

Triple Lux B – Phagozytose unter dem Einfluss von Mikrogravitation und Weltraumstrahlung

P.-D. Hansen und E. Unruh

*Technische Universität Berlin, Fakultät VI – PLANEN, BAUEN, UMWELT
Institut für Ökologie, Fachgebiet Ökotoxikologie,
Franklinstrasse 29 (OE4), D-10587 Berlin*



www.tu-berlin.de/~oekotox



DLR Status-Seminar Strahlen-/Astrobiologie, Kiel, 12./13. Juni 2008
P.-D. Hansen u. E. Unruh, TU Berlin, Fakultät VI, FG Ökotoxikologie, 10587 Berlin

BMFT/DLR – esa/ESTEC: Forschungsprojekt TRIPLE-LUX-B:

**Immunologische und zelluläre Reaktionen
unter dem Einfluss von Mikrogravitation und
Weltraumstrahlung – Entwicklung eines
Biosensors mit Phagozytose-aktiven Zellen**



Übersicht

- **Zielsetzung**
- **Immunologischer Endpunkt:
Phagozytose**
- **Kryokonservierung der Immunzellen**
- **Anforderungen an das Meßsystem u.
experimentelle Rahmenbedingungen**
- **Ergebnisse**



Zielsetzung:

Das TRIPLE-LUX-B Projekt liefert einen Beitrag zur Risikoerfassung von immuntoxischen Effekten unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit und der Strahlung bei Langzeitmissionen in der Raumfahrt



Definition:

Immuntoxische Wirkung = selektive Reaktion des Organismus auf Fremdpartikel, die das Immunsystem erkennt und die durch die Phagozytose beseitigt werden

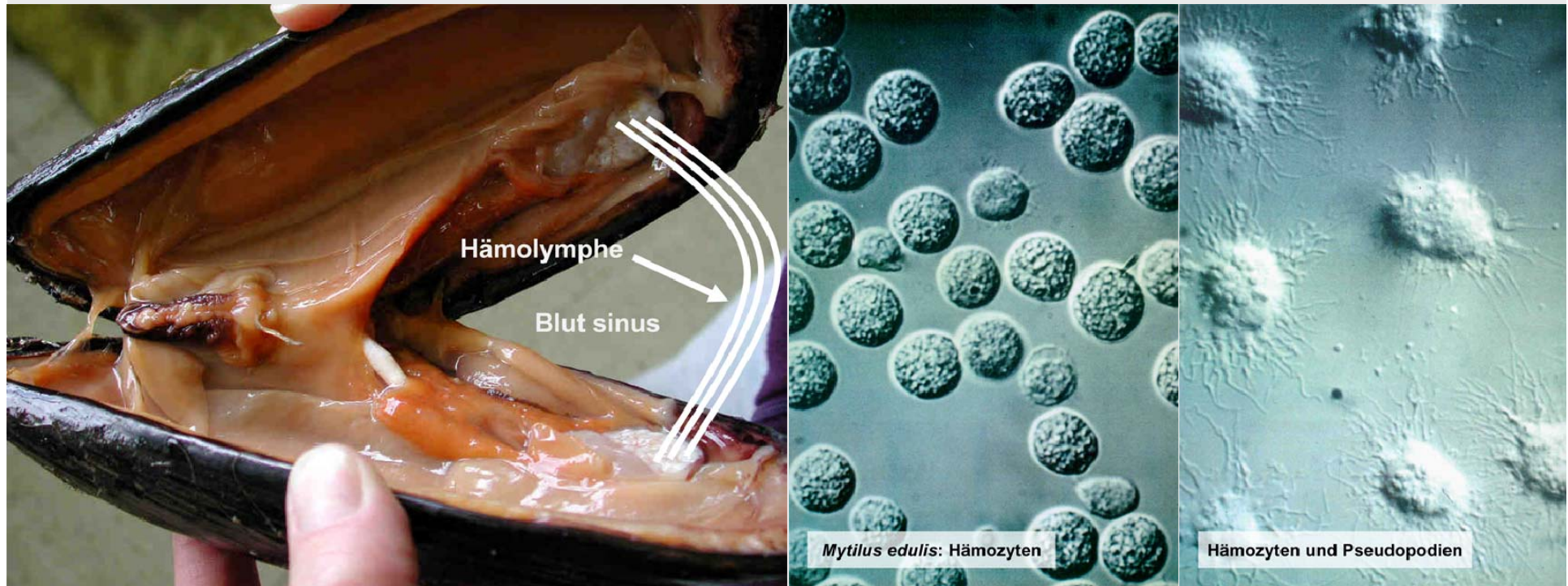
Anheftung

**Intrazelluläres
Abtöten**

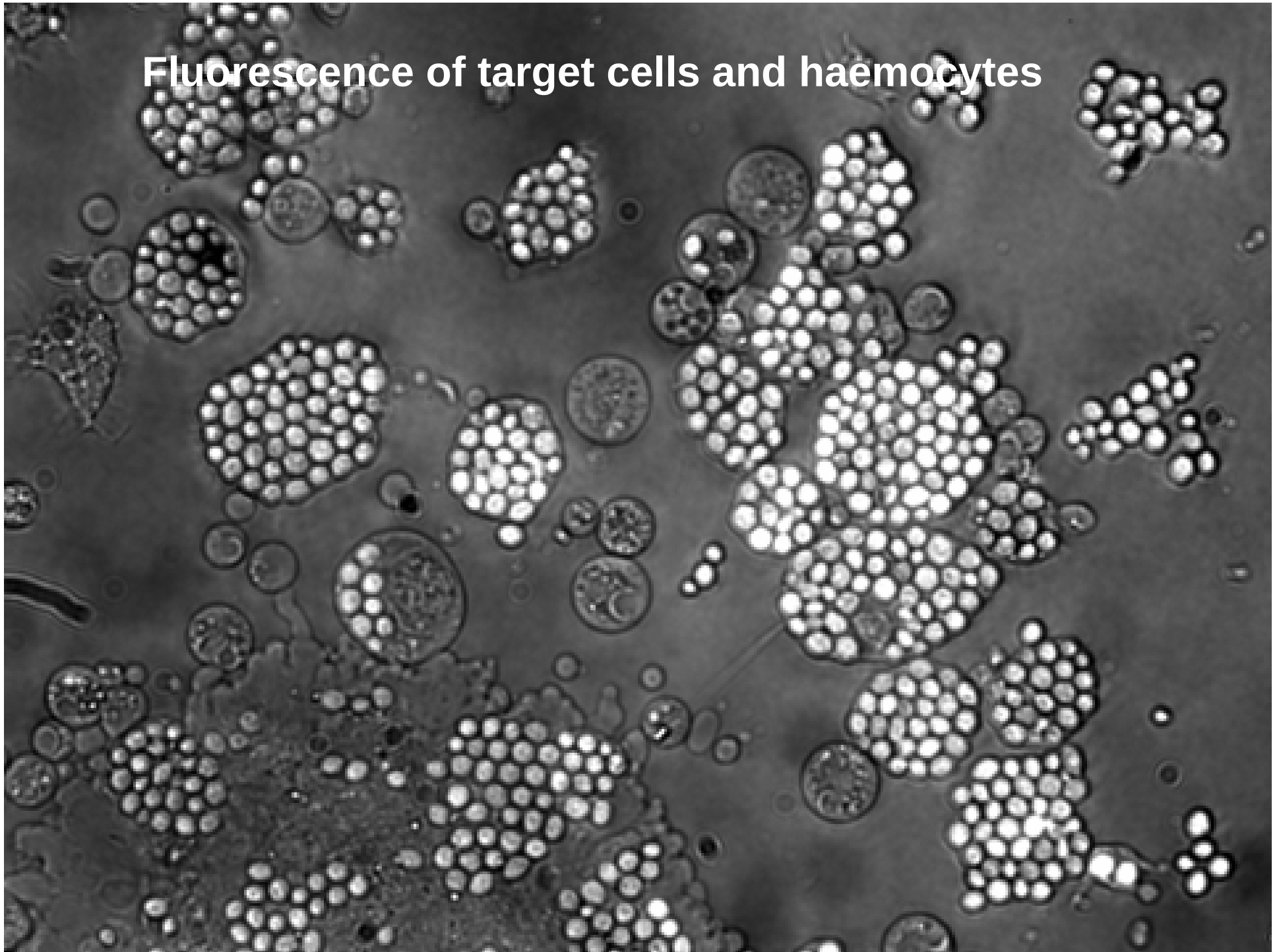
**Intrazelluläre
Verdauung**

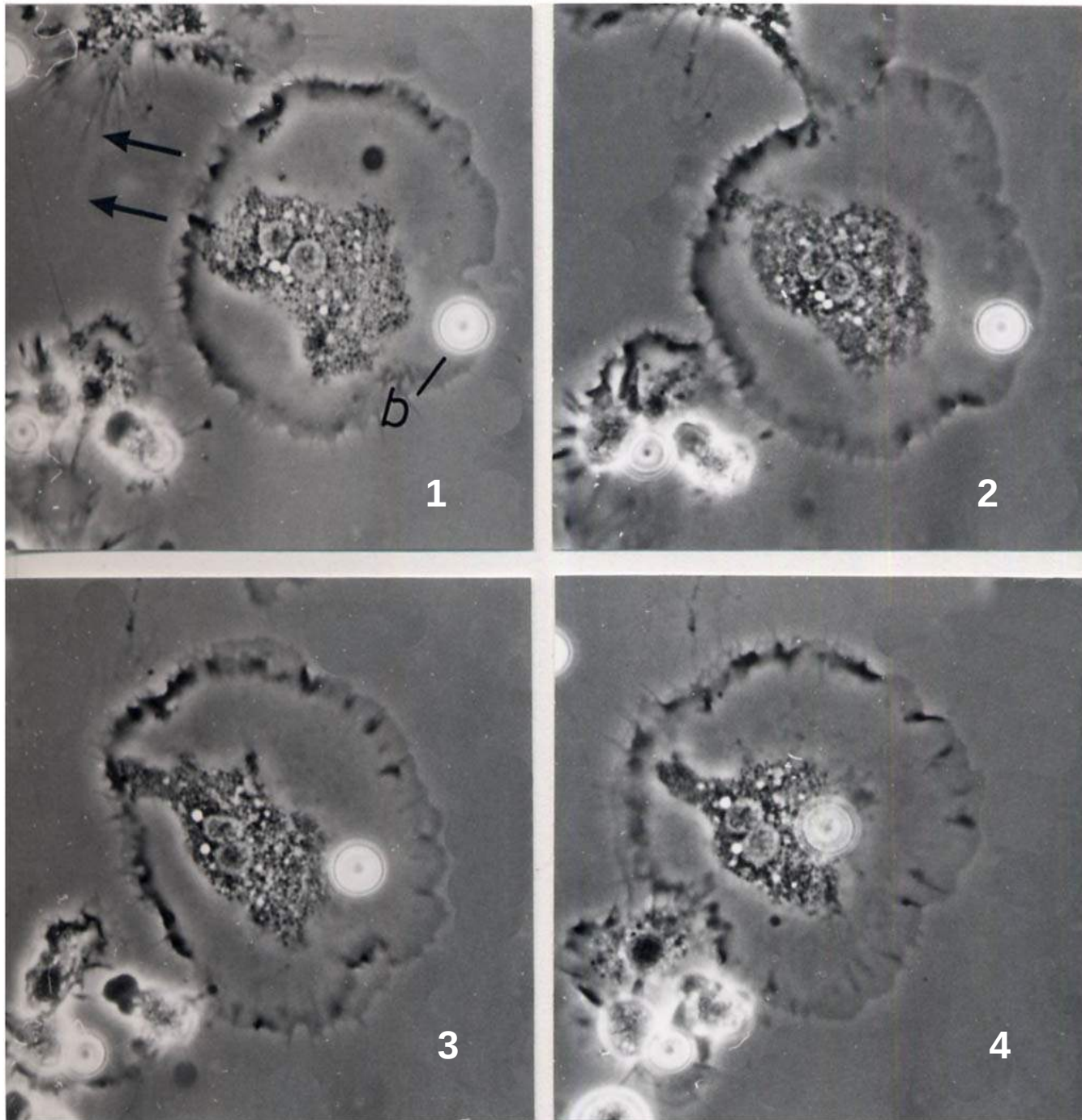


Die Immunzellen = Hämozyten



Fluorescence of target cells and haemocytes





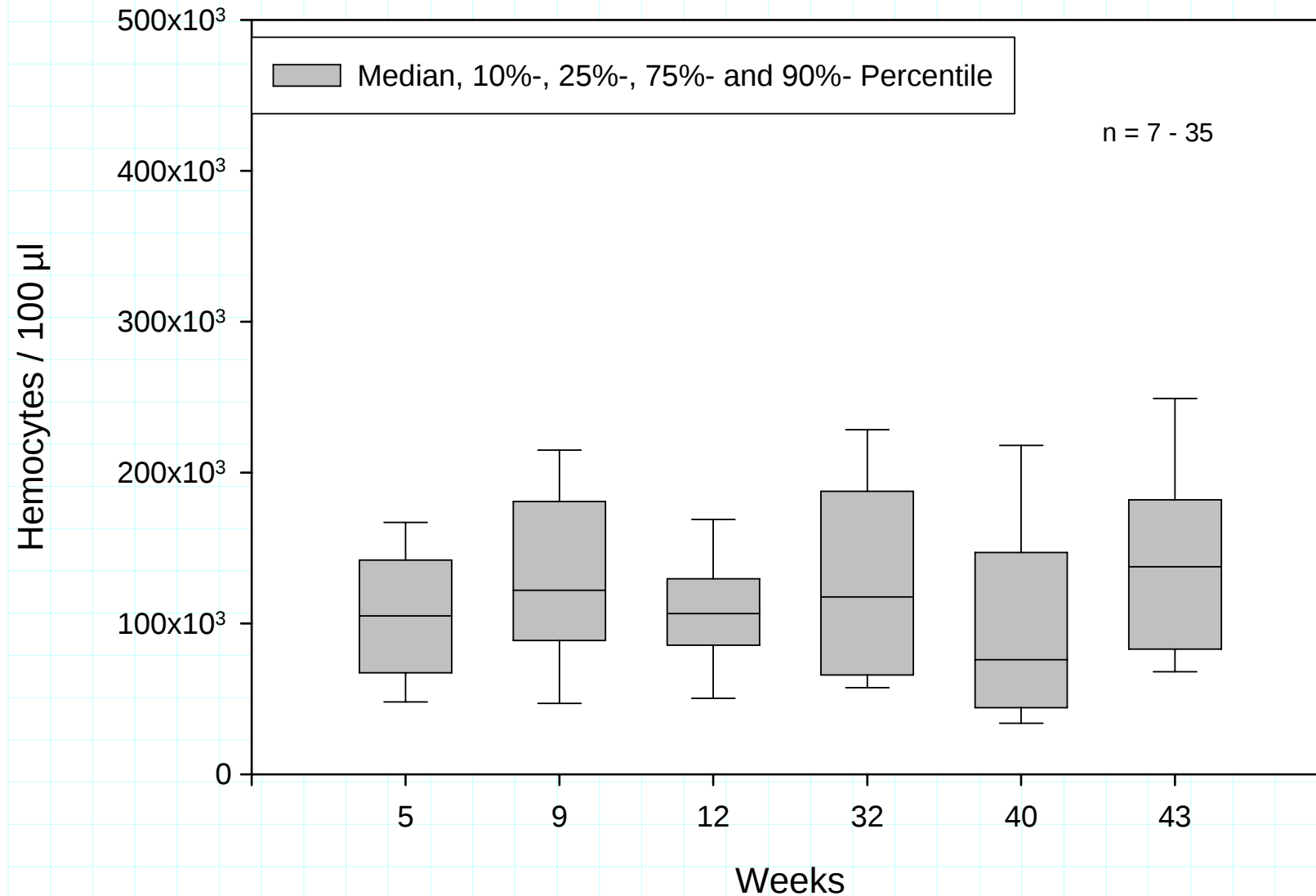
A latex bead (b) attaches to the ectoplasm of a spread haemocyte of *Mytilus edulis* and is transported on the surface of the cell to its endoplasmic area.

Zeiss PhaCo, 530x –
Latexbeads: 7.6 µm

Time range **1-2-3-4**
= 3-6-3 min.

Renwrautz, L. 1990. Internal
defence system of *Mytilus edulis*
In: Neurobiology of *Mytilus edulis*,
Ed. G.B. Stefano, Manchester
University Press, 269

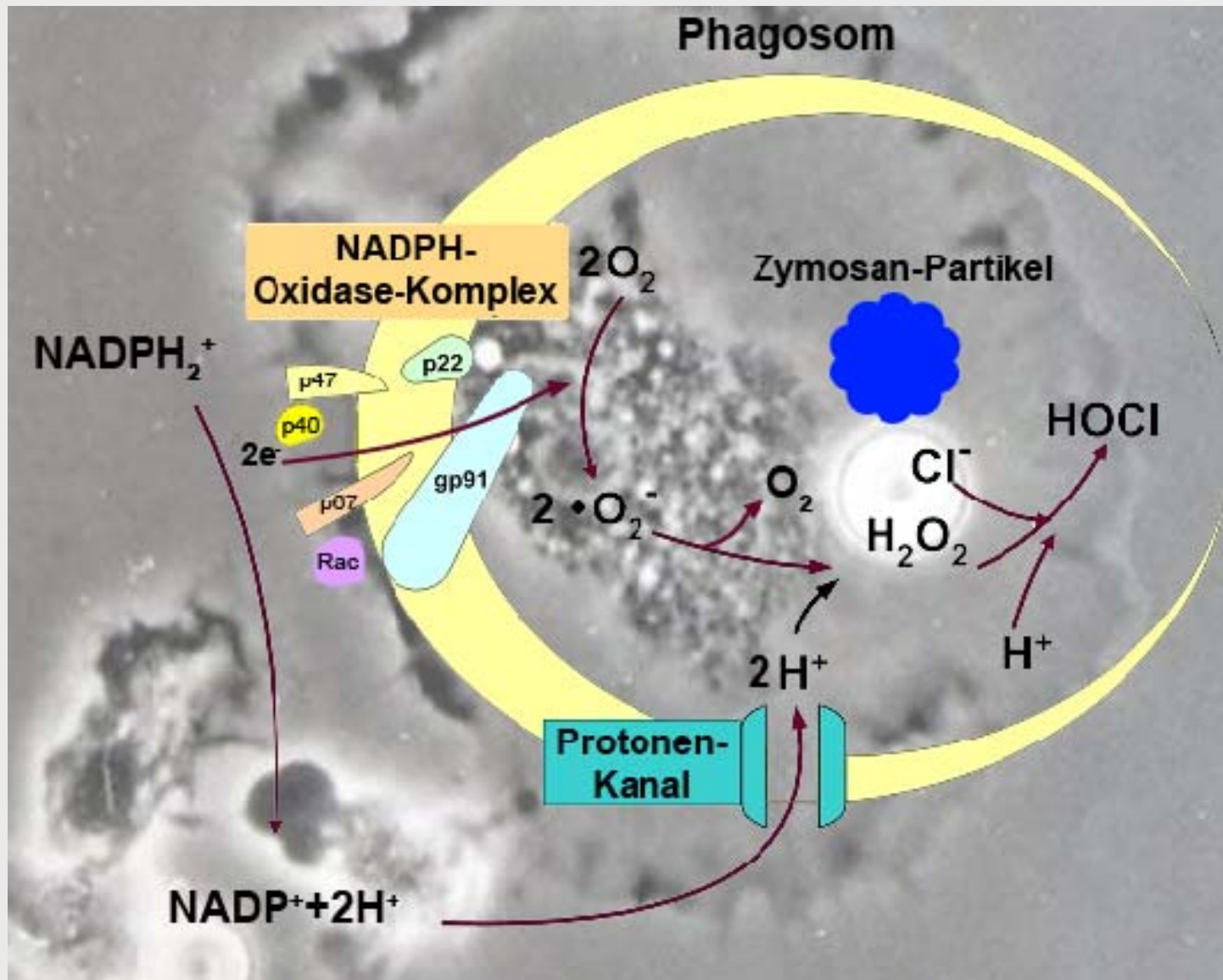
Konstante Haemozytenkonzentration über einen längeren Zeitraum bei Laborhaltung von Muscheln

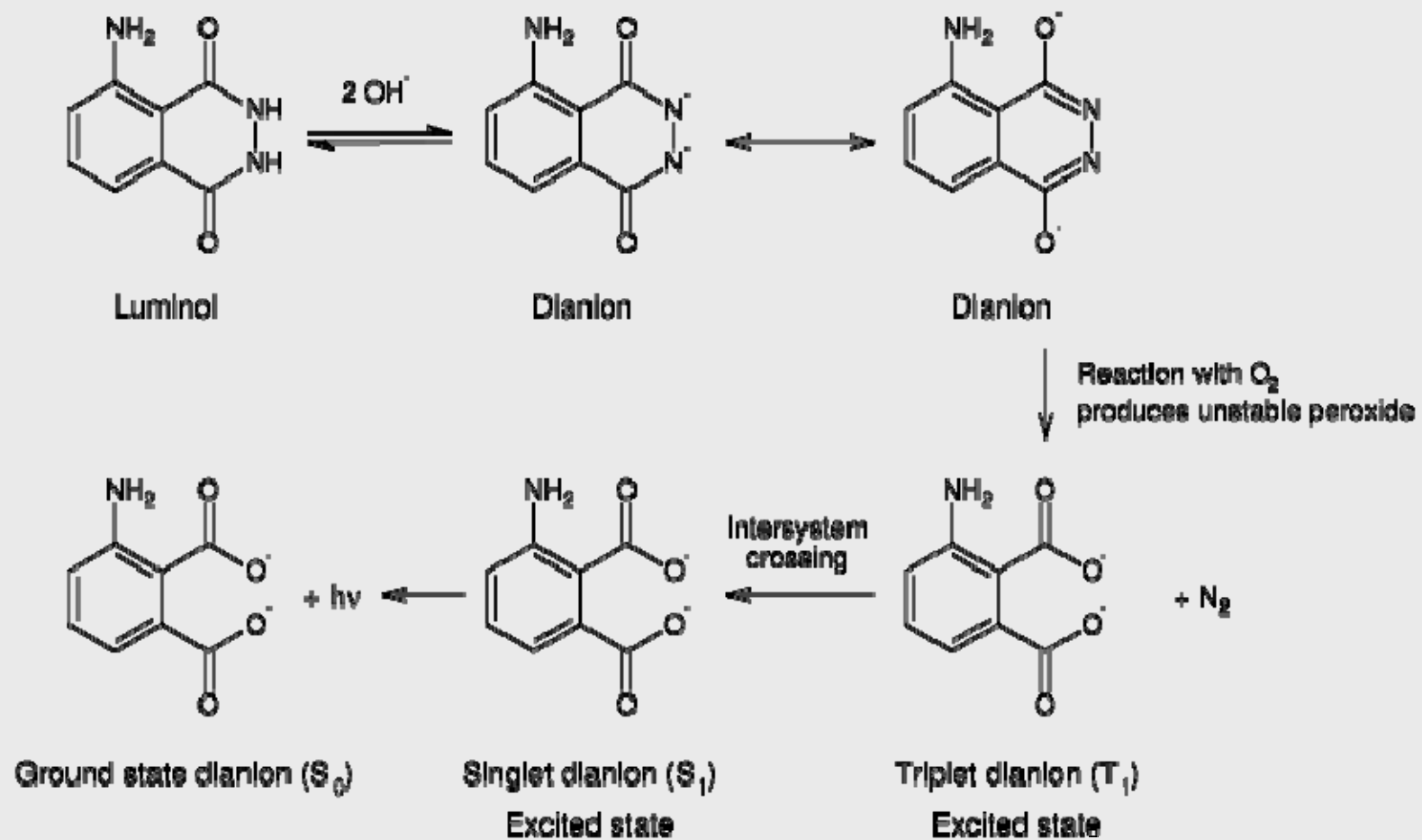


Ablauf der Phagozytose

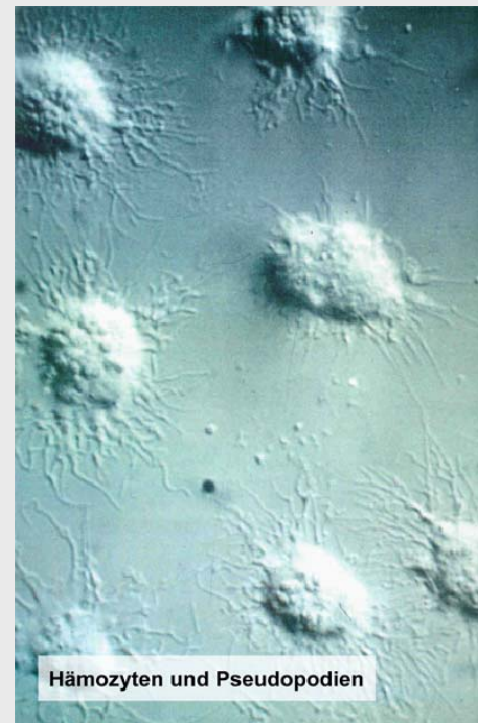
- Bindung an der Oberfläche der Hämozyten
(kohlehydrat spezifische Oberflächen-Rezeptoren)
- Inkorporation und Formation des Phagosoms
Fusion von Phagosom und Lysosom
- Oxidative Destruktion – “Oxidative burst”
- Enzymatischer Abbau







Lumineszenz Messungen an frischen Zellen und an rekonstituierten Zellen



Phagozytose als Schlüsselfunktion in der Immunologie

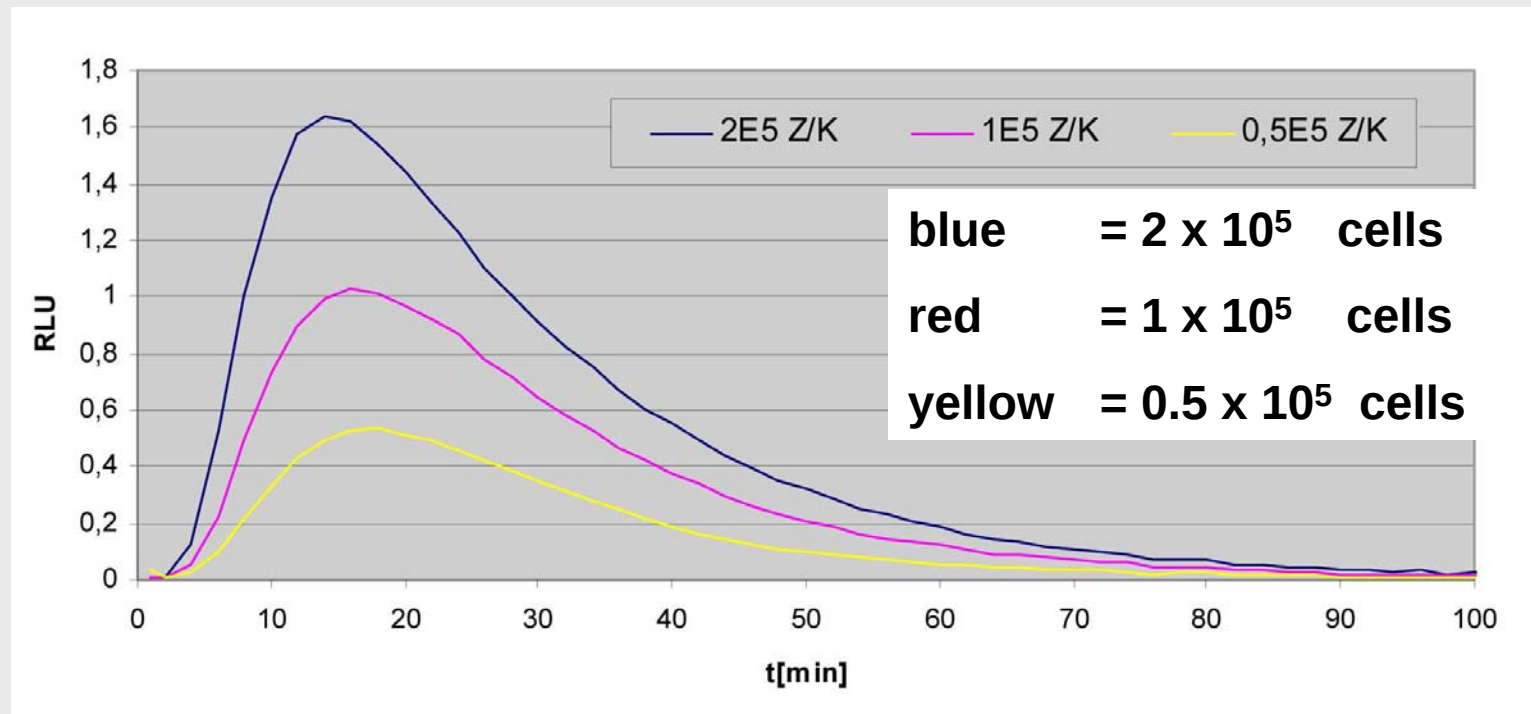
Anpassungsschritte bzw.
Konditionierung der Zellen
(Hämozyten) an die vorgegebenen
experimentellen Bedingungen im AEC:

- 1. Hämozyten in Suspension**
- 2. Kryokonservierung der Hämozyten
unter Beibehaltung der Eigenschaft der
Phagozytose**



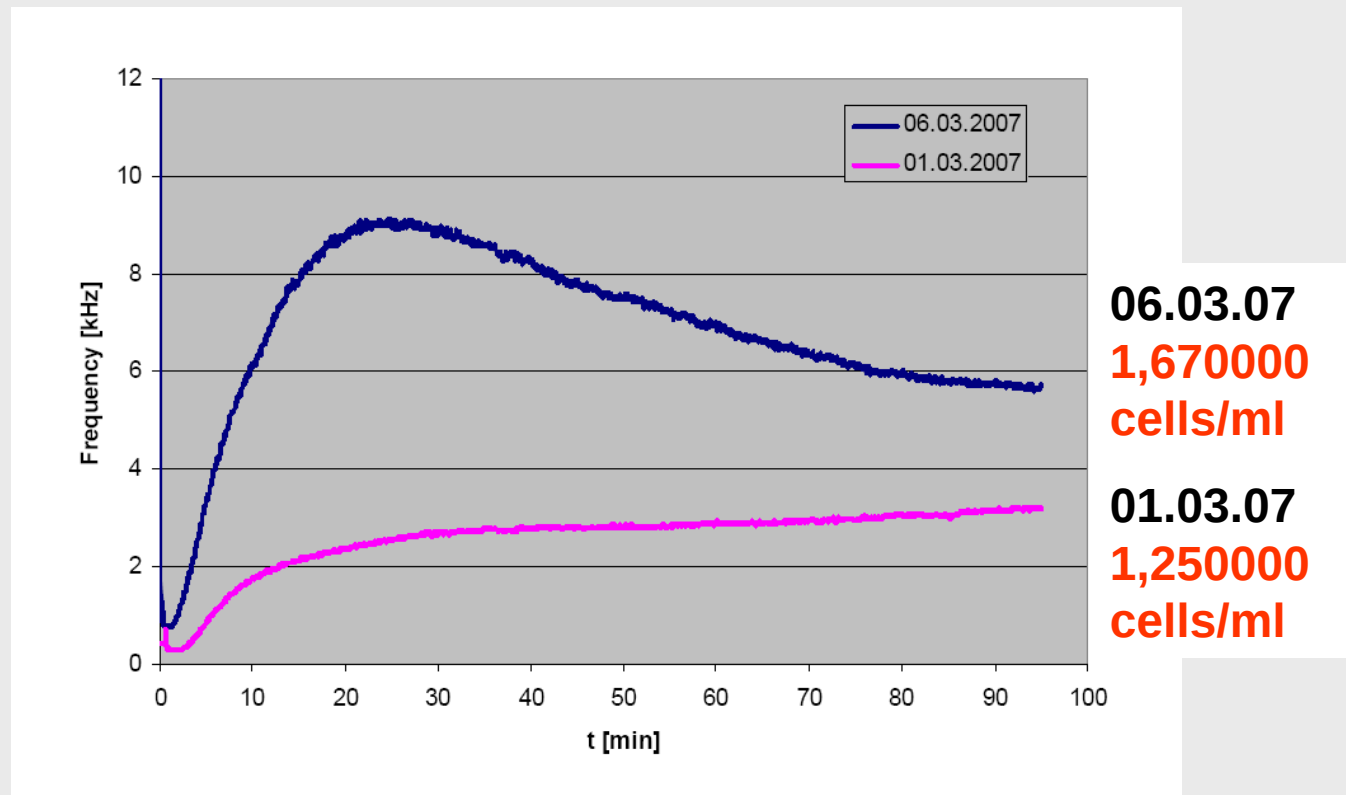
Luminol-Lumineszenz in Pools von frisch entnommenen Hämozyten nach Zugabe von Peroxidase and Zymosan: Abhängigkeit von Signalstärke und Zellzahl

Mikrotiterplatte (weiss) + Reader (Dynatech ML3000)



Luminol lumineszenz in Pools frisch entnommener Hämolymphe Nach Zugabe von Peroxidase und Zymosan: **AEC/“Breadboard“ Messung**

Küvette mit Rührer, Photoncounter



Kryokonservierung der Immunzellen



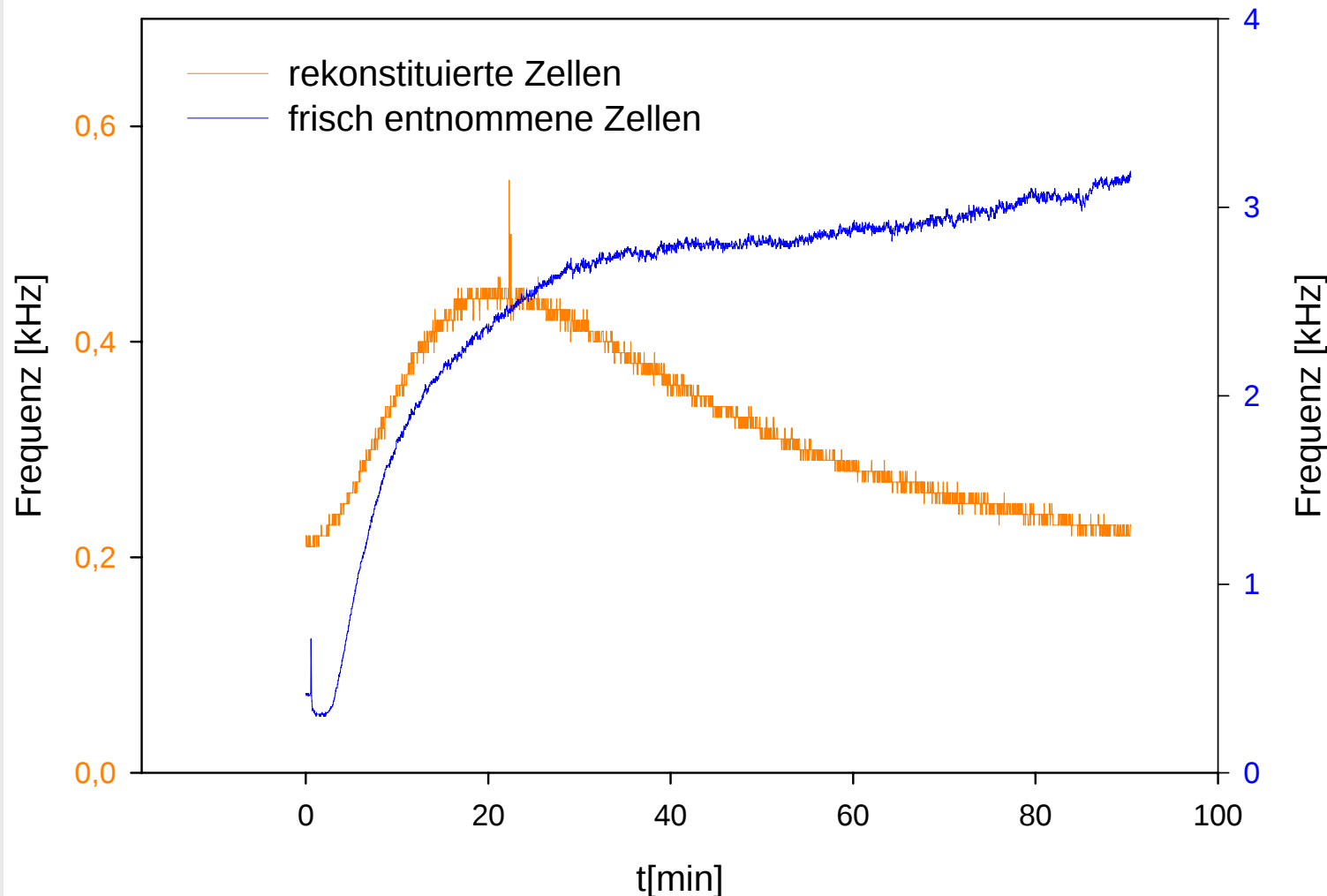
DLR Status-Seminar Strahlen-/Astrobiologie, Kiel, 12./13. Juni 2008
P.-D. Hansen u. E. Unruh, TU Berlin, Fakultät VI, FG Ökotoxikologie, 10587 Berlin

Medien (neu) für die Kryokonservierung

- Serum mit Polyvinylpyrrolidone (PVP) +
- Serum mit PVP und DMSO
- Kulturmedium + PVP + Serum (Zellfreie Hämolymphe)
- Kulturmedium + PVP + Serum + DMSO



Vergleich frisch entnommener und rekonstituierter Hämozyten

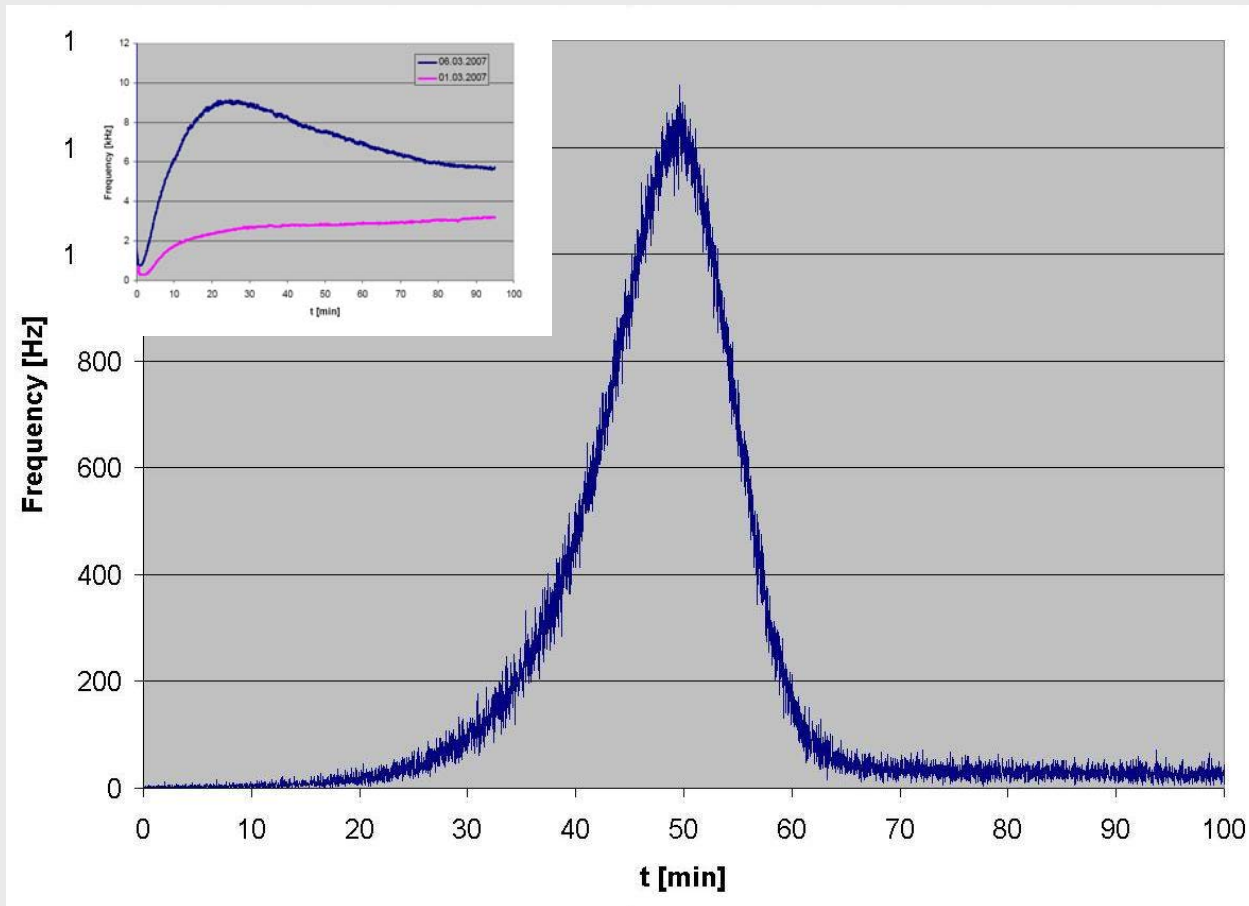


BER Status-Seminar Strahlen-/Astrobiologie, NCI, 12./13. Juni 2000

P.-D. Hansen u. E. Unruh, TU Berlin, Fakultät VI, FG Ökotoxikologie, 10587 Berlin

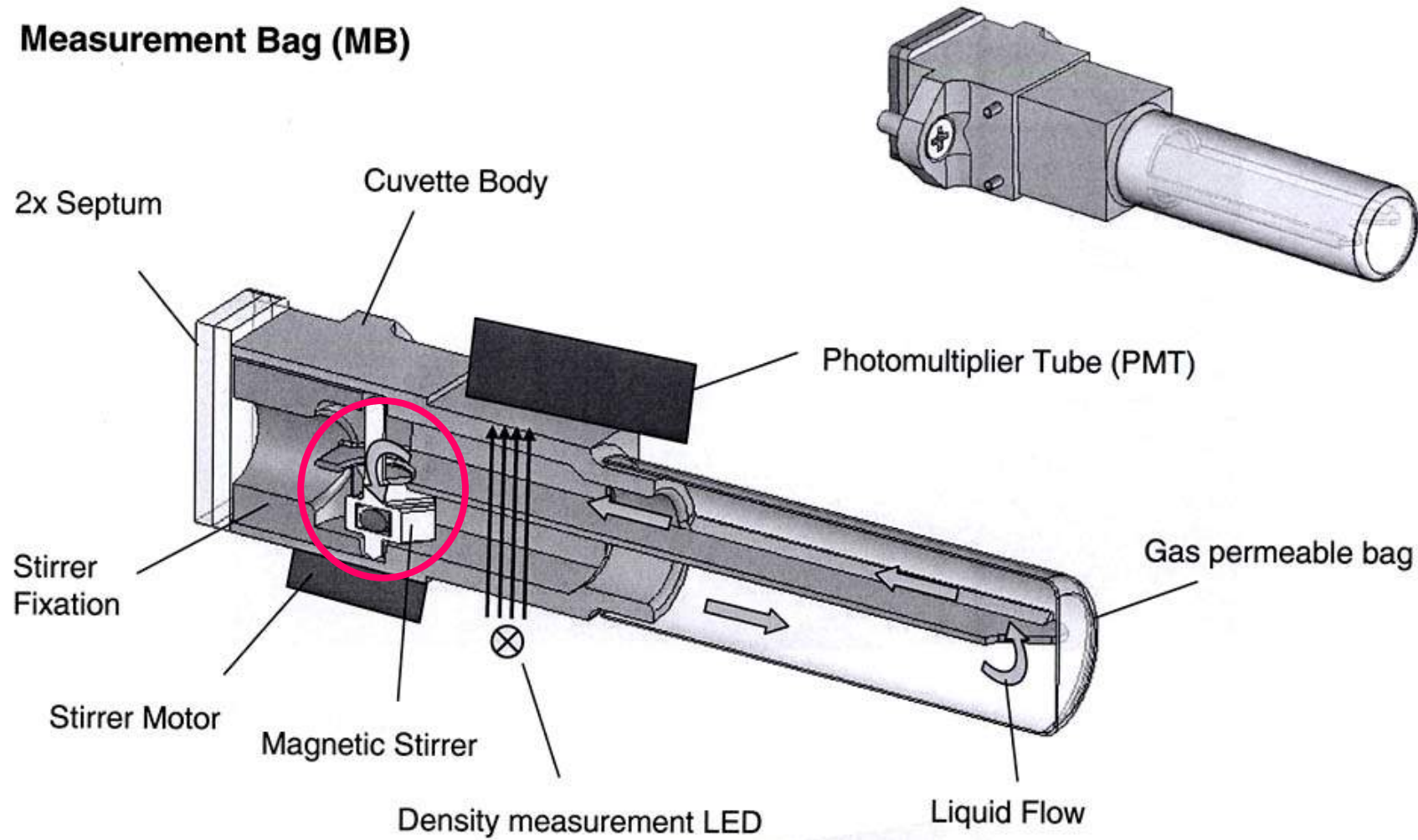
Luminol Lumineszenz in rekonstituierten Hämozyten nach Zugabe von Peroxidase and Zymosan.

Stark verzögerte Phagozytose-Antwort



TRIPLELUX

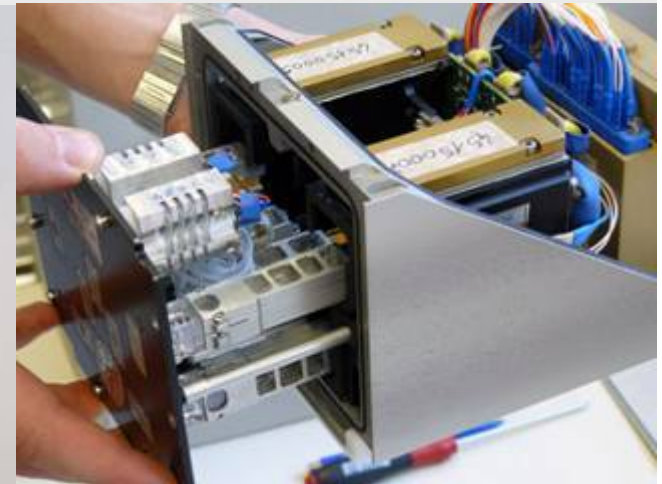
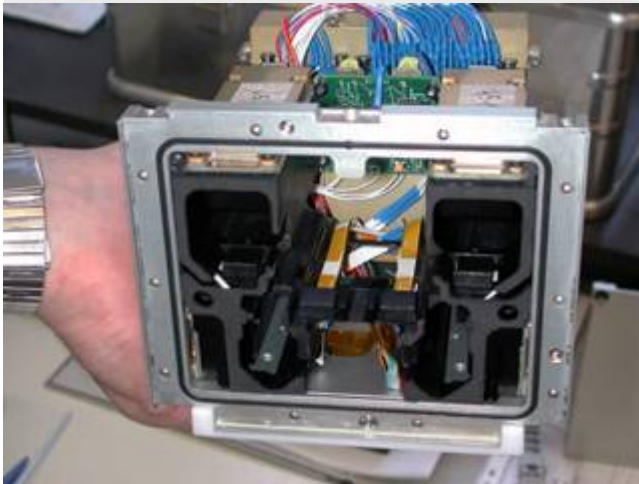
Measurement Bag (MB)



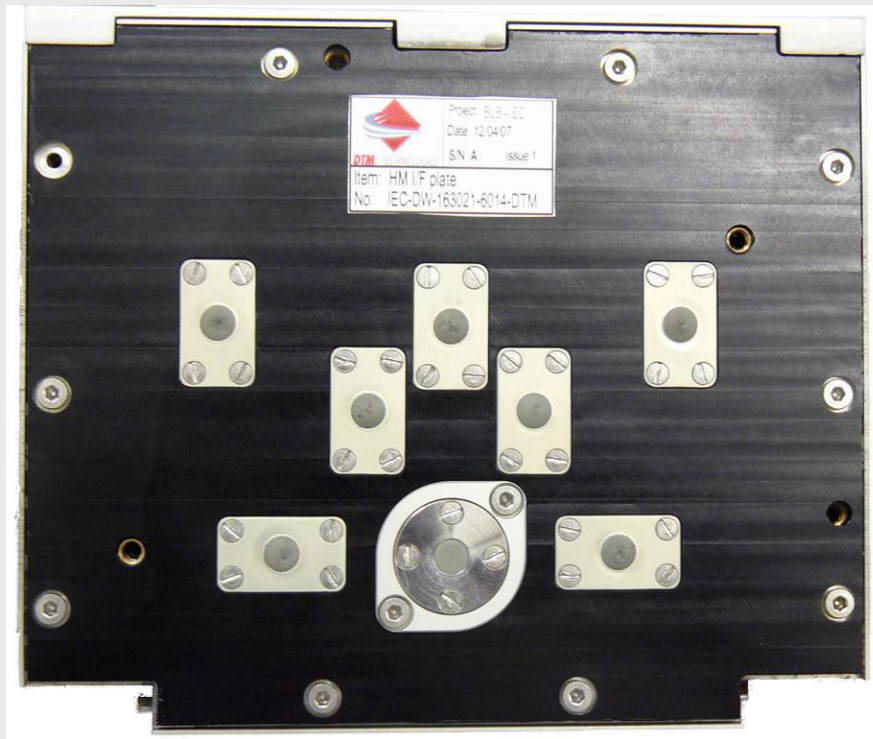
Rührsystem



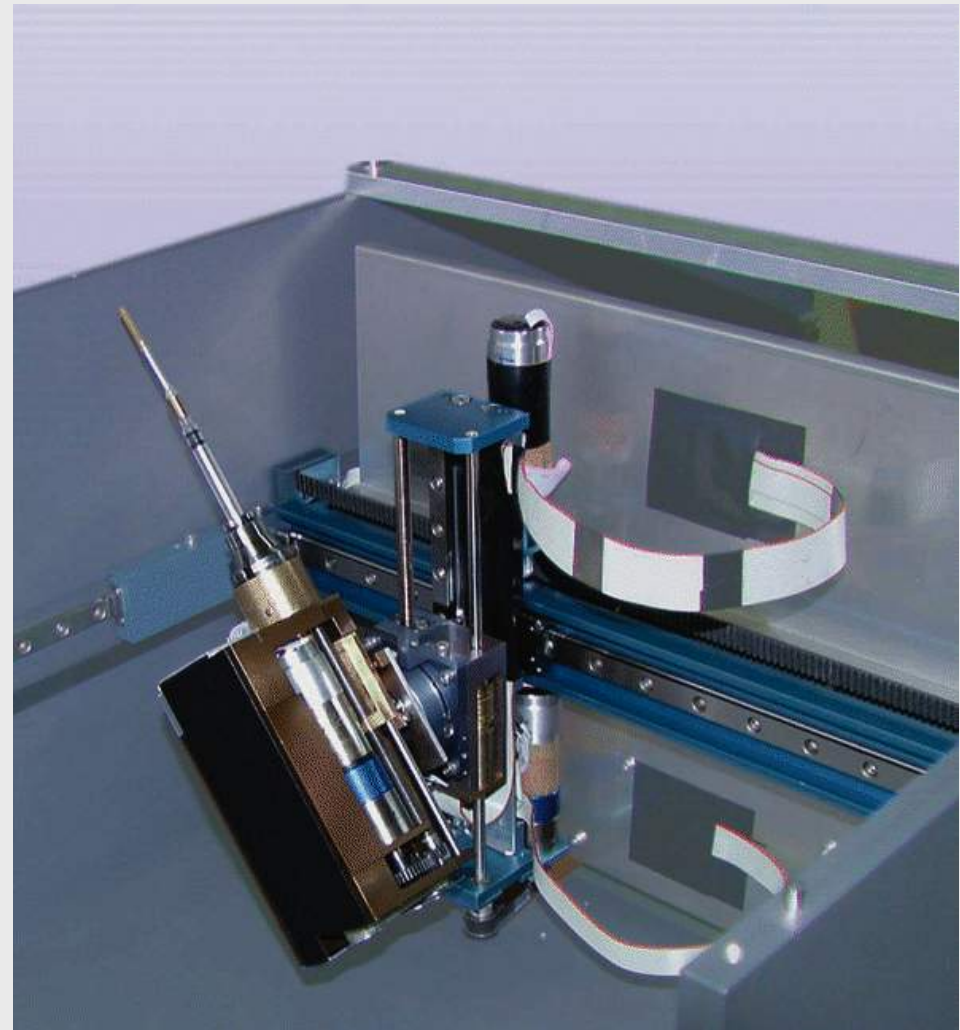
Phagozytose-Monitor mit cryokonservierten Muschel- Hämocyten



DLR Status-Seminar Strahlen-/Astrobiologie, Kiel, 12./13. Juni 2008
P.-D. Hansen u. E. Unruh, TU Berlin, Fakultät VI, FG Ökotoxikologie, 10587 Berlin



**Frontplatte und “ports” des
AEC**

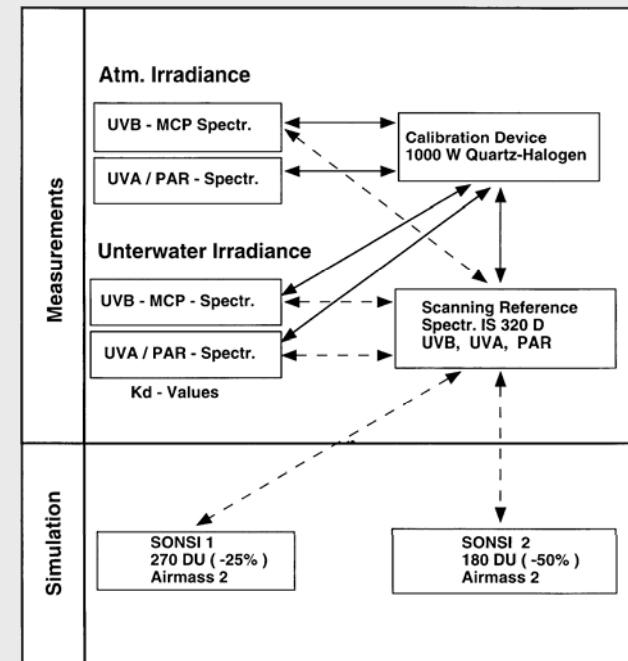
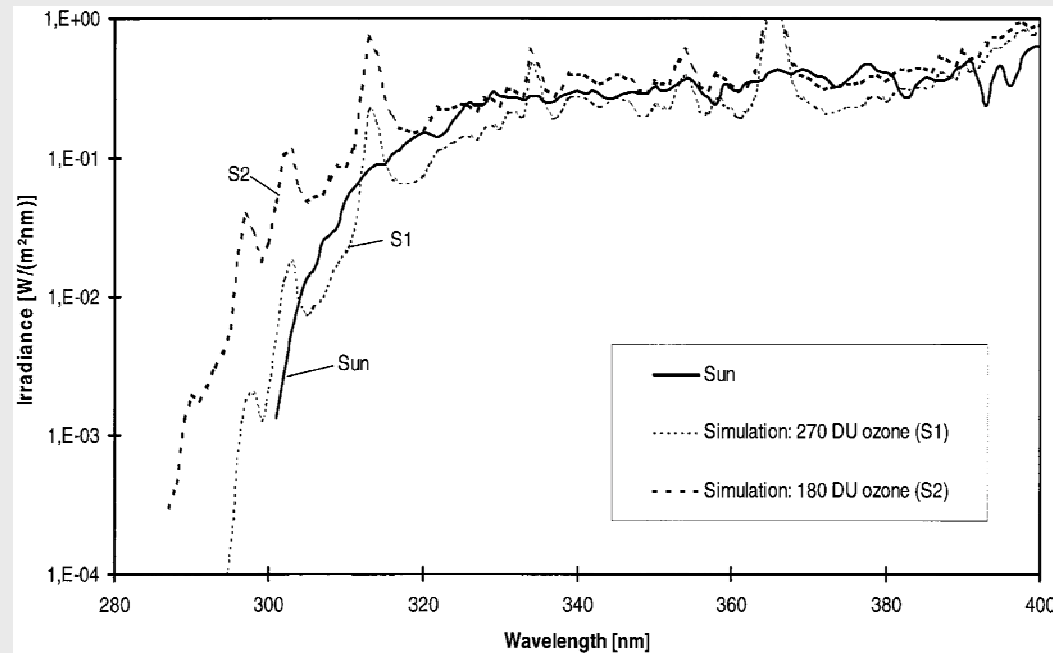


Handling mechanism (robot system)



DLR Status-Seminar Strahlen-/Astrobiologie, Kiel, 12./13. Juni 2008
P.-D. Hansen u. E. Unruh, TU Berlin, Fakultät VI, FG Ökotoxikologie, 10587 Berlin

Einfluss von Weltraumstrahlung



Warum “Download“ der exponierten Hämozyten?

1. Akkumulation von DNA-Schäden

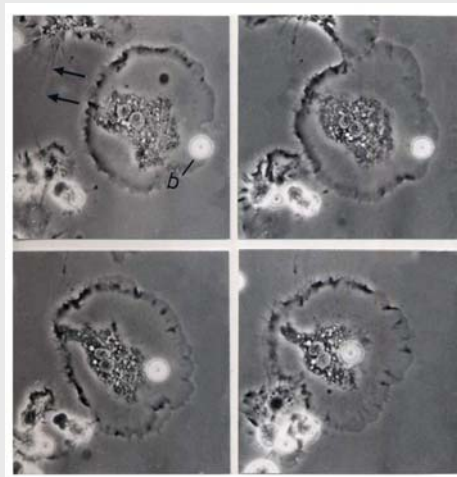
**Untersuchung der DNA-Schäden mit dem
DNA-Aufwindungstest und mit
Apoptose-Markern**

2. Phagozytose-Nachweis ohne ROS- Induktion im Fall eines zu schwachen Lumineszenz- Signals

**Am mit Glutaraldehyd fixiertem Material
wird nachgewiesen, ob eine Phagozytose
stattgefunden hat**



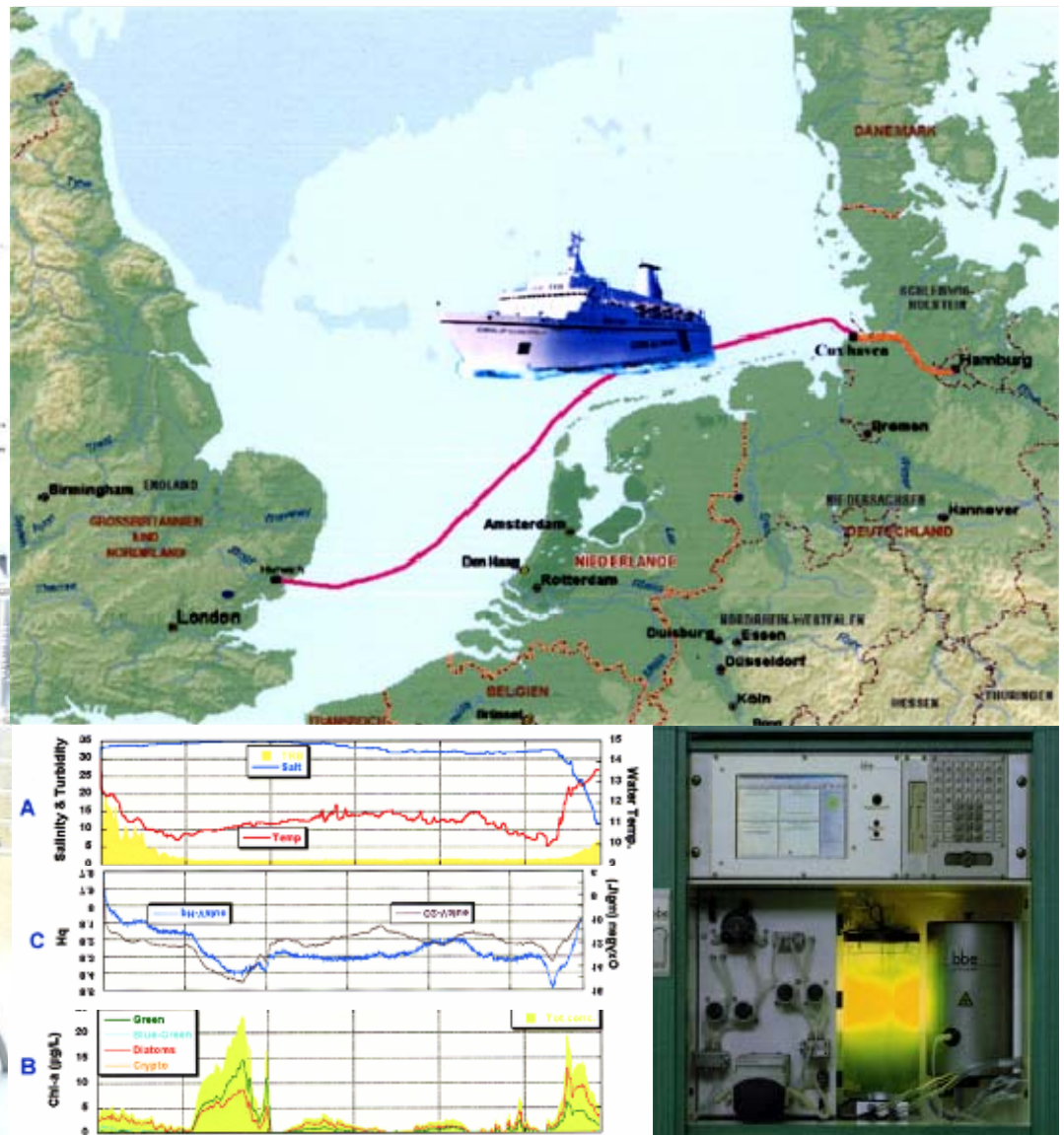
Entwicklung eines Biosensors mit Phagozytose-aktiven Zellen – Umweltmonitoring



Verwertungsplan

Das automatisierte Mess-System (AEC) soll als “real time“ Biotest im Rahmen des *in situ* effects monitoring (operational monitoring nach WFD) im Zusammenhang mit Ferry Box (bbe-Modaenke GmbH, 4H-Jena GmbH) eingesetzt werden.





Operational Monitoring -WFD

Real time bioassays, FerryBox 4E Jena - bbe



DLR Status-Seminar Strahlen-/Astrobiologie, Kiel, 12./13. Juni 2008
P.-D. Hansen u. E. Unruh, TU Berlin, Fakultät VI, FG Ökotoxikologie, 10587 Berlin

Zusammenfassung:

Im TRIPLE-LUX-B Projekt werden längerfristige Wirkungen von Weltraumbedingungen auf das Immunsystem sowie auf das Erbgut untersucht. Aufgrund der geplanten Dauer des Experiments stellt TRIPLE-LUX-B somit ein Testsystem zur Risikobewertung bei Langzeitmissionen in der Raumfahrt dar.

Auf der Grundlage der bisherigen Ergebnisse zur ROS-Bildung und Kryokonservierung ist es geplant, gemeinsam mit dem NRC (National Research Council) -Institute for Biotechnology Research in Montreal - einen on-line Biosensor mit Immunzellen zu entwickeln.

Das AEC = Advanced Experimental Containment soll zum Effects Monitoring in Ergänzung zum Ferry Box System (Blue Box) zur Erfassung der Immuntoxizität in Binnen- und Küstengewässern eingesetzt werden.

.



Zusätzliche Untersuchungen:

Klinostat-Untersuchungen sind in der Planung - gemeinsam mit Frau Dr. Hemmersbach, DLR

Bestrahlungsexperimente – gemeinsam mit Frau Dr. Rabbow, DLR

Teilnahme am Parabelflug im Rahmen 49th parabolic flight campaign



Meilensteinplan für das Jahr 2008

Flugvorbereitung

Optimierung der Protokolle: Optimierung der Protokolle zu Kryokonservierung und Rekonstitution der Zellen

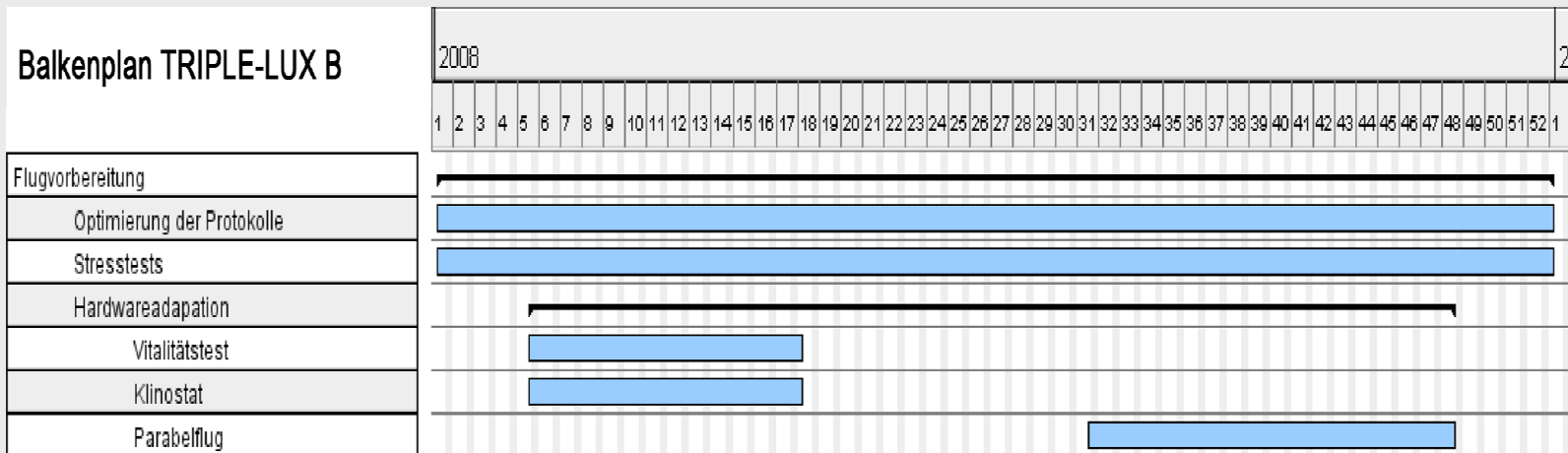
Stresstests: Stresstests mit rekonstituierten Zellen und mit Zellen in Primärkultur (0g pyper-g und Bestrahlung)

Hardwareadapation: Hardwareadapation und Testung in Zusammenarbeit mit DLR, ESA und Astrium

Vitalitätstest: Praktische Erprobung des Vitalitätstest mit dem Mikroskop mit Durchflußkammer der DLR

Klinostat (2009): μ G Simulation auf dem Klinostaten (BSSC), diese Arbeiten werden separat bei der ESA beantragt.

Parabelflug (Okt./Nov. 2008): μ G Simulation im Parabelflug (BSSC)



Literatur:

Hansen, P.D. and E. Unruh. 2005. TRIPLE LUX-B: Phagocytosis in Mussel Hemocytes, Proceedings of the 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space /26th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Cologne Germany, 26 June-1 July 2005 (ESA SP-585, August 2005)

Hansen, P.-D. 2008. Biosensors and Ecotoxicology, Eng. Life Sci., 8, 1, 1-7

Grundlegende Arbeiten zur Phagozytose mit Immunzellen (Hämozyten):

Renwranzt, L., Daniel, I. and Hansen, P.-D. (1985).
Lectin - Binding to Hemocytes of *Mytilus edulis*. Developmental and Comparative Immunology (DCI), 9, 203-210

Hansen, P.-D., Bock, R. and Brauer, F. (1991).
Investigations of phagocytosis concerning the immunological defence mechanism of *Mytilus edulis* using a sublethal luminescent bacterial assay (Photobacterium phosphoreum). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 100C, No 1/2, 129-132



Hansen, P.-D. (1993). Schadstoffwirkungen auf das Immunsystem. In: Biochemische Methoden zur Schadstoff-erfassung im Wasser - Möglichkeiten und Grenzen. Hrsg. Fachgruppe Wasserchemie in der GDCh, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1993), 107-121

Dizer, H., B. Fischer, A.S.A. Harabawy, M.-C. Hennion, P.-D. Hansen 2001. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*, Aquatic Toxicology, 55, 3-4, 149-156

Blaise, C., Gagné, F., Pellerin J., Hansen, P.-D., Trottier, S. 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Saguenay Fjord (Quebec, Canada) with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Environ. Toxicol. 17,3, 170-186. Blaise, C.,

Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen, P.-D. 2002. Immunocompetence of bivalve hemocytes by a miniaturized phagocytosis assay. Environ. Toxicol. 17,3, 160-169.

Gagné, F., C. Blaise, M. Fournier, P.D. Hansen. 2006. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol, 143 (2), 179-186



Danksagung



DLR = German Aerospace Center
Project 96-HEDS-04/05-101



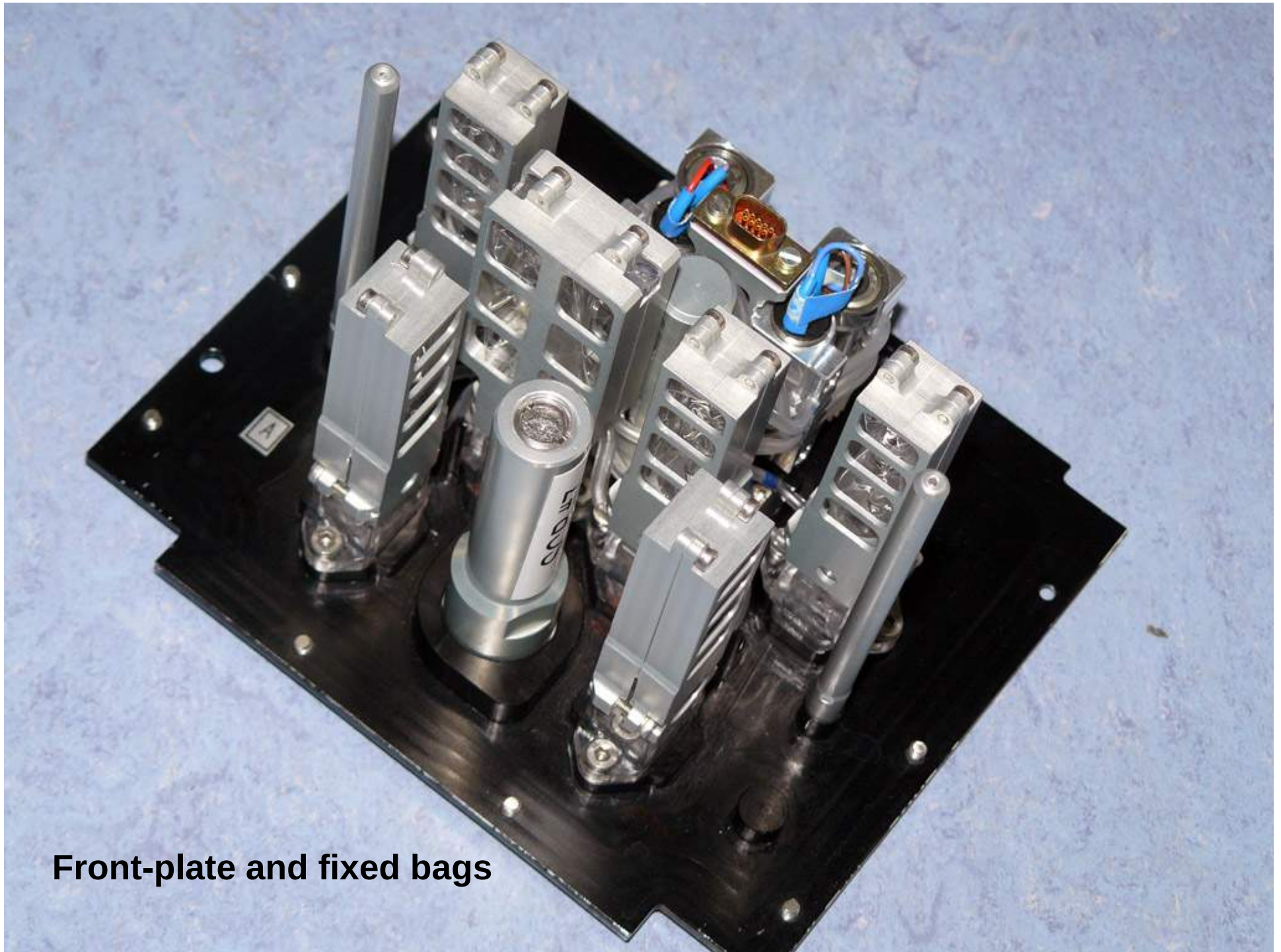
BMBF Federal Minister for Education, Research and Technology



European Commission: BEEP
EVK3-CT-2000-00025.33

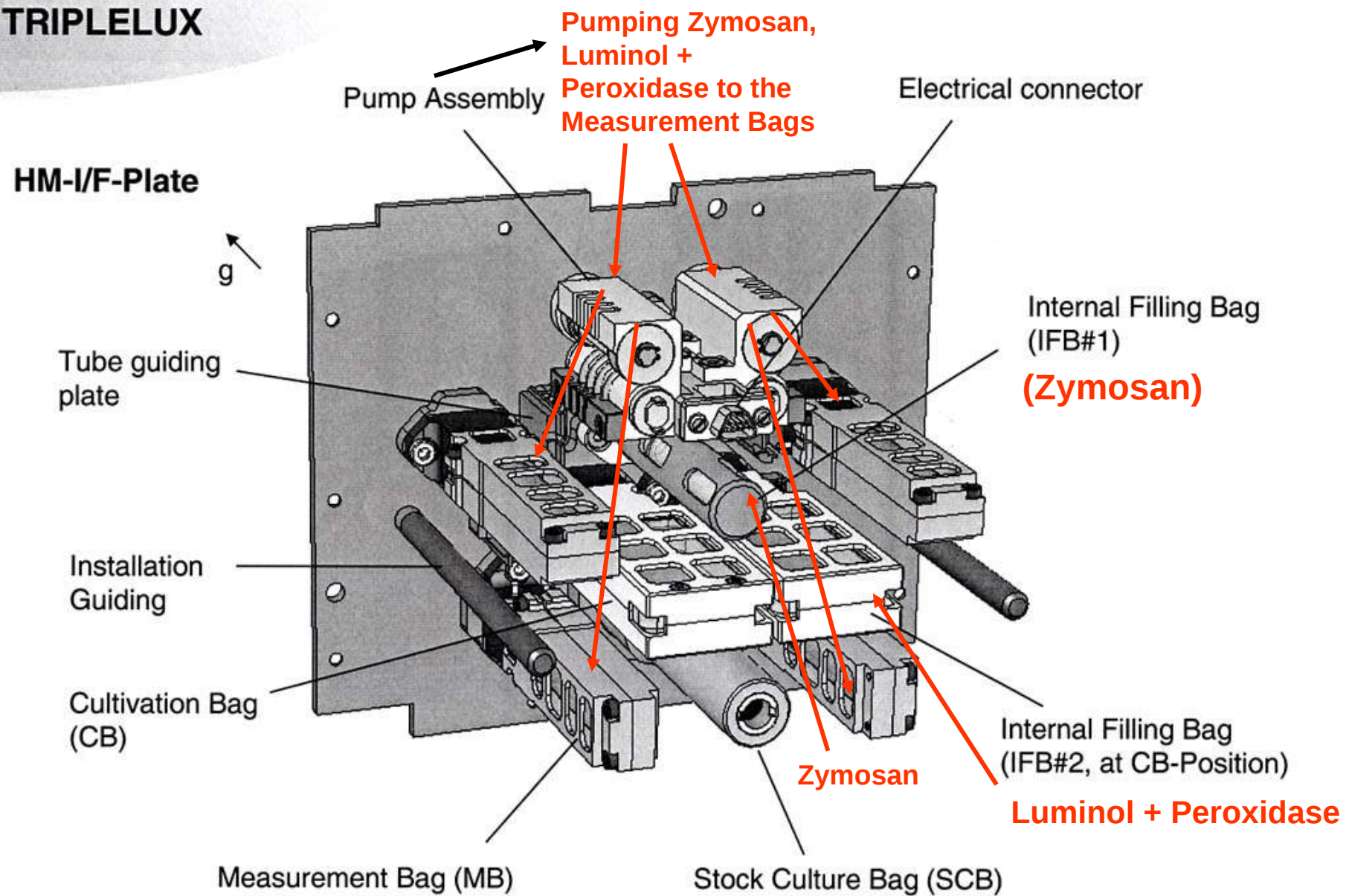


DLR Status-Seminar Strahlen-/Astrobiologie, Kiel, 12./13. Juni 2008
P.-D. Hansen u. E. Unruh, TU Berlin, Fakultät VI, FG Ökotoxikologie, 10587 Berlin



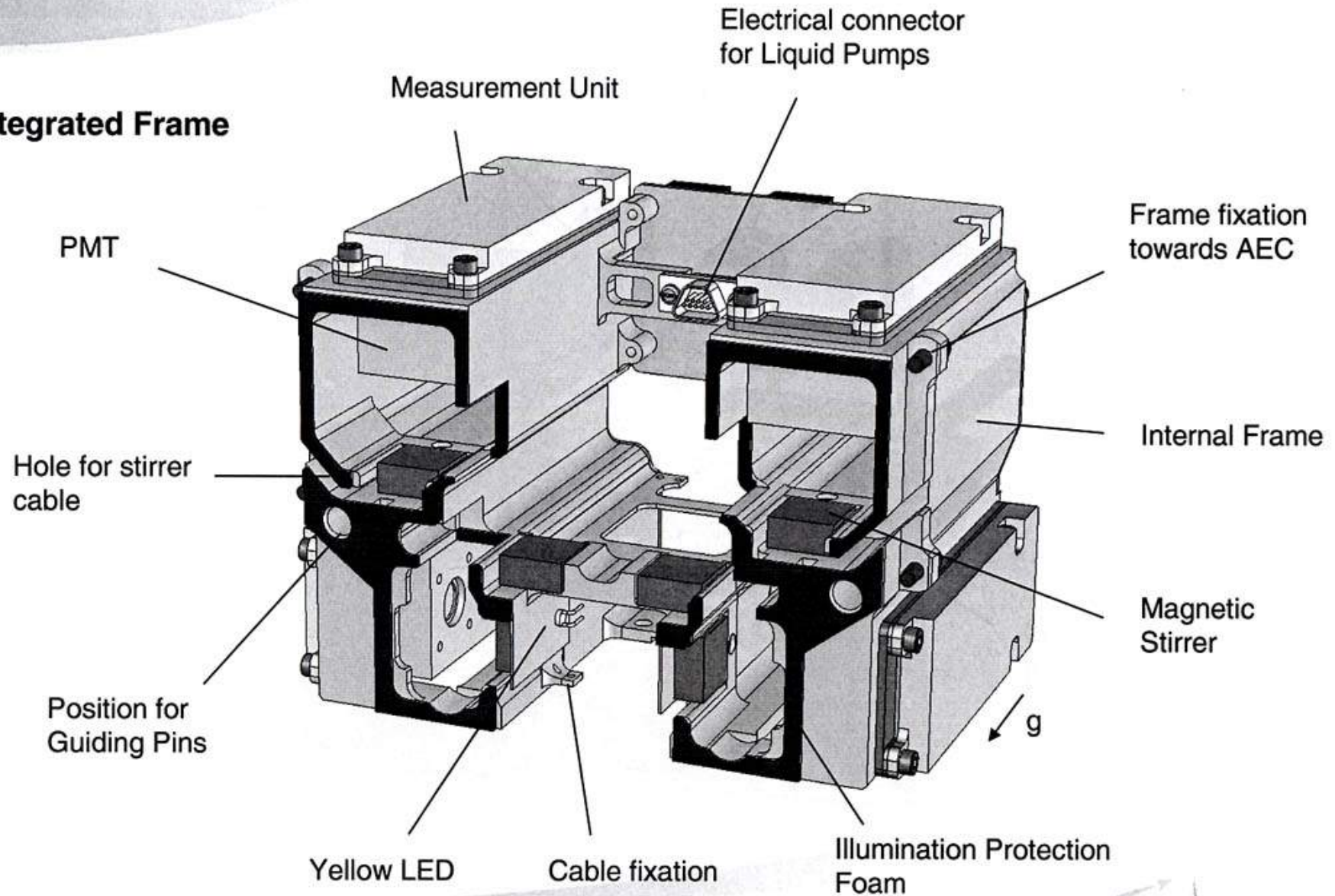
Front-plate and fixed bags

TRIPLELUX



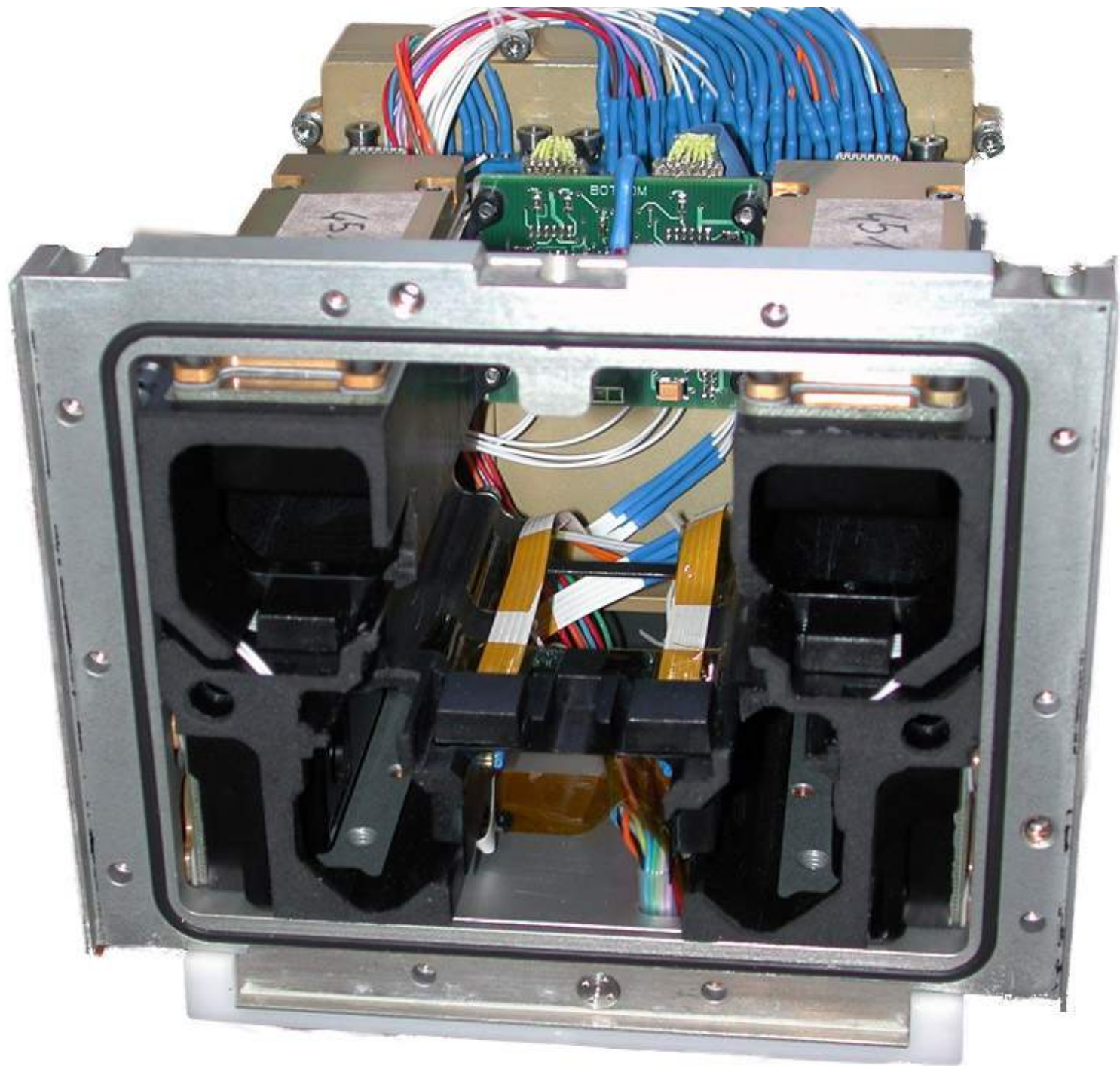
TRIPLELUX

Integrated Frame

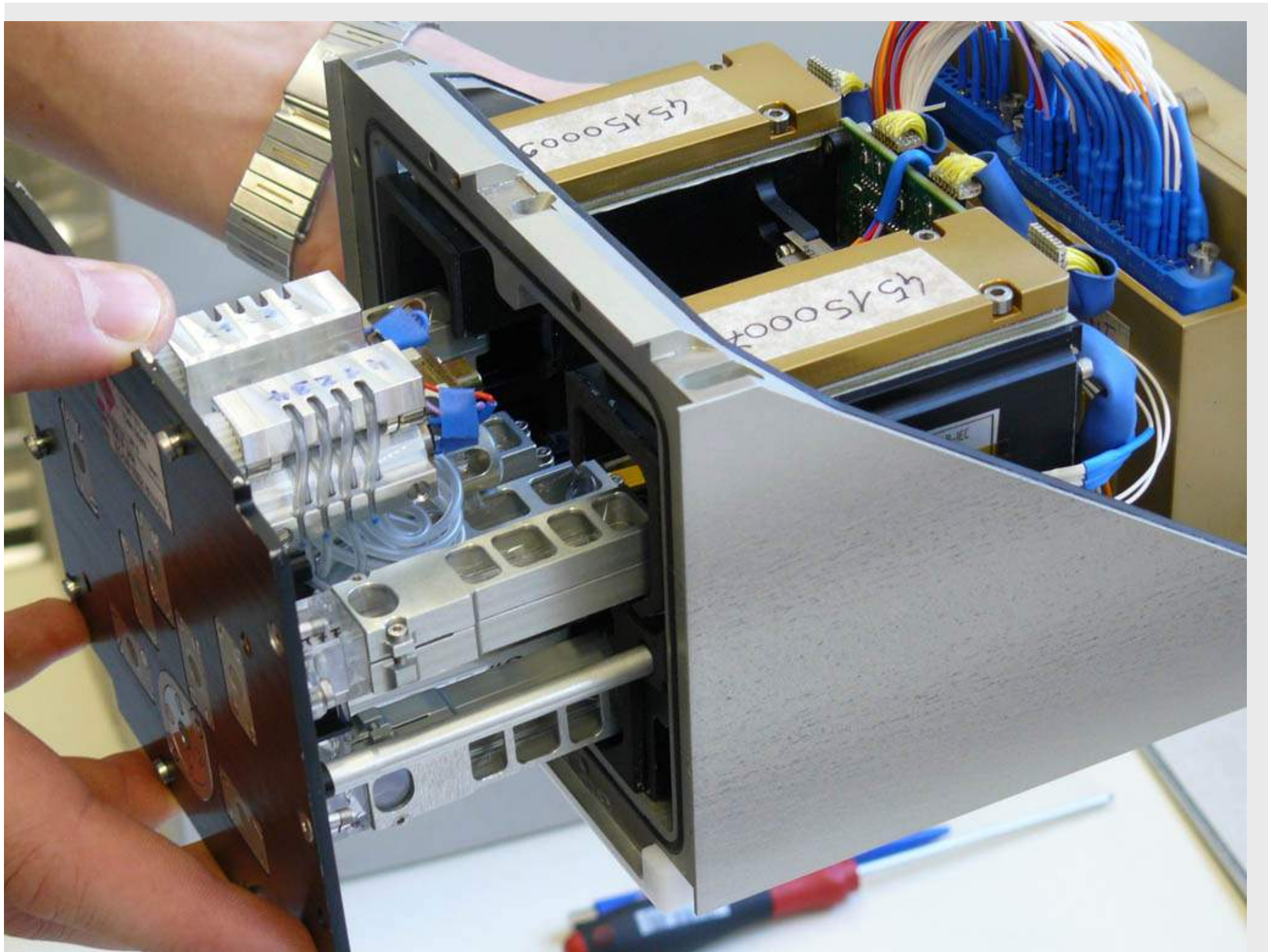


This document is the property of Astrium. It shall not be communicated to third parties without prior written agreement. Its content shall not be disclosed.

All the space you need



DLR
P.-D.



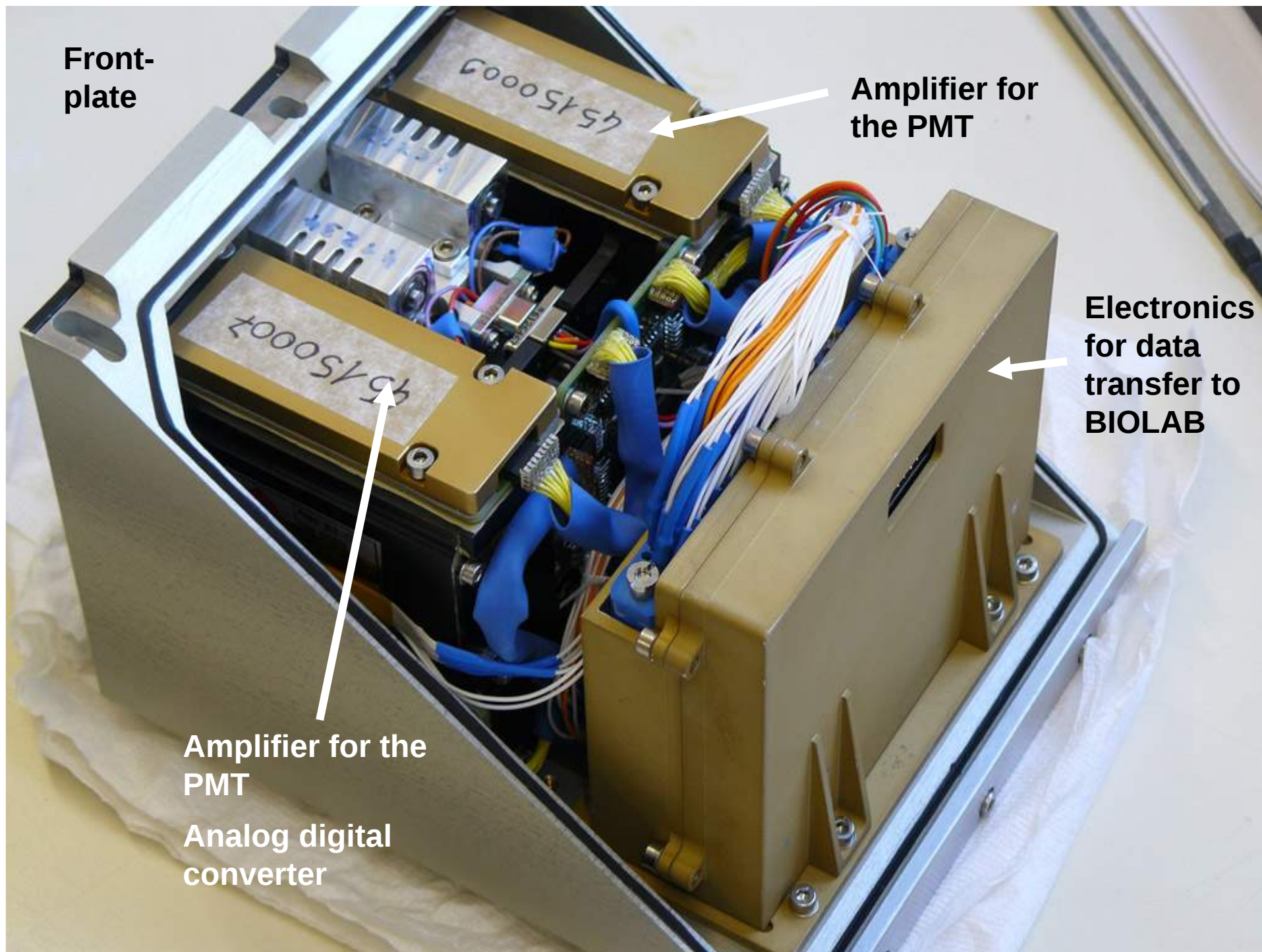
Front-plate

Amplifier for the PMT

Electronics for data transfer to BIOLAB

Amplifier for the PMT

Analog digital converter



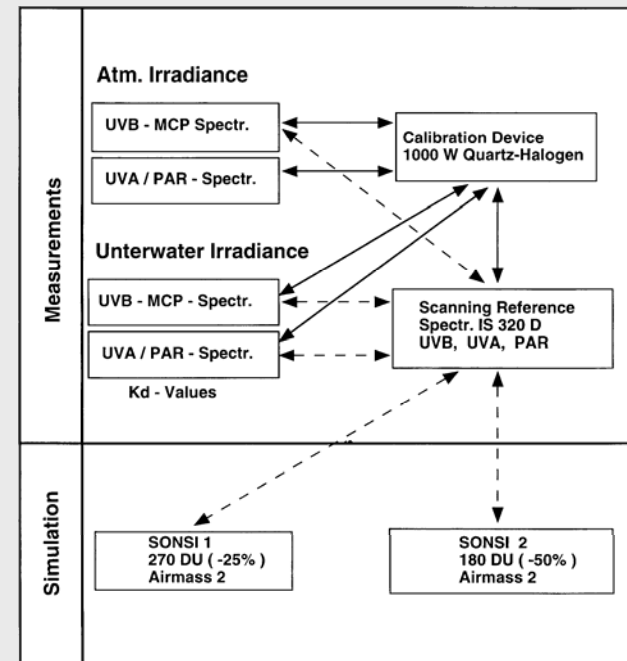
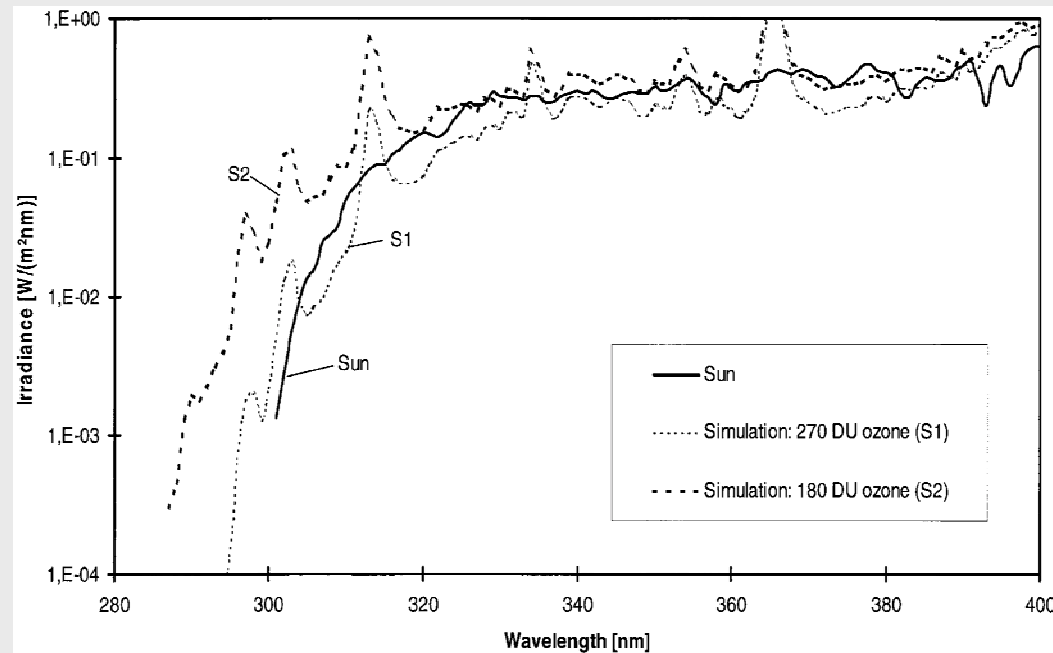


Measurement bags and hardcover for protection of the teflon bags

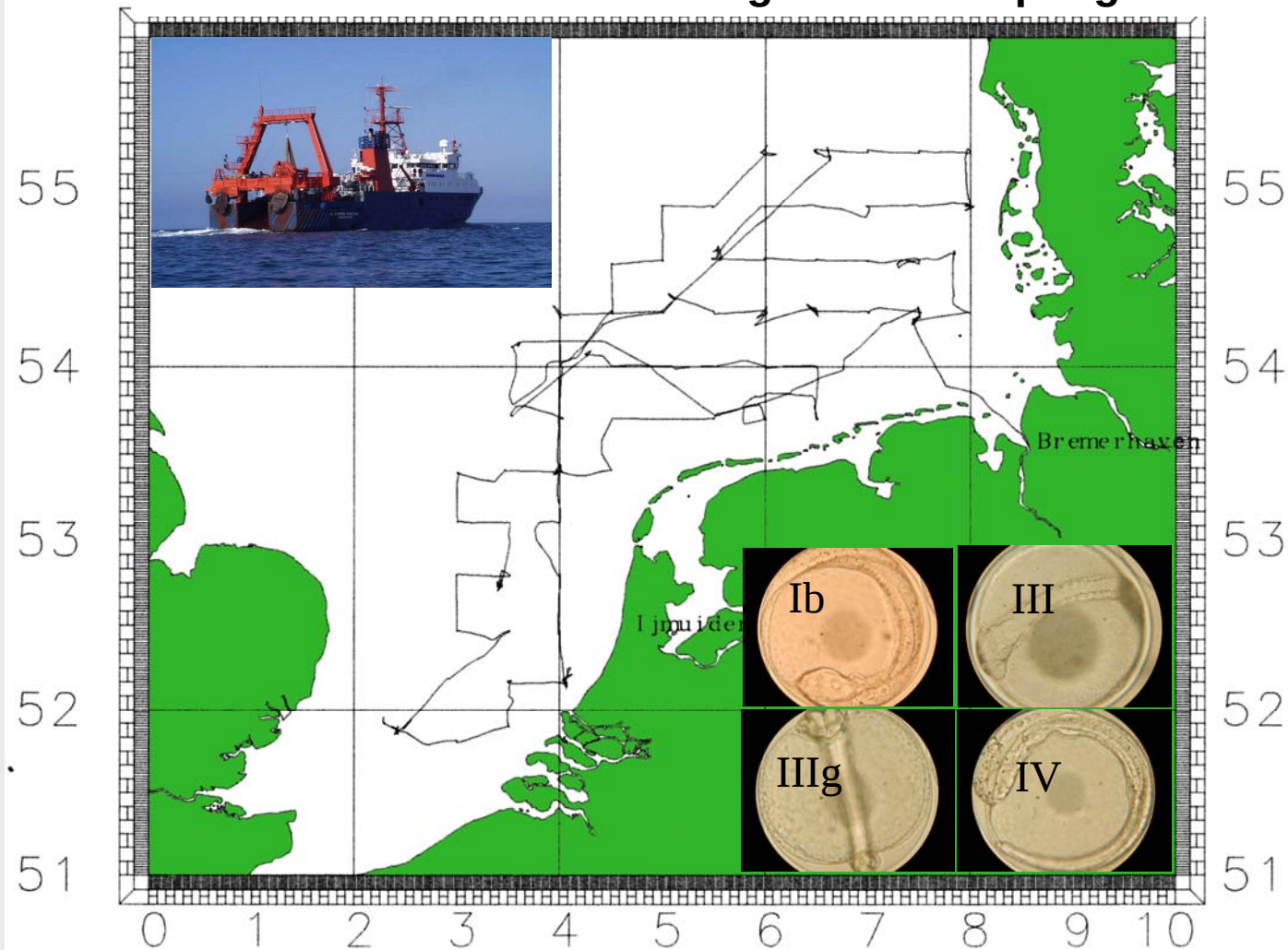
Testbed on ground for the in-flight hardware and final set up for in-flight position at the centrifuge surface



Vorversuche zur UV-B Exposition von Fischeiern (später Hämozyten) in der südlichen Nordsee



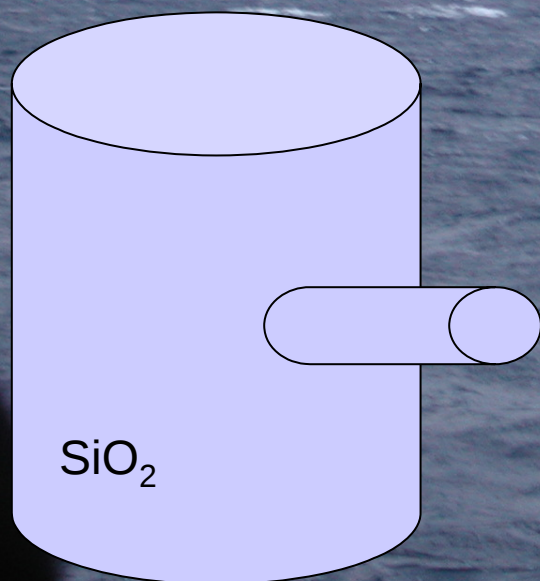
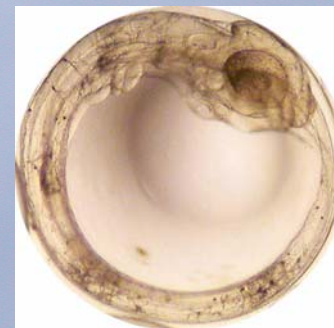
Cruises of RV Walther Herwig III and sampling stations



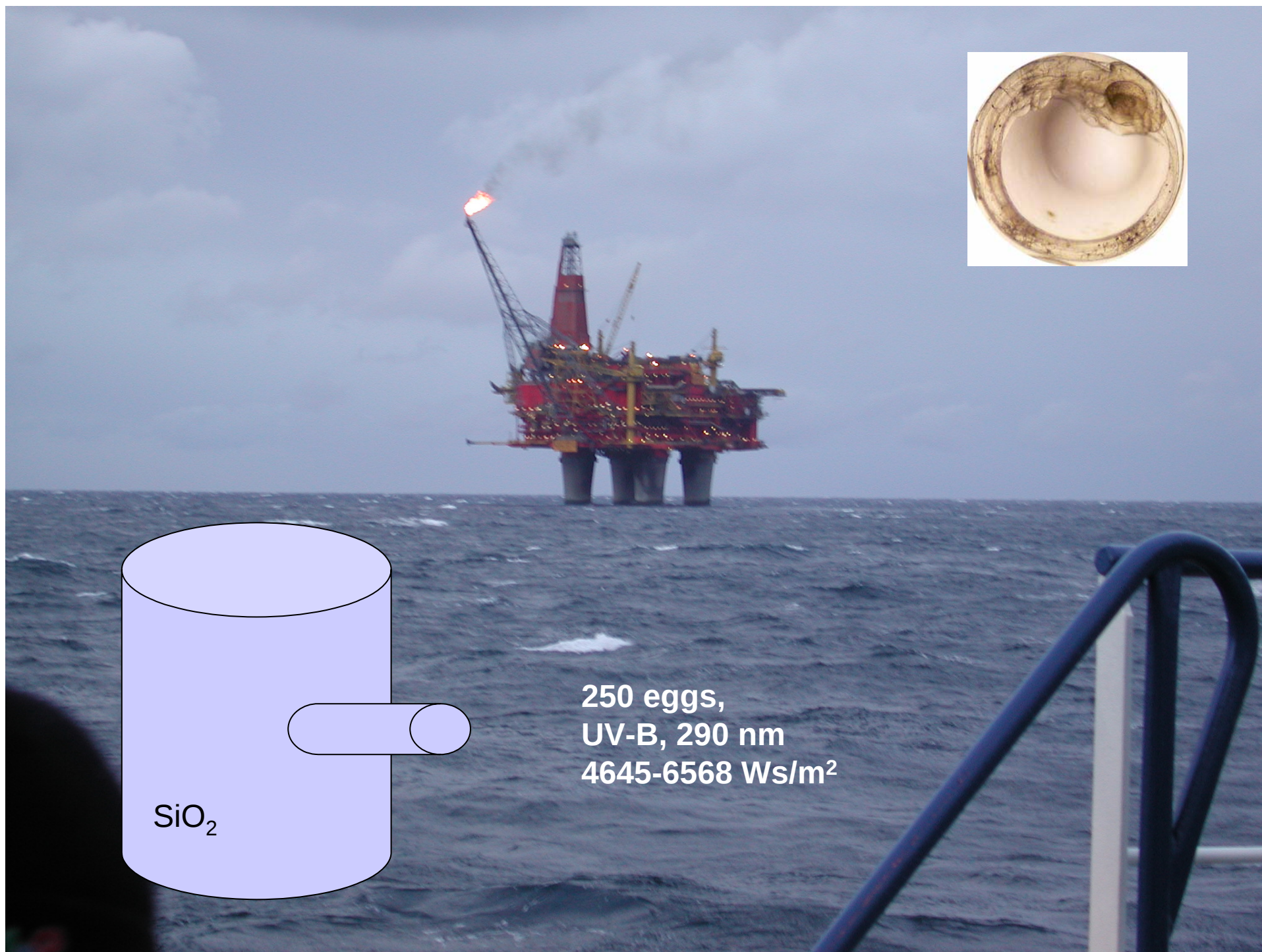
***Limanda limanda*: ontogenetic stages Ib-IV; in total 9 day of incubation**

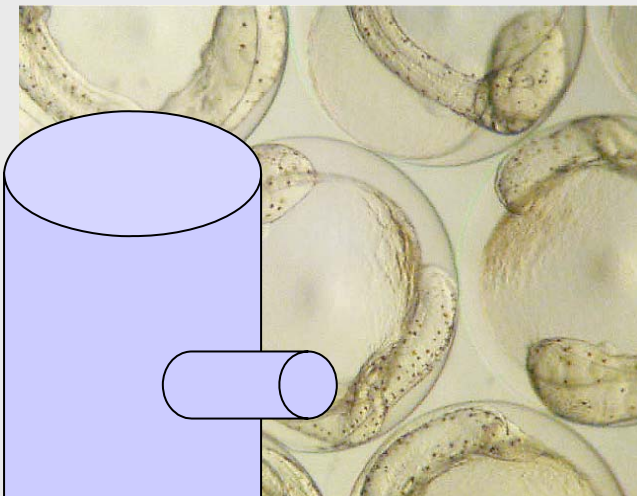
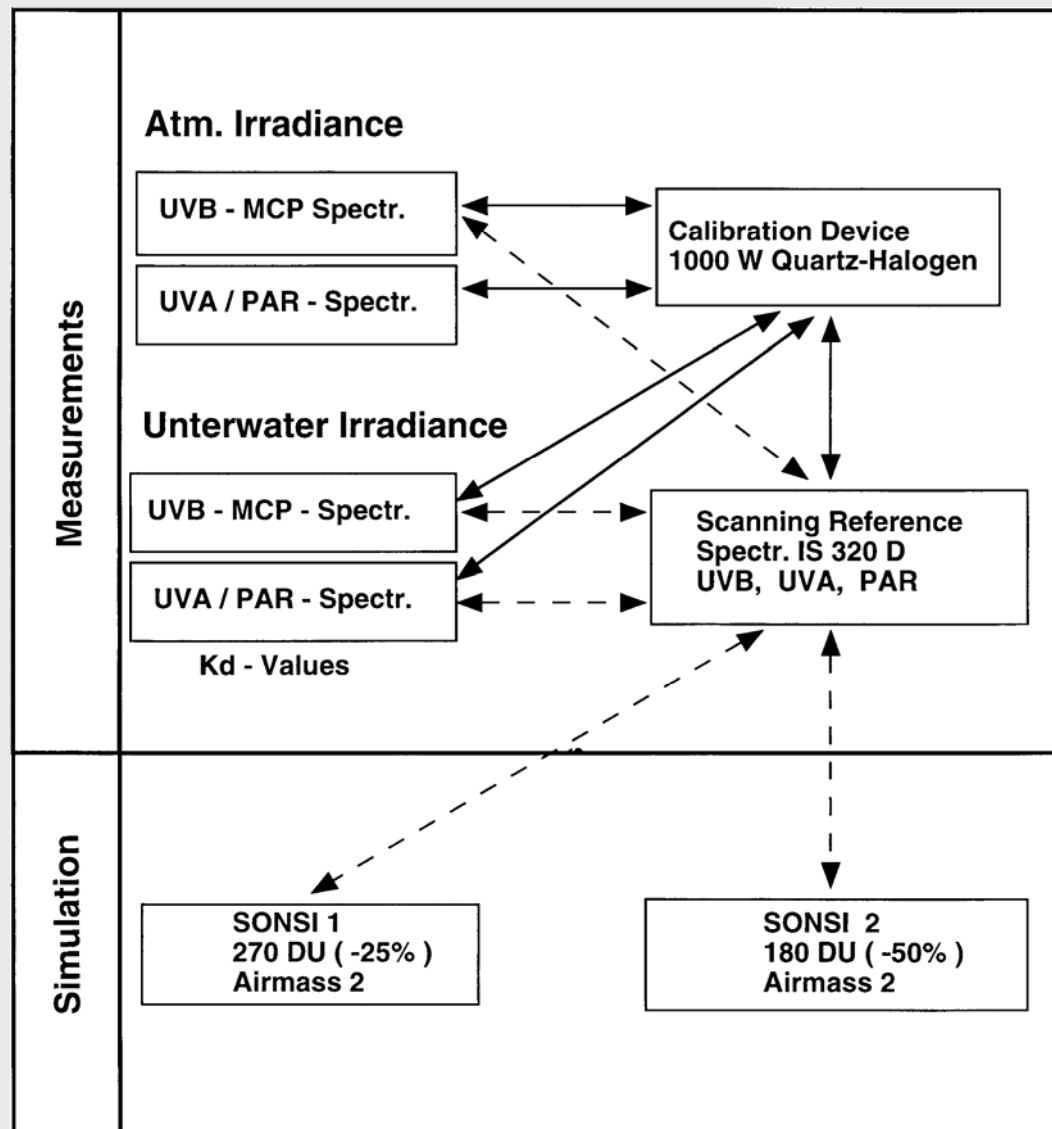


DLR Status-Seminar Strahlen-/Astrobiologie, Kiel, 12./13. Juni 2008
P.-D. Hansen u. E. Unruh, TU Berlin, Fakultät VI, FG Ökotoxikologie, 10587 Berlin

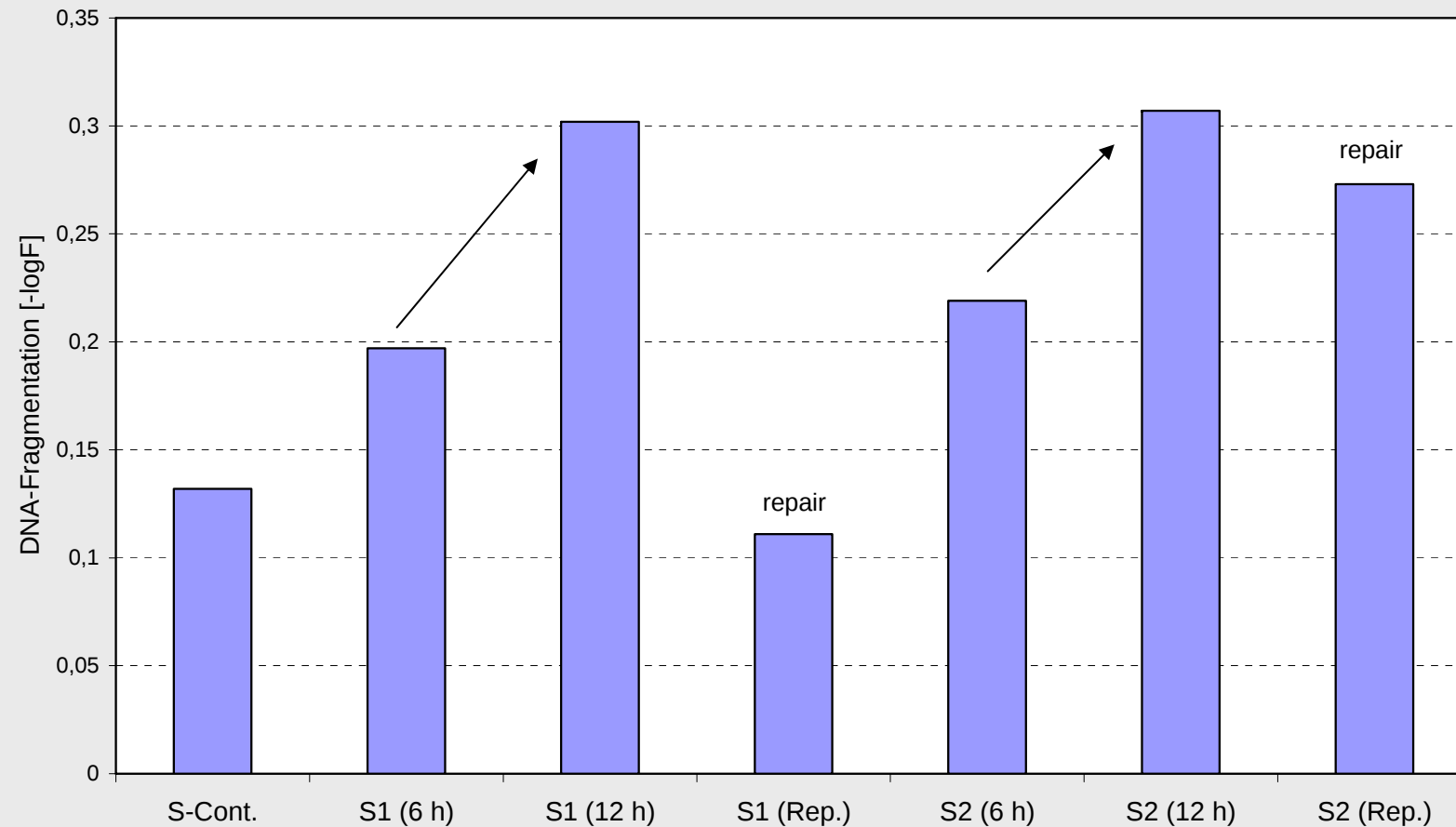


250 eggs,
UV-B, 290 nm
4645-6568 Ws/m²

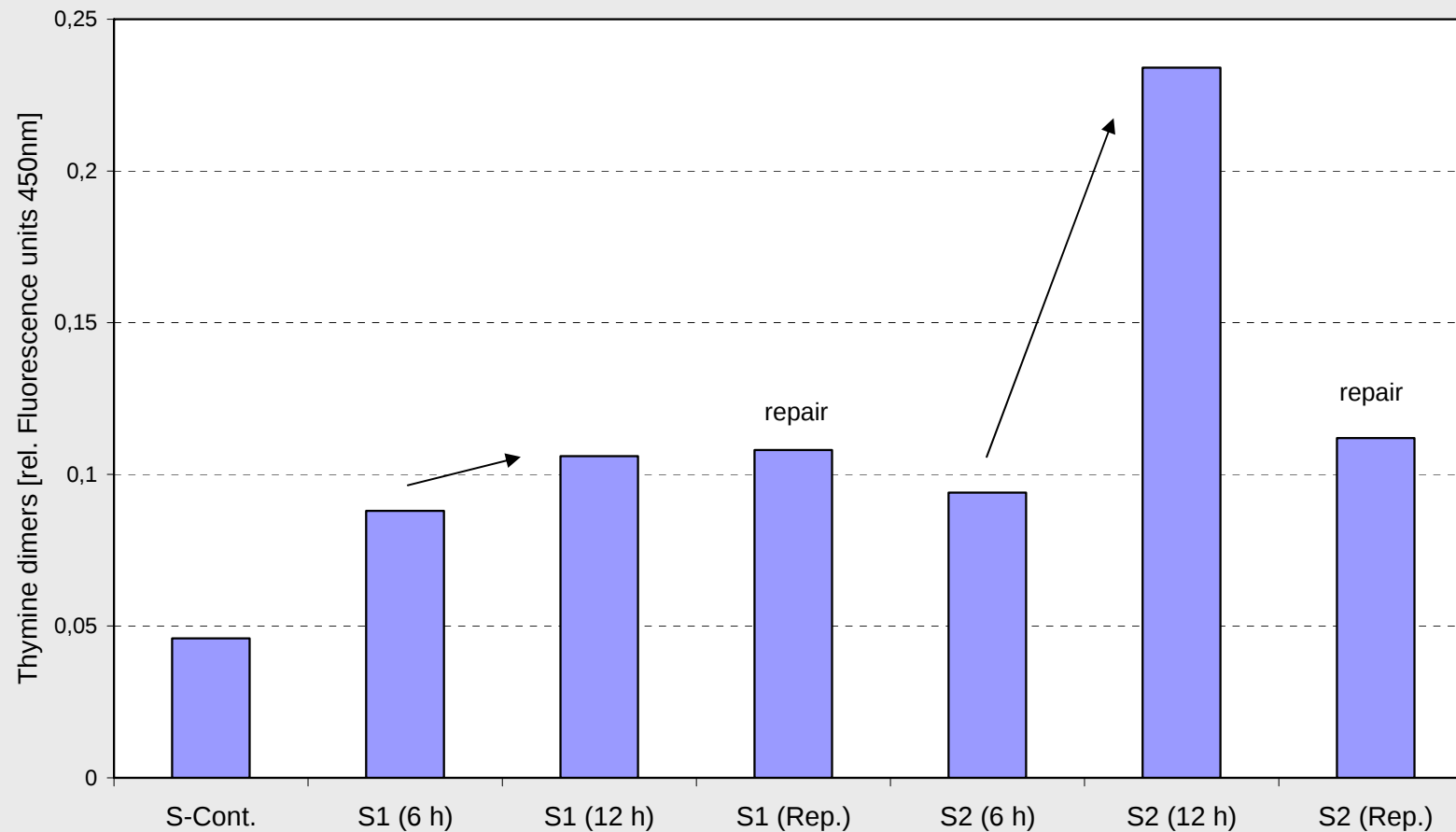




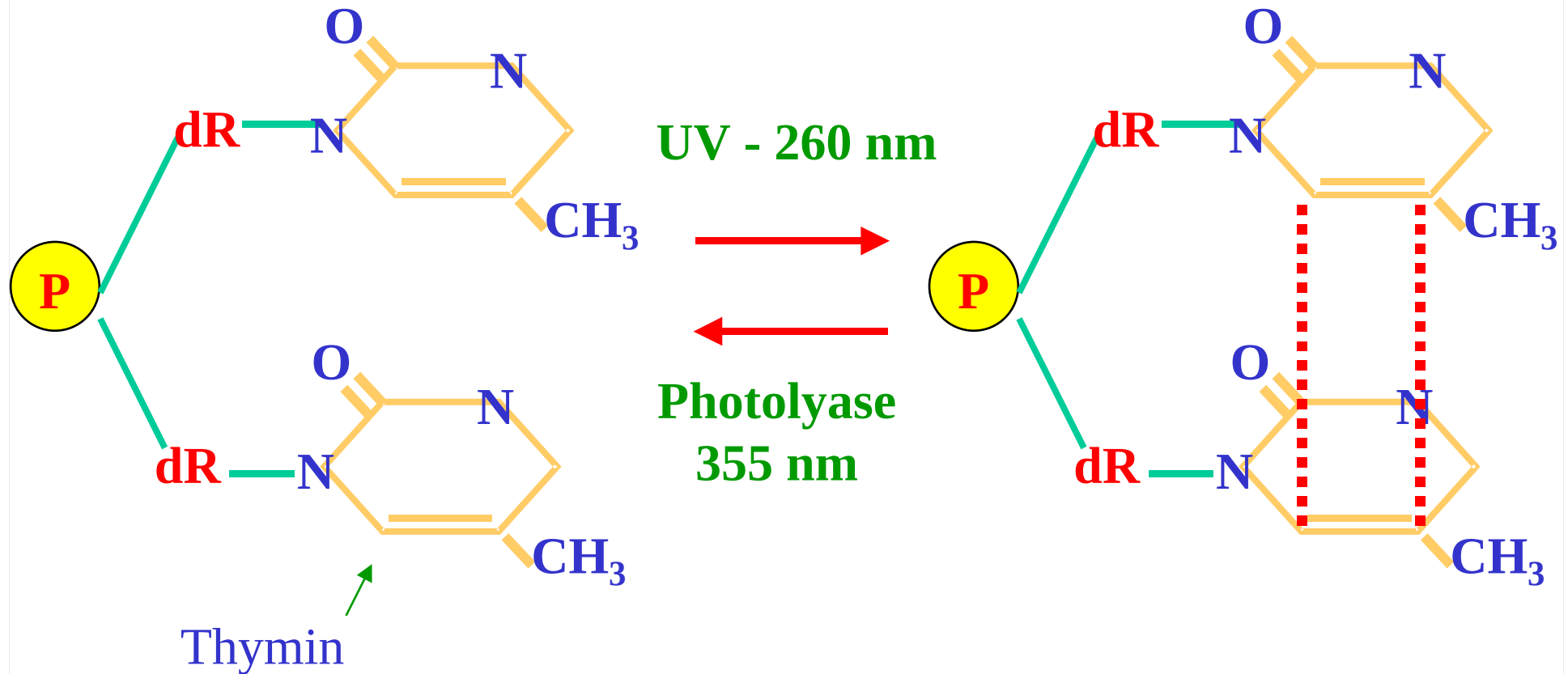
SONSI 1 and SONSII 2 exposure: DNA Fragmentation of exposed embryos (*L. limanda*) and repairment



SONSI 1 and SONSII 2 exposure: Thymine dimers of exposed embryos (*L. limanda*), early ontogenetic stages Ib-II, 2 times 6h in total 12h exposure and 18h repairment



**Thymin-Dimerisierung durch UV führt zu Verzerrung der
DNA-Doppelhelix und Störung der Basenpaare.
DNA-Polymerasen bleiben an Thymindimeren hängen.**



P = Phosphat dR = Desoxyribose