglena* konnten solche Experimente in verschiedenen Experimentplattformen durchgeführt werden – im Fallturm, auf Parabelflügen, auf Höhenforschungsraketen und auf einer Shuttlemission. Dabei zeigten beide Organismen einen Verlust ihrer Gravitaxis und im Fall von *Paramecium* auch der Gravikinese (als Review siehe Häder et al. 2005a).

1.2 Simulation von Schwerelosigkeit

Es wurden verschiedene Plattformen für die Simulation von Mikrogravitation entwickelt; mit unterschiedlichen Überlegungen, wie die Wirkung des Gravitationsreizes ausgeschaltet werden kann. In dieser Arbeit werden das Prinzip des Klinostaten, die sogenannte Klinorotation, und das der Random Positioning Machine, eine Weiterentwicklung des Klinostatenprinzips, näher betrachtet. Bei beiden Anlagen werden die Proben rotiert, jedoch in unterschiedlichen Modi.

1.3 Klinostat

Wenn sich ein Körper im Vakuum im permanenten freien Fall befindet, ist seine Beschleunigung konstant, die Gewichtskraft ist nicht vorhanden. Fällt ein Körper in einem Medium, ist seine Geschwindigkeit nach kurzer Zeit konstant, da die erzeugte Reibung des Körpers durch die Viskosität des umgebenden Mediums den Körper bremst. Wird der Körper im Drehzentrum einer zum Gravitationsvektor senkrechten Rotationsebene platziert, wie es der Fall bei der Klinorotation ist, so verändert sich die Fallbahn des Körpers von einer Geraden hin zu einem Kreis. Das Resultat ist eine konstante zentripetale Beschleunigung (Abbildung 1). Der Radius, auf dem sich der Körper befindet, wird durch die Dichte des Körpers, seiner Masse, der Dichte des umgebenden Mediums und der Rotationsgeschwindigkeit bestimmt. Das Produkt aus Entfernung zur Drehachse (r) sowie Rotationsgeschwindigkeit (ω) ergibt die Restbeschleunigung und damit die Güte der simulierten Schwerelosigkeit. Die resultierende Beschleunigung, die auf eine Masse wirkt, berechnet sich demnach aus $a = \omega^2 * r$. Dies ergibt eine resultierende Kraft aus $F = m \times a$. Je weiter man ein Objekt also von der Rotationsachse entfernt, bzw. je höher die Rotationsgeschwindigkeit ist, umso größer werden die Zentrifugalkräfte, die den Körper aus der Kreisbahn zwingen. Da man aber bei diesen Verfahren den Reiz der Schwerkraft nicht ausschaltet, sondern nur im zeitlichen Mittel annulliert, sprechen wir von funktioneller Schwerelosigkeit oder „simulierter Mikrogravitation“ (Herranz et al., 2013; Briegleb 1992). Somit haben Klinorotation und echter freier Fall gemeinsam, dass bei einem sich in einer viskosen Masse drehender Körper und in wirklichem freien Fall die Sedimentation aufgehoben ist. Bei der Klinorotation wird der Stimulus über die Zeit gemittelt annulliert, wobei der freie Fall eine wirkliche Aufhebung der Kräfte bewirkt (Klaus 2001). Darum ist es beim Klinostatenprinzip erforderlich, die Richtung des Vektors so schnell zu ändern, dass ein Organismus diese Veränderung nicht mehr wahrnehmen kann. Die Erforschung der Auswirkung des Klinostatenprinzips auf Organismen begann mit Julius Sachs, der 1980 erste

Experimente mit Pflanzen durchführte. Er begann das Wachstum von Pflanzen unter horizontaler Klinorotation mit langsamen Geschwindigkeiten von 1-5rpm zu beobachten, die in einer Aufhebung des Gravitropismus resultierte. Diese Grundlage nutzte Briegleb (1966) zur Entwicklung des Prinzips für schnell drehende Klinostaten mit Geschwindigkeiten von 50-80rpm. Da hier die Zentrifugalkraft schon bei wesentlich geringeren Distanzen zur Geltung kommt, ist dieses Prinzip nur für wesentlich kleinere Organismen geeignet als die von Sachs verwendeten Pflanzen.

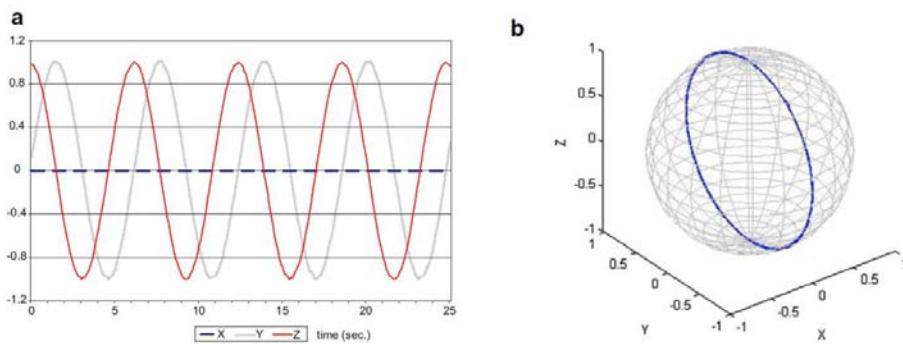
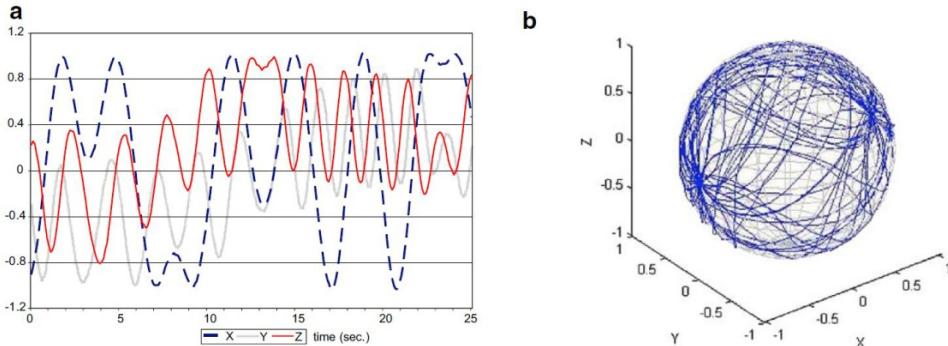
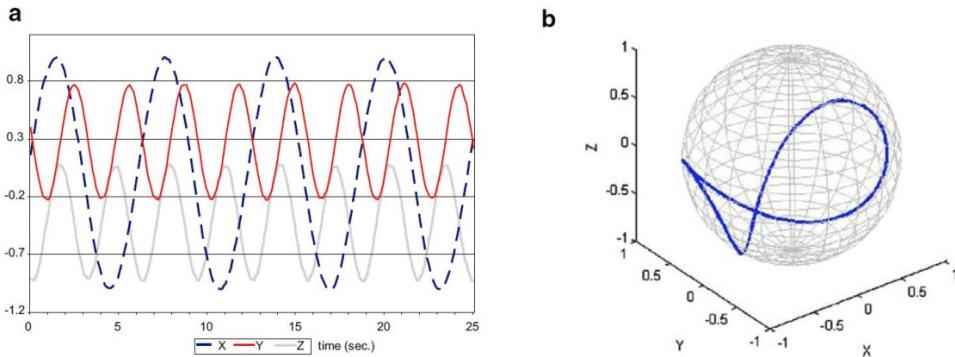


Abbildung 1: a) Analyse der Beschleunigung, die auf einen Körper im 2D-Klinostatenmodus über die Zeit wirkt, aufgeteilt in einen Graphen pro Dimension. Während bei der Rotation um eine Achse nur zwei Dimensionen beteiligt sind, kann von der Rotationsebene keine Beschleunigung festgestellt werden. b) Zeitlich summierte graphische Wiedergabe der Beschleunigung in allen 3 Dimensionen, die auf einen Körper im 2D-Klinostatenmodus wirkt (Borst und van Loon 2009)

1.4 RPM

Beim 3D-Klinostaten wurde im Vergleich zum 2D-Klinostaten eine weitere Rotationsachse orthogonal zu der bestehenden hinzugefügt. Da beide Rotationsachsen sich hierbei in gleicher und konstanter Geschwindigkeit drehen, werden immer dieselben Punkte bei jeder Umdrehung angefahren (Abbildung 2) (Hoson et al. 1997). Die Drehachse des 2D-Klinostaten reduziert sich hierbei zu einem Drehpunkt. Wenn sich nun beide Rotationsachsen in variabler Geschwindigkeit bewegen, wird immer ein anderer Weg pro Umdrehung zurückgelegt (Abbildung 3). Dieses Verfahren ist die Funktionsweise einer Random Positioning Machine (RPM). Auch eine Änderung von Richtung und Geschwindigkeit während eines Experiments Ansteuerung der Motoren lassen diese sich variabel steuern, sodass auf der RPM Versuche im 2D- und 3D-Klinostatenmodus sowie auch im Random Modus durchgeführt werden können. Neben der Einstellung des Geschwindigkeitsbereiches kann in diesem Modus noch entschieden werden, ob eine Änderung der Richtung sowie auch eine Randomisierung der Zeitintervalle, in der diese Änderungen erfolgen kann, stattfinden soll.



1.5 Ziele der Arbeit

Es ist bereits bekannt, dass *Paramecium* sowie auch *Euglena* eine negative Gravitaxis und *Paramecium* zusätzlich eine Gravikinese unter 1xg Bedingungen zeigen. Eine Erhöhung der Gravitationskraft verstärkt die Schwerkraftantworten, in realer Mikrogravitation wie z. B. auf Höhenforschungsraketen werden sie wiederum aufgehoben. Da das Verhalten dieser Organismen in Schwerelosigkeit gut untersucht ist, eignen sie sich besonders zur Überprüfung von Simulationsanlagen. Die Ergebnisse aus Experimenten in realer Mikrogravitation werden als Referenz für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche herangezogen. Die Experimente erfolgten auf einer Random Positioning Machine (RPM), welche in verschiedenen Modi betrieben wurde, im direkten Vergleich mit dem 2D-Klinostaten sowie auf der RPM im 2D-Klinostatenmodus. Es stellt sich die Frage, wie sich eine Weiterentwicklung von einem 2D-Klinostaten zur 3D-RPM, also das Einbringen einer weiteren Rotationsebene, auf die Modellorganismen auswirkt, im Vergleich zu den

Ergebnissen aus den Experimenten unter wirklicher Schwerelosigkeit. Hierbei werden die Auswirkungen der zusätzlichen Dimension bei konstanter Geschwindigkeit beider Rahmen sowie bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten, welche ihre Geschwindigkeit und auch ihre Richtung während eines Experiments in randomisierten Zeitintervallen ändert untersucht. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, in wie weit sich die Rotationsgeschwindigkeit auf das Verhalten der Organismen auswirkt. Mittels der Ergebnisse soll eine Validierung der Simulationsanlagen im Hinblick auf die Güte der Simulation erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Klinostatenmikroskop

Das Klinostatenmikroskop () ist ein durch das DLR (Köln) umgebautes Lichtmikroskop der Firma Zeiss, welches horizontal gelagert wurde. Die Rotationsgeschwindigkeit ist stufenlos einstellbar. So kann das Klinostatenmikroskop mit bis zu 90rpm gedreht werden. Das Drehzentrum der Rotationsebene befindet sich hierbei genau in der optischen Achse und wird vom Sichtfeld der Kamera erfasst. Das Klinostatenmikroskop ist mit einer CCD-Kamera mit einer maximalen Auflösung von 720×576 Pixeln bei 25fps ausgestattet. Das VGA Videosignal wird über einen USB Video Konverter von einem analogen in ein digitales Signal umgewandelt, welches am Computer ausgewertet werden kann.

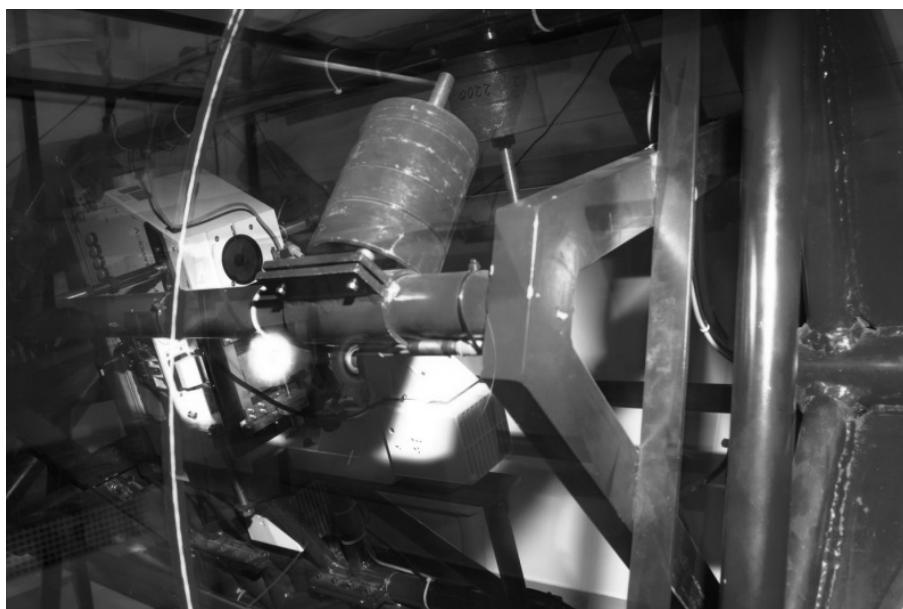


Abbildung 4:

Klinostatenmikroskop des DLR Köln während eines Experiments.

2.1.2 Random Positioning Machine

Die Random Positioning Machine (Abbildung 5) ist ein Desktop Gerät der Firma Dutch Space (Leiden, Niederlande). In der Standardkonfiguration wird die maximale Geschwindigkeit mit 20rpm angegeben. Um die RPM direkt mit schon vorhandenen Daten vom schnell drehenden Klinostaten (Mikroskop) vergleichen zu können, wurde die RPM von Dutch Space mit neuen Motoren ausgestattet, die eine maximale Geschwindigkeit von bis zu 85rpm erreichen. Durch den Einbau einer optischen Bank kann das Verhalten der getesteten Objekte, genau wie beim Klinostatenmikroskop beobachtet werden. Die optische Bank fixiert die Versuchskammer zentral im Drehpunkt. Die Beleuchtung der Versuchskammer erfolgt durch eine, in ihrer Intensität regulierbare, Infrarot-LED. Um eine passende Vergrößerung bei relativ geringer maximaler Distanz von Versuchskammer zur Kamera zu erreichen, wurde ein 10x Objektiv verwendet. Die verwendete CCD-Kamera ist baugleich mit der des Klinostatenmikroskops. Ebenso wird das Kamerasignal auf gleiche Weise zum Computer geführt (siehe 2.4).

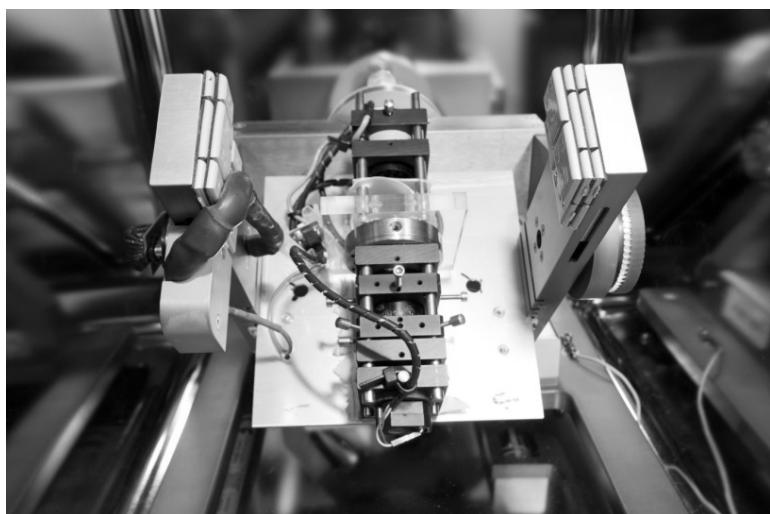


Abbildung 5: Desktop RPM mit optischer Bank, z.B. zur Analyse der Bewegungen von Protozoen.

2.1.3 Chemikalien

Aqua Dest.

Borsäure	H_3BO_3	Merck, Darmstadt
Cobaltchloridhexahydrat	$CoCl_2 \times 6 H_2O$	Roth, Karlsruhe
Calciumchloriddihydrat	$CaCl_2 \times 2 H_2O$	Sigma, Deisenhofen
Diammoniumhydrogenphosphat	$(NH_4)_2HPO_4$	Roth, Karlsruhe
Eisenchloridhexahydrat	$FeCl_3 \times 6 H_2O$	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%		Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut		Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kupfersulfatpentahydrat	$CuSO_4 \times 5 H_2O$	Merck, Darmstadt
Mangansulfatmonohydrat	$MnSO_4 \times H_2O$	Roth, Karlsruhe

Magnesiumsulfatmonohydrat	$MgSO_4 \times H_2O$	Merck, Darmstadt
Natriumjodid	NaI	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdatdihydrat	$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	Roth, Karlsruhe
Nickelchlorid	$NiCl_2$	Sigma, Deisenhofen
Titriplex II	EDTA-II	Merck, Darmstadt
Vitamin B1	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \times HCl$	Roth, Karlsruhe
Vitamin B12	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Aquariumwatte	Dohse KG
Einmal-Filterhalter 0,2µm	Schleicher & Schuell
Einweg-Pasteurpipetten 1ml	Roth, Karlsruhe
Einweg-Spritze 5ml	Becton Dickinson GmbH
Serologische Pipette 5ml	Falcon
Serologische Pipette 50ml	Falcon
Stroh unbehandelt	Örtlicher Zoofachhandel
Zellkulturflasche 250ml	Falcon

2.1.5 Geräte

Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Becherglas 3000ml	Schott
Messkolben 100ml	Hirschmann
U-Glas	Schott
5l Weithalsbehälter, Kunststoff	Roth
Beobachtungskammer (<i>Paramecium</i>)	Eigenbau DLR
Beobachtungskammer (<i>Euglena</i>)	Eigenbau Univ. Erlangen
Incubator C60	Labotect
Schnell drehendes Klinostatenmikroskop	DLR
Random Positioning Machine (RPM)	Dutch Space
Waage: CP324S	Sartorius
Klimaschrank	BOSCH
Kamera: RS-OV 7949-1818	Conrad Electronics
LIFEBOOK E780 4 × 2,0 Ghz, 4GB-Ram	Fujitsu Siemens
USB 2.0 Video Grabber	Logi Link
USB to RS 232 Controller	National Instruments

2.1.6 Software

Excel	Microsoft Corporation
VLC media player	VideoLAN
IBM SPSS Statistics 21	IBM Corporation
Windows Movie Maker	Microsoft Corporation
WinTrack 2000 XP	Media AV Multimedea und Software GmbH, Erlangen

2.1.7 Versuchskammern

Die Beobachtungskammer für *Paramecium* wurde für Experimente auf TEXUS-Raketen konzipiert. Da zum Vergleich meiner Ergebnisse Daten aus diesen Versuchen herangezogen werden sollten, war es von Vorteil, die gleichen Versuchskammern zu benutzen. Die

Versuchskammer hat eine Schichttiefe von 1mm um Randeffekte für *Paramecium* ausschließen zu können (Abbildung 6). Ihre runde Form mit einem Durchmesser von 22mm sorgt für eine gleichmäßige Beschleunigung des Mediums innerhalb des Versuchsraums bei Klinorotation. Die maximale Kraft an den Rändern der Versuchskammer beträgt 0,0443g bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 60rpm. Die resultierende Beschleunigung beträgt 0,4343m/s.



Abbildung 6: Beobachtungskammer mit einem Durchmesser von 22mm und einer Schichtdicke des Versuchsraums von 1mm bzw. 0,6mm .

Da die Optik der RPM nur einen sehr schmalen Bereich der gesamten Tiefe der Kammer wiedergeben kann, wurde für *Euglena gracilis* eine Beobachtungskammer verwendet, deren Schichtdicke nur 0,3-0,6mm beträgt. Auch sie wurde bereits bei TEXUS Experimenten eingesetzt. Die Kammer wurde freundlicherweise von PD Dr. Michael Lebert (Universität Erlangen) zur Verfügung gestellt. Sie hat wie die Beobachtungskammer von *Paramecium* einen Durchmesser von 22mm, folglich beträgt auch hier die maximale Beschleunigung 0,4343m/s bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 60rpm und die daraus resultierende Kraft 0,0443 g.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *Paramecium biaurelia* und *Euglena gracilis*

P. biaurelia wurden freundlicherweise von Jan Bechert, Mitarbeiter des DLR, zur Verfügung gestellt. Als Kulturmedium wurde ein Strohmedium verwendet. Hierbei wurden 15g Stroh mit 1000ml Aqua dest. in ein 3000ml Becherglas gegeben und zum Kochen gebracht. Nach 20 Minuten wurde der flüssige Anteil in einen 5Liter Weithalsbehälter gegeben und verschlossen. Dem Becherglas mit dem verbliebenen Stroh wurden weitere 1000ml Aqua dest. hinzugegeben und für weitere 20 Minuten zum Kochen gebracht. Anschließend wurden

das abgekochte Stroh sowie die Kulturflüssigkeit in den 5L-weithalsbehälter überführt. Nach entsprechender Abkühlphase wurde das Medium mit 200ml einer bereits bestehenden *Paramecium* Kultur beimpft. Bei der Kultivierung ist zu beachten, dass der Deckel des Kulturgefäßes nicht vollständig geschlossen wird, um einen Gasaustausch zu gewährleisten. Die Kulturen wurden nach der Beimpfung in Dunkelheit bei einer Temperatur von 20°C in einem Klimaschrank gehalten. Es wurde darauf geachtet, dass das Alter der für Experimente verwendeten Kultur mindestens zwei Wochen betrug.

Zur Kultivierung von *Euglena gracilis* wurden diese in einem Mineral-Medium (Starr 1964; Tab. 1) in sterilen 250ml Falcon-Zellkulturflaschen mit belüfteten Deckel gehalten. Der pH-Wert des Mediums wurde mit HCl bzw. NaOH auf 6,8 eingestellt. Zur Sterilisation des Mediums wurde dieses für 30 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums wurde die Spurenelementlösung (Tab. 2) sowie Vitamin B1 und B12 über Sterilfiltration keimfrei hinzugegeben. Die Haltung des autotrophen Organismus geschah in einem Klimaschrank bei 20°C mit einer 24-Stunden Kaltlicht LED Beleuchtung. Das Umsetzen der Organismen zur Erstellung einer neuen Kultur erfolgte alle 14 Tage. Hierzu wurden 100 ml steriles Mineralmedium mit 6ml einer bestehenden Kultur beimpft. Das Alter der Kulturen, die für die Experimente verwendet wurden, betrug mindestens zwei Wochen.

Tab. 1: Mineralmedium (nach Starr, 1964), 1 l, pH-Wert 6,8

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,0000g
KH ₂ PO ₄	1,0000g
MgSO ₄ x 1H ₂ O	0,1120g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,0428g
EDTA-II	0,0500g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,0050g
Spurenelementstammlösung	10ml
Vitamin B1 Stammlösung	0,1ml
Vitamin B12 Stammlösung	0,5ml

Tab. 2: Spurenelementlösung, 1 l gelöst in Aqua dest.

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	4,40000g
MnSO ₄ x 1H ₂ O	3,09000g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1,00800g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,08070g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,03900g
H ₃ BO ₃	0,02830g
NaI	0,00118g
<u>Vitamin B1-Stammlösung:</u>	Thiamin-HCl, 0,100mg/100ml Aqua dest.
<u>Vitamin B12-Stammlösung:</u>	Cobalamin 0,001mg/100ml Aqua dest.

2.2.2 Glasbeads

Aus Silikat bestehenden Glasstrahlperlen wurden verwendet, um die physikalischen Kräfte, die auf den rotierenden Experimentplattformen entstehen grafisch wiederzugeben, und diese Ergebnisse mit den ermittelten Schwimmspuren der Organismen vergleichen zu können. Die Glasbeads wurden zunächst in Aqua dest. gegeben, und durch ein Sieb mit einer Porengröße von < 100µm gesiebt. Glasbeads < 100µm wurden für die Versuche benutzt.

2.2.3 Zellimmobilisierung

Um die Sedimentation von *Euglena* und *Paramecium* untersuchen zu können, musste die (Eigen-)Mobilität der Organismen gehemmt werden. Zur Immobilisierung von *Paramecium* wurde eine NiCl₂-Lösung mit der Konzentration von 0,04g/100ml H₂O tropfenweise unter mikroskopischer Kontrolle in die *Paramecium* Kultur gegeben (Kuznicki 1963). Nach Zugabe der NiCl₂-Lösung konnte eine verminderte Schlagfrequenz der Cilien und schließlich das vollständigen Aussetzen des Cilienschlags beobachtet werden. Somit war die aktive Schwimmfähigkeit der Organismen nicht mehr gegeben. Die Aktivität der kontraktilen Vakuole wurde als Indikator für die Vitalität der Zellen mikroskopisch überprüft. Die so behandelten Organismen konnten sich nun nicht mehr aktiv fortbewegen, sodass ihre passiven (Sedimentations-) Eigenschaften untersucht werden konnten.

Euglena gracilis wurde temporär mit Hilfe von flüssigem Stickstoff immobilisiert. 500µl *Euglena* Kultur wurde hierbei in ein Safe-Lock Gefäß (Eppendorf 2ml) gegeben und für 60s flüssigem Stickstoff ausgesetzt. Die gefrorene Zellkultur wurde zum Auftauen auf Eis aufbewahrt. Diese Prozedur immobilisiert die Zellen für zwei bis drei Stunden ohne sie zu töten. Eine mikroskopische Untersuchung der immobilisierten Zellen zeigte, dass dieser Vorgang sich nicht auf die Zellform auswirkte und die Zellen nach einigen Stunden ihre normale Bewegung wieder aufnahmen.

2.2.4 Versuchsbedingungen

Um die Auswirkung eines einzelnen Reizes auf einen Organismus untersuchen zu können, müssen alle anderen Reizquellen wie Licht oder chemische Gradienten ausgeschaltet werden. Aus diesem Grund wurden alle Versuche in einem lichtdicht geschlossenen Inkubator (RPM) sowie in einem abgedunkelten Raum (Klinostatenmikroskop) bei Raumtemperatur durchgeführt. Auf eine luftblasenfreie Befüllung der Versuchskammern zur Vermeidung von internen Strömungen sowie dem Ausschluss der Chemotaxis wurde geachtet.

Natürliche Bewegungen der Organismen finden in einem dreidimensionalen Raum statt. In der computergestützten Bildanalyse wird mittels zweidimensionaler Videobilder eine dreidimensionale Bewegung analysiert. Damit dieser Umstand nicht zu sehr ins Gewicht fällt, wurde die Tiefe der Kammer so gering wie möglich gewählt. Bei einer zu flachen Kammer allerdings können Randeffekte auftreten. Diese Randeffekte entstehen durch Interaktion des Organismus mit der Wand der Versuchskammer. Das Videobild des Klinostatenmikroskop zeigt stets einen Ausschnitt der Küvette, welcher sich genau im Drehzentrum der rotierenden Achse befindet. Auch bei den Versuchen auf der RPM wurde der Mikroskopaufbau so gefertigt, dass der Ausschnitt des Videobildes genau das Drehzentrum der RPM abbildet. Hier sind die durch die Rotation auftretenden Scherkräfte am geringsten.

2.2.4.1 *Paramecium biaurelia*

Paramecium wurde aus den Becken zum Anreichern der Kulturdichte in einen 100ml Messkolben gegeben (Anreicherungskolben). Nach dem vollständigen Befüllen des Messkolbens wurde ein Ppropfen aus Aquariumwatte, befestigt an einem Nylonfaden, in das untere Ende des Kolbenhalses gezogen. Durch die negative Gravitaxis und positive Aerotaxis schwimmt *Paramecium* durch die Watte und sammelt sich im Kolbenhals an. Schmutzpartikel sedimentieren auf die Watte und werden - da sie für die Bewegungsanalyse stören – somit aus dem Medium entfernt. Um eine hohe Anreicherung der Kultur zu erreichen sowie für eine erhöhte negative Gravitaxis wurden die Messkolben bereits am Vorabend des Versuchs befüllt. Um Konvektion im Medium und Zusammenstöße der Individuen zu vermeiden, wurde die angereicherte Kultur mit Hilfe von steril gefiltertem Medium unter einer Stereolupe auf eine Zeldichte von 300-900 Individuen/ml gesenkt und mittels Bildverarbeitung kontrolliert. Die so vorbereitete Kultur wurde nun blasenfrei in eine TEXUS-Küvette gegeben und verschlossen. Zur Adaptation der Einzeller an die für sie neue Umgebung wurde die Küvette horizontal in einem abgedunkelten Behältnis für mindestens 30 Minuten gelagert, bevor ein Experiment gestartet wurde. Diese Anpassung an die Versuchskammer machte sich durch eine Absenkung der Bewegungsgeschwindigkeit bemerkbar, die sonst stark von Literaturangaben abweicht, da das Umsetzen der Zellen für die Individuen Stress bedeutet.

2.2.4.2 *Euglena gracilis*

Da die Konzentration von *Euglena* in ihrem Kulturmedium so hoch ist, dass eine Auswertung der einzelnen Individuen während eines Experiments nicht möglich wäre, wurde vor Versuchsbeginn mikroskopisch mit steril gefiltertem Medium die *Euglena* Kultur auf eine Dichte von $\sim 2,5 \times 10^5$ Zellen/ml gesenkt. So konnte eine mikroskopische Erkennung und

Verfolgung der einzelnen Individuen durchgeführt werden. Hierzu wurde Medium aus der bestehenden Kultur entnommen und über einen Sterilfilter mit einer Porengröße von $2\mu\text{m}$ gereinigt. Das so entstandene zellfreie Medium hat keinen osmotischen Effekt auf die Organismen und kann somit zur Verdünnung der Zellzahl eingesetzt werden. Das so entstandene Medium mit definierter Dichte von Individuen wurde nun in die Beobachtungskammer blasenfrei überführt und diese ebenso wie bei *Paramecium* in einer abgedunkelten Kammer zur Anpassung an die für sie neue Umgebung für 30 Minuten aufbewahrt, bevor sie für den jeweiligen Versuch verwendet wurde.

2.3 Versuchsdurchführung

Um die Versuche untereinander vergleichen zu können, wurde jeder Versuch nach einem festgelegten zeitlich gegliederten Schema durchgeführt. Den Startpunkt für dieses Schema liefert der Aufnahmestart des Videos. Die folgenden Intervalle von jeweils 60s wurden auf Grundlage der Laufzeit des hierbei erzeugten Videos durchgeführt. Das erste Messintervall in den Grafiken gibt zur besseren Analyse des folgenden Versuchs die unter normalen 1xg Bedingungen aufgenommenen Referenzwerte wieder. Zwischen den Messungen befindet sich ein Zeitintervall von 30s welches nicht dargestellt wird. Diese Zeit wurde genutzt um die soeben erhobenen Daten zu speichern und gegebenenfalls die verwendeten Maschinen an bzw. aus zu stellen. Nach Stillstand der Maschine wurde der verwendete Aufbau wieder so ausgerichtet, dass die ermittelten Richtungen auch mit den tatsächlich geschwommenen Schwimmrichtungen übereinstimmen.

2.4 Auswertungsverfahren mittels computergestützter Bildverarbeitung

Die Auswertung und Interpretation der mittels Kamera aufgezeichneten Bewegungsdaten erfolgte durch das Computerprogramm „WinTrack 2000 XP“ (Media AV Multimedea und Software GmbH, Erlangen) zur Verfügung gestellt wurde. Während der Durchführung der Versuche wurde bei diesen das Videosignal zeitgleich aufgenommen und analysiert. Dies erbrachte schon während des Versuchs erste Ergebnisse zum Verhalten der Organismen. Hierfür wurde das von der Kamera kommende analoge Videosignal gesplittet und an zwei USB 2.0 Video-Grabber (Logilink/LinQ) ausgegeben. Die Video-Grabber wandeln das analoge Signal in ein digitales um, welches vom Computer verarbeitet werden kann. Zum einen kann das Videosignal sofort im Computerprogramm WinTrack 2000 XP (s.u.) ausgewertet werden, des Weiteren kann das Videosignal mit Hilfe des Computerprogramms „Windows movie maker“ für spätere Analysen aufgezeichnet werden. Dazu muss das digitalisierte Video erneut in das Analyseprogramm WinTrack 2000 XP eingespeist werden.

Hierzu wird das abgespeicherte Video mittels eines zusätzlichen Computers im Vollbildmodus bei einer Auflösung von 800×600 (4:3) abgespielt und über einen VGA-Ausgang ausgegeben. Dieses digitale Videosignal wird über einen VGA-zu-S-Video-Konverter in ein analoges Signal konvertiert, welches wieder über einen USB 2.0 Video-Grabber analysiert werden kann.

WinTrack ist in der Lage, durch Kontrastunterschiede zwischen Objekt und Hintergrund, in Echtzeit Objekte anhand von frei definierbaren Parametern wie Größe, Beweglichkeit und Geschwindigkeit zu identifizieren und ihre Bewegung zu verfolgen (Lebert und Häder 1999). Dazu wird jedes einzelne Bild des Videosignals als eine Matrix mit x- und y-Koordinate interpretiert. Zu jeder Koordinate dieser Matrix kann anhand der Helligkeit des Videobildes der zugehörige Graustufenwert als Binärwert mit 8Bit Bereich, welche in Werten zwischen 0-255 angegeben werden, bestimmt werden. Die verwendete CCD-Kamera bietet eine PAL Auflösung von 720×576 Pixeln. Da das PAL-Videoformat ein Seitenverhältnis von 1,067:1 hat, resultiert hierdurch ein 4:3 PAL Videobild. Die aufgezeichnete sowie auch die ausgewertete Bildfrequenz ist ebenso durch den PAL-Standard bestimmt und liegt bei 25fps. Dies bedeutet, dass zwischen zwei Bildern ein Intervall von 40ms liegt. Begrenzt wird diese Technik durch das Auflösungsvermögen der eingesetzten Kamera, sowie der Leistungsfähigkeit des eingesetzten Computers. Die Software WinTrack besteht aus einem modular aufgebauten Programm. Diese Module ermöglichen zwei experimentelle Ansätze:

1. Zweidimensionale Bewegungsvektoren aller Objekte im Sichtfeld: Track Module

Die Bewegung des Objekts über die Zeit, also eine Verschiebung der Graustufenunterschiede über die nacheinander angefertigten Matrizen erfolgt durch die Analyse der Position jedes der als Organismen identifizierten Objekte zwischen Bild 1 und Bild 4. Genauer werden die Bewegungsvektoren jedes Individuums aus der Veränderung ihrer Position in den Bildern (Matrizen), über die Zeit ermittelt. Dieser Wert gibt die Abweichung der Schwimmrichtung von der Reizrichtung (definiert als 0°) als Winkel α an.

$$\alpha = \tan^{-1} \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

Durch vorherige Kalibrierung des Programms kann die beobachtete Distanz der Objekte von der Anzahl zurückgelegter Pixel in Mikrometer über einen Faktor k umgerechnet werden. Da das Zeitintervall durch die Bildfrequenz gegeben ist, kann unter Zuhilfenahme der Systemzeit die Geschwindigkeit der Objekte berechnet werden (Richter 2000).

$$v = k \frac{\sqrt{(y_2 - y_1)^2 + (x_2 - x_1)^2}}{t_2 - t_1}$$

Da das Track Module schon in sehr kurzen Zeitintervallen Daten produziert, ist es ein gutes Werkzeug, um genaue Angaben über den Zeitpunkt der Verhaltensänderung angeben zu können wie etwa bei veränderter oder reduzierter Reizrichtung, wie es in dieser Arbeit der Fall ist. Als ein Hauptergebnis liefert dieses Modul zirkuläre Histogramme. Sie stellen die Bewegungsrichtung der Organismen dar, aufgeteilt in 64 Klassen zu je 5,625 Winkelgraden pro Klasse. Je ausgeprägter eine Klasse vertreten ist, desto mehr Bewegungen in diese Richtung werden registriert. Um eine statistische Auswertung der so gewonnenen Daten vornehmen zu können, werden diese vom Computerprogramm analysiert. Aus den Daten wird der Grad der Orientierung (r -Wert) sowie die Vorzugsrichtung Theta (Θ) bestimmt (Batschelet 1985). Hierbei gibt der r -Wert an, ob und wie ausgeprägt die Präzision der Orientierung ist, während Theta angibt, in welche Vorzugsrichtung sich die Organismen bewegen, wenn man alle Bewegungsdaten des Versuchs mittelt. Um zu überprüfen, ob die Verteilung der Bewegungsrichtungen signifikant von einer Vorzugsrichtung (Theta) abweicht, wird der Rayleigh-Test ($r > 0$) verwendet. Der r -Wert berechnet sich wie folgt:

$$r = \frac{\sqrt{(\sum \sin \alpha)^2 + (\sum \cos \alpha)^2}}{n}$$

Der r -Wert umfasst einen Bereich zwischen 0 und 1, wobei 0 einer ungerichteten Verteilung der Bewegungsrichtungen entspricht. Wenn alle Organismen sich in die gleiche Richtung bewegen, so ergibt sich ein r -Wert von 1. Ein r -Wert $< 0,1$ wird als „random“ festgelegt. Der r -Wert ist nur bei unimodalen Verteilungen aussagekräftig wie sie in den hier durchgeföhrten Versuchen vorherrschen. Die Berechnung des Vorzugswinkels Theta erfolgt in 90° eingeteilten Quadranten und wird hier exemplarisch für den ersten Quadranten angegeben.

$$\theta = \arctan \frac{(\sum \sin \alpha)^2}{(\sum \cos \alpha)^2}$$

Es besteht auch die Möglichkeit, eine Einteilung der Geschwindigkeiten nach ihrer Richtung vorzunehmen. Die Aufteilung des Programms liefert hierbei vier separate Werte für unterschiedliche Richtungen. Eingeteilt wird die Bewegung der Organismen in Aufwärts- (300° - 60°), Abwärts- (120° - 240°) und Seitwärtsbewegungen (Abbildung 7), wobei die Möglichkeit besteht, beide Seiten der horizontal ausgerichteten Bewegungen unabhängig voneinander auszuwerten (Seite 1: 60° - 120° ; Seite 2: 240° - 300°), was aber im Rahmen der

Arbeit unnötig war, zumal das Augenmerk auf aufwärts und abwärts gerichtete Bewegungen fokussiert wurde. Zusätzlich wurde noch ein weiterer Modus verwendet, der sich durch eine längere Verfolgung der Individuen auszeichnet und so eine bessere Aussage über die einzelnen Schwimmbahnen zulässt.

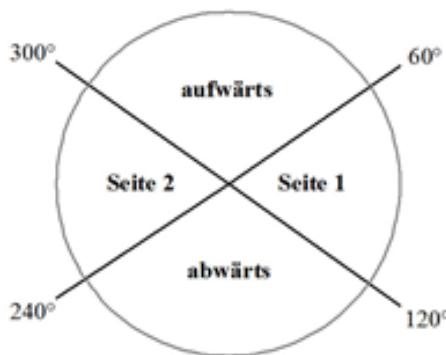


Abbildung 7: Einteilung in die Richtung der beobachteten Bewegung in aufwärts, abwärts, sowie seitwärts, wobei die Seiten 1 und 2 miteinander verrechnet werden

2. Zweidimensionale Bewegungsvektoren einzelner Zellen: Long-Track Module

Auch diesem Modus liegen die gleichen grundlegenden Einstellungsmöglichkeiten zum Identifizieren von Individuen zugrunde, die schon in den Grundlagen für dieses Programm erklärt wurden (siehe 2.4). In diesem Modus jedoch werden nicht wie im Track-Module alle Organismen, die sich im Sichtfeld befinden, über 4 Bilder verfolgt, sondern Bewegungsvektoren einzelner Individuen für mindestens 1s, also mindestens 25 Einzelbilder, erstellt. Die maximale Anzahl an gleichzeitig verfolgten Individuen wurde auf einen Wert von 10 eingestellt. Ein Abbruch der Messung eines Individuums kann durch mehrere Gründe erfolgen. Das Verlassen des Sichtfeldes wäre hier zu benennen, sowie auch ein Zusammenstoß mit anderen Individuen, da dann eine eindeutige Objektzuweisung nicht mehr möglich ist. Auch ein Verlassen der Schärfeebelebene der Kamera sowie eine ausbleibende Bewegung über eine Sekunde hinweg führt zum Abbruch der Verfolgung. Vor dem Start einer Messung wird eine „Search Area“ - ein Bereich von Interesse - ausgewählt, in dem sich zu messende Organismen zu befinden haben, damit eine computergesteuerte Nachverfolgung gestartet werden kann. Die „Search Area“ wurde in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen über das Rotationszentrum gelegt, um Individuen zu verfolgen, die den geringsten Beschleunigungswerten ausgesetzt waren. Jede Schwimmbahn besteht aus einzelnen gleichgroßen Segmenten, die nach Länge oder Zeitintervall eingeteilt sind. So können anhand der Koordinaten des Startpunkts und den Werten der einzelnen Segmentvektoren die Schwimmbahnen einzelner Individuen dargestellt und untereinander verglichen werden. Der direkte Abstand zwischen Start- und Endpunkt im Verhältnis zur tatsächlich zurückgelegten

Strecke gibt das Maß der Schwimmbahngenauigkeit einer Schwimmspur an, und wird als Linearitätsindex (d) bezeichnet. Ein Linearitätsindex von 1 entspricht dem kürzesten direkten theoretischen Wert zwischen Start und Endpunkt. Bei zunehmender Mäandrierung (Bahnkrümmung) der Zellspuren wird auch der Linearitätsindex grösser welcher Werte ab 1 annehmen kann (Batschelet 1985). Analog hierzu leitet sich der mittlere Linearitätsindex ab, welcher sich aus dem Mittel der einzelnen Linearitätswerte von allen analysierten Schwimmspuren zusammensetzt. Somit ist also der mittlere Linearitätsindex als das Verhältnis der Summe aller Spurvektorbeträge gegen die Gesamtlänge definiert.

2.5 Statistik der erfassten Daten

Die erfassten Daten des Track-Modules werden als .ini Datei mit Windows ANSI Formatierung abgespeichert und konnten als solche in Microsoft Excel importiert und weiter bearbeitet werden. Wie bereits erwähnt, werden die aufgezeichneten Geschwindigkeiten aufgeteilt anhand der Richtung ihrer Bewegung. Hieraus ergibt sich ein Problem bei der Anwendung der von Excel vorgegebenen statistischen Auswertungen wie der Erstellung der Mittelwerte oder Standardabweichungen. Die Zeitintervalle ohne ein gemessenes Ereignis werden als ein Ereignis mit einer gegebenen Geschwindigkeit von null gewertet, was zu einer Verfälschung der wirklichen gemessenen Geschwindigkeit führt. Um dies ausschließen zu können wurden die Daten mit einer abgeänderten Formel bearbeitet. Das arithmetische Mittel der Geschwindigkeiten wurde mit Hilfe einer wenn-dann Funktion berechnet, die alle Werte unter eins ausschließt.

{=MITTELWERT (WENN (Wertebereich > 1; Wertebereich))}.

Wobei der Wertebereich den Zeilen der Messung entspricht (z.B. D5:D247). Die Standardabweichung berechnet sich ähnlich:

=((ZÄHLENWENN (Wertebereich; ">0") * SUMMENPRODUKT ((Wertebereich >0)*(Wertebereich)^2) - (SUMMENPRODUKT ((Wertebereich >0)*(Wertebereich)))^2) / (ZÄHLENWENN (Wertebereich ; ">0"))^2)^0,5.

Auch hier wird der Wertebereich wieder definiert durch die Zeilen der Messung.

2.6 Signifikanztest

Ob die gemessenen Geschwindigkeiten einer Normalverteilung entsprechen, wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests geprüft. Hierbei wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit mit 5%

definiert. Bei Werten von $p < 0,05$ lag keine Normalverteilung der zugrundeliegenden Messdaten vor. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit über 0,05 kann von einer Normalverteilung der überprüften Daten ausgegangen werden.

Um nun die einzelnen Messungen miteinander vergleichen zu können, müssen die ermittelten Daten entsprechend ihrer Verteilung überprüft werden. Mit normalverteilten Daten wurde ein T-Test mit unabhängigen Stichproben durchgeführt. Hierbei stellte die Irrtumswahrscheinlichkeit 5% dar, und gab an, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Datenmengen vorherrscht. Bei nicht normalverteilten Datenmengen wurden die ermittelten Geschwindigkeiten mittels des U-Tests nach Mann-Whitney auf signifikante Unterschiede überprüft. Auch hier wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gewählt. Der T-Test sowie auch der U-Test geben Aussagen über die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Datenmengen.

2.7 Berechnung der Gravikinese (nach Machemer 1999)

Die Berechnung der gravikinetischen Komponenten erfolgte über folgende Formeln:

$$\Delta_U = P - V_U - S$$

$$\Delta_D = V_D - P - S$$

V_D = abwärts gerichtete Schwimmgeschwindigkeit

V_U = aufwärts gerichtete Schwimmgeschwindigkeit

S = Sedimentationsgeschwindigkeit

P = schwerkraftunabhängige Antriebsgeschwindigkeit

Δ = allgemeine gravikinetische Komponente

Δ_U = gravikinetische Komponente beim Aufwärtsschwimmen

Δ_D = gravikinetische Komponente beim Abwärtsschwimmen

Das arithmetische Mittel aus den beiden gravikinetischen Komponenten Δ_U und Δ_D gibt die allgemeine gravikinetische Komponente an.

$$\Delta = \frac{(\Delta_U + \Delta_D)}{2}$$

So ergibt sich eine mathematische Definition der Gravikinese als die Hälfte der Differenz aus aufwärts- und abwärts gerichteter Geschwindigkeit, von der die Sedimentationsgeschwindigkeit abgezogen wird.

$$\frac{V_D - V_U}{2} - S = \frac{(\Delta_U + \Delta_D)}{2} = \Delta$$

3. Ergebnisse

3.1 Glasbeads zur Analyse der vorherrschenden Beschleunigungen

Um die Auswirkungen der verschiedenen Rotationsmodi effizient miteinander vergleichen zu können, wurde die Bewegung von Glasbeads in H₂O als Medium in einer Küvette (Durchmesser 22mm, Tiefe 1mm) analysiert. Ihre Sedimentationsgeschwindigkeit konnte mit 36,48µm/s ($\pm 14,42\mu\text{m}/\text{s}$) bestimmt werden. Die Präzision der Orientierung lag hierbei bei 0,808 bei n = 32640 Bewegungereignissen (Abbildung 8).

Abbildung 8: Sedimentation von Glasbeads mit einem Vorzugswinkel Theta von 178° und einer Präzision der Orientierung von 0,808 bei n = 32640.



Die Priorität der Analyse wurde auf die im Long-Track Modul des Computerprogramms erzeugten Spuren gelegt. In Abbildung 9 sind die aufgezeichneten Bewegungen der Glasbeads bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten im 2D-Klinostatenmodus abgebildet. Diese Experimente wurden auf dem Klinostatenmikroskop durchgeführt, stehen jedoch auch stellvertretend für die vorherrschende Beschleunigung auf der RPM im 2D-Klinostatenmodus bei entsprechender Rotationsgeschwindigkeit der Versuchsplattform für im Zentrum platzierte Körper.

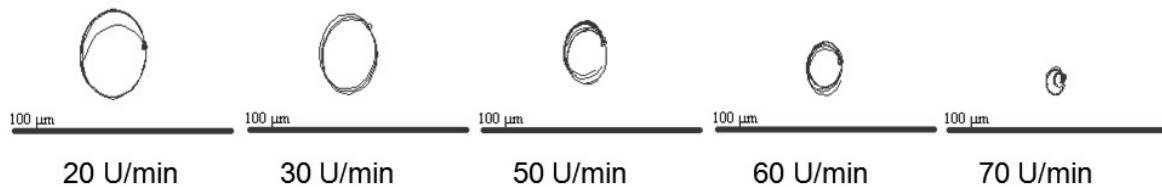


Abbildung 9: Spuren von Glasbeads bei zunehmender Rotationsgeschwindigkeit, wobei jede Spur während einer konstanten Rotationsgeschwindigkeit ermittelt wurde.

Die Bewegungen der Glasbeads um zwei Rotationsachsen in den Modi 3D-Klinostatenmodus mit konstanter Rotationsgeschwindigkeit (**Abb. 3a**) sowie im Real Random Modus mit Random Direction und Random Interval (**Abb. 3b**) werden in **Abbildung 10** dargestellt.

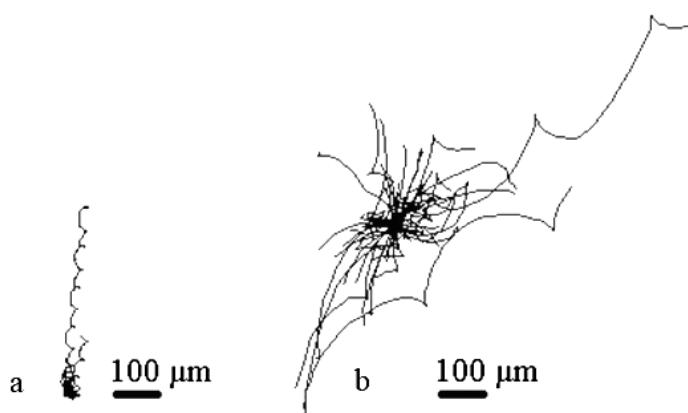


Abbildung 10: Die analysierten Spurbahnen der Glasbeads in Aqua dest. als viskoses Medium während verschiedener Modi der RPM. (a) 3D-Klinostatenmodus mit konstanten 20rpm Rotationsgeschwindigkeit beider Rahmen (b) Real Random Modus mit Random Interval und Random Direction bei einer maximalen Rahmengeschwindigkeit von 20rpm.

3.2 Sedimentationsgeschwindigkeiten von *Paramecium* und *Euglena*

Die ermittelte Sedimentationsgeschwindigkeit von einer immobilisierten *Paramecium* Population betrug $80,16 \mu\text{m/s}$ ($\pm 26,79 \mu\text{m/s}$) bei $n = 1747$ Bewegungereignissen. Für immobilisierte *Euglena* konnte eine Sedimentationsgeschwindigkeit von $28,84 \mu\text{m/s}$ ($\pm 2,91 \mu\text{m/s}$) bei $n= 8227$ beobachteten Bewegungereignissen über ein Messintervall von 60s ermittelt werden.

3.3 Erhebung der 1g Referenzwerte von *Paramecium* sowie *Euglena*

Ziel der Untersuchung war die Ermittlung der mittleren Schwimmgeschwindigkeiten sowie den Grad der Orientierung unter normalen 1xg Standardbedingungen für *Paramecium* sowie für *Euglena*, welche als Referenz für die nachfolgenden Experimente genutzt wurden. In Abbildung 11 sind exemplarisch Orientierungshistogramme von *Paramecium* (a) und *Euglena* (b) abgebildet, die die negative Gravitaxis beider Organismen zeigen, wobei aus den r-Werten und Vorzugswinkeln ersichtlich ist, dass *Euglena* eine höhere Präzision der Orientierung (r-Wert: 0,7; Theta 357°) als *Paramecium* aufweist (r-wert 0,37; theta 0°). In Abbildung 12 sind charakteristische Schwimmspuren für *Paramecium* (a) sowie *Euglena* (b), die unter 1xg Bedingungen aufgenommen wurden, dargestellt.

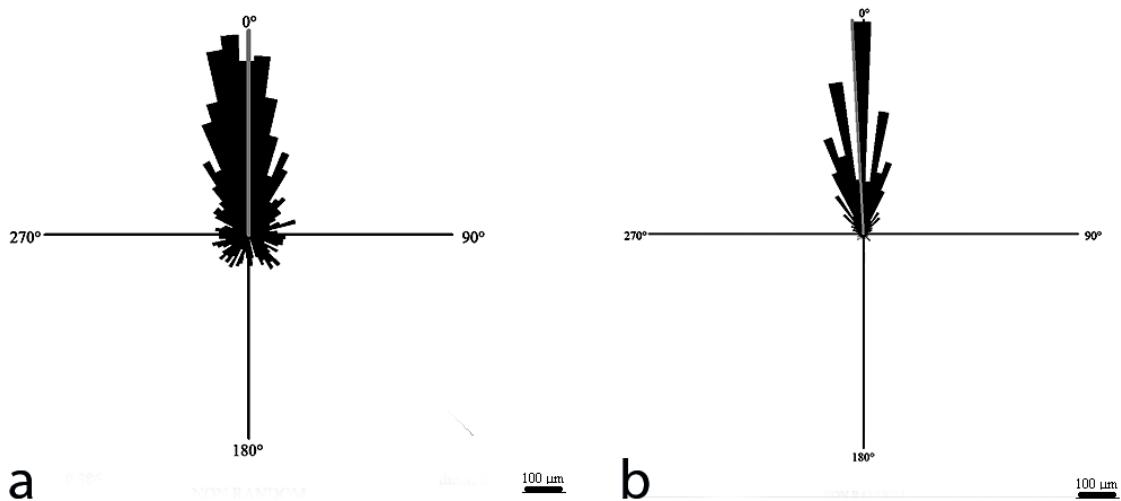


Abbildung 11: Zirkuläre Histogramme, die die Orientierung von *Paramecium* (a) und *Euglena* (b) bei 1xg Bedingungen zeigen. Jedes Histogramm zeigt die Bewegungen, die während einer Messdauer von 60s ermittelt wurden. Die Ausprägung der Balken stellt die Anzahl der Organismen dar, die in die jeweilige Richtung geschwommen sind.

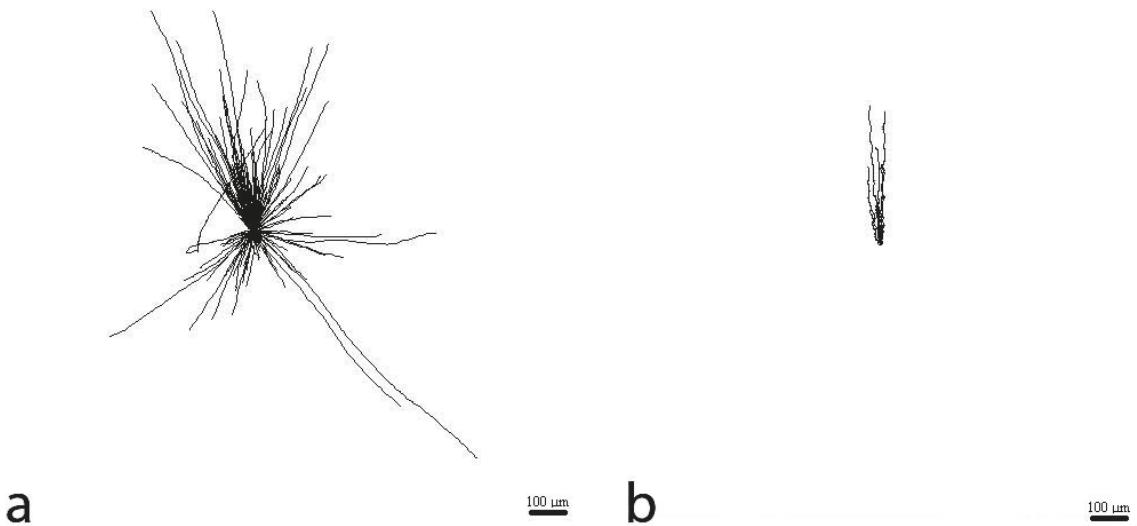


Abbildung 12: Schwimmspuren von *Paramecium* (a) und *Euglena* (b) bei 1xg Standardbedingungen. Der gemessene Linearitätsindex beträgt 1,071 ($n = 89$) (a) und 1,377 ($n=17$) (b) und demonstriert damit die hohe Geradlinigkeit der Schwimmbahnen.

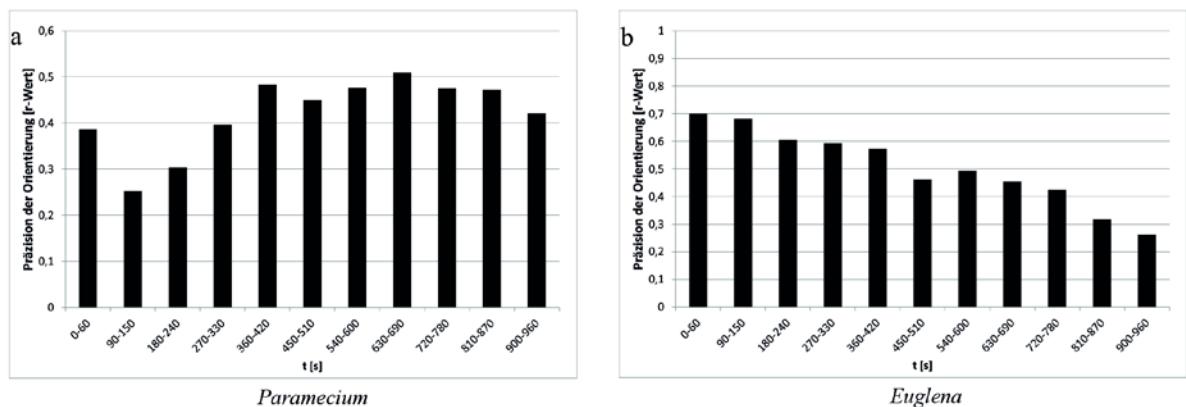


Abbildung 13: Präzision der Orientierung, dargestellt durch den r-Wert für *Paramecium* (a) und *Euglena* (b) unter konstanten 1xg Bedingungen.

Über einen Versuchszeitraum von 16 min wurde die Präzision der Orientierung dargestellt (Abbildung 13). In den gesamten Messintervallen lässt sich eine negative Gravitaxis für beide Organismen nachweisen, jedoch finden sich Unterschiede. In der senkrecht stehenden Versuchskammer nimmt der Grad der Orientierung bei *Paramecium* zu, bei *Euglena* ab. *Euglena* erreicht maximal einen r-Wert von 0,7, *Paramecium* von 0,5, so dass sich auch hier die präzisere Orientierung von *Euglena* zeigt. Weiterhin wurden die Schwimmgeschwindigkeiten von *Paramecium* und *Euglena* ermittelt, als Mittelwert über die gesamte Zeit (Tabelle A1), aufgeschlüsselt in 60s Intervalle entweder als Mittelwerte über alle

Richtungen (Abbildung 14 a, b) oder in Bezug zu den Schwimmrichtungen (Abbildung 14c, d). Die Analyse der Schwimmgeschwindigkeiten unter $1xg$ Bedingungen zeigt für die Beobachtungsdauer des Versuchs keinen signifikanten Unterschied in den gemittelten Geschwindigkeitswerten der Messintervalle für *Paramecium* als auch für *Euglena*. Dagegen unterscheiden sich Auf- und Abwärtsgeschwindigkeiten signifikant über den gesamten Zeitraum. Mit den ermittelten Sedimentationswerten (3.2) ergibt sich ein gravikinetischer Wert von $-60,20 \mu\text{m/s}$ für *Paramecium* und ein gravikinetischer Wert von $-3,86 \mu\text{m/s}$ für *Euglena*.

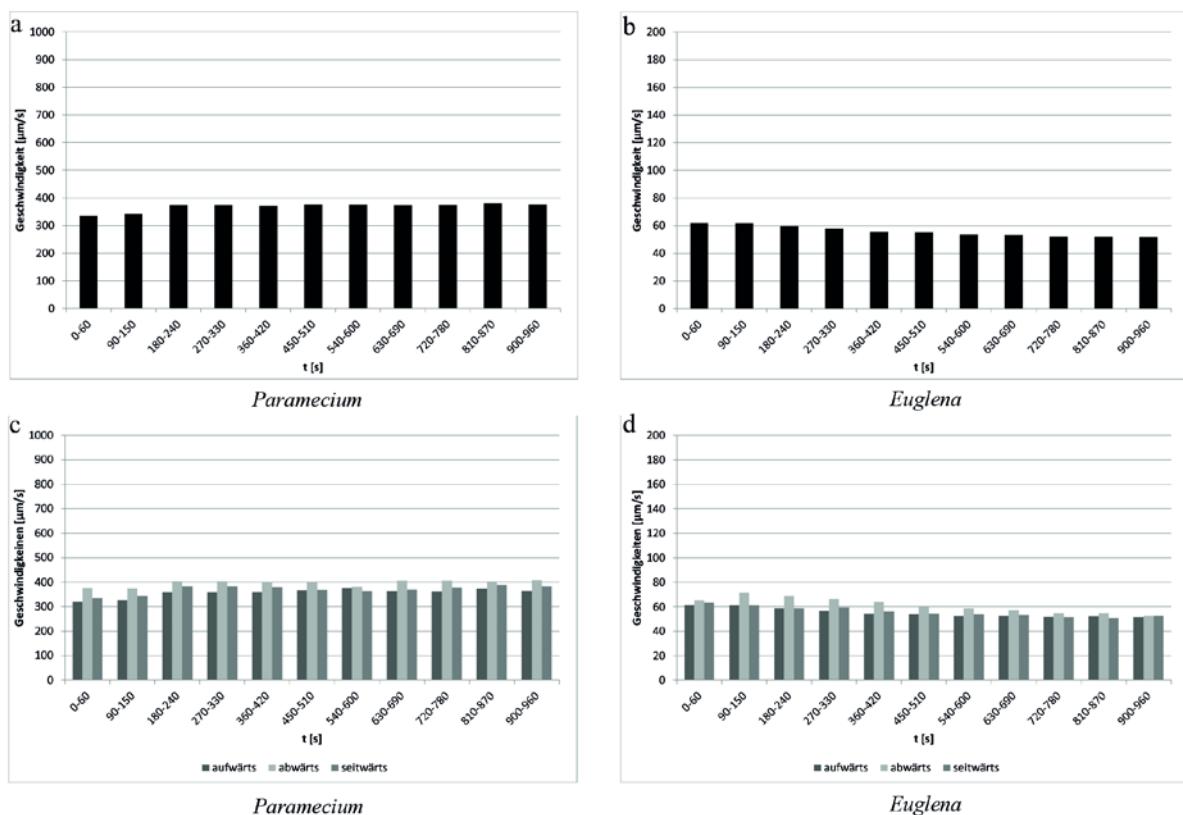


Abbildung 14: Schwimmgeschwindigkeiten von *Paramecium* (a, c) und *Euglena* (b, d) unter $1xg$ Bedingungen; (a, b) mittlere Schwimmgeschwindigkeiten, (c, d) aufgeteilt in die Fortbewegungsrichtungen.

3.4 2D-Modus: Klinostat vs. RPM getestet mit *Paramecium*

Der 2D-Klinostatenmodus wurde auf dem Klinostatenmikroskop sowie auf der RPM bei gleicher Drehgeschwindigkeit durchgeführt und die Ergebnisse gegenübergestellt. In Abbildung 13 sind mit den Histogrammen die Häufigkeit der erkannten Bewegungsrichtung abgebildet. Unabhängig ob der 2D-Klinostatenmodus auf dem Klinostaten oder der RPM appliziert wurde, zeigten die exponierten Proben bei beiden Umdrehungsgeschwindigkeiten (20, 60 rpm) eine Zufallsverteilung (r -Werte $\leq 0,1$). Die Grafiken entstanden jeweils während eines Messintervalls von 60s Dauer und wurden exemplarisch für jede Messung einmal abgebildet. Die zugehörigen exemplarischen Schwimmspuren (Abbildung 14) lassen keine Unterschiede basierend auf den Versuchsbedingungen erkennen.

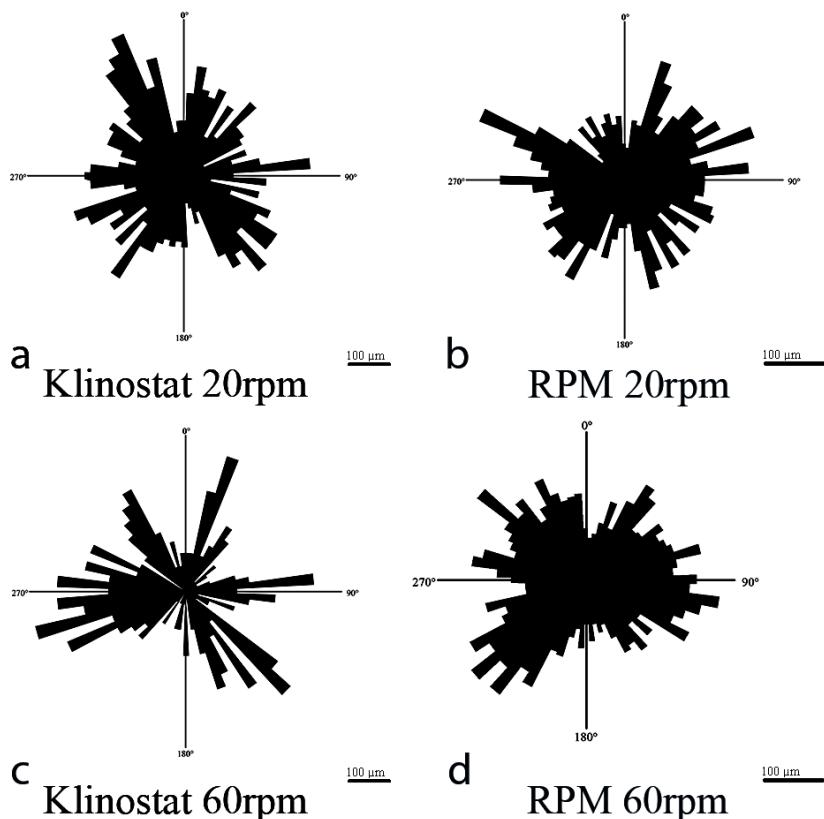


Abbildung 13: Histogramme von *Paramecium*, die während der Rotation des Klinostaten im 2D-Modus bei 20rpm (a) sowie 60rpm (c) sowie auf der RPM im 2D-Modus bei 20rpm (b) und 60rpm (d) ermittelt wurden.

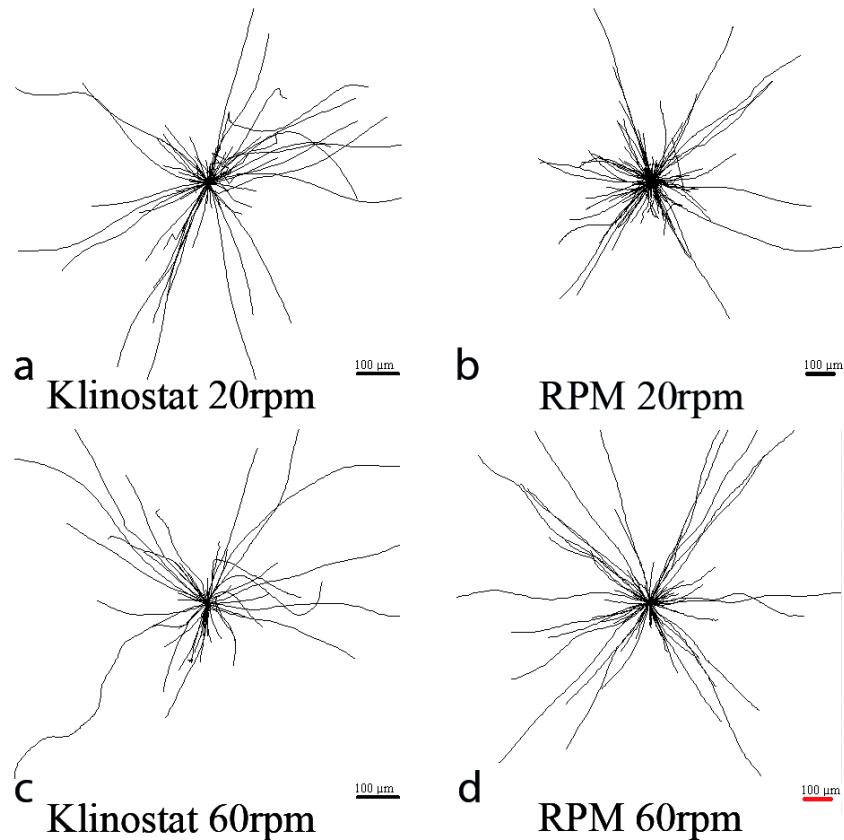
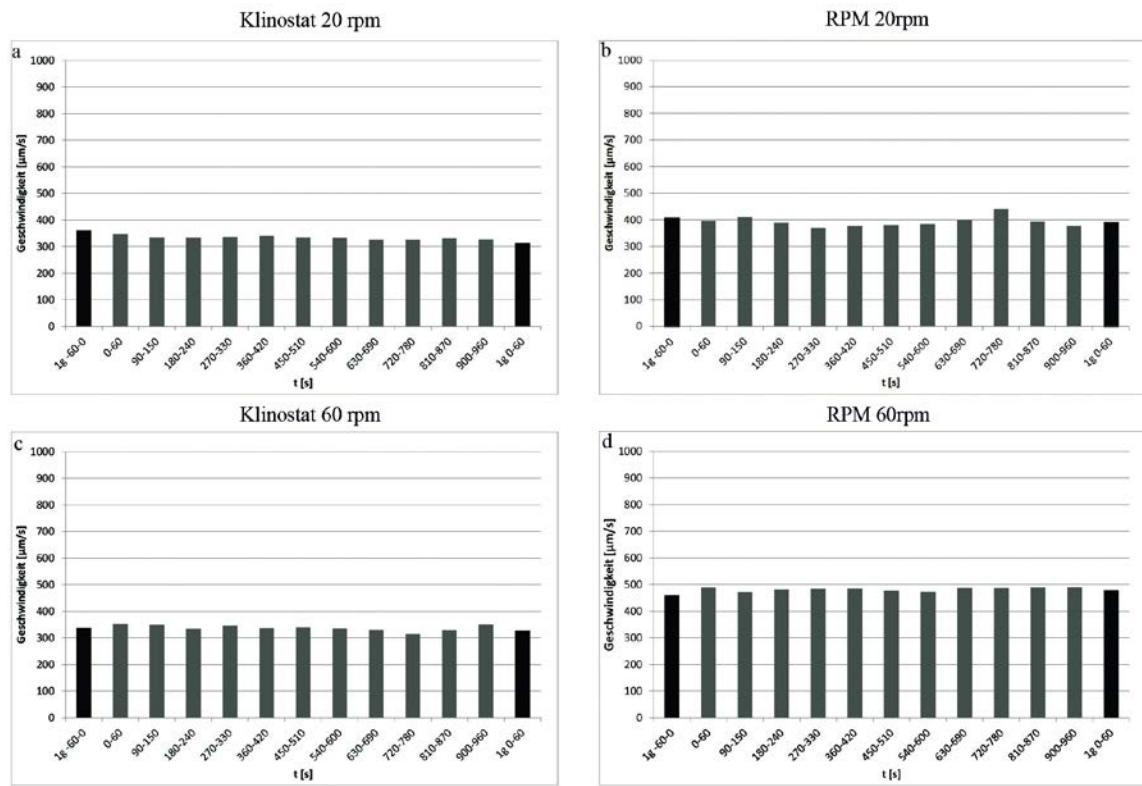


Abbildung 14: Schwimmbahnen von *Paramecium* im 2D-Klinostatenmodus auf dem Klinostaten (a, c) sowie auf der RPM (b, d) bei 20rpm (a, b) sowie 60rpm (c, d).

Die Messdaten zu Schwimmgeschwindigkeiten und Orientierung für den 2D-Klinostatenmodus sind in den Tabellen A2 – A5 zusammengefasst, wobei Vor- und der Nachlauf (1xg) jeweils 60s, betrug, der Zeitraum „bei Rotation“ 16 min entsprechend zu den Referenzexperimenten (3.3). Der Vergleich der gemessenen Gesamtgeschwindigkeiten vor der Rotation, mit denen die während der Rotation gemessen wurden ergab, dass sich die Mittelwerte aus beiden Datensätzen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Um mögliche Adaptationsvorgänge zu erkennen, wurden die Geschwindigkeiten und die Orientierungswerte aus den 60s Intervallen dargestellt. Die Darstellung der Geschwindigkeiten erfolgte als Mittelwerte über alle Richtungen (Abbildung 17) oder in Bezug zu den Schwimmrichtungen (Abbildung 18), wobei sich die Angaben aufwärts, abwärts, seitwärts während der Rotation auf die ursprüngliche Zuordnung beziehen. Es zeigen sich keine signifikanten Geschwindigkeitsänderungen durch das Anschalten der Versuchsanlagen. Die bei 1xg gemessen charakteristischen Geschwindigkeitsunterschiede

(Aufwärts- < Abwärtsgeschwindigkeit) ist bei Klinorotation aufgehoben, stellt sich aber nach Wiederherstellen von 1g sofort wieder ein.



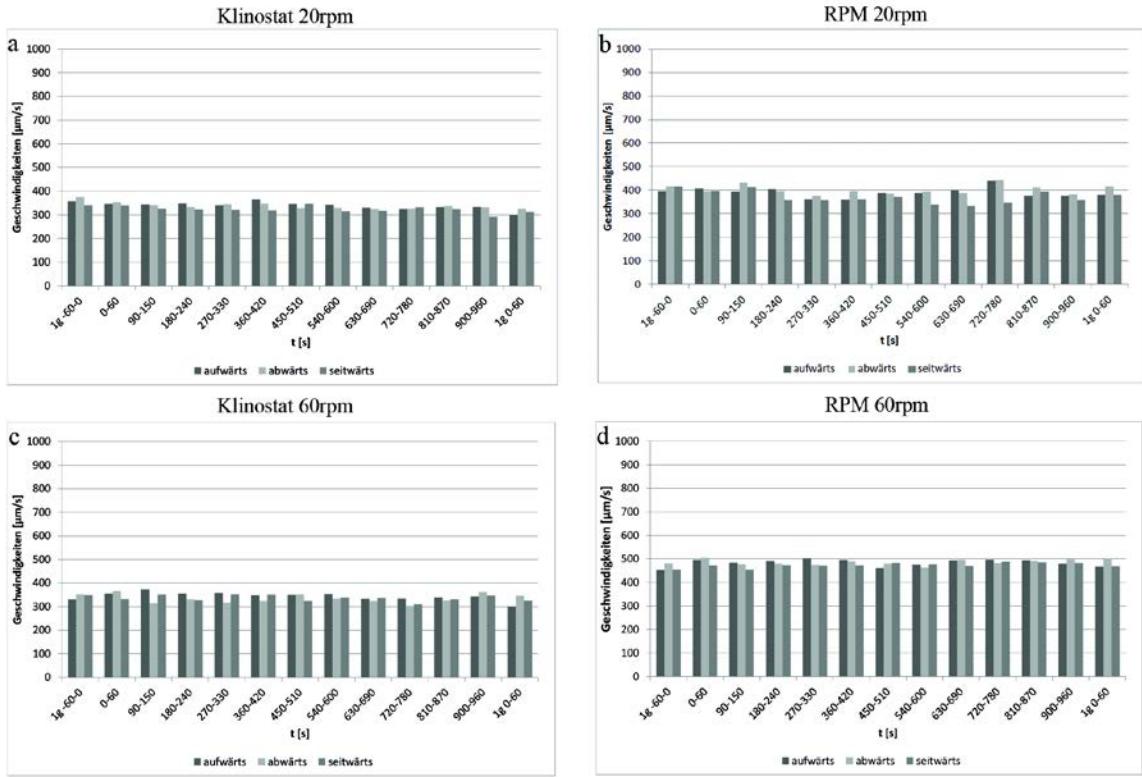


Abbildung 16: Gemittelte Geschwindigkeiten von *Paramecium* auf dem Klinostaten im 2D-Modus bei 20rpm (a) und 60rpm (c), sowie auf der RPM bei 20rpm (b) und 60rpm (d), aufgeteilt in die ursprünglichen Fortbewegungsrichtungen.

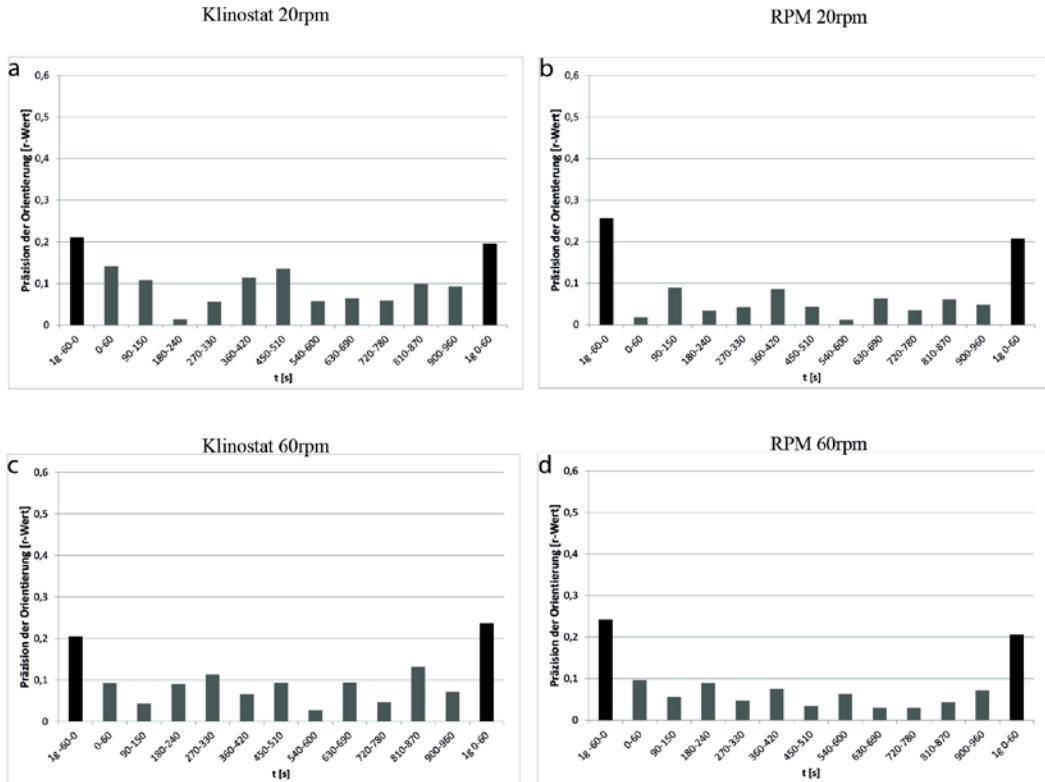


Abbildung 17: Grad der Orientierung, dargestellt durch den r-Wert für *Paramecium* während der 2D-Klinostaten Experimente auf dem Klinostaten bei 20rpm (a) sowie 60rpm (c) im Vergleich zur Exposition auf der RPM bei 20rpm (b) sowie 60rpm (d).

Betrachtet man den Grad der Orientierung so erkennt man bei Rotation der Versuchsanlage eine deutliche Abnahme. Während die $1 \times g$ r-Werte und die zugehörigen Vorzugswinkel die negative Gravitaxis zeigen, verdeutlichen entsprechenden Werte im Klinostatenmodus dass eine Zufallsverteilung vorliegt (Kriterium r-Wert $< 0,1$) (Abbildung 19).

3.5. 2D-Modus: Klinostat vs. RPM mit *Euglena* als getesteten Organismus

In Analogie zu den Experimenten mit *Paramecium* erfolgten die Versuche mit *Euglena* im 2D-Modus auf dem Klinostatenmikroskop sowie der RPM bei 20rpm und 60rpm. In Abbildung 20 sind charakteristische Histogramme eines 60s Messintervalls dargestellt, welche die Häufigkeit einer erkannten Bewegungsrichtung wiedergeben. Wie bei *Paramecium* zeigt sich eine Aufhebung der Gravitaxis, *Euglena* weist eine Zufallsverteilung auf. Abbildung 21 zeigt die zugehörigen Schwimmspuren von *Euglena* während der Rotation bei 20rpm sowie 60rpm auf beiden Experimentplattformen. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu *Paramecium*. Trotz der Zufallsverteilung sind die Schwimmbahnen wellenförmig im Gegensatz zu den geradlinigen Spuren von *Paramecium*.

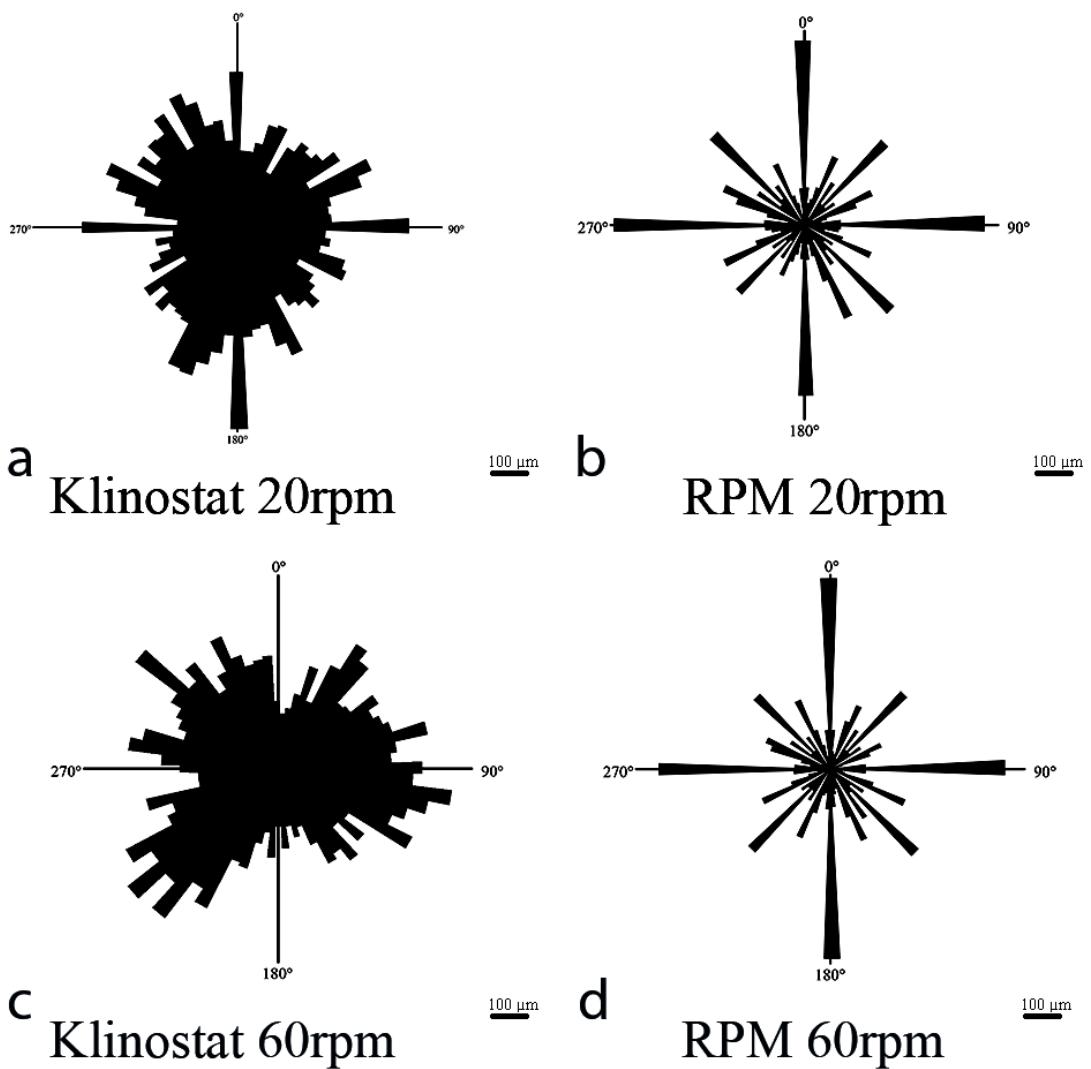


Abbildung 18: Histogramme von *Euglena* auf Klinostat und RPM im 2D-Modus auf dem Klinostaten bei 20rpm (a) sowie 60rpm (c) sowie der RPM bei 20rpm (b) und 60rpm (d).

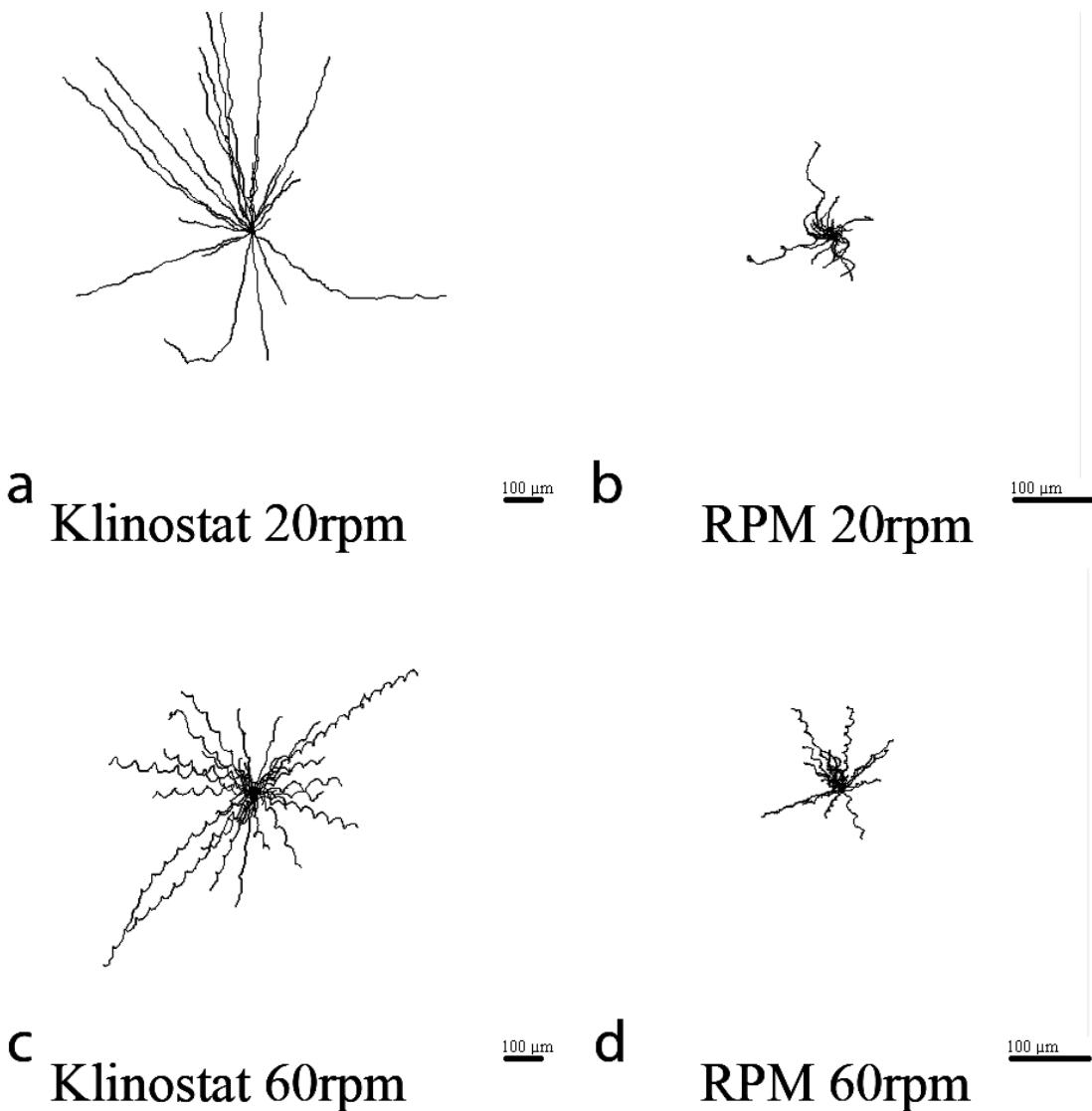


Abbildung 19: Schwimmbahnen von *Euglena* im 2D-Klinostatenmodus auf dem Klinostaten bei 20rpm (a) sowie 60rpm (c), sowie der RPM bei 20rpm (b) und 60rpm (d).

Der Vergleich der erhobenen Gesamtgeschwindigkeiten von *Euglena*, die vor der Rotation, mit den Daten, die während der Rotation ermittelt wurden, ergab, dass sich die gemessenen Mittelwerte der beiden Datensätze nur im 2D-Modus 60rpm auf dem Klinostaten signifikant unterscheiden. Hier wurde eine Erhöhung um 40% ermittelt. Betrachtet man die Geschwindigkeitsänderungen im Detail, d.h. in den einzelnen Messintervallen im Versuchsverlauf (Abbildung 22, 23) so lässt sich in allen Modi eine anfängliche Geschwindigkeitserhöhung beobachten. Auch bei *Euglena* werden die für 1xg typischen Geschwindigkeitsunterschiede (Aufwärts- < Abwärtsgeschwindigkeit) bei Klinorotation aufgehoben.

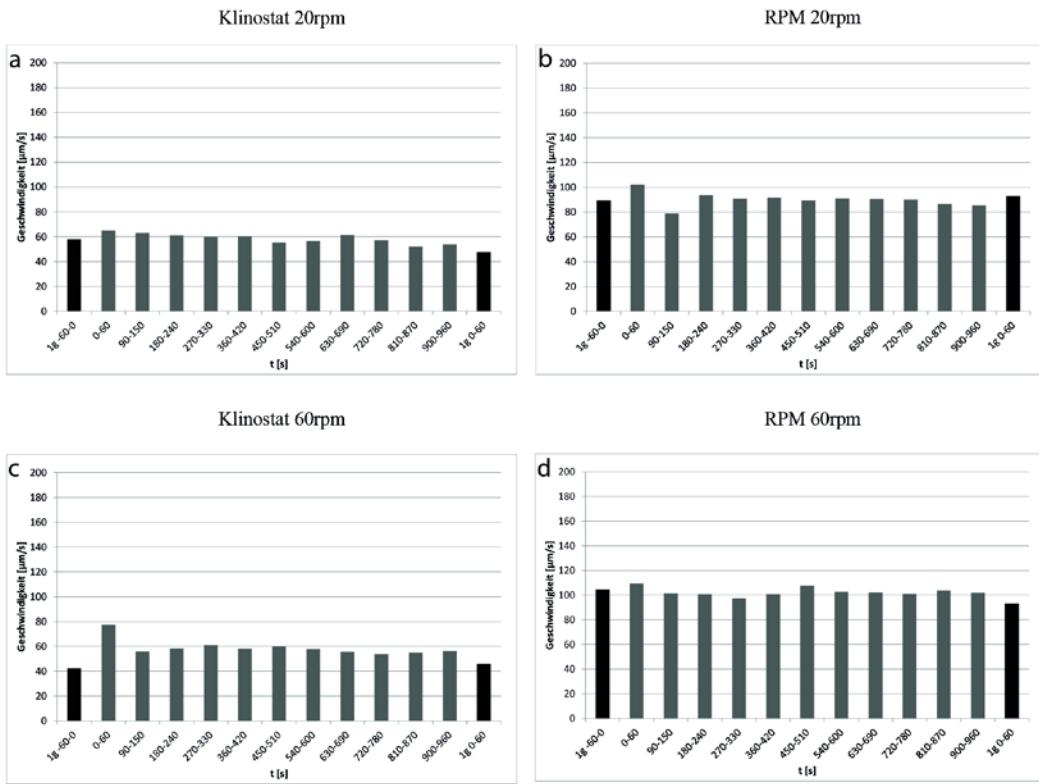


Abbildung 202: Die durchschnittliche Geschwindigkeit von *Euglena* im 2D-Modus auf dem Klinostaten sowie im 2D-Modus auf der RPM bei verschiedenen Drehgeschwindigkeiten. Auf den Klinostaten bei 20rpm (a) und 60rpm (c), sowie auf der RPM bei 20rpm (b) und 60rpm (d).

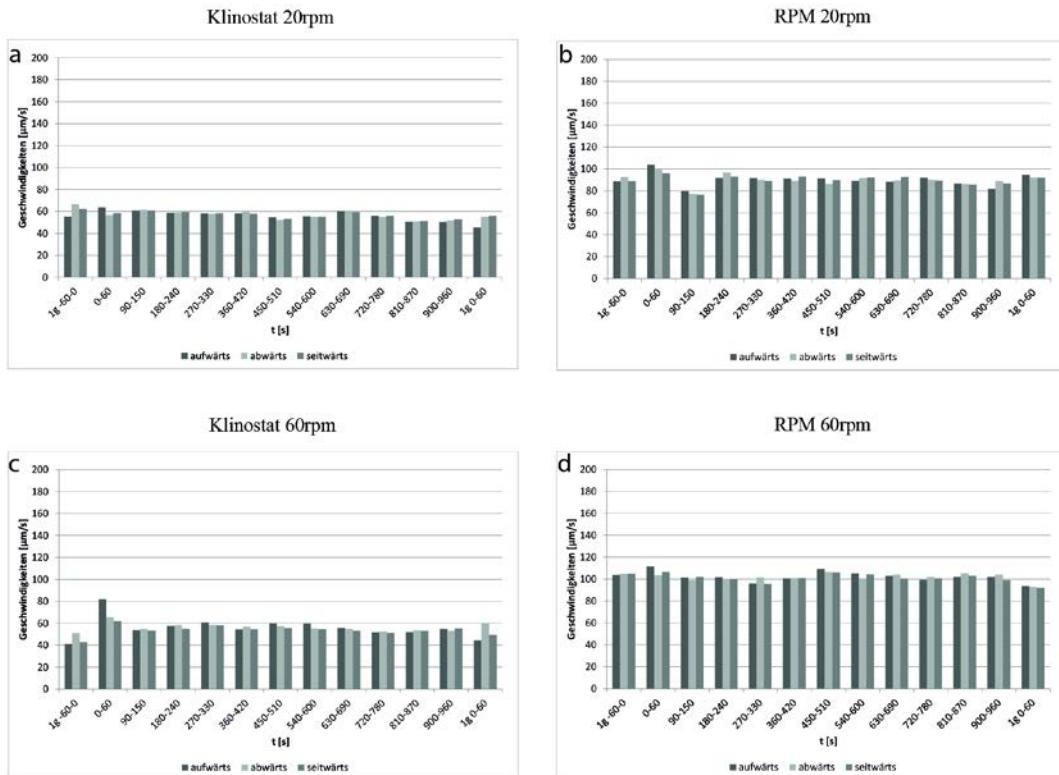


Abbildung 21: Durchschnittliche Geschwindigkeiten von *Euglena* im 2D-Klinostatenmodus. Gegenübergestellt sind die Schwimmgeschwindigkeiten auf dem Klinostat bei 20rpm (a) sowie bei 60rpm (c) im Vergleich mit den Geschwindigkeiten, die auf der RPM bei 20rpm (b) sowie 60rpm (d) gemessen wurden.

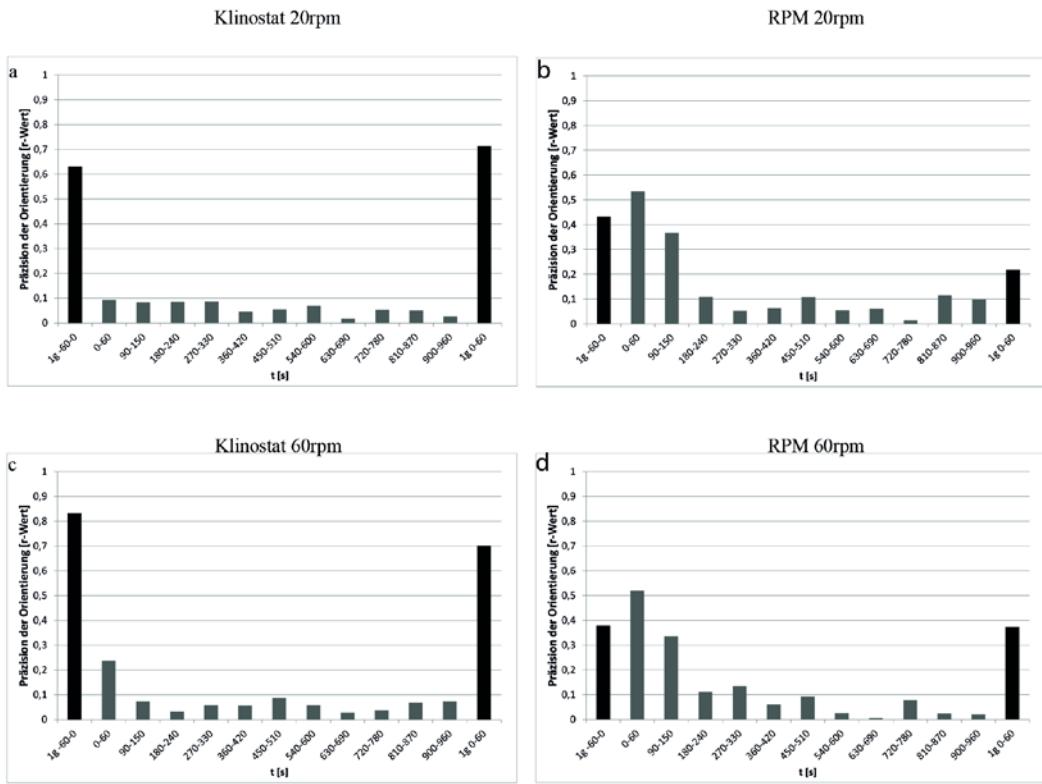


Abbildung 24: Abgebildet ist die Präzision der Orientierung (r-Wert) von *Euglena* während Experimenten im 2D-Klinostatenmodus. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse auf dem Klinostaten bei 20rpm (a) sowie 60rpm (c) und der RPM bei 20rpm (b) und 60rpm (d).

Auf dem Klinostaten bei 20rpm Umdrehungsgeschwindigkeit ist bereits im ersten Messintervall keine Vorzugsrichtung der Orientierung der Euglenen mehr vorhanden, was sich in der randomisierte Verteilung der Bewegungsrichtungen zeigt. Bei 60rpm ist eine Zufallsverteilung erst im Zeitintervall 90s -150s messbar. Für die RPM zeigt sich im 2D-Klinostatenmodus zunächst eine Verbesserung der Orientierung, die Zufallsverteilung ist erst nach 180s erreicht (Abbildung 24).

3.6 3D-Modus der RPM

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Verhaltensänderungen von *Paramecium* und *Euglena* dargestellt, die erfolgen, wenn die RPM im 3D-Modus betrieben wird, d.h. beide Achsen mit konstanter Geschwindigkeit und Richtung laufen. Die Histogramme in Abbildung 13 zeigen unabhängig vom Modus eine Zufallsverteilung der Objekte. Die zugehörigen Schwimmspuren zeigen anders als im 2D-Modus bei *Paramecium* eine Abnahme der Linearität und abrupte Richtungswechsel. Bei *Euglena* zeigen sich elliptische Kreisbahnen die sich im Raum verschieben (Abbildung 26).

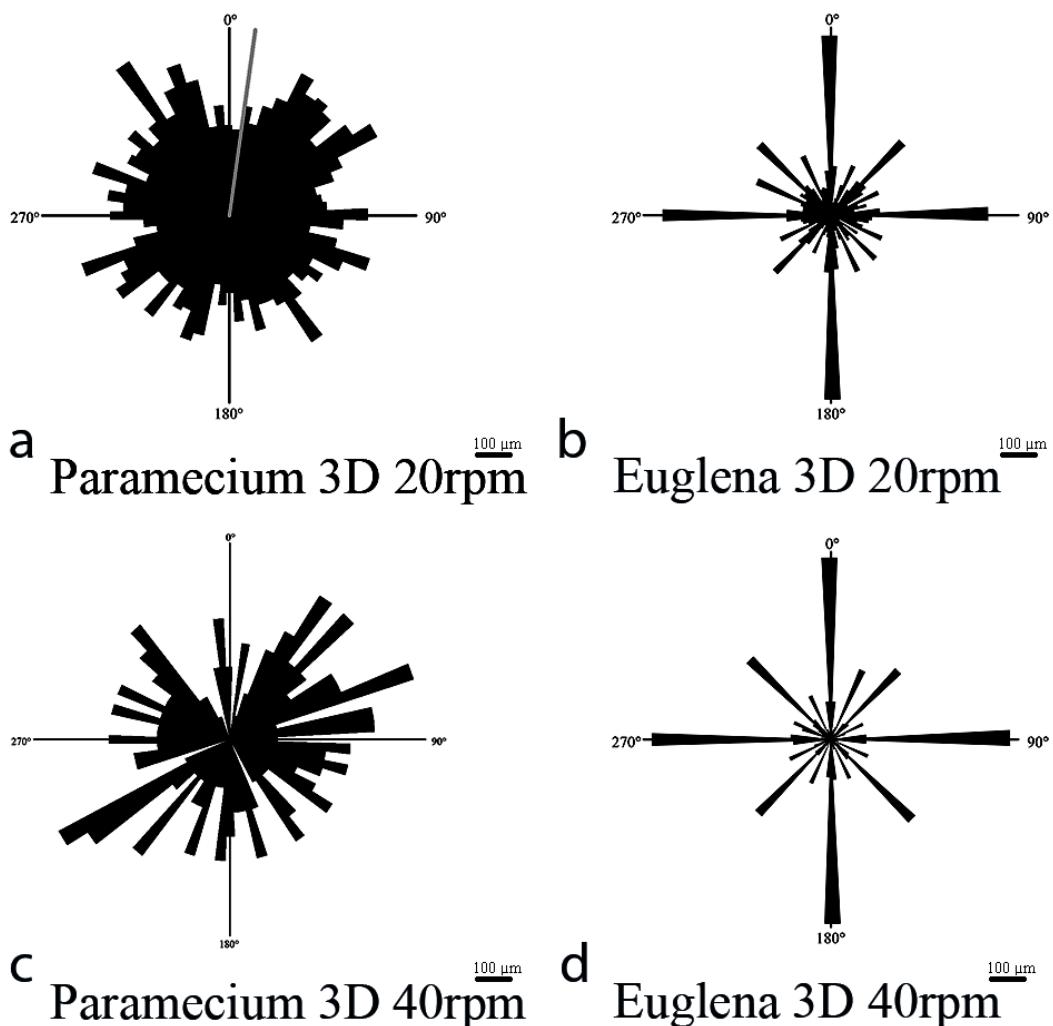


Abbildung 22: Zirkularhistogramme zur Orientierung von *Paramecium* und *Euglena* auf der RPM im konstanten 3D-Klinostatenmodus bei 20rpm (a, b) und 60rpm (c, d).

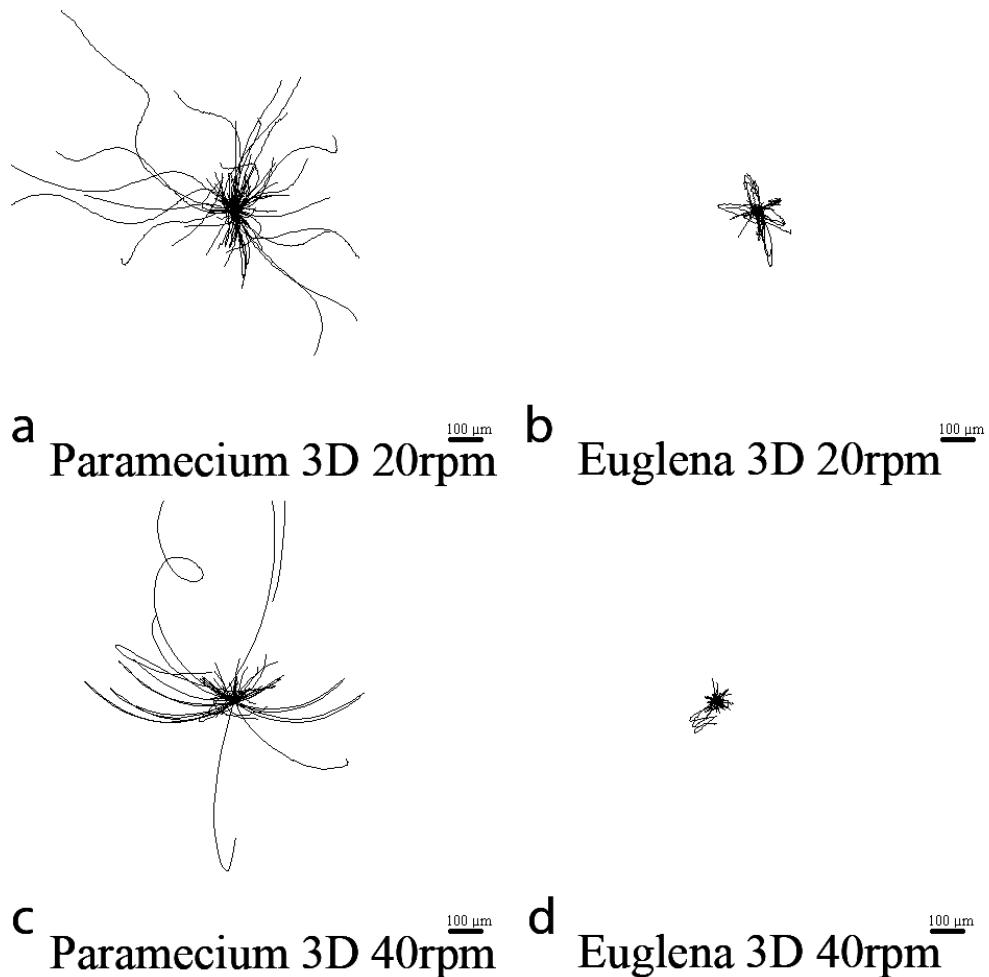


Abbildung 23: Schwimmspuren von *Paramecium* (a, c) und *Euglena* (b, d) auf der RPM im 3D-Klinostatenmodus bei konstanten 20rpm (a, b) und 40rpm (c, d).

Im Vergleich zu 1xg (vor Rotation) erhöht sich die mittlere Schwimmgeschwindigkeit bei *Paramecium* um 17% (20rpm) (Tabelle A10), bzw. 75% (40rpm) (Tabelle A11) bei 3D-Klinorotation. Auch die Detailanalyse demonstriert die Zunahme der Geschwindigkeit, besonders deutlich bei 40rpm (Abbildung 27).

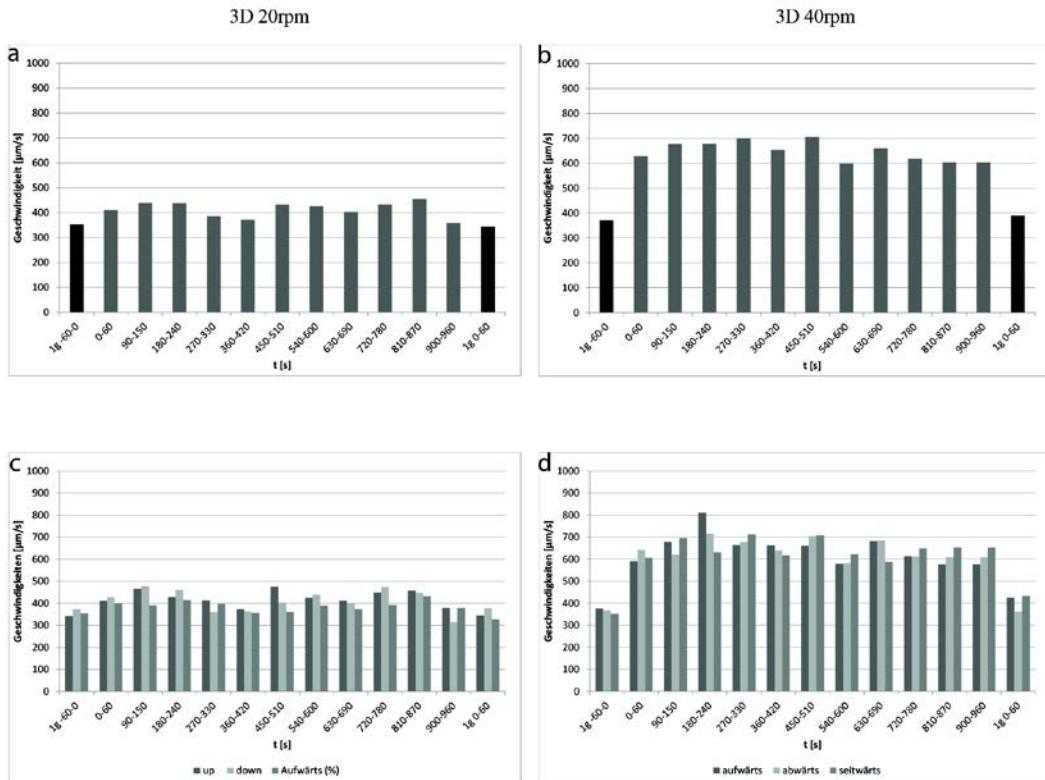


Abbildung 24: Schwimmgeschwindigkeiten von *Paramecium* im 3D-Modus bei 20rpm (a) sowie 40rpm (b). Darunter sind die Ergebnisse der Messintervalle aufgeteilt in die jeweilige (ursprünglichen) Bewegungsrichtung bei 20rpm (c) und 40rpm (d).

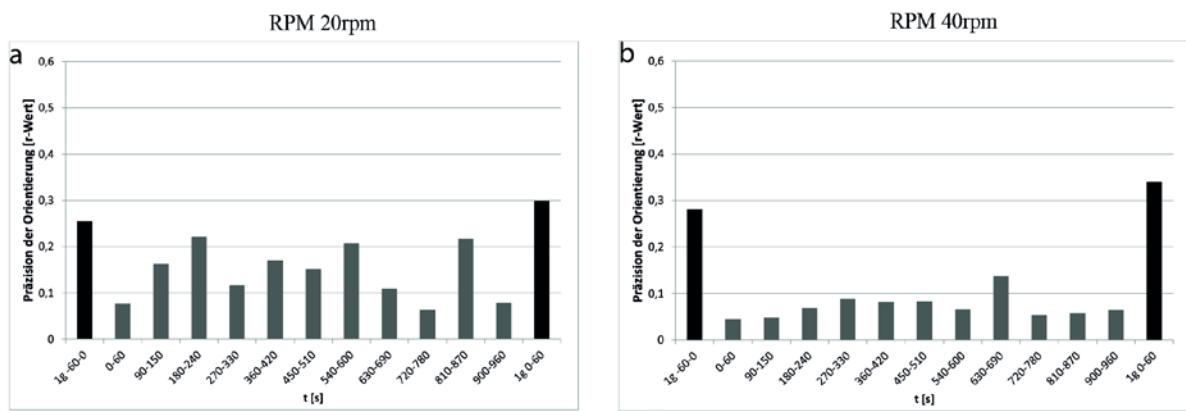


Abbildung 25: Präzision der Orientierung für *Paramecium* auf der RPM gemessen im 3D-Klinostatenmodus bei konstanten 20rpm (a) und 40rpm (b).

Im 3D-Klinostatenmodus bei 20 und 40rpm erfolgt eine Abnahme der Orientierung, wobei bei 20 rpm nur selten eine Zufallsverteilung erreicht wird und die r-Werte stark schwanken. Eine höhere Rotationsgeschwindigkeit (40rpm) sorgte für einen stärkeren Verlust der Präzision der Orientierung, die Zufallsverteilung wird ab dem ersten Messintervall erreicht (Abbildung 28).

Im Vergleich zu 1xg (vor Rotation) erhöht sich die mittlere Schwimmgeschwindigkeit bei *Euglena* um 45% (20rpm) (Tabelle A12), bzw. 169 % (40rpm) (Tabelle A13) bei 3D-Klinorotation. Die Detailanalyse demonstriert die stetige Zunahme der Geschwindigkeit über den Zeitverlauf bei 40rpm (Abbildung 29). Bei 20rpm zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Schwimmrichtungen, während bei 40rpm die Geschwindigkeit in die ehemalige (1xg) Aufwärtsrichtung auffällt.

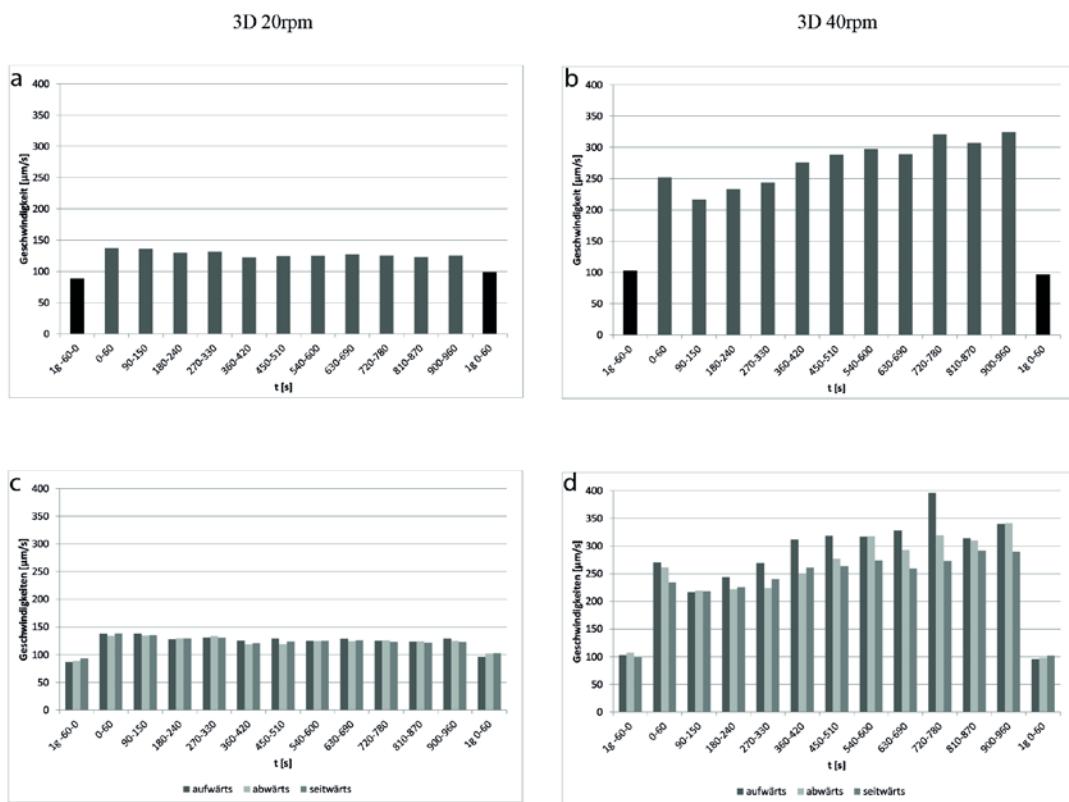


Abbildung 26: Die gemittelten Geschwindigkeiten von *Euglena* im 3D-Modus bei konstanten 20rpm (a) sowie 40rpm (b). Darunter sind die Ergebnisse der Messintervalle aufgeteilt in ihre ursprüngliche Bewegungsrichtung bei 20rpm (c) und 40rpm (d) abgebildet.

Im 3D-Klinostatenmodus bei 20 und 40rpm erfolgt eine direkte Abnahme der Orientierung. In diesem Modus wurden die geringsten r-Werte ermittelt (Abbildung 30).

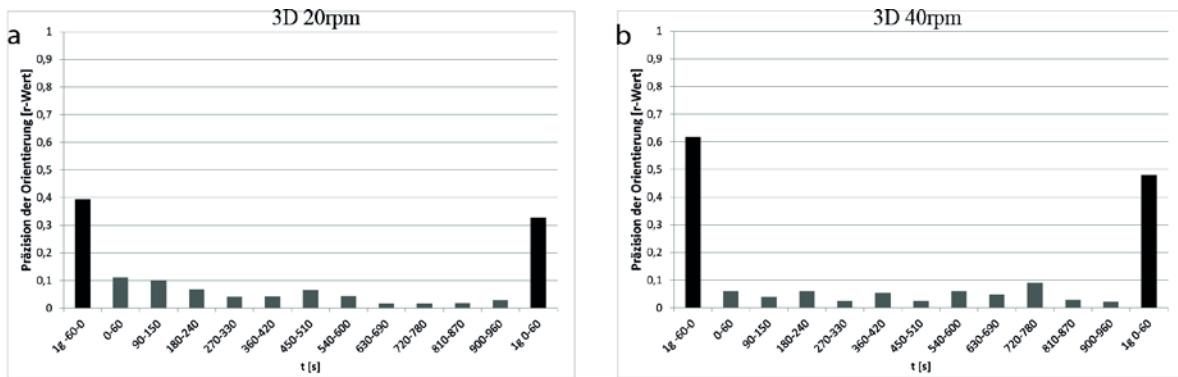


Abbildung 30: Präzision der Orientierung für *Euglena* auf der RPM gemessen im 3D-Klinostatenmodus bei konstanten 20rpm (a) und 40rpm (b) Umdrehungsgeschwindigkeit.

3.7 Real Random Mode mit Random Direction und Random Interval

Der Real Random Mode (RRM) mit Random Direction und Random Interval zeichnet sich durch eine ungleiche Geschwindigkeit von innerem und äußerem Rahmen aus. Zudem ändert sich sowohl die Geschwindigkeit als auch die Richtung der Rotation in randomisierten Zeitabständen.

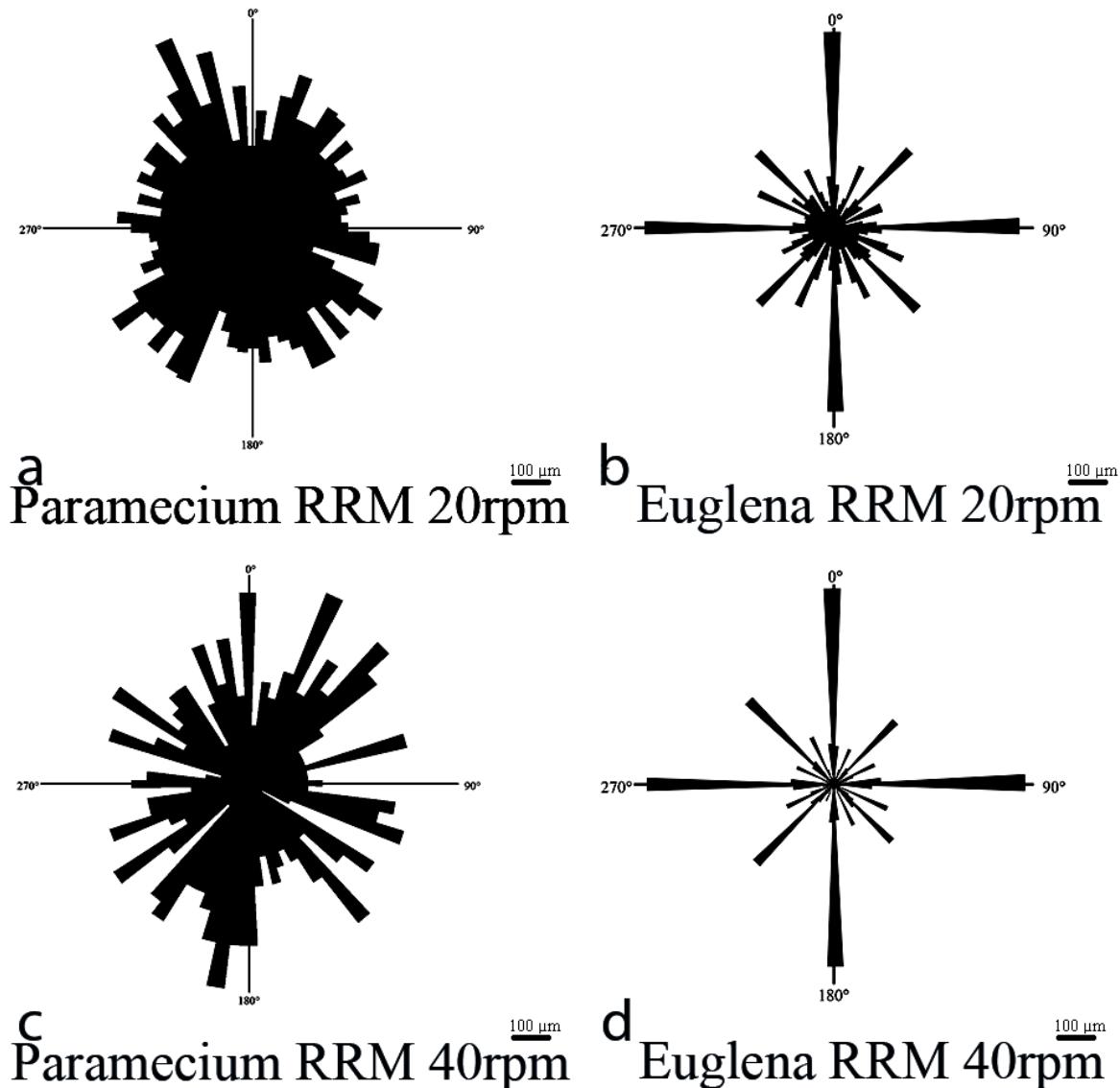


Abbildung 27: Histogramme von *Paramecium* (a, c) und *Euglena* (b, d) während Experimenten auf der RPM im Real Random Modus mit Random Direction und Random Intervall bei 20rpm (a, b) und 40rpm (c, d) Umdrehungsgeschwindigkeit.

Wieder erkennt man in allen Modi eine Zufallsverteilung der Schwimmrichtungen von *Paramecium* und *Euglena* (Abbildung 31). Wegen der Kürze der Schwimmspuren konnten für *Euglena* im real Random Mode 20rpm keine Spuren aufgezeichnet werden, da das Programm das verfolgte Individuum verlor. Bei 40rpm sind abrupte Richtungswechsel erkennbar (Abbildung 32).

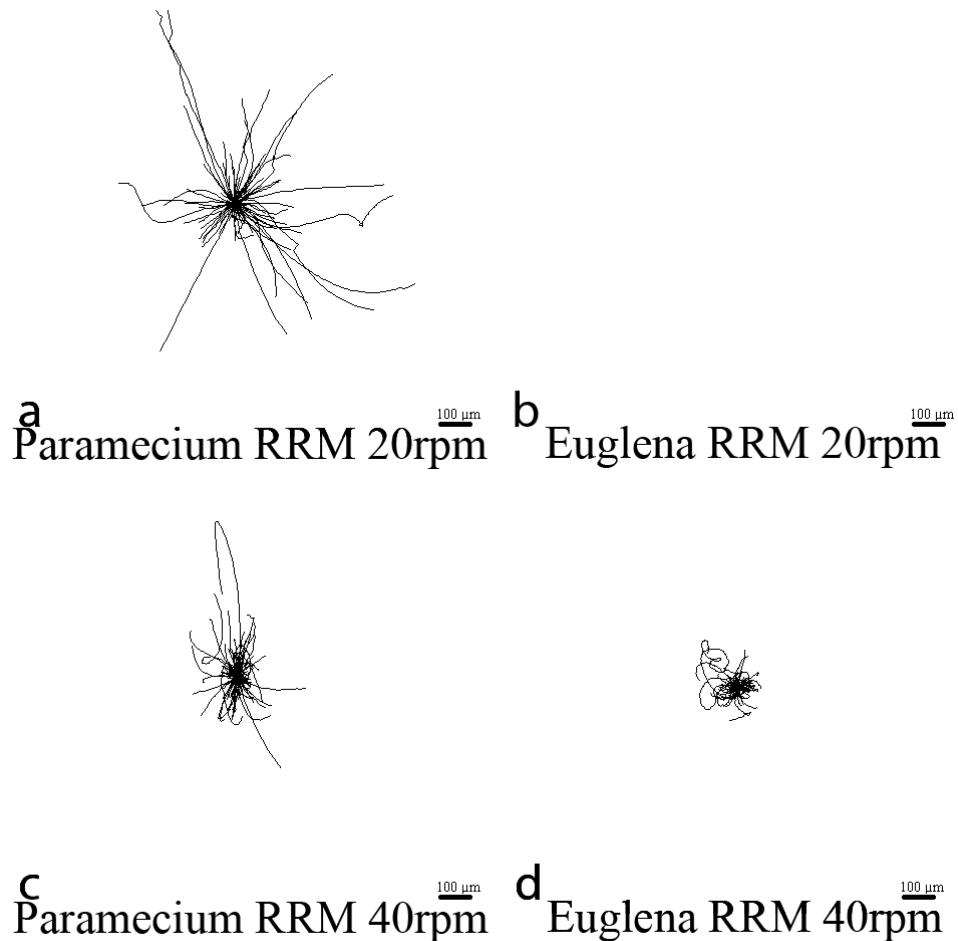


Abbildung 28: Schwimmspuren von *Paramecium* (a, c) und *Euglena* (b, d) während Experimenten auf der RPM im Real Random Modus mit Random Direction und Random Intervall bei 20rpm (a, b) und 40rpm (c, d) Umdrehungsgeschwindigkeit.

Für *Paramecium* konnte im Vergleich zu $1 \times g$ (vor Rotation) eine Geschwindigkeitserhöhung von 14% (20rpm) und 55% (40rpm) registriert werden. Der Detailverlauf demonstriert die konstante Erhöhung bei 20rpm und stark schwankende erhöhte Werte bei 40rpm (Abbildung 33).

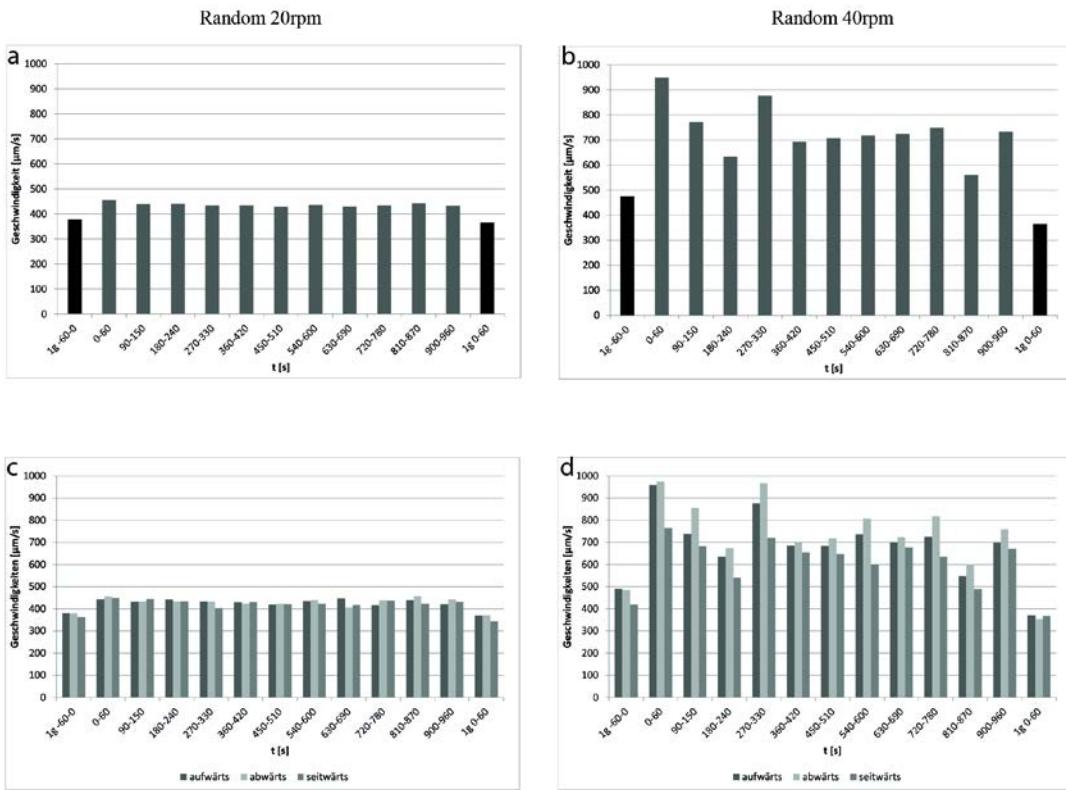


Abbildung 33: Die gemittelten gemessenen Geschwindigkeiten von *Paramecium* im Real Random Modus mit Random Direction sowie Random Interval bei 20rpm (a) sowie 40rpm (b). Darunter sind die Ergebnisse der Messintervalle, aufgeteilt in ihre Bewegungsrichtung bei 20rpm (c) und 40rpm (d) abgebildet.

Im Real Random Modus bei 20 und 40 rpm erfolgt eine Abnahme der Orientierung, wobei sich bei 40 rpm ein stärkerer Verlust der Präzision der Orientierung zeigt (Abbildung 34). Die Werte sind in den Tabellen A14 und A15 angegeben.

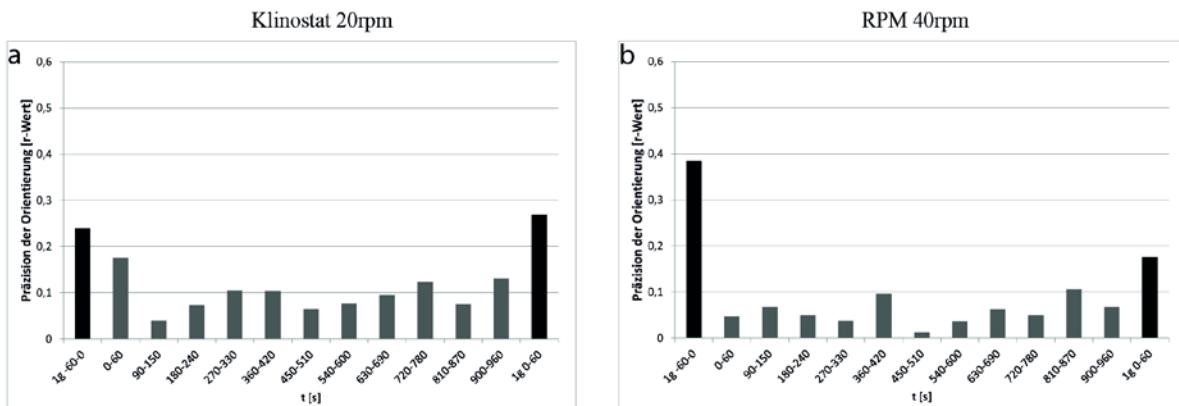


Abbildung 294: Präzision der Orientierung für *Paramecium* auf der RPM gemessen im Real Random Modus mit Random Direction sowie Random Interval 20rpm (a) und 40rpm (b) Umdrehungsgeschwindigkeit.

Für *Euglena* konnte im Vergleich zu 1xg (vor Rotation) eine Geschwindigkeitserhöhung von 28% (20rpm) und 125% (40rpm) registriert werden. Der Detailverlauf demonstriert die dramatische Erhöhung bei 40rpm (Abbildung 35). Bei beiden Umdrehungsgeschwindigkeiten wird eine sofortige und konstante Zufallsverteilung erreicht (Abbildung 36). Die dazugehörigen Tabellen sind A16, A17.

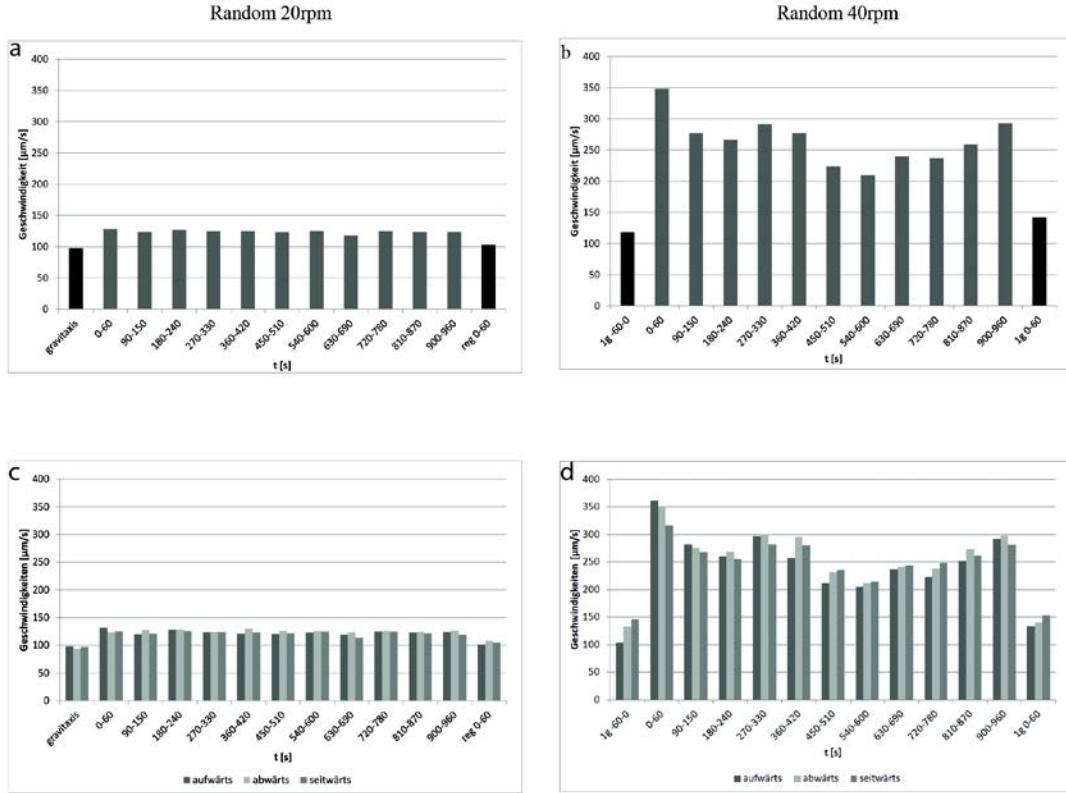


Abbildung 30: Die gemittelten Geschwindigkeiten von *Euglena* im Real Random Modus mit Random Direction sowie Random Intervall bei 20rpm (a) sowie 40rpm (b). Darunter sind die Ergebnisse der Messintervalle, aufgeteilt in ihre Bewegungsrichtung bei 20rpm (c) und 40rpm (d) abgebildet.

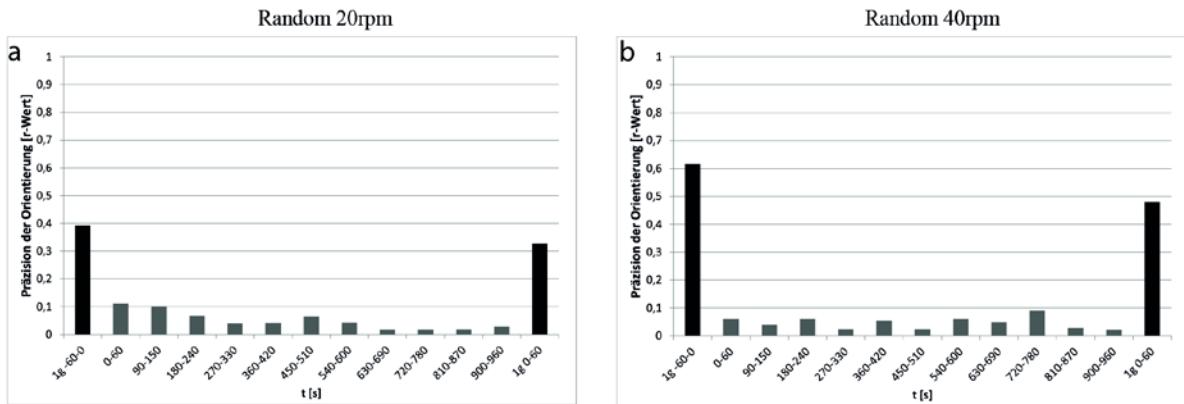


Abbildung 31: Präzision der Orientierung für *Euglena* auf der RPM gemessen im Real Random Modus mit Random Direction sowie Random Interval bei 20rpm (a) und 40rpm (b) Umdrehungsgeschwindigkeit.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob man mit einem Klinostaten oder einer Random Positioning Machine simulierte Mikrogravitation erreichen kann. Diese Anlagen werden von verschiedenen Arbeitsgruppen eingesetzt, um herauszufinden welchen Effekt die Schwerkraft auf einen Organismus hat und um Voraussagen über sein Verhalten in realer Mikrogravitation zu treffen. Meistens werden die Proben (z. B. Zellkulturen in Suspension oder adhäsente Zellen, Pflanzen und Mikroorganismen) exponiert und der Status danach untersucht (als Review siehe Herranz et al. 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag geleistet werden, was bei Rotation der Proben passiert. Getestet wurde bei unterschiedlichen Betriebsmodi der Anlagen, im 2D-Klinostatenmodus (Rotation um eine Achse senkrecht zur Richtung des Gravitationsvektors), im 3D-Klinostatenmodus (Rotation um 2 Achsen, die mit konstanter Richtung und Geschwindigkeit laufen) und Real Random Mode mit Random Direction bei dem Richtung und Geschwindigkeit durch ein kommerzielles Computerprogramm definiert werden. Um zu verstehen, welchen Effekt die Rotation auf die Probe hat, wurden beide Plattformen mit einer Optik ausgestattet, um das Schwimmverhalten der Protozoen aufzuzeichnen und anschließend mit computergestützter Bildanalyse zu analysieren. Da sowohl für *Paramecium* als auch für *Euglena* Daten über das Schwimmverhalten in echter Schwerelosigkeit vorliegen, eignen sie sich besonders für die gewählte Aufgabenstellung. Anhand dieser Daten sollen Rückschlüsse auf die Qualität der Simulation gezogen werden.

4.1 Glasbeads zeigen die vorherrschenden Beschleunigungen

Glasbeads zeigen in eindrucksvoller Weise die Auswirkungen der verschiedenen Rotationsmodi. Im 3D-Modus kann die RPM durch die zweite Drehachse nicht mehr direkt mit dem Klinostatenmikroskop verglichen werden. Die Spurbilder der Glasbeads (siehe Abb. 10) zeigen erhebliche Unterschiede zu den Bildern unter 2D-Rotation (Abb. 9). Im 3D-Klinostatenmodus auf der RPM, bei dem sich beide Achsen mit gleichen und konstanter Geschwindigkeit drehen, erkennen wir einen helikalen Verlauf der Schwimmbahn, wobei sie allmählich aus dem Zentrum abgelenkt werden. Dies deutet darauf hin, dass das Objekt nicht auf eine Kreis-, oder Kugelbahn gezwungen wird (wie im Fall des 2D-Klinostaten), sondern, dass das Objekt von einer wirkenden Kraft aus dem Drehzentrum beschleunigt wird. Im Real Random Mode auf der Random Positioning Machine werden die Bahnen zufallsverteilt, beschreiben ausladende Bögen und lassen den Zeitpunkt der Richtungsänderung der RPM erkennen. Die Objekte werden dabei stark beschleunigt und durch den Raum bewegt. Im Real Random Mode mit Random Intervall und Random Direction wird das Bild der Schwimmspuren von sehr kurzen Aufzeichnungsintervallen geprägt; folglich sind sie sehr kurz. Das spricht dafür, dass die Beads plötzlich einer hohen Beschleunigung ausgesetzt sind und ihre Geschwindigkeit so stark zunimmt, dass sie von der Analysesoftware nicht weiter verfolgt (getrackt) werden können. Die wenigen längeren Spuren zeigen abrupte Richtungswechsel. Da die in diesem Versuch verwendeten Glasbeads unterschiedliche Größen <100µm hatten, handelt es sich bei den längeren Spuren wahrscheinlich um größere Beads. Sie haben durch ihre höhere Masse ein höheres Trägheitsmoment und werden daher nicht so schnell beschleunigt wie die kleineren, leichteren Beads. An diesen Spuren zeigt sich, dass die Beads auf helikalen Bahnen aus dem Drehzentrum nach außen beschleunigt werden.

4.2 Wahl der Versuchsparameter – 1xg Referenzexperimente

Die Referenzexperimente bei 1xg sollten zeigen, ob sich die Parameter Orientierung und Schwimmgeschwindigkeit eignen, um potentielle Einflüsse durch die Exposition der Proben auf den diversen Versuchsplattformen zu demonstrieren. Die negative Gravitaxis kann für beide Organismen gezeigt werden und bestätigt damit die Befunde anderer (als Review siehe Häder et al. 2005a). Der Vergleich der Histogramme (Abb. 11) beider Organismen bei 1xg zeigt für *Paramecium* eine größere Streuung der Vorzugsrichtung , als sie bei *Euglena* vorzufinden ist. Dies spiegelt sich auch in dem um 29% höheren Linearitätswert von *Euglena* im Vergleich zu *Paramecium* wider. Die Ursache könnte in den unterschiedlichen Antriebsformen liegen. Während der Kraftschlag von *Euglena* nur von einem Flagellum

ausgeführt wird, ist bei *Paramecium* ein koordinierter metachromer Schlag von circa 10.000 Cilien für die Fortbewegung verantwortlich.

Die Dauer der Versuchszeit der Referenzexperimente wurde in Analogie zu bereits durchführten Experimenten auf Höhenforschungsraketen (7 – 12min Mikrogravitationszeit) festgelegt. Die negative Gravitaxis lässt sich über den Beobachtungszeitraum von 16 Minuten beobachten. Die Präzision der Orientierung nimmt mit der Zeit bei *Paramecium* leicht zu. Die Ausrichtung der Versuchskammer (180° Drehung) zu Beginn der Messung kann hierfür als Grund angesehen werden. Zu Beginn der Messung dauerte es eine Weile, bis die gesamte Population sich an die neue Richtung des Gravitationsvektors angepasst hat. Da diese Neuorientierung nicht bei allen Individuen einer Population gleich schnell abläuft, sondern die Anpassung der Richtung bei jedem Individuum individuell passiert, ist es nicht verwunderlich, dass zunächst sogar ein leichter Rückgang der Orientierung stattfindet. Nachdem sich die Gesamtheit der Population auf die neue Reizlage eingestellt hat und sich an dieser orientiert, nimmt auch die Präzision der Orientierung wieder zu, was nach ca. 180s beobachtet werden kann.

Bei *Euglena* dagegen kann über die observierte Zeit eine permanente Abnahme der Orientierung in der senkrecht stehenden Versuchskammer beobachtet werden, wobei aber nach 16 Minuten immer noch eine präzise negative Gravitaxis zu beobachten ist. Die Präzision der Orientierung nimmt für *Euglena* kontinuierlich über den Versuchszeitraum des 1xg-Experiments ab. Auch *Euglena* muss sich zunächst auf die neue Reizlage nach 180° Drehung der Versuchskammer zu Versuchsbeginn einstellen. Hierdurch nimmt die gesamte Population zunächst eine Veränderung der Richtung des Reizes wahr, auf die sie reagiert. Mit zunehmender Zeit sind jedoch immer mehr Organismen durch das Sichtfeld der Kamera geschwommen und die Anzahl von Beobachtungen oder Bewegungen nimmt mit der Zeit immer weiter ab, bis nur noch jene Individuen der Population observiert werden, welche möglicherweise bedingt durch eine geringere Fitness, auch eine geringere Präzision der Orientierung aufweisen. Die ermittelte Präzision der Orientierung ist am Anfang der Messung für die *Euglena* deutlich höher als bei *Paramecium* (Abbildung 12) fällt jedoch über die Zeit immer weiter ab. Der obere Teil der Beobachtungskammer wurde von mir nicht beobachtet, sondern nur die Mitte. Man kann aber davon ausgehen, dass sich *Euglena* dort ansammelt, denn dreht man eine Kammer um 180° so konnte ich beobachten, dass sich die Anzahl der zu Euglenen stark erhöht, die mit hoher Präzision durch das Sichtfenster schwimmen. Dies ist bei *Paramecium* nicht der Fall ist. Rein rechnerisch braucht ein *Paramecium* bei der ermittelten

durchschnittlichen Geschwindigkeit von $367,82\mu\text{m}/\text{s}$ etwa 60s um die Kammer zu durchschwimmen. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Individuen der *Paramecium* Population am oberen Rand der Küvette über die beiden Seiten wieder nach unten schwimmen. Anders kann der permanente und konstante Strom von Individuen, die in Vorzugsrichtung schwimmen über die gesamte Versuchsdauer nicht erklärt werden.

Die mittleren Geschwindigkeiten bleiben ebenso wie die signifikanten Unterschiede von Auf- und Abwärtsgeschwindigkeiten über die Versuchsdauer in etwa konstant. Die ermittelten Geschwindigkeiten für die Messungen der Grundgeschwindigkeiten sind zum Teil recht verschieden. Die Differenz der Raumtemperatur des nicht klimatisierten Versuchsräums könnte ein Grund für abweichende Geschwindigkeiten sein. Auch eine Neuausrichtung (180° Drehung) der Versuchskammer vor Beginn des Versuchs kann hierbei eine erhöhte Schwimmgeschwindigkeit zur Folge haben. Da aber diese Faktoren während eines Versuchs konstant sind, betreffen sie das gesamte Experiment, da ich ja die Unterschiede in Bezug zu dem direkten Vorlauf bei $1xg$ betrachtet. Aber auch physiologische Faktoren, wie Alter der Kultur (Stallwitz und Häder 1994), Sauerstoffsättigung des Mediums (Hemmersbach-Krause et al. 1991) können die Unterschiede verursachen.

Die von mir ermittelten Sedimentationsgeschwindigkeiten immobilisierter Einzeller betrug $80,16\mu\text{m}/\text{s} \pm 26,79\mu\text{m}/\text{s}$ für *Paramecium biaurelia*, bzw. $28,84\mu\text{m}/\text{s} \pm 2,91\mu\text{m}/\text{s}$ für *Euglena gracilis*. Damit liegt der Sedimentationswert für *Paramecium* in der Größenordnung bereits publizierter Werte ($84\mu\text{m}/\text{s}$ - Hemmersbach-Krause et al. 1993; $74,24\mu\text{m}/\text{s}$ – Simon 2012). Der in der vorliegenden Arbeit bestimmte Sedimentationswert von *Euglena gracilis* ist größer als die von Vogel et al. ($7\mu\text{m}/\text{s}$), sowie Simon (2013) ($13,83\mu\text{m}/\text{s}$) ermittelten Werte. Die Sedimentationswerte gehen direkt in die Berechnung zur Prüfung, ob eine Gravikinese vorhanden ist, ein. Danach lässt sich für *Paramecium* unter meinen Versuchsbedingungen unter $1xg$ eine gravikinetische Komponente von $-60,20\mu\text{m}$ berechnen und damit das Vorhandensein einer Gravikinese bestätigen (Machemer et al. 1991; Bräucker et al. 1994; Hemmersbach-Krause et al. 1993a). Aus meinen ermittelten Daten besitzt auch *Euglena* die Fähigkeit, die Gravitation zur Modulation ihrer Schwimmgeschwindigkeit zu nutzen. Die gravikinetische Komponente für *Euglena* wurde in dieser Arbeit mit $-3,86\mu\text{m}/\text{s} \pm 1,7\mu\text{m}/\text{s}$ bestimmt. Dieser Wert ist sehr gering ist und auch ist zu beachten, dass die Größe des Sedimentationswertes direkt in die Berechnungen einfließt. Dies könnte die Ursache für die kontroverse Diskussion um das Vorhandensein einer Gravikinese bei *Euglena* sein (Häder et al. 2005a; Machemer-Röhnisch et al. 1999). Die Referenzexperimente demonstrieren, dass die

Parameter Orientierung und Schwimmgeschwindigkeit aufgrund ihrer Konstanz bei 1xg grundsätzlich für die Analyse im Rahmen der Arbeit geeignet sein sollten. Beide Parameter ändern sich in realer Mikrogravitation, wie in Flugexperimenten nachgewiesen wurde (Hemmersbach-Krause et al. 1993, a, b; 1996; Häder et al. 1995; 1996; Machemer und Bräucker 1992; Machemer et al. 1991). Dabei zeigte sich innerhalb weniger Sekunden nach Aussetzen des Schwerkraftreizes eine Zufallsverteilung der Schwimmspuren, sowie eine erhöhte Schwimmgeschwindigkeit innerhalb der ersten 4 Minuten im Fall von *Paramecium*. *Euglena* zeigte ebenso einen Verlust von Gravitaxis (Häder et al. 1995; Häder et al. 2006) und eine Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit durch Wegfall der Sedimentation im Rahmen der 7 minütigen Experimente. Bei den Höhenforschungsraketen - Experimenten ist zu berücksichtigen dass vor der Mikrogravitationsphase eine Beschleunigungsphase von max. 5xg durch die Startbeschleunigung liegt, in der sich die Schwerkraftantworten sogar noch verstärken (Hemmersbach-Krause et al. 1993a, b).

4.3 Verhalten im 2D-Klinostatenmodus

Im 2D-Modus unterscheiden sich RPM und Klinostat in ihrer Wirkungsweise nicht voneinander. In beiden Maschinen wird die zu beobachtende Probe um eine zum Gravitationsvektor senkrecht stehende Achse gedreht. Bei gleicher Rotationsgeschwindigkeit zeigen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsanlagen. In beiden Konfigurationen ist ein random Schwimmen der bei 1xg negativ gravitaktischen Objekte nach maximal 240s Klinorotation zu verzeichnen (Abb. 18, 23). Man findet direkt nach Anschalten der Anlage eine Phase der Restorientierung, die mit einer temporären Geschwindigkeitserhöhung einhergeht, d.h. die Einzeller behalten noch die alte Schwimmrichtung, die dann allmählich randomisiert wird. Damit werden bereits publizierte Daten von *Paramecium* und *Euglena* auf dem 2D-Klinostaten bestätigt und damit ihre enge Korrelation zu dem Verhalten in realer Mikrogravitation (Hemmersbach-Krause et al. 1993a,b; Vogel et al. 1993). Wie lange eine Restorientierung beibehalten wird offensichtlich auch durch die Beschleunigungszeit der jeweiligen Anlagen bestimmt. In der vorhandenen Konfiguration braucht das Klinostatenmikroskop im Vergleich zur RPM längere Zeit, bis die Endgeschwindigkeit erreicht ist. So dauert es bis zu einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 20rpm ca. 5s und bis 60rpm ca. 20s auf dem Klinostatenmikroskop, bei der RPM weniger als 1s. Hierdurch ergibt sich eine wesentlich geringere Beschleunigungszeit der Organismen auf der RPM.

4.4 Verhalten im 3D-Klinostatenmodus

Die Zunahme der zweiten Rotationsachse bringt keine Verbesserung im Hinblick auf die Simulation und die Vergleichbarkeit mit den Daten aus realer Mikrogravitation. Zwar wird für *Paramecium* und *Euglena* die Randomverteilung erreicht, unterliegt aber höheren Schwankungen. Die Geschwindigkeiten der Organismen steigen in Abhängigkeit von der Umdrehungsgeschwindigkeit der RPM im Versuchsverlauf kontinuierlich an. Dabei werden Geschwindigkeiten erreicht die weit über ihren aktiven Schwimmgeschwindigkeiten liegen. Daraus ist zu schließen, dass eine kontinuierliche Beschleunigung der Organismen verursacht durch den 3D-Modus erfolgt. Ob eine kugelförmige Versuchskammer diesen Effekt mindern würde, bleibt zu prüfen.

4.5 Verhalten im Real Random Modus mit Random Interval und Random Direction

Auch die schnelle Änderung der Richtung und der Geschwindigkeit im 3D Real Random bewirkt wieder eine Randomverteilung der Organismen. Die Geschwindigkeiten bei 20rpm gleichen denen im 2D-Klinostatenmodus, wobei eine Ablenkung der Organismen von den ursprünglichen Schwimmbahnen beobachtet wird. Bei 40rpm sind die Geschwindigkeiten stark erhöht und liegen deutlich über den aktiven Schwimmgeschwindigkeiten, vergleichbar wie im 3D-Modus.

4.6 Fazit der Untersuchungen

Die Geschwindigkeit zeichnete sich in den Untersuchungen als Parameter aus, der den direkten Einfluss der Beschleunigungen auf die Organismen widerspiegelt. Um die Diversität der ermittelten Geschwindigkeiten besser anschaulich darstellen zu können, wurden die Geschwindigkeiten aus den verschiedenen Versuchsbedingungen gemittelt und mit den zugehörigen Standardabweichung abgebildet. Die Zunahme der Standardabweichung im Verhältnis zu 1xg wird bei allen Betriebsmodi deutlich. Sie sind im Klinostaten unabhängig von der Umdrehungsgeschwindigkeit der Anlage. Das Hinzufügen einer zweiten Rotationsachse für den 3D-Modus hat eine Zunahme der Standardabweichungen zur Folge. Auffällig ist die Zunahme der Geschwindigkeiten und Standardabweichungen bei 40rpm. Durch den schnellen Betrieb der Anlage wird keine Verbesserung erreicht. Die Organismen werden auf Geschwindigkeiten beschleunigt, die ihre Eigengeschwindigkeit um das Doppelte übersteigen.

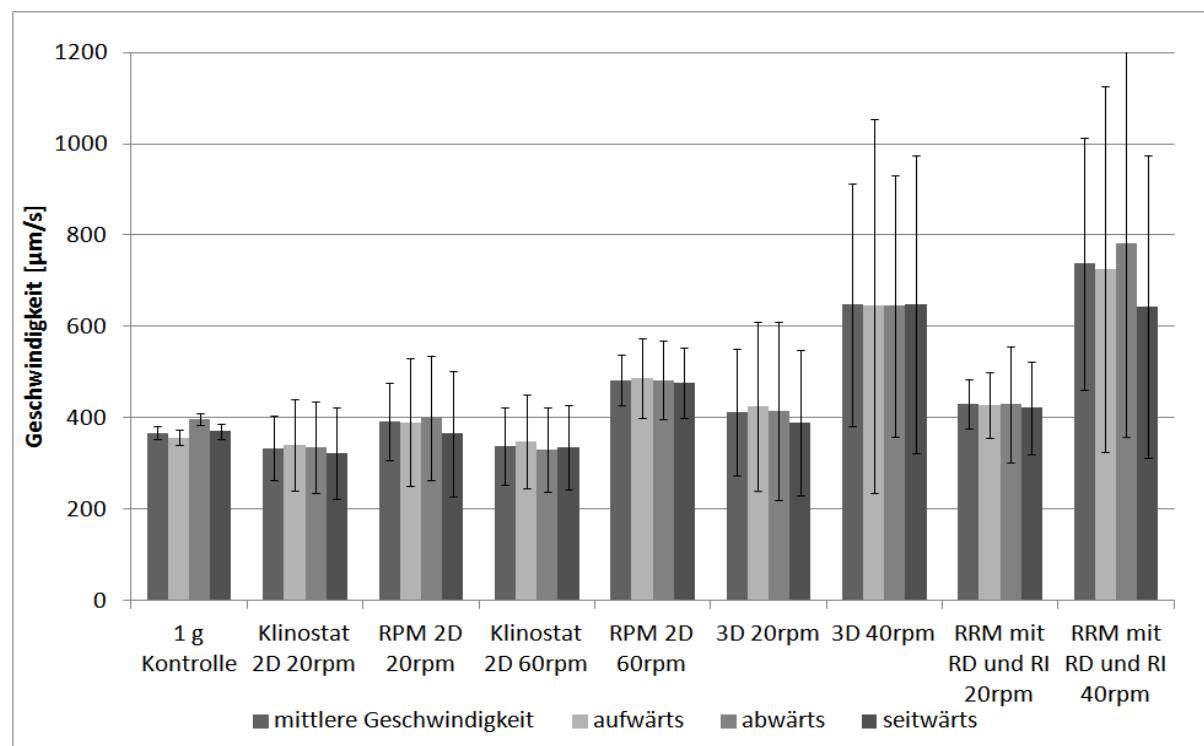


Abbildung 32: Zusammenfassung der gemittelten Geschwindigkeiten für *Paramecium*. Jede Gruppe von Balken zeigt die gemittelten Geschwindigkeiten mit den entsprechenden Standardabweichungen an.

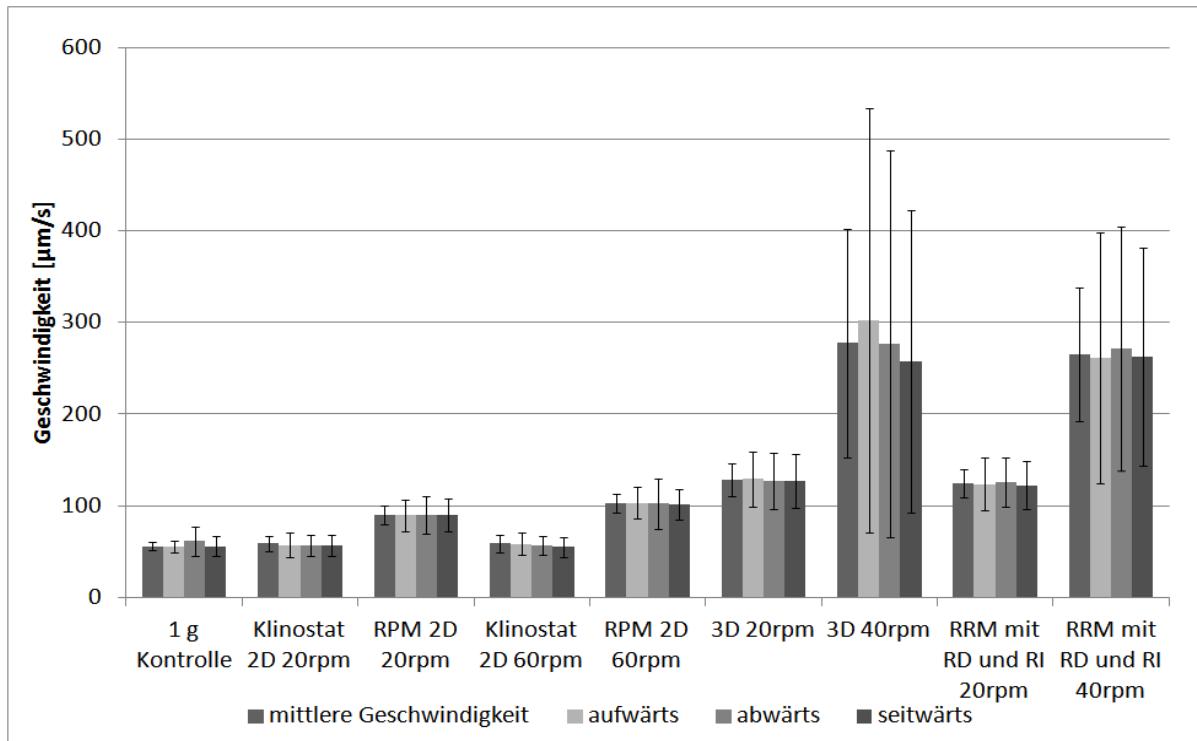


Abbildung 33: Zusammenfassung der gemittelten Geschwindigkeiten für *Euglena*. Jede Gruppe von Balken zeigt die gemittelten Geschwindigkeiten mit den entsprechenden Standardabweichungen an.

Als Schlussfolgerung der Ergebnisse dieser Arbeit muss die Verwendung einer Random Positioning Machine mit zwei rotierenden Achsen kritisch betrachtet werden. Im Vergleich zu dem 2D-Klinostaten bringt die Zunahme einer zweiten Rotationsachse keine Vorteile, da die Organismen stark beschleunigt werden. Bei einer Simulation von Mikrogravitation sollten Beschleunigungskräfte auf die Organismen so weit wie möglich reduziert werden, so dass möglichst keine Kraft mehr auf die Organismen wirkt. Dies erreichen wir in dem 2D-Klinostatenmodus möglichst nah am Drehzentrum.

5. Zusammenfassung:

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob man mit einem 2D oder 3D-Klinostaten oder einer Random Positioning Machine simulierte Mikrogravitation für die gravitaktischen Protozoen *Paramecium biaurelia* und *Euglena gracilis* erreichen kann. Glasbeads wurden zur Demonstration der physikalischen Vorgänge bei Rotation eingesetzt. Im 2D-Klinostatenmodus zeigen sie die zu erwartenden Kreisbahnen gemäß der Hypothese. In den 3D-Modi wurde dagegen eine helikale Spur der Glasbeads aufgezeichnet, die sich immer weiter aus dem Rotationszentrum entfernt. Eine Erhöhung der Geschwindigkeit, welche im 2D-Modus zu einer Verringerung der aufgezeichneten curkularen Spur führt, sorgt bei Rotationen beider Achsen für eine vergrößerte Ablenkung der observierten Partikel innerhalb der auf zwei Dimensionen begrenzten Kammer.

In realer Mikrogravitation zeigen *Paramecium* sowie auch *Euglena* eine randomisierte Schwimmbewegung ohne eine Vorzugsrichtung der Bewegung ausmachen zu können, da die Gravitation als Vektor zur Orientierung nicht mehr vorhanden ist. Kontrollexperimente zeigen unter $1xg$ Bedingungen eine orientierte Bewegung gegen den gegebenen Vektor (negative Gravitaxis). Ein weiterer Anhaltspunkt für Mikrogravitation und damit die Güte der Simulation ist die Aufhebung der Gravikinese, wobei dieser Aspekt für *Euglena* umstritten ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für *Euglena* eine Gravikinese nachgewiesen werden, jedoch in einem so geringen Ausmaß, dass sich dieses Ergebnis auch durch Ungenauigkeiten in den Messungen erklären lassen. Bei 2D-Klinorotation zeigen *Paramecium* und *Euglena* ein vergleichbares Verhalten wie in realer Mikrogravitation, charakterisiert durch den Verlust der Orientierung. Das Hinzufügen einer zweiten Rotationsachse für den 3D-Modus bringt keine Vorteile für die Simulation, was sich in der starken Zunahme der Standardabweichungen zeigt. Die gemessene Präzision (r -Wert) während der Rotation mit beiden Achsen fällt deutlich und sofort nach Beginn der Messung ab. Der Vergleich mit den hierbei ermittelten Geschwindigkeiten und vor allem durch das Betrachten der Schwimmspuren kann genau beobachtet werden, dass die beobachteten Bewegungen nicht vom Organismus aktiv kontrolliert werden, sondern dass die bereits bei den Glasbeads entdeckte Beschleunigung, zu einer Ablenkung der Organismen in alle Richtungen führt. Im Real Random Mode auf der Random Positioning Machine werden die Bahnen zufallsverteilt, beschreiben ausladende Bögen und lassen den Zeitpunkt der Richtungsänderung der RPM erkennen. Die Objekte werden dabei stark beschleunigt. Als Schlussfolgerung der Ergebnisse dieser Arbeit muss die Verwendung einer Random Positioning Machine mit zwei rotierenden Achsen kritisch betrachtet werden. Im Vergleich zu dem 2D-Klinostaten bringt die Zunahme einer zweiten

Rotationsachse keine Vorteile, da die Organismen stark beschleunigt werden. Bei einer guten Simulation von Mikrogravitation sollten Beschleunigungs Kräfte auf die Organismen so weit wie möglich reduziert werden, so dass möglichst keine Kraft mehr auf die Organismen wirkt. Dies erreicht man mit dem 2D-Klinostatenmodus möglichst nah am Drehzentrum. Dagegen sind in allen 3D-Modi Kräfte zu beobachten, die die Organismen beschleunigen.

6. Literaturverzeichnis

Batschelet E (1985) Circular Statistics in Biology. In: Academic Press, London

Borst A, van Loon J (2009) Technology and developments for the random positioning machine, RPM. Microgravity Sci Technol 21:287-292

Bouck G.B., Ngo H. (1996): Cortical structure and function in euglenoids with reference to trypanosomes, ciliates, and dinoflagellates. Int. Rev. Cytol. 169, 267-318.

Bräucker R, Machemer-Röhnisch S, Machemer H (1994) Graviresponses in *Paramecium caudatum* and *Didinium nasutum* examined under varied hypergravity conditions. J Exp Biol 197:271-294

Briegleb W (1966) Ein Modell zur Schwerelosigkeits-Simulation an Mikroorganismen. Naturwissenschaften 54: 167

Briegleb W (1992) Some qualitative and quantitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. ASGSB Bulletin 5:23-30

Fenchel T, Finlay BJ (1986) The Structure and function of Müller vesicles in loxodid ciliates. J. Protozool. 33:69-75

Fukui K, Asai H, (1985) Negative geotactic behavior of *Paramecium caudatum* is completely described by the mechanism of buoyancy-oriented upward swimming. Biophysical Journal 47: 479-482

Gibbs S.P. (1978) The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. Can. J. Bot. 56, 2883-2889.

Goldstein S.F. (1992) Flagellar beat patterns in algae. In: Melkonian M., Algal Cell Motility. Chapman and Hall, New York, 1-38.

Häder DP, Porst M, Tahedl H, Richter P, Lebert M (1997) Gravitactic orientation in the flagellate *Euglena gracilis*. Micrograv Sci Technol 10:53-57

Häder DP, Hemmersbach R (1997) Graviperception and graviorientation in flagellates. Planta 203:7-10

Häder DP, Hemmersbach R, Lebert M (2005a) Gravity and the Behavior of Unicellular Organisms. In: Cambridge University Press, New York

Häder DP, Richter P, Lebert M (2006) Signal transduction in gravisensing of flagellates. *Signal Transduction* 6:422-431

Häder DP, Richter P, Ntefidou M, Lebert M (2005b) Gravitational sensory transduction chain in flagellates. *Adv Space Res* 36:1182-1188

Häder DP, Rosum A, Schafer J, Hemmersbach R (1995) Gravitaxis in the flagellate *Euglena gracilis* is controlled by an active gravireceptor. *J Plant Physiol* 146:474-80

Häder DP, Rosum A, Schäfer J, Hemmersbach R (1996) Graviperception in the flagellate *Euglena gracilis* during a shuttle space flight. *J Biotech* 47:261-269

Hemmersbach R, Braun M (2007) Gravity-sensing and gravity-related signalling pathways in unicellular model systems of protists and plants. *Signal Transduction* 6:432-442

Hemmersbach-Krause R, Briegleb W, Häder DP (1991) Dependence of gravitaxis in Paramecium on oxygen. *Europ J Protistol* 27: 278-282

Hemmersbach R, Voormanns R, Hader DP (1996) Graviresponses in *Paramecium biaurelia* under different accelerations: studies on the ground and in space. *J Exp Biol* 199:2199-205

Hemmersbach-Krause R, Briegleb W, Hader DP, Vogel K, Grothe D, Meyer I (1993) Orientation of *Paramecium* under the conditions of weightlessness. *J Eukaryot Microbiol* 40:439-46

Hemmersbach-Krause R, Briegleb W, Vogel K, Hader DP (1993) Swimming velocity of *Paramecium* under the conditions of weightlessness. *Acta Protozool* 32:229-36

Herranz R, Anken R, Boonstra J, Braun M, Christianen PCM, de Geest M, Hauslage J, Hilbig R, Hill RJA, Lebert M, Medina FJ, Vagt N, Ullrich O, van Loon JJWA, Hemmersbach R (2013) Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology* 13:1–17

Holton E (2003) The impact of gravity on life, *Evolution on Planet Earth*. 6:143-159

Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M (1992) Changes in plant growth processes under microgravity conditions simulated by a three-dimensional clinostat. *Bot Mag* 105:53-70

Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M, Buchen B (1997) Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta* 203:187-197

Jennings HS (1962) Behavior of Lower Organisms. In: Indiana University Press, Bloomington

Klaus D (2001) Clinostats and bioreactors. *Gravitational and Space Biology Bulletin* 14:55-64

Krause M, Bräucker R, Hemmersbach R (2010) Gravikinesis in *Stylonychia mytilus* is based on membrane potential changes. *J Exp Biol* 213:161-171

Kuznicki L (1963) Reversible immobilization of *Paramecium caudatum* evoked by nickel ions. *Acta Protozool* 13:301-312

Lebert M (2000) WinTrack 2000 XP. In: Real time image analysis, User handbook, pp 40-48

Lebert M, Häder DP (1996) How Euglena tells up from down. *Nature* 379:590

Lebert M, Porst P, Häder DP (1999) Circadian rhythm of of gravitaxis in *Euglena gracilis*. *J Plant Phys* 155, 338-343

Lebert M, Häder DP (1999) Image analysis: A versatile tool for numerous applications. *G I T Imaging Microscopy* 1:5-6

Lebert M, Richter P, Häder DP (1997) Signal perception and transduction of gravitaxis in *Euglena gracilis*. *J Plant Physiol* 150:685-690

Leedale G.F. (1982) Ultrastructure. In: Buetow D.E., The Biology of *Euglena*. Acad. Press, New York, 1-27.

Levasseur P.J., Meng Q., Bouck G.B. (1994) Tubulin genes in the algal protist *Euglena gracilis*. *J. Euk. Microbiol.* 41 (5), 468-477.

Lyon EP (1905) On the theory of geotropism in *Paramecium*. *Am. J. Physiol.* 14:421-32

Machemer H (1999) The identification of gravikinesis from ciliates: Methods and experience *Advances in Space Research* 24:887-876

Machemer H, Bräucker R (1992) Gravireception and graviresponses in ciliates. *Acta Protozool* 31:185-214

Machemer H, Deitmer JW (1985) Mechanoreception in ciliates. In: Autrum H, Ottoson D, Perl ER, Schmidt RF, Schimazu H, Willis WD (eds) *Progress in Sensory Physiology*, Springer, Berlin, pp 81-118

Machemer H, De Peyer J (1977) Swimming sensory cells: Electrical membrane parameters, receptor properties and motor control in ciliated protozoa. *Verh Dtsch Zool Ges* 1977 86-110

Machemer H, Machemer-Röhnisch S, Bräucker R, Takahashi K (1991) Gravikinesis in *Paramecium*: theory and isolation of a physiological response to the natural gravity vector. *J Comp Physiol A* 168:1-12

Machemer-Röhnisch S, Nagel U, Machemer H (1999) A gravity-induced regulation of swimming speed in *Euglena gracilis*. *J Comp Physiol A* 185:517-527

Mogami, Y, Ishii, J, Baba SA (2001). Theoretical and experimental dissection of gravity-dependent mechanical orientation in gravitactic microorganisms. *Biol Bull* 201: 26-33

Richter P. (2000) Untersuchungen zur Gravitaxis von *Euglena gracilis*. Dissertation. Universität Erlangen-Nürnberg.

Stallwitz E, Häder DP (1994) Effects of heavy metals on motility and gravitactic orientation of the flagellate, *Euglena gracilis*. *Europ J Protistol* 20: 18-24

Starr RC (1964) The culture of algae at Indiana University. *Am J Bot* 51:1013-1014

Storch V., Welsch U. (2002) Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

van Loon J (2007) Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Advances in Space Research* 39:1161-1165

Verworn M, (1889) Psychophysiologische Protistenstudien. Gustav Fischer Verlag, Jena. 25-130

Vogel K, Hemmersbach-Krause R, Kühnel C, Häder DP (1993) Swimming Behaviour of the Unicellular Flagellate, *Euglena gracilis*, in Simulated and Real Microgravity. *Micrograv. Sci. Technol.* 232-237.

7. Anhang:

Tabelle A1: Erhebung der Schwimmgeschwindigkeiten unter 1xg Bedingungen für *Euglena* sowie *Paramecium* (Meßdauer 16min)

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Paramecium</i>	1xg Kontrolle	M SD	320,36	375,18	335,77	367,82	0,469	23784
			56,76	107,47	96,49	51,26		
<i>Euglena</i>	1xg Kontrolle	M SD	55,01	61,29	55,87	55,92	0,506	98496
			6,35	16,27	11,21	5,43		

Tabelle A2: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Paramecium* auf dem Klinostaten im **2D-Modus bei 20rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Vor- und der Nachlauf (1xg) = 60s, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Paramecium</i>	vor Rotation	M SD	356,56	374,83	339,56	356,56	0,257	1251
			89,45	110,97	98,67	89,45		
	bei Rotation	M SD	340,96	335,87	322,88	340,96	0,048	14161
			100,33	101,19	100,51	100,33		
	nach Rotation	M SD	298,69	324,24	313,23	298,69	0,207	832
			83,08	82,85	81,81	83,08		

Tabelle A3: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Paramecium* auf der RPM im **2D-Modus bei 20rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Paramecium</i>	vor Rotation	M SD	394,22	416,41	416,90	408,22	0,423	1219
			122,02	144,50	149,62	84,53		
	bei Rotation	M SD	390,23	399,98	366,11	392,64	0,143	15817
			139,31	137,11	136,88	84,90		
	nach Rotation	M SD	379,79	416,01	380,78	379,79	0,213	1497
			115,22	148,37	133,10	115,22		

Tabelle A4: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Paramecium* auf dem Klinostat im **2D-Modus bei 60rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Paramecium</i>	vor Rotation	M	329,841	351,78	347,73	338,48	0,204	434
		SD	70,45	75,96	75,18	65,43		
	bei Rotation	M	349,24	331,74	347,73	338,00	0,079	4827
		SD	101,49	92,20	91,87	94,83		
	nach Rotation	M	300,34	345,21	324,85	327,04	0,236	484
		SD	85,37	84,34	74,20	74,33		

Tabelle A5: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Paramecium* auf der RPM im **2D-Modus bei 60rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Paramecium</i>	vor Rotation	M	451,81	480,72	453,90	460,27	0,242	1872
		SD	63,42	104,63	79,82	50,77		
	bei Rotation	M	487,08	482,87	476,59	482,38	0,058	23056
		SD	88,16	85,33	77,41	55,15		
	nach Rotation	M	466,64	501,81	470,81	478,30	0,206	2181
		SD	70,22	114,39	66,42	50,67		

Tabelle A6: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Euglena* auf dem Klinostat im **2D-Modus bei 20rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzah l
<i>Euglena</i>	vor Rotation	M	55,22	66,72	62,31	57,81	0,630	12144
		SD	4,73	18,21	23,23	5,56		
	bei Rotation	M	56,96	56,39	56,55	58,68	0,060	11796
		SD	13,49	11,90	11,23	8,60		
	nach Rotation	M	45,35	55,16	55,87	47,38	0,714	7002
		SD	4,25	18,36	23,60	4,38		

Tabelle A7: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Euglena* auf der RPM im **2D-Modus bei 20rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.
Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Euglena</i>	vor Rotation	M	88,63	92,65	88,97	89,53	0,432	6573
		SD	10,56	20,61	17,67	8,80		
	bei Rotation	M	89,68	89,60	89,43	90,01	0,143	46686
		SD	17,37	20,77	17,75	9,80		
	nach Rotation	M	94,70	92,25	92,05	92,84	0,218	2990
		SD	17,00	25,66	23,35	10,79		

Tabelle A8: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Euglena* auf dem Klinostat im **2D-Modus bei 60rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.
Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Euglena</i>	vor Rotation	M	41,28	51,18	42,65	42,22	0,933	7016
		SD	4,74	24,65	17,41	5,06		
	bei Rotation	M	58,35	56,43	55,07	59,01	0,070	106723
		SD	12,41	10,60	11,02	9,52		
	nach Rotation	M	44,37	60,18	49,44	45,95	0,702	9523
		SD	4,13	30,66	21,39	4,26		

Tabelle A9: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Euglena* auf der RPM im **2D-Modus bei 60rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.
Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Euglena</i>	vor Rotation	M	103,53	104,95	104,95	104,60	0,379	2631
		SD	18,86	33,20	33,70	14,63		
	bei Rotation	M	108,89	102,45	101,68	102,58	0,128	58465
		SD	17,10	27,35	16,88	10,54		
	nach Rotation	M	93,47	92,92	92,04	93,07	0,373	5024
		SD	13,79	27,41	25,97	11,24		

Tabelle A10: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Paramecium* auf der RPM im **3D-Modus bei 20rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
Paramecium	vor Rotation	M	343,10	373,74	355,48	352,30	0,255	800
		SD	108,50	155,64	117,54	95,24		
	bei Rotation	M	426,38	415,79	390,02	413,75	0,143	7256
		SD	184,75	194,72	158,19	138,47		
	nach Rotation	M	345,19	378,95	328,62	343,80	0,299	997
		SD	91,75	143,94	104,02	77,40		

Tabelle A11: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Paramecium* auf der RPM im **3D-Modus bei 40rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
Paramecium	vor Rotation	M	376,87	368,42	352,32	370,96	0,303	1639
		SD	69,34	126,67	94,38	58,09		
	bei Rotation	M	644,98	644,88	648,52	647,47	0,069	3009
		SD	409,05	287,17	326,55	265,14		
	nach Rotation	M	423,81	361,27	423,52	390,31	0,262	1306
		SD	544,06	126,76	699,25	204,74		

Tabelle A12: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Euglena* auf der RPM im **3D-Modus bei 20rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
Euglena	vor Rotation	M	86,58	88,32	93,20	88,40	0,393	5672
		SD	10,37	20,11	21,87	8,16		
	bei Rotation	M	129,01	126,56	126,94	127,91	0,050	20952
		SD	30,09	30,59	29,15	17,71		
	nach Rotation	M	96,05	102,05	102,48	98,92	0,327	2350
		SD	18,97	32,63	30,52	13,08		

Tabelle A13: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Euglena* auf der RPM im **3D-Modus bei 40rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Euglena</i>	vor Rotation	M	102,87	107,28	99,18	102,91	0,617	5029
		SD	9,88	30,14	23,18	8,32		
	bei Rotation	M	302,28	275,96	257,43	277,27	0,046	20373
		SD	231,87	210,96	164,73	124,94	0,021	
	nach Rotation	M	95,66	98,29	101,66	97,11	0,480	4196
		SD	11,27	29,20	25,42	9,22		

Tabelle A14: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Paramecium* auf der RPM im Real Random Modus mit **Random Direction und Random Interval bei 20rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Paramecium</i>	vor Rotation	M	381,23	380,67	362,83	377,46	0,240	2915
		SD	79,13	138,28	92,71	56,72		
	bei Rotation	M	427,49	429,99	421,75	431,05	0,096	25001
		SD	129,74	133,20	123,09	80,30	0,037	
	nach Rotation	M	370,70	371,83	345,17	365,83	0,369	2756
		SD	71,43	127,18	100,61	54,37		

Tabelle A15: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Paramecium* auf der RPM im Real Random Modus mit **Random Direction und Random Interval bei 40rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Paramecium</i>	vor Rotation	M	489,60	485,43	418,42	474,55	0,384	3592
		SD	130,78	293,74	176,62	114,85		
	bei Rotation	M	725,73	781,20	643,36	737,98	0,057	12626
		SD	400,06	423,34	330,15	275,65	0,027	
	nach Rotation	M	371,13	353,03	367,42	365,03	0,176	3339
		SD	106,03	118,73	156,80	71,16		

Tabelle A16: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Euglena* auf der RPM im Real Random Modus mit **Random Direction und Random Interval bei 20rpm**. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16 +min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Euglena</i>	vor Rotation	M	97,71	94,01	96,67	97,24	0,564	8311
		SD	8,33	23,18	20,98	7,61		
	bei Rotation	M	123,42	125,87	122,03	124,01	0,054	27327
		SD	28,59	27,16	26,25	15,43	0,036	
	nach Rotation	M	101,08	108,03	104,89	103,45	0,290	2812
		SD	17,17	27,07	27,13	11,49		

Tabelle A17: Schwimmgeschwindigkeiten und Grad der Orientierung (r-Wert) für *Euglena* auf der RPM im Real Random Modus mit Random Direction und Random Interval bei 40rpm. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Vor- und der Nachlauf (1xg) = 1min, der Zeitraum „bei Rotation“ = 16min.

			aufwärts µm/s	abwärts µm/s	seitwärts µm/s	Gesamt µm/s	r-Wert	Anzahl
<i>Euglena</i>	vor Rotation	M	104,23	132,21	145,93	117,94	0,454	8239
		SD	23,47	59,71	62,92	21,14		
	bei Rotation	M	261,31	271,26	266,77	265,54	0,033	57812
		SD	136,75	133,02	119,30	72,85	0,018	
	nach Rotation	M	133,10	139,96	153,48	142,09	0,574	4148
		SD	63,76	57,18	123,19	41,63		

Danksagung

Abschließend möchte ich all jenen danken, die durch ihr fachliches beitragen und persönliche Unterstützung zum erstellen dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Frau PD. Dr. Ruth Hemmersbach möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit, die gute Unterstützung sowie die gegebenen Freiräume danken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. W. Alt für die Übernahme der Korreferenz.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Gerzer möchte ich mich für die Möglichkeit meine Arbeit im Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin des DLR durchzuführen danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe Gravitationsbiologie für die gute Unterstützung und tolle Arbeitsatmosphäre. Für die vielen konstruktiven Ratschläge sowie die zahlreich erbrachten Überstunden möchte ich Kai Waßer herzlich danken. Birgit Bromeis, für die Mitbetreuung der von mir verwendeten Kulturen, Gerhild Bornemann für die zahlreichen Ratschläge sowie Dr. Jens Hauslage für die technische Unterstützung

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. M. Lebert, für die Bereitstellung des verwendetem Bildverarbeitungssystems.

Meinen Eltern, meiner Schwester und Freunden, insbesondere Dennis Schönenberg und Christian Grober für eine Menge Geduld und aufmunternde Worte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Sabine Podborny, ohne die ich diesen Studienplatz gar nicht erst bekommen hätte.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Bonn, den 15.07.2013