

BIOLAB AUF DEM PRÜFSTAND: AUFTAKT FÜR BIOLOGISCHE EXPERIMENTE AUF DER ISS

E. Brinckmann, F.S. Ambesi-Impiombato, H.J. Marthy, R. Spelat,
B. Labreuille, A. Pefferkorn, B. Eche, G. Gasset
European Space Agency, ESA/HME-GF
Postbus 299, NL-2200 AG Noordwijk, Niederlande

1. ÜBERSICHT

BIOLAB ist die größte biologische Versuchseinrichtung von ESA auf der Raumstation ISS: im Columbus-Modul ist BIOLAB in einem Doppelrack integriert und steht für Experimente mit Gewebe- und Zellkulturen sowie mit pflanzlichen Keimlingen und kleinen Tieren zur Verfügung. Eine Voraussetzung zur experimentellen Nutzung von BIOLAB war die Bio-Kompatibilität des Lebenserhaltungssystems in der Flugeinheit: dies besteht aus einer kontrollierten Atmosphäre (Regulation von Druck, Durchfluß, Sauerstoff, Kohlendioxid, Luftfeuchte), die durch ein Pumpen- und Kanalsystem mit ausgewählten Materialien über die biologischen Proben strömt. Die Bio-Kompatibilität wurde mit Kulturen von Rattenzellen (FRTL5) und jungen Stadien von Seeigellarven getestet. Beide Versuchsobjekte reagieren sehr empfindlich auf Störungen in den Kulturbedingungen und wurden schon erfolgreich bei der Auswahl von BIOLAB-Materialkomponenten eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Rattenzellen bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre einwandfrei im BIOLAB Flugmodell wuchsen. Das in BIOLAB eingebaute Phasenkontrastmikroskop erlaubte die ferngesteuerte automatische Analyse der Lebensfähigkeit dieser Zellen. Ebenso hatten die Seeigellarven eine normale Entwicklung über mehrere Tage bei 22°C und einer 0.03% CO₂ Atmosphäre. Diese Ergebnisse lassen gute Versuchsbedingungen für biologische Experimente auf der Raumstation ISS in BIOLAB erwarten.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Bio-Kompatibilitätstests wurden im BIOLAB Herstellerwerk EADS-Astrium, Toulouse, im Auftrag von ESA unter der Leitung von zwei wissenschaftlichen Beratern des BIOLAB Projektes durchgeführt: F.S. Ambesi-Impiombato, Universität Udine (Italien), und H.-J. Marthy, Laboratoire Océanologique, Banyuls sur mer (Frankreich). Die technische Ausführung besorgten R. Spelat, Udine, sowie B. Labreuille und A. Pefferkorn, EADS-Astrium, mit Unterstützung von B. Eche und G. Gasset, Universität Sabatier, Toulouse. Als Testgerät wurde die Flugeinheit von BIOLAB verwendet (Bild 1).

2.1. Biolab

Für biologische Versuche unter Weltraumbedingungen wurde BIOLAB von der European Space Agency (ESA) entwickelt [1, 2]. BIOLAB besteht aus einem Inkubator (Temperaturbereich 18°C bis 40°C), der zwei Rotoren enthält, auf die von der Crew jeweils sechs Experiment Container (EC) installiert werden können. Je nach Rotationsgeschwindigkeit können 0.001 bis 2.0xg Radialbeschleunigung erzielt werden bzw. 0xg Bedingungen bei Stillstand des Rotors. Die EC werden von einem zentralen Lebenserhaltungssystem (LSS) versorgt,

in dem Druck, Durchfluß, Sauerstoff, Kohlendioxid und Luftfeuchte kontrollierbar sind, so daß eine automatische Durchführung der Experimente gewährleistet ist, ohne daß die Zentrifugen angehalten werden. Beleuchtung, Videobeachtung und Datentransfer zum Zentralcomputer sind ebenfalls auf den laufenden Rotor möglich.



BILD 1. Die BIOLAB Flugeinheit während des Bio-Kompatibilitätstests im Herstellerwerk EADS-Astrium in Toulouse (F). Links im Bild ist der automatische Teil mit dem Inkubator, darüber der Einschub mit dem Roboter sowie Kühlfächer und Analyseinstrumente. Rechts ist der manuelle Teil mit dem Handschuhkasten und darunter zwei Kühl- oder Gefrierschränke.

Ein robotischer Greifarm kann bei stehendem Rotor vollautomatisch Proben aus dem EC entnehmen (oder zugeben) und in Kühlfächern lagern oder einfrieren (-20°C bis +10°C). Ferner ist eine automatische Analyse von flüssigen Proben in dem eingebauten Mikroskop oder dem Spektrophotometer vorgesehen. Weitere Manipulationen kann die Crew in einer „Bio-Glovebox“ unter Abschluß von der Kabinenluft durchführen; dieser Handschuhkasten kann auch mit Ozon sterilisiert werden.

In den Bio-Kompatibilitätstests wurde die Verträglichkeit des LSS sowie der Materialien in dem EC, dem Kühlfach und dem Mikroskop untersucht. Dazu wurden Schilddrüsenzellen von Ratten (FRTL5) als Modell einer Zellkultur und Seeigellarven [3] als Beispiel einer kleinen aquatischen Tierkolonie verwendet. Beide Organismen sind sehr empfindlich gegenüber Verschlechterungen in der umgebenden Atmosphäre und dem Material der Versuchsgefäße, so daß diese Versuche eine erste Aussage über die generelle Bio-Verträglichkeit von BIOLAB erlauben.

2.2. Zellkulturen

Die anhaftend zusammenwachsenden Kulturen der Schilddrüsenzellen von Ratten (FRTL5 Zellen) wurden in Kulturflaschen bei Umgebungstemperatur von Udine (Italien) nach Toulouse (Frankreich) transportiert. Dort wurden sie für 15 min bei 37°C mit 2 ml trypsinhaltigem CTC Medium suspendiert [4, 5]. Nach Verdünnung und Waschen mit neuem Kulturmedium wurde die Zellzahl bestimmt (5×10^5 Zellen pro Schale). 3 ml dieser Suspension wurden in 35 mm-Petrischalen gefüllt und mit gasdurchlässigem Parafilm® versiegelt. Je acht dieser Schalen wurden in einem Experiment Container montiert und bei 37°C, 5% CO₂, 90% relativer Luftfeuchte im BIOLAB Fluginkubator kultiviert (Bild 2). Kontrollzellen derselben Stammkultur wurden identisch behandelt und in einem Standard-CO₂-Inkubator (SCCI) an der Universität Sabatier, Toulouse, gehalten. Eine zweite Kontrollkultur wurde –ohne zusätzlichen Transport– im Labor der Universität Udine angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert.

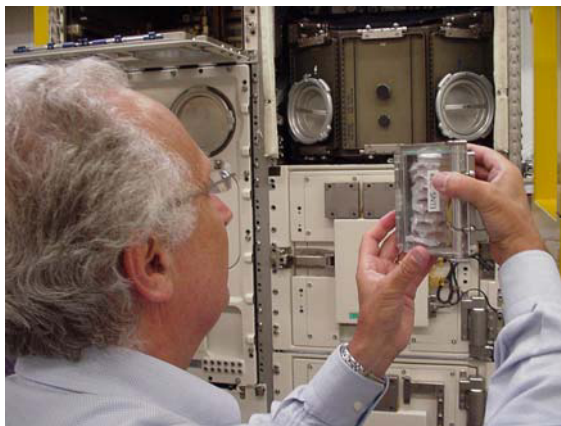


BILD 2. Überführung eines BIOLAB Experiment Containers (EC) in die BIOLAB Flugeinheit. Im EC sichtbar sind acht mit Parafilm verschlossene Petrischalen mit Kulturen von Ratten-Schilddrüsenzellen.

Je drei Petrischalen wurden täglich aus den drei Inkubatoren entnommen zur Bestimmung des pH (etwa pH 7.4 mit einer Tendenz nach pH 7.2-7.1 am Ende des Versuchs wegen der fehlenden Erneuerung des Mediums) und der Zellzahl, die mit einem Neubauer Hämocytometer in acht Feldern ermittelt wurde.



BILD 3. Standard BIOLAB Experiment Container (EC) mit abgenommenem Deckel und einem „Mini-Aquarium“ mit den Seeigellarven.

2.3. Seeigellarven

Aus dem Violetten Seeigel (*Spaerechinococcus granularis*) wurden nach dem Fang vor der Küste von Banyuls sur mer (F) unbefruchtete Eier frisch isoliert, künstlich befruchtet und in Petrischalen bis zur Blastula-Entwicklungsstufe gebracht. Die Blastularlarven wurden in mit Meerwasser gefüllte „Mini-Aquarien“ überführt, die in dem BIOLAB Experiment Container befestigt waren (Bild 3). Die Wände der „Mini-Aquarien“ bestehen zum großen Teil aus einer gasdurchlässigen „Biofolie“, die eine Sauerstoffversorgung der Organismen für mehrere Wochen ermöglicht [6]. Eine zweite Probe von 2x1 ml Larvensuspension wurde in elastische Röhrchen aus Silikonkautschuk injiziert, die eine Standardausrüstung des BIOLAB „Referenz-EC“ bilden. Alle Larven wurden bei 20°C in einem Standardluftgemisch (21% O₂ und 0.03% CO₂) kultiviert. Eine Kontrollgruppe wurde in Kulturflaschen bei +6°C und +10°C in den Kühleinheiten von BIOLAB gelagert. Als Standard-Laborkontrolle wurden Larven bei 20-22°C in Petrischalen gehalten.

3. ERGEBNISSE MIT ZELLKULTUREN

Die biologische Verträglichkeit des BIOLAB Lebenserhaltungssystems sollte durch die gleiche Zellzahl und Wachstumskinetik der Kulturen im Vergleich mit den Kontrollen nachgewiesen werden. Darüber hinaus sollte die Tauglichkeit des im BIOLAB eingebaute Mikroskops für einen ferngesteuerten Vitalitätstest der Zellen geprüft werden [1].

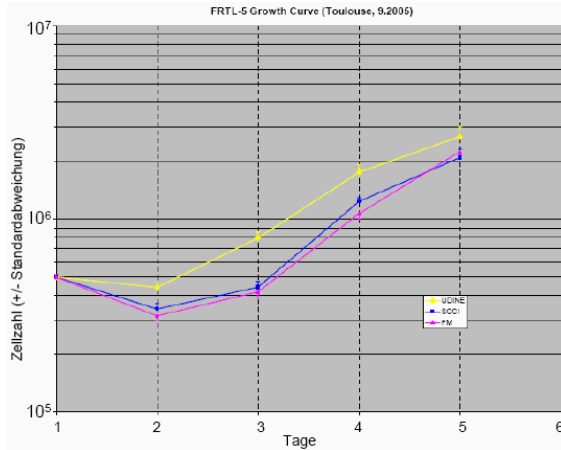


BILD 4. Wachstumskurve von Schilddrüsenzellen der Ratte (FRTL5) während der 5-tägigen Inkubationszeit in einem Standardinkubator in Udine (obere Kurve) im Vergleich zu dem Standardinkubator (SCCI) in der Sabatier Universität in Toulouse (mittlere Kurve) und zum BIOLAB Flugmodell in Toulouse (untere Kurve).

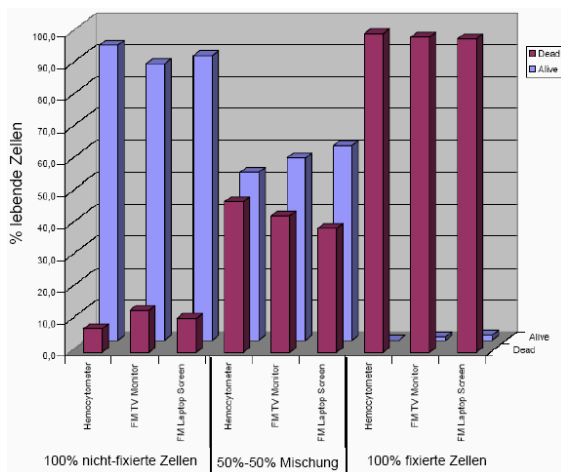


BILD 5. Prüfung der Vitalität von Ratten Schilddrüsenzellen (FRTL5): prozentuale Angabe von lebenden (hellgrau) und toten Zellen (dunkelgrau) in einer Suspension von nicht-fixierten (linke 3 Blöcke), von 50%-50% gemischten (mittlere 3 Blöcke) und von chemisch fixierten Zellen (rechte 3 Blöcke). Die Zellen jeder Suspension wurden in einem Hämacytometer (jeweils linke Säule eines Blocks) oder auf dem BIOLAB TV Monitor (mittlere Säule) oder gleichzeitig auf dem BIOLAB Laptop (rechte Säule) von zwei unterschiedlichen Beobachtern gezählt und ausgewertet. Angegeben ist der Mittelwert von je drei Messungen.

3.1. Kultivierungstest

Bild 4 zeigt die gemittelte Zellzahl (+/- Standardabweichung) in den Zellkulturen der drei verschiedenen Inkubatoren: ein gutes Auswachsen der Zellen sowie deren Teilungsrate mit beinahe identischen Zellzahlen am Ende des Tests (Tag 5) deuten auf einwandfreie Versuchsbedingungen im BIOLAB Inkubator hin. Im Vergleich zu dem Kontrollversuch in Udine ist eine vorübergehende Abnahme der Zellzahlen am Tag 2 erkennbar, was durchaus mit der Transportphase bei Raumtemperatur der anderen Kulturen von Udine nach Toulouse erklärbar ist, denn dieselbe retardierte Kinetik tritt auch in dem Standardinkubator an der Sabatier Universität in Toulouse auf, so daß sich ein BIOLAB spezifischer Effekt ausschließen läßt.

3.2. Vitalitätstest

In diesem Test sollte die Integrität von Zellen mit einer Trypanblaufärbung in BIOLAB Mikroskop nachgewiesen und mit derselben Analyse in einem Labormikroskop verglichen werden. Zu dem Test wurden drei Zellsuspensionen verwendet, die auf die gleiche Weise wie im Zellkulturtest angesetzt, letztlich aber nicht in Petrischalen, sondern in die Röhren des „Referenz-EC“ oder in Behälter des nicht temperierten Kühlfachs gefüllt wurden (1 ml): a) lebenden Zellen in Kulturmedium, b) in 70% Ethanol fixierte Zellen und c) eine 50%ige Mischung aus diesen beiden Suspensionen. Jeder dieser Ansätze wurde mit je 2 ml Trypanblau (0.4%, Sigma) gefärbt. Die gefärbten Proben (0.3 ml) wurden von dem BIOLAB Roboter ferngesteuert entnommen und in das BIOLAB Mikroskop eingespritzt. Dort wurden sie bei Phasenkontrastbeleuchtung mit einem 20x Objektiv ebenfalls ferngesteuert durchgemustert. Das Schwarz-Weiß Bild wurde auf den Videomonitor der Bodenkontrolleinheit sowie auf den Bildschirm des BIOLAB Laptop projiziert. Die Kontrollkulturen wurden in einem Neubauer Hämocytometer unter einem Labormikroskop (Olympus Bx50) mit einem 10x Phasenkontrastobjektiv ausgezählt.

Der Unterschied zwischen lebenden, ungefärbten und toten, blaufärbten Zellen war trotz der Schwarz-Weiß Übertragung deutlich im BIOLAB Mikroskop zu erkennen: tote Zellen erschienen als „dunkle“ Zellen, während lebende Zellen „heller“ und oft von dem typischen hellen Hof des Phasenkontrastes umgeben waren. Die Auswertung der Zellzahlen, die unabhängig und gleichzeitig von verschiedenen Beobachtern an den beiden Monitoren gemacht wurden, ergaben eine hervorragende Übereinstimmung (<10% Abweichung) und bestätigen somit die vorgesehene Nutzung von BIOLAB für Versuche mit Zellkulturen einschließlich deren ferngesteuerter Auswertung während des Fluges.

4. ERGEBNISSE MIT SEEIGELLARVEN

Die Entwicklung der Seeigellarven wurde durch visuelle Auswertung der Form, Anzahl und Bewegung der einzelnen Stadien verfolgt. Dazu diente ein Wild Stereomikroskop und im Vergleich dazu auch das in BIOLAB eingebaute Mikroskop als Analyseinstrument.

4.1. Entwicklung

Die Larven in den „Mini-Aquarien“ und in den Röhrcchen des „Referenz-EC“ entwickelten sich normal aus dem Blasenkeim (Blastula) zum Gastrula- und Pluteus-Stadium innerhalb von 60 Stunden. Dabei zeigten die Larven in dem „Referenz-EC“ eine etwas verzögerte Entwicklung, da die Röhrcchenwände aus Silikonkautschuk weniger luftdurchlässig waren als die speziellen Folienwände der Aquarien. Das Lebenserhaltungssystem von BIOLAB ist also in der Lage, eine einwandfreie Entwicklung von kleinen Lebewesen zu gewährleisten.



BILD 6. Videomonitorsicht einer Blastula-Larve des Seeigels im BIOLAB Mikroskop (Durchlichtbeleuchtung).

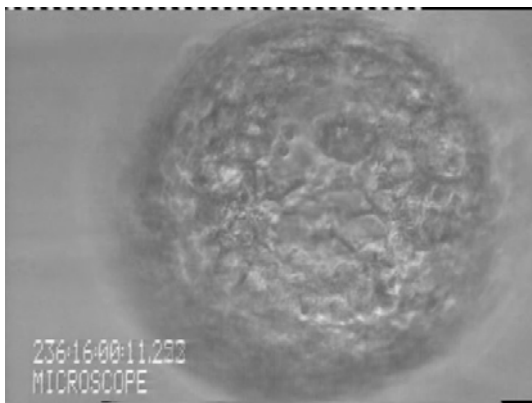


BILD 7. Ansicht einer Blastula-Larve des Seeigels im BIOLAB Mikroskop bei Phasenkontrastbeleuchtung (40x Objektiv). Einzelbild von einem Hi8-NTSC Videoband, aufgenommen mit dem BIOLAB Videorecorder.

4.2. Beobachtung im Mikroskop

Im BIOLAB Mikroskop können flüssige Proben wahlweise in zwei Durchflußküvetten mit unterschiedlicher Schichtdicke (100 µm und 500 µm) beobachtet werden. Für die Bewertung der Seeigelentwicklungsstadien wurden in die 500 µm Küvette ferngesteuert jeweils 300 µl eingespritzt. Die Larven hatten in diesem Zustand eine Größe von 200-500 µm. Sie wurden im Hellfeld (Bild 6), Dunkelfeld und Phasenkontrast (Bild 7) auf dem Bodenkontrollmonitor beobachtet. Details,

wie schlagende Härchen (Cilien) der Blastula, waren deutlich sichtbar bei Verwendung des 40x Objektivs. Dieses Ergebnis bestätigt das gute Auflösungsvermögen des BIOLAB Mikroskops und die problemlose ferngesteuerte Überführung der Proben vom EC in die Analyseinstrumente, was eine Voraussetzung für den automatischen Ablauf der Experimente im Orbit darstellt.

5. AUSBLICK

Der Inkubator mit seinem Lebenserhaltungssystem in BIOLAB Fluggerät konnten erfolgreich getestet werden: die Kultivierung von empfindlichen Modell-Organismen (Zellkulturen und Larven von invertebraten Tieren) zeigte die gleiche Kinetik wie die Kontrollen unter Standard Laborbedingungen. Die Möglichkeit der automatischen Versuchsdurchführung mit Kontrolle vom Boden aus bedeutet eine erhebliche Reduktion der Crewzeit und damit auch eine Flexibilität bei der Nutzung von BIOLAB auf der ISS. Ein weiterer Ausbau der Analysemöglichkeit im Weltraum ist erforderlich im Hinblick auf die begrenzte Rückführung von Proben zur Erde, wenn die Raumfähre (Space Shuttle) nicht mehr zur Verfügung steht. Die bisherigen Ergebnisse mit der BIOLAB Flugeinheit zeigen den Weg, wie Experimente mit kleinen Tieren und Pflanzen sowie Zellkulturen erfolgreich durchgeführt werden können.

6. SCHRIFTTUM

- [1] Brinckmann E., Biolab, EPU and EMCS for Cell Culture Experiments on the ISS; *Journal of Gravitational Physiology* 11(1), 67-74, 2004.
- [2] BIOLAB web Seite:
<http://spaceflight.esa.int/users/index.cfm?act=default.page&level=11&page=747>
- [3] Marthy H.-J., Developmental Biology of Animal Models under Varied Gravity Conditions: a Review. *Vie Milieu* 52 (4), 149-166, 2002.
- [4] Ambesi-Impiombato F.S., Parks L.A.M., Coon H.G., Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3455-3459, 1980.
- [5] Ambesi-Impiombato F.S. & Perrild H., Eds.; *FRTL-5 Today*; Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1989.
- [6] Horn E.R., Sebastian C.E., A Comparison of normal vestibulo-ocular reflex development under gravity and in the absence of gravity. In: *Biorack on Spacehab*, ed. M. Perry, ESA Publications Division, Noordwijk, ESA SP-1222, 127-138, 1999.