

TRIPLELUX – B: Immunological and cellular responses under microgravity and space radiation – development of a biosensor with phagocytic cells

The TRIPLELUX-B is funded (01.01.2008 - 31.12.201) by the BMWi/DLR and ESA contract number 50WB0811

The project-Experiment is positively evaluated and reconfirmed (May 2011) by ESA and will fly to Orbit (International Space Station -ISS) in March 2013.

Experiment Team Coordinator (PI = Principal Investigator):

P.-D. Hansen (PI); Berlin Institut of Technology; Dept. of Ecological Impact and Ecotoxicology

Scientific Team Member:

P.D. Hansen, E. Unruh, BIT, Berlin, Germany

Experiment Specific Goals:

The decreased activity in the immune system of astronauts is usually observed after long term missions and consequently exposure to microgravity. Whether microgravity can cause these immunological effects is still an open question.

The aim of the TRIPLELUX-B experiment is to investigate under space flight conditions the effects of microgravity on cells able to perform phagocytosis as an immune function and to study the universal validity of these innate immune responses.

This will be done by comparing the phagocytotic activity of the cells under influence of simulated earth gravity with cells exposed to μ -gravity. In a second comparison cells exposed to the simulated gravity are compared with cells in natural earth gravity. Herewith other factors of influence than μ -gravity will be investigated.

The Blue Mussel haemocytes were selected for the TRIPLELUX-B studies because of their robustness as a test system. In the mussel, the haemocytes are the primary phagocytotic defence against invading microorganisms and foreign particles. They are comparable in their function with macrophages of vertebrates. Compared to macrophages they are also part of a more ancient step in the development of immune systems.

Haemocytes are, like macrophages, autonomous cells that are able to detect a threat by themselves and are able to navigate through the body to where ever invading organisms are detected. The invaders will become taken up into the cell body (Phagocytosis) and destroyed.

For destroying the ingested particles the haemocytes are producing oxygen radicals (Reactive Oxygen Species or ROS). Up to now, the mechanism of the production of ROS inside of macrophages isn't fully understood. Even less is known about the cellular mechanisms used by haemocytes. Nevertheless, it is a key-immune function and present in vertebrate as well in invertebrate species. During the TRIPLELUX-B experiment the phagocytotic activity of the haemocytes will be stimulated by Zymosan particles. The cells are ingesting the Zymosan and start to produce ROS in an attempt to destroy the particles. By adding Peroxidase and Luminol the activity of the phagocytotic cells becomes visible by luminescence that can be

measured quantitatively. The amount of light is directly proportional to the amount of oxy-radicals produced by the cells. The reaction of the cells under standard gravity is carefully validated and investigated under standardized conditions in the laboratory and demonstrated in extended field studies (see references). The development of luminescence during a run under standard gravity conditions is shown. The mixing of the cells with Zymosan will generate a sharp flash. The initial flash is build up by the turbulences and is fading away quickly followed by the increase of luminescence because of the increase by phagocytotic activity of haemocytes. This reaction will occur approx. 10 minutes after contact of the haemocytes with the Zymosan particles. The light output is increasing and will come to maximum after approx. 50 to 60 minutes.

A change in the potential of the phagocytotic haemocytes to produce ROS will be directly visible in a decrease or increase of the light output.

The TRIPLELUX-B Experiment contributes to risk assessment concerning immunotoxicity under space flight conditions. The results expected will allow conclusion of whether the observed responses are caused by microgravity and/or radiation.

Phagocytosis is a validated biochemical response (Biomarker) for the assessment of immunotoxicity in fresh water and coastal areas. The test system was successfully standardised and validated by projects funded by the European Commission: BIOMAR I - Evaluation of harmful effects of environmental contamination in marine ecosystems using biomarkers (EV5V-CT940550), BIOMAR II – Biological markers of environmental contamination in marine ecosystems (phase 2) (ENV4-CT96-0300), BEEP - Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems (EVK3-CT-2000-00543), ALGAETOX - The application of integrated biosensors with antibody and macrocyclic receptor libraries in the measurement of algal cells and toxins in water (ENV4-CT98-0784) and EU – Concerted Action BIOSET – European network on “Biosensors for Environmental Monitoring” (PL 970792, EV5V-CT92-0104). Phagocytosis is presently undergoing an international standardisation process as a tool for in-situ effects monitoring in the North Atlantic. This work is coordinated by the Centre Interinstitutional de Recherche en Écotoxicologie (CIRÉ) and ICES (International Commission for Exploration of the Sea). The standardization and validation of the sensoric-system under ISO and CEN is on the way.

Forschungsprojekt “TRIPLE-LUX B”: Immunologische und zelluläre Reaktionen unter dem Einfluss von Mikrogravitation und Weltraumstrahlung – Entwicklung eines Biosensors mit Phagozytose-aktiven Zellen

**Gefördert durch BWi/DLR und ESA: Förderkennzeichen 50WB0811
Laufzeit 1. Januar 2008 bis 31. Dezember 2011**

Evaluiert (Mai 2011) und bestätigt durch ESA Life Science und für den Weltraumflug zur ISS im März 2013 vorgesehen (ELIPS-Programm)

Kurzbeschreibung

Das Projekt „TRIPLE-LUX-B“ (z.Z. 50WB0811) leistet einen experimentellen Beitrag zur Untersuchung der Wirkung von Weltraumbedingungen auf die Funktion des Immunsystems und dient somit der Risikobewertung von bemannten Weltraummissionen.

In der Arbeitsgruppe Hansen wird diese Risikobewertung auf der Basis der immuntoxischen Wirkung von Schwerelosigkeit und kosmischer Strahlung auf das Phagozytose-Potenzial von Mießmuschel-Hämozyten vorgenommen.

Wie bei den Makrophagen der Wirbeltiere, so nehmen auch die Hämozyten

Fremdpartikel aktiv auf (Phagozytose) und zerstören diese durch selbstproduzierte Biozide und Verdauungsenzyme. Im Experiment werden diese Fremdpartikel durch Zymosan simuliert.

Zymosan besteht aus Zellwandbruchstücken abgetöteter Hefezellen und stimuliert die Phagozytose so zuverlässig wie ganze Hefezellen. Für die Herstellung hochaktiver Biozide produzieren die Zellen in einem ersten Schritt oxidierende Sauerstoffradikale (ROS = Reactive Oxygen Species), die mit dem Chemilumineszenzfarbstoff Luminol erfasst werden. Die Reaktion der Sauerstoffradikale mit dem Farbstoff Luminol führt zu einer Lichtentwicklung (Lumineszenz), die im Verhältnis zur gebildeten Menge an Radikalen steht. Lumineszenzmessungen sollen im BIOLAB-Modul auf der internationalen Raumstation (im bemannten Labormodul Columbus) durchgeführt werden.

Ziele

Die Hauptaufgaben in der hier beantragten Verlängerung ist die weitergehende Anpassung der biologischen Komponente an das Testsystem und dessen weitere Optimierung.

In dieser Hinsicht haben sich gegenüber des ursprünglichen Experimentdesigns zahlreiche Änderungen im Detail ergeben, die zu immer weiteren Anpassungen auch der biologischen Komponente geführt haben.

Das Science Model als einzig flugrelevantes Messsystem steht nun seit Anfang September 2009 im Fachgebiet Ökotoxikologie für experimentelles Arbeiten mit rekonstituierten Hämozyten zur Verfügung. Gerade auch durch die erst sehr stark verspätete Fertigstellung des Sciencemodels konnte der ursprünglich aufgestellte Meilensteinplan für das Projekt TRIPLE-LUX-B nicht eingehalten werden.

Ursprünglich geplante Maßnahmen wie die Testung des Verhaltens der Zellen in einem Parabelflug sind nun für das Jahr 2010 geplant. Für diesen Parabelflug ist nun nicht mehr die Verwendung des Sciencemodels vorgesehen. Das Fachgebiet wird hierzu eine eigene Messeinrichtung verwenden.

Für die Fortführung der Erprobung der Hämozyten unter Einsatz relevanten Bedingungen ist die Verfügbarkeit des Sciencemodels unabdingbar. Die bisherige Prüfung mit rekonstituierten Zellen im Fachgebiet Ökotoxikologie hat gezeigt, dass die Unterschiede zur hier vorhandenen Messhardware hinsichtlich Handhabbarkeit, Empfindlichkeit und Benutzerfreundlichkeit noch sehr groß sind.