

SHAPE



Schlussbericht zu BNBest-BM

SHAPE (Cellbox-3): Untersuchungen zum Einfluss von Schwerelosigkeit auf das menschliche Immunsystem bei Langzeitweltraummissionen unter Verwendung eines dreidimensionalen Sphäroidenmodells des menschlichen Knochenmarks

Francesco Pampaloni

<https://orcid.org/0000-0003-4357-7320>

Frankfurt am Main 2024

Zuwendungsempfänger: Goethe Universität Frankfurt	Förderkennzeichen 50WB2019
Vorhabenbezeichnung: IMMUNO3D-SHAPE: Untersuchungen zum Einfluss von Schwerelosigkeit auf das menschliche Immunsystem bei Langzeitweltraummissionen unter Verwendung eines dreidimensionalen Sphäroidenmodells des menschlichen Knochenmarks	
Laufzeit des Vorhabens: 01. März 2020 bis 31. Juli 2023	

Projektkoordination:

Dr. Francesco Pampaloni

Goethe Universität Frankfurt, Buchmann
Institut für molekulare Biowissenschaften
(BMLS)

Max von Laue Str. 15, 60438 Frankfurt
am Main



Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
I. Kurzdarstellung	7
I.1 Aufgabenstellung	7
I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	13
I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens	13
I.4 Wissenschaftlicher/technischer Stand, an den angeknüpft wurde	15
I.4.1 Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden	15
I.4.2 Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste	16
I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	17
II. Eingehende Darstellung	17
II.1 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele	17
II.1.1 AP 1: Entwicklung der HYDROWELLS.....	17
II.1.2 AP 2: Charakterisierung der hBM-Sphäroide.....	23
II.1.3 AP 3: Bodenbasierte Forschung.....	33
II.1.4 AP 4: ISS-Workflow-Vorbereitung.....	33
II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	48
II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	49
II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	49
II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	50
II.6 Veröffentlichungen der Ergebnisse	51
II.6.1 Publikationen	51
II.6.2 Vorträge	51
II.6.3 Webauftritte	52
III. Erfolgskontrollbericht (nicht öffentlich)	60
IV. Kurzfassung	60

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Knochenmarkumbau in Astronauten.....	7
Abbildung 2: Graphische Darstellung des SHAPE-Konzepts.....	9
Abbildung 3: Schema Knochemark-Sphäroide.....	10
Abbildung 4: Die trabekuläre Struktur des Knochens.....	10
Abbildung 5: Knochenmark-Chips.....	11
Abbildung 6: U-Well vs. Hydrowell.....	17
Abbildung 7: Gussformen zur Herstellung der HYDROWELLS.....	19
Abbildung 8: Entnahme der HYDROWELLS aus den Gussformen.....	20
Abbildung 9: High-Density-HYDROWELLS.....	21
Abbildung 10: Mediumaustausch in der Experimental Unit.....	21
Abbildung 11: Diffusionsrate während des Mediumaustausch.....	22
Abbildung 12: Formierung der hBM-Sphäroiden in Multiwell-Platten.....	23
Abbildung 13: Fragestellung bei der Charakterisierung der hBM-Sphäroide.....	24
Abbildung 14: Arbeitsablauf für die Analyse der Sphäroide mit Fluoreszenzmikroskopie.....	25
Abbildung 15: Räumliche Verteilung der hMSC und hHSC im hBM-Sphäroid.....	26
Abbildung 16: Analyse mit dem konfokalen Mikroskop.....	26
Abbildung 17: Maximalprojektion des Bildstapels.....	27
Abbildung 18: Aufnahme zweier repräsentativer hBM-Sphäroide.....	28
Abbildung 19: Lokalisierung der CD90- und CD34-positiven Zellen.....	29
Abbildung 20: Nachweis von den pp65-positiven Zellkerne.....	29
Abbildung 21: Programmierter Zelltod in den hBM-Sphäroide.....	30
Abbildung 22: Proliferation in den hBM-Sphäroide.....	31
Abbildung 23: Nachweis von Collagen Typ I in den hBM-Sphäroiden.....	32
Abbildung 24: Nachweis von Hydroxyapatit-Mikrokügelchen in den hBM-Sphäroiden.....	32
Abbildung 25: Exponierung zu simulierter Mikrogravitation.....	33
Abbildung 26: "U-Well", "Torpedo" und "Sharp tip" Gießformen.....	34
Abbildung 27: Einzelne hBM-Sphäroide in Hydrowells.....	35
Abbildung 28: Pipettieren von vorgeformten Sphäroiden in die Hydrowells.....	35
Abbildung 29: Überblick über sechs Hydrowell-Kammern.....	36
Abbildung 30: Aufbau der experimentellen Einheit Typ 5.....	37
Abbildung 31: Vollständigen Zusammenbau der experimentellen Einheit Typ 5.....	38
Abbildung 32: Einsetzen in das äußere Gehäuse.....	38
Abbildung 33: Funktionstest in STaARS-1 EF.....	39
Abbildung 34: Interne Bauweise des STaARS-1 EF-Geräts.....	40
Abbildung 35: Grafische Zusammenfassung der SHAPE-Mission.....	40

Abbildung 36: Flussdiagramm des SHAPE-Experiments auf der ISS.....	41
Abbildung 37: Die Anordnung der experimentellen Behälter im STaARS-1 EF-System.....	42
Abbildung 38: Zeitplan der SHAPE-Mission.....	42
Abbildung 39: Arbeitsschritte der SHAPE Mission in Norfolk.....	43
Abbildung 40: Andocken an die ISS.....	44
Abbildung 41: Zeitplan der Fixierungsschritte.....	45
Abbildung 42: Segmentierung eines hBM-Sphäroids.....	47
Abbildung 43: Maximalprojektion von acht hBM-Sphäroiden.....	47
Abbildung 44: Vergleich 1g vs. μ -g.....	48
Abbildung 45: Prinzip von MACE.....	49
Tabelle I: Merkmale von Sphäroiden und Organoiden.....	15
Tabelle II: Features of Type 5 experimental unit	38
Tabelle III: Vorläufiger Zahlenmäßiger Nachweis.....	50

I. Kurzdarstellung

I.1 Aufgabenstellung

Das IMMUNO3D-SHAPE-Projekt zielte darauf ab, ein dreidimensionales Modell von menschlichen Knochenmark-Sphäroiden zu entwickeln, um die Auswirkungen von Schwerelosigkeit auf das Immunsystem des Menschen während längerer Aufenthalte im Weltraum zu erforschen.

Der Abschlussbericht gibt detaillierte Einblicke in das Projekt SHAPE (Spheroid aggregation and viability in space), das in der Laufzeit des Vorhabens durchgeführt wurde, darunter die wissenschaftliche Ausrichtung, den Forschungshintergrund, die geplanten Maßnahmen und die definierten Arbeitspakete. Die technischen Entwicklungen und wissenschaftlichen Untersuchungen, die für die Durchführung des SHAPE Experiments auf der Internationalen Raumstation (ISS) im Rahmen der Cellbox-3 Mission (<https://www.dlr.de/en/latest/news/2022/04/cellbox-3-launches-biomedical-experiments-to-the-iss>) erforderlich waren, wurden die an der Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Dr. Francesco Pampaloni in der Arbeitsgruppe Physikalische Biologie des Buchmann Instituts für molekulare Biowissenschaften (BMLS) durchgeführt und werden detailliert dargelegt.

Störungen im Immunsystem können die Fähigkeit der Astronauten, auf Langzeitmissionen im Weltraum Infektionen abzuwehren, stark beeinträchtigen. Faktoren wie die sich ändernden Gravitationsbedingungen während der Raumfahrt, die konstante Belastung durch Strahlung und der psychologische Stress, der mit ausgedehnten Missionen einhergeht, wirken sich auf das Immunsystem aus. Frühere Studien haben gezeigt, dass Raumfahrtmissionen das Immunsystem auf verschiedenen Ebenen beeinträchtigen können, von der Blutbildung über die angeborene bis hin zur adaptiven Immunität (**Abbildung 1**). Obwohl die Immunantwort für die Planung von länger andauernden bemannten Raumfahrtmissionen von entscheidender Bedeutung ist, liefern die bisher erhobenen Daten kein klares Bild. Dies liegt an der geringen Anzahl an Untersuchungen sowie an den stark variierenden Ergebnissen, die von früheren Raumflügen bekannt sind.

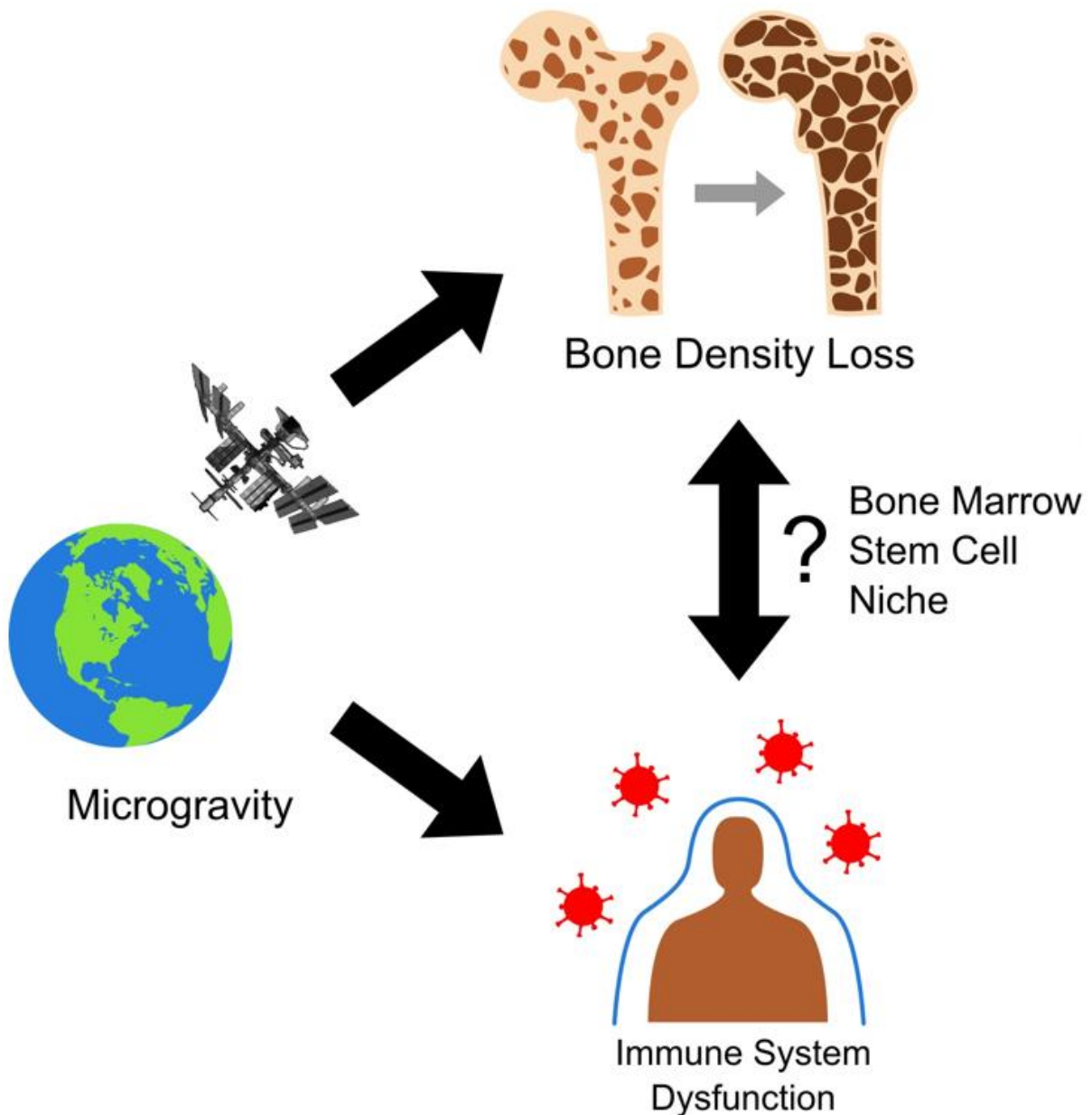


Abbildung 1 – Berichte über die Gesundheitsbeeinträchtigungen von Astronauten identifizieren Knochenmarkumbau und Funktionsstörungen des angeborenen Immunsystems als signifikante Gesundheitsrisiken bei langfristigem Aufenthalt im Weltraum. Durch Mikrogravitation induzierte Veränderungen des Knochenmarks führen zu Veränderungen der Stammzellnische im Knochenmark. Aufgrund der beeinträchtigten Hämatopoese und Myelopoese sind Auswirkungen auf die angeborene Immunität zu erwarten. Aus Sarkar, R. and Pampaloni, F., <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040766>

Das "SHAPE" (**Spheroid aggregation and viability in space**)-Experiment, welches auf der Internationalen Raumstation (ISS) durchgeführt wurde, zielte darauf ab, die Bildung und Überlebensfähigkeit von zellulären Sphäroiden unter Weltraumbedingungen zu bestimmen. Die durch SHAPE gewonnenen Erkenntnisse und Daten werden für die Planung und Durchführung von zukünftigen biotechnologischen Verfahren in der Mikrogravitation von

besonderer Bedeutung sein. Diese umfassen Studien mit 3D-Gewebeähnlichen Strukturen wie Sphäroiden und Organoiden, die auf Plattformen im niedrigen Erdbereich (LEO) und in der zukünftigen Cis-Lunar-Station durchgeführt werden. Darüber hinaus sind die Informationen für die Entwicklung von 3D-Bioprintern im Weltraum von entscheidender Bedeutung.

Zelluläre Sphäroide und Organoiden, auch als 3D-Gewebekulturen bezeichnet, imitieren bedeutende physiologische, morphologische und funktionale Eigenschaften echter Gewebe, weshalb sie als „Gewebe-Proxies“ gelten. Diese können aus verschiedenen Zelltypen wie Zelllinien, Primärzellen und Stammzellen gebildet werden, abhängig von den spezifischen biologischen Fragestellungen, die man mit ihnen untersuchen möchte. **Tabelle I** liefert einen Überblick über die wesentlichen Eigenschaften von Sphäroiden und Organoiden. Diese werden in der wissenschaftlichen Forschung, sowohl akademisch als auch industriell, häufig eingesetzt, um eine Reihe von Tests in der Arzneimittelforschung, der Toxikologie und der Zelltherapie durchzuführen.

Tabelle I – Merkmale von Sphäroiden und Organoiden

Art der 3D-Kultur	Formierung/Morphologie	Zelltypen
Sphäroide <i>Kompakte, mehrschichtige, zelluläre Verbände</i>	Formierung: Die Zellen werden unter nicht-adhäsiven Bedingungen aggregiert. Kein exogenes extrazelluläres Matrix Hydrogel-Gerüst erforderlich. Morphologie: Die Zellen organisieren sich zu kompakten Strukturen. In der Innenschicht können sich Hohlräume (z.B. kanalartige Strukturen) bilden. Bei der Co-Kultur mit verschiedenen Zellen kann es zu einer Sortierung und Schichtung kommen.	<ul style="list-style-type: none"> • Immortalisierte Zelllinien • - Primärzellen • - Stammzellen Beispiele: <ul style="list-style-type: none"> • - Tumorsphäroide • - Sphäroide des Knochenmarks • - Embrioid bodies • - Gastruloide • - Gehirnorganoide
Organoide <i>Zystenartige, hohle, sphärische Zellstrukturen, bestehend aus einer polarisierten Zelleinzelschicht, die ein inneres Lumen begrenzt</i>	Formierung: Die Zellen werden in ein exogenes extrazelluläres Matrix-Hydrogel (z.B. Kollagen, Matrigel oder synthetische Hydrogele) gesät. Im Laufe der Zeit organisieren sich Einzelzellen und Zellcluster selbst und entwickeln polarisierte zystenartige Strukturen.	<ul style="list-style-type: none"> • Adulte Vorläuferzellen • Immortalisierte epitheliale Zelllinien. Beispiele: <ul style="list-style-type: none"> • Epitheliale Organoiden (Pankreas, Leber, Darm, Niere, Haut, etc.) • Blastoide

Die Erzeugung dieser 3D-Kulturen erfolgt in einem mehrstufigen Prozess, der auf der zellulären Selbstorganisation basiert, einschließlich Aggregation, Bildung molekularer Zell-zu-Zell-Verbindungen, Wachstum und Differenzierung. **Die Schwerkraft beeinflusst maßgeblich die Formation von 3D-Zellkulturen, indem sie die Zellansiedlung in der Kultur fördert und die Gewebsaggregation sowie Morphogenese antreibt.** Darüber hinaus steuert die dichtegetriebene Konvektion unter Schwerkrafteinfluss die Nährstoffversorgung aus dem Kulturmedium und die Entsorgung von Metaboliten. Unter Schwerelosigkeitsbedingungen sind die Prozesse, die zur Bildung von Sphäroiden auf der Erde führen, entweder nicht vorhanden oder undefiniert.

Das Ziel des SHAPE-Experiments (eine graphische Darstellung des SHAPE-Konzepts wird im **Abbildung 2** gezeigt) ist es, die Formation von Sphäroiden unter Mikrogravitationsbedingungen zu erforschen und die Zellebensfähigkeit in den mehrschichtigen Strukturen der Sphäroide zu quantifizieren.

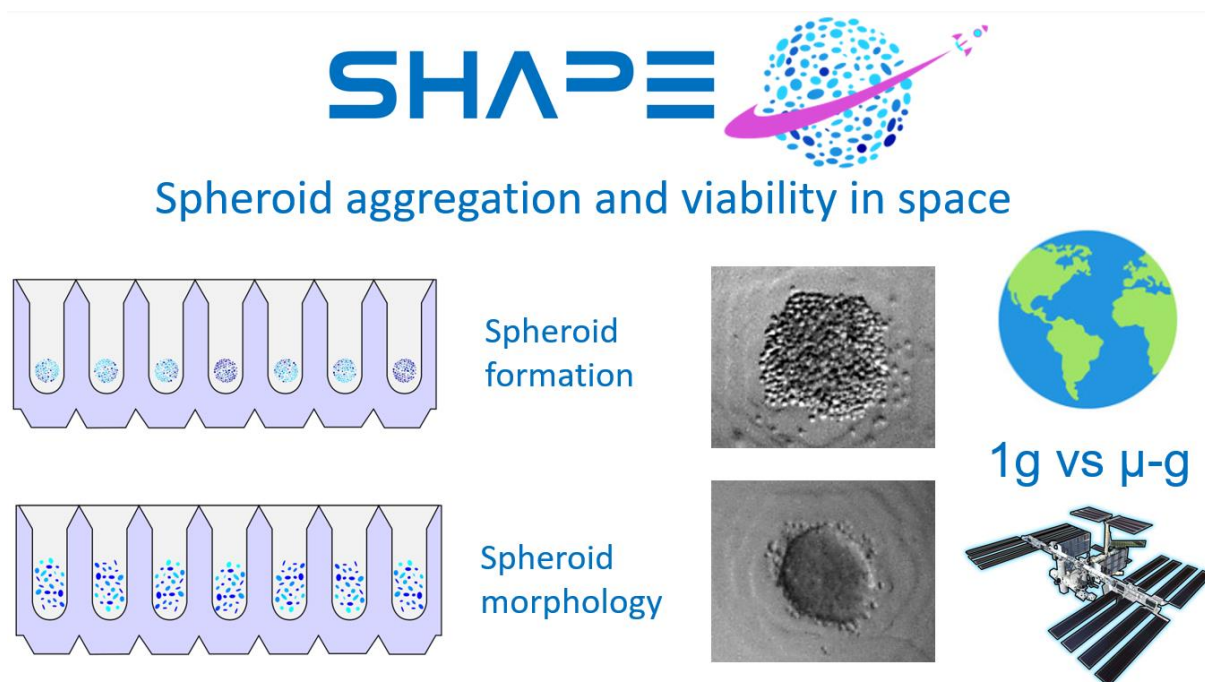


Abbildung 2 – Graphische Darstellung des SHAPE-Konzepts.

Im Rahmen von SHAPE wurde ein Modell von humanen Knochenmark-Sphäroiden (hBM) angewendet. Die hBM-Sphäroide sind **heterotypische Sphäroide, bestehend aus mesenchymalen Stammzellen des menschlichen Knochenmarks (hBM-MS) und CD34+-humanen hämatopoetischen Stammzellen (hHSC)**. Hydroxyapatit-Mikrokügelchen werden ebenfalls den Sphäroiden hinzugefügt, um den mineralischen, trabekulären Teil des Knochens zu simulieren (**Abbildung 3**).

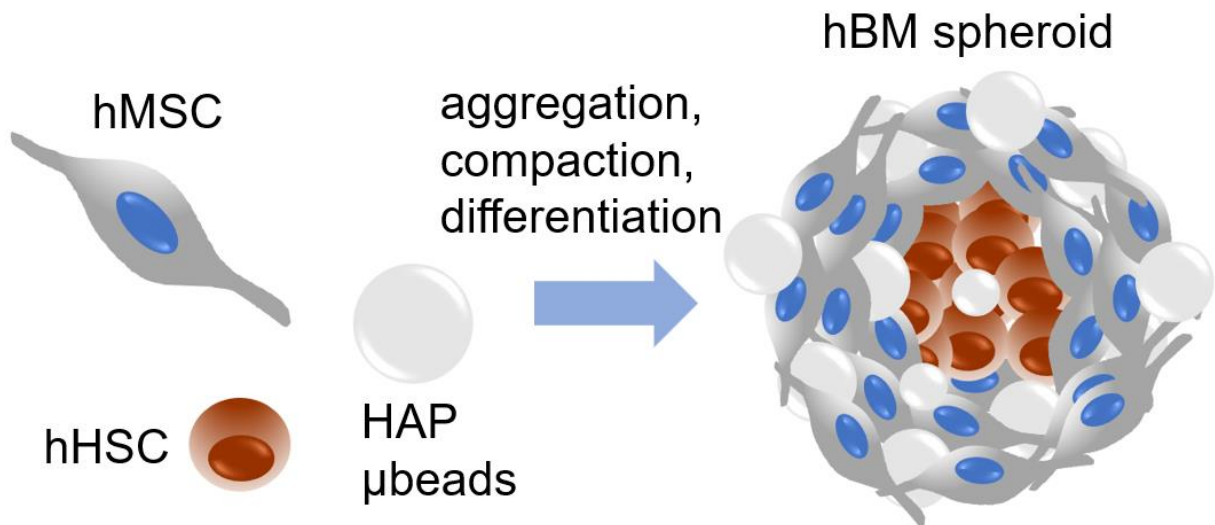


Abbildung 3 – Schematische Darstellung der Bildung von menschlichen Knochenmark-Sphäroiden durch die Kokultur von hMSC und hHSC in Anwesenheit von Hydroxyapatit-Mikrokügelchen zur Simulation der trabekulären Struktur des Knochens.

Die Knochen trabekel sind aus mineralisierten Kollagenfasern aufgebaut (**Abbildung 4**). Die Knochenarchitektur und -umgebung sind von zentraler Bedeutung für die für die kontinuierliche Erneuerung der Blutzellen (hämatopoetische Homöostase) und die Aufrechterhaltung des Immunsystems. Die Trabekel stellen physikalische Ankerpunkte für die Adhäsion der HSCs dar. Die Bindung an die Trabekel und die Interaktion mit stromalen Zellen in der Nische tragen zur Regulation und Schütz der hHSCs.

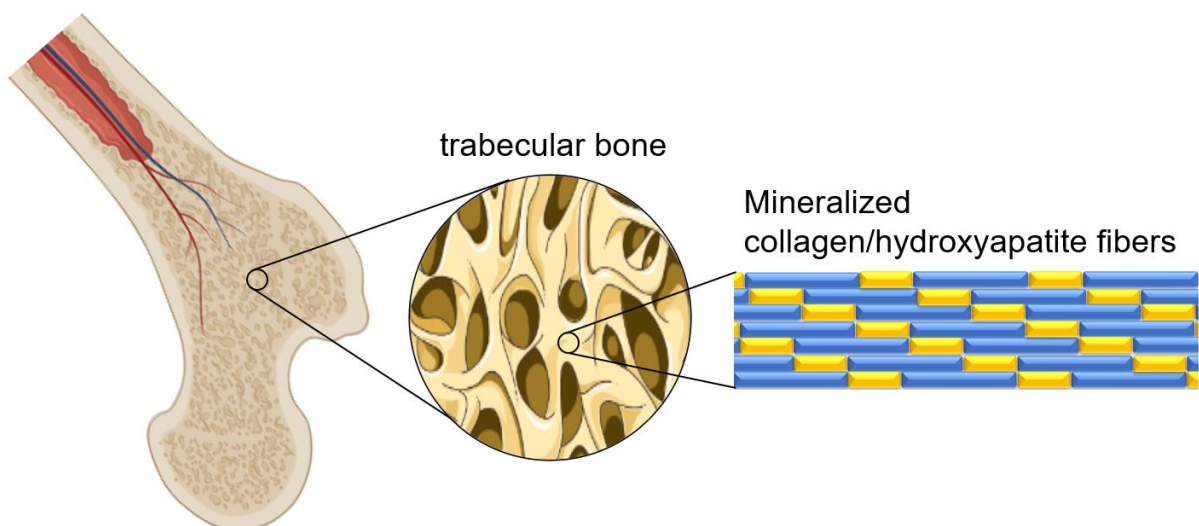


Abbildung 4 – Die trabekuläre Struktur des Knochens.

Frühere Studien haben herausgefunden, dass es möglich ist, eine in-vitro-Knochenmarksnische zu bilden, indem man auf einem Mikrofluidik-Chip Stromazellen (wie mesenchymale

Stammzellen) und CD34-positive hämatopoetische Stammzellen, in Kokultur bringt (**Abbildung 5**).

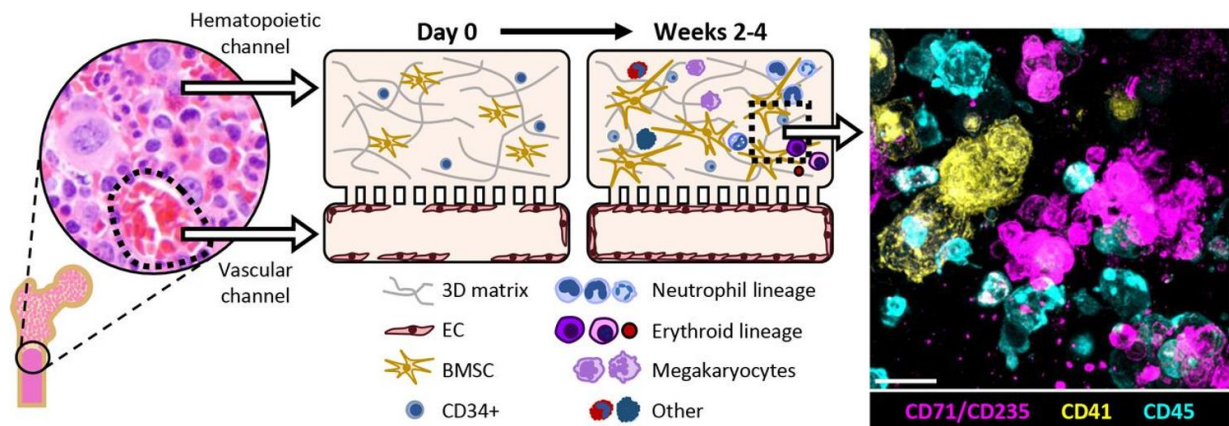


Abbildung 5 – Schematische Darstellung des menschlichen Knochens und die normale Histologie des menschlichen Knochenmarks (links) und eine schematische Querschnittsansicht des menschlichen Knochenmark-Chips am Tag 0 nach der Aussaat, die einzeln verteilte CD34+ Vorläuferzellen und Knochenmarkstromazellen (BMSCs) in einem Gel im oberen Kanal und eine unvollständige Gefäßauskleidung (am Tag 0 oder Tag 8 ausgesät) im unteren Kanal zeigt (links Mitte). Innerhalb von 2 Wochen nach Beginn der Kultur wachsen Endothelzellen, um alle vier Seiten des unteren Kanals zu bedecken und ein vaskuläres Lumen zu schaffen, während CD34+ Zellen Expansion und multilineare Differenzierung durchlaufen (rechts Mitte), wie durch das Immunfluoreszenzbild eines vertikalen Querschnitts durch das Gel im oberen Kanal des Knochenmark-Chips am Tag 14 dargestellt (magenta: erythroide Linie; gelb: Megakaryozyten-Linie; blau: neutrophile und andere hämatopoetische Linien. Messbalken 20 µm. Aus Chou D. et al. doi: 10.1038/s41551-019-0495-z

Im Rahmen des SHAPE-Vorhabens werden die hBM-MSK und hHSC-Zellen in einem speziell von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Agarose-Multiwell-Reservoir, bekannt als „**HYDROWELL**“, kultiviert. Diese Zellsuspension wurde auf der **Internationalen Raumstation (ISS)** sowohl der Schwerelosigkeit (μ -g) als auch einer Kontrollbedingung mit normaler Schwerkraft (1g) ausgesetzt. Über einen Zeitraum von 120 Stunden (5 Tage) hinweg wurden die Proben in festgelegten Intervallen chemisch fixiert. Nach der Rückkehr zur Erde erfolgte die Analyse der Proben. Dabei wurde die dreidimensionale Morphologie der Sphäroide mittels Konfokalmikroskopie und Lichtscheibenmikroskopie untersucht. Zusätzlich wurden Veränderungen in der Genexpression durch RT-qPCR und RNA-Sequenzierung ermittelt.

Die wissenschaftlichen Zielen von SHAPE können wie folgend zusammengefasst werden:

1. Quantitative Analyse der Gewebeentstehung unter Verwendung von heterotypischen hMSC/hHSC Sphäroiden als Gewebemodelle des menschlichen Knochenmarks in Mikrogravitationsumgebungen.
2. Ermittlung der Überlebensfähigkeit von Zellen in den mehrschichtigen Strukturen der Sphäroide.
3. Erforschung der räumlichen Trennung und Sortierung verschiedener Zellarten im Inneren der Sphäroide.

I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Team von Dr. Francesco Pampaloni (ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4357-7320>) am Buchmann-Institut für Molekulare Lebenswissenschaften (BMLS) in Frankfurt am Main hat das Projekt geplant und bearbeitet. Die Expertise des Teams liegt hauptsächlich im Bereich der dreidimensionalen Zellkulturen und fortgeschrittenen Mikroskopietechniken, insbesondere Lichtscheibenmikroskopie (Light Sheet Fluorescence Microscopy, LSFM). Die Arbeitsgruppe erforscht Organoiden die die Funktion von Pankreas, Knochenmark und Leber nachahmen, mit einem besonderen Fokus auf Anwendungen und Ansätze, die das Potenzial für neue zellbasierte Therapie bieten.

Unser Team verfügt über mehrjährige Erfahrung im Bereich der Gravitationsbiologie. Dieses Thema ist von großer Aktualität: Es wird zunehmend erkannt, dass biotechnologische Forschungen im Weltraum sowie unter Bedingungen der Mikrogravitation einzigartige Möglichkeiten bieten, grundlegende biologische Prozesse zu verstehen. Dies öffnet den Weg für die Entwicklung innovativer biotechnologischer Verfahren und zu neuen Behandlungsmöglichkeiten für ein breites Spektrum von Krankheiten, von neurodegenerativen Störungen bis hin zu Krebs. Die Gruppe ist ein aktiver Teil der Gravitationsbiologie-Community in Deutschland und kooperiert mit dem DLR, Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin – Gravitationsbiologie in Köln und mit dem *Physical Sciences Instrumentation and Life Support Laboratory* (LIS) at ESA-ESTEC (Noordwijk, Niederlande). Das SHAPE-Projekt wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz (BMWK) über die Deutsche Raumfahrtagentur im DLR gefördert. Projektträger war das Deutsche Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR).

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das SHAPE-Projekt startete am 01. März 2020 und endete am 01. Juli 2023. Die ursprüngliche Laufzeit wurde kostenneutral verlängert, überwiegend aufgrund von Verzögerungen, die durch die Corona-Pandemie und eine mehrfache Verschiebung des Raketenstarts für den Transport unserer wissenschaftlicher *payload* zu der Internationalen Raumstation verursacht wurden.

Übersicht der Arbeitspakete im SHAPE-Projekt

Arbeitspaket 01 (AP01) umfasst die Entwicklung der HYDROWELLS und die Bildung von humanen Knochenmark-Sphäroiden (hBM-Sphäroiden). In AP01 wurden HYDROWELLS, die von unserem Wissenschaftsteam gefertigt wurden, realisiert und getestet, um ihre Eignung als Behälter für hBM-Sphäroide bei Experimenten auf der Internationalen Raumstation (ISS) zu überprüfen. Das Verfahren zur Erzeugung der hBM-Sphäroide wurde standardisiert und durch Immunofluoreszenzmikroskopie verifiziert. Mit der Entwicklung der HYDROWELL-Technologie sollten folgende Ziele erreicht werden:

1. Kultivierung der Zellen in einer nicht-adhäsiven Umgebung, um die effektive Bildung eines Sphäroids durch das Zusammenlagern der Zellen effektiv zu fördern.
2. Implementierung des Konzepts 'Ein Well - Ein Sphäroid', um die unkontrollierte Aggregation von mehreren Sphäroiden zu unterbinden.
3. Ermöglichung eines effizienten Austauschs von Nährmedien durch Diffusion.
4. Realisierung einer vollständig biokompatiblen Umgebung, die für die Zellkultur optimal geeignet ist.

Im **Arbeitspaket 02 (AP02)** steht die umfassende Charakterisierung der hBM-Sphäroide im Mittelpunkt. Eine experimentelle Methodik (*pipeline*), die auf Fluoreszenzmikroskopie, einschließlich Lichtscheiben- und Konfokalmikroskopie, sowie auf Genexpressionsanalyse setzt wurde geplant. Diese Kombination aus hochentwickelten 3D-Fluoreszenzmikroskopie-Techniken und etablierten Molekularbiologischen Verfahren ermöglicht eine präzise Erkennung und Lokalisierung der Zelltypen im Sphäroid.

Im AP02 wurde geplant, die gleiche *pipeline* sowohl in bodenbasierten Experimenten als auch in Experimenten auf der Internationalen Raumstation (ISS) anzuwenden, um einen systematischen und zuverlässigen Datensatzvergleich zu gewährleisten. Ziel war es, die Einflüsse der Raumflugumgebung auf immunsystemrelevante Vorläuferzellen zeitabhängig zu analysieren. Basierend auf früheren Studien wurde ein signifikanter Unterschied in Morphologie, Migrationsverhalten, Zellproliferation und spezifischen Differenzierungsmarkern der hBM-Sphäroide auf der ISS im Vergleich zu Bodenkontrollen erwartet.

Arbeitspaket 03 (AP03) konzentriert sich auf die bodenbasierte Forschung. Hierbei wird die echte Mikrogravitation, wie sie auf der Internationalen Raumstation (ISS) vorkommt, mithilfe speziell entwickelter Geräte simuliert. Dies ermöglicht die Durchführung von Vorversuchen, bei denen die Proben Bedingungen ausgesetzt werden, die denen der Mikrogravitation nahekommen. Zusätzlich erlauben die bodengebundenen Versuche eine Unterscheidung der Effekte der Mikrogravitation von anderen im Weltraum möglichen Einflüssen, wie beispielsweise Strahlung.

Arbeitspaket 04 (AP04) umfasst die ISS-Workflow-Vorbereitung für das Projekt SHAPE und folgende Hauptaufgaben werden in AP04 bearbeitet:

1. Integration und Anpassung der HYDROWELLS-Container in die Experimental Units (EUs), die für die Durchführung der ISS-Experimente vorgesehen sind.
2. Ermittlung der Überlebensfähigkeit der hBM-Sphäroide innerhalb der EUs, basierend auf dem geplanten minimalen/bevorzugten/maximalen Temperaturprofil während des Fluges.
3. Überprüfung der Lebensfähigkeit der hBM-Sphäroide in den EUs bei 37°C in einer kontrollierten Laborumgebung (1g, 37°C). Die Lebensfähigkeit wird über Zeitintervalle gemessen, die den Zeiträumen der ISS-Experimente entsprechen (24h, 48h, 72h, 96h, 120h).
4. Untersuchung der Aggregations- und Bildungsprozesse der hBM-Sphäroide in den EUs unter standardisierten Laborbedingungen.

I.4 Wissenschaftlicher/technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die in Arbeitspaket 1 verwendete Methodik baut auf Vorarbeiten auf, die in Zusammenarbeit mit dem DLR, Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin – Gravitationsbiologie in Köln durchgeführt wurden. Diese Arbeiten wurden durch das ESA (European Space Agency) Ground-Based Facility (GBF) Grant #CORA-GBF-2017-004 im Jahr 2017-18 finanziell unterstützt. Die Kultivierung und Charakterisierung von Sphäroiden und Organoiden (AP01 und AP02) stellen seit 20 Jahren einen Forschungsschwerpunkt von Dr. Pampaloni und seinem Team dar. AP03 wurde u.a. mit Hardware (2D Clinostat) von der Firma Yuri GmbH bereitgestellt durchgeführt. Darüber hinaus ergaben sich Synergieeffekte mit weiteren parallellaufenden wissenschaftlichen Projekten, nämlich das EU Horizon2020 LSF4LIFE Projekt (Förderungsnummer 668350) und das EU FET-Open BRIGHTER Projekt (Förderungsnummer 828931).

Eine Auswahl an Literatur, an die angeknüpft wurde, ist unter I.4.2 einzusehen.

I.4.1 Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

Für die Arbeitspakete des Projekts nicht relevant.

I.4.2 Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Literatur, an die angeknüpft wurde:

- Armstrong, J. W., R. A. Gerren, et al. (1995). "The effect of space and parabolic flight on macrophage hematopoiesis and function." *Experimental cell research* 216(1): 160-168.
- Davis, T. A., W. Wiesmann, et al. (1996). "Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis." *Journal of leukocyte biology* 60(1): 69-76.
- de Barros, A. P., C. M. Takiya, et al. (2010). "Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model." *PLoS One* 5(2): e9093.
- Dunn, C. D., P. C. Johnson, et al. (1985). "Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic, hypokinetic/hypodynamia: I. Model description." *Aviation, space, and environmental medicine* 56(5): 419-426.
- Edman, K., M. Furber, et al. (2011). "The discovery of MMP7 inhibitors exploiting a novel selectivity trigger." *ChemMedChem* 6(5): 769-773.
- Gueguinou, N., C. Huin-Schohn, et al. (2009). "Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit?" *Journal of leukocyte biology* 86(5): 1027-1038.
- Huin-Schohn, C., N. Gueguinou, et al. (2013). "Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27(1): 333-341.
- Huisken, J., J. Swoger, et al. (2004). "Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy." *Science* 305(5686): 1007-1009.
- Ichiki, A. T., L. A. Gibson, et al. (1996). "Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells." *Journal of leukocyte biology* 60(1): 37-43.
- Keller, P. J., A. D. Schmidt, et al. (2010). "Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy." *Nat Methods* 7(8): 637-642.
- Keller, P. J., A. D. Schmidt, et al. (2008). "Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy." *Science* 322(5904): 1065-1069.
- Kelm, J. M., N. E. Timmins, et al. (2003). "Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types." *Biotechnology and bioengineering* 83(2): 173-180.

- Korff, T. and H. G. Augustin (1998). "Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation." *J Cell Biol* 143(5): 1341-1352.
- Ortega, M. T., M. J. Pecaut, et al. (2009). "Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight." *Journal of applied physiology* 106(2): 548-555.
- Pampaloni, F., N. Ansari, et al. (2013). "High-resolution deep imaging of live cellular spheroids with light-sheet-based fluorescence microscopy." *Cell and tissue research* 352(1): 161-177.
- Pampaloni, F., E. G. Reynaud, et al. (2007). "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10): 839-845.
- Pecaut, M. J., D. S. Gridley, et al. (2003). "Long-term effects of low-dose proton radiation on immunity in mice: shielded vs. unshielded." *Aviation, space, and environmental medicine* 74(2): 115-124.
- Scadden, D. T. (2014). "Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche." *Cell* 157(1): 41-50.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des SHAPE-Projekts kam es zu einem regelmäßigen Austausch mit dem DLR, Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin – Gravitationsbiologie in Köln, der Gruppe von Dr. Michele Salanova an der Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Physiologie, Center for Space Medicine and Extreme Environments, Berlin, sowie mit der Firma Yuri GmbH in Meckenbeuren, Deutschland.

II. Eingehende Darstellung

II.1 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

II.1.1 AP 1: Entwicklung der HYDROWELLS und Bildung von humanen Knochenmark-Sphäroiden

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Agarose-Multiwell-Reservoir, benannt als „HYDROWELL“, entwickelt, um die Effekte der Mikrogravitation auf Sphäroide auf der Internationalen Raumstation (ISS) untersuchen zu können. Die HYDROWELLS ermöglichen es, jedes Sphäroid einzeln in „Miniwells“ zu kultivieren, was die unkontrollierte Fusion mit anderen benachbarten Sphäroiden verhindert (**Abbildung 6**).

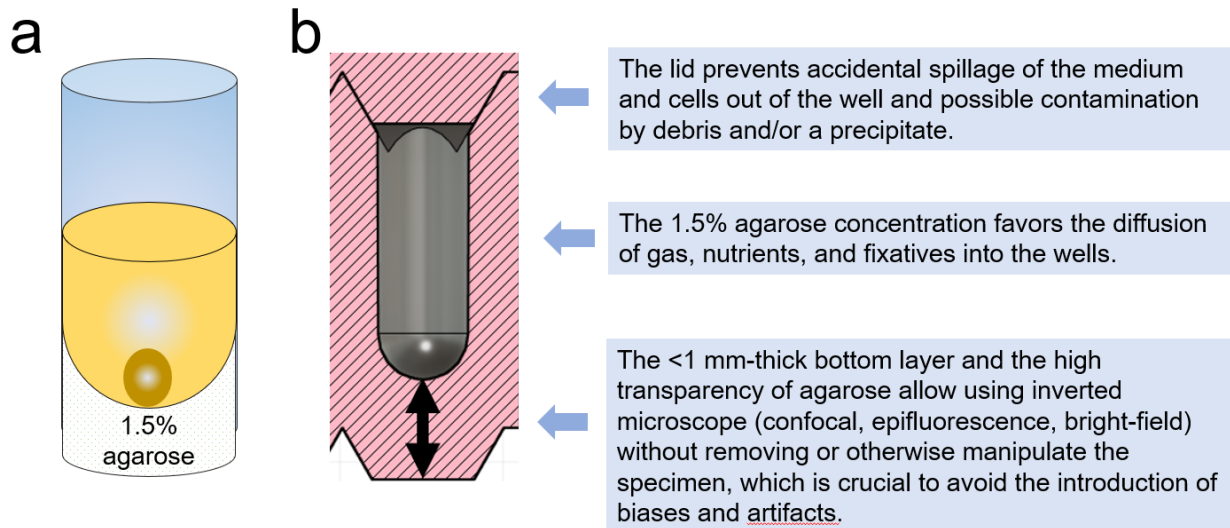
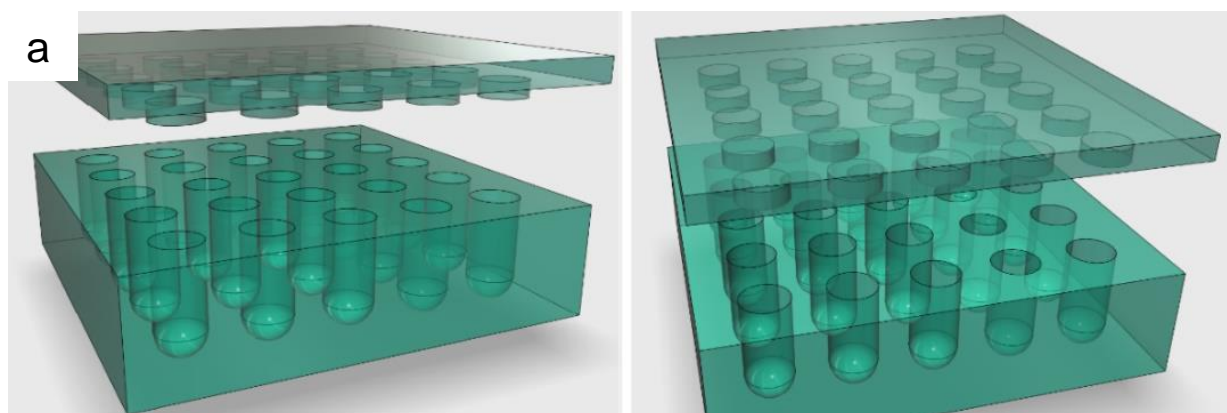


Abbildung 6 – Vergleich zwischen herkömmlicher U-Well und einem Hydrowell.

Zudem gewährleistet die Herstellung der HYDROWELLS aus Hydrogel (Agarose) die schnelle Diffusion von Nährstoffmedien und chemischen Fixierlösungen. Die Herstellung von HYDROWELLS erfolgte durch die Verwendung von 3D-gedruckten positiven Formen. Das Design der Formen wurde mit der CAD-Software Fusion360 (Autodesk) erstellt. Anschließend wurde das CAD-Design als STL-Datei exportiert und in eine 3D-Slicing-Software importiert. Für den Druck wurden Harz-3D-Drucker verwendet, vor allem wegen der resultierenden glatten Oberflächen, die leichter zu sterilisieren sind. Die Formen wurden hauptsächlich auf einem Anycubic Mono mit Anycubic Clear Resin gedruckt. Verschiedene Geometrien der Formen wurden zu Optimierungszwecke getestet (**Abbildung 7**, **Abbildung 8**).

Nach dem Drucken wurden die Teile in 96% Ethanol gewaschen und getrocknet, Danach wurden alle Teile mit UV-Beleuchtung ausgehärtet und anschließend autoklaviert. Während des gesamten Herstellungsprozesses wurden die Formen auf Deformationen oder andere strukturelle Abnormalitäten überprüft.



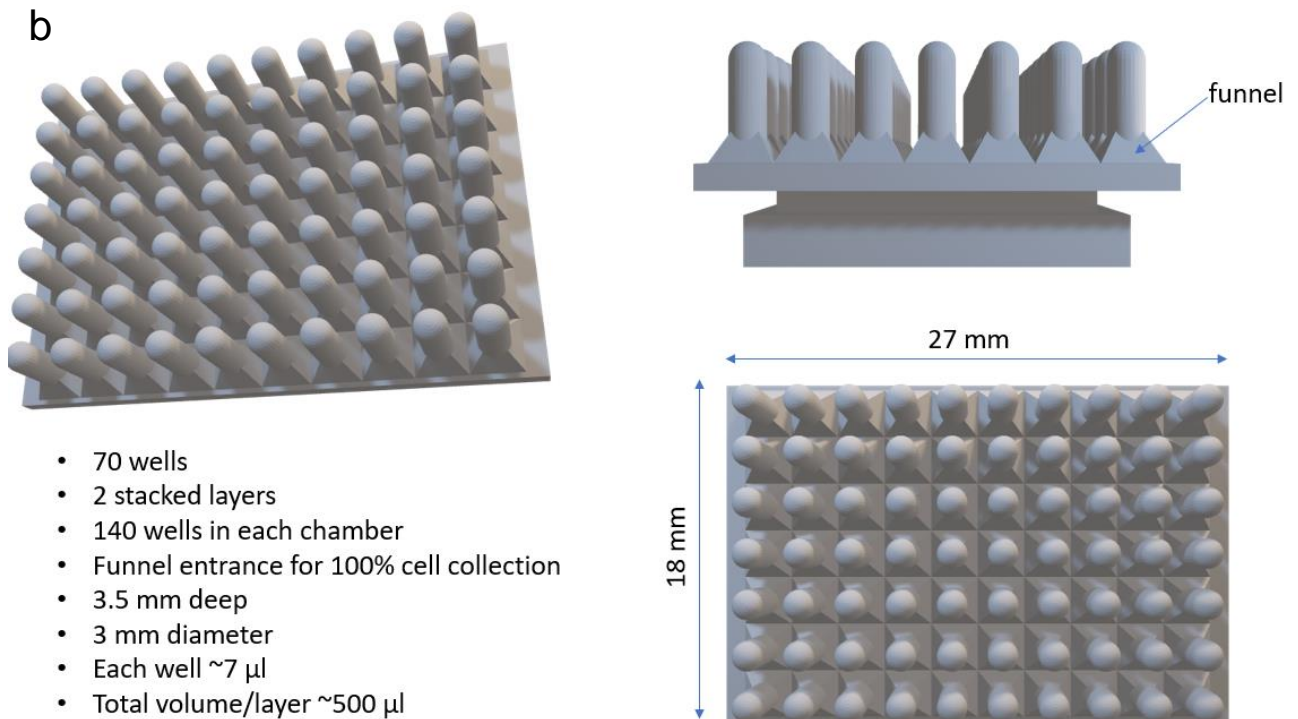
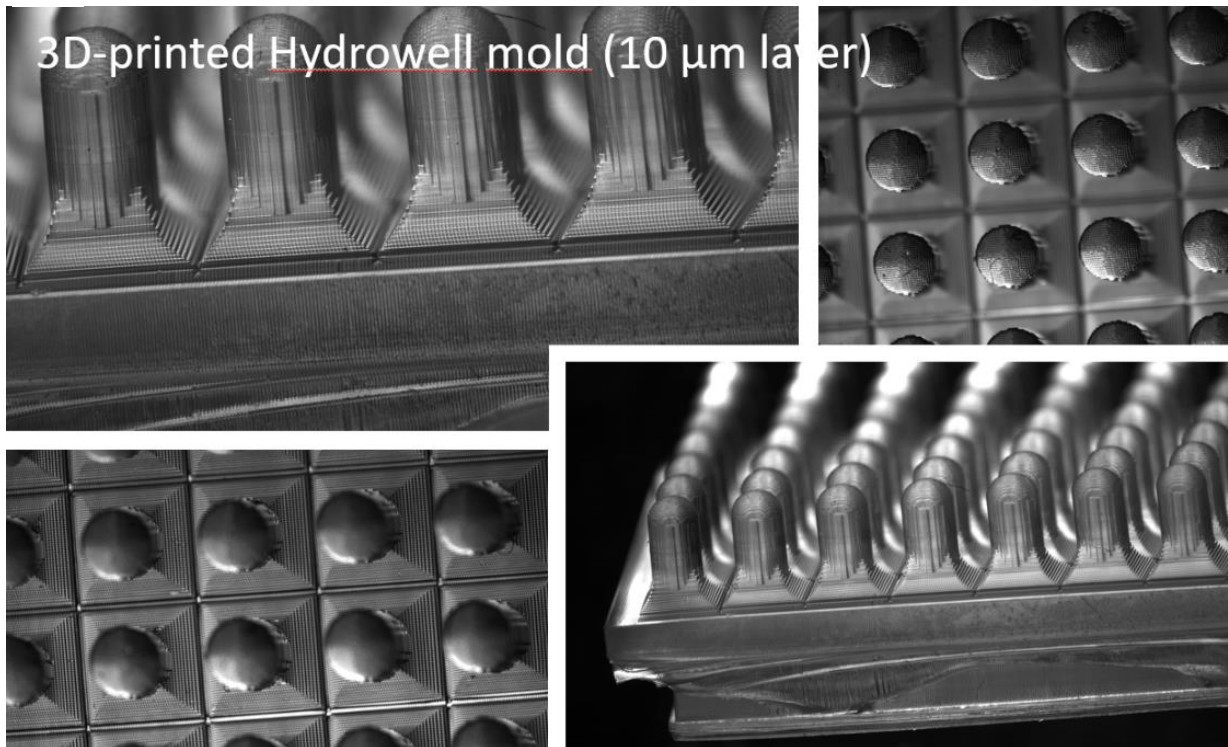
**c**

Abbildung 7 – Vorbereitung der 3D-gedruckten Gussformen für die Herstellung der HYDROWELLS aus Agarose. (a) Konzeptuelle Darstellung eines fertigen HYDROWELL, bestehend aus einer Agarose-Multi-Well-Platte mit Platz für 70 Sphäroide und einer Abdeckung, ebenfalls aus Agarose. (b) CAD-Darstellung der positiven Gussformen für die

HYDROWELLS inklusive Abmessungen. (c) Aufnahme einer 3D-gedruckten Gussform, aufgenommen mit dem Stereomikroskop. Vergrößerung 30x.

Die Hydrowells selbst bestehen aus in sterilem Pufferlösung (PBS, pH 7,4) gelöster Agarose (1,5%). Zur Herstellung der HYDROWELLS wurde die noch flüssige Agarose in der sterilen Sicherheitswerkbank zu den 3D-gedruckten Gussformen hinzugefügt. Nach der Polymerisierung der Agarose wurden die HYDROWELLS aus den Formen entnommen und bei 4 °C in PBS steril aufbewahrt (**Abbildung 8**).

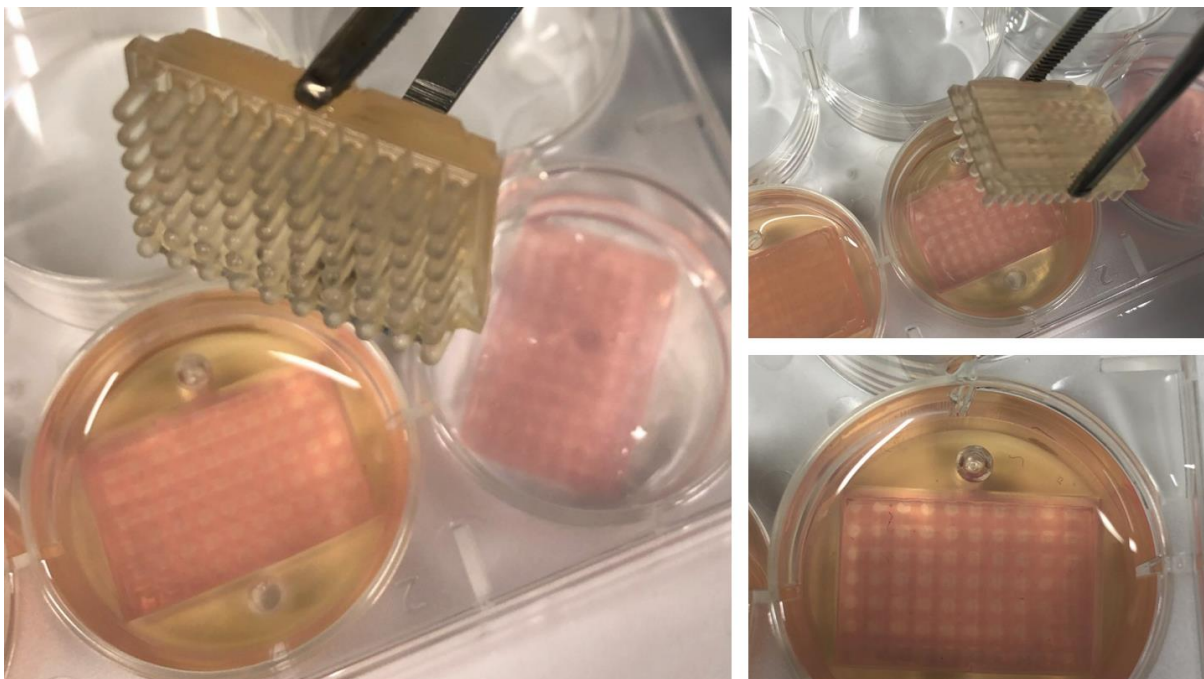


Abbildung 8 – Entnahme der HYDROWELLS aus den 3D-gedruckten Gussformen und Lagerung in einer sterilen PBS-Pufferlösung.

Zur Zellbeladung werden die Hydrowells bei 37 °C inkubiert, um das PBS zu verdampfen und die Agarose auf Zelltemperatur zu bringen. Bei sofortiger Verwendung werden die Hydrowells zentrifugiert, um überschüssiges Wasser zu entfernen.

In der High-Density-Konfiguration können zwei HYDROWELLS aufeinandergestapelt werden, wodurch sich die Anzahl der Sphäroide in der Experimental Unit von 70 auf 140 verdoppelt (**Abbildung 9**).

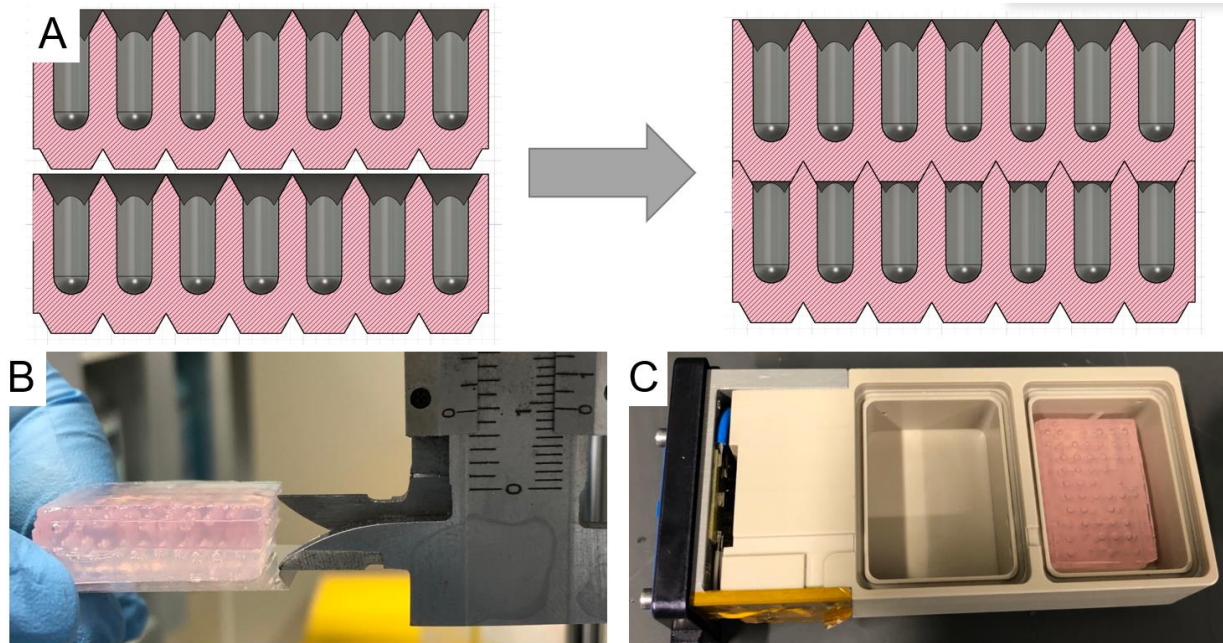


Abbildung 9 – Die sogenannten High-Density-HYDROWELLS bestehen aus zwei aufeinander gestapelten Blöcken, die jeweils Platz für 70 voneinander isolierte Sphäroide bieten (A). Dadurch verdoppelt sich die Kapazität auf 140 Sphäroide in einem Gesamtvolumen von ungefähr 5 ml (19 mm x 28 mm x 9 mm) (B). In einer Experimental Unit finden zwei High-Density-HYDROWELLS Platz (C), wodurch die Kapazität auf insgesamt 280 Sphäroide steigt.

Das Agarose-Hydrogel als Hauptbestandteil der HYDROWELLS gewährleitete die schnelle und effiziente Diffusion von Nährstoffmedien und chemischen Fixierlösungen (**Abbildung 10**, **Abbildung 11**). Die Diffusionsprozesse wurden in einem Experimental Container typ 5 getestet, der von der Firma Yuri GmbH bereitgestellt und ähnliche Funktionen wie die Einheiten aufweist, die für das SHAPE-Experiment auf der ISS verwendet wurden.

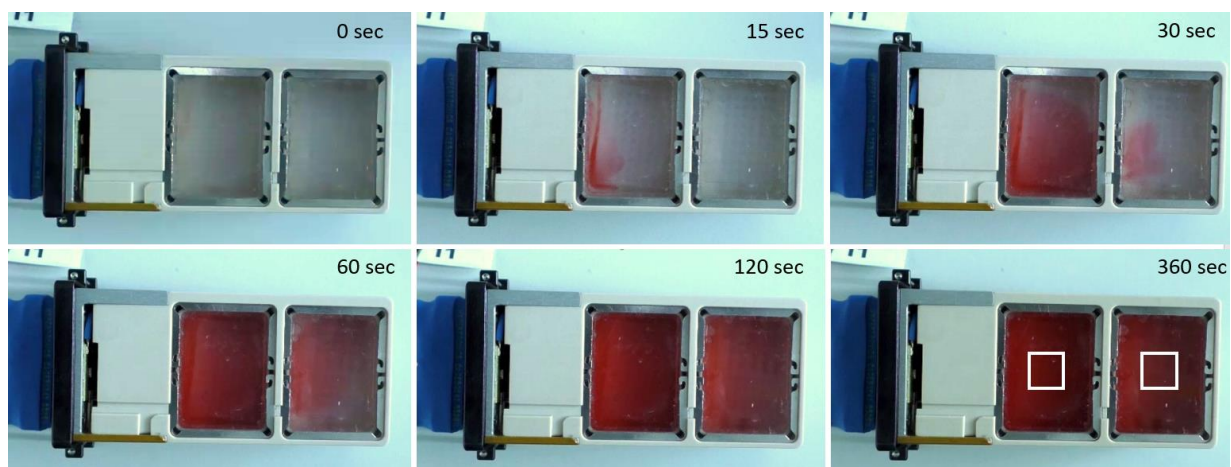


Abbildung 10 – Mediumaustausch in der Experimental Unit. Die durchgeführten Tests zeigen, dass ein vollständiger Austausch innerhalb von 6 Minuten in beiden Kammern erfolgt.

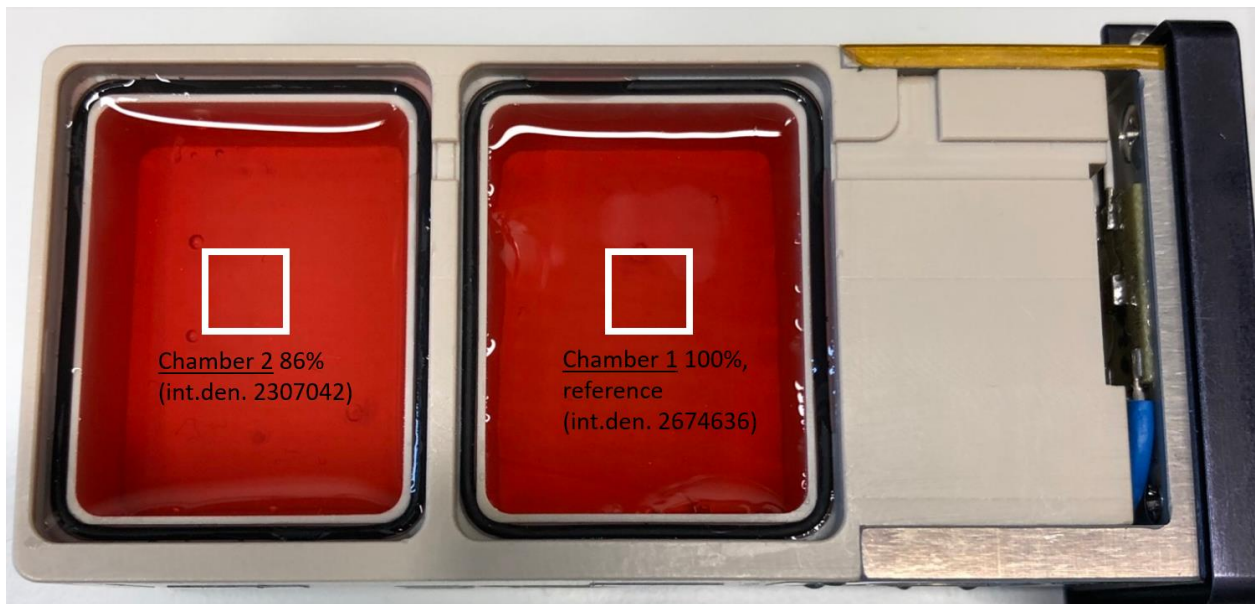
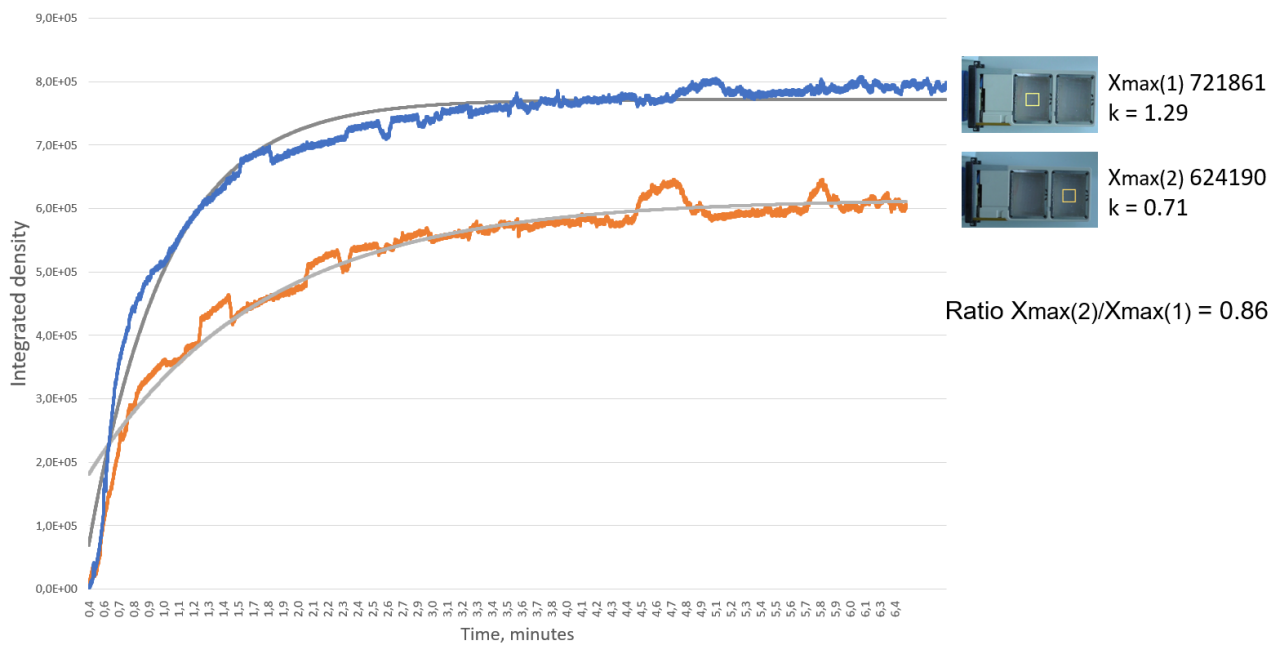


Abbildung 11 – Diffusionsrate während des Mediaustausch in den beiden Kammern der Typ 5 Experimental Unit. Die durchgeführten Tests zeigen, dass ein vollständiger Austausch innerhalb von 6 Minuten in beiden Kammern erfolgt. Die Mediumskonzentration in der Kammer #2 beträgt 86% der Mediumkonzentration in der Kammer #1.

Formierung der hBM-Sphäroiden

Die Formierung der hBM-Sphäroiden wurde sowohl in kommerziellen Multiwellplatten als auch direkt in den HYDROWELLS durchgeführt. Das primäre Ziel war zu bestimmen, ob die Sphäroidenformierung ähnlich effizient in den HYDROWELLS und in den Multiwellplatten erfolgt.

Formierung in Multiwellplatten. Die hBM-Sphäroide werden in kommerziellen Multiwellplatten (U-wells) vorgeformt. Eine Suspension, bestehend aus hMSC-, hHSC-Zellen und Hydroxyapatit-Mikrokugeln (siehe Abbildung 3), wird in die Multiwellplatten eingebracht. Nach einer Inkubationszeit bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% bilden sich hBM-Sphäroide (**Abbildung 12**).

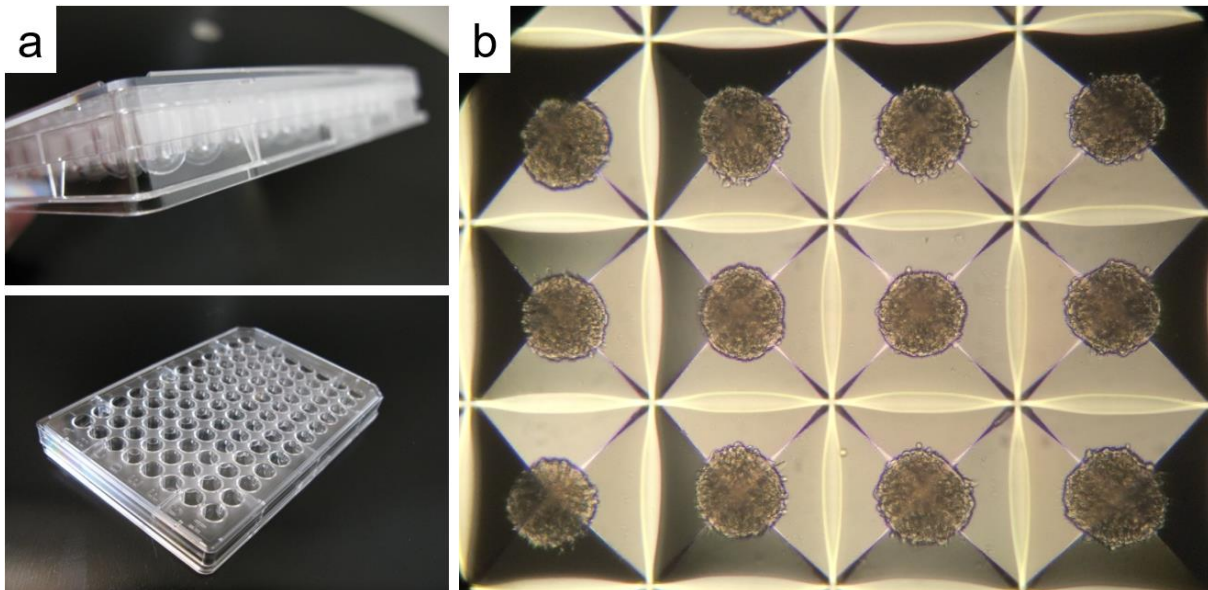


Abbildung 12 – Formierung der hBM-Sphäroiden in kommerziell verfügbaren Multiwell-Platten a) Sogenannte „U-Wellen“, die durch ihre Form und eine zellenabweisende Beschichtung die Bildung der Sphäroide begünstigen. b) hBM-Sphäroide in pyramidenförmigen Wells von der Firma Kugelmeiers Ltd.

II.1.2 AP 2: Charakterisierung der hBM-Sphäroide

In der Charakterisierung mittels Lichtmikroskopie markieren wir hMSC-BM-Zellen und CD34+ hämatopoetische Stammzellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen (CellTracker Green für hMSC-BM-Zellen, CellTracker Orange für CD34+-Zellen), um sie unterscheiden zu können. Zusätzlich erfassen wir eine Reihe von zellulären und molekularen Parametern, um die Auswirkungen der Raumfahrtbedingungen auf CD34+ Zellen zu untersuchen. Dazu gehören CD-Immunfluoreszenz-Phänotypisierung (CD34, CD31, CD117, CD45, CD11b, CD14, CD4, CD3, etc.), Zellzählungen und Analysen der Morphologie und räumlichen Verteilung der CD34+-Zellen im Sphäroid.

Zusammenfassend werden mittels Fluoreszenzmikroskopie folgende Analysen durchgeführt:

1. Hochauflösende Darstellung der dreidimensionalen räumlichen Verteilung myeloischer Zellen.

2. Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper und RNA-Sonden zur Untersuchung spezifischer Differenzierungsmarker und deren Veränderungen unter Weltraumbedingungen.

In der Genexpressionsanalyse verwenden wir RT-qPCR und Massive Analysis of cDNA Ends (MACE), um die differentielle Genexpression der hBM-Sphäroide unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen. Die Proben werden mit RNAlater fixiert, die mRNA wird mittels Trizol-Methode extrahiert, in cDNA umgewandelt und ausgewählte Gene werden anschließend amplifiziert und quantifiziert. Besonderes Augenmerk liegt auf Genen, die die Differenzierung der hHSC in der Knochenmarksnische und die Osteoblastendifferenzierung beeinflussen.

Die relevanten wissenschaftlichen Fragestellungen sind in der folgenden **Abbildung 13** zusammengefasst.

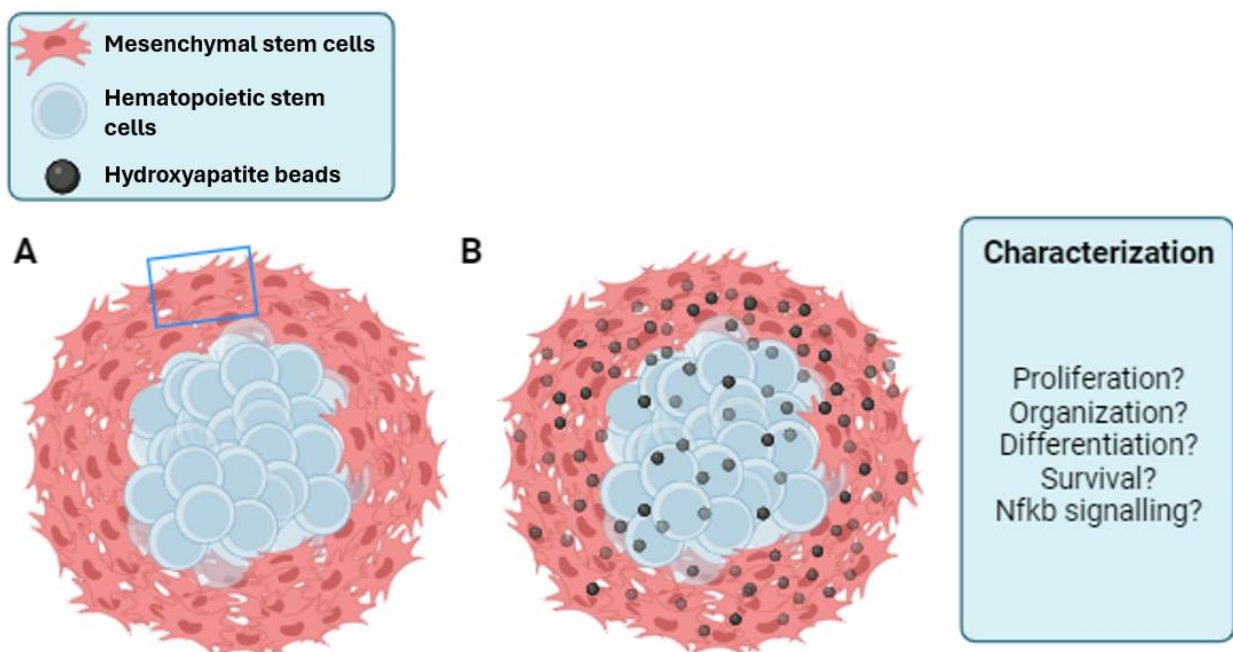


Abbildung 13 – Zusammenfassung der relevanten Fragestellungen bei der Charakterisierung der hBM-Sphäroide. Signalwege der Proliferation, Differenzierung und NF- κ B wurden unter anderem untersucht.

Der methodische Arbeitsablauf für die Analyse der Sphäroide mit Fluoreszenzmikroskopie ist in **Abbildung 14** dargestellt.

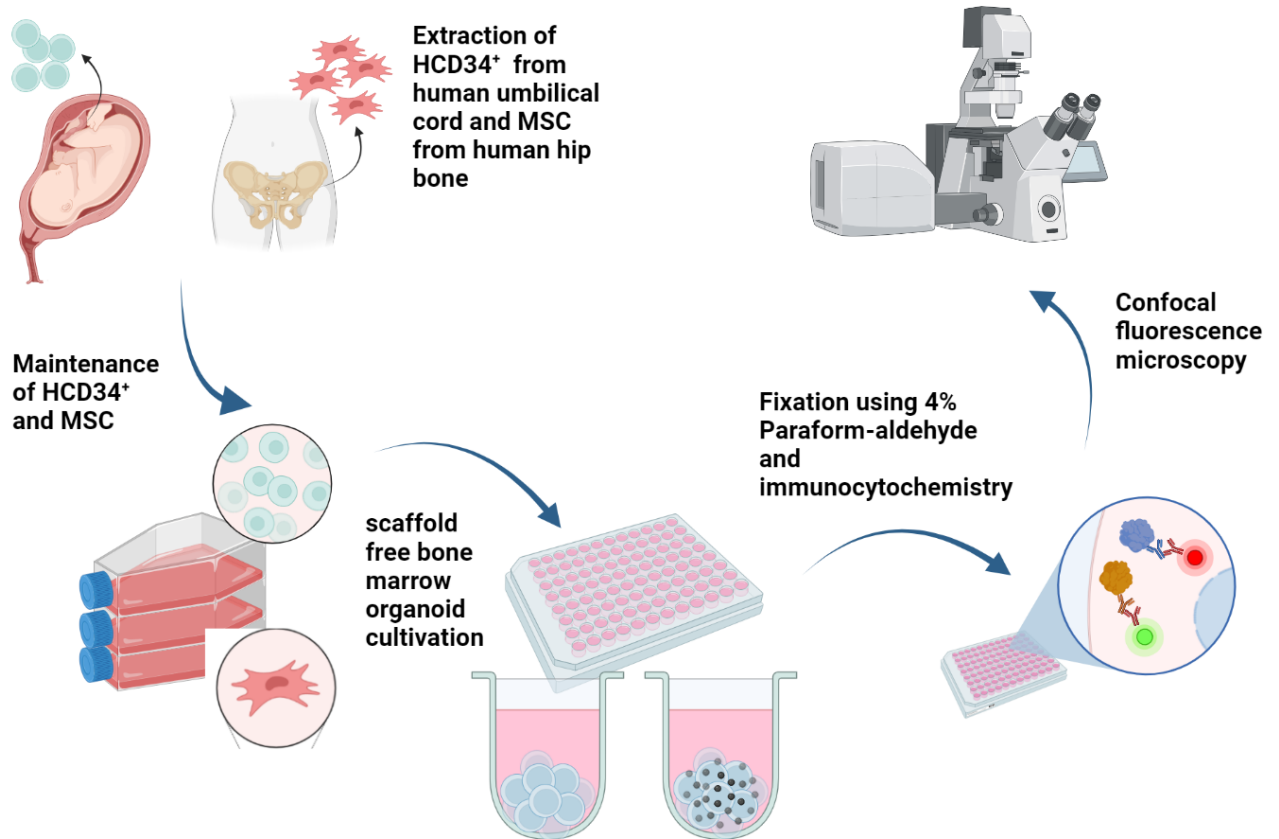


Abbildung 14 – Der methodische Arbeitsablauf für die Analyse der Sphäroide mit Fluoreszenzmikroskopie. Die isolierten hMSC und CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen (hHSC) werden in Kultur expandiert. Anschließend werden Kokultur-Sphäroide mittels der "Liquid-Overlay"-Methode erzeugt. Die resultierenden Sphäroide werden chemisch mit PFA oder Notoxhisto fixiert und mit Fluoreszenzmarkern markiert. Abschließend werden die Sphäroide mit fortgeschrittener Fluoreszenzmikroskopie abgebildet.

Um die räumliche Verteilung der hMSC und hHSC im Sphäroid zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze angewendet. Für die Analyse mit der Hellfeldmikroskopie wurden die hSC mit dem CellTracker Orange-Farbstoff markiert, während die hMSC unmarkiert blieben. CellTracker Orange ist ein fluoreszierender Farbstoff. Er ist jedoch auch im Hellfeld als tiefviolette Färbung deutlich sichtbar. Die mikroskopische Analyse der hMSC/hHSC-Sphäroide zeigt deutlich, dass die hämatopoetischen Zellen im Kern des Sphäroids segregiert sind und von einer Schicht von hMSC umgeben sind (**Abbildung 15**).

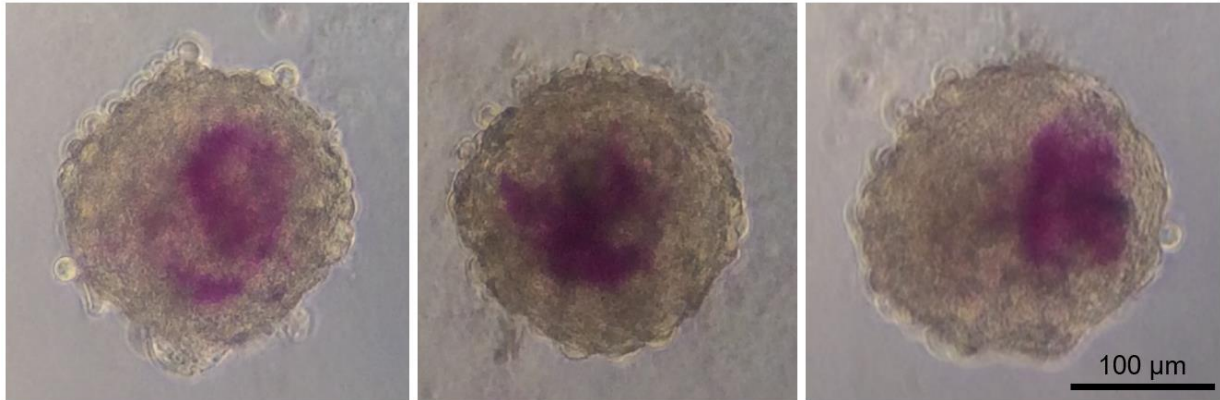


Abbildung 15 – Untersuchung der räumlichen Verteilung der hMSC und hHSC im hBM-Sphäroid mit Hellfeldmikroskopie. Die hämatopoetischen Zellen im Kern des Sphäroids befinden sich in dem inneren Bereich des Sphäroids und werden von einer Schicht von hMSC umgeben.

Anschließend wurden die hMSC mit CellTracker Green und die hHSC mit CellTracker Orange markiert. Die Sphäroide wurden dann mit dem konfokalen Mikroskop abgebildet. Die Schicht-für-Schicht-Analyse des resultierenden Bildstapels bestätigt ebenfalls die Lokalisierung der hHSC im Kern der Sphäroide (**Abbildung 16**).

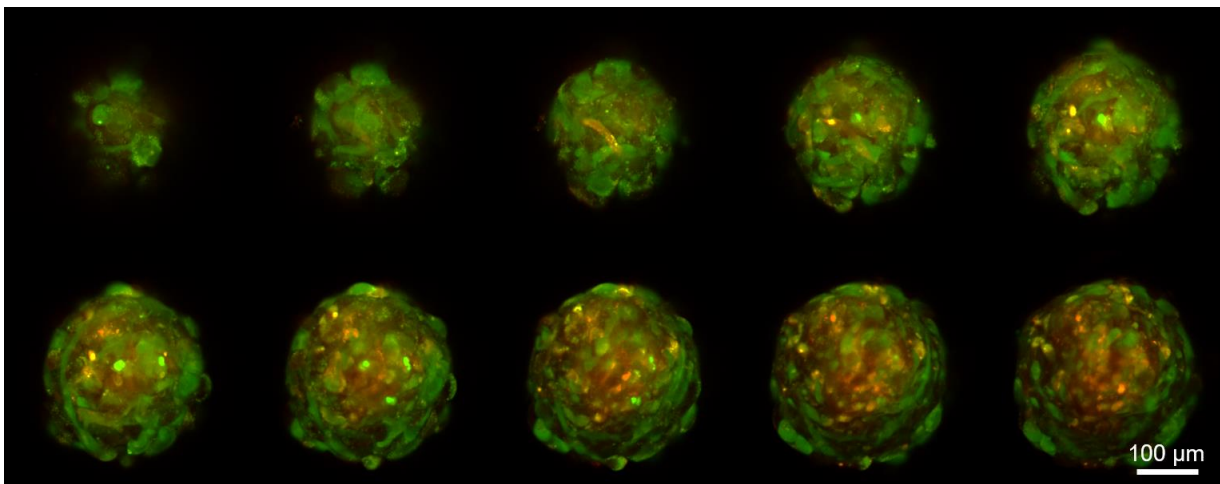


Abbildung 16 – Analyse mit dem konfokalen Mikroskop. Die Schicht-für-Schicht-Inspektion des Bildstapels zeigt die Lokalisierung der hHSC (CellTracker Orange, roter Kanal) im Kern des Sphäroids, während die hMSC (CellTracker Grün, grüner Kanal) sie in der äußeren Schicht umgeben. Mikroskop: Zeiss LSM780, Objektiv Plan-Apochromat 20x/0.8.

Abbildung 17 zeigt als Gesamtdarstellung eine Maximalprojektion des Bildstapels in **Abbildung 16**.

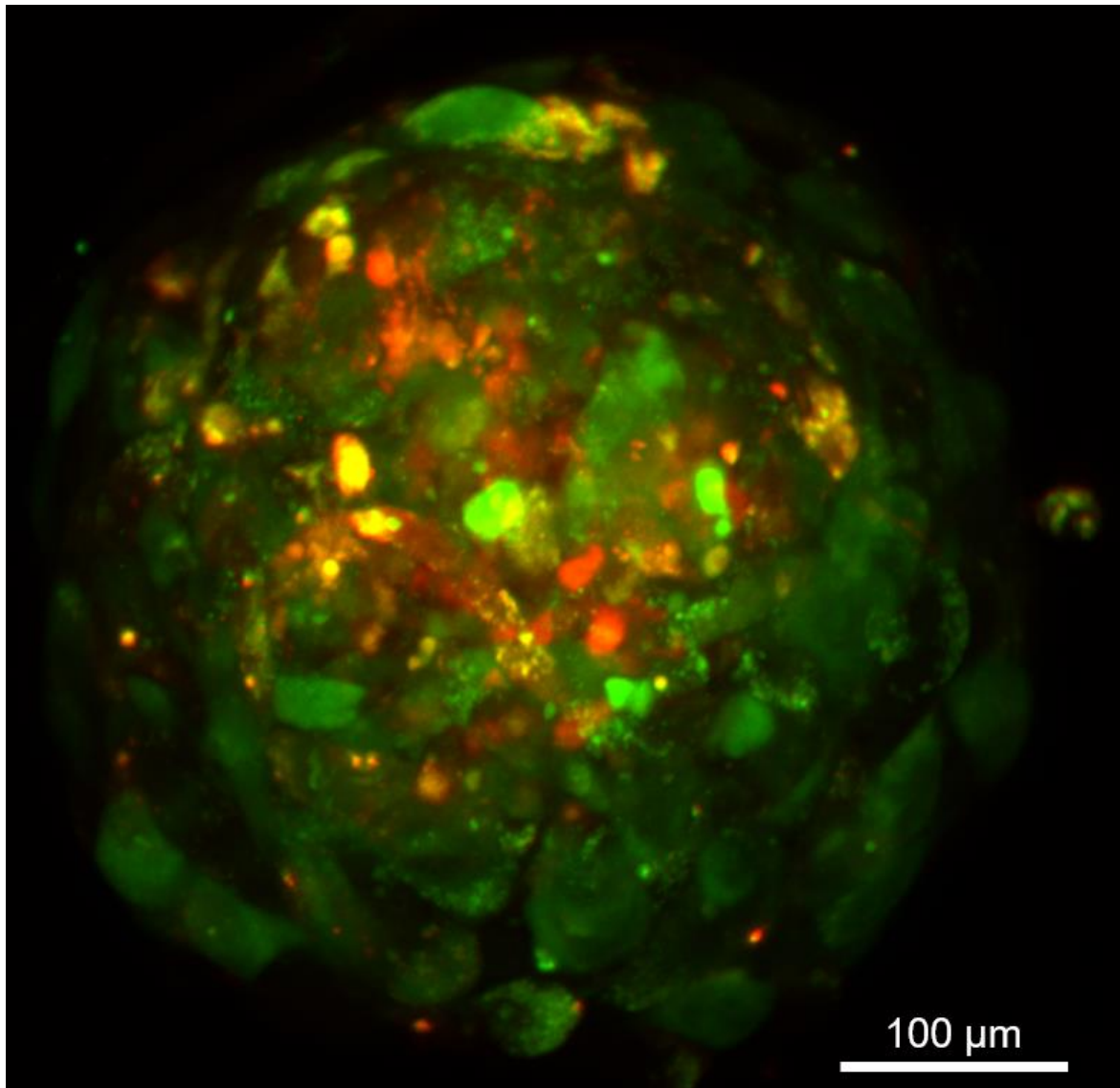


Abbildung 17 – Maximalprojektion des Bildstapels in Abbildung 15. Die Lokalisierung der hMSC im inneren des Sphäroids wird deutlich sichtbar.

Als Nächstes, um die in dem Sphäroid vorhandene Zellpopulation weiter zu bestätigen, wurden spezifische Marker für hMSC und hHSC mittels Immunfluoreszenz detektiert (**Abbildung 18**).

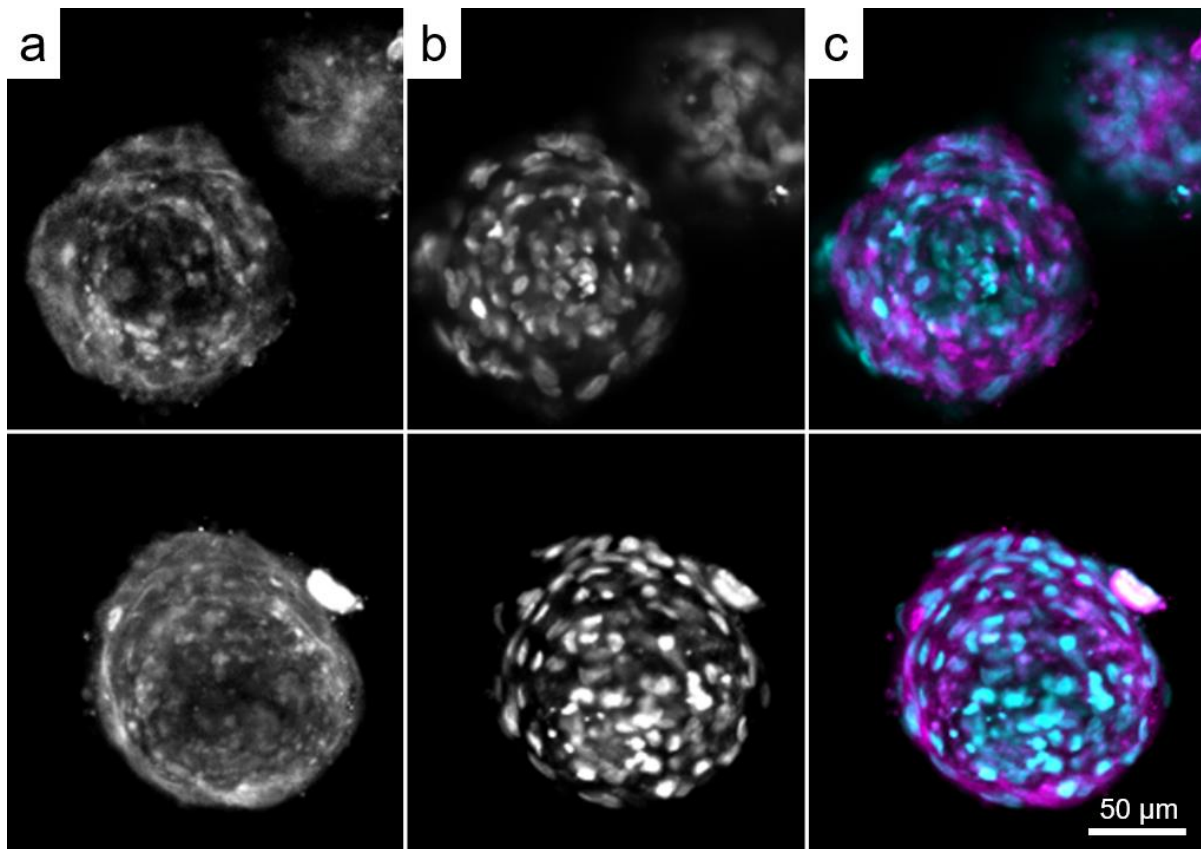


Abbildung 18 – Aufnahme zweier repräsentativer hBM-Sphäroide. a) CD90-positive Zellen. CD90 ist ein Marker für mesenchymale Stammzellen. b) Zellkerne. c) Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Anregungswellenlänge (Alexa Fluor 488): 488 nm; Anregungswellenlänge (Hoechst 34580): 405 nm; Emissionswellenlänge (Alexa Fluor 488): 553 nm; Emissionswellenlänge (Hoechst 34580): 438 nm. Mikroskop: Zeiss Konfokalmikroskop LSM780, Objektiv Plan-Apochromat 20x/0.8.

Die Lokalisierung der CD90-positiven Zellen bestätigt, dass sich die hMSC im äußeren Bereich der hBM-Sphäroide verteilen.

Abbildung 19 zeigt die Lokalisierung der CD90- und CD34-positiven Zellen. Dies bestätigt, dass sich die CD34+ hHSC im inneren Bereich der hBM-Sphäroide befinden.

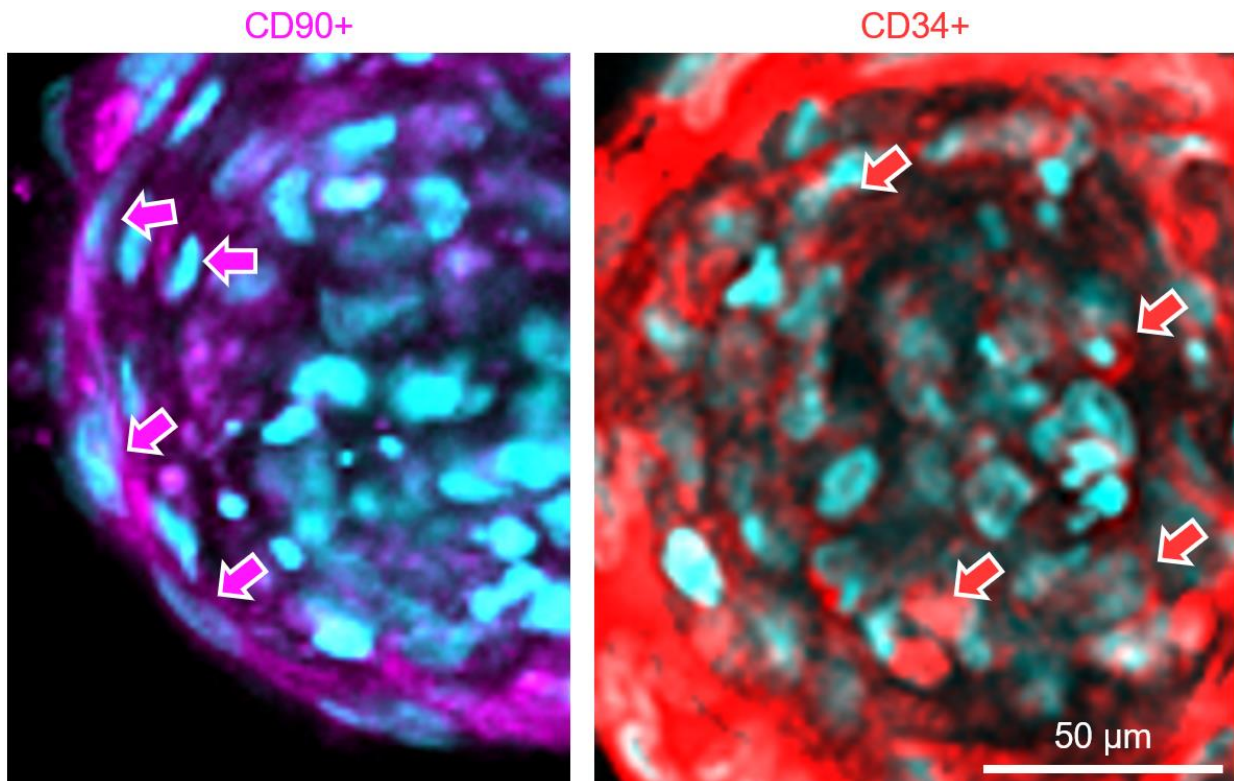


Abbildung 19 – Lokalisierung der CD90- und CD34-positiven Zellen in den hBM-Sphäroide. Die Pfeile weisen auf Zellen hin, die ein positives Immunfluoreszenz-Signal zeigen. Mikroskop: Zeiss Konfokalmikroskop LSM780, Objektiv Plan-Apochromat 20x/0.8.

Aktuelle Daten (Nakagawa et al. 2018, doi: 10.3389/fcell.2018.00143) deuten darauf hin, dass das NF- κ B-Signaling eine Schlüsselrolle bei der Bestimmung des ‚Ruhezustands‘ (Quieszenz) im Vergleich zum ‚Aktivzustand‘ von hHSCs spielt und dass die Feinabstimmung des NF- κ B-Signalings die molekularen und genetischen Identitäten der hHSCs bewahrt.

Die Expression von NF- κ B in den hBM-Sphäroiden wurde mit Immunfluoreszenz untersucht. Das aktive NF- κ B-Signaling wurde durch die pp65-positiven Zellkerne nachgewiesen.

Abbildung 20 zeigt, dass eine begrenzte Anzahl der Zellen im Sphäroid pp65 exprimiert, was demonstriert, dass die Mehrheit der Zellen in der Nische der hBM-Sphäroide einen robusten Stammzellcharakter beibehält.

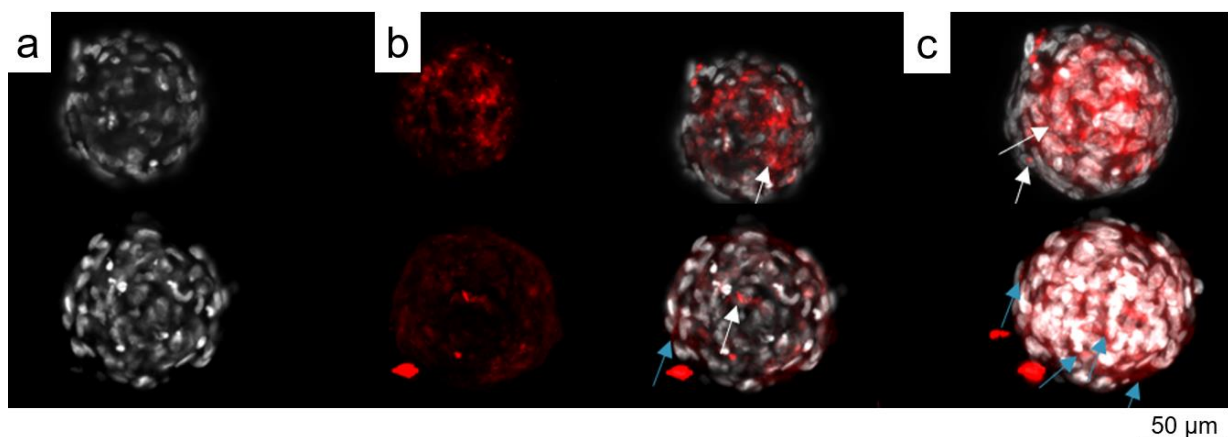


Abbildung 20 – Nachweis von den pp65-positiven Zellkerne in den hBM-Sphäroide. (a) Zellkerne (Hoechst 34580). b) pp65-positive Zellen (Immunofluoreszenz, Marker: Alexa Fluor 568). c) Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Mikroskop: Zeiss Konfokalmikroskop LSM780, Objektiv Plan-Apochromat 20x/0.8.

Die Proliferation und der programmierte Zelltod (Apoptose) in den hBM-Sphäroiden wurden durch den Nachweis der Expression der Marker Cleaved Caspase 3 und Ki67 analysiert (siehe **Abbildung 21** und **Abbildung 22**). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Prozesse in den hBM-Sphäroiden nur in sehr begrenztem Maße auftreten, was auf eine hohe Stabilität der BM-Nische in den Sphäroiden hinweist.

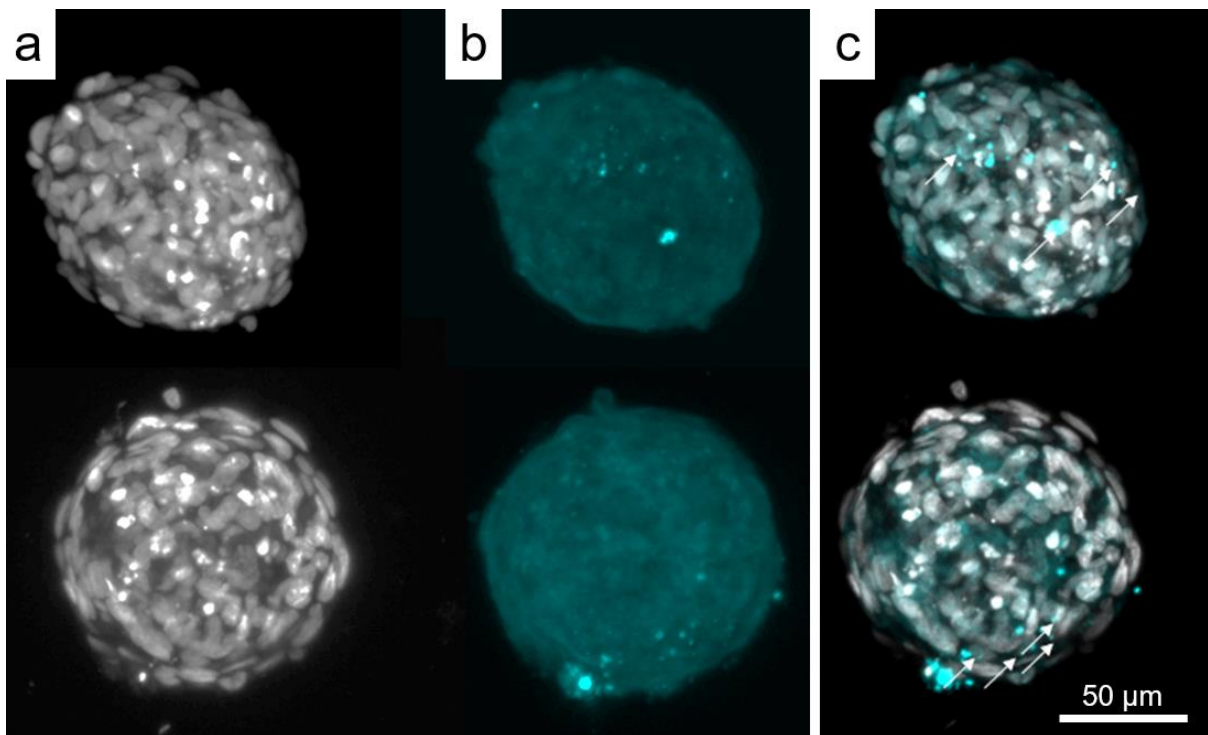


Abbildung 21 – Programmierter Zelltod in den hBM-Sphäroide. a) Hoechst34580-Signal zur Detektion von Zellkernen. b) Alexa Fluor 488 zur Detektion von gespaltener Caspase 3 in den hBM-Sphäroide. Die Sphäroide wurden mit PFA fixiert und mit Hoechst 34580 (a) und gegen gespaltene Caspase 3 (b) markiert. Eine maximale Intensitäts-Z-Projektion aller Kanäle einzeln (a,b) und zusammengeführt (c) ist gezeigt. Mikroskop: Zeiss LSM780 konfokales Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskop. Objektiv: PlanApochromat 20x/0.8. Anregungswellenlänge (Alexa Fluor 488): 488nm, Anregungswellenlänge (Hoechst34580): 405nm; Emissionswellenlänge (Alexa Fluor 488): 553 nm, Emissionswellenlänge (Hoechst34580): 462 nm. Voxelgröße: 0,24 x 0,24 x 2,25 µm³. Maßstab: 50 µm.

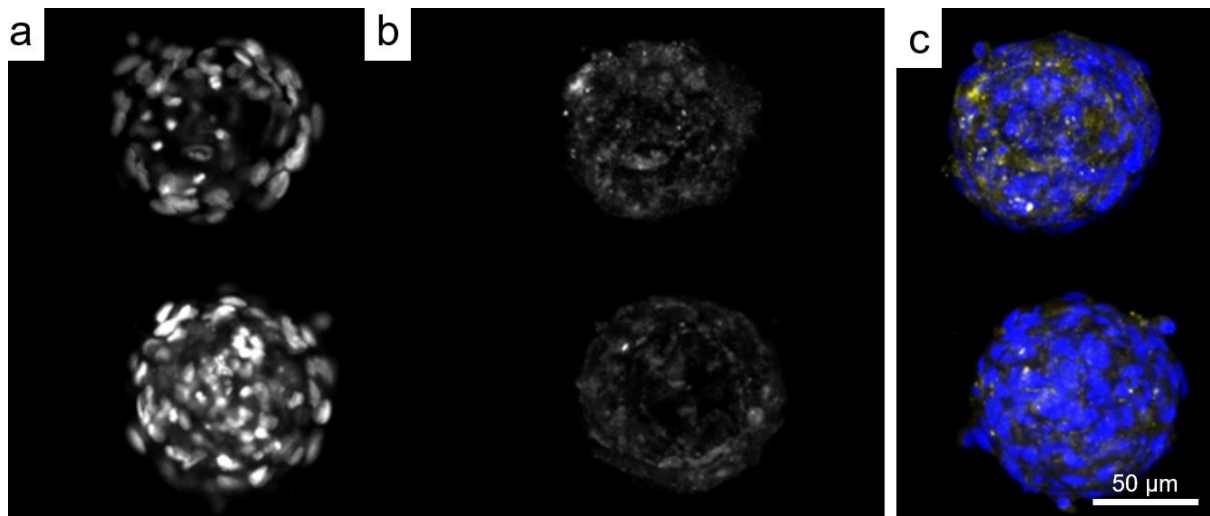


Abbildung 22 – Proliferation in den hBM-Sphäroide. (a) Hoechst34580 zur Detektion von Zellkernen und (b) Alexa Fluor 568-Signal zur Detektion von Ki67 wurden eingesetzt. Nach 7 Tagen wurden hBM-Sphäroide fixiert und mit Hoechst 34580-Farbstoff (a) gefärbt und mit Alexa Fluor 568-Antikörpern gegen Ki67 (b) immungefärbt. Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Objektiv Zeiss PlanApochromat 20x/0.8. Anregungswellenlänge (Alexa Fluor 568): 561nm, Anregungswellenlänge (Hoechst34580): 405nm; Emissionswellenlänge (Alexa Fluor 568): 640 nm, Emissionswellenlänge (Hoechst34580): 462 nm; Voxelgröße: 0,24 x 0,24 x 2,25 µm³. Maßstab: 50 µm.

In der Knochenmarknische interagieren HSCs direkt oder indirekt mit verschiedenen Komponenten der ECM, einschließlich Kollagen Typ I. Diese Interaktionen sind essenziell für die Aufrechterhaltung der Stammzellquieszenz, der für die langfristige Erhaltung der Stammzellpopulation wichtig ist. Kollagen Typ I beeinflusst die HSCs über integrinvermittelte Signalwege, die für die Zelladhäsion und das Überleben der Zellen von zentraler Bedeutung sind. Veränderungen in der Kollagen-Typ-I-Expression können zu einer gestörten Nischenarchitektur führen, was wiederum die HSC-Nische beeinträchtigt und zu hämatopoetischen Erkrankungen beitragen kann. **Abbildung 23** zeigt eine ausgeprägte Expression von Kollagen Typ I in den hBM-Sphäroiden, was auf die Stabilität der BM-Nische hindeutet.

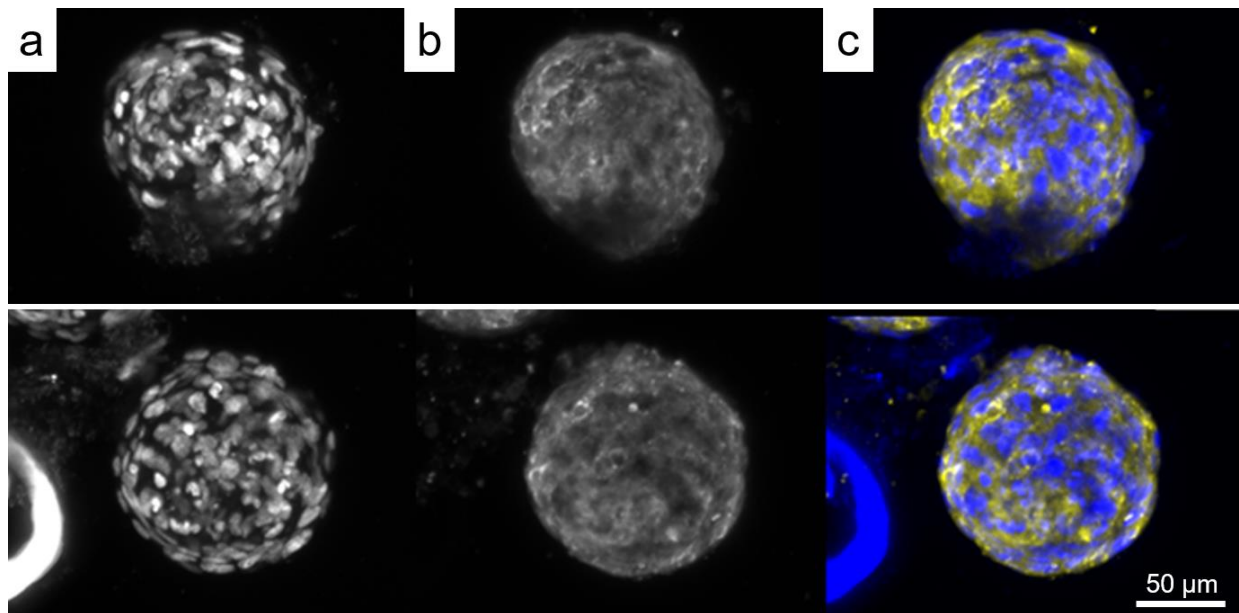


Abbildung 23 – Nachweis von Collagen Typ I in den hBM-Sphäroiden. Hoechst 34580-Signal zur Erkennung von Zellkernen (a) und Alexa Fluor 488-Signal zur Erkennung von Kollagen 1 (b). Eine maximale Z-Projektion wurde mit beiden Kanälen einzeln (a,b) und zusammengeführt (c) erstellt; Mikroskop: LSM780 konfokales Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskop; Objektiv: Zeiss PlanApochromat 20x/0.8. Anregungswellenlänge (Alexa Fluor 488): 488nm, Anregungswellenlänge (Hoechst34580): 405nm; Emissionswellenlänge (Alexa Fluor 488): 553 nm, Emissionswellenlänge (Hoechst34580): 462 nm; Voxelgröße: 0,24 x 0,24 x 2,25 µm³. Maßstab: 50 µm.

Die Verteilung der Hydroxyapatite-Mikrokugeln in den Sphäroiden wurde mit Hellfeld-Mikroskopie und Aufhellung (optical clearing) untersucht (**Abbildung 24**).

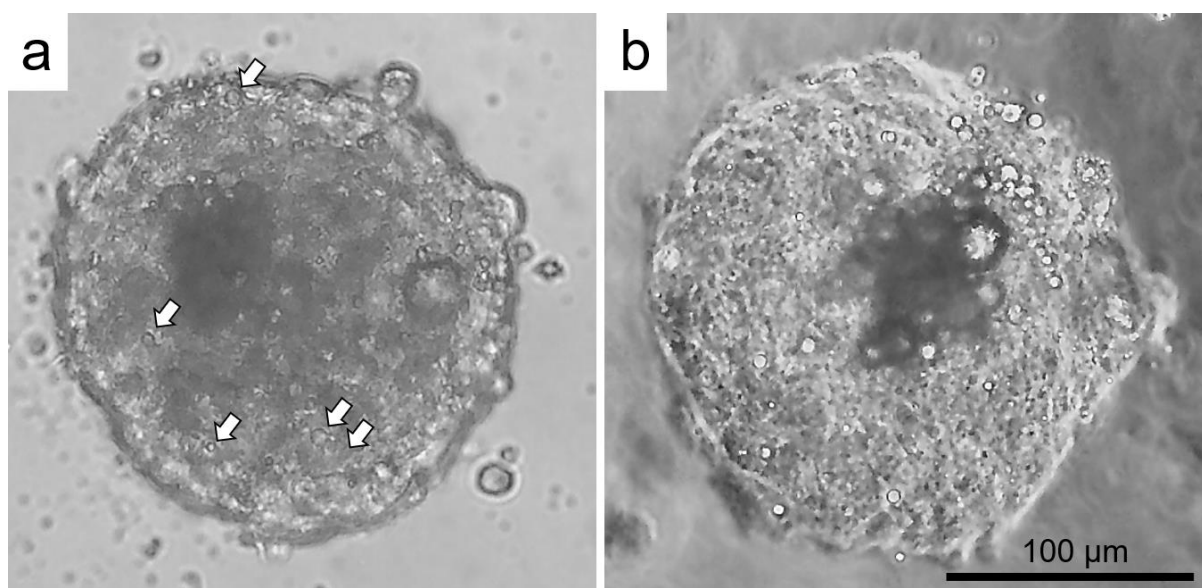


Abbildung 24 – Nachweis von Hydroxyapatit-Mikrokügelchen in den hBM-Sphäroiden: (a) mittels Hellfeldmikroskopie und (b) Hellfeldmikroskopie eines optisch aufgehellten Sphäroids.

Die Aufhellung ermöglicht eine deutliche Erkennung der Mikrokügelchen und deren Verteilung innerhalb der hBM-Sphäroide.

II.1.3 AP 3: bodenbasierte Forschung

Die bodenbasierte Forschung umfasste das Exponieren von hBM-Sphäroiden und hMSC/hHSC-Zellsuspension gegenüber simulierter Mikrogravitation (μ -g) in einem von der Firma Yuri GmbH gemieteten Klinostat (**Abbildung 25**).

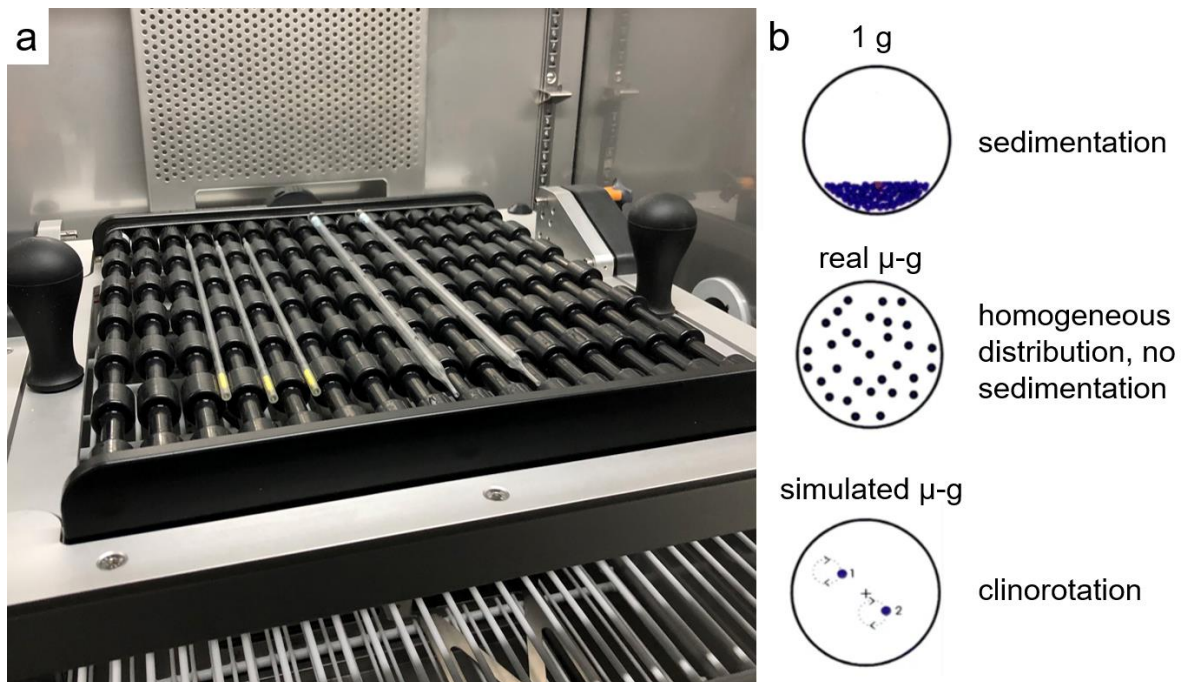


Abbildung 25 – Exponierung von hBM-Sphäroiden und hMSC/hHSC-Zellsuspension gegenüber simulierter Mikrogravitation (μ -g) in einem von der Firma Yuri GmbH gemieteten Klinostat.

II.1.4 AP 4: ISS-Workflow-Vorbereitung

Zell- und Sphäroidkultur in Hydrowells

Die Hydrowells wurden einer Reihe von Optimierungsschritten unterzogen, um die optimale Form zu finden, die die Aggregation von Zellen zu Sphäroiden begünstigt. Drei getestete Formen, die jeweils als "U-Well", "Torpedo" und "Sharp tip" bezeichnet wurden, wurden getestet. Letztendlich erwies sich die "Torpedo"-Form als die beste Geometrie für die Sphäroidbildung und wurde in den nachfolgenden Experimenten verwendet (**Abbildung 26**).

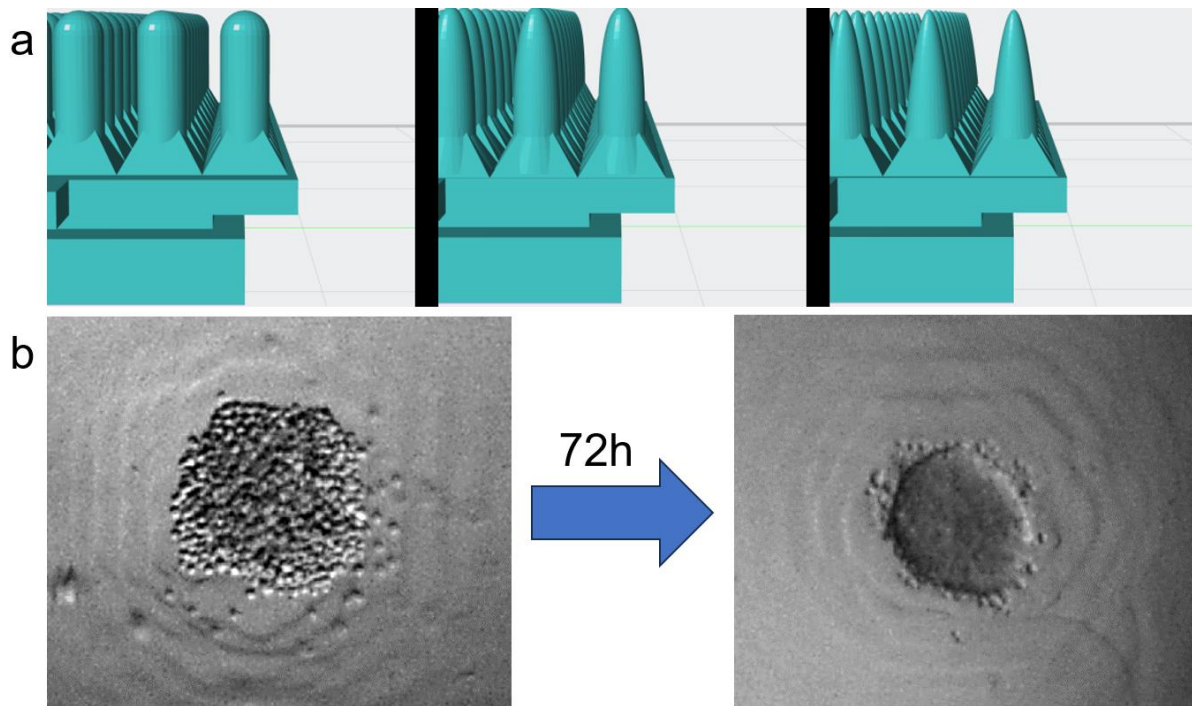


Abbildung 26 – a) Die drei getestete Formen, von links nach rechts "U-Well", "Torpedo" und "Sharp tip" wurden getestet. Letztendlich erwies sich die "Torpedo"-Form als die beste Geometrie für die Sphäroidbildung und wurde in den nachfolgenden Experimenten verwendet. b) Ein Beispiel für die Sphäroidbildung in den Hydrowells unter Laborbedingungen bei 1g. Die Zellsuspension wird zunächst durch Zentrifugation in der Mitte konzentriert. Nach 72 Stunden bildet sich ein kompaktes Sphäroid.

Abbildung 27 zeigt ein Beispiel für einzelne hBM-Sphäroide, die in getrennten Kammern eines Hydrowells kultiviert wurden. Jede Kammer hat einen Durchmesser von 3 mm. Durch diese Unterteilung kommen die einzelnen Sphäroide nicht miteinander in Kontakt, was einen hohen Grad an Standardisierung des Experiments gewährleistet.

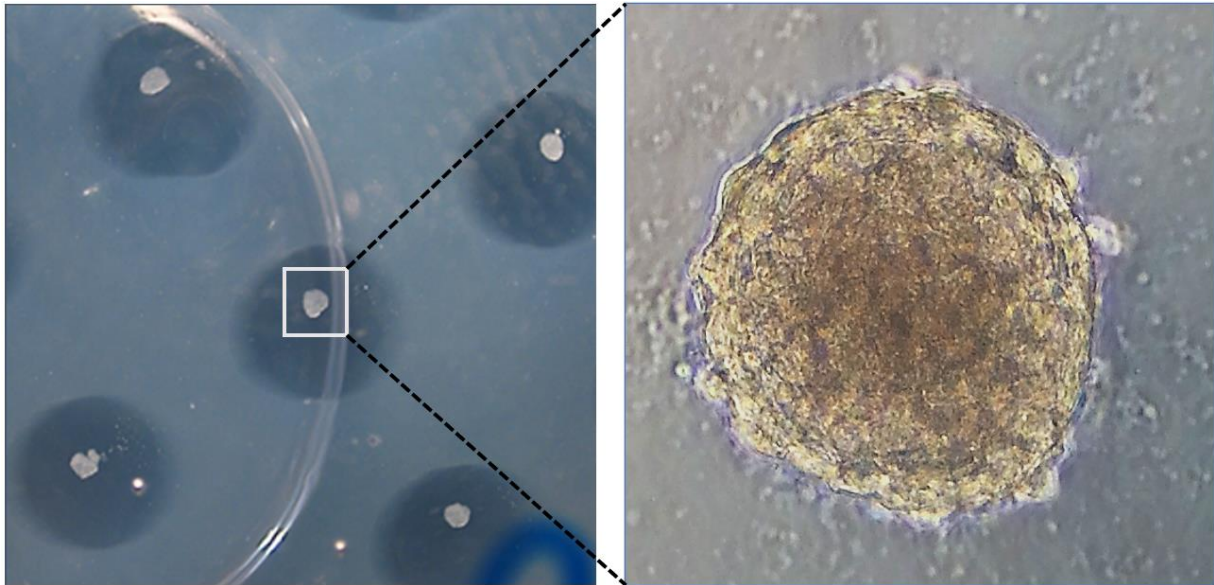


Abbildung 27 – Einzelne hBM-Sphäroide, die in getrennten Kammern eines Hydrowells kultiviert wurden. Jede Kammer hat einen Durchmesser von 3 mm.

Als Nächstes entwickelten wir Verfahren, um vorgeformte Sphäroide unter sterilen Bedingungen direkt in die Hydrowells zu pipettieren (**Abbildung 28**).

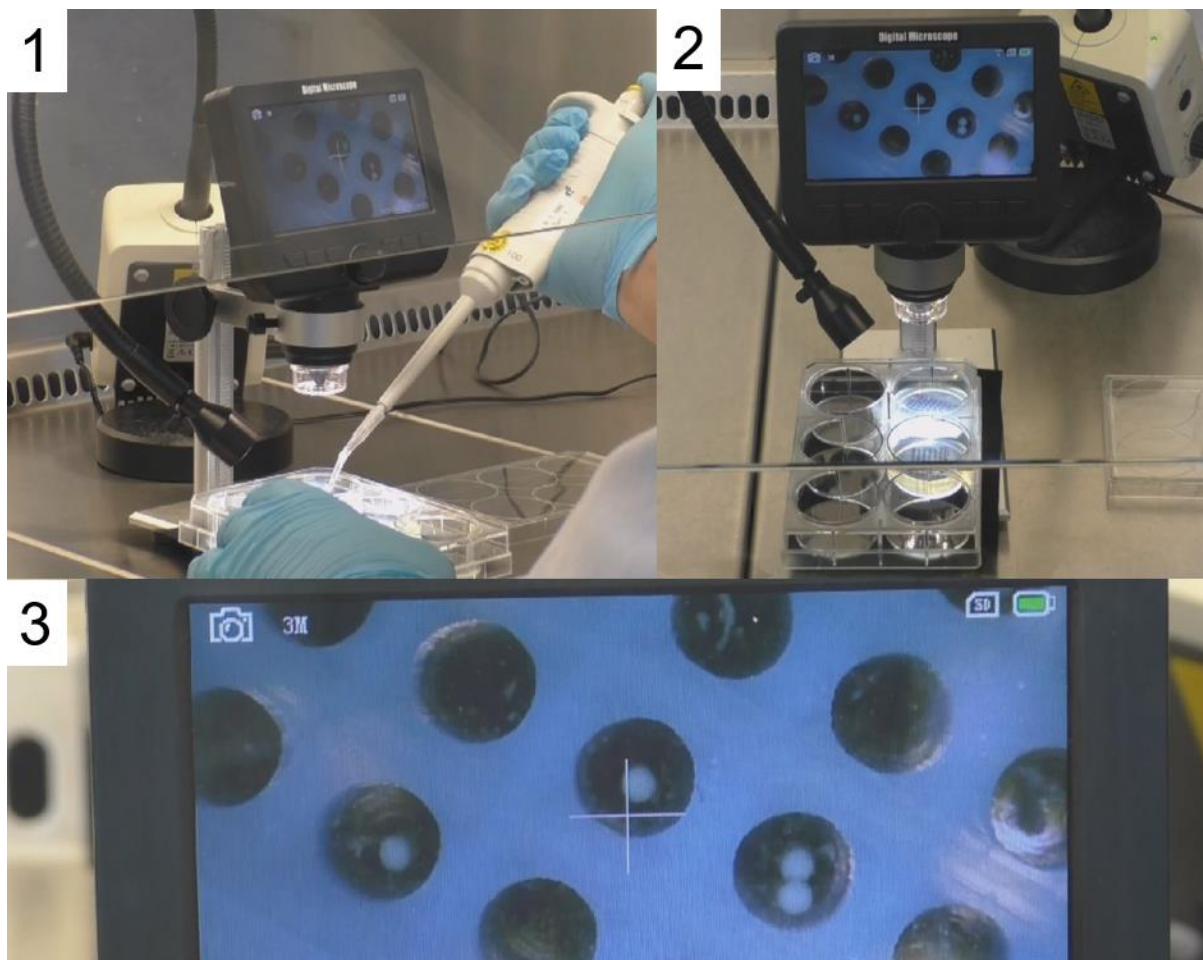


Abbildung 28 – Pipettieren von vorgeformten Sphäroiden in die Hydrowells. 1) Ein kompaktes digitales Mikroskop wird innerhalb der sterilen Laminar-Flow-Box platziert, um eine optimale Überwachung des Transfers der Sphäroide in das Hydrowell unter sterilen Bedingungen zu gewährleisten. 2-3) Das digitale Mikroskop bietet eine sehr gute Ansicht der pipettierten Sphäroide für die Qualitätskontrolle und Dokumentation.

Abbildung 29 zeigt einen Überblick über sechs Hydrowell-Kammern vor und nach dem Transfer der hBM-Sphäroide mit einer herkömmlichen Pipette, wie in **Abbildung 28-1** dargestellt. Der Transfer wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

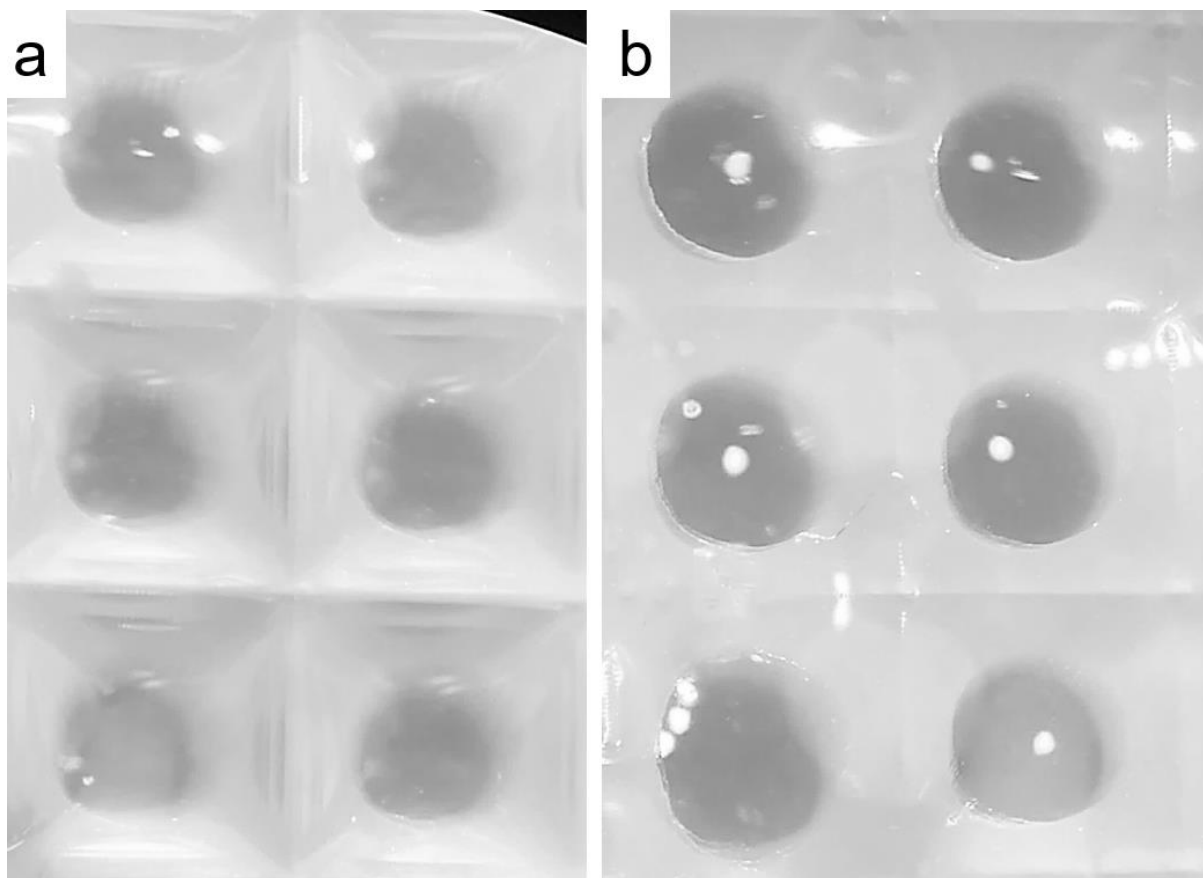


Abbildung 29 – Überblick über sechs Hydrowell-Kammern vor (a) und nach (b) dem Transfer der hBM-Sphäroide.

Test und Betrieb der experimentellen Einheit Typ 5

Die experimentellen Einheiten Typ 5 wurden von Yuri GmbH für die Cellbox-3 Mission SHAPE bereitgestellt. Jede Einheit enthält zwei Kammern und ermöglicht die Aufnahme von zwei doppelt gestapelten Hydrowells, was insgesamt 280 Sphäroide pro experimentelle Einheit ergibt. Die Einheit verfügt außerdem über einen Tank, der das Fixiermittel enthält, und eine Miniatur-Peristaltikpumpe für den Medien austausch (**Abbildung 30**). Die Haupteigenschaften

der experimentellen Einheit Typ 5 werden in **Tabelle II** zusammengefasst.

Tabelle II - Features of Type 5 experimental unit (source: Yuri GmbH)	
Main Dimensions	84.5 x 40 x 30 mm ³
Matching outer shell	Extended Type-I Hypertac
Mass Approx.	195 g (filled, with Lid and outer shell)
CC-Volume without Insert	11 ml ± 0.3 ml
Number of CC	2
Number of tanks	1
Pump-Flowrate	2 – 3 ml/min

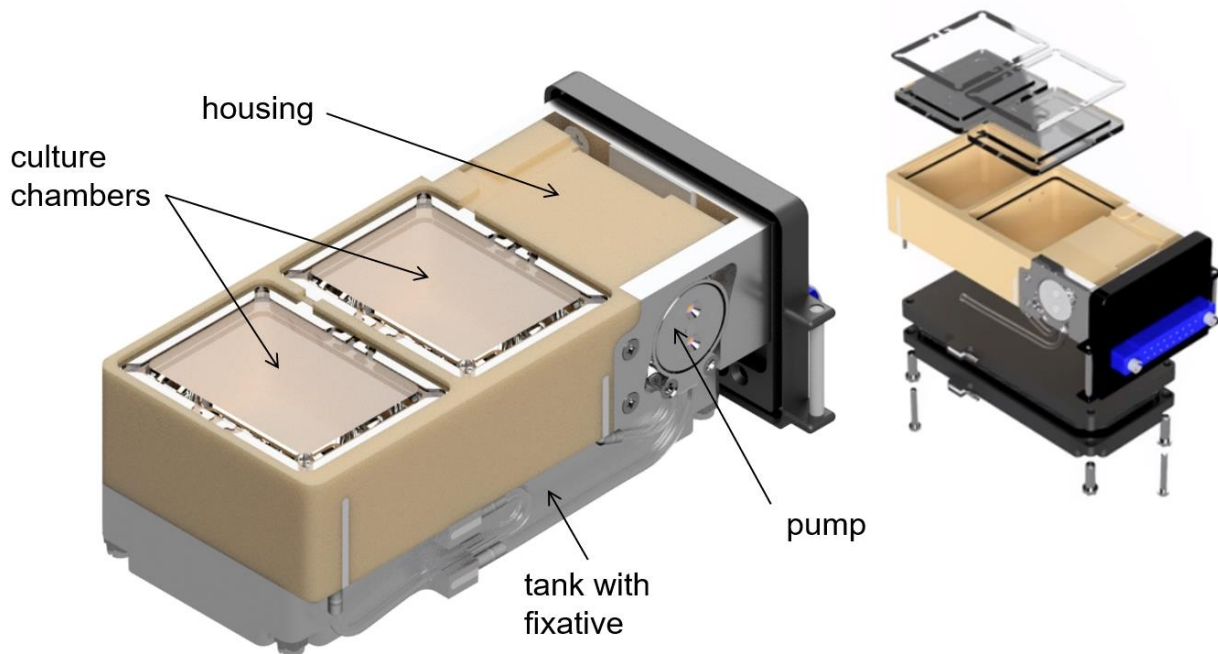


Abbildung 30 – Aufbau der experimentellen Einheit Typ 5. Für Details s. Tabelle II. Quelle: Yuri GmbH.

Abbildung 31 zeigt den vollständigen Zusammenbau der experimentellen Einheit Typ 5. Zwei doppelt gestapelte Hydrowells werden in die beiden Kammern eingesetzt, wobei speziell entwickelte Adapter sicherstellen, dass die Hydrowells stabil an ihrem Platz gehalten werden. Abschließend versiegeln zwei transparente Kunststoffdeckel die Kammern hermetisch. **Abbildung 32** zeigt das Einsetzen des experimentellen Behälters Typ 5 in das äußere

Gehäuse.

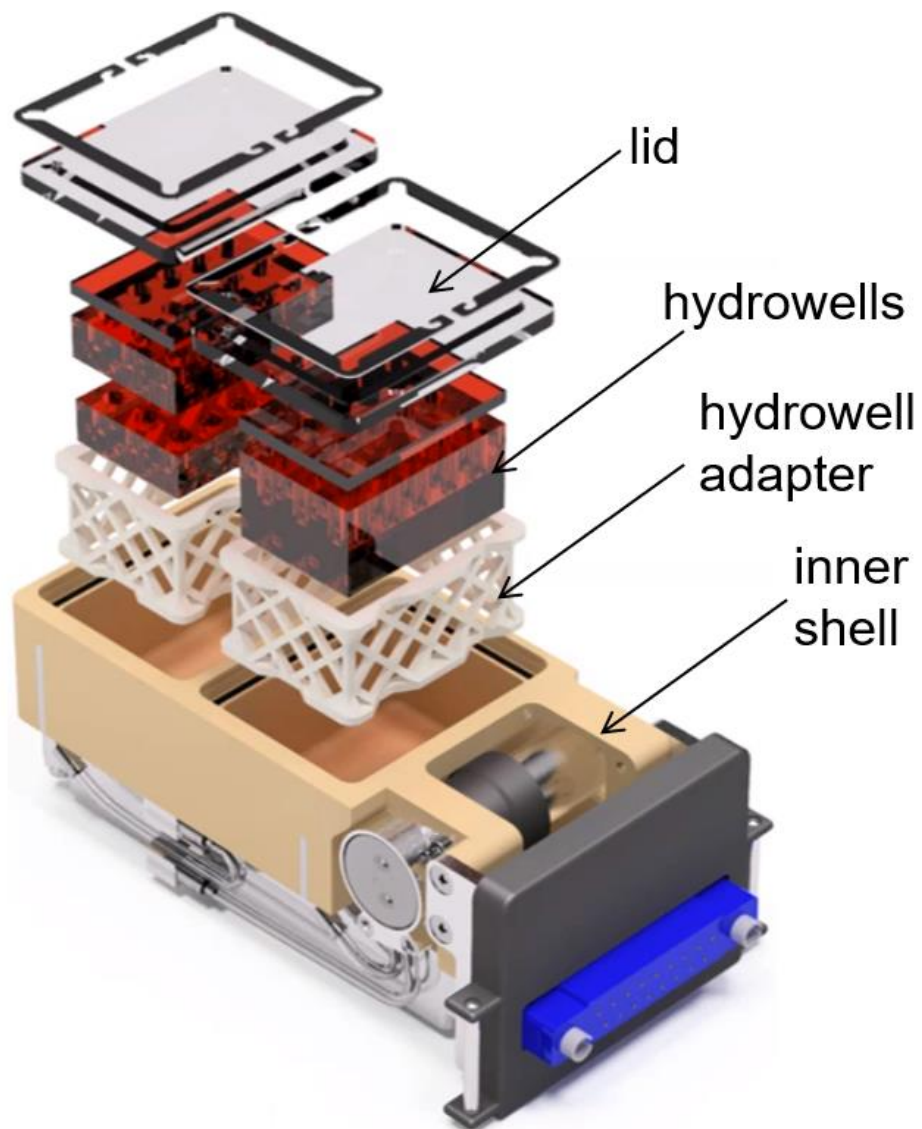


Abbildung 31 – Vollständigen Zusammenbau der experimentellen Einheit Typ 5. Quelle: Yuri GmbH

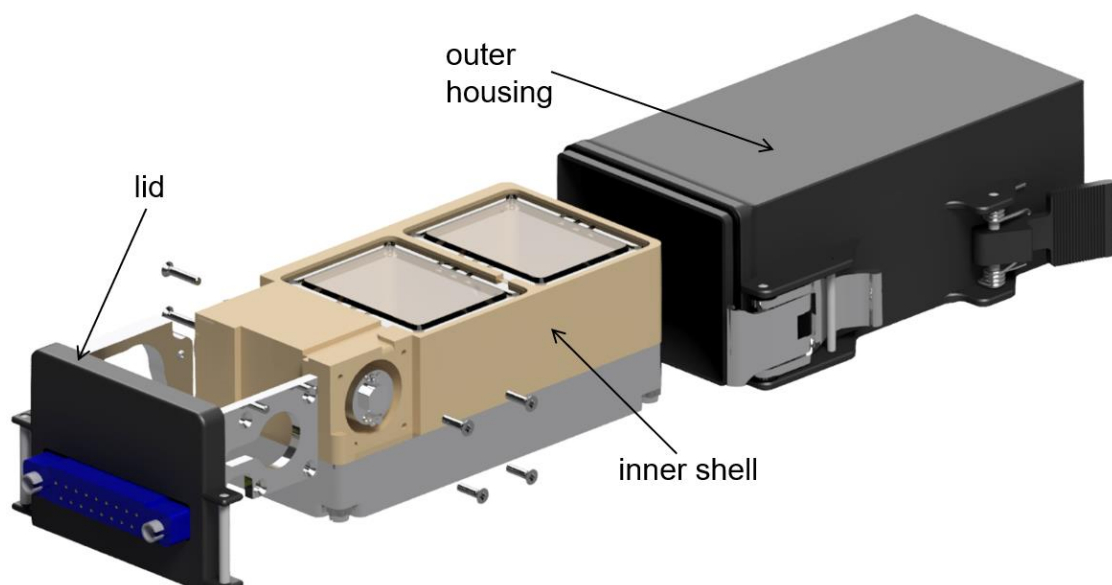


Abbildung 32 – Einsetzen des experimentellen Behälters Typ 5 in das äußere Gehäuse.
Quelle: Yuri GmbH.

Funktionstest des experimentellen Behälters Typ 5 in der "Space Technology and Advanced Research Systems Inc experiment facility" STaARS-1 EF (LaMont Aerospace).

Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des experimentellen Behälters in Verbindung mit einem System, das identisch mit dem auf der ISS installierten ist, wurde von der Firma Yuri GmbH in Zusammenarbeit mit LaMont Aerospace durchgeführt. Unser SHAPE-Team an der Goethe-Universität nahm an dem Vorbereitungstreffen vor dem Test teil, und es gab einen kontinuierlichen Informationsaustausch zwischen dem SHAPE-Team und Yuri GmbH. **Abbildung 33** and **Abbildung 34** zeigen das STaARS-1 EF-Gerät während der Testversuche.

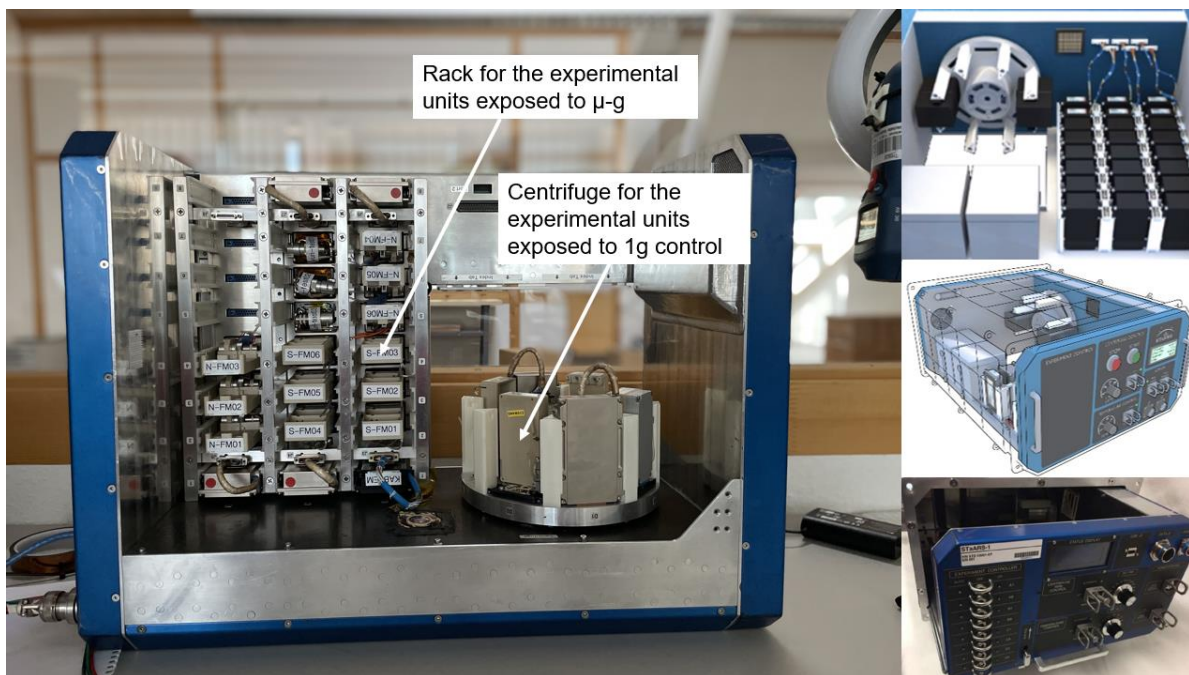


Abbildung 33 – Funktionstest des experimentellen Behälters Typ 5 in der "Space Technology and Advanced Research Systems Inc experiment facility" STaARS-1 EF (LaMont Aerospace).
(Source: Yuri GmbH und LaMont Aerospace).

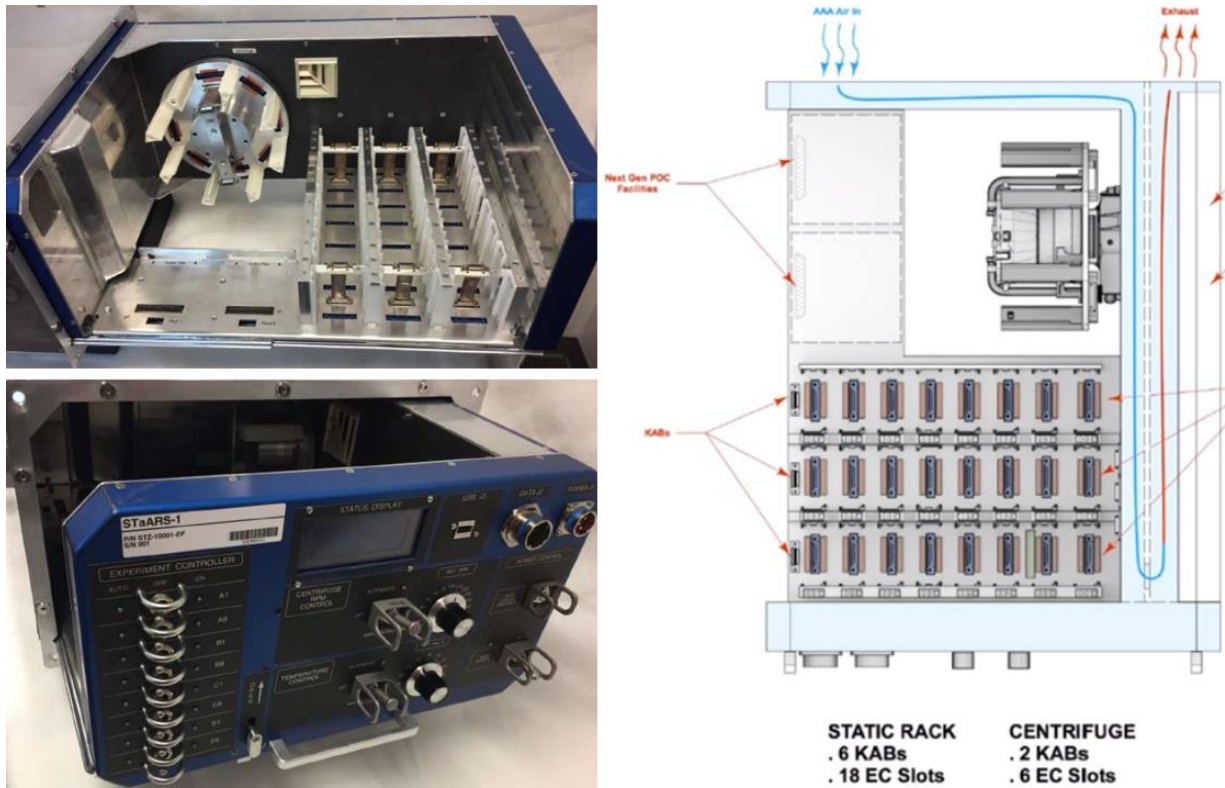
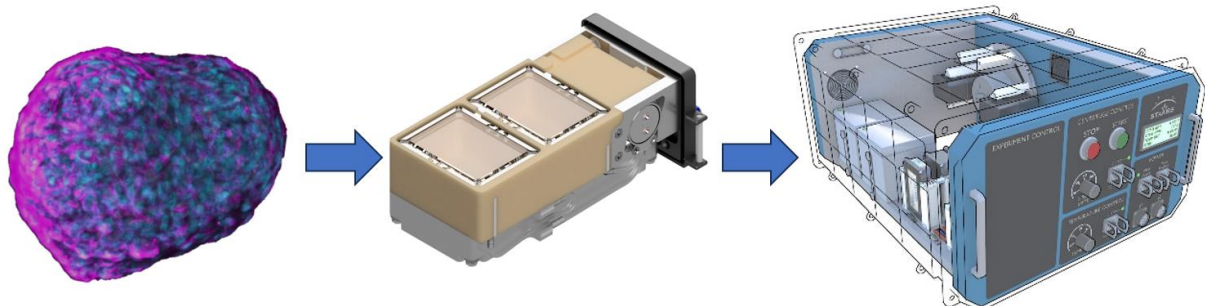


Abbildung 34 – Interne Bauweise der "Space Technology and Advanced Research Systems Inc experiment facility", STaARS-1 EF. Source: LaMont Aerospace.

Vorbereitungen der SHAPE-Mission vor dem Raketenstart zur NG-18 Cargo-Mission zur Internationalen Raumstation, (ISS)



Formation of hBM spheroids or suspension of hMSC and hHSC

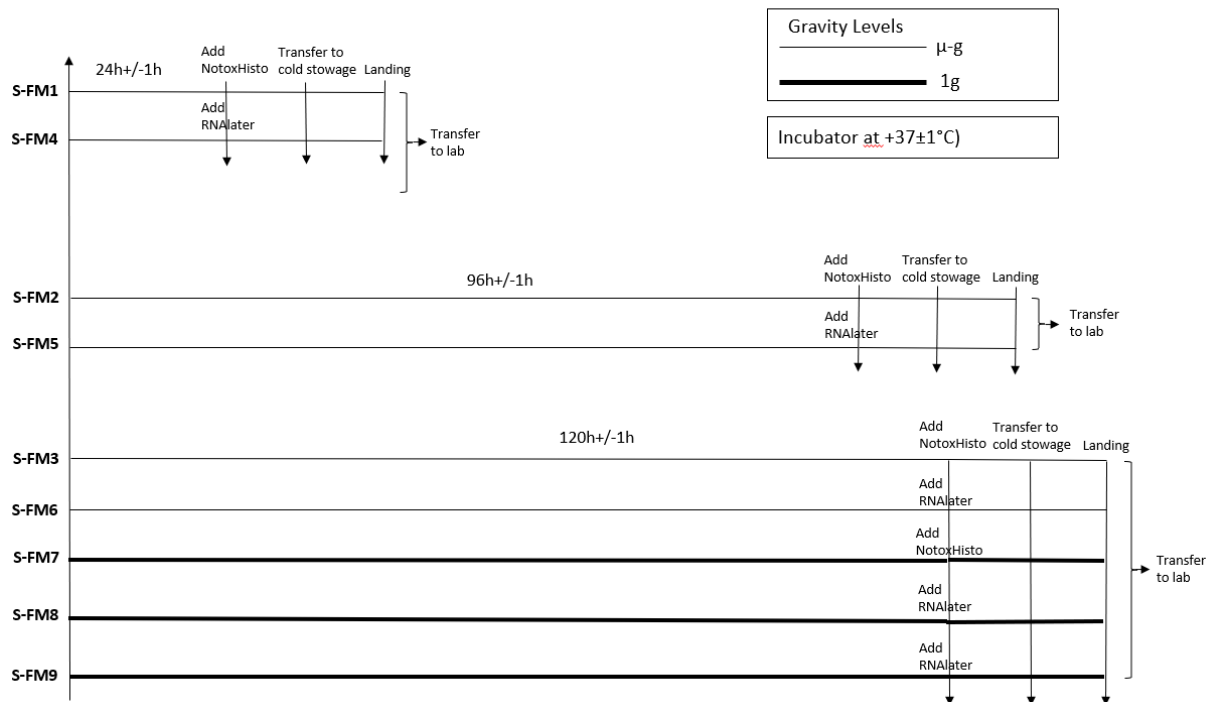
hBM spheroid culture in type V experimental containers

STaARS: μ -g, 1g

Abbildung 35 – Grafische Zusammenfassung der SHAPE-Mission (Oktober-November 2022)

Das Flussdiagramm des SHAPE-Experiments auf der ISS ist in **Abbildung 36** dargestellt. Insgesamt wurden 9 experimentelle Behälter verwendet. Die Fixierungszeiten betragen jeweils 24h, 96h und 120h. Als Fixierungsmittel wurden Notoxhisto und RNAlater verwendet. 3 experimentelle Behälter wurden für die 1g-Kontrolle in die Zentrifuge gelegt.

SHAPE Experiment Flow Diagram



. **Abbildung 36** – Flussdiagramm des SHAPE-Experiments auf der ISS.

Die geplante Anordnung der experimentellen Behälter im STaARS-1 EF-System ist in **Abbildung 37** dargestellt. Das SHAPE-Experiment wurde parallel zum NEMUCO-Experiment der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die experimentellen Behälter von NEMUCO sind ebenfalls im Plan sichtbar.

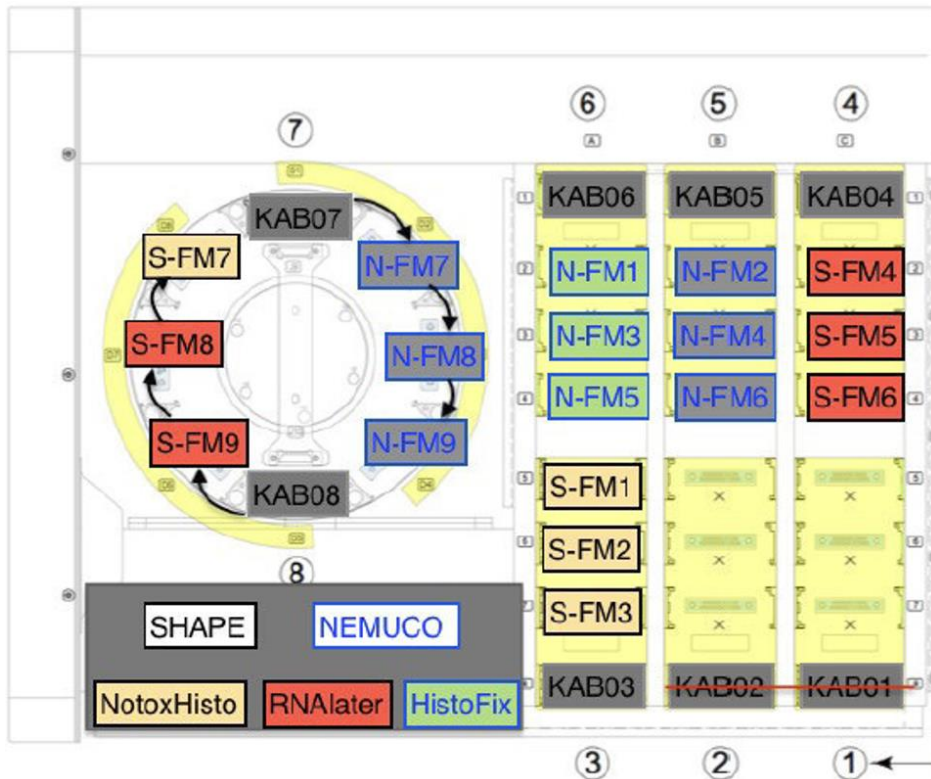


Abbildung 37 – Die Anordnung der experimentellen Behälter im STaARS-1 EF-System.

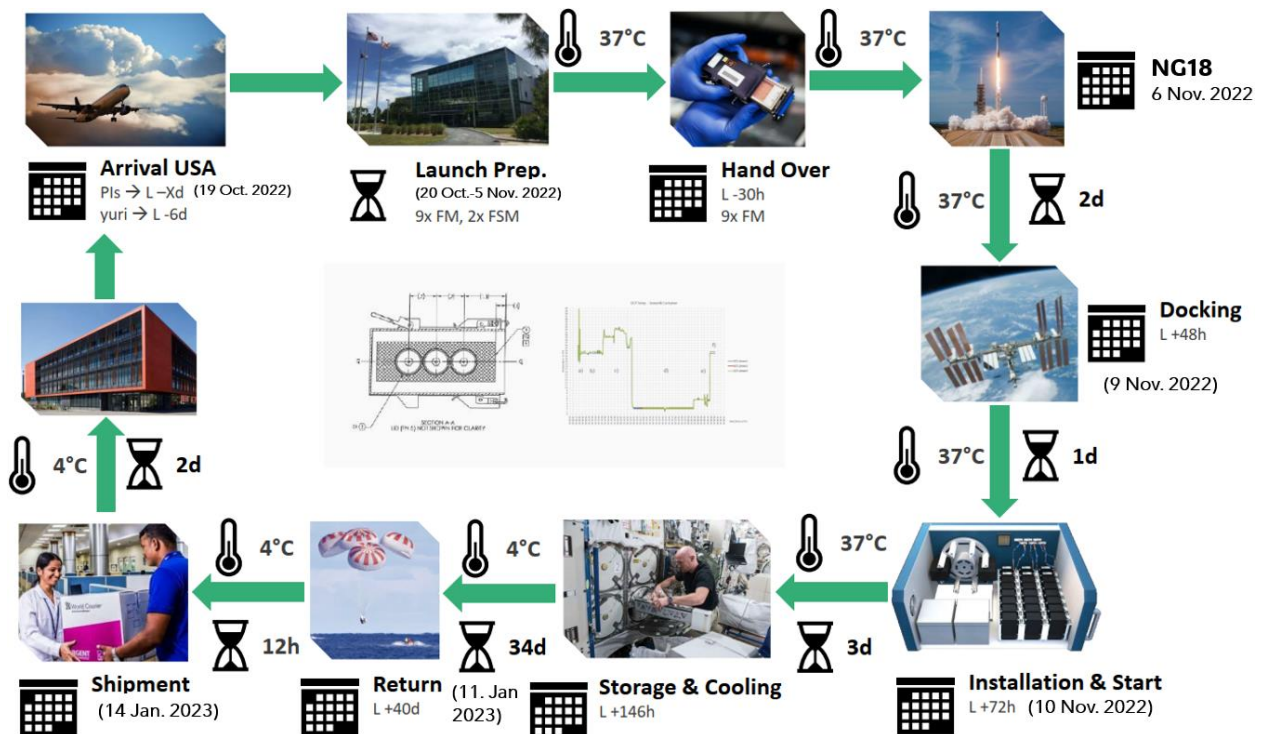


Abbildung 38 – Zeitplan der SHAPE-Mission. Quelle: Yuri GmbH and Goethe University Frankfurt.

Der Zeitplan der SHAPE-Mission mit allen Schritten, einschließlich der Ankunft in Norfolk (Virginia, USA), der Vorbereitung der Proben, der Übergabe an die NASA, dem Start (vom

Wallops Flight Facility, Virginia) sowie dem Zeitplan der Operationen auf der ISS, der Rückkehr und dem Versand an die Goethe-Universität Frankfurt, wird in **Abbildung 38** beschrieben.

Nach der Ankunft in Norfolk (Virginia) begann das SHAPE-Team mit den Arbeiten, die mit der Probenvorbereitung und dem Einsetzen in die 9 von der Firma YURI GmbH bereitgestellten experimentellen Einheiten zusammenhängen. Eine visuelle Zusammenfassung der durchgeführten Schritte ist in **Abbildung 39** dargestellt. Die Arbeiten wurden in von der Eastern Virginia Medical School bereitgestellten Labore durchgeführt.

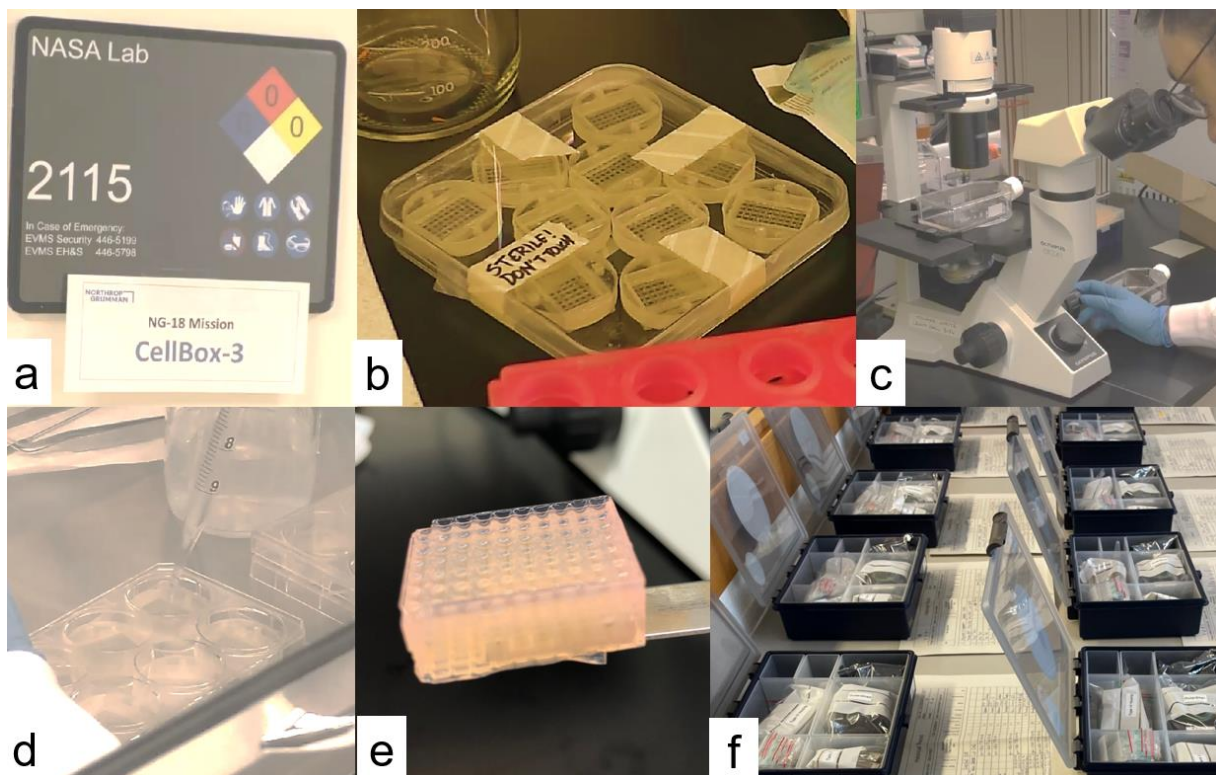


Abbildung 39 – Arbeitsschritte der SHAPE Mission bei Eastern Virginia Medical School (Norfolk, Virginia). a) Vorbereitung des Labors und Beginn der Arbeiten in dem NASA Lab. b) Vorbereitung der für die Mission benötigten Hydrowells. c) Zellkulturarbeiten mit hMSC- und hHSC-Zellen. d) Übertragung der hBM-Sphäroide und Zellsuspensionen in die Hydrowells. e) Platzierung der Hydrowells in den experimentellen Einheiten. f) Finale Aufbau der neun für die SHAPE-Mission vorgesehenen experimentellen Einheiten.

Nach dem Andocken der nach der NASA-Astronautin benannten "Sally Ride" Cygnus-Kapsel an die ISS wurden die Proben zur STaARS-1 Experimentieranlage auf der ISS übertragen (**Abbildung 40**) und die geplante automatische experimentelle Sequenz (**Abbildung 41**) wurde von den Astronauten gestartet.

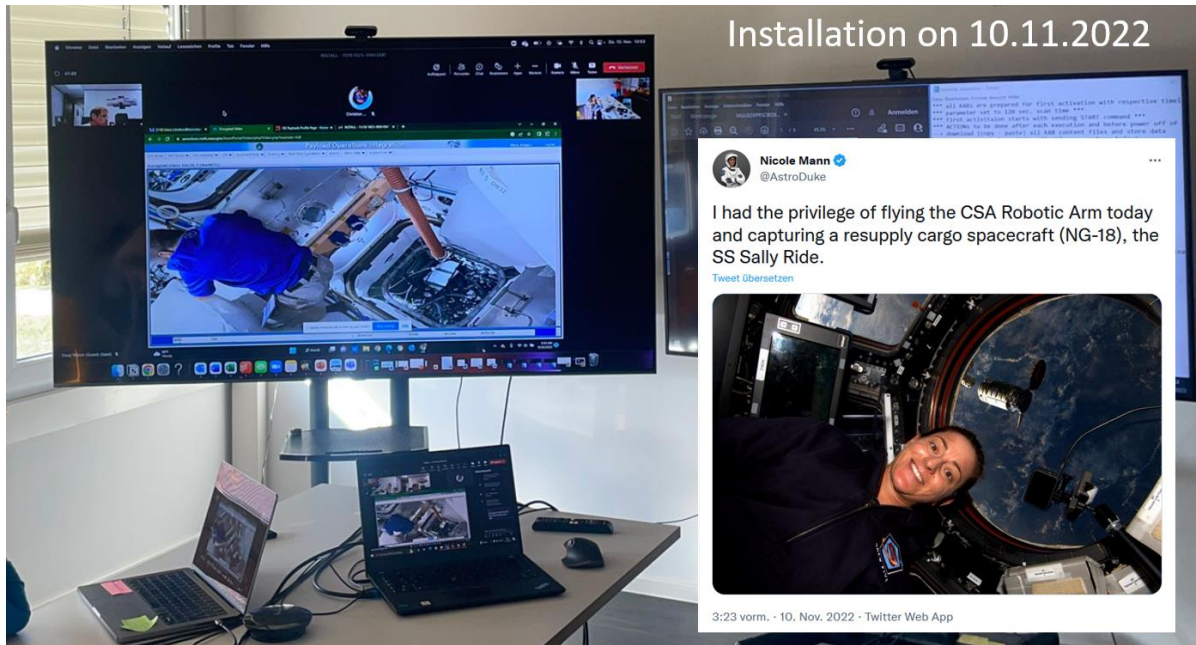


Abbildung 40 – Andocken der nach der NASA-Astronautin benannten "Sally Ride" Cygnus-Kapsel an die ISS und Übertragung der Proben zur STaARS-1 Experimentieranlage auf der ISS. Die Übertragung wurde von Yuri GmbH überwacht.

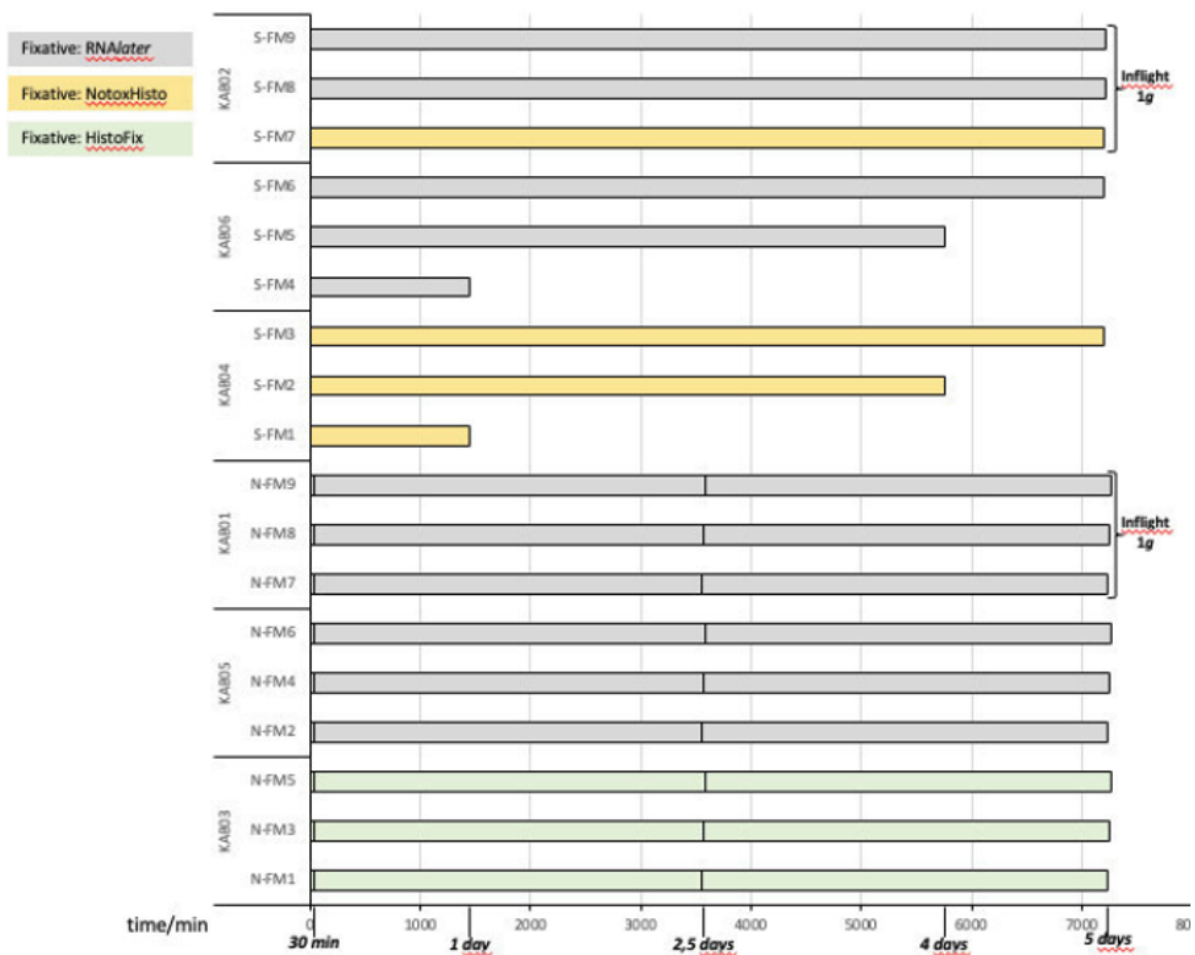


Abbildung 41 – *Zeitplan der Fixierungsschritte für die neun experimentellen Einheiten des SHAPE--Experiments auf der ISS. Quelle: Yuri GmbH.*

Ergebnisse

Morphologische Analyse der Aggregation von hBM-Sphäroiden unter verschiedenen Gravitationsbedingungen (echte und simulierte μ -g) sowie bei 1g

Das SHAPE-Experiment bietet aufschlussreiche Erkenntnisse über die Zellmorphologie innerhalb von Knochenmark-Sphäroiden (hBM-Sphäroiden), die unterschiedlichen Schwerkraftbedingungen – der Standard-Erdgravitation (1g) sowie der Mikrogravitation (μ -g), sowohl real auf der Internationalen Raumstation (ISS) als auch simuliert bei bodenbasierten Versuchen – ausgesetzt waren. Ziel war es, die Auswirkungen von Schwerelosigkeit auf die Zellzusammenlagerung und die Sphäroidbildung zu untersuchen.

Im Rahmen der Studie wurden 2.520 hBM-Sphäroide einer bis zu 120 Stunden andauernden echten Mikrogravitation während einer Raumfahrtmission ausgesetzt. Die Kulturen erfolgten in speziell entworfenen Agarose-Hydrowells, die eine optimale Umgebung für das Wachstum dreidimensionaler Zellsysteme bieten.

Nach der Rückkehr der Proben von der ISS wurden die Sphäroide einer detaillierten morphologischen Analyse unterzogen. Hierzu wurden sie mit Hoechst gefärbt, was eine klare Unterscheidung der Zellpopulationen (hMSC und hHSC) anhand ihrer Kerngröße und Fluoreszenzintensität erlaubte.

Die morphologische Untersuchung (**Abbildung 42**) offenbarte signifikante Differenzen zwischen den hHSC- und hMSC-Gruppen:

- **Kerngröße und Fluoreszenzintensität:** Die Färbung resultierte in unterschiedlichen Kerngrößen und Fluoreszenzintensitäten zwischen den Zelltypen, was eine eindeutige Identifikation ermöglichte.
- **Kernfläche und -umfang:** Es wurden quantitative Messungen durchgeführt, die eine deutliche Variation zeigten – vermutlich ein Effekt der Mikrogravitation.
- **Zentroid und Zirkularität:** Diese Parameter ergaben präzise Informationen zu den geometrischen Eigenschaften der Zellkerne innerhalb der Sphäroide.
- **Räumliche Verteilung:** Im Vergleich zu 1g- und simulierten μ -g-Bedingungen zeigte sich eine gelockerte Zellverteilung in der echten Mikrogravitation.

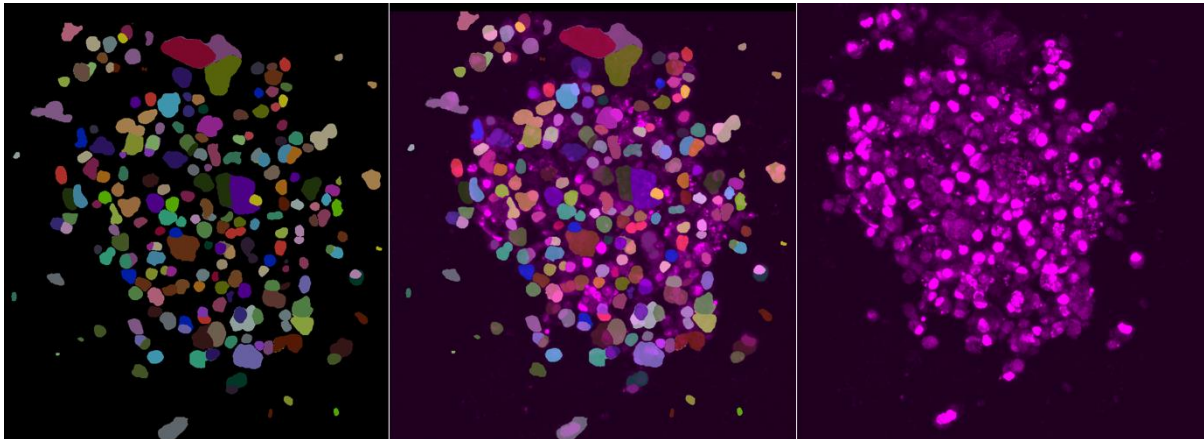


Abbildung 42 – Beispiel für die Segmentierung eines hBM-Sphäroids, kultiviert unter realer μ -g auf der ISS. Links: segmentiertes Sphäroid. Mitte: Überlagerung der Segmentierung und des Fluoreszenzbildes. Rechts: Fluoreszenzbild.

Interessanterweise tendierten die Zellen unter echter Mikrogravitation dazu, lockere Aggregate zu bilden, was auf eine mögliche Beeinflussung der Zelladhäsionsmechanismen durch die Schwerelosigkeit hinweist (**Abbildung 43**, **Abbildung 44**).

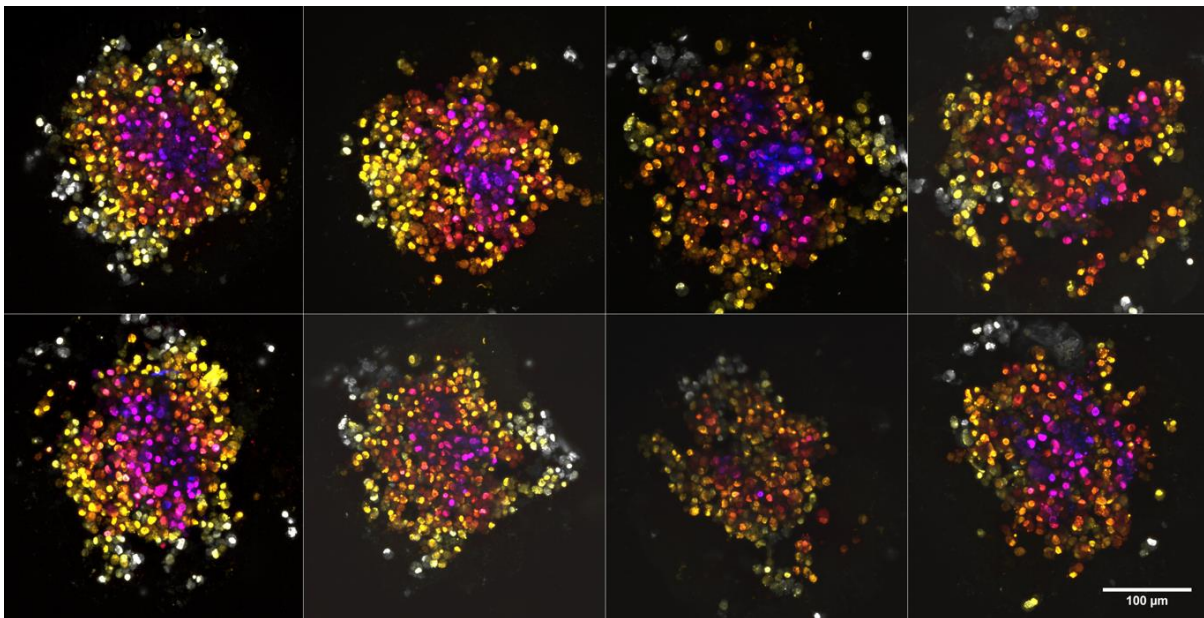


Abbildung 43 – Maximalprojektion von acht verschiedenen hBM-Sphäroiden, die die lockere Aggregationsmorphologie der unter realer Mikrogravitation gewachsenen Sphäroide zeigt.

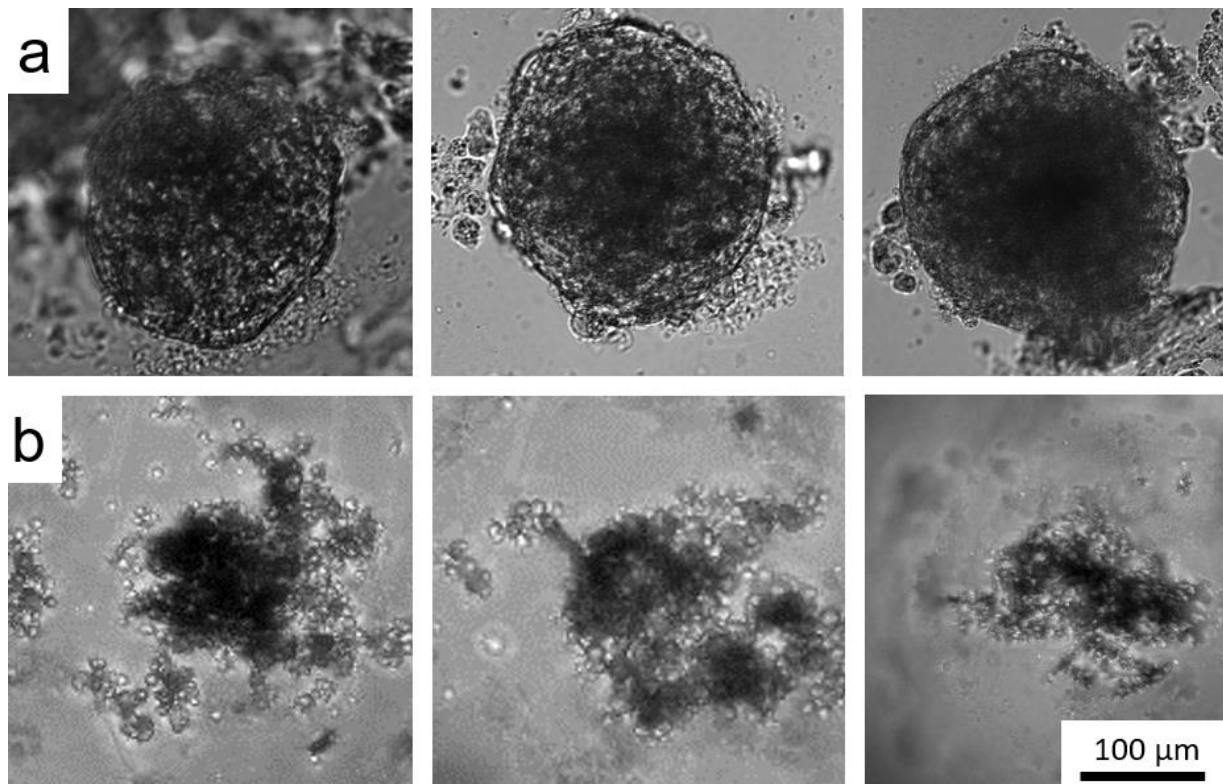


Abbildung 44 – Vergleich der unter 1g (a) und unter realer Mikrogravitation (μ -g) auf der ISS gezüchteten hBM-Sphäroide.

Die weiteren Forschungsschritte umfassen vertiefende Immunfluoreszenz-Bildgebungen zur Identifizierung spezifischer Differenzierungsmarker von hHSC. Darüber hinaus wird eine systematische Segmentierung der mikroskopischen Datensätze angestrebt, um eine präzise quantitative morphologische Analyse sowie eine genaue Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale zu ermöglichen.

Genexpressionsanalyse in den hBM-Sphäroiden unter verschiedenen Gravitationsbedingungen (echte und simulierte μ -g) sowie bei 1g

Es wurde RNA-Extraktion gefolgt von Sequenzierung und Analyse durchgeführt, um die molekularen Veränderungen unter Mikrogravitation zu verstehen. Die RNA-Analyse wurde mit Massive Analysis of cDNA-Ends (MACE) durchgeführt (**Abbildung 45**). MACE ist eine fortschrittliche Technik für die Analyse der Genexpression, die mehrere Vorteile gegenüber herkömmlichen RNA-Seq-Methoden bietet. Sie ermöglicht eine präzise Quantifizierung von Transkripten durch die Sequenzierung nur des 3'-Endes jedes cDNA-Moleküls, das den hoch polymorphen 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) umfasst. MACE ermöglicht die Verwendung von so wenig wie 0,05 ng Gesamt-RNA, sondern sie bietet auch eine hohe technische Zuverlässigkeit und eine starke Korrelation in der Transkriptquantifizierung über ein Spektrum von RNA-

Eingabemengen. Die MACE-Technologie verwendet einzigartige Molekül-Identifikatoren (UMIs), um jedes Molekül vor der PCR zu markieren, was bei der Identifizierung von PCR-Duplikaten und Sequenzierungsfehlern hilft, was zu genaueren Daten führt.

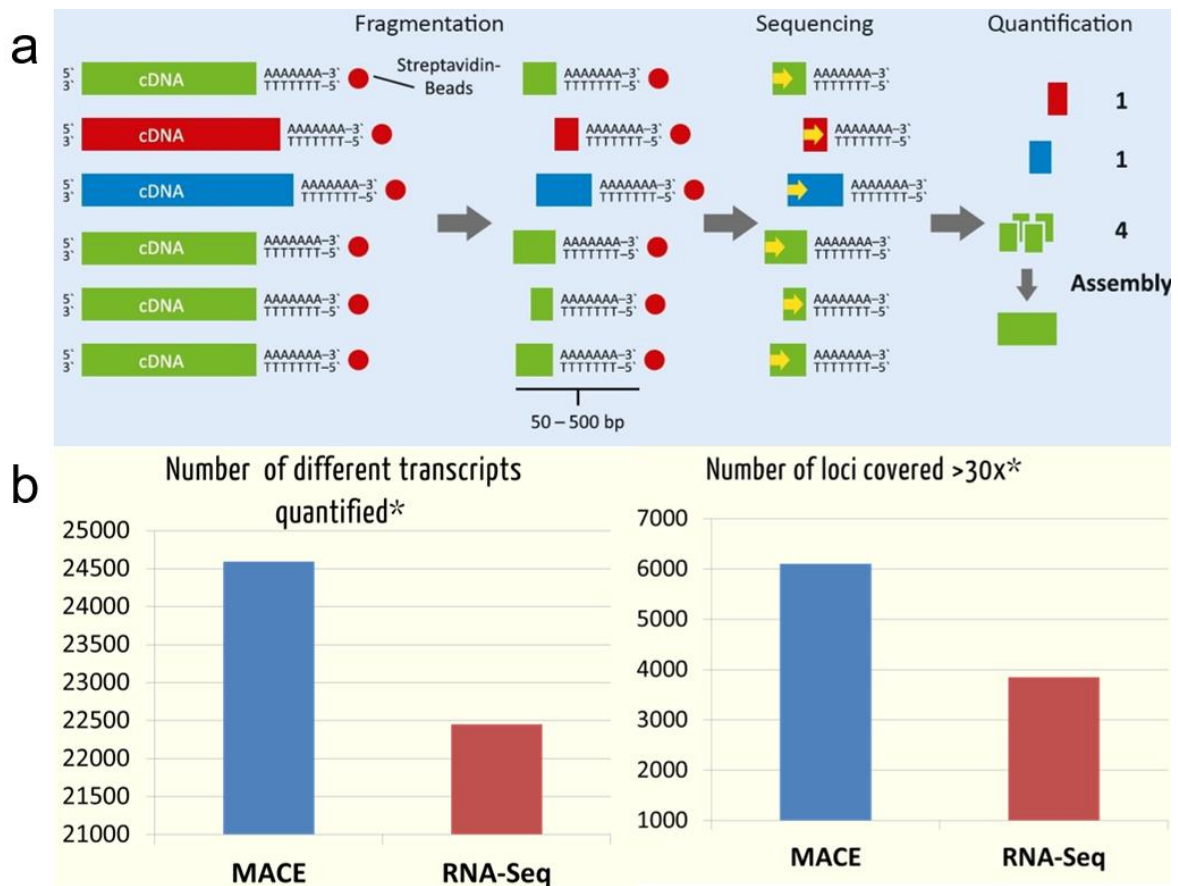


Abbildung 45 – Prinzip der Massive Analysis of cDNA-Ends (MACE) (a) und Sensitivität von MACE im Vergleich zu RNA-Seq hinsichtlich der Anzahl quantifizierter Transkripte und der abgedeckten Loci (b).

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Tabelle III stellt den vorläufigen zahlenmäßigen Nachweis. Die tatsächlichen Ausgaben werden mit dem zahlenmäßigen Verwendungsnachweis genau bestimmt.

Tabelle III: Vorläufiger Zahlenmäßiger Nachweis

	Zuwendung	Ausgaben
Personalkosten	138.358,17 €	140.956,74 €
Vergabe von Aufträge	29.000,00 €	26.358,50 €
Verbrauchsmaterial	76.327,56 €	90.572,09 €
Dienstreisen	21.033,00 €	6.988,88 €
Gegenstände 410€<Preis<800€	556,97 €	646,09 €
Gesamt	265.275,70 €	265.522,30 €

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Rahmen des Vorhabens SHAPE durchgeführten experimentellen und technologischen Arbeiten und die dafür eingesetzten Mittel entsprachen dem im Projektantrag formulierten Arbeitsplan und waren notwendig und angemessen, um die Aufgaben des Projekts zu bearbeiten. Alle wesentlichen Aufgaben, die im Arbeitsplan vorgesehen waren, wurden erfolgreich durchgeführt.

II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Schwerelosigkeit: ein Katalysator für Fortschritt

Die Entwicklung von Bioreaktoren für den Einsatz in der niedrigen Erdumlaufbahn (LEO) birgt das Potenzial, transformative Anwendungen für die Biotechnologie auf der Erde hervorzubringen. Die durch das SHAPE-Projekt erlangten Erkenntnisse werden mittelfristig essenzielle Designparameter bereitstellen, die für die Entwicklung von effizienteren Bioreaktoren entscheidend sind. Diese Bioreaktoren sollen für die biotechnologische Produktion von „engineered organs“ in großem Maßstab optimiert werden. Basierend auf den Experimenten des Vorhabens kann ein innovativer Workflow entwickelt werden, der Hyper- und Mikrogravitationsphasen geschickt kombiniert, um das Wachstum und die Differenzierung von Stammzellen gezielt zu verbessern. Langfristig zielt das Projekt darauf ab, neuartige Bioreaktor-Konzepte zu entwickeln, die diesen Workflow effektiv integrieren und automatisieren.

Darüber hinaus kann die weiterentwickelte Bioreaktortechnologie maßgeblich die klinische Anwendung von 3D-Zellkulturen sowie die biotechnologische Industrie beeinflussen. Die Verbindung zur Industrie wird durch langjährige Partnerschaften mit Unternehmen wie Lonza AG und Insphero (www.insphero.com) gefestigt, die in verschiedenen Projekten eng mit unserer Forschungsgruppe an der Universität Frankfurt zusammengearbeitet haben. Diese Kooperationen bilden eine Brücke zwischen akademischer Forschung und industrieller Anwendung, was den Transfer von Technologie und Wissen in praktische Anwendungen beschleunigt.

Die neue Weltraumwirtschaft: Technologien ermöglichen

Der Anstieg privater Investitionen in Weltraumaktivitäten (new space economy, neue Weltraumwirtschaft), hat die Interesse in der Entwicklung und den Einsatz von Bioreaktoren in der niedrigen Erdumlaufbahn (LEO) und auf dem Mond erheblich gestiegen. Unternehmen und Forschungseinrichtungen haben einen zunehmend vereinfachten Zugang zum Weltraum, begünstigt durch kommerzielle Startdienste und die Verfügbarkeit von modularen Weltraumplattformen zur Durchführung von Experimenten.

Diese Zugänglichkeit hat Innovationen in der Bioreaktortechnologie angeregt, wobei sich mehrere Start-ups und etablierte Firmen auf die biologische Herstellung im Weltraum konzentrieren. Diese Systeme können langfristige biologische Prozesse im Weltraum unterstützen, was sie ideal für die Produktion von Pharmazeutika, das Wachstum von Gewebe für die medizinische Forschung und sogar den Anbau von Nahrung für Astronauten auf Langzeitmissionen macht. Die aus dem SHAPE-Experiment gesammelten Daten, die mehr als zweitausend hBM-Sphäroide umfassen, sind entscheidend für die Entwicklung zukünftiger Zellfabriken im Weltraum.

II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die Untersuchung von Sphäroiden und Organoiden im Weltraum ermöglicht das Verständnis von Krebs und eröffnet neue Möglichkeiten für die regenerative Medizin. Bodenbasierte Simulationen der Mikrogravitation, wie sie mit einer Random Positioning Machine (RPM) durchgeführt werden, zeigen, dass diese Umgebung das Verhalten von Krebszellen erheblich beeinflussen kann, was zur Bildung von dreidimensionalen Sphäroiden aus 2D-adhärenenten Krebszellkulturen führt. Diese Sphäroide bieten ein relevanteres Modell für das Studium der komplexen Biologie des Organismus als traditionelle zweidimensionale Zellkulturen. Der Prozess beinhaltet das Ablösen einzelner Zellen aufgrund der Rotation und des Flüssigkeitsflusses, die durch die RPM induziert werden, gefolgt von ihrer Aggregation in 3D-Sphäroiden in Abwesenheit von Sedimentation, was einer Bedingung ähnlich der tatsächlichen Mikrogravitation ist (<https://doi.org/10.3390/cells12222665>).

Axiom Space hebt die Vorteile der Mikrogravitationsumgebung für die Bildung von Organoiden und Sphäroiden hervor (<https://www.axiomspace.com/research/organoids-spheroids>). In der Mikrogravitation proliferieren Stammzellen und Vorläuferzellen nicht nur effektiver, sondern behalten auch ihre Stammzelleneigenschaften effizienter bei. Diese Umgebung fördert die Zellinteraktion und die Verankerung aneinander, was die Entwicklung von dreidimensionalen Kulturen fördert, die größere und komplexere Zellcluster bilden. Solche Bedingungen sind ideal für die Optimierung der großangelegten Produktion von Organoiden und Sphäroiden für verschiedene Anwendungen, einschließlich Forschung, regenerative Medizin und präklinische

Tests von Arzneimittelkandidaten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Mikrogravitationsumgebung die Krebsausbreitung potenziell stören und den Zelltod induzieren kann, was neue Wege für die Krebsbehandlung bietet. Zusätzlich wurde die Organoidtechnologie in der Mikrogravitation genutzt, um die neuronale Entwicklung und Funktion zu studieren, mit Implikationen für das Verständnis von Bedingungen wie Autismus und psychiatrischen Störungen.

II.6 Veröffentlichungen der Ergebnisse

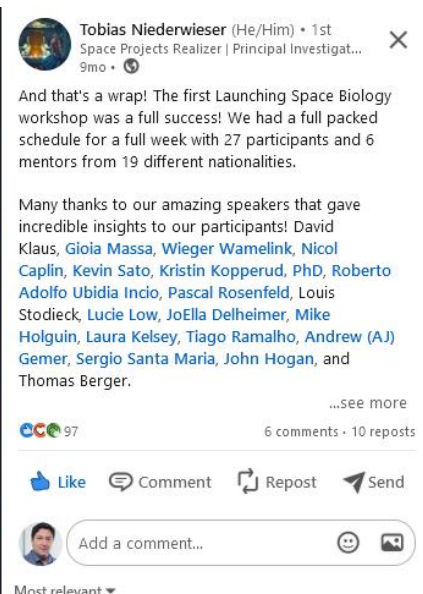
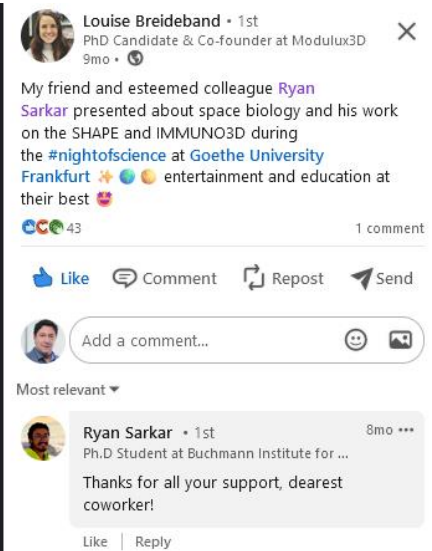
II.6.1 Publikationen

- Sarkar, Ryan, and Francesco Pampaloni. "In vitro models of bone marrow remodelling and immune dysfunction in space: Present state and future directions." *Biomedicines* 10.4 (2022): 766
- Cialdai, Francesca, et al. "How do gravity alterations affect animal and human systems at a cellular/tissue level?." *npj Microgravity* 9.1 (2023): 84.
- Davis, Trent, et al. "How are cell and tissue structure and function influenced by gravity and what are the gravity perception mechanisms?." *npj Microgravity* 10.1 (2024): 16.

II.6.2 Vorträge

(Die Vortragenden werden in den Klammern benannt)

- Gravimeeting, Erlangen 2019, 2020, 2021, 2022, 2023 (Francesco Pampaloni, Ryan Sarkar)
- SHAPE Mission Overview, Virginia Eastern Medical School, Norfolk, Virginia (USA), 2.11.2022 (Louise Breideband, Ryan Sarkar).
- SHAPE Mission debriefing, 13.12.2022, Goethe University Frankfurt, Campus Riedberg (Louise Breideband, Francesco Pampaloni, Ryan Sarkar)
- Launching Space Biology, 22.-26.05.2023, Boulder, Colorado (USA) (Ryan Sarkar)
- Night of Science 2023, 16.06.2023, Goethe University Frankfurt, Campus Riedberg. (Ryan Sarkar)
- Inspire, Connect, and Celebrate: Postdocs in the Rhein-Neckar Region, DKFZ Heidelberg, 20.09.2023 (Francesco Pampaloni)



II.6.3 Webauftritte

Das SHAPE Projekt ist auf folgenden Berichten, Pressemitteilungen, Webseiten und Podcasts vertreten:

- Pressemitteilung des DLR (4.11.2022):
<https://www.dlr.de/de/aktuelles/nachrichten/2022/04/cellbox-3-startet-mit-biomedizinischen-experimenten-zur-iss>
- Beschreibung des Experiments auf der Webseite der Firma Yuri GmbH:
<https://yurigravity.com/post/cellbox3-launched>
- WeltraumWagner: der Raumfahrt-Podcast · 25.10.2021 · 131 Min. (ARD Audiothek)
<https://www.ardaudiothek.de/episode/weltraumwagner-der-raumfahrt-podcast/cosmic-kiss-matthias-maurer-auf-der-iss/hr/94271400>

- Deutsche Welle, Wissenschaft, “Generalprobe für ISS-Experiment“ 05.11.2021
German: <https://p.dw.com/p/42dY4>
English: <https://p.dw.com/p/42ddG>

Francesco Pampaloni hat regelmäßig auf LinkedIn (<https://www.linkedin.com/in/francescopampaloni/>) und Twitter (@PampaLsfm4life) Beiträge veröffentlicht. Die Beiträge auf LinkedIn erreichten insgesamt 30958 *impressions*. Drei Videos, die verschiedene Momente der SHAPE-Mission zeigen, wurden produziert und veröffentlicht.

Verschiedene Screenshots, die LinkedIn-Beiträge zeigen, sind unten dargestellt.

The image shows a screenshot of a LinkedIn profile for Francesco Pampaloni. The profile header includes his name, title 'Tenured Staff Scientist at the Goethe University Frankfurt', and a follower count of 481. Below the profile, the 'All activity' section is visible, with tabs for Posts, Comments, Videos, Images, and Reactions. The 'Videos' tab is selected, showing three video posts. The first video, titled 'What a ride! After a 24h launch scrub, the Antares...', has a duration of 3:30 and 71 reactions. The second video, 'In the last two days, Louise Breideband and Ryan Sarkar...', has a duration of 1:28 and 55 reactions. The third video, '21 days to lift off. SHAPE team's Louise Breideband a...', has a duration of 0:07 and 58 reactions. Each video post includes a thumbnail image and a caption with a truncated title.



Francesco Pampaloni (He/Him) • You
Tenured Staff Scientist at the Goethe University Frankfurt.
1yr • 🔒



21 days to lift off. SHAPE team's [Louise Breideband](#) and [Ryan Sarkar](#) fly tomorrow to Norfolk, Virginia. There, they will grow hundreds of bone marrow spheroids for our SHAPE experiment on the International Space Station. I can't wait to join them next week!



Olivia Nilsson and 57 others

3 reposts

Reactions



Like

Comment

Repost

Send

2,999 impressions

[View analytics](#)



Francesco Pampaloni (He/Him) • You
 Tenured Staff Scientist at the Goethe University Frankfurt.
 1yr • 🌐



In the last two days, [Louise Breideband](#) and [Ryan Sarkar](#) of the [Goethe University #SHAPE](#) team worked incredibly hard to culture the bone marrow spheroids, transfer them in the agarose hydrowells, and integrate all in the [#ScienceShells](#) from [yuri](#). Look the video below to get a feeling of how complex it was! A special thank to [Dennis Balasus](#) and [Lukas Trautwein](#) from [yuri](#) for their supervision and support during the assembly of the [#ScienceShells](#). In a few hours, [Tobias Niederwieser](#) from [BioServe Space Technologies](#) will transfer our samples to the [#NASA](#) launch site at Wallops Flight Facility. From there, on next Sunday a Cygnus NG-18 cargo spacecraft will transfer the spheroids to the [#ISS](#). Thank to all the people who are making this possible and particularly to the [German Aerospace Center \(DLR\)](#)! [#cellbox3](#) [#spacebiology](#)



Hitikk Chawla and 54 others 1 comment • 5 reposts

Reactions



Like Comment Repost Send

2,721 impressions [View analytics](#)



Francesco Pampaloni (He/Him) • You
Tenured Staff Scientist at the Goethe University Frankfurt.
1yr •



What a ride! After a 24h launch scrub, the Antares rocket carrying the S.S. Sally Ride Cygnus spacecraft with our [Goethe University #SHAPE](#) experiment aboard finally launched from NASA's Wallops Flight Facility. It was a breathtaking experience. I will never forget the roar of the rocket and the great feeling of accomplishment shared with my colleagues: #SHAPE's [Louise Breideband](#), [Ryan Sarkar](#), #NEMUCO's [Michele Salanova](#), [Katharina Block](#), Gabor T., yuri's [Dennis Balasus](#), [Lukas Trautwein](#), [Maria Birlem](#), [Christian Bruderrek](#), [Daniela Bezdán](#), [BioServe Space Technologies's Tobias Niederwieser](#), [German Aerospace Center \(DLR\)'s Dr. Michael Becker](#) and [Joachim Lenic](#). Thank you all for these unforgettable experience!



Julia Eckert and 70 others

10 comments • 7 reposts

Reactions



Like

Comment

Repost


Send

4,361 impressions

[View analytics](#)



Francesco Pampaloni (He/Him) • You
Tenured Staff Scientist at the Goethe University ...
1yr • 🌐

Our cells (human mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells) for the [#SHAPE Goethe University Frankfurt](#) experiment are happily growing, carefully nurtured by [Ryan Sarkar](#) (can you see his ghostly  mirror image?). In a few days, the cells will be homed in the hydrowells and launched into space! [#spacebiology](#) [#Cellbox3](#) [#ISS](#)

👥 Núria Torras and 52 others 1 comment

👍 Like 💬 Comment 🔄 Repost ✉️ Send

📊 2,377 impressions 🔍 View analytics

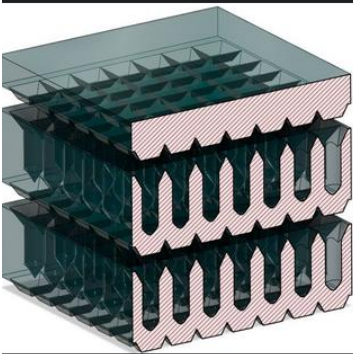
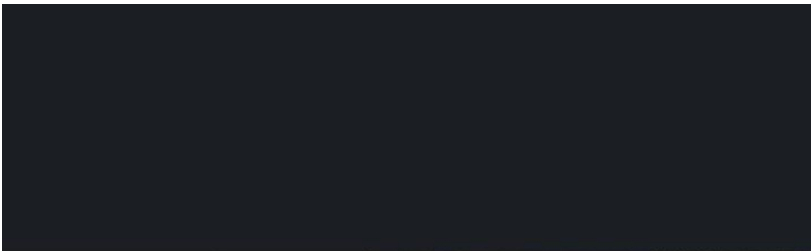
 Add a comment...  

Most relevant ▾

 **Dr. Sanam Saeifar** • 1st
PhD in Cell biology and Physiology, Clinical ...
1y ...

Well done 👏 🎯 🍀

Like | Reply



Francesco Pampaloni (He/Him) • You
Tenured Staff Scientist at the Goethe University ...
1yr • 🌐

[Louise Breideband](#) and [Ryan Sarkar](#) mass-produce agarose hydrowells with 3D-printed molds. Each hydrowell has 70 mini-wells, each one tiny home of one bone marrow spheroid. 2 stacked hydrowells = 140 spheroids x 2 chambers = 280 spheroids/unit. We have 11 units = 3080 spheroids for the [#SHAPE](#) experiment! We specifically designed the hydrowells to have each bone marrow spheroid spatially separated from the others to prevent uncontrolled aggregation. The spheroids have a homogeneous size. The large number of specimens and the size uniformity ensure robust statistics and improve the reliability and reproducibility of the data we will obtain from [#SHAPE](#) [#spacebiology](#)

👥 Jose Luis Cortes Sanchez and 19 others 2 comments

👍 Like 💬 Comment 🔄 Repost ✉️ Send

📊 1,188 impressions 🔍 View analytics

 Add a comment...  

Most relevant ▾

 **Dr. Benedikt Linder** • 1st
Scientist
1y ...

very cool stuff, Francesco. Keep us in the loop!

Like | Reply · 1 Reply

 **Francesco Pampaloni**
(He/Him) **Author**
Tenured Staff Scientist at the Goeth...



Francesco Pampaloni (He/Him) • You
Tenured Staff Scientist at the Goethe University ...
1yr • 🌐

It was a honour to present the [Goethe University Frankfurt #SHAPE](#) project to the audience of Waitzer Hall at [Eastern Virginia Medical School](#) in Norfolk. 4 days to go to the launch of our [#SHAPE #Cellbox3](#) experiment onboard [Cygnus NG-18](#)! Thanks to [German Aerospace Center \(DLR\)](#), [Yuri](#), [BioServe Space Technologies](#) for the support. [#spacebiology](#) [#spacecience](#)

👍❤️ Berit Reinhardt and 50 others 3 comments · 3 reposts

👍 Like 💬 Comment 🔄 Repost ➦ Send

📊 2,601 impressions [View analytics](#)

Add a comment...

Most relevant ▾

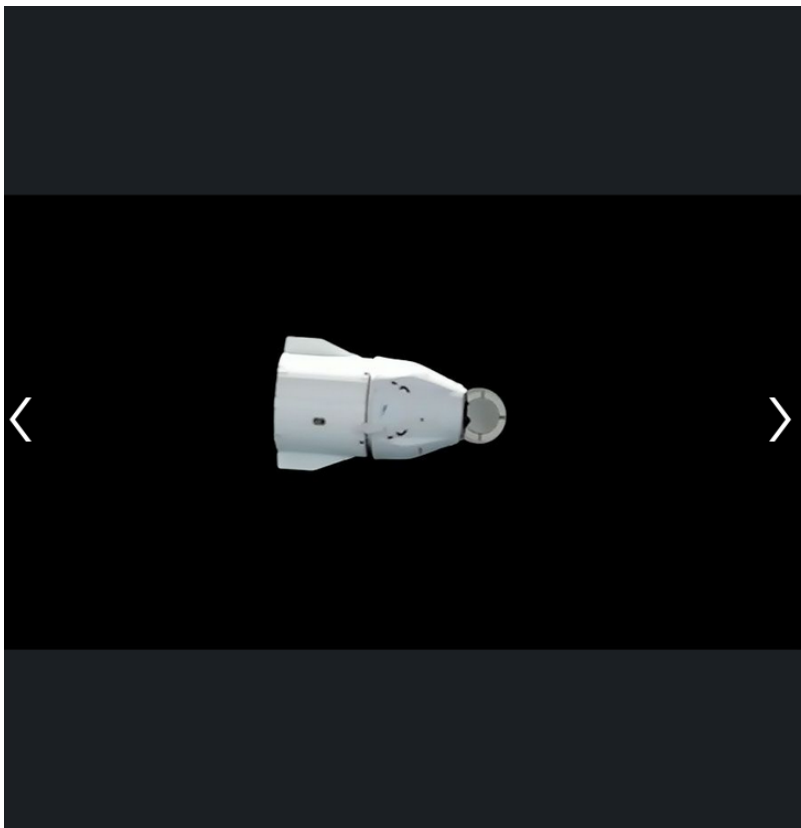
Benjamin Mayer • 1st 1y ***
Wissenschaftler
Congratulations! What an exciting journey! 🎉

Like | Reply · 1 Reply

Francesco Pampaloni (He/Him) **Author** 1y ***
Tenured Staff Scientist at the Goeth...
Thank you Benjamin!

Like | Reply

Dr. Sanam Saeifar • 1st 1y ***
PhD in Cell biology and Physiology, Clinical ...



Francesco Pampaloni (He/Him) • You
Tenured Staff Scientist at the Goethe University ...
1yr • 🌐

[SpaceX-X Dragon CRS-26](#) with our [#SHAPE](#) human bone marrow spheroids departed yesterday at 22:45 CET the International Space Station. Splashdown is about 36 hours later, on January 11th. Our specimens will be back in our lab at [Goethe University Frankfurt](#) on January 14th, after two months on the ISS. I and my colleagues [Louise Breideband](#) and [Ryan Sarkar](#) are looking forward to opening the experimental unit and analyzing the effects of spaceflight on the human innate immune system! Thanks to the [German Aerospace Center \(DLR\)](#), [Yuri](#), and [BioServe Space Technologies](#).

👍👍👍 Aayush Marishi and 51 others 8 comments · 1 repost

👍 Like 💬 Comment 🔄 Repost ➦ Send

📊 2,770 impressions [View analytics](#)

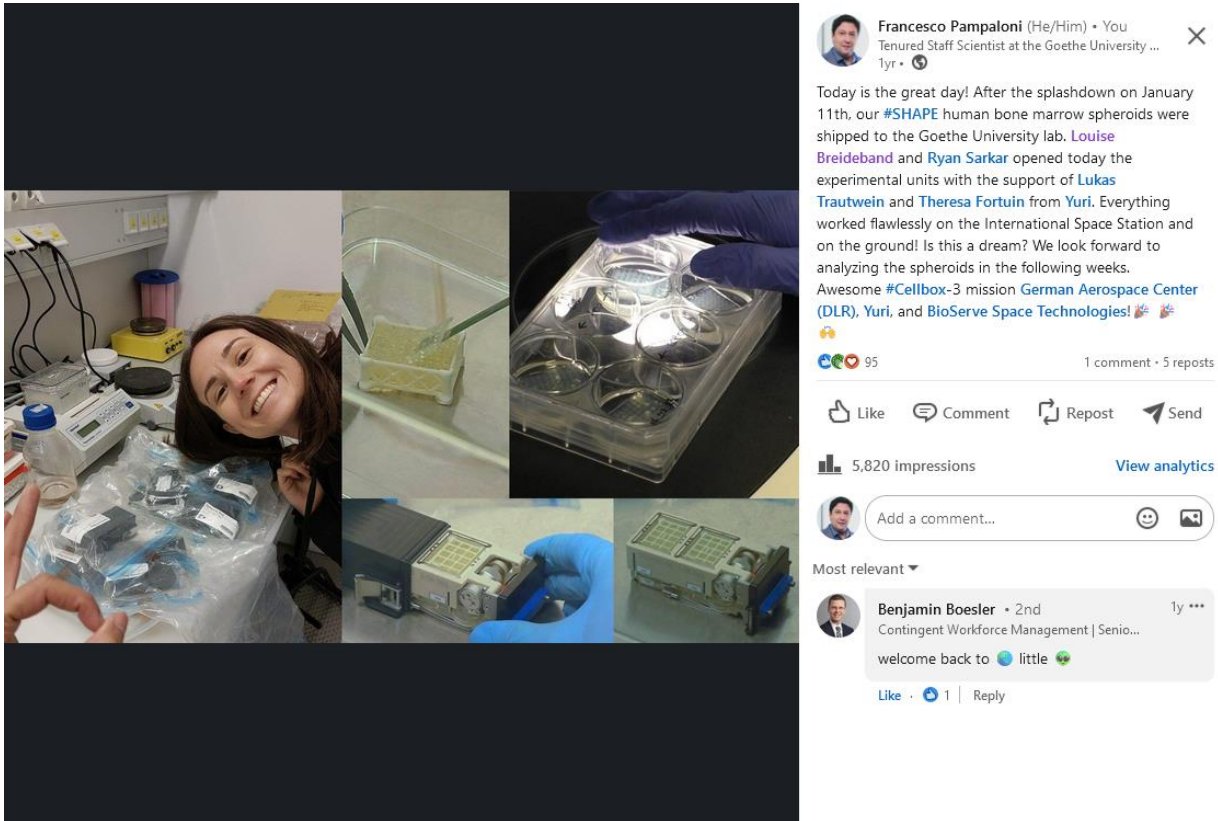
Add a comment...

Most relevant ▾

Dr. Aviseka Acharya • 1st 1y ***
MSAT Scientist | Personalized Medicine | Ai/...
Congratulations

Like · 🌐 1 | Reply · 1 Reply

Francesco Pampaloni (He/Him) **Author** 1y ***
Tenured Staff Scientist at the Goeth...
Thank you!



III. Erfolgskontrollbericht (nicht öffentlich)

Der Erfolgskontrollbericht liegt dem Projektträger als separate Anlage vor.

IV. Kurzfassung

Das SHAPE-Projekt darauf abzielte, die Auswirkungen der Mikrogravitation auf das menschliche Knochenmark und das Immunsystem zu untersuchen. Durch die Nutzung der einzigartigen Bedingungen der Internationalen Raumstation (ISS) bot das Projekt wertvolle Einblicke in die zellulären und molekularen Veränderungen, die unter Schwerelosigkeit auftreten. Die Forschung konzentrierte sich auf die Kultivierung und Analyse von menschlichen Knochenmark-Sphäroiden (hBM-Sphäroiden) unter realen und simulierten Mikrogravitationsbedingungen sowie unter Standard-Erdgravitation (1g).

Während der Mission wurden insgesamt 2.520 hBM-Sphäroide in speziell entworfenen Agarose-Hydrowells kultiviert, die eine optimale Umgebung für das Wachstum dreidimensionaler Zellsysteme boten. Diese Sphäroide wurden einer bis zu 120 Stunden andauernden echten Mikrogravitation während einer Raumfahrtmission ausgesetzt. Die morphologische Analyse der zurückgekehrten Proben enthüllte signifikante Unterschiede in der Zellmorphologie, insbesondere eine gelockerte Zellverteilung in der echten Mikrogravitation, was auf eine Beeinflussung der Zelladhäsionsmechanismen durch die Schwerelosigkeit hindeutet.

Darüber hinaus wurde eine umfassende Genexpressionsanalyse durchgeführt, um die molekularen Veränderungen unter Mikrogravitation zu verstehen. Die RNA-Analyse wurde mit der fortgeschrittenen Technik der Massive Analysis of cDNA-Ends (MACE) durchgeführt, die eine präzise Quantifizierung von Transkripten ermöglicht und mehrere Vorteile gegenüber herkömmlichen RNA-Seq-Methoden bietet.

Die Ergebnisse dieses Projekts haben bedeutende Implikationen für das Verständnis des Stammzellverhaltens im Weltraum und bieten das Potenzial für Anwendungen im Bereich des Tissue Engineerings und der regenerativen Medizin außerhalb der Erdoberfläche. Die Forschung unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Studien in dieser Richtung, um die Möglichkeiten der Weltraummedizin und -biotechnologie voll auszuschöpfen.

Zusätzlich zur wissenschaftlichen Forschung wurde das Projekt durch eine aktive Kommunikationsstrategie unterstützt, die regelmäßige Beiträge auf LinkedIn und Twitter sowie die Produktion und Veröffentlichung von drei Videos, die verschiedene Momente der SHAPE-Mission hervorheben, umfasste. Diese Bemühungen trugen zur Sensibilisierung und Verbreitung der erzielten Fortschritte und Ergebnisse bei.

Overview

The SHAPE project was aimed at investigating the effects of microgravity on human bone marrow and the immune system. Utilizing the unique conditions of the International Space Station (ISS), the project provided valuable insights into the cellular and molecular changes occurring under weightlessness. The research focused on the cultivation and analysis of human bone marrow spheroids (hBM spheroids) under real and simulated microgravity conditions as well as under standard Earth gravity (1g).

Throughout the mission, a total of 2,520 hBM spheroids were cultivated in specially designed agarose hydrogels, providing an optimal environment for the growth of three-dimensional cell systems. These spheroids were exposed to real microgravity for up to 120 hours during a space mission. Morphological analysis of the returned samples revealed significant differences in cell morphology, particularly a looser cell distribution in real microgravity, suggesting an influence of weightlessness on cell adhesion mechanisms.

Furthermore, a comprehensive gene expression analysis was conducted to understand the molecular changes under microgravity. The RNA analysis was performed using the advanced Massive Analysis of cDNA-Ends (MACE) technique, which allows for precise quantification of transcripts and offers several advantages over traditional RNA-Seq methods.

The results of this project have significant implications for understanding stem cell behavior in space and offer potential applications in the field of tissue engineering and regenerative medicine outside the Earth's environment. The research underscores the need for further studies in this direction to fully exploit the possibilities of space medicine and biotechnology.

In addition to scientific research, the project was supported by an active communication strategy, including regular posts on LinkedIn and Twitter, and the production and publication of three videos highlighting different moments of the SHAPE mission. These efforts contributed to raising awareness and disseminating the progress and results achieved.

Overall, the IMMUNO3D-SHAPE project represents a significant advancement in understanding the effects of microgravity on human cells and tissues, laying the groundwork for future research in this exciting and innovative field of science.