

**Analysen zur Stabilität und Degradation biogener Substanzen sowie
zum Resistenzpotential der Flechte *Buellia frigida* unter simulierten
Marsbedingungen und Exposition im LEO-Weltraum**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Theresa Backhaus
aus Haltern

Düsseldorf, März 2019

Institut für Botanik

Symbiotische Interaktionen

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Gutachterin: Apl. Prof. Dr. Sieglinde Ott (HHU, Düsseldorf, D)

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. William F. Martin (HHU, Düsseldorf, D)

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2019

I Einleitung	1
II Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Die Flechte <i>Buellia frigida</i> aus der Antarktis	14
2.1.2 BIOMEX Flechtenproben	15
2.1.3 Biogene Substanzen	17
2.2 Methoden	20
2.2.1 Weltraum-Exposition auf der ISS	20
2.2.2 Mission Ground Reference	24
2.2.3 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)	26
2.2.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	26
2.2.5 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Technik	27
2.2.6 Konfokale Laser Mikroskopie	29
2.2.6.1 LIVE/DEAD Färbung mit FUN [®] 1	30
2.2.6.2 LIVE/DEAD Färbung mit SYTO [®] 9/Propidiumjodid	31
2.2.7 Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz Messungen	31
2.2.8 Kulturversuche der Symbiose-Partner	32
2.2.9 Sporulationsversuche	34
2.2.10 Raman-Spektroskopie biogener Substanzen	35
2.2.11 Bestrahlungsversuch mit monochromatischem UV-C _{254nm}	39
III Ergebnisse	40
3.1 Anatomische Veränderungen (REM)	40
3.2 Ultrastrukturelle Veränderungen (TEM)	41
3.3 DNA Integrität	44
3.4 Vitalität nach LIVE/DEAD Färbung	46
3.5 Photosynthetische Aktivität	49
3.6 Kultivierung der Symbiose-Partner	51
3.7 Sporulationsfähigkeit	52

Inhaltsverzeichnis

3.8 Biogene Substanzen	53
3.9 Mission Ground Reference und Transportkontrolle	55
3.9.1 Ultrastrukturelle Veränderungen (TEM)	55
3.9.2 DNA Integrität	56
3.9.3 Vitalität nach LIVE/DEAD Färbung	58
3.9.4 Photosynthetische Aktivität	60
3.9.5 Kultivierung der Symbiose-Partner	61
3.9.6 Sporulationsfähigkeit	61
3.10 Photosynthetische Aktivität nach UV-C _{254nm}	62
IV Diskussion	64
4.1 Morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen	66
4.2 DNA Integrität	67
4.3 Vitalität nach LIVE/DEAD Färbung	68
4.4 Photosynthetische Aktivität	69
4.5. Kultivierbarkeit und Sporulationsfähigkeit der Symbionten	70
4.6 Methodische Beurteilung des Vitalitätszustands von Flechten	72
4.7 Vergleich zum LIFE Experiment	73
4.8 Nachweisbarkeit biogener Substanzen mittels Raman-Spektroskopie	74
4.9 Mission Ground Reference	77
4.10 Transportkontrolle	78
V Zusammenfassung	79
VI Summary	81
VII Literaturverzeichnis	83
VIII Anhang	100
IX Publikationen	116
8.1 Characterization of viability of the lichen <i>Buellia frigida</i> after 1.5 years in space on the International Space Station (Astrobiology)	116

Inhaltsverzeichnis

8.2 DNA damage of the lichen <i>Buellia frigida</i> after 1.5 years in space using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique (under review, Planetary & Space Science)	126
8.3 Results of BIOMEX: Effects on growth and ultrastructure of the lichen <i>Buellia frigida</i> and its symbionts (in prep.)	145
8.4 Chlorophyll <i>a</i> fluorescence of the lichen <i>Buellia frigida</i> after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. (in prep.)	166
X Danksagung	168
XI Eidesstattliche Erklärung	170

Publikationen:

- 2019 **Backhaus T**, Meeßen J, Demets R, de Vera J P, Ott S: Characterisation of viability of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in space on the International Space Station. *Astrobiology* 19(2), 233-241.
- 2019 de Vera J P, Alawi M, **Backhaus T**, Baqué M, Billi D, Böttger U, Berger T, Bohmeier M, Cockell C, Demets R, de la Torre Noetzel R, Edwards H, Elsaesser A, Fagliarone C, Fiedler A, Foing B, Foucher F, Fritz J, Hanke F, Herzog T, Horneck G, Hübers H W, Huwe B, Joshi J, Kozyrovska N, Kruchten M, Lasch P, Lee N, Leuko S, Leya T, Lorek A, Martínez-Frías J, Meeßen J, Moritz S, , Moeller R, Olsson-Francis K, Onofri S, Ott S, Pacelli C, Podolich O, Rabbow E, Reitz G, Rettberg P, Reva O, Rothschild L, Sancho L G, Schulze-Makuch D, Selbmann L, Serrano P, Szewzyk U, Verseux C, Wadsworth J, Wagner D, Westall F, Wolter D, Zucconi L: Limits of life and the habitability of Mars: The ESA space experiment BIOMEX on the ISS. *Astrobiology* 19(2), 145-157.
- 2019 **Backhaus T**, Meeßen J, Demets R, de Vera J P, Ott S: DNA damage of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in Space using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. *Planetary and space science* (under review).
- 2019 **Backhaus T**, Meeßen J, Demets R, de Vera J P, Ott S: Results of BIOMEX: Effects on growth and ultrastructure of the lichen *Buellia frigida* and its symbionts after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. (in prep.).
- 2019 **Backhaus T**, Meeßen J, Demets R, de Vera J P, Ott S: Chlorophyll *a* fluorescence of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. (in prep.).
- 2019 de la Torre Noetzel R, Ortega García MV, Miller AZ, Bassy O, Granja C, Cuber, B, Jordão L, Martínez Frías J, Rabbow E, **Backhaus T**, Ott S, Sancho LG, de Vera JP: Lichens survive on board the EXPOSE-R2 facility outside the ISS: Results of the BIOMEX Experiment. *Astrobiology* (under review).
- 2017 Meeßen J, **Backhaus T**, Brandt A, Raguse M, Böttger U, de Vera J P, de la Torre R: The effect of high-dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiology* 17(2), 154-162.

- 2015 **Backhaus T.**, de la Torre R., Lyhme K., de Vera J. P., Meeßen J.: Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC_{254nm} in the photobiont of the astrobiologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. *International Journal of Astrobiology* 14(3), 479-488.
- 2014 Meeßen J, **Backhaus T**, Sadowsky A, Mrjali M, Sánchez FJ, de la Torre R, Ott S: Effects of UVC_{254 nm} on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. *International Journal of Astrobiology* 13(4), 340-352.

Vorträge:

- 03/2019 Ott, S, **Backhaus, T**: BIOMEX – final results of analysis of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years space exposure. Final BIOMEX meeting, Berlin
- 06/2018 **Backhaus T**, Ott S: Allgemeine Einführung in die Astrobiologie. Seminar-Vortrag, HHU Düsseldorf
- 12/2017 **Backhaus T**, Ott S: Ergebnisse aus dem BIOMEX Projekt, Kurs-Vortrag, HHU Düsseldorf
- 06/2017 **Backhaus T**, Ott S: Allgemeine Einführung in die Astrobiologie. Seminar-Vortrag, HHU Düsseldorf
- 12/2016 **Backhaus T**, Ott S: Vorstellung des BIOMEX Projekts- Flechten im Weltraum. Kurs-Vortrag, HHU Düsseldorf
- 06/2016 **Backhaus T**, Ott S: Allgemeine Einführung in die Astrobiologie. Seminar-Vortrag, HHU Düsseldorf
- 05/2016 **Backhaus T**, Ott S: Methods and techniques envisaged for the analysis of the returning BIOMEX samples. BIOMEX Meeting, Rom
- 05/2016 Meeßen J, **Backhaus T**, Ott S: Lessons learned from STARLIFE: new momentum and new techniques to analyze the BIOMEX samples. BIOMEX Meeting, Rom
- 10/2014 Meeßen J, **Backhaus T**, Mrkalj M, Schürmann F, de la Torre R, de Vera J P, Ott S: UVC-induced photodamage and its attenuation by co-occurring stressors in photobionts of the astrobiological model lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. EANA Konferenz, Edinburgh (GB)

Poster-Präsentationen:

- 09/2018 **Backhaus T**, Meeßen J, Demets R, de Vera J P, Ott S: BIOMEX: Post-flight viability of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years of space exposure. EANA (European Astrobiology Network Association) Konferenz, Berlin (DE)
- 11/2017 **Backhaus T**, Meeßen J, de Vera J P, Ott S: Preliminary results of the analysis of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years of space exposure during the BIOMEX project DAbG (Deutsche Astrobiologische Gesellschaft e.V.) Konferenz, Potsdam (DE)
- 08/2017 **Backhaus T**, Meeßen J, de Vera J P, Ott S: Preliminary results of the analysis of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years of space exposure during the BIOMEX project. EANA Konferenz, Aarhus (DK) (mit Auszeichnung)
- 2015 Meeßen J, Brandt A, **Backhaus T**, Ott S, Jänicke R U, de la Torre R, de Vera J P, Raguse M, Okayasu R, Moeller R: The effect of high-dose ionizing radiation on two astrobiological models: the lichen *Xanthoria elegans* and the isolated photobiont of *Circinaria gyrosa*. EANA Konferenz, Noordwijk (NL)
- 2015 Meeßen J, **Backhaus T**, de la Torre R, Ott S, Möller R: STARLIFE - Death by ionizing radiation of isolated algae of *Circinaria gyrosa*. DLR Meeting, Köln (D)
- 2014 Meeßen J, **Backhaus T**, Mrjalj M, Schürmann F, de la Torre R, de Vera J P, Ott S: Effect of UVC_{254nm} on DNA-integrity, protein and pigment content as well as photosynthetic activity in photobionts of *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. EANA Konferenz, Edingburgh (GB)
- 2013 Meeßen J, **Backhaus T**, de la Torre R, Moeller R, Ott S: The effect of extraterrestrial stressors on isolated photobionts of two astrobiological model lichens, *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. International Symbiosis Society Congress, Lissabon (PT)

Akronyme und Abkürzungen

CLSM	Confocal laser scanning microscopy/konfokale Laser Mikroskopie
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESA	European Space Agency, europäische Weltraumorganisation
Gy	Gray, SI-Maßeinheit für absorbierte Dosis ionisierender Strahlung (J/kg)
ISS	International Space Station/internationale Raumstation
LEO	low earth orbit, erdnahe Umgebung/Umlaufbahn, 300 bis 1500km über der Erdoberfläche
MB	Mycobiont
MGR	Mission Ground Reference, Simulation der EXPOSE Weltraumexperimente im DLR Köln während des BIOMEX Projekts
PB	Photobiont
PSII	Photosystem II
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TOM	<i>Trebouxia</i> Organic Medium
UV	Ultraviolette Strahlung

I Einleitung

Der Begriff der Symbiose (altgr. syn/sym "zusammen" und bios "Leben") wurde erstmals im Jahr 1879 von Heinrich Anton de Bary verwendet, als er erkannte, dass interspezifische Interaktionen zwischen zwei Arten ein eigenständiges biologisches Konzept darstellen. Er definierte den Begriff als Zusammenleben zweier ungleichnamiger Arten (de Bary 1879). Diese sehr weit gefasste Definition beinhaltet verschiedene mögliche Ausprägungen einer Symbiose:

- den Mutualismus (Symbiose zu beiderseitigem Nutzen),
- den Parasitismus (Symbiose zum Nutzen des einen und zum Schaden des anderen)
- und den Kommensalismus (Symbiose zum Nutzen eines Partners, ohne Auswirkungen auf den zweiten Partner) (Zook 2010; Piekarski 2013).

Symbiosen sind im Laufe der Evolutionsgeschichte mehrfach unabhängig voneinander entstanden und stellen eine bedeutende Anpassungsstrategie an die Umwelt dar. Durch die Bildung von Symbiosen wird die Besiedlung freier Nischen und damit die Nutzung neuer Ressourcen ermöglicht (Braus 2010). Symbiotische Lebensformen können von vielen Organismengruppen gebildet werden, beispielsweise durch die Vergesellschaftung von Bakterien der Familie Rhizobiaceae mit Leguminosen (Hülsenfrüchtler) (zwecks N₂-Fixierung) oder von Cyanobakterien mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz Geosiphon (Gehrig *et al.* 1996). Der Mykorrhizapilz ist darüber hinaus bekannt für symbiotische Interaktionen mit den Wurzeln von Landpflanzen (Giovanetti 2002; Duplessis *et al.* 2002; Saarschmidt *et al.* 2009).

Die Symbiose zwischen heterotrophen Pilzen (Mycobionten, MB) und autotrophen Algen und/oder Cyanobakterien (Photobionten, PB) wird als Flechtensymbiose bezeichnet. Sie ist eine seit ca. 415 Mio. Jahren erfolgreiche Assoziation (Honegger 2018), die durch 16.000 bis 20.000 Arten weltweit verbreitet ist (Hawksworth 1988; Henssen & Jahns 1974; Honegger 1998; Øvstedal & Smith 2001). Durch die symbiotische Assoziation von Pilz und Alge entsteht ein neuer, hoch differenzierter Phänotyp, der weder dem isolierten PB noch dem isolierten MB in seiner Form und Struktur ähnelt. Der symbiotische Flechtenorganismus weist emergente physiologische Eigenschaften auf (Honegger 1991). Die symbiotische Interaktion dieser beiden Organismen ergibt Vorteile für beide Symbionten. Der MB dient dem PB als Schutz vor Umwelteinflüssen (z.B. zu starker Sonneneinstrahlung), wohingegen der PB durch erzeugte Photosyntheseprodukte (Ribitol, Glucose) dem MB als Nährstofflieferant dient (Henssen & Jahns 1974).

Etwa 99% der MB aller (bekannten) Flechtenarten gehören zu den Ascomyceten (Schlauchpilzen), während der deutlich kleinere Anteil durch Basidiomyceten (Ständerpilzen) ausgemacht wird (Henssen & Jahns 1974; Ott & Lumbsch 2001). Der Photobiont stammt aus verschiedenen Verwandtschaftsgruppen der eukaryotischen Chlorophyta (Grünalgen) oder der prokaryotischen Cyanobakterien (Henssen & Jahns 1974). Der häufigste Vertreter der Grünalgen-Partner, der in Flechtensymbiosen zu finden ist, gehört zur Gattung *Trebouxia* (Henssen & Jahns 1974).

Aufgrund des hohen Alters der Flechtensymbiose kann ein besonderer evolutiver Erfolg postuliert werden. Evolutive Prozesse sind in starkem Ausmaß von Umweltbedingungen beeinflusst, durch die ein Selektionsdruck auf Organismen wirkt (Darwin 1859). Die Flechtensymbiose war über einen Zeitraum von 415 Mio. Jahren (Honegger 2018) wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt. Aufgrund der Anpassungen an diverse Lebensraumbedingungen weisen Flechten heute eine große morphologische und anatomische Vielfalt auf (Jahns 1988; Büdel & Scheidegger 1996). Neben der Integration unterschiedlicher Symbionten in verschiedenen Flechtenarten (Henssen & Jahns 1974) existieren auch diverse morphologische Anpassungen, beispielsweise verschiedene Thallus-Wuchsformen (krustenförmig, blattförmig, strauchförmig). Vom Mycobionten werden unterschiedlich gestaltete Fruchtkörper (dienen der sexuellen Vermehrung des MB) gebildet. Abhängig von der Gestalt und Bauweise werden insgesamt vier Typen unterschieden:

- Apothecien (offene Fruchtkörper, meist becher- oder scheibenförmig)
- Peritheccien (geschlossene Fruchtkörper, Öffnung in einem Punkt, birnenförmig)
- Hysterothecien (lang gestreckte Fruchtkörper)
- Cleistothecien (vollkommen geschlossen, bei Flechten sehr selten)

Die PB vermehren sich im Gegensatz zum MB ausschließlich asexuell durch die Bildung von Autosporen (Henssen & Jahns 1974; Lange & Kappen 1972; Kappen & Friedmann 1983; Schroeter & Scheidegger 1995; Kappen 2000). Neben der Vermehrung der einzelnen Symbionten ist auch die Verbreitung des gesamten Flechtenorganismus durch die Bildung asexueller Verbreitungsstrukturen möglich, beispielsweise über die Bildung von Soredien oder durch die Fragmentation des Thallus (Henssen & Jahns 1974; Hestmark 1991; Honegger 1993; Ott 1987; Ott *et al.* 1993; Jahns & Ott 1997). Eine Vermehrungsstrategie, die beide Symbionten gemeinsam verbreitet, bietet besonders bei der Besiedlung extremer Standorte einen offensichtlichen Vorteil: Die Symbionten stehen

sich für die Bildung einer neuen Assoziation gegenseitig direkt zur Verfügung (Henssen & Jahns 1974).

Je nach Verteilung der PB im Thallus wird zwischen heteromeren und homöomeren Flechten unterschieden. Bei den homöomeren Flechten liegen die Photobiontenzellen nahezu regellos verstreut im gesamten Thallus verteilt. Bei heteromeren Flechten ist die Verteilung der Photobiontenzellen auf eine klar definierte und begrenzte Zone (Algenschicht) beschränkt. Neben der Algenschicht ist bei heteromeren Flechten auch eine Marksicht (oder Medulla) zu finden, die ausschließlich durch Pilzhyphen gebildet wird (Henssen & Jahns 1974). Nach außen hin sind einige Flechten durch eine Rinde begrenzt, die aus dicht verwachsenen Hyphenzellen besteht und dem Thallus als Schutz dient (Henssen & Jahns 1974).

Flechtensymbiosen zeichnen sich durch die Entwicklung verschiedener Synthesewege aus, die zur Produktion von einer vielfältigen Reihe von sekundären Flechteninhaltsstoffen führen (Huneck & Yoshimura 1996; de Vera *et al.* 2004). Einige dieser Stoffe fungieren als fundamentaler Schutz gegenüber überschüssigem photosynthetisch aktiven Licht oder gegen UV-Strahlung, da sie dazu in der Lage sind verschiedene Wellenlängen im UV-B und -C Bereich zu absorbieren (Solhaug & Gauslaa 1996; Quilhot *et al.* 1996; Holder *et al.* 2000; Nybakken *et al.* 2004; Kranner *et al.* 2005).

Durch die Vielzahl adaptiver Merkmale der Flechten und ihrer Symbionten erhöht sich das Resistenzpotential dieser Organismen gegenüber verschiedenen Umweltbedingungen (Lange *et al.* 2001). Als Grund für das hohe Resistenzpotential von Flechten, das bereits in zahlreichen Studien untersucht worden ist, werden vor allem die mutualistische, symbiotische und poikilohydre Lebensweise dieser Organismen genannt (Lange 1954, 1969; Kappen *et al.* 1996; de Vera *et al.* 2003, 2004a, 2004b, 2008, 2010, 2014; de la Torre Noetzel *et al.* 2007; Sancho *et al.* 2007; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008; de la Torre *et al.* 2010; de Vera & Ott 2010; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012; Sánchez *et al.* 2012, 2014; Scalzi *et al.* 2012; Meeßen *et al.* 2014a; Backhaus *et al.* 2014; Brandt *et al.* 2015). Poikilohydrie bezeichnet einen durch Wassermangel erzwungenen Zustand, der zur Einstellung sämtlicher metabolischer Prozesse im Organismus führt. Im poikilohydrischen Zustand können Flechten extreme Bedingungen überdauern (Honegger 1991). Studien haben gezeigt, dass Flechten im trockenen Zustand in der Lage sind, Temperaturen von -20°C für mindestens 13 Jahre zu überdauern (Honegger 2003). Die Fähigkeit zur Anhydrobiose bietet den Flechten ein enorm ausgeprägtes

Resistenzpotential gegenüber Trockenheit und Kälte (Hoekstra *et al.* 2001; Schlenso *et al.* 2003; Rebecchi *et al.* 2007; Kranner *et al.* 2008). Grundsätzlich gilt, dass ausgetrocknete Flechten nach einer Reaktivierung mit flüssigem Wasser physiologische Prozesse schnell wiederaufnehmen können (Kranner *et al.* 2008). Die Fähigkeit zur Poikilohydrie kann als fundamentale Überlebensstrategie der Flechten beschrieben werden und bildet eine wesentliche Basis für ihre Extremotoleranz (Kranner *et al.* 2008; Meeßen *et al.* 2014b). Im Vergleich zu anderen Vegetationsformen weisen Flechten durch ihre poikilohydre Lebensweise eine deutlich erhöhte Konkurrenzkraft auf, insbesondere bezüglich der Besiedlung neuer Lebensräume als Pionierorganismen (Emerson 1947; Brodo *et al.* 2001). Durch die Fähigkeit zur Poikilohydrie sind Flechten in der Lage Standorte zu besiedeln, die durch extreme Umweltbedingungen geprägt sind. Zu den Stressoren extremer Standorte zählen geringe Nährstoff- und Wasserverfügbarkeit, lange Trocken-, Hitze- und Kälteperioden (Kappen 1993), hohe Level photosynthetisch aktiver Strahlung und die Bestrahlung mit Licht von Wellenlängen im UV-Bereich (Lange 1992; Nybakken *et al.* 2004). Standorte, deren Umweltbedingungen durch solche extremen Parameter charakterisiert sind, sind beispielsweise alpine und polare Habitate (Aubert *et al.* 2007; Engelen *et al.* 2008) sowie heiße und kalte Wüsten (Nash III *et al.* 1977; Friedmann *et al.* 1988; Nybakken *et al.* 2004; Perez-Ortega *et al.* 2012). An einigen dieser Standorte, etwa der Antarktis, stellen Flechten die dominante Vegetation der gesamten Region dar (Dyer & Crittenden 2008). Aufgrund der vielseitigen Anpassungsstrategien und des hohen Resistenzpotentials der Flechtensymbiose wird geschätzt, dass ca. 8% aller terrestrischen Ökosysteme der Erde von Flechtenvegetationen dominiert werden (Larson 1987).

Das breite Spektrum an Überlebensstrategien (Sadowsky & Ott 2012 2016; Determeyer-Wiedmann *et al.* 2019) führte letztlich zu einem großen Interesse in der Astrobiologie, Flechten als Untersuchungsobjekte einzusetzen. Sie wurden bereits intensiv unter simulierten und echten Weltraum-Experimenten in einem astrobiologischen Kontext untersucht (Kappen *et al.* 1996; de Vera *et al.* 2003, 2004a, 2004b, 2008, 2010; de la Torre Noetzel *et al.* 2007; de Vera & Ott 2010; de la Torre *et al.* 2007, 2010; Sancho *et al.* 2007; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012; Scalzi *et al.* 2012; Meeßen *et al.* 2014a; Backhaus *et al.* 2014, 2019; Sánchez *et al.* 2014; Brandt *et al.* 2015). Auch im Hinblick auf die seit Jahren diskutierte Panspermie-Theorie, nach der es möglich sein soll mikroskopische Lebensformen durch einen interplanetaren Transport von einem auf einen anderen Planeten zu übertragen (Varela 1964), wurde in

den letzten Jahren intensiv an Flechten geforscht. Dabei müssten Organismen, die sich interplanetar übertragen lassen, folgende Ereignisse überdauern:

1. den Auswurf ins Weltall z.B. durch ein Impact-Ereigniss,
2. den langen Aufenthalt unter Weltraumbedingungen während der Transferphase
3. und den Wiedereintritt auf einem anderen Planeten (Horneck 2001).

Während einer potentiellen Transferphase wären die Organismen gegenüber den verschiedenen Bedingungen des Weltraums, beispielsweise extraterrestrischer Strahlung, exponiert. Extraterrestrische Strahlung hat auf biologisches Material sehr schädliche, teils letale Auswirkungen (Horneck *et al.* 1984; Sancho *et al.* 2007). Die kosmische Strahlung besteht aus hochenergetischen Teilchen, die von Sonnen, Supernovae und schwarzen Löchern aus der Milchstraße oder anderen Galaxien stammen. Kosmische Strahlungsteilchen (hauptsächlich Protonen, in geringeren Anteilen Elektronen, Atomkerne und ionisierte Atome) können Geschwindigkeiten von nahezu Lichtgeschwindigkeit ($v_{\text{Licht}} = 299.792.458 \text{ m/s}$) erreichen (Schenk 1964; Eichler 2011; Bender 2000). Hoch energetische Teilchen der galaktischen kosmischen Strahlung können Energien von bis zu 10 Trillionen Elektronenvolt pro nukleares Teilchen erreichen (Schenk 1964).

Die Sonne unseres Sonnensystems ist eine riesige Wasserstoff-Kugel (109-facher Erddurchmesser), in dessen Kern bei einer Temperatur von ca. 15 Mio °C in Kernaufbaureaktionen Protonen unter Energiefreisetzung zu Helium verschmelzen (Schenk 1964). Dabei werden pro Sekunde 564 Mio t Wasserstoff zu 560 Mio t Helium umgewandelt (das entspricht einem Masseverlust der Sonne von 4 Mio t pro Sekunde) (Völkle 2010). Die durch diese Kernreaktion entstehende Energie wird in Form von Strahlung (zum Beispiel Röntgen- und γ -Strahlung) ins All freigesetzt. Dabei strahlt die Sonne etwa $3,7 \times 10^{26} \text{ W}$ ($1 \text{ W} = 1 \text{ J/s}$) Energie ab (=1 Sonnenleuchtkraft) (Schenk 1964; Brix *et al.* 2012). Auf der Erde kommt aufgrund des Erdmagnetfelds im globalen Mittel am oberen Rand unserer Atmosphäre nur ca. 1.340 W/m^2 der kosmischen Energie an (Wagner 2017). Die auf die Grenze der Erdatmosphäre eingestrahlte Energie wird im weiteren Verlauf durch die Atmosphäre in verschiedenen Anteilen reflektiert, absorbiert und in Wärme umgewandelt. Der restliche Anteil des Sonnenlichts geht durch die Atmosphäre hindurch und erreicht schließlich die Erdoberfläche. Die Sonnenstrahlung, die auf der Erdoberfläche ankommt, ist entsprechend abhängig vom Wetter und vom Sonnenstand und liegt zwischen 0 W/m^2 (nachts) und maximal ca. 1000 W/m^2 (klarer Himmel, Sommer).

Auf der Marsoberfläche ist die Strahlungsdosis im Vergleich zur Erde deutlich erhöht. Das liegt zum einen daran, dass der Mars über kein relevantes Magnetfeld verfügt (Acuña *et al.* 1998) und zum anderen daran, dass die Marsatmosphäre sehr dünn ist (<1% im Vergleich zur Erde), sodass hoch energetische Teilchen nahezu ungehindert durch sie hindurch dringen und auf die Marsoberfläche treffen (Hassler *et al.* 2014). Teilchen der galaktischen kosmischen Strahlung, die mit ausreichend Energie auf die Marsoberfläche treffen, können bis zu einigen Metern tief in den Mars-Boden eindringen (Hassler *et al.* 2014). Dadurch bedingt kommt es zur Entstehung sekundärer Teilchen, z.B. Neutronen und γ -Strahlung (Hassler *et al.* 2014).

Wie bereits erwähnt wurde, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien, die die Auswirkungen sowohl von simulierten als auch von echten Weltraumbedingungen auf Flechten untersuchten, durchgeführt (z.B. Starlife, LICHENS II, LITHOPANSPERMIA und STONE auf BIOPAN 5/6, LIFE in EXPOSE-E) (de Vera *et al.* 2003, 2004a, 2004b, 2008, 2010, 2014; de la Torre Noetzel *et al.* 2007; Sancho *et al.* 2007; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008; de la Torre *et al.* 2010; de Vera and Ott 2010; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012; Sánchez *et al.* 2012, 2014; Scalzi *et al.* 2012; Meeßen *et al.* 2013, 2014a, 2015; Backhaus *et al.* 2014, 2019; Brandt *et al.* 2015, 2016, 2017). Der Fokus dieser Studien lag darin, das Überlebenspotential der Organismen gegenüber extraterrestrischen Bedingungen (z.B. Vakuum, intensive Weltraumstrahlung) zu analysieren (Berger *et al.* 2012; Rabbow *et al.* 2012). Eine Besonderheit von biologischen Experimenten, die auf der Internationalen Raumstation ISS durchgeführt wurden (z.B. LIFE), besteht darin, dass hier ausschließlich die speziellen Parameter des Low Earth Orbits (LEO) untersucht werden können. LEO ist eine Bezeichnung für eine Satellitenbahn-Kategorie, die durch eine erdnahe Umlaufbahn mit einer Höhe von max. 2000km charakterisiert ist und sich entsprechend innerhalb des Erdmagnetfelds befindet (Haak *et al.* 2003).

Der extraterrestrische Stressor der UV-C Strahlung spielt für die Überlebensfähigkeit lebender Organismen eine große Rolle (Horneck 1999; Nicholson *et al.* 2005). Grundsätzlich gilt: Je kurzwelliger die auf biologisches Material treffende Strahlung ist, desto mehr Schäden werden im Organismus verursacht (Vass *et al.* 1996; Hollósy 2002). UV-C Strahlung ist hoch energetisch und umfasst einen Wellenlängenbereich von 280nm bis 200nm (Moussa 2009). Durch die Exposition von Organismen gegenüber UV-C Strahlung kommt es zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (Caldwell *et al.*

1998) und zur Zerstörung chemischer Bindungen (Kovács & Keresztes 2002). Da das Absorptionsmaximum von DNA in dem Wellenlängenbereich von UV-C Strahlung liegt (ca. 260nm) (Petty *et al.* 2004), verursacht dieser Strahlungstyp außerdem genomische Schäden (Nasibi & M'Kalantari 2005; Sass *et al.* 1997). Allerdings besitzt UV-C Strahlung nur eine geringe Eindringtiefe von ca. 35-50µm in organische Materie (Kovács & Keresztes 2002; Jasinghe & Perera 2005; de Winne *et al.* 2015). Auf der Erdoberfläche kommt UV-C Strahlung nicht vor, da sie von der Stratosphäre absorbiert wird. Entsprechend gibt es keinen terrestrischen Standort, an dem Organismen durch UV-C Strahlung beeinflusst werden (Rikkinen 1995). Die schädliche Wirkung von UV-C Strahlung auf Flechtenorganismen ist unter einem astrobiologischen Kontext bereits mehrfach untersucht worden (Meeßen *et al.* 2013, 2014; Backhaus 2014; Nguyen *et al.* 2014; Jänchen *et al.* 2015; Backhaus *et al.* 2015). Ein natürlicher und effektiver Schutz gegenüber teils auch extraterrestrischen Strahlungen besteht aus durch den MB synthetisierten sekundären Flechtenmetaboliten (z.B. Melanin und Parietin), die im Intrazellularraum oder im Cortex deponiert werden. Da diese Substanzen schädliche Strahlung absorbieren können, stellen sie einen effizienten Strahlungsschutz für den PB dar (Wynn-Williams & Edwards 2002; Solhaug *et al.* 2003; Solhaug & Gauslaa 2004; Spagnuolo *et al.* 2011). Melanin, das unter anderem vom MB von *Buellia frigida* synthetisiert wird, ist ein Makromolekül, das effizient UV- und überschüssige photosynthetisch aktive Strahlung absorbiert (Meredith & Riesz 2004; Nybakken *et al.* 2004) und die Flechte vor extremen Temperaturen, Austrocknung und osmotischem Stress schützt (Sterflinger 2006; Plemenitaš *et al.* 2008).

Spezielle Untersuchungen über die Auswirkungen von Marsbedingungen auf Flechten sind im astrobiologischen Kontext von besonderem Interesse, um eine potenzielle Habitabilität des Planeten Mars vor vielen Milliarden Jahren einschätzen zu können. Zur Erklärung dieser Hypothese ein kleiner Rückblick: Auf der Marsoberfläche gab es vor 3,95 bis 3,7 Mrd. Jahren ein enormes Wasservorkommen (Abb. 1), was eine mögliche Bewohnbarkeit des Planeten zu dieser Zeit bedeuten könnte (Fairén *et al.* 2010; Palumbo & Head 2018). Auf diese wasserreiche Epoche folgte eine semi-trockene Ära (3,7 bis 2,0 Mrd. Jahre vor heute), während der die Marsoberfläche, mit Ausnahme einiger kleiner Nischen, unbewohnbar wurde (de Vera *et al.* 2014; Schirmack *et al.* 2014). Heute sind die ehemaligen Ozeane auf dem Mars verschwunden. Der Planet ist durch eine trockene Atmosphäre gekennzeichnet, auf dessen Oberfläche Temperaturen Werte über dem Gefrierpunkt erreichen können, sodass flüssiges Wasser theoretisch stabil vorkommen

könnte. Allerdings würde flüssiges Wasser aufgrund der trockenen Atmosphäre schnell wieder verdunsten, wodurch es für Organismen nicht lange zur Verfügung stehen würde.

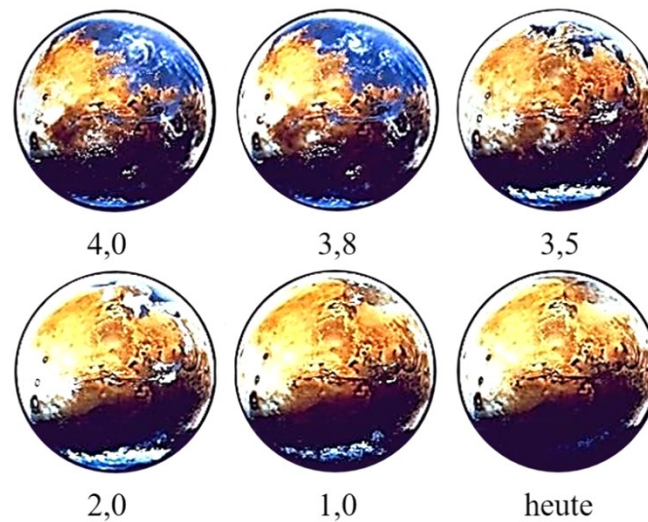


Abb. 1 Entwicklung des Wasservorkommens auf dem Mars vor 4,0 Mrd. Jahren bis heute. Wasser geht durch die Spaltung in Sauerstoff und Wasserstoff verloren. Der Wasserstoff wird durch Sonnenwinde in den Weltraum abgetragen, wohingegen der Sauerstoff in dem Marsboden an Eisen bindet.

Abbildung entnommen und angepasst aus:

www.onthescienceandthesocial.wordpress.com/2012/11/29/water-on-mars/

In astrobiologischen Studien zeigten Flechtenorganismen sowohl nach simulierten als auch nach echten Weltraum-Experimenten hohe Vitalitätswerte und ein ausgeprägtes Resistenzpotential gegenüber extraterrestrischen Stressoren (de la Torre *et al.* 2007, 2010; de Vera *et al.* 2008, 2010; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012; Sánchez *et al.* 2012; Brandt *et al.* 2015; Backhaus *et al.* 2015). Das enorme Überlebenspotential von Flechten gegenüber extraterrestrischen Bedingungen wird meistens durch ihre Fähigkeit zur Poikilohydrie begründet (auch Anhydrobiose) (Crowe *et al.* 1992; Kranner *et al.* 2008). Im ausgetrockneten Zustand sind Flechten in der Lage extreme Umweltbedingungen ohne dauerhafte Vitalitätseinbußen zu überdauern (Crowe *et al.* 1992). Außerdem erhöht sich als Folge der physiologischen Inaktivität das Resistenzpotential beider Flechtensymbionten gegenüber verschiedenen Stressoren (Kranner *et al.* 2008). In einigen Studien, die sowohl mit ausgetrockneten als auch mit feuchten, metabolisch aktiven Flechtenorganismen durchgeführt wurden, zeigten die trockenen Organismen ein deutlich höheres Resistenzpotential gegenüber beispielsweise UV-C Strahlung (de Vera & Ott 2010; Sánchez *et al.* 2014; Meeßen *et al.* 2014a; Backhaus *et al.* 2014).

Nach mehreren Jahren der erfolgreichen Forschung gelten Flechten aktuell als Modellorganismen für die Astrobiologie und sind bereits zwei Mal in einem Langzeit-Experiment (>12 Monate) auf der ISS gegenüber Weltraumbedingungen exponiert worden (Sancho *et al.* 2008; Meeßen *et al.* 2013, 2014a, 2017; Brandt *et al.* 2015, 2016; Backhaus *et al.* 2019). In echten Weltraum-Experimenten werden lebende Organismen durch verschiedene extreme Umweltbedingungen beeinflusst (beispielsweise durch Vakuum, extraterrestrische UV-Strahlung, kosmische ionisierende Strahlung und ein breites Temperaturspektrum) (Nicholson *et al.* 2000, 2005; Moeller *et al.* 2017).

Das erste Weltraum-Experiment mit Flechten, das über einen Zeitraum von 18 Monaten auf der Internationalen Raumstation ISS durchgeführt wurde, war das *lichen and fungi experiment* (LIFE), das in den Jahren 2008 und 2009 durchgeführt wurde (Brandt *et al.*, 2015). Durch dieses Experiment sollten unter anderem das Resistenzpotential und die Auswirkungen der LEO Bedingungen auf die Flechte *Xanthoria elegans* untersucht werden. Für die Durchführung des LIFE Experiments wurden Fragmente der Flechte *Xanthoria elegans* vom Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) in Köln in verschiedene Untereinheiten (=Trays) der sogenannten EXPOSE Einheit eingebettet. Die Trays wurden später an der Außenseite der ISS in die EXPOSE Einheit integriert und gegenüber Weltraum- und Mars-ähnlichen Bedingungen exponiert (Brandt *et al.* 2015, 2016). Durch die Installation verschiedener strahlungsabschirmender Filter und die hermetische Abriegelung einiger Trays wurden einzelne Flechtenproben gegenüber Mars-analogen Parametern exponiert. Dies sollte eine Einschätzung einer möglichen ehemaligen Habitabilität des Planeten ermöglichen. Während des LIFE Experiments wurden in den unterschiedlichen Trays insgesamt drei verschiedene experimentelle Setups verwirklicht. Entsprechend der installierten Filter verändern sich die Strahlungsparameter, denen die Proben in den einzelnen Trays ausgesetzt sind, wie folgt:

1. volles Spektrum der Strahlungsparameter des LEO
2. Filter, der 99,9% der Strahlung $\geq 110\text{nm}$ abgeschirmt hat (Mars-analog)
3. Dunkelproben, die im Inneren der EXPOSE-E Einheit angebracht waren

Die Vitalität der Flechtenproben nach Durchführung des LIFE Projekts wurde durch verschiedene Methoden analysiert (Brandt *et al.* 2015). Die Analyse der LIFE-Proben zeigte für die Mars-analogen Proben nach der Exposition im LEO die höchsten Vitalitätswerte. Aufgrund der hohen Überlebensraten, die für die Flechten nach der Exposition auf der ISS ermittelt werden konnten, kann spekuliert werden, dass diese

Flechte auch einen längeren Aufenthalt im Weltall überleben können (Brandt *et al.* 2015 2016).

Im Juli 2014 startete das zweite Langzeit-Experiment auf der internationalen Raumstation (ISS): das *biology and Mars experiment* (BIOMEX). Als Untersuchungsobjekt für dieses internationale Projekt wurde unter anderem die antarktische endemische Flechte *Buellia frigida* ausgewählt und neben anderen biologischen Proben für 1,5 Jahre auf der ISS gegenüber LEO Bedingungen exponiert. Durch die Exposition der Flechte *Buellia frigida* gegenüber Weltraum- und Mars-ähnlichen Bedingungen während des BIOMEX Experiments sollten Informationen über das Resistenz- und Überlebenspotential dieses symbiotischen Organismus gewonnen und die Einschätzung einer potentiellen (ehemaligen) Habitabilität des Planeten Mars ermöglicht werden. Die Flechte *Buellia frigida* erwies sich in zahlreichen Vorversuchen gegenüber simulierten Weltraumbedingungen (z.B. Vakuum, Mars Atmosphäre, Temperaturschwankungen und monochromatischem UVC_{254nm} Licht) als geeigneter Kandidat für das BIOMEX Projekt (Meeßen *et al.* 2015). Allerdings war die Flechte während der Vorversuche im Labor den verschiedenen Bedingungen gegenüber bis zu maximal 38 Tagen ausgesetzt, was einen nur begrenzten Zeitraum verglichen mit 18 Monaten Exposition im LEO darstellt.

Neben den Flechten *Buellia frigida* (dessen Resistenzpotential in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wird) und *Circinaria gyrosa* war eine Vielzahl weiterer biologischer Proben [Bakterien (z.B. *Deinococcus radiodurans*), Archaea, Pflanzensamen, Mikropilze (z.B. *Kombucha*), Moose (*Grimmia sessitana*) und ca. 150 Proben verschiedener organischer Substanzen] für 1,5 Jahre als Teil des BIOMEX Projekts auf der ISS in der EXPOSE-R2 Einheit installiert und gegenüber LEO Bedingungen exponiert (Rabbow *et al.* 2017). Während der Expositionsphase auf der ISS sind die BIOMEX Proben den speziellen Bedingungen des LEO ausgesetzt. Da sich die ISS innerhalb des Erdmagnetfeldes befindet, ist der Anteil der Strahlungsdosen, die die BIOMEX Proben treffen, im Vergleich zum "deep space" deutlich verringert, da magnetisch ablenkbare Strahlungstypen durch das Erdmagnetfeld abgeschirmt werden. Jedoch werden die BIOMEX Proben bei jedem Durchflug der ISS durch die beiden Van Allen Strahlungsgürtel von ionisierender Strahlung getroffen (benannt nach James van Allen, vgl. Abb. 2). Die Van Allen Strahlungsgürtel entstehen durch die Ablenkung und das Einfangen geladener kosmischer Teilchen durch das Erdmagnetfeld. Der äußere Strahlungsgürtel besteht aus Elektronen und erstreckt sich in einer Entfernung zur

Erdoberfläche von 4 bis 7 Erdradii. Der innere Gürtel wird vor allem durch Protonen gebildet und erstreckt sich um den Äquator in 1,2 bis 3-fachen Erdradius Entfernung zur Erdoberfläche (Horne *et al.* 2007; Sarno-Smith 2015).

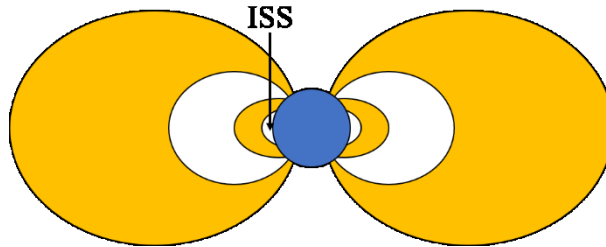


Abb. 2 Schematische Darstellung der Van Allen Strahlungsgürtel (gelb), die durch das Erdmagnetfeld der Erde entstehen (Erde in blau). Darstellung angelehnt an Sarno-Smith 2015.

Nach der Rückkehr der BIOMEX Proben von der ISS sollte durch die Anwendungen verschiedener Methoden die Fragestellung, ob die Flechtensymbiose dazu in der Lage ist die Exposition gegenüber extraterrestrischen oder Mars-ähnlichen Bedingungen zu überdauern, bearbeitet werden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene Analysen der Proben durchgeführt. Neben Messung der Stoffwechselaktivität wurden auch DNA basierte Methoden durchgeführt, um die genomische Integrität der Flechten nach Exposition im LEO zu untersuchen. Zusätzlich wurde durch mikroskopische Analysen untersucht ob (und welche) ultrastrukturellen und anatomischen Veränderungen in den Flechtenorganismen nach Exposition im LEO zu beobachten sind. Da sich Kultivierungsversuche der einzelnen Symbionten in den letzten Jahren als „Gold Standard“ Methode zur Einschätzung der Überlebensfähigkeit von Flechten etabliert haben, wurden auch diese mit den beiden Symbionten der Flechte *Buellia frigida* durchgeführt. Letzlich sollen das Resistenzpotential der zwei unterschiedlichen Flechtenarten *Xanthoria elegans* und *Buellia frigida* eingehend miteinander verglichen und Unterschiede diskutiert werden.

Wie bereits erwähnt wurde, waren neben den biologischen Organismen auch verschiedene biogene Substanzen als Teil des BIOMEX Experiments auf der ISS gegenüber Weltraumbedingungen exponiert. Diese Proben sollten nach Exposition im LEO bezüglich ihrer Stabilität untersucht werden. Die Auswahl der BIOMEX Substanzen erfolgte aufgrund verschiedener Charakteristika. Es gibt einige Substanzen, die in interstellaren, zirkumstellaren und protoplanetaren Wolken gebildet werden oder in Meteoriten und auf dem Mars zu finden sind (Miller 1953; Oró & Kimball 1961, 1962;

Kvenvolden *et al.* 1970, 1971; Miller *et al.* 1976; Hollis *et al.* 2000; Kaiser *et al.* 2015). Dazu gehören z.B. Nukleinsäureverbindungen (Pyrimidine und Purine), einige Aminosäuren, Carbonsäuren, Aldehyde, Alkohole, einfache Zucker und Kohlenwasserstoffe. Für das BIOMEX Projekt wurden Substanzen ausgewählt, von denen bislang nicht bekannt ist, dass sie im Weltraum oder auf anderen Himmelskörpern zu finden sind. Die ausgewählten Substanzen wurden vor und nach der Exposition auf der ISS mittels Raman-Spektroskopie untersucht. Vergleichend sollten daraus Informationen zur Stabilität und Degradation der einzelnen Verbindungen nach Weltraum-Exposition gewonnen werden. Wegen des biologischen oder organischen Ursprungs der ausgewählten biogenen Substanzen sollten die Ergebnisse für die Erstellung einer Biomarker-Datenbank für zukünftige Weltraum-Missionen genutzt werden. Folgende Substanzen wurden für die Exposition im LEO während des BIOMEX Projekts ausgewählt: β -Carotin, Chlorophyllin, Melanin, Naringenin, Parietin, Quercitin (allesamt Farbstoffe) sowie Cellulose, Chitin und Agar.

Cellulose und Chitin wurden ausgewählt, weil sie für die strukturelle Integrität von Organismen eine wichtige Rolle einnehmen. Das Polysaccharid Cellulose ist das häufigste Biopolymer der Erde. Chitin bildet den Hauptbestandteil der Zellwände von Pilzen und Mycobionten. Das Polysaccharid Agar-Agar wurde Teil des BIOMEX Experiments, da es bezüglich einiger Merkmale der Biofilm-bildenden extrazellulären, polymeren Substanz ähnelt.

Bei β -Carotin handelt es sich um ein Fotopigment, das als Antioxidationsmittel in Pflanzen und Pilzen zu finden ist und den Organismus vor überschüssiger Lichtenergie schützt. Die Chlorophylle sind im Metabolismus photoautotropher Organismen zu finden. In Vorversuchen hat sich jedoch herausgestellt, dass Chlorophylle durch Raman-Spektroskopie nicht eindeutig nachweisbar sind (sie zeigen nur eine unbestimmte Fluoreszenzkurve). Für das BIOMEX Projekt wurde daher das Kupfernatriumsalz von Chlorophyllin verwendet. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Derivat von Chlorophyll, das eindeutige und klare Raman-Spektren erzeugt.

Einige der ausgewählten Substanzen können mit der Resistenz von extremophilen und extremotoleranten Organismen (z.B. Flechten) in Verbindung gebracht werden und zeichnen sich beispielsweise durch das Absorptionsvermögen von UV-Strahlung aus (Melanin, Parietin). Das Polymer Melanin dient als üblicher Licht- und UV-Schutz in Flechten und wird auch vom Mycobionten der Flechte *Buellia frigida* gebildet (Meeßen

et al. 2015). Der sekundäre Flechteninhaltsstoff Parietin kommt in den astrobiologisch relevanten Flechten *Xanthoria elegans* (Brandt *et al.* 2015a, 2016) und *Fulgensia bracteata* vor (de Vera *et al.* 2003, 2004; Meeßen *et al.* 2014). Naringenin und Quercitin sind Antioxidationsmittel, die von vielen Organismen gebildet werden und freie Radikale abfangen und neutralisieren können.

II Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Die Flechte *Buellia frigida* aus der Antarktis

Buellia frigida ist eine in der Antarktis endemisch vorkommende, placoider Krustenflechte. Sie wächst rosettenförmig und kann einen Durchmesser von bis zu 15 cm erreichen. Am äußeren Thallusrand befindet sich die Wachstumszone, die durch zahlreiche kleine Loben charakterisiert ist (vgl. Abb. 3, Øvstedal & Smith 2001). Das Verbreitungsgebiet dieser Flechte erstreckt sich über die maritime und kontinentale Antarktis bis zu einem Breitengrad von 86°S (Schöller 1997). In der kontinentalen Antarktis gehört sie zu den dominanten Flechtenarten. *Buellia frigida* wächst exponiert auf unterschiedlich großem Felsgestein auf bis zu ca. 2000 m ü.M., wo sie Umwelteinflüssen wie starkem Wind, niedrigen Temperaturen sowie hoher photosynthetisch aktiver Strahlung (besonders während des antarktischen Sommers) ausgesetzt ist (Øvstedal & Smith 2001). Der heteromere Thallus zeichnet sich durch eine intensiv entwickelte Mark- und Algenschicht aus und ist oberseits berindet (s. Abb. 3, B). Der Photobiont dieser antarktischen Flechte gehört zur Gattung *Trebouxia* (Clade A/OTU A02) (Leavitt *et al.* 2015; Determeyer-Wiedmann *et al.* 2019). Melanin-Auflagerungen in der oberen Rindenschicht verursachen die dunkelgraue bis schwarze Färbung der Flechte. *Buellia frigida* bildet ungestielte, meist konvex geformte Apothecien (Fruchtkörper) mit einem sehr dünnen Rand, die einen Durchmesser von bis zu 1 mm erreichen können. Im Hymenium jedes Fruchtkörpers sind zahlreiche Asci enthalten, in denen sich jeweils 8 Ascosporen entwickeln (Balzer 2012).

Das Flechtenmaterial, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde, wurde in Nord Victoria Land (74°38'S 164°13'E) während des antarktischen Sommers 2009/2010 gesammelt. Die Flechten wurden an der Luft getrocknet und bei Temperaturen von -20°C nach Düsseldorf transportiert und dort bis zu dem Zeitpunkt, zu dem es untersucht wurde, bei -20°C gelagert.

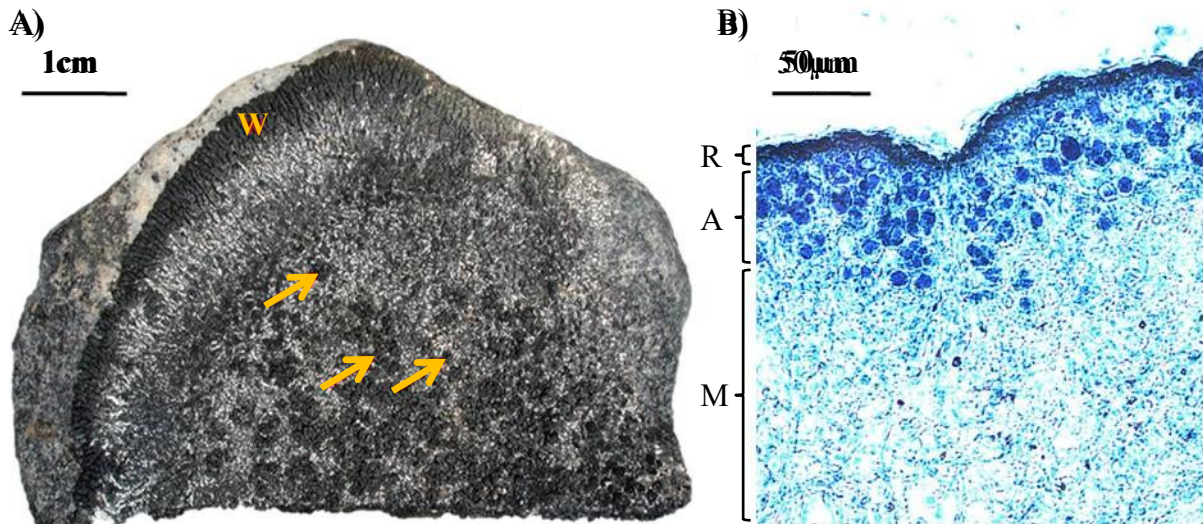


Abb. 3 A) Flechtenlager von *Buellia frigida* auf antarktischem Gestein. Zu erkennen sind die äußere, schwarze Wachstumszone (W), sowie eine Vielzahl schwarzer Apothecien (einige beispielhaft durch Pfeile markiert). B) Querschnitt einer Lobe von *Buellia frigida*. Deutlich erkennbar ist der heteromere Aufbau der Flechte mit einer oberen Rindenschicht (R, ca. 12µm dick), der darunter liegenden Algenschicht (A, ca. 65µm dick) und der anschließenden Markschrift (M).

2.1.2 BIOMEX Flechtenproben

Zu Beginn des BIOMEX Projekts wurden Fragmente der Flechte *Buellia frigida* für das BIOMEX Projekt in der EXPOSE-R2 Einheit vorbereitet. Im ersten Teil sollte Flechtenmaterial, das auf natürliche Weise auf antarktischem Gestein gewachsen war, gegenüber Weltraumbedingungen exponiert werden. Für diesen Teil des Experiments wurden Steinpellets mit einem Durchmesser von 10mm aus antarktischen (mit der Flechte *Buellia frigida* bewachsenen) Gesteinsproben gefräst (s. Abb 4). Diese Proben werden im Folgenden als „rock“ Proben bezeichnet.

Neben den rock-Proben wurden für ein zweites und drittes Experiment zwei unterschiedliche, künstliche Mars-Substrate vorbereitet. Die Zusammensetzungen dieser künstlichen Substrate entsprechen zwei unterschiedlichen Mars-Epochen, die im Folgenden beschrieben werden. Das erste Mars-Substrat ähnelt in seiner Komposition (Tab. 1) der hydrothermalen Epoche der Mars-Geschichte, die 3,95 bis 3,7 Mrd. Jahre zurück liegt (s.o.). Da während dieser Zeit der Mars-Boden durch saure, phyllosilikatische Eigenschaften charakterisiert war, wird dieses künstliche Regolith „P-Mars“ genannt. Das zweite Mars-Substrat ist bezüglich seiner Zusammensetzung (Tab. 2) an eine semi-trockene und kalte Epoche angelehnt, die 3,7 bis 2,9 Mrd. Jahre zurück liegt (s.o.). Dieses Mars-Zeitalter war durch basische, sulfathaltige Böden gekennzeichnet

(Böttger *et al.* 2012; de Vera *et al.* 2014; Schirmack *et al.* 2014) und wird daher im Folgenden als „S-Mars“ bezeichnet.

Tabelle 1 Zusammensetzung des frühen, phyllosilikatischen P-Mars Regoliths.

Mineral	% (Gewicht)
Montmorillonit	45
Chamosit	20
Quarz	10
Eisen(III)-oxid	5
Kaolinit	5
Siderit	5
Hydromagnesit	5
Gabbro	3
Dunit	2

Tabelle 2 Zusammensetzung des späten, sulfathaltigen S-Mars Regoliths.

Mineral	% (Gewicht)
Gabbro	32
Gips	30
Dunit	15
Hämatit	13
Goethit	7
Quarz	3

Aus den beiden verschiedenen pulvrigen Mars-Regolith-Gemischen wurden über einen Zeitraum von 10 bis 15min und durch Ausüben einer Kraft von 5 bis 7t feste, steinartige Pellets gepresst (PP-10-Pelletpresse, Retsch, Deutschland, Pellet-Durchmesser 12mm, Pellet-Dicke ca. 4mm). Zur Bestückung der hergestellten Mars-Pellets mit Flechtenmaterial wurden mehrere Thallusfragmente mit einer Größe von jeweils 2-3mm² mit einem Skalpell aus einer Population von einem der antarktischen Steine entfernt. Auf jedes gepresste Pellet wurden mittels speziellem Weltraum-geprüftem Silikon-Kleber etwa zehn Thallusfragmente befestigt (RTV-S 691 Silikonkautschuk, Wacker-Chemie GmbH Deutschland, zugelassen für Anwendungen in der Luft- und Raumfahrt durch das European Space Research and -technology Centre). Nach dem Ankleben der Flechtenfragmente auf die Pellets befindet sich die Medulla jedes Fragments in direktem Kontakt mit dem künstlichen Mars-Regolith der P- und S-Mars Pellets (vgl. Abb. 4).

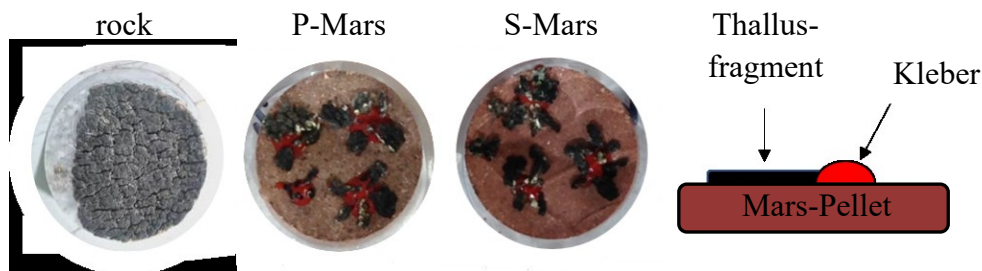


Abb. 4 Abbildungen der BIOMEX Flechtenproben vor Weltraum-Exposition: rock, P- und S-Mars Pellets (v.l.n.r.) sowie schematische Darstellung der Befestigung der BIOMEX Proben auf den künstlichen Mars-Substraten.

Nach der Fertigstellung der Flechtenproben der rock-, P-Mars und S-Mars Pellets wurden diese zum Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) nach Köln verschickt, dort in unterschiedliche Trays der EXPOSE-R2 Einheit eingesetzt und für das Weltraum-Experiment vorbereitet. Zusätzliche rock, P-Mars und S-Mars Pellets mit darauf befestigtem Flechtenmaterial wurden während der Vorbereitungen für das BIOMEX Projekt als Reserve-Pellets angefertigt. Diese Proben wurden auf die exakt gleiche Art und Weise hergestellt, die oben beschrieben wurde. Sie sollten aber nur zum Einsatz kommen, falls bei der Integration der eigentlich dafür geplanten Proben in die Trays der EXPOSE-R2 Einheit Pellets zerbrechen. Da von den ursprünglichen Proben keine zerbrach, wurden die Reserve-Proben für das BIOMEX Projekt nicht verwendet. Sie wurden in Köln bis zur Rückkehr der BIOMEX Proben von der ISS unter leider unbekannten Bedingungen aufbewahrt. In der vorliegenden Arbeit werden sie als Transportkontrollen (trp) behandelt.

2.1.3 Biogene Substanzen

Wie bereits erwähnt wurde, waren neben den Flechtenproben auch verschiedene biogene Substanzen als Teil des BIOMEX Projekts auf der ISS in der EXPOSE-R2 Einheit integriert (β -Carotin, Chlorophyllin, Naringenin, Quercitin, Melanin, Parietin, Cellulose, Chitin, Agar, siehe Tab. 3 und Abb. 5). Die verschiedenen Substanzen wurden in drei verschiedenen experimentellen Proben-Setups für das BIOMEX Projekt vorbereitet. In einem ersten Setup wurden die biogenen Substanzen jeweils in Methanol suspendiert und anschließend, bevor das Methanol verdampft war, auf Quarzglasobjektträger ($\varnothing$ 6mm) aufgetragen. Für das zweite und dritte Setup wurden die einzelnen Substanzen mit einem Anteil von jeweils 5% (Gew./Gew.) unter die pulvrigen P- und S-Mars Substrate gemischt (Zusammensetzung siehe Tab. 1 und 2). Aus den präparierten Mars-Regolith Gemischen wurden anschließend durch Ausübung einer Kraft von 6 t über 15 Minuten Pellets mit einem Durchmesser von 6mm und einem Gewicht von 0,4g gepresst (PP-10-Pelletpresse, Retsch, Deutschland). Die Pellets weisen im Vergleich zu den Mars-Pellets, die für die Flechtenproben verwendet wurden, einen deutlich reduzierten Durchmesser auf. Der Vorteil der kleineren Pellets, die für die biogenen Substanzen verwendet wurden, liegt in einer glatteren Oberfläche, wodurch die Analyse der Pellet-Oberflächen am Raman-Spektroskop vereinfacht wird.

Die angefertigten Proben der biogenen Substanzen (Quarzglas-Objektträger, P-Mars und S-Mars Pellets) wurden zum Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) nach

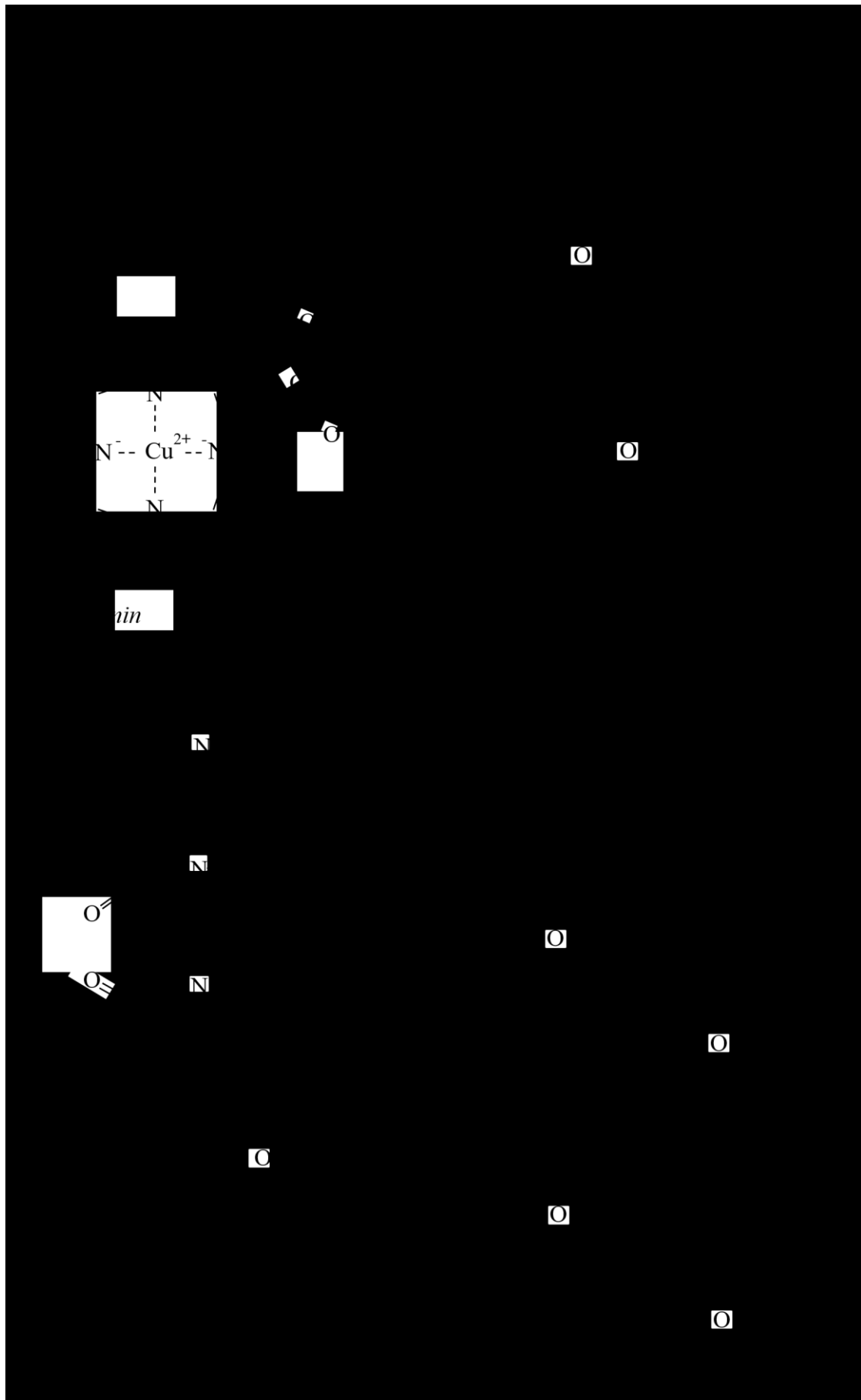
Köln verschickt und dort in ein Tray der EXPOSE-R2 Einheit integriert. Zusätzlich wurden P- und S-Mars Pellets mit jeder der biogenen Substanzen vorbereitet, die später zu Kontrollzwecken am Raman-Spektroskop untersucht werden sollten.

Das BIOMEX Projekt sollte die biogenen Substanzen im Hinblick auf ihre jeweilige Stabilität und möglicher Degradationsprozesse nach der Exposition gegenüber Weltraumbedingungen untersuchen. Außerdem sollten mögliche Wechselwirkungen der biogenen Substanzen mit den verwendeten Mars-Pellets analysiert werden.

Tabelle 3 Liste der biogenen Substanzen, die für das BIOMEX Projekt verwendet wurden. Aufgelistet sind die zugehörigen Stoffgruppen, Summenformeln, Molekulargewicht und der Hersteller, von dem die jeweilige Substanz bezogen wurde.

	Substanz	Stoffgruppe	Summenformel	Mol.gewicht	Hersteller
Farbstoffe	β -Carotin	Carotenoide	$C_{40}H_{56}$	536.89	Fluka
	Chlorophyllin	Porphyrin-Derivate	$C_{34}H_{31}N_4O_6Na_3Cu$	724.19	Sigma
	Naringenin	Flavonoide	$C_{15}H_{12}O_5$	272.26	Alfa Aesar
	Quercitin	Flavonoide	$C_{15}H_{10}O_7$	338.27	Sigma
	Melanin	Tyrosin-Derivate	$[C_8H_3NO_2]_n$		Sigma
	Parietin	Antrachinone	$C_{16}H_{12}O_5$	284.26	Roth
	Cellulose	Polysaccharide	$[C_6H_{10}O_5]_n$	variable	Sigma
	Chitin	Polysaccharide	$[C_8H_{13}NO_5]_n$	~400,000	Roth
	Agar	Polysaccharide			Roth

Abb. 5 Strukturformeln der verschiedenen biogenen Substanzen, die für das BIOMEX Projekt ausgewählt und verwendet wurden.



2.2 Methoden

2.2.1 Weltraum-Exposition auf der ISS

Alle für das BIOMEX Projekt vorbereiteten Proben, darunter die Proben der biogenen Substanzen sowie acht Pellets, auf denen Fragmente von *Buellia frigida* befestigt waren (4x rock 2x P-Mars und 2x S-Mars Pellets), wurden zum Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) nach Köln gesendet und dort in verschiedene Trays der EXPOSE-R2 Einheit integriert. Die verschiedenen Trays der EXPOSE-R2 Einheit sind jeweils in zwei Etagen unterteilt. Proben, die in der oberen Etage, genannt „top layer“, integriert waren, waren den Weltraumbedingungen gegenüber direkt ausgesetzt. Proben, die in der darunter liegenden Etage („bottom layer“) integriert wurden, sind durch den top layer vor einigen der Weltraumbedingungen, z.B. UV-Strahlung, geschützt. Die Proben des bottom layers werden aber von hoch energetischer Weltraumstrahlung (z.B. γ -Strahlung) erreicht.

Die mit den BIOMEX Proben ausgestatteten Trays wurden nach Kasachstan transportiert und in die Rakete überführt, die am 23. Juli 2014 in Baikonur startete (Abb. 6 A). Auf der ISS angekommen, wurden die einzelnen Trays am 18. August 2014 während eines Außenbordeinsatzes durch die Astronauten Aleksandr Skvortsov und Oleg Artemyev in die EXPOSE-R2 Einheit am Zvezda-Modul integriert (Abb. 6 B). Nach einer ca. neunwöchigen Evakuierungsphase, während der Gas- und Wasserrückstände aus den Proben ausgasen konnten, wurde am 22. Oktober 2014 die Abdeckung der EXPOSE-R2 Einheit entfernt, der die Proben bis zu diesem Zeitpunkt vor Weltraumstrahlung schützte. Durch das Entfernen der Abdeckung begann entsprechend die Expositionsphase der BIOMEX Proben gegenüber Weltraum- und Mars-ähnlichen Bedingungen im LEO (Abb. 6 C).

Die einzelnen Trays der EXPOSE-R2 Einheit sind in vier Compartments angeordnet (siehe Abb. 7). Durch die Isolation der einzelnen Trays voneinander konnten für das BIOMEX Projekt unterschiedliche experimentelle Parameter getestet werden. BIOMEX Proben, die sich in Tray 1 im Compartment 1 befinden, wurden direkt und ohne weitere Besonderheiten den Weltraumbedingungen des LEO (inklusive Vakuum, zwischen 1.33×10^{-3} und 1.33×10^{-4} Pa) gegenüber exponiert. In diesem Tray waren die rock-Proben der Flechte *Buellia frigida* integriert.

Die Trays der Reihe 2 aus Compartment 1 und 2 wurden nach der Integration der verschiedenen Proben in Köln hermetisch verriegelt, evakuiert und anschließend mit einer künstlichen Mars-Atmosphäre mit einem Druck von 980Pa befüllt (Zusammensetzung: 95,55% CO₂ + 2,70% N₂ + 1,60% Ar + 0,15% O₂, ~ 370 ppm H₂O, Praxair Deutschland GmbH). In diesen Trays wurden die P- und S-Mars Flechtenproben sowie die Proben der biogenen Substanzen integriert und während des BIOMEX Projekts Mars-ähnlichen Bedingungen gegenüber exponiert.

Innerhalb der EXPOSE-R2 Einheit sind Sensoren installiert (vgl. Abb. 7), die während der gesamten Dauer des BIOMEX Projekts Daten der verschiedenen Weltraum-Parameter erhoben und diese direkt zur Erde übertragen haben. Die akkumulierten Bestrahlungsdosen der einzelnen Proben während der Expositionsphase wurden entsprechend der übermittelten Daten durch die Firma RedShift kalkuliert.

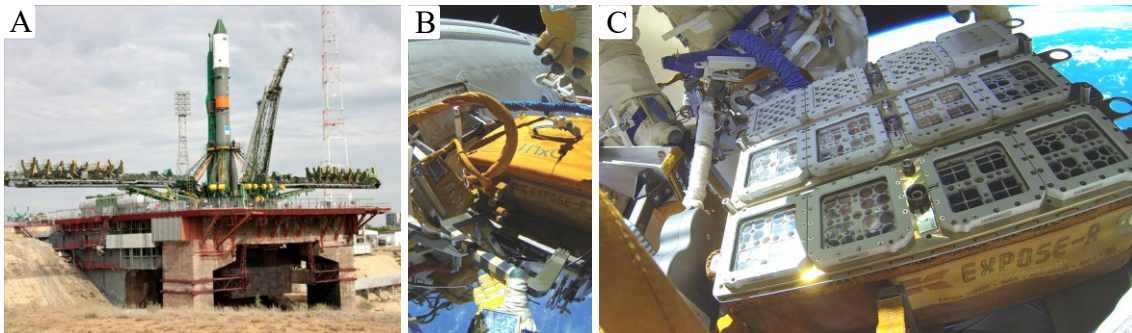


Abb. 6 A) Startrampe in Baikonur (Kasachstan) mit der Rakete, die die BIOMEX Proben zur ISS befördert hat. B) Integrierte BIOMEX Proben in der EXPOSE-R2 Einheit an der ISS. Zu sehen ist hier die orange-farbige Abdeckung, die zu Beginn des BIOMEX Projekts auf der EXPOSE-R2 Einheit angebracht war. C) Aufnahme der EXPOSE-R2 Einheit mit den BIOMEX Proben während der Expositionsphase auf der ISS. (Quelle: ESA/ROSCOSMOS)

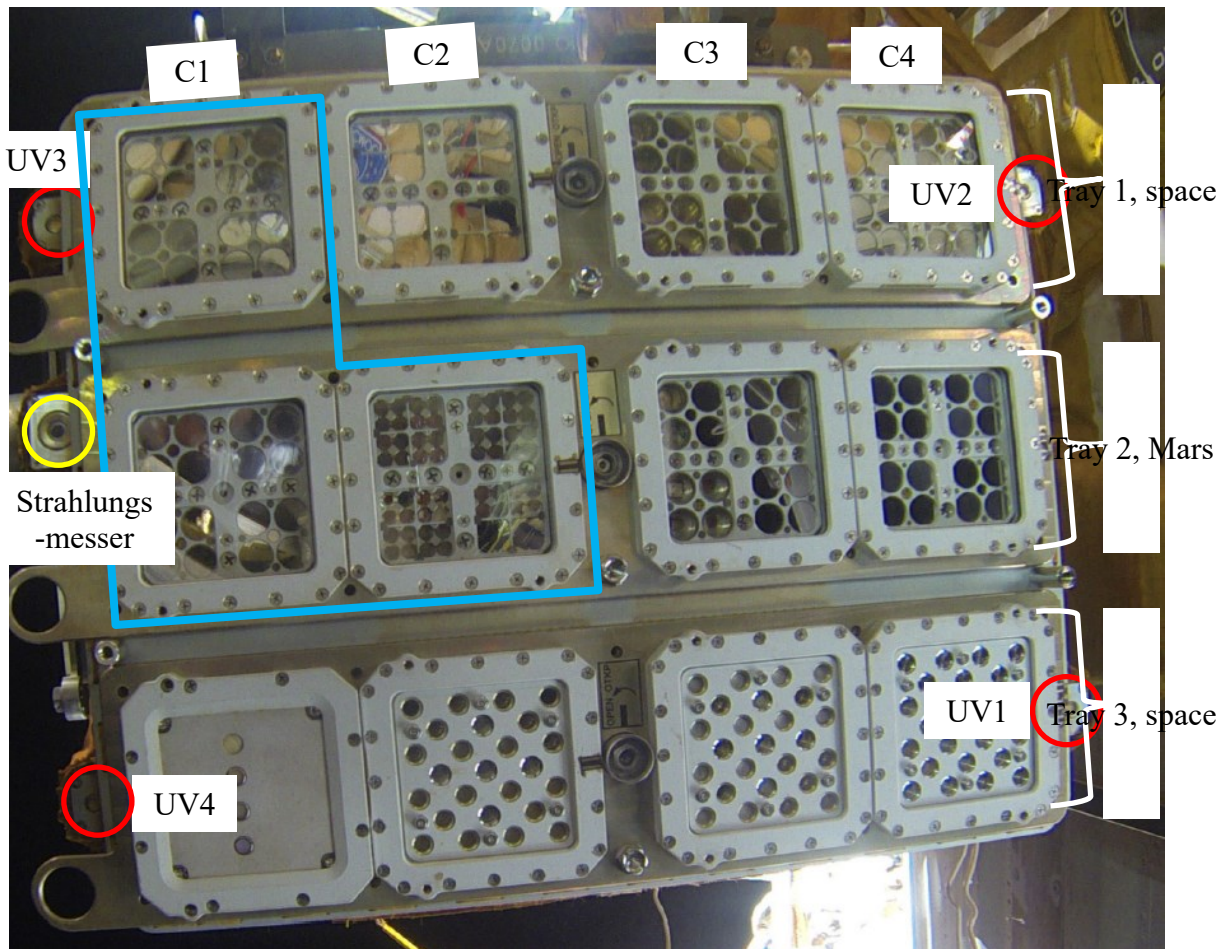


Abb. 7 Aufsicht und Aufteilung der EXPOSE-R2 Einheit während der BIOMEX Mission und Kennzeichnung des Strahlungsmessers (gelb) sowie der UV-Sensoren (rot), die die experimentellen Parameter erfassen. In jeder Compartment-Einheit (C1-4) der drei Trays (T1-3) ist außerdem ein Temperatursensor integriert. Trays mit Proben, die zu dem BIOMEX Projekt gehören, sind blau markiert.

Insgesamt akkumulierten die Flechtenproben im top layer während der Dauer des BIOMEX Projekts auf der ISS UV-A Dosen zwischen 301 und 359MJ/m², UV-B Dosen zwischen 51 und 69MJ/m², UV-C Dosen zwischen 19 und 28MJ/m² und Dosen photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) zwischen 2660 und 3020MJ/m². Eine exakte Auflistung der akkumulierten Strahlungsdosen jeder BIOMEX Flechtenprobe ist in Tabelle 4 dargestellt.

Die biogenen Substanzen, die im top layer der EXPOSE-R2 Einheit integriert waren, akkumulierten UV-A Dosen von ca. 366 MJ/m², UV-B Dosen von ca. 69 MJ/m², UV-C Dosen von ca. 25 MJ/m² und PAR Dosen von ca. 3045 MJ/m² (Tab. 5).

Die von allen BIOMEX Proben akkumulierte Strahlungsdosis, die durch galaktische kosmische Strahlung verursacht wird, also durch Protonen und Elektronen sowie zu

einem kleineren Anteil durch α -Teilchen und schwere Atomkerne (Brunstein & Cline 1966), hängt stark von der Sonnenaktivität ab und schwankt zwischen 68 und 82 μGy pro Tag (Rabbow *et al.* 2017). Die akkumulierten Dosen ionisierender Strahlung, die auf die BIOMEX Proben trafen, liegen am inneren der beiden Strahlungsgürtel der Erde (Protonen der südatlantischen Anomalie, s.o.) zwischen 340 und 844 μGy pro Tag. Am äußeren Strahlungsgürtel (Elektronen, s.o.) werden bis zu 2.960 μGy pro Tag erreicht.

Abgesehen von der Bestrahlung, denen die Flechten während des BIOMEX Projekts ausgesetzt sind, unterliegen die Proben auch sich ständig wiederholenden Temperaturschwankungen (maximal 57,98°C und minimal -20,9°C) und durchlaufen täglich mehrere Tau-Gefrier-Zyklen. Während des BIOMEX Projekts wurden Temperaturen von weit unter -20°C durch ein Beheizungssystem in der EXPOSE-R2 Einheit verhindert, um Störungen der Elektronik in der EXPOSE-R2 Einheit zu vermeiden (Rabbow *et al.* 2017).

Nach einer Expositionsphase von ca. 1,5 Jahren (469 Tagen) wurden die BIOMEX Proben wieder in das Innere der ISS überführt und somit das Experiment beendet. Am 18. Juni 2016 wurden die Proben zurück zur Erde transportiert. Nach der Entfernung aus den einzelnen Trays wurden die BIOMEX Proben, die mit *Buellia frigida* Fragmenten bestückt waren sowie die biogenen Substanzen, zurück nach Düsseldorf transportiert.

Tabelle 4 Experimentelle Bestrahlungsparameter für die in dieser Studie untersuchte Flechte *Buellia frigida* während des BIOMEX Projekts. Die Mittelwerte der Strahlungsdosen wurden durch die Firma RedShift berechnet. UV-A (315-400nm), UV-B (280-315nm), UV-C (100-280nm) und PAR (300-700nm) sind in MJ/m^2 angegeben. Dabei ist die Überlappung der UV-A und der PAR Strahlung zu beachten. Die letzte Zeile zeigt die akkumulierte Strahlung zwischen 200 und 400nm.

	Weltraum-Parameter		P-Mars Parameter		S-Mars Parameter	
	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁷ Pa		10 hPa		10 hPa	
	top	bottom	top	bottom	top	bottom
	MJ/m^2	MJ/m^2	MJ/m^2	MJ/m^2	MJ/m^2	MJ/m^2
Gesamt	6858	-	5843	-	6226	-
UV-A	318 $\pm$ 14%	-	304 $\pm$ 7%	-	363 $\pm$ 6%	-
UV-B	53,3 $\pm$ 20%	-	58,0 $\pm$ 8%	-	69,2 $\pm$ 7%	-
UV-C	18,0 $\pm$ 38%	-	20,8 $\pm$ 18%	-	24,9 $\pm$ 17%	-
PAR	3026 $\pm$ 13%	-	2676 $\pm$ 14%	-	3039 $\pm$ 11%	-
UV ₂₀₀₋₄₀₀	388 $\pm$ 16%	-	383 $\pm$ 8%	-	456 $\pm$ 7%	-

Tabelle 5 Experimentelle Bestrahlungsparameter für die in dieser Studie untersuchten biogenen Substanzen während des BIOMEX Projekts. Die für die Proben akkumulierten Strahlungsdosen wurden durch die Firma RedShift berechnet. Die gezeigten Strahlungsdosen sind Mittelwerte, die aus den einzelnen akkumulierten Dosen der verschiedenen Proben gebildet wurden. UV-A (315-400nm), UV-B (280-315nm), UV-C (100-280nm) und PAR (300-700nm) sind in MJ/m² angegeben. Dabei ist die Überlappung der UV-A und der PAR Strahlung zu beachten. Die letzte Zeile zeigt die akkumulierte Strahlung zwischen 200 und 400nm.

Mars-Parameter		
10 hPa		
	top	bottom
	MJ/m ²	MJ/m ²
Gesamt	6223 ± 5,68%	0
UV-A	366 ± 6,5%	-
UV-B	69 ± 6,5%	-
UV-C	25 ± 6,5%	-
PAR	3045 ± 5,7%	-
UV ₂₀₀₋₄₀₀	459 ± 6,7%	-

2.2.2 Mission Ground Reference

Mit einer im Vergleich zum BIOMEX zeitlichen Verzögerung von etwa zwei Monaten wurde in Köln ein zusätzliches Experiment durchgeführt. Entsprechend der von der ISS übermittelten Daten wurde ein zweites Set von Proben in Simulationskammern am Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt gegenüber simulierten Weltraumbedingungen exponiert (Mission Ground Reference, kurz: MGR). Dazu wurde ein im Vergleich zu den Weltraum-exponierten Proben identisches zweites Set an Proben (top und bottom der rock, P-Mars und S-Mars Proben) in Nachbildungen der Trays der EXPOSE-R2 Einheit integriert. Die Trays der zweiten Reihe aus Compartment 1 und 2 (Mars Proben und biogene Substanzen) wurden (identisch zu den BIOMEX Proben) mit Mars-Atmosphäre befüllt (Zusammensetzung und Druck s.o.) Die Umweltparameter der „echten“ BIOMEX Proben wurden für die MGR, soweit technisch möglich, nachgestellt (Rabbow *et al.* 2016a, 2016b). Dabei wurden neben der Expositionsphase für die MGR auch Umweltparameter anderer Phasen des BIOMEX Experiments, beispielsweise die Lagerung der Proben innerhalb der ISS, nachgestellt. Die Weltraum-Parameter, die für die MGR simuliert werden konnten, umfassen:

- Temperatur-Simulationen:

Die Temperaturen, denen die BIOMEX Proben während des ca. 19-tägigen Transports zur Startrampe der Rakete in Baikonur ausgesetzt waren, wurden auch für die MGR Proben in Köln nachgestellt. Für den Zeitraum vor der Exposition, in dem die BIOMEX Proben innerhalb der ISS gelagert wurden, stehen keine detaillierten Temperaturdaten zur Verfügung. Dennoch wurde dieser Zeitraum durch Simulation der Innentemperatur der ISS (23°C) nachgestellt. Entsprechend der Temperaturdaten, die während der Expositionsphase durch die Sensoren der EXPOSE-R2 übermittelt wurden*, wurden die Proben der MGR erwärmt bzw. abgekühlt. Für die Dauer zwischen der Rückkehr der BIOMEX Proben ins Innere der ISS und dem Rücktransport zur Erde wurde entsprechend wieder die Innentemperatur der ISS für die Simulationsexperimente in Köln gewählt. Letztlich wurden auch die Temperaturen, die die BIOMEX Proben während der Rückkehr der Proben auf die Erde und anschließend zum DLR erfuhren, für die MGR simuliert.

*Für einen Zeitraum von 63 Tagen liegen aufgrund von Überhitzung durch Sonneneinstrahlung und einem technischen Defekt keine Temperaturdaten vor.

- Druck-Simulationen:

Die Simulation der Vakuum-Bedingungen bzw. des niedrigen atmosphärischen Drucks der Mars-Atmosphäre der BIOMEX Proben konnten ebenfalls für die MGR Proben nachgestellt werden. Für die rock Proben wurde der Luftdruck zwischen 1×10^{-5} und 6×10^{-5} Pa nachgestellt. Der Druck der Mars-Proben wurde zwischen $1,4 \times 10^{-3}$ und $1,4 \times 10^{-4}$ Pa simuliert.

- UV-Bestrahlungssimulationen (200-400nm):

Die durch die Firma RedShift für die jeweiligen Proben ermittelten Strahlungswerte biologisch relevanter UV-Wellenlängen von 200 bis 400nm wurden ebenfalls am DLR für die MGR Proben nachgestellt. Als UV-Strahlungsquelle wurde eine Deuteriumlampe (Heraeus D200 F) verwendet. Die für die MGR simulierten Strahlungsdosen entsprechen den in Tabelle 4 aufgeführten Mittelwerte. Jedoch ist die gesamte Bestrahlungszeit der MGR Proben aufgrund der Bestrahlung mit der Deuteriumlampe im Vergleich zu den BIOMEX Proben der ISS deutlich verkürzt.

- Sonneneinstrahlung:

Die Simulation des Sonnenlichts wurde entsprechend des variierenden Sonnenspektrums nachempfunden. Da für die BIOMEX Proben auf der ISS die Einstrahlung von Licht mit einer direkten Temperaturerhöhung der Proben einherging, wurde die Bestrahlung der

MGR-Proben zeitgleich mit der simulierten Temperaturerhöhung durchgeführt. So wurden die Vorgänge auf der ISS möglichst genau nachgestellt.

Weltraum-Parameter, die für die simulierte Behandlung der MGR aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht simuliert wurden, umfassen:

- Start und Landung der Rakete/Kapsel (Vibrationen, Aufprall)
- Ionisierende Strahlung
- UV-Bestrahlung mit Wellenlängen <200nm
- Mikrometeoriten-Einschläge

Die Durchführung der MGR am DLR in Köln startete am 28. August 2014 und endete am 16. August 2016.

2.2.3 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Die Raster-Elektronenmikroskopie (REM) wurde angewendet, um die BIOMEX Flechtenproben bezüglich morphologischer Veränderungen nach der Weltraumexposition zu untersuchen. Aufgrund der sehr geringen Probenmenge wurde für die REM nur je ein Fragment bzw. eine Lobe jeder Probe (top und bottom von rock, P- und S-Mars Proben sowie der Frischkontrolle) unter sterilen Bedingungen von den Pellets entfernt und isoliert. Die Hälfte jedes isolierten Flechtenfragments wurde vor der Untersuchung am REM mit einem Gefriermikrotom (Reichert-Jung, Deutschland) in 120µm dicke Schnitte zerteilt. Während die Anfertigung dieser Schnitte einen Einblick in die innere Struktur der Flechtenproben erlaubt, ermöglicht die intakte Hälfte eine Analyse der Flechtenoberfläche. Die vorbereiteten Proben (Schnitte und halbe Löbchen) wurden auf speziellen Probenhaltern befestigt und für 24h unter vakuumierten Bedingungen gelagert, bevor sie mit einer dünnen Goldschicht besputtert wurden. Für jede Probe wurden zwischen 4 und 9 Bilder am REM (LEO1430VP, LEO Electron Microscopy Ltd) aufgenommen und anschließend manuell bezüglich visueller Schäden ausgewertet.

2.2.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Um ultrastrukturelle Veränderungen der BIOMEX Flechtenproben nach Weltraum-Exposition zu analysieren, wurden die Proben am Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) untersucht. Auch hier wurde wegen der geringen BIOMEX Probenmenge nur ein Fragment bzw. eine Lobe jeder Probe (top und bottom von rock, P- und S-Mars Proben sowie eine Frischkontrolle) untersucht. Unter sterilen Bedingungen wurde jeweils ein Fragment der verschiedenen Proben von den verschiedenen Pellets entfernt und isoliert,

anschließend in 2,5% Glutaraldehyd (200nm Cacodylat-Puffer) fixiert und in 4%iger Osmiumsäurelösung (OsO₄, 0,8% Kaliumferrocyanid) kontrastiert. Die auf diese Weise vorbereiteten Flechtenproben wurden in Harz (Epon812) eingebettet und getrocknet. Aus den Harz-Blöcken konnten für jede Probe ultradünne Querschnitte (100nm) angefertigt und am Transmissions-Elektronenmikroskop (Zeiss E902) untersucht werden. Am TEM wurden für jede Probe zwischen 10 und 35 Bilder aufgenommen werden. Die Sichtung und Auswertung sichtbarer ultrastruktureller Schäden (z.B. kollabierte Protoplasten) wurde manuell durchgeführt.

2.2.5 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Technik

Die DNA-Integrität der einzelnen BIOMEX Proben wurde durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit zufällig amplifizierten polymorphen DNA Fragmenten (randomly amplified polymorphic DNA, kurz: RAPD) untersucht. Die RAPD-PCR Methode basiert auf der Amplifikation von genomischer DNA mittels kurzer Primer (10 Basenpaare Länge), die eine zufällige Nukleotid Sequenz aufweisen, sodass sie sich an mehreren Stellen an die genomische DNA anlagern können (Atienzar *et al.* 2002). Während der PCR entstehen so, je nach Primer und Organismus, in ihrer Länge variable PCR-Fragmente, die aber für die einzelnen Proben reproduzierbar sind. Durch eine Gelelektrophorese, in der die PCR Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden, entsteht so für jeden Organismus ein individuelles und spezifisches Bandenmuster.

Das organismusabhängige, spezifische RAPD-Bandenmuster kann genutzt werden, um Informationen über die DNA-Integrität einer Probe im Vergleich zu einer ungeschädigten Kontrolle zu erhalten. Durch eine verminderte DNA Integrität kann die Anlagerung der Primer an die DNA beeinflusst oder die Aktivität der DNA Polymerase gestört werden, was die Synthese der PCR Fragmente beeinflussen kann (Atienzar *et al.* 2000). Dadurch können bei Organismen mit geschädigter DNA im Vergleich zur Frischkontrolle untypische und veränderte Bandenmuster entstehen. Die RAPD-PCR wurde bereits erfolgreich angewendet, um Analysen von durch UV- oder Röntgenstrahlen induzierte DNA Schäden z.B. in Pflanzen und Makroalgen nachzuweisen (Kuroda *et al.* 1999; Atienzar *et al.* 2000).

Für die RAPD-PCR Analyse der BIOMEX Proben wurde je ein Flechtenfragment bzw. eine Lobe der rock, P- und S-Mars Proben (top und bottom) sowie von der Frischkontrolle

unter sterilen Bedingungen entfernt und isoliert. Die DNA aus diesen Proben wurde anschließend mittels CTAB (Cetyl-trimethylammonium Bromid) Extraktion isoliert. Dazu wurde jede Probe in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und unter Zugabe von 500µl CTAB Puffer und einer Spatelspitze Quarz-Sand (VWR, Sand für Analysen, 0,4-1,0mm Körnchengröße) mit einem Pistill für zwei Minuten gemörsert. Dann wurden jeweils 8,3µl 2-Mercaptoethanol und 50µl Proteinase K hinzugegeben. Nach einer anschließenden Inkubationszeit von 30min bei 55°C wurden zu jeder Probe 250µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben. Durch vorsichtiges Invertieren wurden die Proben gemischt. Es folgte eine fünf minütige Zentrifugation bei 13.000rpm. Die obere Phase jeder Probe wurde in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und mit jeweils 50µl Ammonium-Azetat (7,5M) und 500µl kalten Ethanol (100%ig, -20°C) versetzt. Nach einer gründlichen Durchmischung der Proben wurden diese für 60min bei -20°C abgekühlt. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt (5min, 13.000rpm), dessen Überstand jeweils verworfen wurde. Nach erneuter Zugabe von 50µl Ammonium-Azetat und 500µl kaltem Ethanol wurde wiederum zentrifugiert (5min, 13.000rpm). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde jeweils in 25µl TE Puffer gelöst und der DNA Gehalt mittels NanoDrop Spektralphotometer (ND1000, peqLab) ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die RAPD-Analysen der BIOMEX Proben fünf verschiedene Primer verwendet (die Primersequenzen sind in Tab. 6 dargestellt). Dabei wurden Primer OPAJ04 und Primer 4 sowie Primer OPA11 und OPA03 jeweils zusammen in einem RAPD-PCR Ansatz benutzt. Der Primer 2 wurde ohne Zugabe eines zweiten Primers für die RAPD verwendet. Jeder RAPD-PCR Ansatz wurde mit einem Gesamtvolumen von 25µl wie folgt angesetzt:

Primer	5µl/2x 2,5µl
Jumpstart*	12,5µl
ddH ₂ O	6,5µl
DNA Extraktionsprodukt	100ng DNA/1µl

*JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix for PCR, Sigma

Jeder RAPD-PCR Ansatz wurde für jede BIOMEX Probe sowie für die Frischkontrolle jeweils zwei mal angesetzt und durchgeführt. Die vorbereiteten PCR-Tubes wurden in einen Thermocycler (Biometra PCR T-Gradient, Whatman) eingesetzt. Der PCR-Prozess

wurde mit folgenden Parametern durchgeführt und umfasst 45 Schleifen, die jeweils aus Denaturierung, Annealing und Elongationsphase bestehen:

Initiale Denaturierungsphase	95,0°C	5min
Denaturierung	95,0°C	1min
Annealing	40,7°C	1min
Elongation	73,0°C	2min

10µl von jedem PCR Produkt wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1%igem Agarosegel für 1,5h unter 80V der Größe nach aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht fotografiert. Die Auswertung der erzeugten RAPD-Profile und die Bewertung der genomischen Integrität der BIOMEX Proben wurde nach Atienzar *et al.* (2000) durchgeführt. Jeder beobachteten Veränderung im RAPD-Profil der BIOMEX Proben (Erscheinen von neuen Banden, Verschwinden von Kontrollbanden, schwächere oder stärkere Bandenintensitäten im Vergleich zum Kontrollprofil) wurde in einem willkürlichem Bewertungssystem ein Punkt (+1) zugerechnet (Atienzar *et al.* 2000).

Tabelle 6 Sequenzen der fünf verschiedenen Primer (à 10 Basenpaaren), die für die RAPD-PCR der BIOMEX Proben verwendet wurden. Alle hier aufgelisteten Primer wurden bereits in früheren Studien zur Untersuchung von Flechten DNA verwendet (Kranter *et al.* 2005).

Primer	Sequenz
Primer 2	5'-GTTTCGCTCC-3'
Primer 4	5'-AAGAGCCCGT-3'
OPA03	5'-AGTCAGCCAC
OPAJ04	5'-GAATGCGACC
OPA11	5'-CAATCGCCGT

2.2.6 Konfokale Laser Mikroskopie

Die Konfokale Laser Mikroskopie (CLSM) wurde verwendet, um Informationen über den Vitalitätszustand der Proben von *Buellia frigida* zu erhalten. Für die Analyse wurde unter sterilen Bedingungen je ein Flechtenfragment bzw. eine Lobe von jedem unterschiedlichen experimentellen Versuch (top und bottom von rock, P- und S-Mars) von den jeweiligen Pellets entfernt und isoliert. Die isolierten Fragmente wurden über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend wurden mittels Gefriermikrotom (Reichert Jung, Deutschland) 120µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnittebene wurde in der Regel

vertikal zur Thallusoberfläche gewählt, sodass für jede Probe zwischen sechs und zwölf Schnitte produziert wurden. Das präparierte Flechtenmaterial wurde mit zwei verschiedenen LIVE/DEAD Färbemitteln behandelt, die im Folgenden beschrieben werden. Für die beiden Färbungen konnten von jeder Probe (top und bottom von rock, P-Mars und S-Mars) jeweils zwischen sechs und zehn Bilder aufgenommen und zwischen 1.385 und 8.487 Mycobiontenzellen bzw. zwischen 764 und 4.580 Photobiontenzellen bezüglich ihrer Vitalitätszustände manuell ausgewertet werden (vgl. Brandt *et al.* 2015).

2.2.6.1 LIVE/DEAD Färbung mit FUN[®]1

Der erste Farbstoff, mit dem das vorbereitete Flechtenmaterial gefärbt wurde, ist FUN[®]1 (Molecular Probes, Oregon, USA). Durch das Anfärben der Zellen mit dieser Substanz können metabolisch aktive (lebende) und inaktive (tote) Zellen optisch voneinander unterschieden werden. Durch Kontakt der Flechtenfragmente mit dem Farbstoff diffundiert dieser zunächst in jede Zelle hinein und markiert sie mit einer hellen, diffusen, gelblich-grünen Fluoreszenz. In metabolisch inaktiven Zellen wird der Farbstoff nicht weiter verstoffwechselt und die Fluoreszenzeigenschaften bleiben unverändert. Ausschließlich metabolisch aktive Zellen sind dazu in der Lage den Farbstoff aktiv in ihre Vakuolen zu transportieren und dort zu deponieren. Durch den pH-Wert in der Vakuole verändern sich die Fluoreszenzeigenschaften des dort gelagerten Farbstoffs zu einem orange-roten Farbton. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzen von FUN[®]1 in metabolisch aktiven und inaktiven Zellen können diese optisch voneinander unterschieden werden. (Molecular Probes, Produkt Information 2004).

Der FUN[®]1 Farbstoff wurde entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet: 1,5µl FUN[®]1 wurden in 0,5ml HEPES Puffer gelöst. 40µl der hergestellten Färbelösung wurden direkt auf die präparierten Flechtenschnitte gegeben und im Dunkeln für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Auswertung wurden die gefärbten Proben am Konfokalen Laser Mikroskop (CLSM, Carl Zeiss LSM 710) untersucht. Der Farbstoff wurde dazu mit einem Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt. Die grüne Fluoreszenz metabolisch inaktiver Zellen wurde durch einen Breitband-Filter zwischen 505 und 550nm detektiert, die rote zwischen 575 und 615nm. Zusätzlich zur Detektion der Farbstoff-Fluoreszenz wurde die Autofluoreszenz des Chlorophylls der Photobionten mit einem Breitband-Filter zwischen 660 und 750nm aufgenommen.

2.2.6.2 LIVE/DEAD Färbung mit SYTO[®]9/Propidiumjodid

Der zweite Farbstoff, der zur Vitalitätsanalyse der BIOMEX Flechtenproben verwendet wurde, ist *BacLight*[™]. Dieser ursprünglich für Bakterien entwickelte Marker wurde bereits erfolgreich bei Untersuchungen mit Flechten angewendet (z.B. Sancho *et al.* 2007). *BacLight*[™] ist eine Kombination zweier Farbstoffe: SYTO[®]9 und Propidiumjodid. Das Propidiumjodid zeichnet sich durch rote Fluoreszenzeigenschaften aus. Es dringt ausschließlich durch beschädigte Membranen in Zellen ein. Aufgrund der nicht vorhandenen Membranintegrität werden rot fluoreszierende Zellen als “tote Zellen” gewertet. Der SYTO[®]9 Farbstoff färbt jede Zelle im Flechtengewebe an und lässt sich durch eine grüne Fluoreszenz darstellen. Ausschließlich grün fluoreszierende Zellen werden als “lebende Zellen” gewertet.

Für die Färbung mit *BacLight*[™] wurde das Herstellerprotokoll befolgt (Molecular Probes, Produkt Information 2004). Dazu wurden 1,5µl SYTO[®]9 und 1,5µl Propidiumjodid in jeweils 1ml HEPES Puffer gelöst. Die vorbereiteten Flechtenschnitte wurden mit 20µl beider Lösungen versetzt und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Auswertung der Färbung wurden die Proben am CLSM mit zwei Lasern (488nm Argon, 543nm) angeregt. SYTO[®]9 wurde mit einem Breitband-Filter zwischen 475 und 525nm detektiert. Die Fluoreszenz von Propidiumjodid wurde mit einem Breitband-Filter zwischen 575 und 615nm detektiert. Zusätzlich wurde die Autofluoreszenz des Chlorophylls der Photobionten durch einen Breitband-Filter zwischen 660 und 750nm aufgenommen.

2.2.7 Chlorophyll *a* Fluoreszenz Messungen

Um die Auswirkungen der Weltraum- und Mars-ähnlichen Bedingungen auf den Vitalitätszustand der Flechte *Buellia frigida* zu untersuchen, wurden Analysen des Photosystem II (PSII) durchgeführt. Aufgrund des geringen BIOMEX Probenmaterials wurde jeweils eine Lobe bzw. ein Fragment von den rock, P- und S-Mars Pellets (top und bottom) sowie von der Frischkontrolle vorsichtig und unter sterilen Bedingungen vom Substrat entfernt. Die Aktivität des Photosyntheseapparats wurde durch Messungen der Chlorophyll *a* Fluoreszenz detektiert. Dazu wurde ein Mini Puls Amplituden Modulation (PAM) Fluorometer (Heinz Walz Mess- und Regeltechnik GmbH, Deutschland) verwendet. Die Quantenausbeute (engl. Quantum Yield, QY), die durch das Fluorometer gemessen werden, werden durch folgender Berechnung angegeben:

$$F_v/F_M = (F_M - F_0)/F_M$$

Dabei ist F_0 ist die minimale Fluoreszenzausbeute, die unter schwachem Licht bestimmt wird. F_M ist die maximale Fluoreszenzausbeute, die während eines sättigenden Lichtimpulses ($5000 \text{ mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ermittelt wird (Jensen 2002). F_v steht für die variable Fluoreszenzausbeute (Schreiber *et al.* 1994). Die Methode der Chlorophyll *a* Fluoreszenz ist in der Lichenologie etabliert, unter anderem um die Vitalität von Flechten nach (simulierter) Weltraum-Exposition zu untersuchen (de la Torre *et al.* 2004, 2007; de Vera *et al.* 2010; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012; Meeßen *et al.* 2014b; Brandt *et al.* 2015, 2016).

Zur Reaktivierung photosynthetischer Prozesse wurden die BIOMEX Proben mit Leitungswasser besprüht. Um osmotischen Stress in den Zellen zu vermeiden, wurde hier kein destilliertes Wasser verwendet. Die Chlorophyll *a* Fluoreszenz der Proben wurde unmittelbar nach der Befeuchtung (0 min) sowie nach Regenerationszeiten von 2, 5 10, 30 und 60min und nach bis zu 50 Tagen gemessen. Die Flechtenfragmente wurden unter kontrollierten Bedingungen (8°C 14/10h Tag/Nacht Rhythmus, Lichtbedingungen von $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) gelagert und jeweils morgens befeuchtet. 60min nach der Befeuchtung wurden die Proben mittels PAM untersucht und anschließend über Nacht unter den oben genannten Bedingungen langsam getrocknet. An einigen der untersuchten Proben entwickelten sich während der Versuchsdauer sichtbare Kontaminationen (z.B. Fremdpilze). Diese wurden vorsichtig mittels Spritzen und Ethanol-Tupfern von den betroffenen Flechtenfragmenten entfernt.

2.2.8 Kulturversuche der Symbiose-Partner

In den Kulturversuchen sollte getestet werden, ob die einzelnen Symbionten der Flechte *Buellia frigida* nach 1,5 Jahren im Weltall noch die Fähigkeit zur Zellteilung und Koloniebildung besitzen. Von jeder der verschiedenen experimentellen BIOMEX Proben (rock, P-Mars, S-Mars) sowie von der Frischkontrolle wurde dazu ein Thallusfragment unter sterilen Bedingungen von den unterschiedlichen Substraten entfernt. Für den Kultivierungsversuch wurden beide Symbionten (Myco- und Photobiont) einzeln aus den präparierten Thallusfragmenten isoliert (nach Yoshimura *et al.* 2002) und auf geeignetes Medium übertragen. Insgesamt konnten für jede der Proben (top und bottom von rock, P-Mars und S-Mars) zwischen 9 und 23 PB-Zellproben auf Trebouxia-Organic Medium (TOM, s. Tab. 7) und auf BG11 Medium (Tab. 8) sowie zwischen 9 und 16 MB-Zellproben auf Malz-Hefe Extrakt Medium (MY, Tab. 9) übertragen werden. Die

isolierten Zellen wurden für drei Monate bei 8°C unter niedrigen Lichtbedingungen ($20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und unter einem 14/10h Tag/Nacht Rhythmus kultiviert. Wachstumsprozesse wurden täglich beobachtet und auftretende Kontaminationen wurden mittels Spritzen und Ethanol-Tupfern unter sterilen Bedingungen entfernt.

Tabelle 7 *Trebouxia*-Organic-Medium (TOM)
(nach Ahmadjian 1967).

Stoff	Menge
NaCl	25mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75mg
KNO ₃	500mg
(NH ₂) ₂ HPO ₄	250mg
Glc-Monohydrat	11g
Proteosepepton	10g
HEPES	715mg
Thiamin	10mg
Biotin	1mg
B ₁₂	0,2mg
Nicotinsäure	0,1mg
H ₃ BO ₃	11,42mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,44mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,28mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0,84mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,57mg
Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	0,49mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	4,98mg
NaEDTA x 2 H ₂ O	6,66mg
Agar	20g

in 1000ml ddH₂O lösen,
pH auf 5,5 einstellen.

Tabelle 8 Rezeptur des BG11 Mediums.

Stoff	Menge
1. Ansatz:	
Na ₂ MG EDTA	100mg
Ammonium-Eisen III-Citrat	600mg
Citronensäure • 1H ₂ O	600mg
CaCl ₂ • 2H ₂ O	3,6g
mit ddH ₂ O auf 1000ml auffüllen	
2. Ansatz:	
MgSO ₄ • 7H ₂ O	7,5g
mit ddH ₂ O auf 1000ml auffüllen	
3. Ansatz:	
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	4g
mit ddH ₂ O auf 1000ml auffüllen	
4. Ansatz:	
H ₃ BO ₃	2,86g
MnCl ₂ • 4H ₂ O	1,81g
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	222mg
CuSO ₄ • 5H ₂ O	79mg
COCl ₂ • 6H ₂ O	5mg
NaMoO ₄ • 2H ₂ O	391mg

mit ddH₂O auf 1000ml auffüllen, von den
Ansätzen 1-3 jeweils 10ml zusammenführen.
Dazu noch 20 mg Na₂CO₃ und 45mg NaNO₃
hinzugeben.

Tabelle 9 Malz-Hefe-Extrakt Agar (MY-Medium) (nach Adhmadjian 1993).

Rezeptur:

Malz Extrakt	20g
Hefe Extrakt	2g
Agar	20g

in 1000ml ddH₂O lösen, pH auf 5,6 einstellen.

2.2.9 Sporulationsversuche

Buellia frigida bildet Apothecien aus, daher kann die Vermehrung dieses Organismus durch generative Sporen vorausgesetzt werden (Kappen 1997). Um die Fähigkeit zum Ausstreuen der Sporen durch die Fruchtkörper sowie die Sporulations- und Wachstumsfähigkeit der Sporen nach Weltraum-Exposition zu überprüfen, wurden zwischen drei und elf Fruchtkörper aus den Thallusfragmenten jeder BIOMEX Probe (top und bottom von rock, P-Mars und S-Mars) sowie von der Frischkontrolle isoliert. Die präparierten Apothecien wurden an der Unterseite der Deckel von Petrischalen befestigt, die mit MY Medien ausgegossen wurden. Die Apothecien wurden so angebracht, dass ausgeschleuderten Sporen auf die Oberfläche des Agars fallen. Eine erfolgreiche Sporulationsfähigkeit der verschiedenen Proben konnte entsprechend durch einzelne auf dem Agar liegenden Sporen nachgewiesen werden. Die präparierten Apothecien wurden während des Sporulationsversuchs bei 8°C unter Lichtbedingungen von $20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und unter einem 14/10h Tag/Nacht Rhythmus in einer Wachstumskammer (Rubarth Apparate GmbH, Deutschland) gelagert. Die Experimente zur Überprüfung der Sporulationsfähigkeit wurden für einen Zeitraum von vier Wochen regelmäßig beobachtet und überprüft.

In einem weiteren Experiment, das ausschließlich die Keim- und Wachstumsfähigkeit der Sporen testen sollte, wurden einzelne Sporen aus den Fruchtkörpern der verschiedenen Proben isoliert und kultiviert. Dazu wurden von jeder BIOMEX Probe je ein Apothecium am Gefriermikrotom 120µm dicke Schnitte hergestellt. Durch leichtes Aneinanderdrücken zweier Objektträger wurden aus den angefertigten Schnitten Quetschpräparate hergestellt, aus denen am Binokular einzelne Sporen entfernt wurden. Diese wurden dann auf MY Medium übertragen und unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Die einzelnen Sporen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen regelmäßig hinsichtlich Auskeimungsvorgängen überprüft.

2.2.10 Raman-Spektroskopie biogener Substanzen

Durch die Raman-spektroskopische Untersuchung erhält man Informationen über Schwingungs- und Rotationszustände funktioneller Gruppen, die Rückschlüsse auf die Struktur von untersuchten Molekülen zulassen. Dabei wird eine zu untersuchende Probe mit einem intensiven, monochromatischen Laser bestrahlt (532nm). Der größte Teil des einfallenden Laserlichts durchstrahlt die Probe (vgl. Atommodelle nach E. Rutherford). Ein sehr geringer Teil des einfallenden Lichts wird von der bestrahlten Substanz mit der unveränderten Laser-Frequenz gestreut (Rayleigh-Streuung, vgl. Abb. 8b). Der geringste Teil des Laser-Lichtes wird unelastisch durch die Raman-Streuung gestreut (vgl. Abb. 8c, d). Dabei wird durch die Bestrahlung mit dem Laser ein Molekül durch die Absorption von Photonen in einen energetisch angeregten Zustand angehoben. Die angeregte Probe emittiert einen Teil der Energie in Form von Photonen. Die im Molekül verbleibende Energie wird von einzelnen Molekülgruppen durch mechanische Schwingungen absorbiert. Daher haben die emittierten Photonen eine im Vergleich zum Laser unterschiedliche Wellenlänge, wodurch Rückschlüsse auf die Molekülstruktur gezogen werden können. In Tabelle 10 ist eine Übersicht einiger Gruppenschwingungen aufgeführt, die für die Detektion der biogenen Substanzen eine Rolle spielen. Wenig polare Bindungen oder Moleküle mit leicht deformierbaren Elektronenhüllen (z.B. S-H, C=C) sind stärker Raman-aktiv als stark polare Bindungen (Spieß & Klapötke 1999).

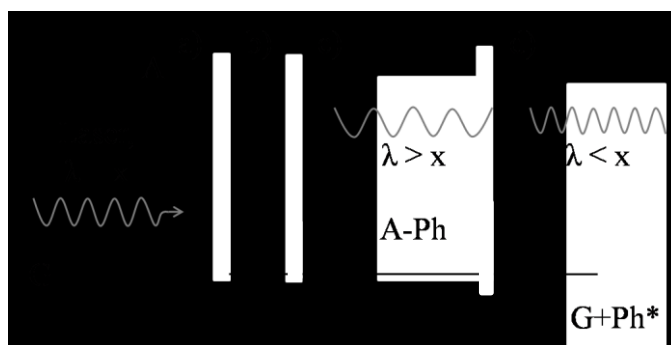


Abb. 8 Schematische Darstellung des Raman-Prinzips. **a)** Die Probe wird durch die Bestrahlung eines Lasers mit der Wellenlänge $\lambda=x$ vom Grundzustand G in einen energetisch angeregten Zustand A angehoben. **b)** Durch Emission von Photonen (Ph) wird der Grundzustand G wieder erreicht (Rayleigh Streuung). **c)** Durch Emission von Photonen geht die Probe in einen energetischen Zustand über, der über dem Grundzustand liegt (Stokes-Raman-Streuung); die abgestrahlten Photonen haben daher eine längere Wellenlänge λ . **d)** Thermisch angeregte Moleküle können Energie an Photonen abgeben (Ph*) (Anti-Stokes-Raman-Streuung); die abgestrahlten Photonen haben dann eine kürzere Wellenlänge (Energieerhaltung).

Tabelle 10 Übersicht einiger wichtiger Gruppenschwingungen, die in Raman-Spektrogrammen beobachtet werden können von Gruppen, die in den biogenen Substanzen des BIOMEX Projekts enthalten sind. Die Bereiche sind nur Richtwerte! (Quelle: Otting 1952; Spieß 1999).

Gruppe	Schwingungsbereiche (Raman-Shift, cm^{-1})		Schwingungsart
C-C	670-1100		Valenzschwingung
C-O	1000-1250		Valenzschwingung
R-CH ₂ OH	1000-1075		Valenzschwingung
-C-O-C	1060-1150	800-970	Valenzschwingung
R-O-H	1110		
R-C-OH	1100-1210	1680-1740	Valenzschwingung
O-H	1330-1420	650	Deformationsschwingungen
CH ₂	1350-1465	3000-3090	Valenzschwingung
CH ₃	1380 1420-1460	2870 2960	
C=C	1620-1680	1500-1900	Valenzschwingung
C=O	1620-1820		Valenzschwingung
O-H	2500-3750*		Valenzschwingung
C-H	2800-3200		Valenzschwingung
aromat. Ring = CH	3000-3100		Valenzschwingung

*wird oft durch CH Valenzschwingungen überlagert

Zur Detektion der BIOMEX Proben der verschiedenen biogenen Substanzen in den gepressten Mars-Pellets wurde ein Raman-Spektroskop (Witec alpha 300 R-System) verwendet. Das verwendete Raman-Spektroskop verfügt über ein Mikroskop (10x Objektiv), einen piezoelektrisch angetriebenen Scantisch, ein UHTS 300-Spektrometer mit einem ultraschnellen EMCCD-Detektor und einem Nd: YAG-Laser (Festkörperlaser). Die Anregungswellenlänge des verwendeten Lasers liegt bei 532nm (grünes Licht), dessen Leistung für die Untersuchungen der Proben zwischen 0,25mW und 5,0mW variiert wurde. Die Raman-Spektren wurden in einem Intervall von 100 bis 3.800cm^{-1} und mit einer Auflösung von $4\text{-}5\text{cm}^{-1}$ aufgenommen. Um zu überprüfen, ob es in den biogenen Substanzen nach der Rückkehr von der ISS durch die Exposition gegenüber Erdatmosphäre zu Veränderungen der Molekülstruktur kommt, wurden die BIOMEX Proben zunächst unter Sauerstoff-Ausschluss und anschließend unter Erdatmosphäre untersucht. Da die Ergebnisse keinen statistischen Unterschied zwischen Sauerstoffeinfluss und Sauerstoffausschluss in der Detektierbarkeit der Substanzen zeigten, wurden die Datensätze zusammengefasst. Für jede Probe wurden zwischen acht und 18 Linienscans mit jeweils 100 Messpunkte ($\Delta 1\text{s}$) aufgenommen.

Vor Beginn des BIOMEX Projekts wurden Raman-Spektren von den verschiedenen reinen biogenen Verbindungen aufgenommen (Abb. 9). Diese dienen in der vorliegenden Studie zur Charakterisierung und als Referenz für die Raman-Spektren der biogenen Substanzen des BIOMEX Projekts. Zusätzlich wurden die beiden verwendeten Mars-Substrate (P- und S-Mars) und ihre Bestandteile detailliert von Böttger und ihrem Team mittels Raman-Spektroskopie analysiert (Böttger *et al.* 2012).

Das Raman-Spektrum von β -Carotin (Abb. 9a) zeigt mehrere Peaks: zwei große (bei 1159 und 1516 cm^{-1}) sowie einige kleinere (bei 1009, 1189, 1214, 2159, 2311, 2521, 2666 und 3024 cm^{-1}). Diese sind die für β -Carotin charakteristischen Peaks im Raman-Spektrum, anhand derer diese Substanz zweifelsfrei erkannt werden kann. Eine Zuordnung einzelner Peaks bestimmter Schwingungsbereiche im β -Carotin Spektrum kann zu folgenden funktionellen Gruppen vermutet werden (vgl. Tab. 10):

1009 cm^{-1} : Valenzschwingung der Einfachbindung C-C

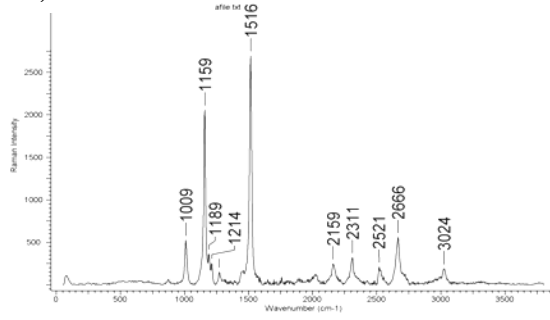
1516 cm^{-1} : Valenzschwingung der Doppelbindung C=C

3024 cm^{-1} : Valenzschwingung der CH₂ Bindung

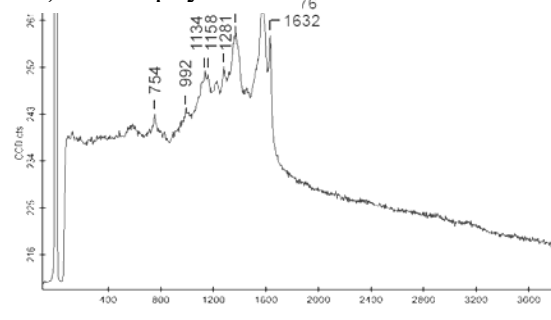
Noch einfacher ist die Zuordnung der Raman-Peaks des Melanin-Spektrums (Abb. 9e), berücksichtigt man die Strukturformel dieses Moleküls (Abb. 5e). Die Peaks bei 1349 cm^{-1} und 1566 cm^{-1} stellen sehr wahrscheinlich die Valenzschwingungen der 5er und 6er Kohlenstoffringe dar.

Die Auswertung der aufgenommenen Raman-Spektren erfolgte mittels automatischer Filterabtastung durch eine Software (Projekt FOUR, WITec focus innovations) und wurde unterstützt durch die manuelle Sichtung jedes einzelnen aufgenommenen Spektrums.

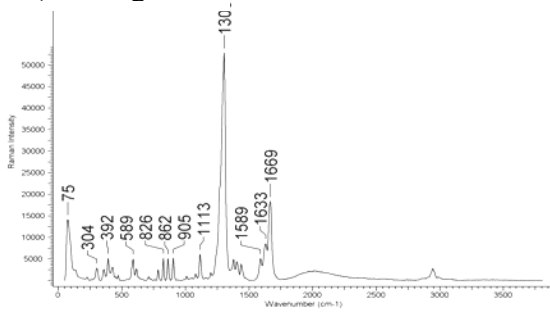
a) β -Carotin



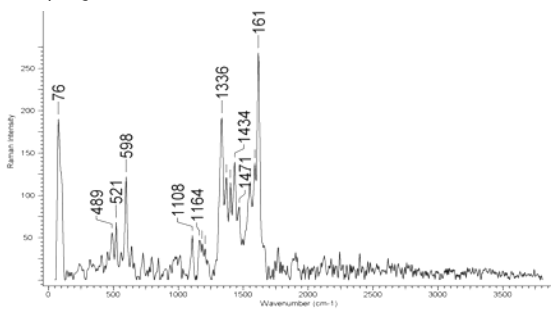
b) Chlorophyllin



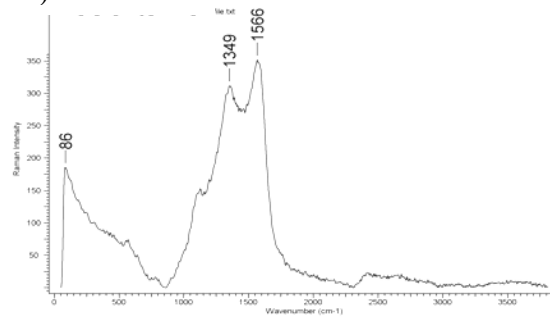
c) Naringenin



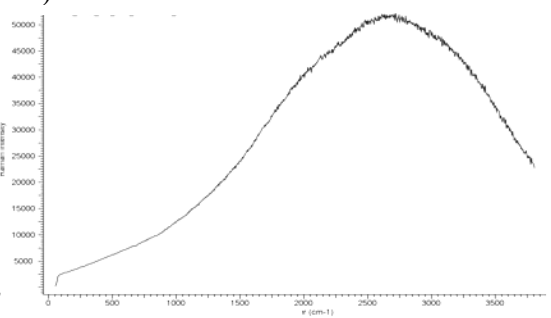
d) Quercitin



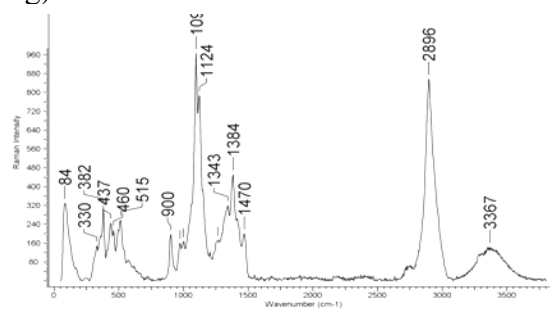
e) Melanin



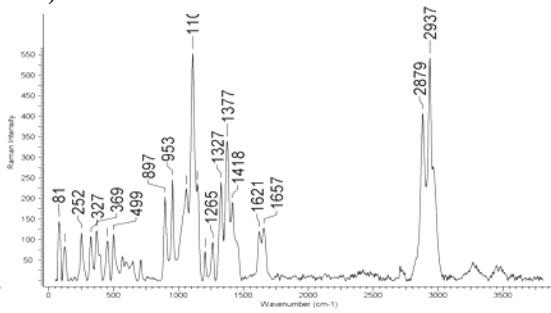
f) Parietin



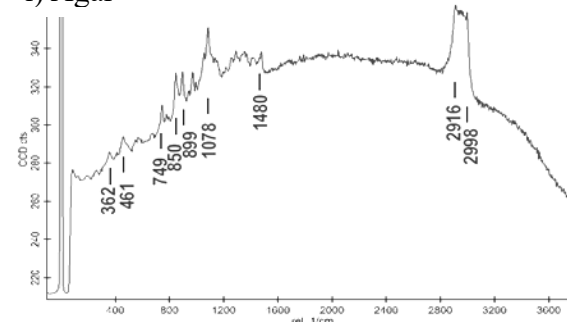
g) Cellulose



h) Chitin



i) Agar



is
n

2.2.11 Bestrahlungsversuch mit monochromatischem UV-C_{254nm}

In dem hier beschriebenen, zusätzlich zum BIOMEX Projekt durchgeführten Experiment wurden die Effekte unterschiedlicher UV-C Expositionszeiten auf die Flechte *Buellia frigida* bei identischen akkumulierten Strahlungsdosen untersucht. Aus der Frischkontrolle, die auch für das BIOMEX Projekt verwendet wurde, wurden Photobionten isoliert und auf TOM Medium übertragen (die Vorgehensweise und die Kulturbedingungen sind unter 3.8 beschrieben). Nach dreiwöchiger Wachstumszeit wurden einzelne Cluster der auf TOM Agar herangezogenen Photobionten jeweils in 80ml flüssiges TOM-Medium übertragen und kultiviert (Rezeptur siehe 3.8, ohne Zugabe von Agar).

Für den Bestrahlungsversuch wurden mit TOM-Agar befüllte Petrischalen jeweils mit neun quadratischen und sterilen Filtern bestückt (1cm², Porendurchmesser 0,44µm, Durapore/Milipore, Deutschland). Pro Filter wurden 0,33ml aus einer flüssigen PB-Kultur entnommen, die für 30s bei 1000rpm abzentrifugiert wurde. Das überständige Medium wurde abgenommen und die verbleibenden Photobiontenzellen wurden mittels Pipette auf jeweils einen Filter aufgetragen. Die Bestrahlung der Proben mit 7J/cm² erfolgte über einen Zeitraum von 4h, 2h oder 15min (mit jeweils n=9) mittels einem Quecksilber-Niederdruckstrahler (OSRAM, UV-C Puritec G13), der monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 254nm erzeugt (>93% der Strahlungsleistung liegen bei 254nm, 1% UV-B, <6% sichtbares Licht). Anschließend wurden die Effekte der UV-C Strahlung auf physiologische Prozesse der Photobionten mittels Chlorophyll *a* Fluoreszenz über einen Zeitraum von insgesamt 10 Tagen ermittelt (siehe 3.7).

III Ergebnisse

3.1 Anatomische Veränderungen (REM)

Die für die Flechte *Buellia frigida* charakteristischen morphologischen Eigenschaften wurden mittels einer Frischkontrolle am REM untersucht. Die Rinde der Krustenflechte ist aus einer Vielzahl kleinerer Lagerfelder (Areolen) und plakoiden Loben zusammengesetzt. Die schwarze Rindenschicht besteht aus einem gallertigen Hyphengeflecht. Die obere Rindenschicht der Frischkontrolle, dessen Oberfläche sehr gleichmäßig und glatt erscheint, können kleinere Fissuren und Risse erkannt werden (Abb. 10 A). Die Mycobionten formen ein zusammenhängendes und relativ dichtes Plektenchym ($\approx$ Geflecht) mit zahlreichen luftgefüllten Hohlräumen zwischen den Hyphenzellen.

Die BIOMEX Proben, die auf der ISS gegenüber Weltraum- oder Mars-analogen Bedingungen exponiert waren, zeigen im Vergleich zur Frischkontrolle eine deutlich veränderte Rindenstruktur. Die Anzahl der Fissuren auf der Thallusoberfläche und der Risse der Rindenschicht ist deutlich erhöht (vgl. Abb. 10 B, E). In einigen BIOMEX Proben konnte auch das Abplatzen der Rinde beobachtet werden, wodurch die darunter liegende Algenschicht frei liegt (vgl. Abb. 10 C, D, F).

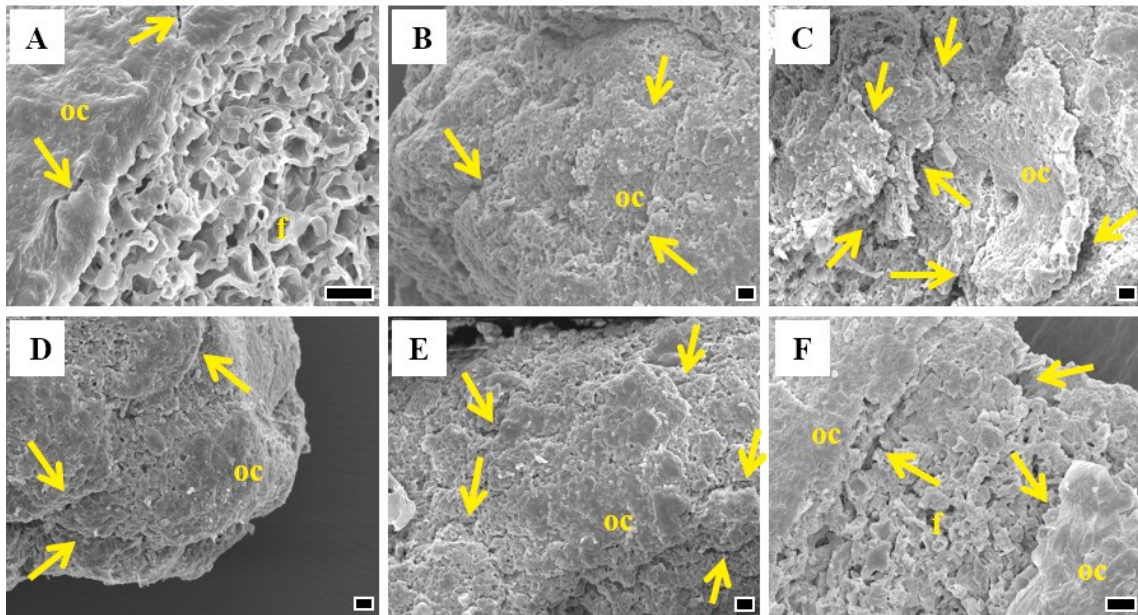


Abb. 10 Raster-Elektronenmikroskop Aufnahmen der Flechte *Buellia frigida*. A) Vakuum-getrocknete Frischkontrolle mit austrocknungsinduzierten Fissuren der Rinde, z.B. Aufbrüche und Veränderungen der Oberflächenstruktur der Rinde (mit Pfeilen markiert). B) bis F) BIOMEX Proben, die Veränderungen der oberen Rindenschicht zeigen, z.B. Aufbrüche und starke Veränderungen der Oberflächenstruktur. B) P-Mars top, C) S-Mars top, D) rock top, E) P-Mars bottom, F) S-Mars bottom. oc- oberer Cortex/Rinde, f- Hyphenzellen. Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10µm.

3.2 Ultrastrukturelle Veränderungen (TEM)

Die Untersuchung der BIOMEX Proben mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop wurde durchgeführt, um die jeweiligen Bionten der Flechtenproben nach der Exposition im Low Earth Orbit (LEO) bezüglich ultrastruktureller Veränderungen zu untersuchen. Für jede der Proben wurden zwischen 59 und 180 Photobionten bzw. zwischen 187 und 315 Mycobiontenzellen ausgewertet.

Die Frischkontrolle zeigt einzellige Photobionten mit jeweils einem großen, zentral gelagerten Protoplasten mit einem zentralen Pyrenoid. Der Protoplast weist an seinen Begrenzungen für *Trebouxia* Arten charakteristische, deutlich gelappte Strukturen auf (Henssen & Jahns 1974) (vgl. Abb. 11 A). Lufträume im Zwischenzellraum, die dem Gasaustausch dienen (Sojo *et al.* 2003), konnten bei jeder untersuchten Probe beobachtet werden. Etwa ein Drittel der Zellen der Frischkontrolle weisen Veränderungen in Form von kollabierten Protoplasten ($30,0 \pm 33,8$ (SD) %) oder deformierten Zellwänden ($2,8 \pm 7,2$ (SD) %) auf (Abb. 12).

Die Photobionten der BIOMEX Proben zeigen nach der Exposition im LEO deutlich höhere Anteile ultrastruktureller Zellschäden (Abb. 11 B, C). Den prozentual höchsten Anteil geschädigter Zellen von 97,9% weisen Photobionten vom S-Mars Pellet des top layers auf (Abb. 12). Die Anteile geschädigter PB für die rock- und P-Mars Proben des top layers liegen bei 83,1% bzw. bei 80,7%. Für die rock bottom Probe wurde der niedrigste Anteil geschädigter Zellen von 74% ermittelt. Für die P-Mars bottom Probe konnten 91,3% und für die S-Mars bottom Probe 91,5% geschädigte Photobiontenzellen ermittelt werden. Unterschiedliche Anteile ultrastruktureller Zellschäden der top layer Proben konnten im Vergleich zum bottom layer nicht beobachtet werden.

Die Ultrastruktur der Mycobionten aus der Frischkontrolle wurde ebenfalls analysiert. Die einzelnen Mycobiontenzellen enthalten typischerweise verschiedene Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Ribosomen, Vakuole). Im Flechtenverbund sind einzelne Mycobiontenzellen durch ihre chitinhaltigen Zellwände miteinander verschmolzen, wodurch lang gestreckte, fädige Strukturen (Hyphen) entstehen. In ihrer Gesamtheit bilden die Mycobiontenzellen ein Pilzmycel aus. Für Mycobionten der Frischkontrolle konnten vereinzelt Abweichungen von der typischen Ultrastruktur der MB Zellen beobachtet werden ($1,1 \pm 1,5$ (SD) % kollabierte Protoplasten und $1,1 \pm 1,9$ (SD) % deformierte Zellwände).

Die Flechtenproben, die auf dem rock-Substrat gegenüber Weltraumbedingungen exponiert wurden, zeigen einen von der Frischkontrolle nur geringfügig abweichenden Anteil geschädigter Mycobiontenzellen (bottom layer: 4,2%, top layer: 6,3%) (Abb. 12). Die Mycobionten der Flechtenproben, die im top und bottom layer auf den beiden künstlichen Mars-Substraten gegenüber simulierten Marsbedingungen auf der ISS exponiert waren, weisen deutlich höhere Anteile ultrastruktureller Zellschäden auf (zwischen 27,1% und 38,5%).

Angemerkt sei, dass sich die Anfertigung ultradünner Schnitte der Flechtenfragmente der P- und S-Mars Pellets (top und bottom) als äußerst schwierig gestaltete, da aufgrund der hohen Anteile ultrastruktureller Schäden die Gewebestruktur der Proben stark beeinträchtigt war und die dünnen Schnitte der Proben sehr instabil waren.

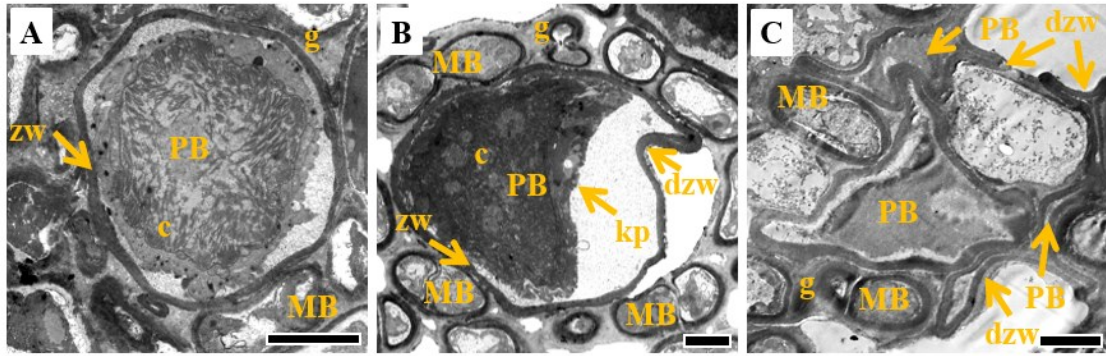


Abb. 11 Aufnahmen vom Transmissions-Elektronenmikroskop von *Buellia frigida* nach Weltraum-Exposition. A) Frischkontrolle mit unbeschädigten Zellen, die für MB und PB typische Ultrastrukturen aufweisen. B) P-Mars bottom, C) S-Mars bottom, B) und C) jeweils mit deutlich veränderten MB und PB Zellen; deformierte Zellwände und eingefallene, kollabierte Protoplasten. PB- Photobiont, MB- Mycobiont, zw- Zellwand, dzw- deformierte Zellwand, c- Chloroplast, g- Gallerte, kp- kollabierter Protoplast. Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2,5µm.

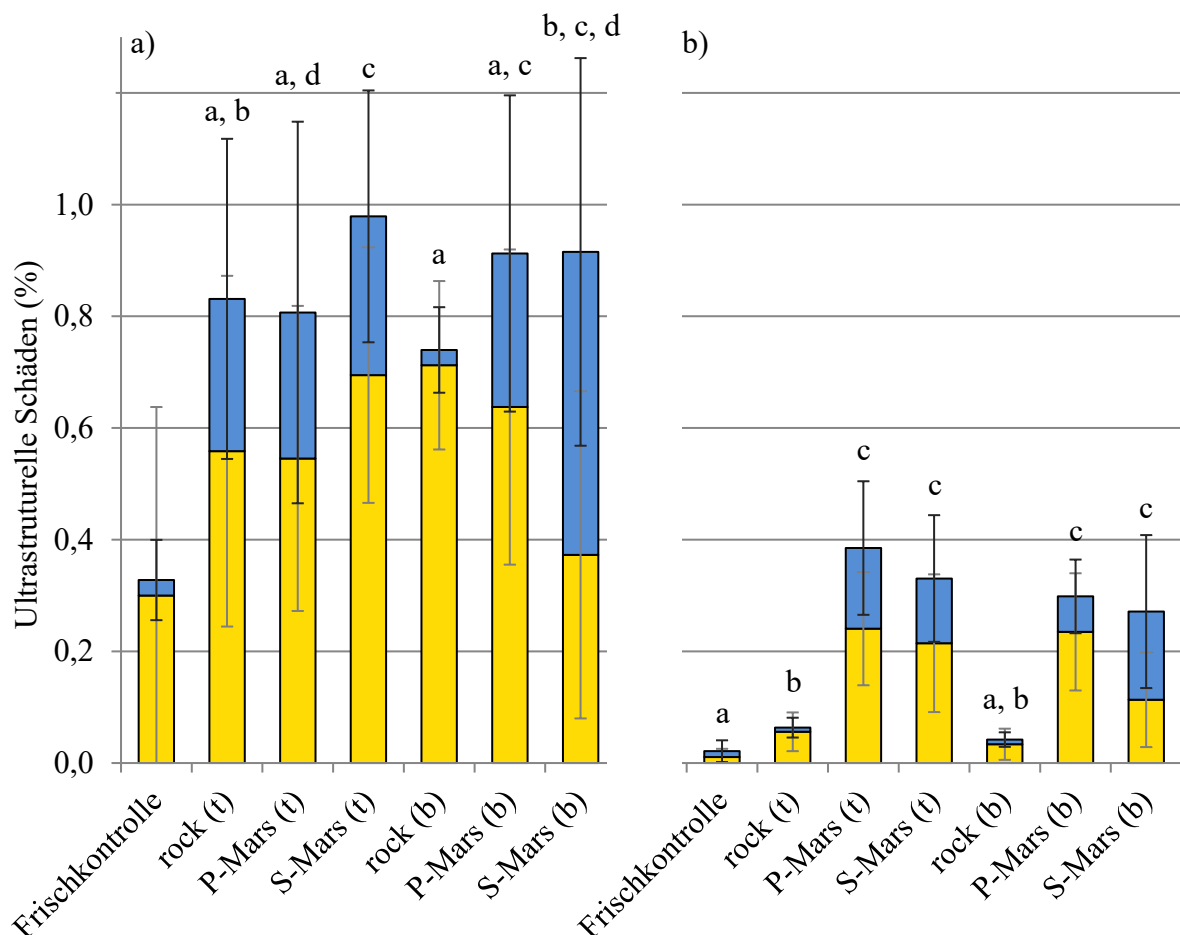


Abb. 12 Ultrastrukturelle Schäden an a) Photo- und b) Mycobionten der Flechte *Buellia frigida*. Gezeigt sind die Schäden der Bionten der Frischkontrolle und der BIOMEX Proben (top (t) und bottom (b) layer der rock, P- und S-Mars Proben) in %. Kollabierte Protoplasten (gelb) und deformierte, eingefallene Zellwänden (blau). Statistik: Zweiseitiger t-Test mit Signifikanzniveau $\alpha=0,05$.

3.3 DNA Integrität

Die Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR wurde durchgeführt, um die BIOMEX Proben bezüglich ihrer DNA-Integrität nach Exposition im Low Earth Orbit (LEO) zu untersuchen. Die RAPD-PCR der Frischkontrolle ergibt, abhängig von den verschiedenen benutzten Primern (Primer 4+OPAJ04, Primer OPA11+OPA03, Primer 2), folgende reproduzierbare und charakteristische Bandenmuster:

Primer	Anzahl amplifizierter Banden	Ungefähre Länge der Banden (in BP)
Primer OPA11 + OPA03	3	700, 420, 80
Primer 4 + OPAJ04	2	680, 420
Primer 2	3	1400 1100, 700

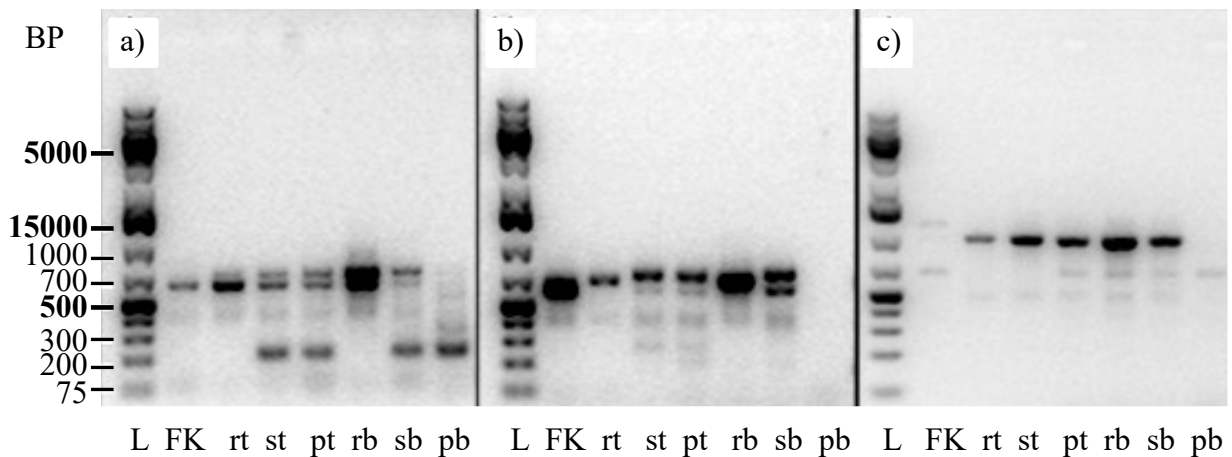


Abb. 13 In einer Gelelektrophorese aufgetrennte RAPD-PCR Produkte aus genomischer DNA von *Buellia frigida*. Aufgetragen sind jeweils (von links nach rechts): Ladder (L), Frischkontrolle (FK), sowie die BIOMEX Proben: rock top (rt), S-Mars top (st), P-Mars top (pt), rock bottom (rb), S-Mars bottom (sb), P-Mars bottom (pb). Dargestellt sind die Gele drei verschiedener RAPD-PCR Ansätze mit a) Primer OPA11 + OPA03, b) Primer 4 + OPAJ04, c) Primer 2.

Wird die RAPD-PCR beispielsweise mit der Primern OPA11 + OPA03 durchgeführt, entstehen drei Banden mit einer Länge von ca. 700, 420 und 80 Basenpaaren (BP) (Abb. 13). Das mittels RAPD-PCR und Gelelektrophorese durch die jeweiligen Primer produzierte Bandenmuster der Frischkontrolle dient als Referenzsystem für die RAPD-Profile der BIOMEX Proben. Im Vergleich zu den Bandenmustern der Frischkontrolle sind in den RAPD-PCR Profilen der BIOMEX Proben Variationen zu erkennen. Allen beobachteten Veränderungen (unterschiedliche Bandenintensitäten, Auftauchen neuer Banden, Verschwinden von Kontrollbanden) wurde in einem willkürlichen Bewertungssystem ein Punkt (+1) zugeordnet (Atienzar *et al.* 2000). In Tabelle 11 ist

entsprechend dieses Rankings eine Übersicht der beobachteten Veränderungen der BIOMEX Profile dargestellt. Beispielsweise weist die RAPD-PCR der rock Probe des top layers, die mit den Primern OPA11+OPA03 durchgeführt wurde, im Gelbild noch drei Banden auf (bei ca. 420, 700 und 800BP Größe, vgl. Abb. 13a). Die Banden bei ca. 420BP und 700BP Größe sind auch in der zugehörigen Frischkontrolle zu erkennen (vgl. Abb. 13a). Die Bande bei ca. 420BP Größe bleibt unverändert (dafür gibt es 0 Punkte im Ranking). Die ca. 700BP große Bande erscheint viel deutlicher und intensiver als die entsprechend gleiche Bande der Frischkontrolle. Daher wird der Tabelle unter der Kategorie "c" (=stärkere Bandenintensität) ein Wert von +1 zugerechnet. Die Frischkontroll-Bande bei 80BP Größe konnte mit der genomischen DNA der rock top Probe nicht mehr amplifiziert werden. In der Tabelle wird daher für die rock top Probe unter der Kategorie "b" (=Verschwinden von Banden) ein Wert von +1 verzeichnet. Außerdem kann für die rock top Probe bei ca. 800BP eine zusätzliche Bande erkannt werden, die in der Frischkontrolle nicht zu sehen ist. In der Tabelle wird daher unter der Kategorie "a" (Erscheinen neuer Banden) ein Punkt (+1) notiert. Aufaddiert ergibt sich für die genomische DNA der rock top Flechtenprobe durch die RAPD-PCR mit den Primern OPA11+OPA03 ein Wert von 3. Insgesamt ergibt sich anhand der drei RAPD-PCR Profile für jede BIOMEX Probe ein relativer Wert bezüglich der DNA-Integrität (letzte Spalte, Total). Je höher dieser Wert ist, desto größer ist der Grad der DNA-Schädigung. Für die BIOMEX Proben aus dem top layer konnten bezüglich der DNA-Integrität Werte von 10 (rock und S-Mars) und 11 (P-Mars) ermittelt werden. Die Werte des bottom layers liegen unter denen des top layers bei 8 (S-Mars) und 9 (rock und P-Mars).

Tabelle 11 Bewertung der RAPD-PCR Profile der genomischen DNA der BIOMEX Proben im Vergleich zur Frischkontrolle, durchgeführt mit den Primern OPA11+OPA03, Primer4+OPAJ04 und Primer2. Jeder beobachteten Veränderung wurde in einer willkürlich gewählten Skala ein Punkt (+1) zugerechnet (vgl. Atienzar *et al.* 2000). a- Erscheinen neuer Banden, b- Verschwinden von Kontrollbanden, c- stärkere Bandenintensität, d- schwächere Bandenintensität sowie insgesamt beobachtete, aufaddierte Veränderungen (Total).

		OPA11 + OPA03					Primer4 + OPAJ04					Primer2					
		Banden	a	b	c	d	Banden	a	b	c	d	Banden	a	b	c	d	Total
Frischkontrolle		3					2					3					
top layer	rock	3	1	1	1	0	2	1	0	1	1	2	1	1	2	0	10
	S-Mars	5	2	0	0	1	4	2	0	0	1	2	1	1	2	0	10
	P-Mars	5	2	0	0	0	5	3	0	0	1	4	2	2	1	0	11
bottom layer	rock	3	1	1	0	0	2	1	0	1	0	4	2	2	1	0	9
	S-Mars	5	2	0	0	1	3	1	0	0	1	3	1	1	1	0	8
	P-Mars	5	4	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	2	0	9

3.4 Vitalität nach LIVE/DEAD Färbung

Um die Zellanteile der Flechtensymbionten zu bestimmen, die die Exposition im Low Earth Orbit (LEO) auf der ISS überlebt haben, wurden die verschiedenen BIOMEX Proben durch die Färbung mittels zweier LIVE/DEAD Farbstoffe (FUN[®]1 und BacLight[™]) markiert und mittels CLSM analysiert. Durch den FUN[®]1 Farbstoff konnten beide Symbionten im Flechtenthallus erfolgreich angefärbt werden (Abb. 14a). Die Frischkontrolle weist einen Anteil von $31,9 \pm 15,4$ (SD) % toter Photobiontenzellen auf (Abb. 15a). Die Mortalitätsraten der Photobiontenzellen, die für die BIOMEX Proben nach der Exposition im LEO auf der ISS für den top layer detektiert wurden, liegen zwischen 98,4% und 100% (rock $98,4 \pm 1,53$ (SD) %, P-Mars $99,3 \pm 1,0$ (SD) %, S-Mars 100 ± 0 (SD) %). Die Photobionten des bottom layers zeigen Mortalitätsraten zwischen 96,5% und 98,7% (rock $96,5 \pm 3,6$ (SD) %, P-Mars $98,7 \pm 2,3$ (SD) %, S-Mars 100 ± 0 (SD) %).

Die Mycobionten der Frischkontrolle von der Flechte *Buellia frigida* zeigen $14,5 \pm 11,5$ (SD) % metabolisch inaktive, tote Zellen (vgl. Fig. 15). Die Anteile der toten Mycobiontenzellen der BIOMEX Proben liegen nach Weltraum-Exposition für den top layer zwischen 94,1% und 97,8% (rock $95,5 \pm 2,8$ (SD) %, P-Mars $97,8 \pm 2,6$ (SD) %, S-

Mars $94,1 \pm 5,0$ (SD) %). Die Proben des bottom layers weisen für den Mycobionten Mortalitätsraten zwischen 89,5% und 96,9% auf (rock $92,8 \pm 11,3$ (SD) %, P-Mars $96,9 \pm 4,5$ (SD) %, S-Mars $89,5 \pm 6,4$ (SD) %). Eine Tendenz bezüglich geringerer Mortalitätsraten für MB-Zellen des bottom layers im Vergleich zum top layer kann beobachtet werden.

Die Ergebnisse der *BacLight*TM Färbung konnten für den Mycobionten nicht ausgewertet werden, da die Pilzzellen ein diffuses, nicht differenzierbares Fluoreszenzsignal aussenden (Abb. 14b). Bei den Photobionten hingegen war nach der Färbung der Flechtenschnitte eine optische Unterscheidung zwischen membranintakten und -geschädigten Zellen möglich. Die Frischkontrolle der Flechte *Buellia frigida* zeigt einen Anteil toter Photobiontenzellen von $10,3 \pm 8,4$ (SD) % (Abb. 16). Die BIOMEX Proben aus dem top layer weisen Anteile toter PB-Zellen zwischen 76% und 97% auf (rock $76,4 \pm 18,8$ (SD) %, P-Mars $97,4 \pm 3,6$ (SD) %, S-Mars $95,8 \pm 1,4$ (SD) %). Die Mortalitätsraten der Photobionten des zugehörigen bottom layers liegen zwischen 88% und 92% (rock $92,0 \pm 3,7$ (SD) %, P-Mars $87,7 \pm 8,9$ (SD) %, S-Mars $90,7 \pm 9,5$ (SD) %).

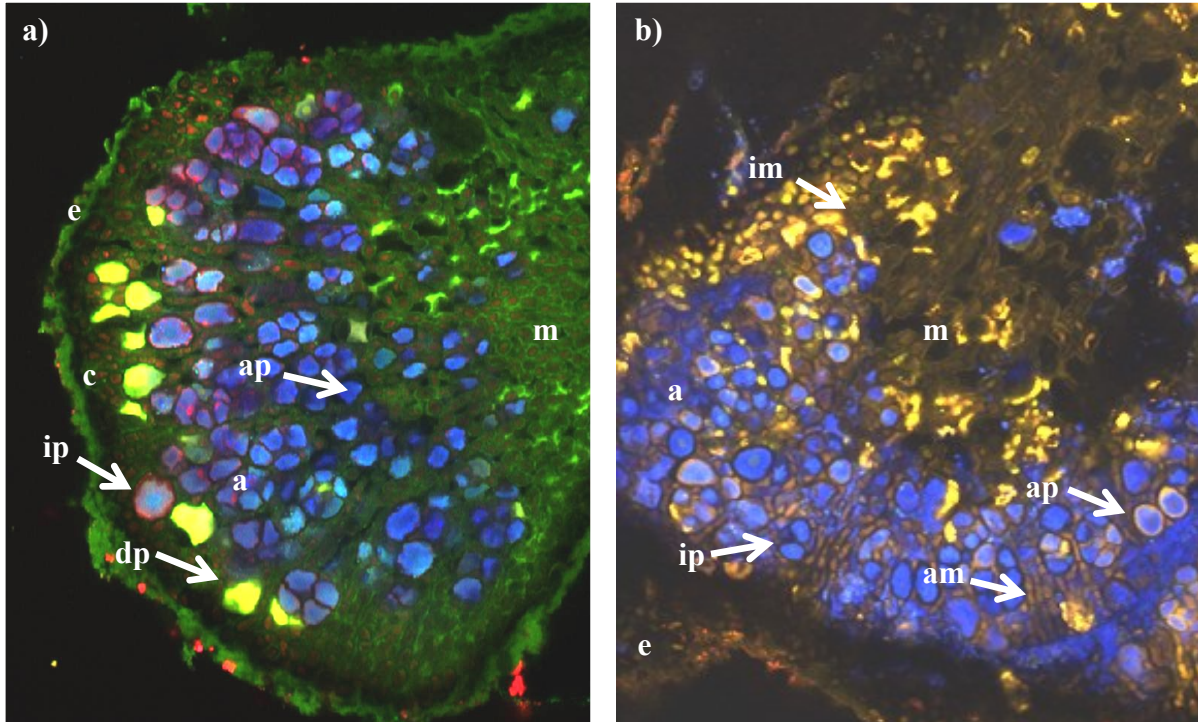


Abb. 14 CLSM Bilder von *Buellia frigida* nach LIVE/DEAD Färbung mit a) BacLight™ (P-Mars bottom) und b) FUN®1 (Frischkontrolle). e- Epicortale Gallert-Schicht, c- Cortex, m- Hyphenzellen, am- metabolisch aktive Hyphenzellen, im- metabolisch inaktive Hyphenzellen, a- Algencluster, ap- membranintakte/metabolisch aktive Photobiontenzellen, ip- membrandefekte/metabolisch inaktive Photobiontenzellen, dp- degenerierte Photobiontenzellen.

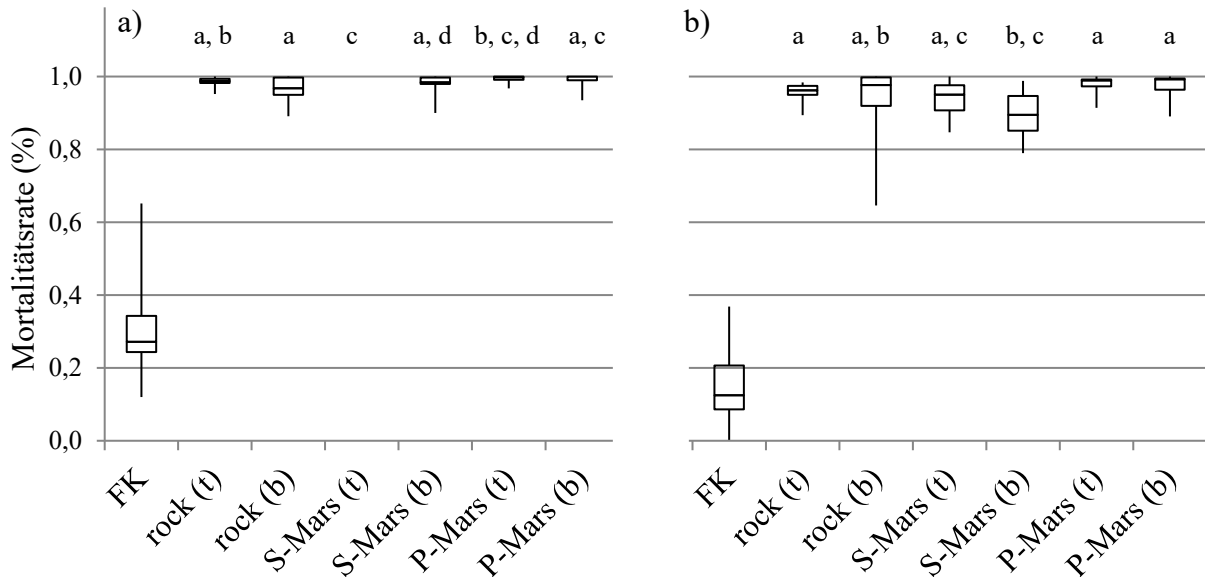


Abb. 15 Ergebnisse der CLSM Analyse nach FUN®1 LIVE/DEAD Färbung von *Buellia frigida* BIOMEX Proben. Gezeigt sind die prozentualen Mortalitätsraten der Frischkontrolle und der BIOMEX Proben der ausgezählten Photobionten (a) und Mycobionten (b) im Boxplot Diagramm aus FK-Frischkontrolle, rock Proben, S-Mars-Proben, P-Mars Proben, t- top layer, b- bottom layer. Statistik: Zweiseitiger t-Test mit Signifikanzniveau $\alpha=0,05$.

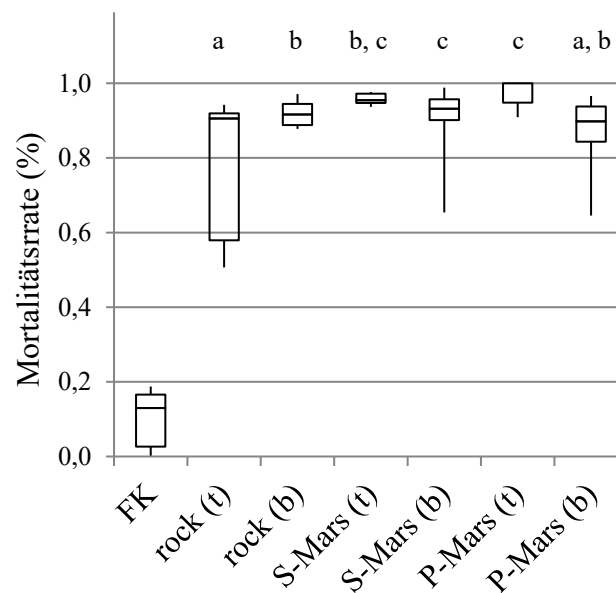


Abb. 16 Ergebnisse der CLSM Analyse nach *BacLight*TM LIVE/DEAD Färbung von *Buellia frigida* BIOMEX Proben. Gezeigt sind die prozentualen Mortalitätsraten der Frischkontrolle und der BIOMEX Proben der ausgezählten Photobionten im Boxplot Diagramm aus FK-Frischkontrolle, Rock Proben, S-Mars-Proben, P-Mars Proben, t- top layer, b- bottom layer. Statistik: Zweiseitiger t-Test mit Signifikanzniveau $\alpha=0,05$.

3.5 Photosynthetische Aktivität

Alle ermittelten Werte der Quantenausbeute ($QY=F_v/F_M$), die für die BIOMEX Flechtenproben ermittelt wurden, wurden auf den maximal gemessenen Wert der Frischkontrolle normiert. Dieser wurde an Tag 37 gemessen ($F_v/F_M=0,723 \triangleq QY_{\max}=1$). Die Frischkontrolle regeneriert nach Befeuchtung innerhalb von 2min ca. 40% ihres photosynthetischen Potentials (Abb. 17). Die prozentuale Quantenausbeute der Frischkontrolle liegt zwischen Tag 1 und 48 im Mittel bei 95,3%. An Tag 42 konnte eine Fremdpilz-Kontamination auf der Frischkontrolle beobachtet werden. Diese wurde nach der Methode, die oben beschrieben wurde, entfernt. Trotzdem war die Frischkontrolle an Tag 48 von dem Fremdpilz nahezu komplett überwachsen, sodass keine photosynthetische Aktivität mehr gemessen werden konnte (Abb. 17).

Das photosynthetische Potential des Flechtenfragments der rock bottom Probe wird im Vergleich zur Frischkontrolle verzögert regeneriert (Abb. 17). Der Wert der Quantenausbeute steigt innerhalb von 41 Tagen im Durchschnitt um etwa 2% pro Tag. Nach 17 Tagen erreicht der QY dieser Probe ca. 50% des photosynthetischen Potentials der Frischkontrolle. Die für die rock bottom Probe maximal gemessene Quantenausbeute

liegt im Vergleich zur Frischkontrolle bei 81,2% (Tag 41). An Tag 42 entwickelte sich eine Fremdpilz-Kontamination auf dem Flechtenfragment der rock bottom Probe, die entfernt wurde. Die Quantenausbeute sank trotz Entfernung der Kontamination innerhalb der nächsten Tage auf 0 ab.

Die Flechtenprobe des rock-Pellets aus dem top layer zeigt zu Beginn der Chlorophyll *a* Fluoreszenz Messungen eine stark verzögerte Wiederaufnahme photosynthetischer Prozesse. An Tag 8 der Messungen erreicht diese Probe einen QY Wert von 15,1% (Abb. 17). Am Tag 9 wurde eine Fremdpilz-Kontamination auf dem Flechtenfragment beobachtet. Obwohl der Pilz direkt entfernt wurde, sank die Quantenausbeute auf 7,0% ab. In den folgenden Tagen stiegen die F_V/F_M Werte wieder auf maximal 23,1% an (Tag 17). An Tag 18 wurde erneut eine Kontamination auf dem zu untersuchenden Flechtenfragment beobachtet. Diese wurde wiederum entfernt. Die Werte der Quantenausbeute für die rock top Probe sanken danach auf 0 ab.

Für die P- und S-Mars Proben (top und bottom layer) konnten durchschnittliche F_V/F_M Werte von 2% ermittelt werden (Abb. 17). In keiner der untersuchten Flechtenfragmente dieser Proben konnte eine Regeneration der Quantenausbeute beobachtet werden. Die maximal gemessenen QY-Werte der P-Mars Proben liegen bei 6,4% für den top layer (Tag 8) beziehungsweise bei 6,5 % für den bottom layer (Tag 1). Für die S-Mars Proben konnten maximale F_V/F_M Werte von 9,3% für den top layer (Tag 1) bzw. 8,7% für den bottom layer (10 min) ermittelt werden. Die F_V/F_M Werte aller Mars-Proben lagen nach 28 Tagen auf Nullniveau. Daher wurden die Messungen dieser Proben an Tag 29 abgebrochen.

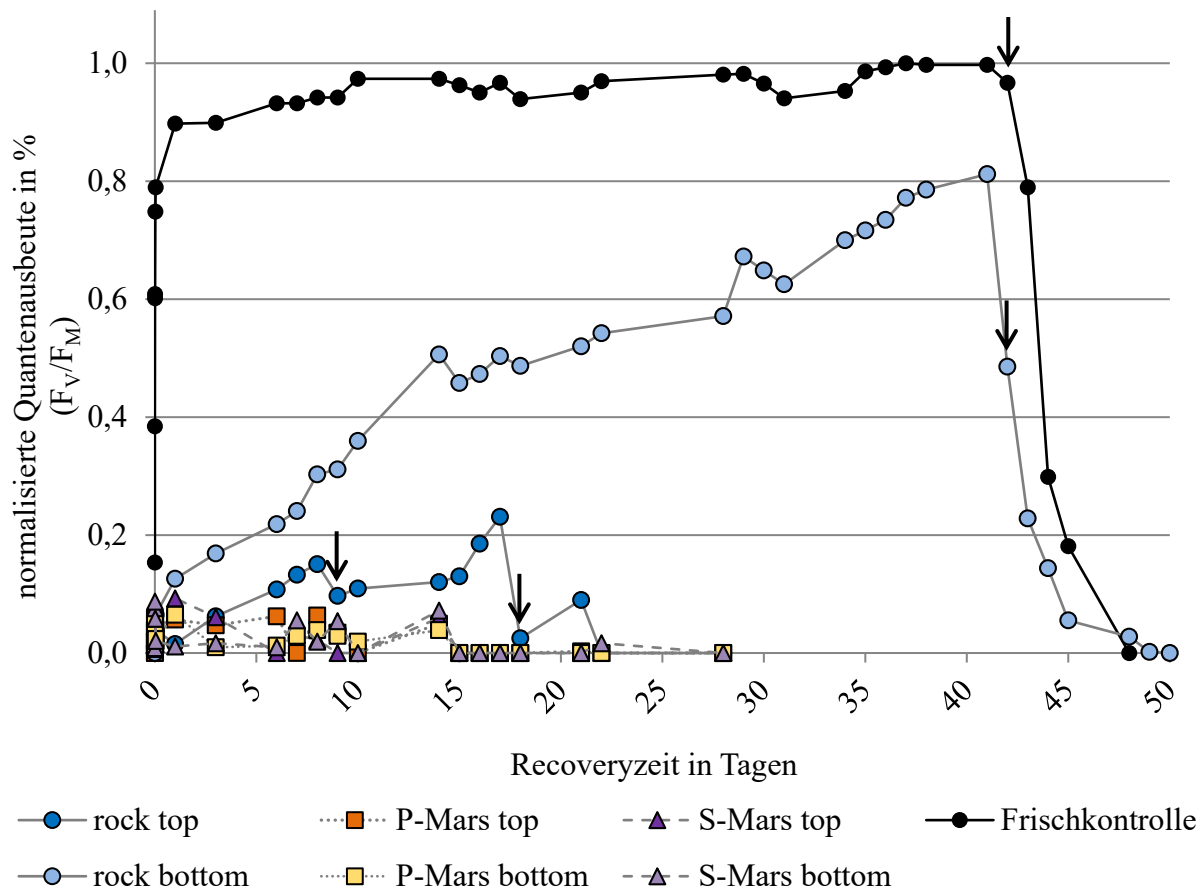


Abb. 17 Photosynthetische Aktivität als Quantenausbeute ($QY=F_V/F_M$) von *Buellia frigida* Frischkontrolle und BIOMEX Proben. Die F_V/F_M Werte sind auf die Frischkontrolle normiert. Die Entfernung von auftauchenden Kontaminationen ist mit Pfeilen markiert. Die Messungen der BIOMEX Proben wurden nach 28, 48 bzw. 50 Tagen abgebrochen, da die QY Werte auf dem Nullniveau lagen.

3.6 Kultivierung der Symbiose-Partner

Die Kultivierungsversuche der Bionten von *Buellia frigida* wurden durchgeführt, um die Vitalität und Wachstumsfähigkeit beider Flechtensymbioten zu testen. Die Wachstumsfähigkeit wurde für die Frischkontrolle erfolgreich nachgewiesen (Abb. 18). Für die Frischkontrolle kann bereits nach einer Kultivierungsdauer von einer Woche beobachtet werden, dass Wachstums- und Zellteilungsprozesse stattgefunden haben. Die auf die verschiedenen Medien aufgetragenen Zellproben an Photo- und Mycobionten sind zu diesem Zeitpunkt durch Zellteilungsprozesse deutlich vergrößert. Nach vier Wochen erreichen die rundlichen, dunkelgrau gefärbten Mycobionten-Rasen der Frischkontrolle einen Durchmesser von bis zu 3mm. Die gewachsenen Zellkolonien der Photobionten der Frischkontrolle erreichen nach 4 Wochen Durchmesser von maximal 2mm. Von den insgesamt 16 Mycelien des MB der Frischkontrolle, die auf MY Medium kultiviert

wurden, sind 5 gewachsen ($\pm 31\%$). Von den 31 auf TOM und BG11 Medium aufgetragenen PB-Clustern sind 100% zu Kolonien herangewachsen.

Bezüglich der BIOMEX rock Proben (top und bottom) wuchsen von den jeweils 25 ausgebrachten Photobionten-Zellclustern auf TOM sowie auf BG11 Medium 22 zu Kolonien heran ($\pm 88\%$). Für die PB der übrigen BIOMEX Proben (top und bottom layer der P-Mars und S-Mars Proben) konnten keine Zellteilungs- oder Wachstumsprozesse nachgewiesen werden. Die Mycobionten der BIOMEX Proben zeigten im Kulturversuch kein Wachstum.

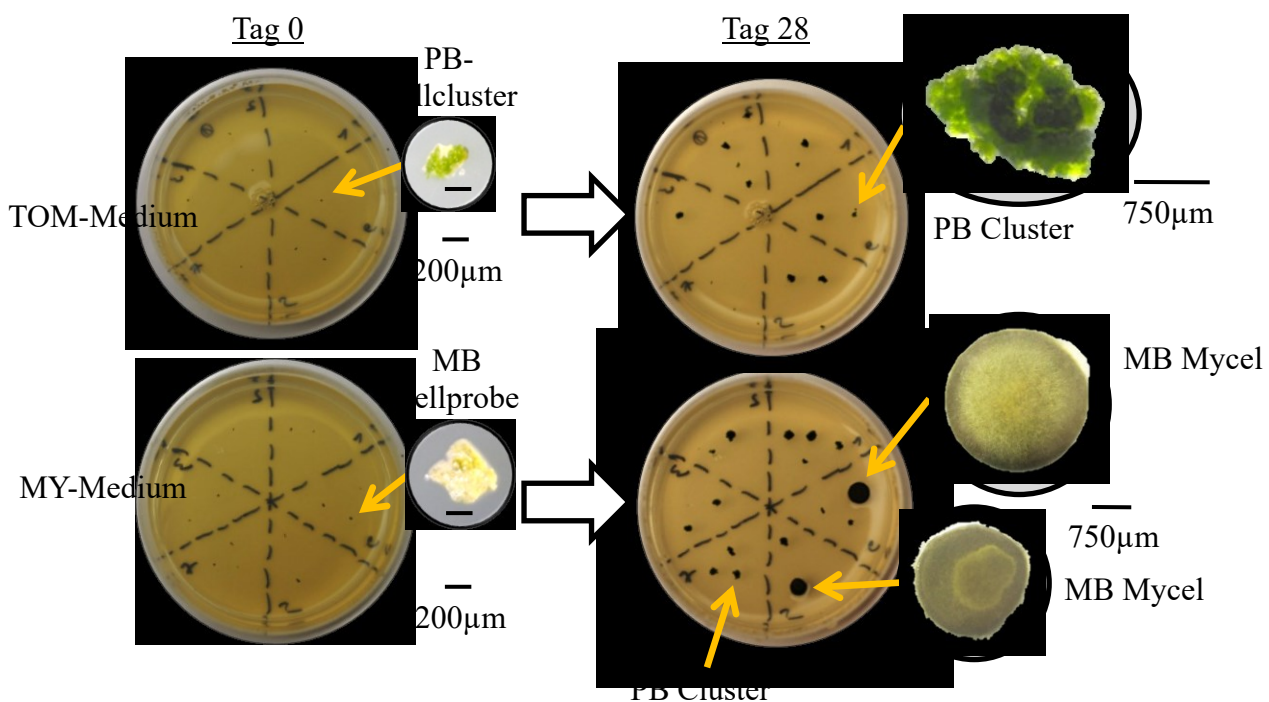


Abb. 18 Darstellung des Kultivierungsversuchs von Photobionten (PB) auf TOM Medium (oben) und Mycobionten (MB) auf MY Medium (unten) in Petrischalen (hier: Frischkontrolle). Links: Start des Kultivierungsversuchs (Tag 0), im Detail sind die aus dem Flechtenverband isolierten Zellproben gezeigt. Rechts: Stand des Kultivierungsversuchs nach 28 Tagen, im Detail sind deutlich entwickelte PB Cluster und MB Mycelien gezeigt.

3.7 Sporulationsfähigkeit

Die Streufähigkeit der Apothecien des in dieser Studie verwendeten Flechtenmaterials wurde erfolgreich durch die Frischkontrolle nachgewiesen. Bereits 24h nach Beginn des Sporulationsversuchs konnten aus dem Fruchtkörper ausgeschleuderte Sporen auf dem Agar nachgewiesen werden. Auskeimprozesse der ausgestreuten Sporen in Form von auswachsenden Hyphen konnten für die Frischkontrolle nach ca. 10 Tagen beobachtet

werden. Die aus den zusätzlich angefertigten Quetschpräparaten der Frischkontrolle isolierten Sporen der Frischkontrolle (n=31) keimten ebenfalls nach 10 Tagen aus.

Durch Querschnitte der Apothecien wurde die Präsenz von Sporen in jeder BIOMEX Probe nachgewiesen (vgl. Abb. 19). Während des Sporulationsversuchs konnte für die BIOMEX Proben weder das Ausschleudern von Sporen aus den Apothecien noch die Keimfähigkeit der einzelnen isolierten Sporen (je nach Probe zwischen 9 und 17 Sporen) nachgewiesen werden.

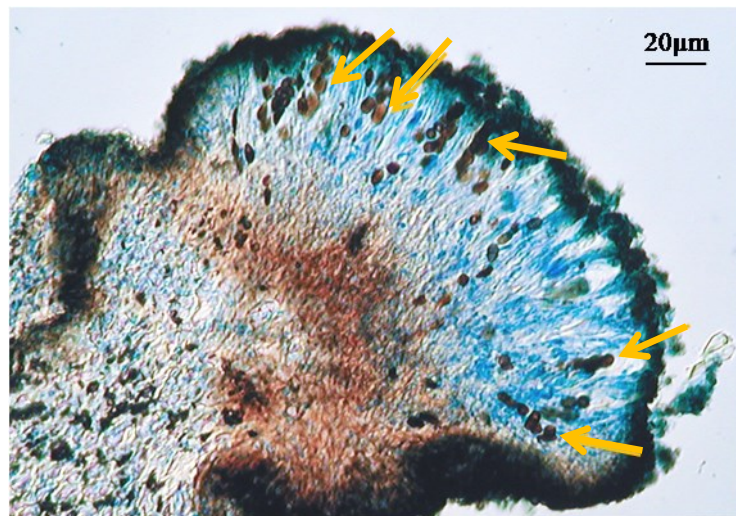


Abb. 19 Querschnitt durch ein Apothecium von *Buellia frigida* von der BIOMEX S-Mars (top) Probe. Deutlich zu sehen sind zwischen den sterilen Hyphen die einzelnen dunkel erscheinenden Sporen des Fruchtkörpers in der Hymenium-Schicht (durch Pfeile markiert).

3.8 Biogene Substanzen

Die Untersuchungen zur Detektierbarkeit der biogenen Substanzen der vorbereiteten Kontrollen mittels Raman-Spektroskopie zeigen, dass Parietin und Agar in den Kontrollpellets der Mars-Proben nicht detektierbar sind. Chitin und Cellulose sind in den unbehandelten Kontrollpellets nur in sehr geringen Anteilen nachweisbar. Die übrigen biogenen Substanzen lassen sich mittels Raman-Spektroskopie eindeutig und gut nachweisen.

Die Detektierbarkeit der neun biogenen Substanzen des BIOMEX Projekts wurde nach 1,5 Jahren Weltraum-Exposition im Low Earth Orbit (LEO) mittels Raman-Spektroskopie untersucht. Die Nachweisbarkeit der Biosignaturen ist nach Weltraum-Exposition bei einigen der untersuchten Substanzen deutlich beeinträchtigt. Eine Übersicht der Nachweisbarkeit der verschiedenen Substanzen ist in Tabelle 12 gezeigt.

Parietin und Agar sind, genau wie in den Kontrollpellets, in keiner der BIOMEX Proben (Quarz-Plättchen, P- und S-Mars) nach der Exposition im LEO nachweisbar. Zusätzlich ist Chitin nach Exposition im LEO nicht mehr nachweisbar. Cellulose war in 58,4% der aufgenommenen Raman-Spektren der Quarz-Plättchen des bottom layers detektierbar. Charakteristische Raman-Spektren für β -Carotin und Naringenin konnten in einigen wenigen Spektren jeweils noch im bottom layer auf S-Mars Pellets erkannt werden (0,2% β -Carotin, 3,5% Naringenin). Quercitin war, außer auf dem Quarz-Plättchen des top layers, auf jeder Probe des top und bottom layers noch detektierbar. Die prozentuale Nachweisbarkeit von Quercitin ist im top layer ist aber deutlich geringer als im bottom layer (20,3% top und 70,1% bottom bei P-Mars sowie 22,0% top und 69,3% bottom bei S-Mars). Chlorophyllin und Melanin waren auf der Oberfläche von jedem der untersuchten Träger (Quarz und Mars-Pellets) nachweisbar. Tendenziell kann auch hier festgestellt werden, dass die prozentuale Nachweisbarkeit der Substanzen im bottom layer höher liegt als im top layer (vgl. Tab. 12).

Tabelle 12 Nachweis der verschiedenen biogenen Substanzen des BIOMEX Projekts in % nach Weltraum-Exposition im LEO auf der ISS, detektiert mittels Raman-Spektroskopie zwischen 0 und 4000cm^{-1} . Die biogenen Substanzen wurden auf Quarz-Plättchen und auf P- und S-Mars Pellets gegenüber Weltraumbedingungen exponiert. In der Tabelle sind die Detektierbarkeiten (0% Nachweis=**X**) für den top und bottom layer der EXPOSE-R2 Einheit gezeigt.

	Kontrollen		Quarz Plättchen		P-Mars		S-Mars	
	P-Mars	S-Mars	top	bottom	top	bottom	top	bottom
β -Carotin	17,0%	6,5%	X	X	X	X	X	0,2%
Chlorophyllin	81,7%	76,2%	97,7%	90,2%	37,7%	74,3%	44,1%	75,6%
Naringenin	12,0%	21,7%	X	X	X	X	X	3,5%
Quercitin	94,0%	48,2%	X	63,0%	20,3%	70,1%	22,0%	69,3%
Melanin	47,7%	57,5%	53,2%	84,7%	5,3%	11,1%	35,5%	23,2%
Parietin	X	n. a.	X	X	X	X	X	X
Cellulose	2,3%	0,0%	X	58,4%	X	X	X	X
Chitin	1,3%	0,6%	X	X	X	X	X	X
Agar	X	n. a.	X	X	X	X	X	X

3.9 Mission Ground Reference und Transportkontrolle

Die Analyse der MGR-Flechtenproben sowie der Transportkontrollen erfolgte parallel und auf die exakt gleiche Art und Weise wie die Auswertung der BIOMEX Proben, die auf der ISS gegenüber Weltraumbedingungen exponiert waren.

3.9.1 Ultrastrukturelle Veränderungen (TEM)

Die Anfertigung ultradünner Schnitte der MGR-Flechtenproben gestaltete sich als äußerst schwierig, da das Thallusgewebe durch ein starkes Ausmaß an Zellschäden beeinträchtigt war. Der geschädigte Gewebeverband hatte zur Folge, dass die Anzahl der angefertigten Schnitte stark vermindert ist, wodurch der Stichprobenumfang der MGR Proben nur zwischen 15 und 68 PB bzw. zwischen 23 und 143 MB Zellen liegt. Für die Analyse der Transportkontrollen wurden zwischen 35 und 106 PB und zwischen 223 und 348 MB Zellen ausgewertet.

Die typische Ultrastruktur der Photobionten- und Mycobiontenzellen aus der Frischkontrolle ist detailliert unter 4.5 beschrieben worden. Die Anteile geschädigter Zellen der Transport-Kontrolle liegen zwischen 40,0% und 93,5% für den PB bzw. zwischen 40,8% und 89,9% für den MB (Tab. 13). Diese Werte weichen deutlich von denen der Frischkontrolle ab. Bezüglich der Transportkontrolle wurde der höchste Anteil geschädigter MB- und PB-Zellen für die S-Mars Probe detektiert.

Die Anteile geschädigter MB und PB für die MGR Proben wurden ebenfalls ermittelt (Tab. 13). Für den top layer wurden zwischen 66,7% und 100% deformierter PB-Zellen bzw. zwischen 95,0% und 100% deformierter MB-Zellen detektiert. Der bottom layer zeigt Anteile deformierter Zellen zwischen 91,2% und 100% für den PB sowie zwischen 77,9% und 85,5% für den MB.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Anteile geschädigter MB-Zellen, die für die MGR Proben ermittelt wurden, im Vergleich zu denen der BIOMEX Proben, die auf der ISS gegenüber Weltraumbedingungen exponiert waren, deutlich höher liegen (vgl. Abb. 12, siehe 3.2).

Tabelle 13 Ultrastrukturelle Schäden an PB und MB der Flechte *Buellia frigida* der Mission Ground Reference (MGR) und Transportkontrolle (trp) in %. Kollabierte Protoplasten (a) und deformierte Zellwände (b), sowie jeweils aufaddierte Anteile insgesamt geschädigter PB und MB (c).

		Photobiont			Mycobiont		
		a	b	c	a	b	c
Frischkontrolle		30,0%	2,8%	32,8%	1,1%	1,1%	2,1%
MGR	rock (t)	17,0%	74,5%	91,5%	92,5%	2,5%	95,0%
	P-Mars (t)	1,8%	98,2%	100,0%	96,0%	1,6%	97,6%
	S-Mars (t)	0,0%	66,7%	66,7%	100,0%	0,0%	100,0%
	rock (b)	0,0%	100,0%	100,0%	85,5%	0,0%	85,5%
	P-Mars (b)	36,8%	54,4%	91,2%	81,8%	0,7%	82,5%
	S-Mars (b)	68,8%	31,3%	100,0%	77,9%	0,0%	77,9%
trp	rock	11,4%	28,6%	40,0%	79,4%	1,8%	81,2%
	P-Mars	61,3%	8,5%	69,8%	40,1%	0,7%	40,8%
	S-Mars	64,5%	29,0%	93,5%	89,1%	0,9%	89,9%

3.9.2 DNA Integrität

Um Informationen über die DNA Integrität der MGR Proben und Transportkontrollen zu erhalten, wurde die Methode der RAPD-PCR angewendet. Diese Methode wurde detailliert unter 3.9 beschrieben. Die RAPD-PCR der MGR Proben und der Transportkontrollen ergab reproduzierbare DNA Fragmente, die mit denen der Frischkontrolle verglichen werden konnten. Die Beurteilung der Gelbilder und der RAPD-PCR Profile wurde nach dem unter 3.3 beschriebenen Bewertungssystem vorgenommen.

Die Flechtenproben der MGR Proben des top layers weisen DNA-Integritätswerte von 12 (P- und S-Mars-Proben) und 14 (rock) auf (Tab. 14). Die Werte, die für die MGR Proben des bottom layers ermittelt werden konnten, liegen bei 8 (rock), 9 (S-Mars) und 10 (P-Mars). Verglichen mit den Werten der DNA-Integrität, die für die BIOMEX Proben des top layers der auf der ISS exponierten Flechten ermittelt werden konnten, weisen die MGR Proben der top layer einen höheren Grad an DNA Schädigung auf (vgl. Tab. 11).

Die Flechtenproben der Transportkontrolle weisen im Vergleich zur Frischkontrolle ebenfalls einen Verlust der DNA Stabilität auf. Die RAPD-Profile zeigen für die

Transportkontrolle deutliche Veränderungen, die sich insgesamt auf Werte von 11 (S- und P-Mars) bzw. 12 (rock) summieren. Die Werte der Transportkontrollen der rock- und S-Mars Probe liegen knapp über den Werten, die für den top layer der BIOMEX Proben, die auf der ISS exponiert waren, ermittelt wurden.

Tabelle 14 Bewertung der RAPD-PCR Profile der genomischen DNA der Mission Ground Reference (MGR) und Transportkontrolle des BIOMEX Projekts im Vergleich zur Frischkontrolle, durchgeführt mit den Primern OPA11+OPA03, Primer4+OPAJ04, Primer2. Jeder beobachteten Veränderung wurde in einer willkürlich gewählten Skala ein Punkt (+1) zugerechnet (vgl. Atienzar *et al.* 2000). a- Erscheinen neuer Banden, b- Verschwinden von Kontrollbanden, c- stärkere Bandenintensität, d- schwächere Bandenintensität sowie insgesamt beobachtete, aufaddierte Veränderungen (Total).

		OPA11 + OPA03					Primer4 + OPAJ04					Primer2					Total
		Banden	a	b	c	d	Banden	a	b	c	d	Banden	a	b	c	d	
Frischkontrolle		3					2					3					
MGR																	
top layer	rock	3	2	2	1	0	4	2	0	0	2	2	2	2	1	0	14
	S-Mars	3	1	0	1	0	5	3	0	0	1	6	4	1	1	0	12
	P-Mars	2	1	2	1	0	3	1	0	0	1	4	3	1	1	1	12
bottom layer	rock	4	1	0	1	1	3	1	0	1	0	3	1	1	1	0	8
	S-Mars	2	1	0	1	0	4	2	0	0	2	3	1	1	1	0	9
	P-Mars	4	2	1	1	0	2	1	1	0	1	3	1	1	1	0	10
Transport-Kontrolle																	
	rock	3	2	2	1	0	3	1	0	0	1	3	2	2	0	1	12
	S-Mars	2	1	2	1	0	3	1	0	0	1	4	2	1	2	0	11
	P-Mars	5	2	0	0	1	3	1	0	0	1	1	2	3	0	1	11

3.9.3 Vitalität nach LIVE/DEAD Färbung

Für die Proben der MGR und Transportkontrolle des BIOMEX Projekts wurden die Anteile der metabolisch aktiven und inaktiven bzw. der membranintakten und -defekten PB und MB durch Anfärbung der Zellen mit den LIVE/DEAD Farbstoffen FUN[®]1 und BacLight[™] bestimmt (siehe 2.2.6).

Die FUN[®]1 Färbung der MGR Flechtenproben zeigte für den MB des top layers zwischen $98,2 \pm 1,1$ (SD) % (rock) und 100% (P-Mars) metabolisch inaktiver (toter) Zellen (Abb. 20 b). Die Analyse des bottom layers ergab $82,2 \pm 22,5$ (SD) % (P-Mars), $87,9 \pm 6,2$ (SD) % (S-Mars) und $98,5 \pm 1,8$ (SD) % (rock) metabolisch inaktiver (toter) MB Zellen.

Die Anteile toter PB Zellen des top layers der MGR liegen nach der FUN[®]1 Färbung bei $99,0 \pm 2,1$ (SD) % (rock) bzw. bei $100 \pm 0,0$ (SD) % (P- und S-Mars). Die MGR Proben des bottom layers weisen für den PB Mortalitätsraten von $91,0 \pm 12,2$ (SD) % (rock), $96,4 \pm 2,6$ (SD) % (P-Mars) und $89,9 \pm 4,3$ (SD) % (S-Mars) auf (Abb. 20 a). Nach der FUN[®]1 Färbung der PB und MB Zellen der MGR Proben kann trotz der hohen Mortalitätsraten tendenziell festgestellt werden, dass der bottom layer einen geringeren Anteil toter Zellen aufweist als der top layer.

Die BacLight[™] Färbung ergab für die MGR Proben Anteile toter PB Zellen von knapp 100% (Abb. 21, rock $99,8 \pm 0,6$ (SD) %, P-Mars $98,7 \pm 2,4$ (SD) %, S-Mars $99,8 \pm 0,4$ (SD) %). Die für die PB Zellen des bottom layers bestimmten Anteile toter Zellen weichen davon geringfügig ab (rock $97,2 \pm 4,2$ (SD) %, P-Mars-b $93,7 \pm 8,6$ (SD) %; S-Mars $96,0 \pm 2,6$ (SD) %).

Nach der Färbung der Flechtenschnitte der Transportkontrolle mit FUN[®]1 wurden für die rock Probe $67,3 \pm 24,6$ (SD) % tote PB und $93,4 \pm 7,5$ (SD) % tote MB Zellen detektiert (Abb. 22 a und b). Für die Flechtenfragmente, die auf dem P-Mars Pellet befestigt wurden, konnten $81,6 \pm 15,0$ (SD) % tote PB und $99,1 \pm 1,8$ (SD) % tote MB Zellen festgestellt werden. Für Flechtenfragmente, die auf dem künstlichen S-Mars Pellet befestigt wurden, wurden Anteile von $85,3 \pm 13,1$ (SD) % toter PB und $96,0 \pm 4,6$ (SD) % toter MB Zellen detektiert.

Die Färbung mit BacLight[™] zeigt für die PB der Transportkontrollen der rock Probe $95,7 \pm 34,9$ (SD) % tote PB Zellen. Die Anteile toter PB von Flechtenfragmenten, die auf den

Mars-Pellets befestigt waren, liegen bei $80,2 \pm 20,8$ (SD) % (P-Mars) und $58,1 \pm 34,9$ (SD) % (S-Mars) (Abb. 22 c).

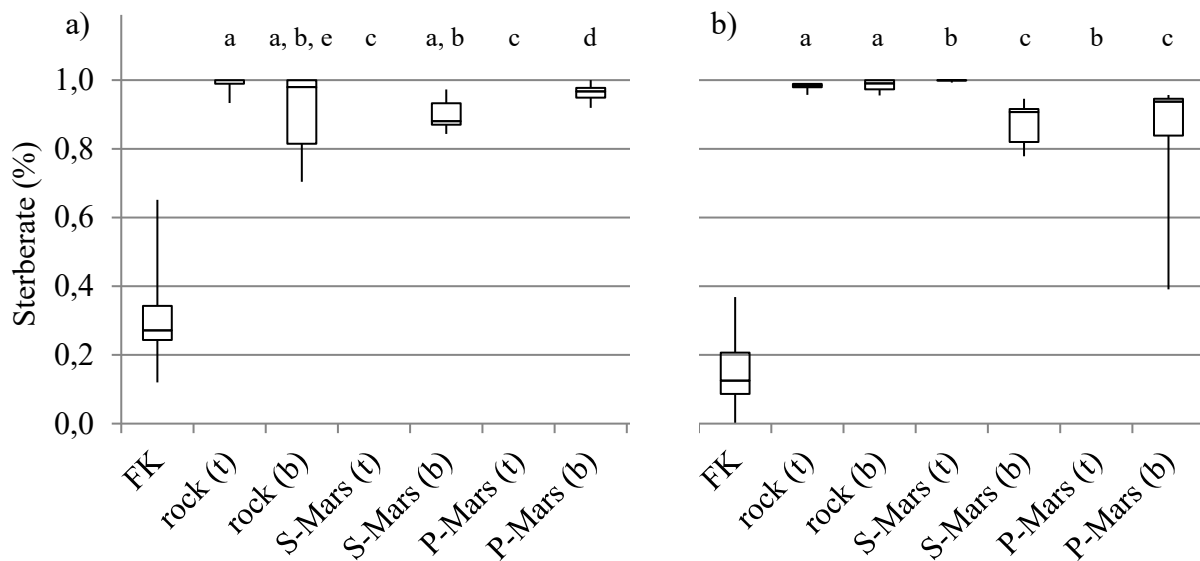


Abb. 20 Ergebnis der CLSM Analyse nach LIVE/DEAD Färbung von *Buellia frigida* der MGR-Proben des BIOMEX Projekts mit FUN[®]1. Gezeigt sind die prozentualen Sterberaten aller ausgezählten Photobionten (a) und Mycobionten (b) im Boxplot Diagramm. FK-Frischkontrolle, rock Proben, S-Mars-Proben, P-Mars Proben, t- top layer, b- bottom layer. Das Signifikanzniveau ist mit $\alpha=0,05$ angegeben.

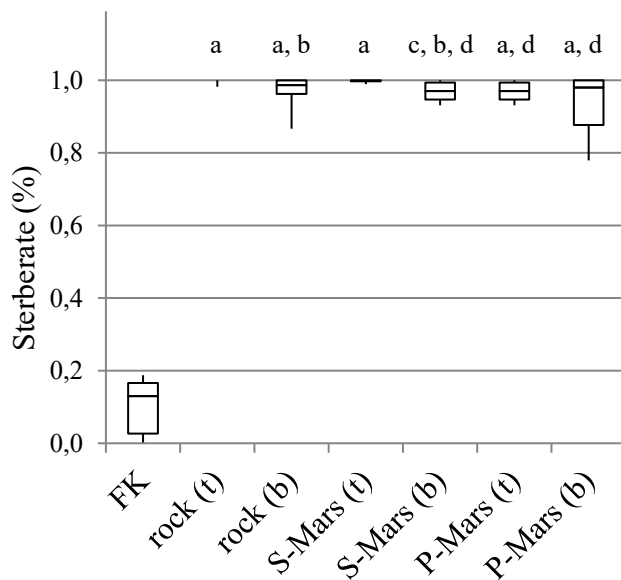


Abb. 21 Ergebnis der CLSM Analyse nach LIVE/DEAD Färbung von *Buellia frigida* der MGR-Proben des BIOMEX Projekts mit BacLight™. Gezeigt sind die prozentualen Sterberaten aller ausgezählten Photobionten im Boxplot Diagramm. FK-Frischkontrolle, rock Proben, S-Mars-Proben, P-Mars Proben, t- top layer, b- bottom layer. Das Signifikanzniveau ist mit $\alpha=0,05$ angegeben.

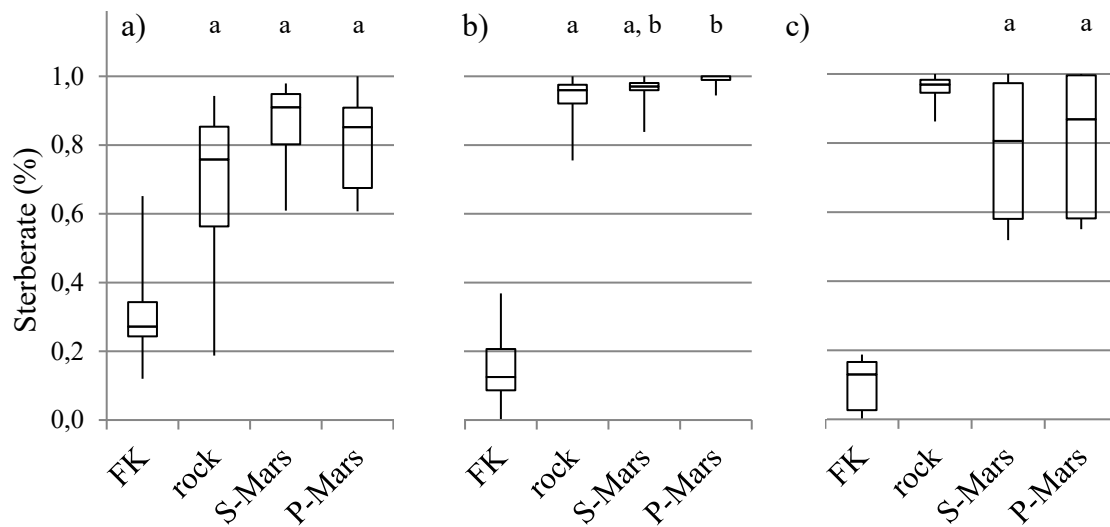


Abb. 22 Ergebnis der CLSM Analyse nach LIVE/DEAD Färbung der Transport-Kontrolle von *Buellia frigida* Proben aus dem BIOMEX Projekt mit FUN[®]1 (a und b) und BacLight[™] (c). Gezeigt sind die prozentualen Sterberaten der ausgezählten Photobionten (a, c) und Mycobionten (b) im Boxplot Diagramm. FK-Frischkontrolle, rock Proben, S-Mars-Proben, P-Mars Proben. Das Signifikanzniveau ist mit $\alpha=0,05$ angegeben.

3.9.4 Photosynthetische Aktivität

Das photosynthetische Regenerationspotential der MGR Proben und der Transportkontrolle, das über Chlorophyll *a* Fluoreszenz ermittelt wurde, ist in Abb. 23 dargestellt. Auch hier wurden die Werte zur Quantenausbeute (Quantum Yield, QY) auf den maximalen F_v/F_m Wert der Frischkontrolle normiert (vgl. 4.6). Für die Proben der MGR Proben sowie die Transportkontrollen kann nach 28 Tagen kein Anstieg der F_v/F_m Werte beobachtet werden. Es kann für keine der Proben eine Regeneration der photosynthetischen Aktivität festgestellt werden.

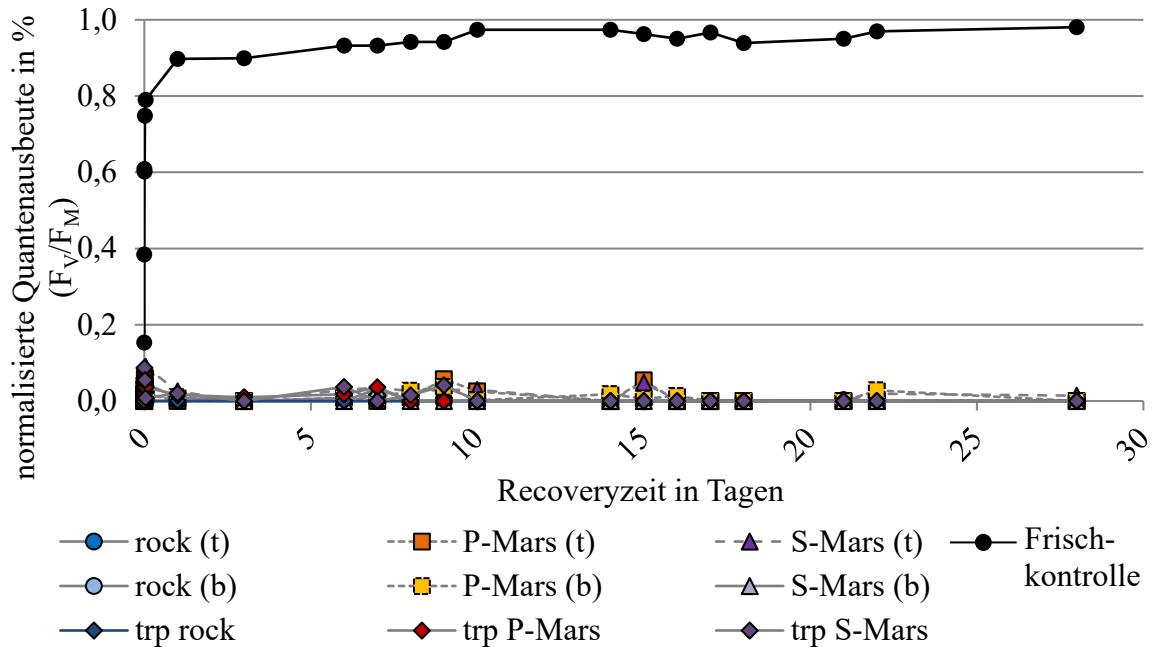


Abb. 23 Photosynthetische Aktivität (F_v/F_m) ermittelt durch Chlorophyll *a* Fluoreszenz der MGR ($\square\Delta$) und Transportkontrolle ($\diamond$) von *Buellia frigida* im BIOMEX Projekt. Die F_v/F_m Werte sind auf die Frischkontrolle normiert. Die Transportkontrollen sind mit der Abkürzung trp gekennzeichnet, die übrigen Daten (mit Ausnahme der Frischkontrolle) beziehen sich auf die MGR. t-top layer, b-bottom layer.

3.9.5 Kultivierung der Symbiose-Partner

Der Kultivierungsversuch der Flechtenproben der MGR und Transportkontrollen wurde wie unter 2.3.8 beschrieben durchgeführt. Sowohl von den PB als auch von den MB wurden aus jeder Probe (top und bottom der MGR von rock, P-Mars, S-Mars, sowie rock, P-Mars und S-Mars der Transportkontrolle) zwischen 5 und 11 Zellproben auf geeignetes Medium übertragen. Weder für die PB noch für die MB der MGR oder der Transportkontrolle konnten Wachstumsprozesse der Zellen beobachtet werden. Die Kultivierbarkeit der beiden Symbiose-Partner konnte für keine der Proben der MGR oder der Transportkontrolle nachgewiesen werden.

3.9.6 Sporulationsfähigkeit

Um die Sporulationsfähigkeit der MGR und Transportkontrollen zu untersuchen, wurde die Fähigkeit der Apothecien Sporen auszuschleudern untersucht (vgl. 2.3.9). Die Anzahl der präparierten Fruchtkörper der verschiedenen Proben liegt zwischen 3 und 11. Das Ausschleudern von Sporen konnte bei keinem der untersuchten Apothecien beobachtet werden.

In einem zweiten Versuch wurde das Wachstum von aus Quetschpräparaten von Apothecien isolierten und auf MY-Medium übertragenen Sporen untersucht (vgl. 2.3.9). Dazu wurden von jeder Probe der MGR (top und bottom von rock, P- und S-Mars) sowie der Proben der Transportkontrolle (rock, P- und S-Mars) jeweils zwischen 13 und 28 Sporen auf Medium ausgelegt. Keine der ausgesäten Sporen der verschiedenen Proben keimte oder bildete ein Mycel aus.

3.10 Photosynthetische Aktivität nach UV-C_{254nm}

In einem zusätzlich zum BIOMEX Projekt durchgeführten Versuch wurde der Einfluss der Bestrahlungszeit bei gleichbleibender UV-C_{254nm} Strahlungsdosis auf isolierte PB Cluster untersucht. Die ermittelte Quantenausbeute wurde jeweils auf den gemessenen Wert der Proben vor der Bestrahlung normiert. Eine unbestrahlte Kontrolle zeigt im Verlauf von 10 Tagen konstante photosynthetische Leistung (Abb. 24). Die bestrahlten PB zeigen nach einer UV-C Dosis von 7J/cm² eine deutliche Verminderung der photosynthetischen Aktivität. Die Abnahme der photosynthetischen Aktivität korreliert mit der Expositionsdauer. Unmittelbar nach 30 minütiger Bestrahlungszeit sinkt die Quantenausbeute der PB auf 71%; nach 2h Bestrahlung auf 61% und nach 4h auf 46%. Im Verlauf von 10 Tagen regeneriert das Photosynthesepotential der Proben nur geringfügig. Die Aktivität des PSII liegt am Ende der Messreihe bei Werten von 71% (0,5h), 69% (2h) bzw. auf 48% (4h) (t=10 Tage).

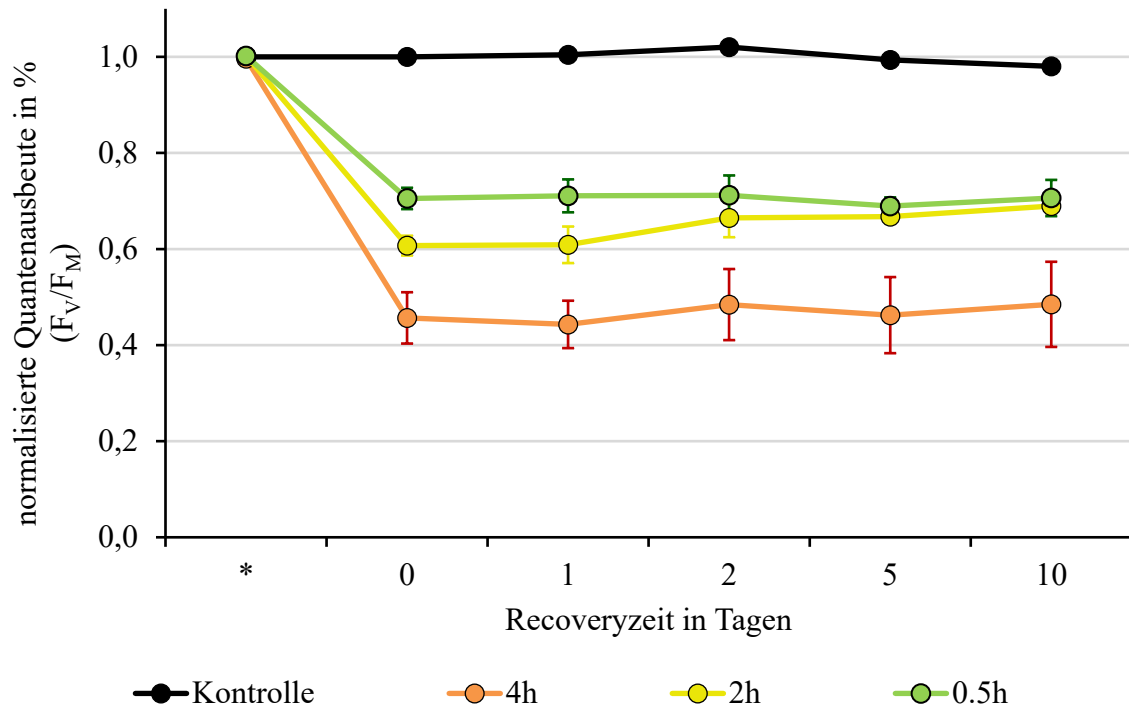


Abb. 24 Photosynthetische Aktivität (F_v/F_m) ermittelt durch Chlorophyll *a* Fluoreszenz von PB der Flechte *Buellia frigida* nach Bestrahlung mit 7 J/cm^2 mit monochromatischer UV-C_{254nm} Strahlung über einen Zeitraum von 4h/2h/15min. Die F_v/F_m Werte sind jeweils auf den für die jeweilige Messreihe vor der Bestrahlung ermittelten mittleren F_v/F_m Wert normiert ($t=*$). Der Messpunkt bei $t=0$ bezieht sich auf unmittelbar nach der Bestrahlung ermittelte F_v/F_m Werte. Der Stichprobenumfang jeder Probe liegt bei $n=9$.

IV Diskussion

Der Vitalitätszustand eines Organismus wird durch die physiologische Leistungsfähigkeit seiner Systeme charakterisiert (Schubert *et al.* 1993). Es existieren allerdings keine allgemeingültigen Kriterien, die eine methodische Beurteilung des Vitalitätszustandes vorgeben. Als Maß der Vitalität sollten daher verschiedene Faktoren herangezogen werden, beispielsweise die Proteinbiosynthesefähigkeit, das Verhältnis von synthetisierenden und abbauenden Prozessen oder die Reproduktionsfähigkeit von Zellen/Organismen (Schubert *et al.* 1993). In der vorliegenden Arbeit wird die Vitalität der Flechte *Buellia frigida* nach 1,5-jähriger Exposition im Low Earth Orbit (LEO) durch die Anwendung mehrerer unterschiedlicher wissenschaftlicher Methoden beurteilt (siehe Abb. 25). Mit Hilfe dieser Methoden werden morphologische, ultrastrukturelle und genomische Eigenschaften, physiologische Aspekte sowie die Reproduktionsfähigkeit/Kultivierbarkeit des Organismus untersucht, wodurch ein Überblick über den Vitalitätszustand der Flechte nach Weltraum-Exposition im LEO ermöglicht wird. Die Fähigkeit zur Reproduktion ist dabei von relevanter Bedeutung. Dieser Aspekt wird später noch detailliert diskutiert.

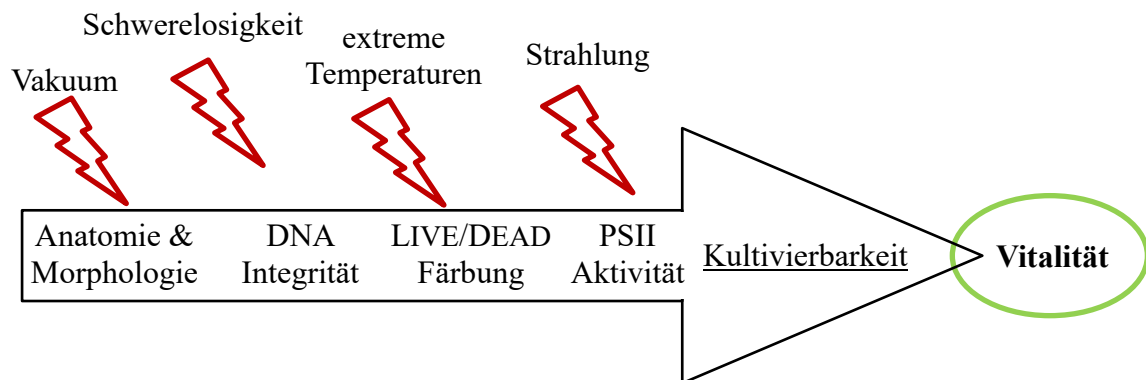


Abb. 25 Methodischer Überblick zur Beurteilung der Vitalität der Flechte *Buellia frigida* nach 1,5-jähriger Exposition gegenüber Weltraumbedingungen während des BIOMEX Projekts.

Einige Stressoren des antarktischen Lebensraums können mit den Parametern des LEO verglichen werden (Honegger 2003; Nybakken *et al.* 2004; de Vera *et al.* 2008; Sadowsky & Ott 2012; Backhaus *et al.* 2015). *Buellia frigida* ist in der Antarktis an hohe Strahlungsintensitäten, extreme Temperaturschwankungen und lange Trockenperioden gut angepasst (Lange & Kappen 1972; Kappen 1985, 1993; Kappen *et al.* 1998; Barták *et al.* 2007; Dyer & Crittenden 2008; Onofri *et al.* 2012; Meeßen *et al.* 2015). Unter Berücksichtigung des Resistenzpotentials der Flechte *Buellia frigida* gegenüber den

Umweltbedingungen an antarktischen Standorten kann spekuliert werden, dass einige der Weltraumbedingungen des LEO für diese Flechte als nicht letal einzuschätzen sind. Das Temperaturregime, das während des BIOMEX Projekts auf der ISS herrschte, liegt innerhalb des von dieser Flechte natürlicherweise tolerierten Temperaturspektrums (Kappen 1985; Sadowsky & Ott 2012; Brandt *et al.* 2015). Die Temperaturbedingungen, denen die BIOMEX Proben auf der ISS gegenüber exponiert waren, können als nicht letaler Faktor bezüglich der Vitalität der Proben nach Exposition im LEO bezeichnet werden (Brandt *et al.* 2015).

Insgesamt kann nach der Analyse der BIOMEX Proben durch die verschiedenen eingesetzten Methoden festgestellt werden, dass die Vitalität der Flechte *Buellia frigida* nach der Exposition im LEO stark reduziert ist. Dabei zeigen Flechtenfragmente, die im top layer integriert waren, tendenziell höhere Mortalitätswerte als die Proben des bottom layers, die durch ihre Position unterhalb des top layers von weniger Strahlung erreicht wurden. Die Fähigkeit der Flechten zur Anhydrobiose stellt auch bezüglich der Exposition im LEO durch die Reduzierung von strahlungsinduzierten Schäden einen Überlebensvorteil dar (Brandt *et al.* 2016). Im ausgetrockneten Zustand kann durch die Einwirkung ionisierender Strahlung keine Radiolyse intrazellulärer Wassermoleküle stattfinden, wodurch die Entstehung gefährlicher reaktiver Sauerstoffspezies und damit die Schädigung von Zellstrukturen verringert wird (Riley 1994; Keresztes & Kovács 2002).

Neben dem Strahlungsregime sind die BIOMEX Proben während der Exposition auf der ISS auch Vakuum bzw. Mars-Atmosphäre ausgesetzt. Die Exposition gegenüber dem LEO-Vakuum wird in einigen Studien als für biologische Organismen stark schädlicher Stressor extraterrestrischer Bedingungen beschrieben (Sancho *et al.* 2007; Horneck *et al.*, 2010). Entsprechend wurde spekuliert, dass die P- und S-Mars Proben aufgrund ihrer Exposition unter einem Druck von 980Pa weniger Schäden erleiden als die Vakkum-exponierten rock Proben. Als Ergebnis des LIFE Experiments (dem ersten Langzeit-Experiment auf der ISS) konnte unter anderem bezüglich der Vitalität der Flechtenproben nach Exposition im LEO ein schützender Effekt der verwendeten Marsatmosphäre (980Pa) festgestellt werden (Brandt *et al.* 2015, 2016). Die BIOMEX Proben, die unter Mars Atmosphäre gegenüber Weltraum-Bedingungen exponiert waren, weisen jedoch eine geringere Vitalität auf als die Flechtenproben, die unter Vakuum-Bedingungen auf der ISS exponiert waren (rock Proben). Es kann vermutet werden, dass es in den

künstlichen Mars-Pellets durch die Einwirkung extraterrestrischer Strahlung zur Dekomposition von Molekülen kommt und dadurch bedingt die Entstehung von sekundären Teilchen und Radikalen begünstigt wird. Eine potenzielle Toxizität kann durch den direkten Kontakt der Mars-Pellets mit der Medulla die Vitalität der Flechtenproben beeinflussen (Hassler *et al.* 2014; Meeßen *et al.* 2015; Backhaus *et al.*, 2019). In den bereits erwähnten Vorversuchen zum BIOMEX Projekt ergaben sich für die Flechtenproben von *Buellia frigida*, die mit dem RTV-S 691 Kleber auf den künstlichen Mars-Pellets befestigt, keine letalen Auswirkungen. Bezüglich der 1,5-jährigen Exposition der BIOMEX Flechtenproben auf der ISS wird neben der Entwicklung einer unbekannten Langzeit-Toxizität der verwendeten Mars-Pellets auch ein schädlicher Effekt des Silikonklebers vermutet (Backhaus *et al.* 2019). Dieser kann ebenfalls durch die extraterrestrische Strahlung verursacht werden, da es zu Dekompositionen der Moleküle und zur Entstehung UV induzierter Radikale kommen kann (Shkrob *et al.* 2010; Noblet *et al.* 2012; Poch *et al.* 2013, 2014). Die Erkenntnisse einer möglichen Langzeitwirkung des Silikonklebers ergaben sich zum ersten Mal und werden zukünftig in Weltraum-Experimenten mit Organismen zu berücksichtigen sein.

Eins der Ziele des BIOMEX Projekt war, eine potenzielle Habitabilität des Planeten Mars vor vielen Milliarden Jahren einzuschätzen. Trotz der relevanten Erkenntnisse, die mit dem BIOMEX Projekt erzielt wurden, sind weitere Experimente notwendig, um eine solidere Einschätzung einer möglichen Habitabilität des Planeten Mars zu erreichen. Darüber hinaus ist zu beachten, dass auch wenn Organismen im Weltraum oder unter simulierten Mars-ähnlichen Bedingungen überleben können, der Beweis dafür fehlt, dass diese Organismen auch auf dem Mars überleben können (Joseph *et al.* 2019).

4.1 Morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen

Die REM ist zur Auswertung und Charakterisierung von Thallusstrukturen eine etablierte Methode in der Lichenologie (Honegger 1986; Brown *et al.* 1987). Darüber hinaus wurden mittels REM bereits Analysen zur Ultrastruktur von Flechten nach Weltraum-Exposition durchgeführt (Sancho *et al.* 2007; Raggio *et al.* 2011). Die morphologischen und ultrastrukturellen Merkmale spielen für das Widerstandspotential von Flechten gegenüber extremen Bedingungen eine entscheidende Rolle (Meeßen *et al.* 2013). Vor allem die Struktur des Cortex, der die Thallusoberfläche bildet, ist für die Strahlungsresistenz von relevanter Bedeutung, da in dieser Thallusschicht sekundäre Flechteninhaltsstoffe (z.B. Melanin) eingelagert sein können (Meeßen *et al.* 2015). Eine

intakte Thallusoberfläche ist in der Lage die Flechtensymbionten vor Strahlung zu schützen (Jasinghe & Perera 2005). Die kleinen Fissuren, die auf der Thallusoberfläche der Frischkontrolle beobachtet wurden, entstehen auf natürliche Weise bei dem Austrocknungsprozess unter terrestrischen Bedingungen (Honegger *et al.* 1996; Honegger 2003; de los Ríos *et al.* 2004, 2010; Brown *et al.* 1987). Die für die BIOMEX Proben beobachteten Fissuren, die nach der Exposition im LEO zu beobachten sind, sind deutlich stärker ausgeprägt. Die veränderten Oberflächenstrukturen werden vermutlich durch die extreme und langanhaltende Austrocknung durch Vakuum bzw. durch den niedrigen Druck der künstlichen Mars-Atmosphäre verursacht.

Die für die getrocknete Frischkontrolle beobachteten geringen Anteile beschädigter Zellen (kollabierte Protoplasten und deformierte Zellwände) sind ebenfalls durch Trocknung am natürlichen Standort induzierte Vorgänge, die für PB bereits beschrieben wurden (Brown *et al.* 1987; Honegger *et al.* 1996; de los Ríos *et al.* 2004). Die PB-Zellen sind in der Lage unmittelbar nach Rehydrierung ihre Zellform zu regenerieren (Honegger *et al.* 1996, 2003). Der erhöhte Anteil geschädigter Zellen beider Symbionten in den BIOMEX Proben wurde vermutlich ebenfalls durch die extreme Austrocknung unter Vakuum-Bedingungen bzw. durch den niedrigen Druck der künstlichen Mars-Atmosphäre verursacht. Für die PB Zellen wurde ein größerer Anteil veränderter Zellstrukturen beobachtet als für die Mycobionten, da die PB den sensibleren Symbiosepartner der Flechtensymbiose darstellen (Kinraide & Ahmadjian 1970; Ahmadjian 1993; Sadowsky & Ott 2012; Determeyer-Wiedmann *et al.* 2019).

4.2 DNA Integrität

Die DNA Integrität eines Organismus kann bezüglich der Vitalität als essenzieller Faktor beschrieben werden (Maldonado *et al.* 2016). Da UV-Strahlung direkt mit dem Genom interagiert, verursacht die Exposition der Flechten im LEO, insbesondere gegenüber extraterrestrischer Strahlung, Zellschäden auf genomischem Level (Harm 1980; Ravant *et al.* 2001; Rastogi *et al.* 2010). Strahlung mit einer Wellenlänge von 260nm hat, bedingt durch das Absorptionsmaximum zellulärer DNA in diesem Wellenlängenbereich, besonders schädliche und direkte Auswirkungen (Pasternack *et al.* 1993; Rastogi *et al.* 2010; Girard *et al.* 2011), was sich in Genomschäden wie Genmutationen manifestiert (Cacao *et al.* 2016). Genomischen Schäden der BIOMEX Proben wurden durch Veränderungen der RAPD-PCR Profile nachgewiesen. Die Methode der RAPD-PCR ist eine einfache und günstige Methode, um die DNA Integrität von Organismen zu

untersuchen (Weisling *et al.* 1994; Boiteux *et al.* 1999; Atienzar *et al.* 2000). Veränderungen in RAPD-PCR Profilen korrelieren mit dem Level der DNA Schädigung sowie mit der Regenerationsfähigkeit des Organismus (Atienzar *et al.* 2000, 2002). Da die Flechtenproben des top layers einer höheren Strahlungs-dosis ausgesetzt waren als der bottom layer, weisen sie einen höheren Grad genomischer Schäden auf. Die DNA-Extraktion erfolgte mit gefrorenen BIOMEX Proben, daher konnten keine DNA-Reparaturen stattfinden.

Veränderte RAPD-PCR Profile können durch mutierte Sequenzen der Primer-Bindungsstellen oder durch strukturelle Veränderungen der DNA, wie Strangbrüche, Transpositionen und Deletionen, verursacht werden (Danylchenko & Soronchinska 2005; Lalrotuluanga *et al.* 2011). Ebenso können durch veränderte DNA Sequenzen (z.B. Mutationen und Deletionen) die Bindungen der Primer blockiert oder neue Bindestellen gebildet werden (Unal *et al.* 2009), wodurch es zu einer im Vergleich zur Frischkontrolle veränderten Anlagerungen der Primer kommt (Atienzar *et al.* 2002). Änderungen der RAPD Profile der BIOMEX Proben können auch durch DNA Photoprodukte (Pyrimidin Dimere, 6-4 Photoprodukte) entstehen, die eine verminderte Polymerisation der DNA während der PCR verursachen (Donahue *et al.* 1994; Nelson *et al.* 1996; Hollósy 2002; Danylchenko & Sorochinsky 2005). Durch extraterrestrische Strahlung (UV, Infrarot, Gamma-Strahlung) bedingt können auch das cross-linking von Proteinen, DNA Strangbrüche, Basendeletionen oder -insertionen induziert werden (Danylchenko & Sorochinsky 2005; Rastogi *et al.* 2010). Durch die Schädigung von Proteinen kann es zu einer Blockade des Transkriptions- oder Replikationsprozesses kommen (Strid *et al.* 1994; Jansen *et al.* 1996a, b; Takeuchi *et al.* 1996), was die Amplifizierung inhibiert und somit ebenfalls zu Veränderungen der RAPD-PCR Profile führen kann.

4.3 Vitalität nach LIVE/DEAD Färbung

Die Vitalität eines Organismus kann durch das Verhältnis von der Anzahl vitaler Zellen zur Anzahl aller Zellen angegeben werden (Postgate 1969). Der Vitalitätszustand der Flechte *Buellia frigida* und ihrer Symbionten nach der Exposition im LEO wurde durch LIVE/DEAD Färbung am CLSM analysiert. Die hier verwendeten Farbstoffe FUN[®]1 und Baclight[™] markieren die einzelnen Zellen des Symbioseorganismus auf Basis ihrer metabolischen Aktivität (FUN[®]1) bzw. ihrer Membranintegrität (Baclight[™]). Beide verwendeten Farbstoffe wurden bereits in Analysen zur Vitalität von Flechten verwendet (de Vera *et al.* 2010, 2012, 2014; de la Torre *et al.* 2010; Sancho *et al.* 2007; Brandt *et al.*

2015; Meeßen *et al.* 2015). Die Frischkontrolle weist einen durch beide Färbungen ermittelten geringen Anteil letaler Zellen auf, der für diese Flechte bereits in anderen Studien bestimmt wurde (Meeßen *et al.* 2015) und durch natürliche Vorgänge zu begründen ist. Solare UV-Strahlung kann bezüglich der Weltraumbedingungen als besonders schädlicher Stressor beschrieben werden (de Vera *et al.* 2003), wodurch der hohe Anteil toter Symbionten der BIOMEX verursacht wird. Neben der UV-Strahlung ist auch γ -Strahlung bekannt dafür, die metabolische Aktivität von Zellen zu beeinflussen (de la Torre *et al.* 2017). Als strahlungsbedingte Schäden an den PB, die zu Vitalitätseinbußen führen, sind beispielsweise die Degradation von Enzymen des Calvin Zyklus (Allen 1998), DNA- und Protein-Schäden (Strid *et al.* 1994; Jansen *et al.* 1996b, Takeuchi *et al.* 1996) sowie Inaktivierung von Enzymen (Nasibi & M'Kalantari 2005; Vass *et al.* 2005) zu nennen. UV-C Strahlung beeinflusst darüber hinaus die Proteinbiosynthese, was zur Inhibierung metabolischer Prozesse führen kann (Meeßen *et al.* 2014). Obwohl der obere Cortex von *Buellia frigida* mit der UV-absorbierenden Substanz Melanin bezüglich der Resistenz gegenüber Strahlung von relevanter Bedeutung ist (de Vera *et al.* 2003), weisen die Ergebnisse der LIVE/DEAD Färbungen einen offensichtlichen Verlust der metabolischen Aktivität und der Membranstabilität auf. Auch bezüglich der bereits diskutierten ausgeprägten Schäden auf morphologischer und ultrastruktureller Ebene lassen sich die Anteile metabolisch inaktiver und membrandefekter Symbionten erklären.

4.4 Photosynthetische Aktivität

Messungen der Chlorophyll *a* Fluoreszenz werden in astrobiologischen Studien häufig genutzt, um die Vitalität des photoautotrophen Symbiosepartners von Flechten zu beurteilen (de la Torre Noetzel *et al.* 2007; de la Torre *et al.* 2010; de Vera *et al.* 2008, 2010; de Vera & Ott 2010; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012; Sánchez *et al.* 2012, 2014; Brandt *et al.* 2014; Backhaus *et al.*, 2015). Flechtenorganismen sind nach Austrocknung und Wiederbefeuchtung mit flüssigem Wasser innerhalb von wenigen Minuten in der Lage photosynthetische Prozesse wieder aufzunehmen (Valladares *et al.* 1998; Schlensog *et al.* 2003; Kranner & Britic 2005; Kranner *et al.* 2005, 2008; Kosugi *et al.* 2009). Die Reaktivierungszeit von luftgetrockneten Flechten liegt je nach Art und Dauer der Austrocknung zwischen 5 und 20 Minuten (Lange *et al.* 1989; Dyer & Crittenden 2008). Das in dieser Studie verwendete Flechtenmaterial der Art *Buellia frigida* wurde im getrockneten Zustand über einen Zeitraum von 9 Jahren bei -20°C

gelagert, wodurch sich eine Verzögerung der Wiederaufnahme der vollständigen Photosyntheseleistung erklären lässt. Die Reinitialisierung der photosynthetischen Aktivität der Frischkontrolle erfolgte unmittelbar nach Reaktivierung mit flüssigem Wasser.

Die Analyse der photosynthetischen Aktivität der BIOMEX Proben anhand der Chlorophyll *a* Fluoreszenz zeigt im Vergleich zur Frischkontrolle geringere Quantum Yield Werte (F_v/F_m), was als Indikator für umweltbedingten Stress gilt (Unal *et al.* 2009). Bezogen auf die Weltraum-Parameter, denen die BIOMEX Proben während der Exposition im LEO ausgesetzt sind, gilt die UV-Strahlung als Hauptstressor für den Photosyntheseapparat der Photobionten (Aro *et al.* 1993; Teramura & Sullivan 1994; Rozema *et al.* 1997; Jansen *et al.* 1998; Lytvyn *et al.* 2010). Dabei ist die Strahlung abhängig von der Wellenlänge durch unterschiedliche Effekte auf photosynthetische Zellkomponenten charakterisiert (Jenkins *et al.* 1995; Takeuchi *et al.* 1996). Sowohl UV-B als auch -C Strahlung können photosynthetisch essenzielle Proteine, Chlorophylle, Carotinoide und Plastoquinone zerstören, was die Photosyntheseleistung mindern kann (Strid *et al.* 1994; Nogués & Baker 1995; Rao *et al.* 1996; Rozema *et al.* 1997; Jansen *et al.* 1998; Hollósy 2002; Nasibi & M'Kalantari 2005; Joshi *et al.* 2007; Rahimzadeh *et al.* 2011). UV-B Strahlung schränkt die photosynthetische Aktivität durch Verlust der Calvin-Zyklus Enzyme (s.o., Allen 1998), durch Auswirkungen auf das D1 Protein, auf Quinon-Elektronen-Akzeptoren, auf Redox-aktive Tyrosine und auf Wasser-oxidierende Komplexe (Teramura & Sullivan 1994; Vass *et al.* 2005) ein. Das im Vergleich zur BIOMEX rock top Probe deutlich höhere photosynthetische Regenerationspotential der rock bottom Probe kann durch eine fehlende Einwirkung der UV-Strahlung erklärt werden. Die im Vergleich zur Frischkontrolle verzögerte Wiederaufnahme photosynthetischer Prozesse der rock bottom Probe wird durch die extreme und lange Austrocknung unter Vakuum-Bedingungen verursacht. Die extrem niedrigen F_v/F_m Werte der BIOMEX Mars-Proben (top und bottom) können, wie bereits diskutiert wurde, durch eine vermutete (aber noch nicht nachgewiesenen) Langzeit-Toxizität des Regoliths oder des Klebers verursacht werden, die durch die Einwirkung extraterrestrischer Strahlung verstärkt wird und die Vitalität der Flechtenproben beeinflusst (s.o.).

4.5 Kultivierbarkeit und Sporulationsfähigkeit der Symbionten

Studien haben gezeigt, dass Flechten und ihre Symbionten ihre Vitalität nach bis zu 6 Jahren Lagerung im trockenen Zustand beibehalten können und im eingefrorenen Zustand

auch nach 9 Jahren noch vital sind (Honegger *et al.* 1996; Honegger 2003). Die Kultivierbarkeit des in der vorliegenden Studie verwendeten Materials wurde nach 9 Jahren durch das oben beschriebene Kultivierungsexperiment erfolgreich nachgewiesen (Frischkontrolle).

Nach Exposition im LEO zeigen die Symbionten während des Kultivierungsexperiments eine stark verringerte Fähigkeit zur Zellteilung und Kolonie-Bildung. Nur für die PB der rock Proben (top und bottom) konnte die Fähigkeit für Zellteilung und Wachstum in Kultur erfolgreich nachgewiesen werden. Das Zellwachstum der PB der rock Proben fand im Vergleich zur Frischkontrolle verzögert statt. Eine verzögerte Zellteilungsaktivität konnte bereits in Kulturversuchen mit ausgetrockneten Flechten gezeigt werden (Kranner *et al.* 2003; Gasulla *et al.* 2009). Ursache für das verzögerte Einsetzen von Zellteilungsprozessen sind verschiedene Reparatur- und Regenerationsprozesse, die nach Reaktivierung der Flechten mit flüssigem Wasser aktiviert werden (Kranner *et al.* 2008; Gasulla *et al.* 2009). Beim Durchlaufen von Zellzyklusprozessen werden die PB Zellen vor der Einleitung der Zellteilung an sogenannten „Checkpoints“ auf Intaktheit überprüft (Esnault *et al.* 2010). Wird eine beschädigte Zelle entdeckt, kommt es zum mitotischen Arrest der Zelle und es werden abhängig vom Grad und Intensität des Schadens aktiv nekrotische oder apoptotische Wege eingeleitet (Reape *et al.* 2008) oder die Zellschäden durch Reparaturmechanismen beseitigt (z.B. DNA- und Protein-Reparaturmechanismen) (Eker *et al.* 1994; Petersen *et al.* 1999; Sinha & Häder 2002; Buffoni Hall *et al.* 2003).

Wie bereits erwähnt wurde, wurde bezüglich der Vitalität der Mars Proben (P- und S-Mars) ein Vorteil durch die Exposition unter Mars-Atmosphäre postuliert. Diese Hypothese kann auch durch den Kultivierungsversuch nicht bestätigt werden, da für die Bionten der P- und S-Mars Proben keine Zellteilungs- und Wachstumsprozesse nachgewiesen werden konnten. Mögliche Ursachen, die für gestörte Zellzyklusprozesse der BIOMEX Mars Proben verantwortlich gemacht werden können, wurden bereits diskutiert (Langzeit-Toxizität des Substrats und des Silikon-Klebers).

Für das in der vorliegenden Studie verwendete Flechtenmaterial konnte in einem Sporulationsexperiment sowohl das Ausschleudern als auch die Keimfähigkeit von Sporen nachgewiesen werden. Für die BIOMEX Proben konnte weder das Ausschleudern von Sporen aus den Apothecien noch das Auskeimen einzelner isolierter Sporen nachgewiesen werden. Der Defekt des Ausschleudermechanismus kann durch die anatomischen und ultrastrukturellen Zellveränderungen verursacht sein. Die Einwirkung

extraterrestrischer Strahlung führt offensichtlich zu einer Schädigung der Sporenzellen und letztendlich zur Verhinderung des Keimungsprozesses. Die bereits gezeigten Fissuren der Thallusoberfläche können ein tieferes Eindringen der Strahlung ins Innere der Apothecien verursachen.

4.6 Methodische Beurteilung des Vitalitätszustands von Flechten

Der Vitalitätszustand eines Organismus ist charakterisiert durch einen hohen Grad an Komplexität. Zur Beurteilung des Vitalitätszustandes ist es relevant, eine Reihe unterschiedlicher wissenschaftlicher Methoden einzusetzen. In Tabelle 15 sind die Methoden aufgelistet, die für die Auswertung der Flechte *Buellia frigida* im BIOMEX Projekt angewendet wurden, um eine möglichst differenzierte Studie zur Vitalität dieser Flechte aufzustellen.

Tabelle 15 Überblick über die in der vorliegenden Studie gewählten Methoden, die eine Analyse des Vitalitätszustandes der Flechte *Buellia frigida* nach Exposition im LEO erlauben.

Methode	Informationsgehalt
Raster-Elektronenmikroskopie	Oberflächen und intra-thalline Veränderungen der Morphologie
Transmissions-Elektronenmikroskopie	Ultrastrukturelle Veränderungen der Zellen-
RAPD-PCR	DNA-Integrität
FUN [®] 1 Färbung	Stoffwechsel-Aktivität
BacLight [™] Färbung	Membran-Integrität
Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz	Photosynthetische Aktivität (PSII)
Kultivierung von MB und PB	Wachstums- und Zellteilungsfähigkeit
Sporulation des MB	Wachstums- und Zellteilungsfähigkeit

Durch die Anwendung einzelner Methoden können nur wenige Komponenten des Organismus untersucht werden. Die Ergebnisse, die durch eine einzelne Methode erzielt werden können, erlauben daher keine fundierten Erkenntnisse über den Vitalitätszustand des Organismus. Erst durch eine Serie der Methoden, die in Tabelle 15 aufgeführt sind, lassen sich umfassendere Aussagen zur Vitalität der Flechte *Buellia frigida* nach 1,5 Jahren im Weltraum erstellen.

Zu Beginn wurde bereits erwähnt, dass bezüglich der Beurteilung des Vitalitätszustands von Organismen der Kulturversuch als „Gold-Standard“ Methode zu nennen ist. Durch die Auswirkung von Stressoren auf biologische Organismen können verschiedene

Schäden verursacht werden, auf die einzelne Zellen unterschiedlich reagieren können. Beispielsweise können Reparaturmechanismen eingeschaltet werden, die zu einem zeitlich begrenzten mitotischen Arrest führen (Roy 2000) oder durch die aktiv nekrotische/apoptotische Prozesse eingeleitet werden können (Thierfelder 2006). Da nur eine sehr begrenzte Menge an Probenmaterial in dieser Studie zur Verfügung stand, konnten Reparaturmechanismen nach verschiedenen Regenerationszeiten nicht untersucht werden. Mit Hilfe des Kultivierungsversuchs der Symbionten ergeben sich allerdings essenzielle Erkenntnisse zur Funktionsfähigkeit der wesentlichen Zellprozesse, die fundierte Aussagen zur Überlebensfähigkeit der Flechte nach Exposition gegenüber LEO aufzeigen.

4.7 Vergleich zum LIFE Experiment

Das BIOMEX Projekt ist, wie bereits erwähnt wurde, das zweite Langzeit-Experiment auf der ISS, in dem Flechtenorganismen den Bedingungen des LEO ausgesetzt wurden. Im ersten Experiment (LIFE) wurden die Auswirkungen der Weltraumbedingungen auf die Flechte *Xanthoria elegans* untersucht. Die von den Flechtenproben während des LIFE Projekts akkumulierten Strahlungsdosen hängen ebenfalls stark von der Sonnenaktivität ab und liegen um 20-30% unter denen, die die BIOMEX Flechtenproben während ihrer Exposition im LEO akkumulierten (Tabelle 16).

Tabelle 16 Bestrahlungsparameter einiger der für die in dem LIFE Experiment untersuchten Proben des top layers der Flechte *Xanthoria elegans* (Brandt *et al.* 2015). Die Mittelwerte der Strahlungsdosen wurden durch die Firma RedShift berechnet. Zusätzlich sind die prozentualen Anteile der einzelnen Strahlungsdosen im Vergleich zu denen des BIOMEX Projekts angegeben (vgl. Tabelle 4, siehe 2.2.1). UV-A (315-400nm), UV-B (280-315nm), UV-C (100-280nm) und PAR (300-700 nm) sind in MJ/m² angegeben.

	Weltraumbedingungen	Marsbedingungen
	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁷ Pa	10 hPa
	MJ/m ²	MJ/m ²
Gesamt	4873 (71%)	4799 (80%)
UV-A	236 (74%)	249 (75%)
UV-B	41 (77%)	47 (74%)
UV-C	14 (78%)	18 (80%)
PAR	2185 (72%)	2227 (74%)

Der Vitalitätszustand der Flechte *Xanthoria elegans* wurde nach der Weltraum-Exposition durch verschiedene Methoden, z.B. Chlorophyll *a* Fluoreszenz Messungen,

LIVE/DEAD Färbung mit FUN[®]1 und Kultivierung der Bionten, analysiert. Insgesamt zeigt *Xanthoria elegans* nach Weltraum-Exposition deutlich niedrigere Mortalitätsraten als *Buellia frigida*. Außerdem konnten für die LIFE-Proben, die unter Mars-analogenen Parametern gegenüber extraterrestrischer Strahlung exponiert waren (Mars-Atmosphäre) höhere Vitalitätswerte bestimmt werden als für die Vakuum-exponierten Proben (Brandt *et al.* 2015). Die Messwerte der Chlorophyll *a* Fluoreszenz (Quantum Yield) der LIFE Proben zeigen beispielsweise ein für die unter Marsbedingungen exponierten Proben ausgeprägtes Regenerationspotential photosynthetischer Prozesse. Im Versuch zur Kultivierbarkeit zeigten die Symbionten aller LIFE-Proben (Vakuum und Mars-analog exponierte Flechten des top und bottom layers) sowohl eine Zellteilungs- als auch Wachstumsfähigkeit. Als Fazit des LIFE Experiments konnte eine ausgeprägte Überlebensfähigkeit der Flechte *Xanthoria elegans* nach Weltraum-Exposition unter Vakuum und Mars-analogenen Bedingungen beobachtet werden, während für *Buellia frigida* gegenüber Weltraumbedingungen nur eine begrenzte Resistenzfähigkeit festgestellt werden konnte.

Xanthoria elegans und *Buellia frigida* zeigen gegenüber Weltraumbedingungen unterschiedliche Resistenz und Überlebensfähigkeiten. *Xanthoria elegans* ist eine kosmopolitische Flechte, deren Verbreitungsgebiet von der maritimen und kontinentalen Antarktis bis in alpine Regionen des Himalayas in 7000 m ü.M. reicht. Die kosmopolitische Flechte *Xanthoria elegans* verfügt über ein breites Spektrum an Anpassungsmechanismen, die die Überlebensfähigkeit in vielen Habitaten und Klimazonen ermöglichen (Øvstedal & Lewis Smith 2001; Brandt *et al.* 2015). *Buellia frigida* ist eine endemische antarktische Flechte (Lange & Kappen 1972; Kappen *et al.* 1998). Die Adaptationsfähigkeit endemischer antarktischer Organismen an extreme Umweltbedingungen von Standorten hinsichtlich neuer Umweltbedingungen wird als deutlich eingeschränkt diskutiert (Clayton & Wiencke 1998, Finster *et al.* 2007).

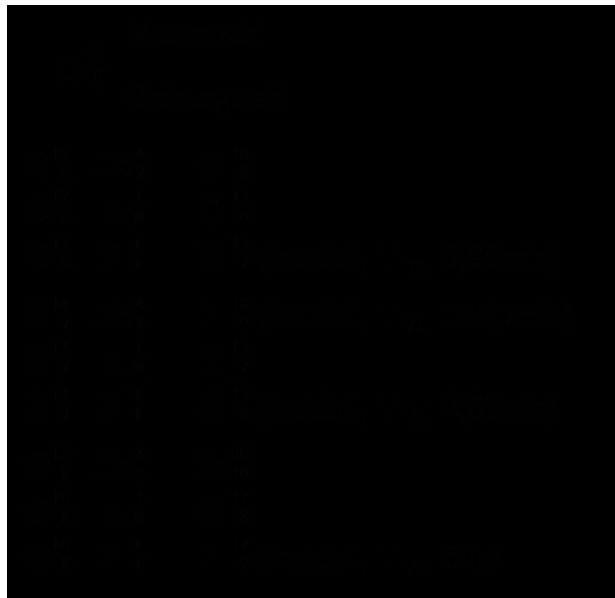
4.8 Nachweisbarkeit biogener Substanzen mittels Raman-Spektroskopie

Durch die Exposition der BIOMEX Proben biogener Substanzen im LEO kann es aufgrund der extraterrestrischen Bedingungen zu Degradations- und Zerfallsprozessen der Molekülstrukturen kommen. Durch Veränderungen der Molekülstrukturen ändern sich die Raman-Eigenschaften funktioneller Gruppen, was zu veränderter Detektierbarkeit der Substanzen durch die Raman-Spektroskopie führt. Die Analyse der biogenen Substanzen des BIOMEX Projekts zeigte, dass solche Substanzen, die in den Kontrollpellets

nachweisbar waren (Chlorophyllin, Quercitin, Melanin) auch nach der Exposition im LEO noch nachgewiesen werden konnten. Substanzen, die in den Kontrollpellets nur in geringem Ausmaß nachweisbar waren (β -Carotin, Naringenin, Cellulose, Chitin), waren in den BIOMEX Proben (mit wenigen Ausnahmen) nicht mehr detektierbar. Letztlich war eins der Ziele des BIOMEX Projekts, die Ergebnisse der Raman-Spektroskopie der biogener Substanzen für die Erstellung einer grundlegenden Biomarker-Datenbank zu nutzen. Da sich ausschließlich Chlorophyllin, Quercitin und Melanin nach Exposition im LEO noch deutlich nachweisen ließen, ist nur die Verwendung dieser drei Biosubstanzen für eine Biomarker-Datenbank empfehlenswert.

Strahlungsinduzierte Degradationen der biogenen Substanzen können als Ursache für veränderte Raman-Eigenschaften genannt werden, wodurch die Verbindungen nicht mehr nachweisbar sind. UV-B und -C Strahlung können stark schädigend auf Proteine wirken und sowohl Proteine als auch Chlorophylle und Carotinoide zerstören (Strid *et al.* 1994; Nogués & Baker 1995; Rao *et al.* 1996; Rozema *et al.* 1997; Jansen *et al.* 1998; Hollósy 2002; Nasibi & M'Kalantari 2005; Joshi *et al.* 2007; Rahimzadeh *et al.* 2011). Die tendenziell geringere Nachweisbarkeit der biogenen Substanzen der top layer lassen sich durch die höheren akkumulierten UV Strahlungsdosen erklären. Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erwähnt wurde, gibt es neben der UV-Strahlung weitere Strahlungsarten, die auch die BIOMEX Proben des bottom layers beeinträchtigen. Kommt es während der Expositionsphase der BIOMEX Proben zu einem Treffer eines Strahlungsteilchens in ein Atom der biogenen Substanzen, können abhängig von der Energie des Teilchens und abhängig davon, ob ein Elektron oder der Atomkern getroffen wurde, verschiedene Ereignisse eintreten, die zu einer Beeinträchtigung der Nachweisbarkeit mittels Raman-Spektroskopie führen können. Trifft ein Photon in der Atomhülle eines Atoms auf ein Elektron, wird das Elektron auf eine höheres Quantenniveau angehoben (+X Quanten). Allerdings verbleibt das Elektron dort nur für rund eine zehnmilliardstel Sekunde, kehrt dann auf den ursprünglichen, tieferen Platz zurück und emittiert dabei ein Photon (Schenk 1964). Je nach Energiegehalt des Photons beim Aufprall auf das Elektron kann das Elektron auch um mehrere Bahnen angehoben werden, um dann innerhalb von Sekundenbruchteilen wiederum auf den tieferen Platz zurückzukehren. Ionisierende Strahlung mit ausreichender Energie ist dazu fähig, Elektronen vom Atom zu trennen, wodurch Atomverbindungen zerstört werden und abbrechen und ganze Moleküle zerfallen können (Barboza-Flores *et al.* 2002). Durch solche Ereignisse kann es zur fehlenden Nachweisbarkeit der biogenen Substanzen nach Exposition im LEO kommen.

Darüber hinaus kann hochenergetische Strahlung auch mit den Atomkernen der exponierten Substanzen interagieren und dadurch bedingt die Umwandlung des Atoms bzw. den Zerfall des ganzen Moleküls nach sich ziehen. Wie bereits erwähnt wurde, können kosmische Strahlungsteilchen Protonen (Wasserstoffkerne), α Teilchen (Heliumkerne), Neutronen, Elektronen oder schwere Atomkerne sein. Anhand folgender Beispiele wird die mögliche Kernumwandlung von Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffatomen durch Beschuss mit α -Strahlung (He), Neutronenstrahlung (n) und Protonenstrahlung (P) veranschaulicht. Die beispielhaft ausgewählten Elemente (Kohlenstoff C, Stickstoff N und Sauerstoff O) sind allesamt Bestandteile der in dieser Studie eingesetzten biogenen Substanzen.



Durch den Teilchen-Beschuss können sich die Massen- und/oder Ordnungszahlen der getroffenen Atome erhöhen, wodurch neue Atomkerne entstehen. Durch die Änderung der Kernladung ändern sich auch die chemischen Eigenschaften des betroffenen Atoms, wodurch sich die Valenzen (=Wertigkeiten) der neu entstandenen Atome im Vergleich zum ursprünglichen Atom ändern. Im Molekülverband kann darauf die Auflösung kovalenter Bindungen zu anderen Atomen folgen, wodurch es zur Degradation des ursprünglichen Moleküls kommen kann. Dadurch kann es ebenfalls zu veränderten Raman-Eigenschaften und Veränderungen der Nachweisbarkeit der biogenen Substanzen durch die Exposition im LEO kommen. Zusätzlich kann das Produkt einer solchen Reaktion eines kosmischen Teilchens mit einem Atomkern radioaktiv sein und entsprechend nach verschiedenen Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) zerfallen, wodurch eine Nachweisbarkeit der entsprechenden Substanz mittels Raman-Spektroskopie nicht mehr möglich ist. Beim radioaktiven Zerfall von Atomen werden (je nach Zerfallstyp) Helium-

Kerne (α Zerfall), Elektronen oder Positronen (β^- bzw. β^+ Zerfall) oder elektromagnetische Strahlung von hoher Frequenz (γ Zerfall) freigesetzt.

4.9 Mission Ground Reference

Zusätzlich zur Exposition der BIOMEX Proben im Weltraum auf der ISS wurden Proben im Labor gegenüber simulierten Weltraumbedingungen (Mission Ground Reference, MGR) exponiert. Im Vergleich zu den BIOMEX Proben, die auf der ISS gegenüber echten Weltraumbedingungen exponiert waren, zeigen die MGR-Proben von *Buellia frigida* eine deutlich geringere Vitalität.

Die akkumulierten Strahlungsdosen der verschiedenen BIOMEX Proben der ISS wurden für die MGR Proben entsprechend der von der ISS übermittelten Strahlungsdaten simuliert. Allerdings unterscheiden sich die Expositionszeiten der MGR Proben deutlich von den Bestrahlungszeiten der BIOMEX Proben, da letztere auf der ISS relativ konstant über einen langen Zeitraum (1,5 Jahre) bestrahlt wurden. Für die simulierte Bestrahlung der MGR Proben in Köln wurde eine Deuteriumlampe verwendet, die entsprechend der übermittelten UV Strahlungsdosen für wiederholte kürzere Expositionszeiten eingeschaltet wurde.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass ein durch Strahlung verursachter Effekt auf biologische Organismen durch die Dauer der Expositionszeit beeinflusst wird (Sancho *et al.* 2007). In dieser Studie sollte durch den Bestrahlungsversuch, der mit isolierten Photobionten der Flechte *Buellia frigida* und monochromatischem UV-C_{254nm} durchgeführt wurde, der Einfluss der Expositionszeit bei gleichbleibender UV-C Dosis überprüft werden (siehe 2.2.11 und 3.10). Die Auswirkungen auf die Vitalität der PB wurden durch Messungen der Chlorophyll *a* Fluoreszenz ermittelt. Die Ergebnisse bestätigten eine Korrelation zwischen der Bestrahlungszeit und der photosynthetischen Aktivität. Bezüglich der Beurteilung der Vitalität von Organismen nach Exposition gegenüber Stressoren ist die Expositionszeit von relevanter Bedeutung.

4.10 Transportkontrolle

Eine Interpretation der Ergebnisse der Transportkontrolle ist nicht sinnvoll, da nicht nachvollziehbar ist, wie die Proben in Köln für die Dauer des BIOMEX Projekts gelagert wurden. Die Umweltparameter (Wasserverfügbarkeit, Temperatur, Lichtverhältnisse), unter denen die Transportkontrollen der rock, P- Mars und S-Mars Proben im DLR in Köln gelagert wurden, sind unbekannt. Daher sind alle Ergebnisse, die sich aus diesen Proben ergeben, schwierig zu interpretieren. Die Verantwortung für die Transportkontrollen während der Lagerung in Köln lag beim DLR.

V Zusammenfassung

Die endemische antarktische Flechte *Buellia frigida* sowie neun verschiedene biogene Substanzen wurden als Teil des *biology and Mars experiment* (BIOMEX) für 1,5 Jahre an der Außenseite der ISS am Zvezda Modul gegenüber Weltraumbedingungen des Low Earth Orbit (LEO) exponiert. Sowohl die Flechtenproben als auch die Proben der biogenen Substanzen waren während des Experiments auf verschiedenen Trägermaterialien in der EXPOSE-R2 Einheit integriert: auf Gestein (rock), auf Quarz-Plättchen sowie auf künstlich hergestellten Mars-Pellets. Die Quarz-Plättchen und die Gesteinsproben waren gegenüber Weltraumbedingungen des LEO exponiert (Vakuum), während die Proben auf den sogenannten Mars-Pellets zusätzlich einer künstlichen Mars-Atmosphäre ausgesetzt waren. Die BIOMEX Proben sind während der Weltraum-Exposition den verschiedenen Bedingungen des LEO ausgesetzt (extraterrestrische Strahlung, extreme Temperaturen, Vakuum bzw. Mars-Atmosphäre). Alle Proben waren in einer exponierten, oberen Schicht (top layer) und in einer darunter liegenden Schicht, geschützt vor einem Teil der extraterrestrischen Strahlung (bottom layer), angebracht. Ziel dieses Experiments war die Vitalität der Flechte und die Stabilität der biogenen Substanzen nach Exposition im LEO zu testen. Für die Analyse wurden verschiedene wissenschaftliche Methoden angewendet.

Die Stabilität der biogenen Substanzen wurde mittels Raman-Spektroskopie analysiert. Einige der untersuchten Substanzen ließen sich nach der Exposition im Weltraum nicht oder kaum noch detektieren (β -Carotin, Naringenin, Parietin, Cellulose, Chitin und Agar). Chlorophyllin, Quercitin und Melanin sind in den BIOMEX Proben nach Exposition im LEO noch nachweisen. Diese Substanzen sind als Biomarker für zukünftige Weltraum-Missionen zu empfehlen.

Durch die Analyse der BIOMEX Flechtenproben mittels Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie konnte ein hoher Anteil an Zellschäden festgestellt werden (kollabierte Protoplasten und deformierte Zellwände). Die Analyse der Flechte *Buellia frigida* mittels Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR Technik zeigte einen Verlust der DNA Integrität, die für das Überleben von Zellen und Organismen als essenzielle Voraussetzung gilt. Die auf Mars-Pellets befestigten Flechtenproben zeigen den größten DNA Integritätsverlust. Mittels LIVE/DEAD Färbung und Analyse am konfokalen Laser-Mikroskop wurden Sterberaten bis zu 76,4% für den Photobionten und bis zu 89,8% für den Mycobionten festgestellt. Nur eine von sechs BIOMEX

Flechtenproben (rock bottom) zeigte durch Chlorophyll *a* Fluoreszenz ermittelte photosynthetische Aktivität nach 1,5 Jahren Exposition im LEO. In einem Kultivierungsversuche zeigten nur die Photobionten der rock bottom Probe Reproduktions-, Zellteilungs- und Wachstumsfähigkeit. Obwohl die Fruchtkörper der BIOMEX Flechtenproben noch Sporen enthielten, konnte in einem durchgeführten Sporulationsversuch keine wachstums- oder keimfähige Spore beobachtet werden. Das im Cortex eingelagerte Melanin wirkt als effizienter UV Schutz in der Flechte. Die Fähigkeit von Flechten zur Anhydrobiose führt zu einer hohen Trockentoleranz, die unter den Vakuum Bedingungen des Weltraums den Vorteil bietet, strahlungsinduzierten Schäden wie die Radiolyse von Wasser deutlich zu reduzieren.

Das BIOMEX Experiment ist bereits das zweite Langzeit Experiment, das die Auswirkungen der LEO Bedingungen auf die Flechtensymbiose und ihre eukaryotischen Bionten untersucht hat. Im ersten Experiment, dem *lichen and fungi experiment* (LIFE), wurde die Flechte *Xanthoria elegans*, eine kosmopolitisch verbreitete Flechte, im LEO exponiert. Die Analyse dieser Flechte zeigte ein deutlich höheres Resistenzpotential nach der Exposition im LEO als die Flechte *Buellia frigida*. Der Endemismus der antarktischen Flechte *Buellia frigida* führt zu Lebensstrategien, die an die Besonderheiten der jeweiligen Umweltbedingungen speziell angefasst sind. Sie weist somit ein engeres Spektrum auf als eine kosmopolitische Art. Es kann postuliert werden, dass dieser Aspekt von Relevanz für das im Vergleich zu *Xanthoria elegans* niedrigere Resistenzpotential von *B. frigida* ist.

VI Summary

The endemic Antarctic lichen *Buellia frigida* and nine different biogenic substances have been exposed to low earth orbit (LEO) space conditions for 1.5 years on the outside of the ISS as part of the Biology and Mars Experiment (BIOMEX). The lichen samples and the biogenic substances are exposed to space conditions on different substrates (on rock or quartz pellets and on artificial Mars pellets). The quartz pellets and the rock samples were exposed to real LEO space conditions (vacuum) while the Mars pellets were exposed under an artificial Martian atmosphere. The BIOMEX samples are exposed to the various conditions of LEO during the BIOMEX project as extraterrestrial radiation. Additionally, all samples were placed in two different layers: a fully exposed top layer and a protected bottom layer. The aim of the BIOMEX project was to analyze the resistance potential of the lichen *Buellia frigida* and the stability of biogenic substances after exposure towards LEO conditions.

The stability of the biogenic substances was analyzed by Raman spectroscopy. Some of the investigated substances are not detectable after space exposure (β -carotene, naringenin, parietin, cellulose, chitin and agar). On the other hand, chlorophyllin, quercitin and melanin can still be detected in the different BIOMEX samples (quartz and Mars pellets) after space exposure. Concluding, these substances should be recommended as biomarkers for future space missions.

Analysis of the BIOMEX lichen samples by scanning and transmission electron microscopy revealed a high loss of cell integrity (collapsed protoplasts and deformed cell walls). The DNA integrity of cells or organisms can be described as essential for survival. DNA damages were detected for the lichen samples after space exposure by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR technique. Lichen samples exposed on Mars pellets show major loss of DNA integrity. High mortality rates for the photo- and mycobionts (up to 76.4% and 89.8%, respectively) were detected by LIVE/DEAD staining and analysis by confocal laser scanning microscopy. Chlorophyll *a* fluorescence measurements demonstrated only one out of six BIOMEX lichen samples (rock bottom) regained its photosynthetic activity after space exposure. The cultivation assay carried out for the BIOMEX samples successfully proofed the ability to reproduction, grow and colony formation for the rock bottom sample. A sporulation assay demonstrated that none of the fruiting bodies of the BIOMEX samples is able to distribute spores after space exposure.

The lichen *Buellia frigida* is able to synthesize an effective UV protector: the cortex pigment melanin (secondary metabolite). Due to the ability to anhydrobiosis, the symbiotic lichen organism has an enormous desiccation tolerance. This implies another protective effect considering the desiccation by space vacuum because radiation-induced damages (e.g. radiolysis of water) are significantly reduced in dried cells. However, the extreme dehydration caused by space vacuum and the additional effects of extraterrestrial radiation have a negative effect on the viability of the lichen *Buellia frigida*.

Concluding, the analysis of the lichen *Buellia frigida* after space exposure demonstrates a low resistance potential to the combined extraterrestrial conditions of the LEO. Some unknown long-term toxicity of the artificial Mars regolith or of the silicone rubber may affect the viability of the lichen samples.

The BIOMEX experiment is the second long-term experiment that analyzed the effects of LEO conditions on lichen organisms. In the first experiment, the *lichen and fungi experiment* (LIFE), the lichen *Xanthoria elegans* was exposed to the LEO conditions. Analysis of this lichen demonstrated a significantly higher survival potential compared to the lichen *Buellia frigida*. This can be explained by the different distribution of the lichens. *Xanthoria elegans* is a cosmopolitan lichen and thereby provides a wider life strategy, which contributes to an increased resistance potential.

VII Literaturverzeichnis

- Acuña, H. M., Connerney, J. E. P., Wasilewski, P., Lin, R. P., Anderson, K. A., Carlson, C. W., Mc Fadden, J., Curtis, D. W., Mitchell, D., Reme, H., Mazelle, C., Sauvaud, J. A., d'Uston, C., Cros, A., Medale, J. L., Bauer, S. J., CLoutier, P., Mayhew, M., Winterhalter, D., Ness, N. F. (1998). Magnetic field and plasma observations at Mars: Initial results of the Mars global surveyor mission. *Science* 279(5357), 1676-1680.
- Ahmadjian, V. (1993). The lichen symbiosis. *New York: John Wiley & Sons*.
- Allen, D. J., Nogués, S., Baker, N. R. (1998). Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? *Journal of experimental botany* 49(328), 1775-1788.
- Aro, E. M., Virgin, I., Andersson, B. (1993). Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143(2), 113-134.
- Atienzar, F. A., Venier, P., Jha, A. N., Depledge, M. H. (2002). Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research* 521(1-2), 151-163.
- Atienziar, A., Cordi, B., Donkin, M. E., Evenden, A. J., Jha, A. N., Depledge, M. H. (2000). Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic Toxicology* 50(1-2), 1-12.
- Aubert, S., Juge, C., Boisson, A. M., Gout, E., Bligny, R. (2007). Metabolic processes sustaining the reviviscence of lichen *Xanthoria elegans* (Link) in high mountain environments. *Planta* 226(5), 1287-1297.
- Backhaus, T. (2014). Einfluss von UC-V Strahlung auf den isolierten Photobionten der Flechte *Circinaria gyrosa*. *Bachelor-Arbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.
- Backhaus, T., de la Torre, R., Lyhme, K., de Vera, J.-P., Meeßen, J. (2015). Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC_{254nm} in the photobiont of the astrobiologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. *International Journal of Astrobiology* 14(3), 479-488.
- Backhaus, T., Meeßen, J., Demets, R., de Vera, J. P., Ott, S. (2019). Characterisation of viability of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in space on the international space station. *Astrobiology* 19(2), 233-241.
- Balzer, A. (2012). Sustainability of the composting toilet. *Undergraduate Honors Theses* 282.
- Barboza-Flores, M., Meléndres, R., Chernoc, V., Castaneda, B., Pedroza-Montero, M., Gan, B., Ahn, J., Zhang, Q., Yoon, S. (2002). Thermoluminescence in DVC diamond films: Application to actinometric dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* 100(14), 443-446.

- Barták, M., Váczi, P., Hájek, J., Smykla, J. (2007). Low-temperature limitation of primary photosynthetic processes in Antarctic lichens *Umbilicaria antarctica* and *Xanthoria elegans*. *Polar biology* 3(1), 47-51.
- Bender, B. (2000). Methoden zur Messung der Lichtgeschwindigkeit und Aspekte zur Konstanz der Lichtgeschwindigkeit. *Examensarbeit, Diplomica Verlag GmbH*.
- Berger, T., Hajek, M., Bilski, P., Körner, C., Vanhavere, F., Reitz, G. (2012). Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* 12(5), 387-392.
- Boiteux, L. S., Fonseca, M. E., Simon, P. W. (1999). Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124(1), 32-38.
- Böttger, U., de Vera, J. P., Fritz, J., Weber, I., Hübers, H. W., Schulze-Makuch, D. (2012). Optimizing the detection of carotene in cyanobacteria in a Martian regolith analogue with a Raman spectrometer for the ExoMars mission. *Planetary and Space Science* 60(1), 356-362.
- Brandt, A., de Vera, J. P., Onofri, S., Ott, S. (2015). Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated mars conditions on the ISS. *International Journal of Astrobiology* 14(3), 411-425.
- Brandt, A., Posthoff, E., de Vera, J. P., Onofri, S., Ott, S. (2016). Characterisation of growth and ultrastructural effects of the *Xanthoria elegans* photobiont after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. *Origin of life and evolution of biospheres* 46(2-3), 311-321.
- Brandt, A., Meeßen, J., Jänicke, R. U., Raguse, M., Ott, S. (2017). Simulated space radiation: impact of four different types of high-dose ionizing radiation on the lichen *Xanthoria elegans*. *Astrobiology* 17(2), 136-144.
- Braus, G. (2010). Das Königreich der Pilze: Vom Fluch der Pharaonen zur kulinarischen Bereicherung. *Jahrbuch der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen*, 457-466.
- Brix, J., Brose, M., Fartasch, M., Horak, W., Jossen, H., Kitz, E., Knuschke, P., Ott, G., Reichrath, J., Reidenbach, H. D., Schmid, H. R., Siekmann, H., Steinmetz, M., Völker, T. (2012). Leitfaden „Sonnenstrahlung“, Fachverband für Strahlenschutz
- Brodo, I. M., Sharnoff, S. D., Sharnoff, S. (2001). Lichens of north america. *Yale University Press, New Haven, London*.
- Brown, D. H., Ascaso, C., Rapsch, S. (1987). Ultrastructural changes in the pyrenoid of the lichen *Parmelia sulcata* stored under controlled conditions. *Protoplasma* 136(2), 136-144.
- Brunstein, K. A. & Cline, T. L. (1966). Possible spectral neutrality of cosmic radiation. *Nature* 209(5029), 1186.
- Büdel, B. & Scheidegger, C. (1996). Thallus morphology and anatomy. *Lichen biology* 2, 40-68.

- Buffoni Hall, R. S., Paulsson, M., Duncan, K., Tobin, A. K., Widell, S., Bornmann, J. F. (2003). Water- and temperature dependence of DNA damage and repair in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. *mitis* exposed to UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* 118(3), 371-379.
- Cacao, E. H., Hada, M., Saganti, P. B., George, K. A., Cucinotta, F. A. (2016). Relative biological effectiveness of HZE particles for chromosomal exchanges and other surrogate cancer risk endpoints. *PLoS One* 11(4), e0153998.
- Caldwell, T. E., Abdelrehim, I. M., Land, D. P. (1998). Preadsorbed oxygen atoms affect the product distribution and kinetics of acetylene cyclization to benzene on Pd (111): A laser-induced thermal desorption/fourier transform mass spectrometry study. *The Journal of Physical Chemistry B* 102(3), 562-568.
- Clayton, M. & Wiencke, C. (1998). The antarctic marine macroalgal flora: levels of endemism and characteristics of endemic species. *New Zealand Natural Sciences* 34.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54(1), 579-599.
- Danylchenko, O. & Sorochinsky, B. (2005). Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-C and y-rays. *BMC Plant Biology* 5(1), 1-2.
- Darwin, D (1859). On the origin of species by means of natural selection. *Murray, London*. 220.
- de Bary, H. A. (1979). Die Erscheinung der Symbiose. *Verlag von Karl J. Trübner, Straßburg*.
- de la Torre Noetzel, R., Sancho, L. G., Pintado, A., Rettberg, P., Rabbow, E., Panitz, C., Deutschmann, U., Reina, M., Horneck, G. (2007). BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: Pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Advances in Space Research* 40(11), 1665-1671.
- de la Torre, R., Horneck, G., Sancho, L. G., Pintado, A., Scherer, K., Facius, R., Deutschmann, U., Reina, M., Baglioni, P., Demets, R. (2004). Studies of lichens from high mountain regions in outer space: the Biopan experiment. *Proceedings of the third european workshop on exo-astrobiology, Mars: the search for life, edited by R.A. harris and L. Ouwehand, ESA SP-545, ESA Publications Division, Noordwijk, Netherlands*, 193-194.
- de la Torre, R., Miller, A. Z., Cubero, B., Martín-Cerezo, M. L., Raguse, M., Meeßen, J. (2017). The effect of high-dose ionizing radiation on the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiology* 17(2), 145-153.
- de la Torre, R., Sancho, L. G., Horneck, G., de los Ríos, A., Wierzechos, J., Olsson-Francis, K., Cockell, C., Rettberg, P., Berger, T., de Vera, J. P., Ott, S., Frías, J. M., Gonzalez, P. M., Lucas, M. M., Reina, M., Pintado, A., Demets, R. (2010). Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions-Results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208(2), 735-748.

- de los Ríos, A., Ascaso, C., Wierzechos, J., Sancho, L. G. (2010). Space flight effects on lichen ultrastructure and physiology. *Symbiosis and stress: joint ventures in biology, cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology* 17(5), edited by J. Seckbach and M. Grube, Springer, Heidelberg, 557-593.
- de los Ríos, A., Wierzechos, J., Sancho, L. G., Ascaso, C. (2004). Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 50(3), 143-152.
- de Vera, J. P., Möhlmann, D., Butina, F., Lorek, A., Wernecke, R., Ott, S. (2010). Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* 18(2), 215-227.
- de Vera, J. P. & Ott, S. (2010). Resistance of symbiotic eukaryotes. Survival to simulated space conditions and asteroid impact catalysms. *Symbioses and Stress* 17, 595-611.
- de Vera, J. P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2003). The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* 1(4), 285-293.
- de Vera, J. P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2004a). The potential of lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Advances in Space Research* 33(8), 1236-1243.
- de Vera, J. P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2004b). In the context of panspermia: may lichens serve as shuttles for their bionts in space? *Proceedings of the Third European Workshop on Astrobiology, ESA SP-545, ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, the Netherlands* 197-198.
- de Vera, J. P., Rettberg, P., Ott, S. (2008). Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Origion of Live and Evolution of Biospheres* 38(5), 457-468.
- de Vera, J. P., Schulze-Makuch, D., Khan, A., Lorek, A., Koncz, A., Möhlmann, D., Spohn, T. (2014). Adaptation of an Antarctic lichen to martian niche conditions can occur within 34 days. *Planet and Space Science* 98, 182-190.
- de Winne, F. W. (2015). Biology research on EXPOSE-R, Safety in Clusters . *esa, Space for life, human spaceflight science newsletter* (7), 10-14.
- Determeyer-Wiedmann, N., Sadowsky, A., Convey, P., Ott, S. (2019). Physiological life history strategies of photobionts of lichen species from Antarctic and moderate European habitats in response to stressful conditions. *Polar Biology* 42(2), 395-405.
- Donahue, B. A., Yin, S., Taylor, J. S., Reines, D., Hanawalt, P. C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(18), 8502-8506.

- Duplessis, S., Tagu, D., & Martin, F. (2002). Living together underground - a molecular glimpse of the ectomycorrhizal symbiosis. *Molecular Biology of Fungal Development. Osieqasz HD (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York Basel*, 302-303.
- Dyer, P. & Crittenden, P. (2008). Antarctic lichens: life in the freezer. *Microbiology Today* 35(2), 74.
- Eichler, J. (2011). Physikalische Größen. *Physik. Vieweg+Teubner* 1-3.
- Eker, A. P., Yajima, H., Yasui, A. (1994). DNA photolyase from the fungus *Neurospora cassia*. Purification, characterization and comparison with other photolyases. *Photochemistry and Photobiology* 60(2), 125-133.
- Emerson, F. W. (1947). Basic botany. *The Blakiston Co., Philadelphia*.
- Engelen, A., Buschbom, J., Voncey, P., Ott, S. (2008). Specificity and selectivity of algal partners in the lichen symbioses at coastal and inland sites in Antarctica. In: *Antarktische Nunatakker als Modell-Ökosystem für initiale Besiedlungsprozesse und Artendiversität in nacheiszeitlichen Perioden. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, 75-96.
- Esnault, M. A., Legue, F., Chenal, C. (2010). Ionizing radiation: advances in plant response. *Environmental and experimental botany* 68(3), 231-237.
- Fairén, A. G., Davila, A. F., Lim, D., Bramall, N., Bonaccorsi, R., Zavaleta, J., Uceda, E. R., Stoker, C., Wierzechos, J., Dohm, J. M., Amils, R., Andersen, D., McKay, C. P. (2010). Astrobiology through the ages of mars: the study of terrestrial analogues to understand the habitability of Mars. *Astrobiology* 10(8), 821-843.
- Finster, K., Hansen, A., Liengard, L., Mikkelsen, K., Kristoffersen, T., Merison, J., Nørnberg, P., Lomstein, B. A. (2007). Mars simulation experiments with complex microbial soil communities. In *ROME: Response of organisms to the Martian environment, edited by Horneck, G. (Cockell, C., ESA communications, ESTEC, Noordwijk, Netherlands)*, 59-71.
- Friedmann, E. I., Hua, M., Ocampo-Friedmann, R. (1988). Cryptoendolithic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica. *Polarforschung* 58(2-3) 251-259.
- Gannutz, T. P. (1972). Effects of gamma radiation on lichens - I. acute gamma radiation on lichen algae and fungi. *Radiation Botany* 12(5), 331-338.
- Gasulla, F., de Noca, P. G., Esteban-Carrasco, A., Zapata, J. M., Barreno, E., Guéra, A. (2009). Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichenic algae *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231(1), 195-208.
- Gehrig, H., Schüssler, A., Kluge, M. (1996). *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with Nostic (cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: Evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution* 43(1), 71-81.

- Giovanetti, M. (2002). Survival strategies in arbuscular mycorrhizal symbionts. *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems. Seckbach J (Ed.), Kluwer, Academic Press, Dordrecht*, 293-321.
- Girard, P. M., Francesconi, S., Pozzebon, M., Graindorge, D., Rochette, P., Droun, R., Sage, E. (2011). UVA-induced damage to DNA and proteins: direct versus indirect photochemical processes. *journal of Physics: Conference Series 261(1)*, IOP Publishing.
- Haak, V., Maus, S., Korte, M., Lühr, H. (2003). Das Erdmagnetfeld – Beobachtung und Überwachung. Spezial: Geophysik. *Physik in unserer Zeit 34(5)*, 218-224.
- Harm, W. (1980). Biological effects of ultraviolet radiation.
- Hassler, D. M., Zeitlin, C., Wimmer-Schweingruber, R. F., Ehresmann, B., Rafkin, S., Eigenbrode, J. L., Brinza, D. E., Weigle, G., Böttcher, S., Böhm, E., Burmeister, S., Guo, J., Köhler, J., Martin, C., Reitz, G., Cucinotta, F. A., Kim, M. H., Grinspoon, D., Bullock, M. A., Posner, A., Gómez-Elvira, J., Vasavada, A., Grotzinger, J. P. and MSL Science Team (2014). Mars' surface radiation environment measured with the mars science laboratory's curiosity rover. *Science 343(6169)*, 1-6.
- Hawksworth, D. L. (1988). The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society 96(1)*, 3-20.
- Henssen, A. & Jahns, H. M. (1974). *Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hestmark, G. (1991). To sex or not to sex--: structures and strategies of reproduction in the family Umbilicariaceae (Lecanorales, Ascomycetes). *Sommerfeltia Supplement 3*, 1-47.
- Hoekstra, F., Golovina, E. A., Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science 6(9)*, 431-438.
- Holder, J. M., Wynn-Williams, D. D., Perez, F. R., Edwards, H. G. (2000). Raman spectroscopy of pigments and oxalates *in situ* within epilithic lichens. *Acarospora from the Antarctic and mediterranean. New Phytologist 145(2)*, 271-280.
- Hollis, J. M., Lovas, F. J., Jewell, P. R. (2000). Interstellar glycoaldehyde: the first sugar. *The Astrophysical Journal Letters 540(2)*, L107.
- Hollósy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron 33(2)*, 179-197.
- Honegger, R. (1986). Ultrastructural studies in lichens. *New phytologist 103(4)*, 797-808.
- Honegger, R. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual review of plant biology 42(1)*, 553-578.
- Honegger, R. (1993). Developmental biology of lichens. *New Phytology 125(4)*, 659-677.
- Honegger, R. (1996). Experimental studies of growth and regenerative capacity in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *New Phytologist 133(4)*, 573-581.

- Honegger, R. (1998). The lichen symbiosis - What is so spectacular about it? *Lichenologist* 30(3), 193-212.
- Honegger, R. (2003). The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biology* 5(3), 324-330.
- Honegger, R. (2018). Fossil lichens from the lower Devonian and their bacterial and fungal epi- and endobionts. *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 547-563.
- Honegger, R., Peter, M., Scherrer, S. (1996). Drought-induced structural alterations at the mycobiont-photobiont interface in a range of foliose macrolichens. *Protoplasma* 190(3), 221-232.
- Horne, R. B., Thorne, R. M., Glauert, S. A., Meredith, N. P., Pokhotelov, D., Santolík, O. (2007). Electron acceleration in the van allen radiation belts by fast magnetosonic waves. *Geophysical research letters* 34(17), 1-5.
- Horneck, G. (1999). Astrobiology studies of microbes in simulated interplanetary space. *Laboratory astrophysics and space research. Springer, Dordrecht.* 667-685.
- Horneck, G. (2001). Likelihood of transport of life between the planets of our solar system. *First steps in the origin of life in the universe. Springer, Dordrecht.* 231-236.
- Horneck, G., Bücker, H., Reitz, G., Requardt, H., Dose, K., Martens, K. D., Mennigmann, H. D., Weber, P. (1984). Life sciences: microorganisms in the space environment. *Science* 225(4658), 226-228.
- Horneck, G., Klaus, D. M., Mancinelli, R. L. (2010). Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(1), 121-156.
- Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, S. C., Möller, R., Meyer, C., de Vera, J. P., Schade, S., Artemieva, N. A. (2008). Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: first phase of Lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8(1), 17-44.
- Huneck, S. & Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances. *Identification of lichen substances, Springer, Berlin, Heidelberg.* 11-123.
- Jahns, H. M. (1988). The lichen thallus. *CRC handbook of lichenology, Vol I CRC Press, BOCA Ranton.* 95-143.
- Jahns, H. M. & Ott, S. (1997). Life strategies in lichens - some general considerations. *Bibliotheca Lichenologica* 67, 49-68.
- Jänchen, J., Meeßen, J., Herzog, T. H., Feist, M., de la Torre, R., de Vera, J. P. (2015). Humidity interaction of lichens under astrobiological aspects: the impact of UVC exposure on their water retention properties. *International Journal of Astrobiology* 14(3), 445-456.
- Jansen, M., Gaba, V., Greenberg, B. M., Mattoo, A. K., Edelman, M. (1996a). Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem-II. *The plant journal* 9(5), 693-699.

- Jansen, M. A., Babu, T. S., Heller, D., Gaba, V., Mattoo, A. K., Edelman, M. (1996b). Ultraviolet-B effects on *Spirodela oligorhiza*: induction of different protection mechanisms. *Plant Science* 115(2), 217-223.
- Jansen, M. A., Gaba, V., Greenberg, B. M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3(4), 131-135.
- Jasinghe, V. J. & Perera, C: O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation. *Food chemistry* 92(3), 541-546.
- Jenkins, G. I., Christie, J. M., Fuglevand, G., Long, J. C., Jackson, J. A. (1995). Plant responses to UV and blue light: biochemical and genetic approaches. *Plant Science* 112(2), 117-138.
- Jensen, M. (2002). Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens. *Protocols in Lichenology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 135-151.
- Joseph, R. G., Dass, R. S., Rizzo, V., Cantasano, N., Bianciardi, G. (2019). Evidence of life on Mars? *Journal of Astrobiology and space science reviews* 1(40), 40-81.
- Joshi, P. N., Ramaswamy, N. K., Iyer, R. K., Nair, J. S., Pradhan, M. K., Gartia, S., Biswal, B., Biswal, U. C. (2007). Partial protection of photosynthetic apparatus from UV-B induced damage by UV-A radiation. *Environmental and Experimental Botany* 59(2), 166-172.
- Kaiser, R. I., Parker, D. S., Mebel, A. M. (2015). Reaction dynamics in astrochemistry: low-temperature pathways to polycyclic aromatic hydrocarbons in the interstellar medium. *Annual Review of Physical Chemistry* 66(2015), 43-67.
- Kappen, L. (1985). Lichen-habitats as micro-oases in the Antarctic-the role of temperature. *Polarforschung* 55(1), 49-54.
- Kappen, L. (1993). Plant activity under snow and ice, with particular reference to lichens. *Arctic* 46(4), 297-302.
- Kappen, L. (1997). Flechten in der Antarktis. *Flechten. Geschichte, Biologie, Systematik, Ökologie, Naturschutz und kulturelle Bedeutung. Kleine Senckenberg-Reihe* 27, 149-156
- Kappen, L., Schroeter, B., Green, T. G: A., Seppelt, R: D. (1998). Chlorophyll *a* fluorescence and CO₂ exchange of *Umbilicaria aprina* under extreme light stress in the cold. *Oecologia* 113(3), 325-331.
- Kappen, L., Schroeter, B., Scheidegger, C., Sommerkorn, M., Hestmark, G. (1996). Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0°C. *Advances in space research* 18(12), 119-128.
- Kappen, L. (2000). Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science* 12(3), 314-324.
- Kappen, L. & Friedmann, E. I. (1983). Ecophysiology of lichens in the dry valleys of Southern Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology* 1(4), 227-232.

- Kappen, S. B., Green, T. G., Seppelt, D. R. (1998). Microclimatic conditions, meltwater moistening, and the distributional pattern of *Buellia frigida* on rock in a southern continental Antarctic habitat. *Polar biology* 19(2), 101-106.
- Keresztes, E. & Kovács, Á. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron* 33(2), 199-210.
- Kinraide, W. T. B. & Ahmadjian, V. (1970). The effects of usnic acid on the physiology of two cultured species of the lichen alga *Trebouxia* Puym. *Lichenologist* 4(3), 234-247.
- Kosugi, M., Arita, M., Shizuma, R., Moriyama, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K. (2009). Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant and cell physiology* 50(4), 879-888.
- Kovács, E. & Keresztes, A. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron* 33(2), 271-274.
- Kranner, I. & Birtic, S. (2005). A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45(5), 734-740.
- Kranner, I., Becket, R., Hochmann, A., Nash III, T. H. (2008). Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* 111(4), 576-593.
- Kranner, I., Zorn, M., Turk, B., Wornik, S., Becket, R. P., Batic, F. (2003). Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance. *New Phytologist* 160(1), 167-176.
- Kranner, L., Cram, W. J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheimer, E., Pfeifhofer, H. W. (2005). Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(8), 3141-3146.
- Kuroda, S., Yano, H., Koga-Ban, Y., Tabei, Y., Takaiwa, F., Kayano, T., Tanaka, H. (1999). Identification of DNA polymorphism induced by X-ray and UV irradiation in plant cells. *Japan Agricultural Research Quarterly* (33), 223-226.
- Kvenvolden, K. A., Lawless, J. G., Ponnamperna, C. (1971). Nonprotein amino acids in the Murchison meteorite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(2), 486-490.
- Kvenvolden, K., Lawless, J., Pering, K., Peterson, E., Flores, J., Ponnamperna, C., Kaplan, I. R., Moore, C. (1970). Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Nature* 228(5275), 923-926.
- Lalrotluanga, Senthil Kumar, N., Gurusubramanian, G. (2011). Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage in mosquito larvae treated with plant extracts. *Science Vision* 11(3), 155-158.
- Lange, O. L. (1954). Einige Messungen zum Wärmehaushalt poikilohydrer Flechten und Moose. *Archiv für Meteorologie, Geophysik und Bioklimatologie, Serie B* 5.2, 182-190.

- Lange, O. L. (1969). The functional adaptation of lichens to ecological conditions of arid areas. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft* 82(1), 3-22.
- Lange, O. L. (1992). Pflanzenleben unter Stress. Flechten als Pioniere der Vegetation an Extremstandorten der Erde. Rostra Universitas Wirceburgensis, Würzburg. 213-217
- Lange, O. L. & Kappen, L. (1972). Photosynthesis of lichens from Antarctica. *Antarctic terrestrial biology* 20, 83-95.
- Lange, O. L., Bilger, W., Rimke, S., Schreiber, U. (1989). Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water. *Botanica acta* 102(4), 306-313.
- Lange, O. L., Green, T. G. A., Heber, U. (2001). Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance? *Journal of Experimental Botany* 52(363), 2033-2042.
- Larson, D. (1987). The absorption and release of water by lichens. *Bibliotheca Lichenologica* 25(35), 351-360.
- Leavitt, S. D., Kraichak, E., Nelsen, M. P., Altermann, S., Divakar, P., Alors, D., Esslinger, T. L., Crespo, A., Lumbsch, T. (2015). Fungal specificity and selectivity for algae play a major role in determining lichen partnerships across diverse ecogeographic regions in the lichen-forming family Parmeliaceae (Ascomycota). *Molecular Ecology* 24(14), 3779-3797.
- Lytvyn, D. I., Yemets, A. I., Blume, Y. B. (2010). UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line. *Environmental and Experimental Botany* 68(1), 51-57.
- Maldonado, A. P., O'Connell, D., Welch, E., Vann, R., van der Woude, M. W. (2016). Spatial dependence of DNA damage in bacteria due to low-temperature plasma application as assessed at the single cell level. *Scientific Reports* 6(2016), 1-10.
- Meeßen, J., Backhaus, T., Brandt, A., Raguse, M., Böttger, U., de Vera, J. P., de la Torre, R. (2017). The effect of high-dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiologie* 17(2), 154-162.
- Meeßen, J., Backhaus, T., Sadowsky, A., Mrkalj, M., Sánchez, F. J., de la Torre, R., Ott, S. (2014b). Effects of UVC_{254nm} on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. *International Journal of Astrobiology* 13(4), 340-352.
- Meeßen, J., Sánchez, F. J., Sadowsky, A., de Vera, J. P., de la Torre, R., Ott, S. (2014a). Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five lichen species used in astrobiological research II. Secondary lichen compounds. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 43(6), 501-526.
- Meeßen, J., Sánchez, F. J., Brandt, A., Balzer, E. M., de la Torre, R., Sancho, L. G., de Vera, J. P., Ott, S. (2013). Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research. I. Morphological and anatomical characteristics. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 43(3), 283-303.

- Meeßen, J., Wuthenow, P., Schille, P., Rabbow, E., de Vera, J. P., Ott, S. (2015). Resistance of the lichen *Buellia frigida* to simulated space conditions during the preflight tests for BIOMEX-viability assay and morphological stability. *Astrobiology* 15(8), 601-615.
- Meredith, P. & Riesz, J. (2004). Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochemistry and Photobiology* 79(2), 211-216.
- Miller, S. L. (1953). A production of amino acids under possible primitive Earth conditions. *Science* 117(3046), 528-529.
- Miller, S. L., Urey, H. C., Oró, J. (1976). Origin of organic compounds on the primitive earth and in meteorites. *Journal of Molecular Evolution* 9(1), 59-72.
- Moeller, R., Raguse, M., Leuko, S., Berger, T., Hellweg, C. E., Fujimori, A., Okayasu, R., Horneck, G., STARLIFE Research Group (2017). STARLIFE-An international campaign to study the role of galactic cosmic radiation in astrobiological model systems. *Astrobiology* 17(2), 101-110.
- Moussa, G. (2009). Referenzbereich der minimalen Erythemdosis für UVB- und UVA-Strahlung.
- Nash III, T. H., White, S. L., Marsh, J. E. (1977). Lichen and moss distribution and biomass in hot desert ecosystems. *The Bryologist* 80(3), 470-479.
- Nasibi, F. & M'Kalantari, K. H. (2005). The effects of UV-A, UV-B and UV-C on protein and ascorbate content, lipid peroxidation and biosynthesis of screening compounds in *Brassica napus*. *Iranian Journal of Science and Technology* 29(1), 39-48.
- Nelson, J. R., Lawrence, C. W., Hinkle, D. C. (1996). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA-polymerase ζ . *Science* 272(5268), 1646-1649.
- Nguyen, K. H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., Tomasi, S. (2013). UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural product reports* 30(12), 1490-1508.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3), 548-572.
- Nicholson, W. L., Schuerger, A. C., Setlow, P. (2005). The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research* 571(1-2), 249-264.
- Noblet, A., Stalport, F., Guan, Y. Y., Poch, O., Coll, P., Szopa, C., Cloix, M., Macari, F., Raulin, F., Chaput, D., Cottin, H. (2012). The PROCESS experiment: amino and carboxylic acids under Mars-like surface UV radiation conditions in low-Earth orbit. *Astrobiology* 12(5), 436-444.
- Nogués, S. B. & Baker, N. R. (1995). Evaluation of the role of damage to photosystem II in the inhibition of CO₂ assimilation in pea leaves on exposure to UV-B radiation. *Plant, Cell & Environment* 18(7), 781-787.

- Nybakken, L., Solhaug, K. A., Bilger, W., Gauslaa, Y. (2004). The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* 140(2), 211-216.
- Onofri, S., de la Torre, R., de Vera, J. P., Ott, S., Zucconi, L., Selbmann, L., Scalzi, G., Venkateswaran, K. J., Rabbow, E., Sánchez, F. J., Horneck, G. (2012). Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space. *Astrobiology* 12(5), 508-516.
- Oró, J. & Kimball, A. P. (1961). Synthesis of purines under possible primitive earth conditions. I. Adenine from hydrogen cyanide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 94(2), 217-227.
- Oró, J. & Kimball, A. P. (1962). Synthesis of purines under possible primitive earth conditions. II. Purine intermediates from hydrogen cyanide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 96(2), 293-313.
- Ott, S. (1987). Reproductive strategies in lichens. Progress and problems in lichenology in the eighties. *Bibliotheca Lichenologica* 25, 81-93.
- Ott, S. & Lumbsch, H. (2001). Morphology and phylogeny of ascomycete lichens. *Fungal Associations. Springer, Berlin, Heidelberg*. 189-210.
- Ott, S., Treiber, K., Jahns, M. (1993). The development of regenerative thallus structures in lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society* 113(1), 61-67.
- Otting, W. (1952). Der Raman-Effekt und seine analytische Anwendung. *SpringerVerlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg*.
- Øvstedal, D. O. & Smith, R. L. (2001). Lichens of Antarctica and South Georgia. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*. 361-363.
- Palumbo, A. M. & Head, J. W. (2018). Impact cratering as a cause of climate change, surface alteration, and resurfacing during the early history of Mars. *Meteoritics & Planetary Science* 53(4), 687-725.
- Pasternack, R. F., Bustamante, C., Collings, P. J., Giannetto, A., Gibbs, E. J. (1993). Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique. *Journal of the American chemical society* 115(13), 5393-5399.
- Perez-Ortega, S., Ortiz-Álvarez, R., Green, T. A., de los Ríos, A. (2012). Lichen myco- and photobiont diversity and their relationships at the edge of life (MyMurdo Dry Valleys, Antarctica). *FEMS Microbiology Ecology* 82(2), 429-448.
- Petersen, J. L., Lang, D. W., Small, G. D. (1999). Cloning and characterization of a class II DNA photolyase from *Chlamydomonas*. *Plant Molecular Biology* 40(6), 1063-1071.
- Petty, J., Zheng, J., Hud, N., & Dickson, R. (2004). DNA-templated Ag nanocluster formation. *Journal of the American Chemical Society* 126(16), 5207-5212.
- Piekarski, G. (2013). Lehrbuch der Parasitologie: unter besonderer Berücksichtigung der Parasiten des Menschen. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg*.

- Plemenitaš, A., Vaupotič, T., Lenassi, M., Kogej, T., Grunde-Cimerman, N. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology* 61, 67-75.
- Poch, O., Kaci, S., Stalport, F., Szopa, C., Coll, P. (2014). Laboratory insights into the chemical and kinetic evolution of several organic molecules under simulated Mars surface UV radiation conditions. *Icarus* 242, 50-63.
- Poch, O., Noblet, A., Stalport, F., Correia, J. J., Grand, N., Szopa, C., Coll, P. (2013). Chemical evolution of organic molecules under Mars-like UV radiation conditions simulated in the laboratory with the "Mars organic molecule irradiation and evolution" (MOMIE) setup. *Planet and Space Science* 85, 188-197.
- Postgate, J. R. (1969). Chapter XVII viable counts and viability. *Methods in microbiology* 1, 611-628.
- Quilhot, W., Fernandez, E., Rubio, C., Cavieres, M. F., Hidalgo, M. E., Goddard, M., Galloway, D. (1996). Preliminary data on the accumulation of usnic acid related to ozone depletion in the Antarctic lichens. *Seria Cientias INACH* 46, 105-111.
- Rabbow, E., Huberth, S., Willnecker, R. (2016b). EXPOSE-R2 mission and mission ground reference report. *ISS-MUSC-EXP-RP-0017*, 53-75.
- Rabbow, E., Parpart, A., Reitz, G. (2016a). The planetary and space simulation facilities at DLR Cologne. *Microgravity Science and Technology* 28(3), 215-229.
- Rabbow, W., Rettberg, P., Barczyk, S., Bohmeier, M., Parpart, A., Panitz, C., Horneck, G., von Heise-Rotenburg, R., Hoppenbrouwers, T., Willnecker, R., Baglioni, P., Demets, R., Dettmann, J., Reitz, G. (2012). EXPOSE-E: an ESA astrobiology mission 1.5 years in space. *Astrobiology* 12(5), 374-386.
- Rabbow, W., Rettberg, P., Parpart, A., Panitz, C., Schulte, W., Molter, F., Jaramillo, E., Demets, R., Weiß, P., Willnecker, R. (2017). EXPOSE-R2: The Astrobiological ESA Mission on Board of the International Space Station. *Frontiers in Microbiology* 8, 1-14.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., de la Torre, R., de los Ríos, A., Wierzechos, J., Horneck, G., Sancho, L. (2011). Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11(4), 281-292.
- Rahimzadeh, P. H., Hosseini, S., Dilmaghani, K. (2011). Effects of UV-A and UV-C radiation on some morphological and physiological parameters in savory (*Satureja hortensis* L.). *Annals of Biological Research* 2(5), 164-171
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110(1), 125-136.
- Rastogi, R. P., Kumar, A., Tyagi, M. B., Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids* 2010, 1-32.

- Ravant, J. L., Douki, T., Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63(1), 88-102.
- Reape, T. J., Molony, E. M., McCabe, P. F. (2008). Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of experimental botany* 59(3), 435-444.
- Rebecchi, L., Altiero, T., Guidetti, R. (2007). Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebrate Survival Journal* 4(2), 65-81.
- Rikkinen, J. (1995). What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens. *Bryobrothera* 4, 1-239.
- Riley, P. A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* 65(1), 27-33.
- Roy, S. (2000). Strategies for the minimization of UV-induced damage. *The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge University Press*, 177-205.
- Rozema, J., van de Staaij, J., Björn, L. O., Caldwell, M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in ecology & evolution* 12(1), 22-28.
- Rutherford, E. (1911). The scattering of α and β particles by matter and the structure of the atom. *Philosophical Magazine* 6(21), 669-688.
- Saarschmidt, S., Hause, B., Strack, D. (2009). Einladung ans Buffet-Wege zur Mykorrhiza. *Biologie in unserer Zeit* 2(39), 102-113.
- Sadowsky, A. & Ott, S. (2012). Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis* 58(1-3), 81-90.
- Sadowsky, A. & Ott, S. (2016). Symbiosis as a successful strategy in continental Antarctica: performance and protection of *Trebouxia* photosystem II in relation to lichen pigmentation. *Polar Biology* 39(1), 139-151.
- Sánchez, F. J., Meeßen, J., Ruiz, M., Sancho, L., Ott, S., Vilchez, C., Horneck, G., Sadowsky, A., de la Torre, R. (2014). UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *International Journal of Astrobiology* 13(1), 1-18.
- Sánchez, F., Mateo-Martí, E., Raggio, J., Meeßen, J., Martínez-Frías, J., Sancho, L., Ott, S., de la Torre, R. (2012). The resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (nom. provis) towards simulated mars conditions - a model test for the survival capacity of a eukaryotic extremophile. *Planetary and Space Science* 72(1), 102-110
- Sancho, L. G., de la Torre, R., Pintado, A. (2008). Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biology Reviews* 22(3), 103-109.
- Sancho, L. G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Ríos, A., Pintado, A., Wierzechos, J., Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7(3), 443-454.

- Sarno-Smith, L. (2015). A radiation belt MeV electron flux comparison between RBE and GOES-15. *Data-Model Comparison* 1-10.
- Sass, L., Spetea, C., Máté, Z., Nagy, F., Vass, I. (1997). Repair of UV-B induced damage of photosystem II via de novo synthesis of D1 and D2 reaction centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research* 54(1), 55-62.
- Scalzi, G., Selbmann, L., Zucconi, L., Rabbow, E., Horneck, G., Albertano, P., & Onofri, S. (2012). LIFE Experiment: isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 42(2-3), 253-262.
- Schenk, G. (1964). Das Unsichtbare Universum. Safari Verlag.
- Schirmack, J., Böhm, M., Brauer, C., Löhmannsröben, H. G., de Vera, J. P., Möhlmann, D., Wagner, D. (2014). Laser spectroscopic real time measurements of methanogenic activity under Martian subsurface analogue conditions. *Planetary and Space Science* 98, 198-204.
- Schlenso, M. A. R. K., Schroeter, B., Pannewitz, S., Green, T. G. A. (2003). Adaptation of mosses and lichens to irradiance stress in maritime and continental Antarctic habitats. *Antarctic Biology in a global context*, Backhuys Publishers, Leiden. 161-166.
- Schöller, H. (1997). Flechten. Geschichte, Biologie, Systematik, Ökologie, Naturschutz, kulturelle Bedeutung. Kleine Senckenberg-Reihe (27).
- Schreiber, U. B. W. N., Bilger, W., Neubauer, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecophysiology of Photosynthesis*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 49-70.
- Schroeter, B. & Scheidegger, C. (1995). Water relations in lichens at subzero temperatures: structural changes and carbon dioxide exchange in the lichen *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica. *New Phytologist* 131(2), 273-285.
- Schubert, R. & Wagner, G. (1993). Botanisches Wörterbuch 11. Auflage. *Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart*. 519.
- Shields, L. M. & Rickard, W. H. (1961). A preliminary evaluation of radiation effects at the Nevada test site. *Recent Advances in Botany*, University of Toronto Press New York. 1387-1390.
- Shkrob, I. A., Chemerisov, S. D., Marin, T. W. (2010). Photocatalytic decomposition of carboxylated molecules on light-exposed martian regolith and its relation to methane production on Mars. *Astrobiology* 10(4), 425-435.
- Sinha, R. P. & Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1(4) 225-236.
- Sojo, F., Romeike, J., Ott, S. (2003). *Himantormia lugubris* (Hue) M. Lamb - vegetative and reproductive habit: adaptations of an Antarctic endemic. *Flora* 198(2), 118-126.

- Solhaug, K. A., Gauslaa, Y., Nybakken, L., Bilger, W. (2003). UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist* 158(1), 91-100.
- Solhaug, K. A. & Gauslaa, Y. (1996). Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia* 108(3), 412-418.
- Solhaug, K. A. & Gauslaa, Y. (2004). Photosyntates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Plant, Cell & Environment* 27(2) 167-178.
- Spagnuolo, V., Zampella, M., Giordano, S., Adamo, P. (2011). Cytological stress and element uptake in moss and lichen exposed in bags in urban area. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(5), 1434-1443.
- Spieß, G. & Klapötke, T. M. (1999). Eine einfache Einführung in die Raman-Spektroskopie. LMU München.
- Sterflinger, K. (2006). Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts, Springer, Berlin*. 501-514.
- Stöffler, D., Horneck, G., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C. S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J. P., Fritz, J., Artemieva, N. A. (2007). Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus* 189, 585-588
- Strid, A., Chow, W. S., Anderson, J. M. (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynthesis Research* 39(3), 475-489.
- Takeuchi, Y., Murakami, M., Nakajima, N., Kondo, N., Nikaido, O. (1996). Induction of repair and damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV-B. *Plant and Cell Physiology* 37(2), 181-187.
- Teramura, A. H. & Sullivan, J. H. (1994). Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research* 39(3), 463-473.
- Thierfelder, N. K. (2006). Untersuchung zur Apoptoseinduktion in lymphoblastoiden Zellen von Patienten mit Nijmegen-Brekage-Syndrom. *Dissertation, Humboldt-Universität, Berlin*.
- Unal, D., Tuney, I., Esiz-Dereboyly, A., Sukatar, A. (2009). The effect of UV-A (352 nm) stress on chlorophyll fluorescence, chlorophyll a content, thickness of upper cortex and determinate DNA damage in *Physcia semipinnata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 94(1), 71-76.
- Valladares, F., Sancho, L. G., Ascaso, C. (1998). Water storage in the lichen family Umbilicariaceae. *Botanica Acta* 111(2), 99-107.
- Varela, M. M. (1964). Origins of terrestrial life. *Philippine Studies* 12(3), 460-472.
- Vass, I., Sass, L., Spetea, C., Bakou, A., Ghanotakis, D. F., Petrouleas, V. (1996). UV-B-induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. *Biochemistry* 35(27), 8964-8973.

- Vass, I., Szilárd, A., Sicora, C. (2005). 43 adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In *Handbook of Photosynthesis, Francis and Taylor publisher, New York*. 43-63.
- Völkle, H. (2010). Die kosmische Strahlung. *Bulletin de la Société Sciences Nat* 100.
- Wagner, H. F. (2017). *www.weltderphysik.de*. Abgerufen am 21. 01 2019 von welt der physik: <https://www.weltderphysik.de/index.php?id=142>
- Weisling, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W. (1994). DNA fingerprinting in plants and fungi. *CRC Press*.
- Woodwell, G. M. & Gannutz, T. P. (1967). Effects of chronic gamma irradiation on lichen communities of a forest. *American Journal of Botany* 54(10), 1210-1215.
- Wynn-Williams, D. D. & Edwards, H. G. (2002). Environmental UV radiation: biological strategies for protection and avoidance. *Astrobiology, Springer, Berlin, Heidelberg*. 245-260.
- Yoshimura, I., Yamamoto, Y., Nakano, T., Finnie, J. (2002). Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts. *Protocols in lichenology. Berlin, Heidelberg: Springer*. 3-33
- Zhdanova, N. N., Zakharchenko, V. A., Vember, V. V., Nakonechnaya, L. T. (2000). Fungi from chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research* 104(12), 1421-1426.
- Zook, D. (2010). Tropical rainforests as dynamic symbiospheres of life. *Symbiosis* 51(1), 27-36.

VIII Anhang

zu 3.2 Ultrastrukturelle Veränderungen (TEM)

3.2.1 Ultrastrukturelle Schäden an Photo- und Mycobionten der Flechte *Buellia frigida* (Frischkontrolle) in %. Aufgelistet sind kollabierte Protoplasten und deformierte Zellwände.

	Photobiont			Mycobiont		
	Anzahl PB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände	Anzahl MB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände
Frischkontrolle						
7	2	0	36	0	0	
8	3	0	33	1	1	
26	4	0	29	1	0	
19	2	0	33	1	0	
6	1	1	27	0	0	
8	2	0	31	0	1	
7	1	2	18	0	0	
7	2	0	15	0	0	
4	4	0	20	0	0	
4	1	0	18	0	1	
7	6	0	22	0	0	
2	2	0				
10	1	0				
3	3	0				
9	8	0				
5	2	0				
9	1	1				
8	3	0				
10	3	0				
14	3	1				
3	0	0				
4	0	0				
Gesamt	180	54	5	282	3	3
%		30,0%	2,8%		1,1%	1,1%

3.2.2 Ultrastrukturelle Schäden an Photo- und Mycobionten der BIOMEX Proben der Flechte *Buellia frigida* in %. Kollabierte Protoplasten und deformierte Zellwände sind für jede der BIOMEX Proben des top layers (rock, S-Mars und P-Mars) aufgelistet.

	Photobiont			Mycobiont		
	Anzahl PB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände	Anzahl MB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände
ISS rock (top)						
	13	5	8	38	3	0
	15	10	4	38	1	0
	7	5	1	41	1	0
	8	5	1	42	5	0
	2	1	1	29	1	1
	5	0	4	30	1	0
	17	7	2	24	2	1
	6	6	0	26	1	0
	4	4	0			
Gesamt	77	43	21	268	15	2
%		55,8%	27,3%		5,6%	0,7%
ISS S-Mars (top)						
	8	7	1	23	7	0
	4	4	0	29	3	0
	11	7	3	22	5	3
	11	7	3	40	6	2
	15	13	2	25	1	1
	14	7	7	25	7	3
	12	10	2	34	9	8
	8	2	6	24	7	8
	12	9	3	11	5	2
Gesamt	95	66	27	233	50	27
%		69,5%	28,4%		21,5%	11,6%
ISS P-Mars (top)						
	12	8	2	21	6	3
	5	5	0	8	1	2
	9	6	0	13	3	0
	7	5	0	19	9	2
	5	2	3	28	7	1
	7	3	3	30	5	11
	21	12	5	19	5	2
	13	7	1	33	6	2
	9	0	9	16	3	4
Gesamt	88	48	23	187	45	27
%		55,7%	26,1%		24,1%	14,4%

3.2.3 Ultrastrukturelle Schäden an Photo- und Mycobionten der BIOMEX Proben der Flechte *Buellia frigida* in %. Kollabierte Protoplasten und deformierte Zellwände sind für jede der BIOMEX Proben des bottom layers (rock, S-Mars und P-Mars) aufgelistet.

Photobiont				Mycobiont		
Anzahl PB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände		Anzahl MB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände
ISS rock (bottom)						
16	16	0		33	1	1
14	12	0		44	2	0
9	5	2		22	1	0
29	22	1		26	0	0
26	18	0		39	3	1
13	8	1		26	1	0
25	23	0		20	0	0
14	11	1		28	0	0
Gesamt	146	104	4	238	8	2
%		71,2%	2,7%		3,4%	3,4%
ISS S-Mars (bottom)						
1	0	1		24	3	8
2	0	2		8	2	2
7	5	2		33	5	2
11	4	6		20	4	0
8	2	4		17	1	4
7	0	7		18	0	6
4	3	0		22	5	8
10	5	5		37	3	3
9	3	5		40	1	1
Gesamt	59	22	32	219	24	34
%		37,3%	55,9%		12,8%	17,8%
ISS P-Mars (bottom)						
9	2	5		43	4	1
9	3	2		27	2	2
7	3	2		48	12	10
10	10	0		44	11	2
9	9	0		43	16	1
11	6	2		61	16	2
8	5	2		49	13	2
9	6	8				
8	7	1				
Gesamt	80	51	22	315	74	20
%		63,8%	27,5%		23,7%	6,3%

3.2.4 Ultrastrukturelle Schäden an Photo- und Mycobionten der Mission Ground Reference (MGR) Proben der Flechte *Buellia frigida* in %. Kollabierte Protoplasten und deformierte Zellwände sind für jede der Proben des top layers (rock, S-Mars, P-Mars) aufgelistet.

	Photobiont			Mycobiont		
	Anzahl PB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände	Anzahl MB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände
MGR rock (top)						
	5	0	5	16	14	2
	6	0	6	10	8	0
	1	0	1	9	9	0
	2	0	2	7	7	0
	2	0	2	4	4	0
	5	0	5	5	5	0
	2	0	2	18	16	0
	3	0	3	11	11	0
	9	2	5			
	12	6	4			
Gesamt	47	8	35	80	74	2
%		17,0%	74,5%		92,5%	2,5%
MGR S-Mars (top)						
	5	0	2	4	4	0
	1	0	1	9	9	0
	3	0	3	9	9	0
Gesamt	9	0	6	22	22	0
%		0,0%	66,7%		100,0%	0,0%
MGR P-Mars (top)						
	2	1	1	17	16	0
	2	0	2	3	3	0
	1	0	1	3	3	0
	4	0	4	7	7	0
	2	0	2	14	13	1
	15	0	15	15	14	1
	8	0	8	17	17	0
	9	0	9	19	18	0
	4	0	4	13	12	0
	5	0	5	16	16	0
	3	0	3			
Gesamt	55	1	54	124	119	2
%		1,8%	98,2%		96,0%	1,6%

3.2.5 Ultrastrukturelle Schäden an Photo- und Mycobionten der Mission Ground Reference (MGR) Proben der Flechte *Buellia frigida* in %. Kollabierte Protoplasten und deformierte Zellwände sind für jede der Proben des bottom layers (rock, S-Mars, P-Mars) aufgelistet.

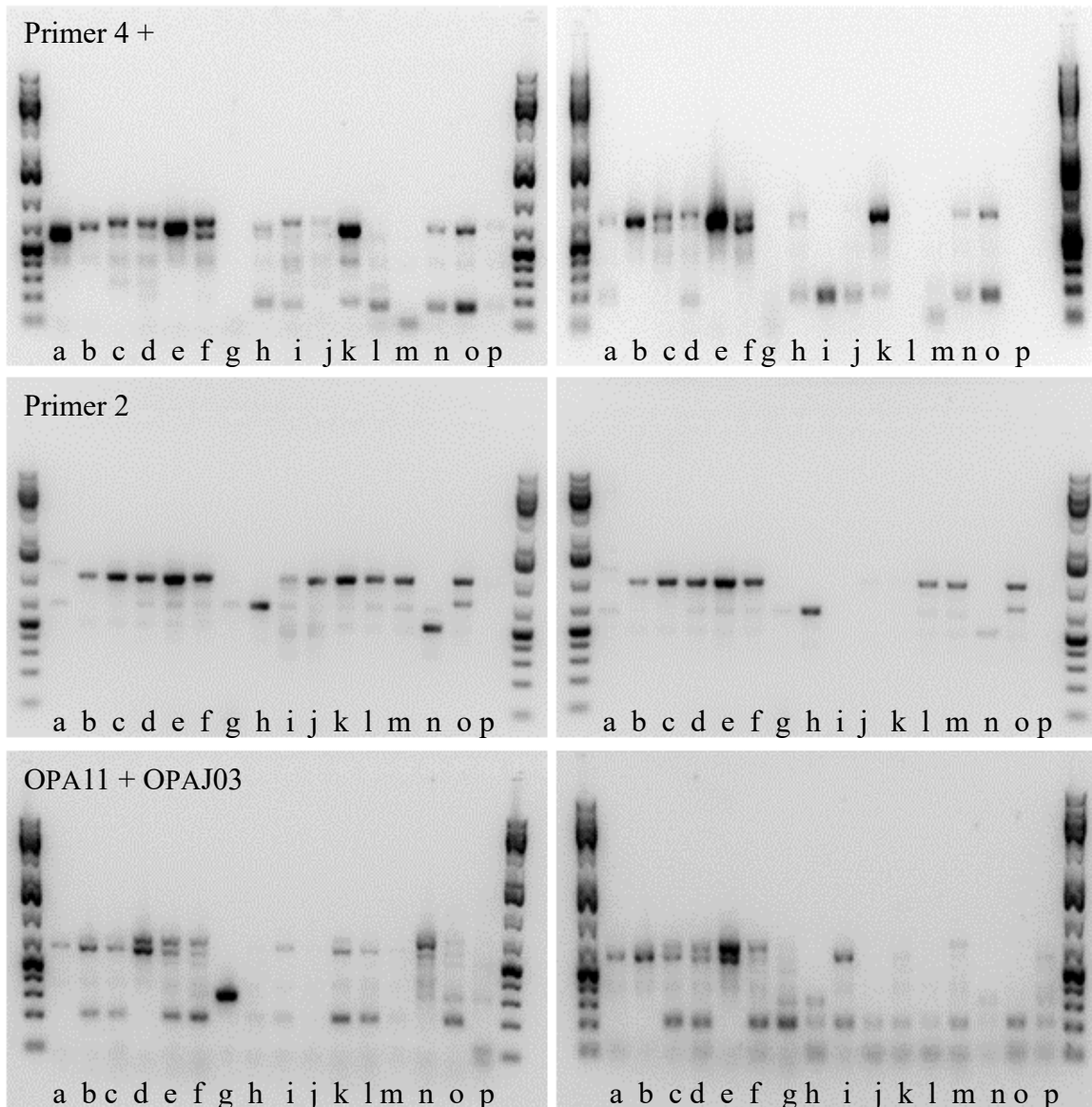
	Photobiont			Mycobiont		
	Anzahl PB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände	Anzahl MB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände
MGR rock (bottom)						
	5	0	5	21	14	0
	1	0	1	9	8	0
	2	0	2	16	15	0
	7	0	7	20	18	0
				19	17	0
				14	10	0
				8	8	0
				10	10	0
Gesamt	15	0	15	117	100	0
%		0,0%	100,0%		85,5%	0,0%
MGR S-Mars (bottom)						
	4	0	4	6	4	0
	5	4	1	17	12	0
	7	6	1	4	4	0
	6	4	2	17	15	0
	5	3	2	24	19	0
	2	2	0	18	13	0
	3	3	0			
Gesamt	32	22	10	86	67	0
%		68,8%	31,3%		77,9%	0,0%
MGR P-Mars (bottom)						
	9	0	9	7	3	0
	7	0	7	13	11	0
	3	0	3	8	5	1
	3	0	3	18	14	0
	4	0	4	9	8	0
	6	0	6	12	9	0
	10	5	2	18	16	0
	4	1	3	23	22	0
	13	10	0	15	12	0
	9	9	0	20	17	0
Gesamt	68	25	37	143	117	1
%		36,8%	54,4%		81,8%	0,7%

3.2.6 Ultrastrukturelle Schäden an Photo- und Mycobionten der Transportkontrolle der Flechte *Buellia frigida* in %. Kollabierte Protoplasten und deformierte Zellwände sind für jede der Proben aufgelistet.

	Photobiont			Mycobiont		
	Anzahl PB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände	Anzahl MB	kollabierte Protoplasten	deformierte Zellwände
Transportkontrolle rock						
	4	0	3	16	13	0
	2	0	2	17	15	0
	10	3	0	20	15	0
	10	1	0	35	32	0
	9	0	5	19	18	0
				59	34	4
				27	25	0
				30	25	0
Gesamt	35	4	10	223	177	4
%		11,4%	28,6%		52,5%	1,8%
Transportkontrolle S-Mars						
	6	6	0	26	26	0
	3	3	0	25	24	0
	7	6	0	27	25	0
	6	4	0	23	23	0
	3	3	0	39	37	0
	4	1	3	26	22	0
	8	1	7	30	28	0
	6	3	3	28	22	0
	6	2	3	40	29	2
	4	3	1	37	36	0
	9	8	1	47	38	1
Gesamt	62	40	18	348	310	3
%		64,5%	29,0%		89,1%	0,9%
Transportkontrolle P-Mars						
	17	6	0	51	15	1
	16	12	0	16	5	0
	12	5	3	35	9	0
	17	7	2	44	15	1
	3	2	1	16	12	0
	5	5	0	29	12	0
	9	7	1	18	10	0
	10	8	1	19	8	0
	7	6	1	19	9	0
	6	4	0	23	9	0
	4	3	0	14	10	0
Gesamt	106	65	9	284	114	2
%		61,3%	8,5%		40,1%	0,7%

zu 3.3 DNA Integrität

RAPD-PCR Profile der genomischen DNA von *Buella frigida*. Oben: Primer 4 + OPAJ04, Mitte: Primer 2, Unten: OPA11 + OPAJ03. a) Frischkontrolle, BIOMEX top layer: b) rock top, c) S-Mars top, d) P-Mars top, bottom layer: e) rock bottom, f) S-Mars bottom, g) P-Mars bottom, Mission Ground Reference (MGR): top layer: h) rock top, i) S-Mars top, j) P-Mars top, bottom layer: k) rock bottom, l) S-Mars bottom, m) P-Mars bottom, Transportkontrollen: n) rock, o) S-Mars, p) P-Mars. Links und rechts sind jeweils die DNA Leitern aufgetragen.



zu 3.4 Vitalität nach LIVE/DEAD Färbung

3.4.1 Prozentuale Anteile der Zellmembran-intakten (lebenden) und -defekten (toten) Photobiontenzellen der Flechte *Buellia frigida* nach BacLight™ Färbung. Frischkontrolle (FK), BIOMEX Proben (ISS), Mission Ground Reference (MGR) (jeweils top und bottom layer von rock, S-Mars und P-Mars) und Transportkontrolle (trp, davon rock, S- und P-Mars).

ISS	FK	rock t	S-Mars t	P-Mars t	rock b	S-Mars b	P-Mars b
lebend (%)	89,7%	23,6%	4,2%	2,6%	8,0%	9,3%	12,3%
tot (%)	10,3%	76,4%	95,8%	97,4%	92,0%	90,7%	87,7%
MGR		rock t	S-Mars t	P-Mars t	rock b	S-Mars b	P-Mars b
lebend (%)		0,2%	0,2%	1,3%	2,8%	3,1%	6,3%
tot (%)		99,8%	99,8%	98,7%	97,2%	96,9%	93,7%
trp		rock	S-Mars	P-Mars			
lebend (%)		4,3%	41,9%	19,8%			
tot (%)		95,7%	58,1%	80,2%			

3.4.2 Prozentuale Anteile der metabolisch aktiven (lebenden) und inaktiven (toten) Photobiontenzellen der Flechte *Buellia frigida* nach FUN®1 Färbung. Frischkontrolle (FK), BIOMEX Proben (ISS) und Mission Ground Reference (MGR) (jeweils top und bottom layer von rock, S-Mars und P-Mars) und Transportkontrolle (trp, davon rock, S- und P-Mars).

ISS	FK	rock t	S-Mars t	P-Mars t	rock b	S-Mars b	P-Mars b
lebend (%)	68,1%	1,6%	0,0%	0,7%	3,9%	2,2%	1,3%
tot (%)	31,9%	98,4%	100,0%	99,3%	96,1%	97,8%	98,7%
MGR		rock t	S-Mars t	P-Mars t	rock b	S-Mars b	P-Mars b
lebend (%)		1,0%	0,0%	0,0%	9,0%	10,1%	3,6%
tot (%)		99,0%	100,0%	100,0%	91,0%	89,9%	96,4%
trp		rock	S-Mars	P-Mars			
lebend (%)		32,7%	14,7%	18,4%			
tot (%)		67,3%	85,3%	81,6%			

3.4.3 Prozentuale Anteile der metabolisch aktiven (lebenden) und inaktiven (toten) Mycobiontenzellen der Flechte *Buellia frigida* nach FUN[®]1 Färbung. Frischkontrolle (FK), BIOMEX Proben (ISS) und Mission Ground Reference (MGR) (jeweils top und bottom layer von rock, S-Mars und P-Mars) und Transportkontrolle (trp, davon rock, S- und P-Mars).

ISS	FK	rock t	rock b	S-Mars t	S-Mars b	P-Mars t	P-Mars b
lebend (%)	85,5%	4,5%	7,2%	5,9%	10,5%	2,2%	3,1%
tot (%)	14,5%	95,5%	92,8%	94,1%	89,5%	97,8%	96,9%
MGR		rock t	rock b	S-Mars t	S-Mars b	P-Mars t	P-Mars b
lebend (%)		1,8%	0,1%	0,0%	1,5%	12,1%	17,8%
tot (%)		98,2%	99,9%	100,0%	98,5%	87,9%	82,2%
trp		rock	S-Mars	P-Mars			
lebend (%)		6,6%	4,0%	0,9%			
tot (%)		93,4%	96,0%	99,1%			

zu 3.5 Photosynthetische Aktivität

3.5 a) (nicht normierte) F_v/F_m Werte der Flechte *Buellia frigida* (Frischkontrolle) sowie der verschiedenen BIOMEX Proben nach Weltraum-Exposition auf der ISS, der zugehörigen Mission Ground Reference (MGR) und der Transportkontrolle (trp). Recoveryzeiten 0-9 Tage.

		0	2min	5min	10min	30min	60min	24h	3d	6d	7d	8d	9d
	Frischkontrolle	0,111	0,278	0,440	0,435	0,541	0,571	0,649	0,650	0,674	0,674	0,681	0,681
ISS	rock	0,005	0,000	0,000	0,000	0,015	0,028	0,011	0,045	0,078	0,096	0,109	0,070
	top P-Mars	0,000	0,000	0,015	0,025	0,036	0,021	0,041	0,034	0,045	0,000	0,046	0,025
	S-Mars	0,039	0,026	0,031	0,011	0,017	0,011	0,067	0,044	0,000	0,022	0,016	0,000
	rock	0,000	0,014	0,007	0,011	0,037	0,047	0,091	0,122	0,158	0,174	0,219	0,225
	bottom P-Mars	0,028	0,015	0,007	0,042	0,016	0,017	0,047	0,007	0,009	0,021	0,028	0,021
	S-Mars	0,005	0,006	0,055	0,063	0,042	0,015	0,008	0,012	0,007	0,040	0,014	0,039
MGR	rock	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	top P-Mars	0,000	0,000	0,019	0,012	0,060	0,019	0,000	0,000	0,009	0,000	0,010	0,057
	S-Mars	0,007	0,022	0,012	0,017	0,032	0,090	0,025	0,000	0,029	0,035	0,026	0,029
	rock	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	bottom P-Mars	0,015	0,019	0,003	0,039	0,026	0,015	0,010	0,000	0,008	0,010	0,027	0,037
	S-Mars	0,000	0,006	0,023	0,054	0,059	0,045	0,009	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000
trp	rock	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	P-Mars	0,000	0,020	0,048	0,033	0,071	0,036	0,016	0,010	0,018	0,036	0,000	0,000
	S-Mars	0,000	0,059	0,053	0,087	0,055	0,008	0,020	0,000	0,037	0,000	0,015	0,041

3.5 b) Fortsetzung, Recoveryzeiten 10 bis 31 Tage.

		10d	14d	15d	16d	17d	18d	21d	22d	28d	29d	30d	31d	
	Friskontrolle	0,704	0,704	0,696	0,687	0,699	0,679	0,687	0,701	0,709	0,710	0,698	0,680	
ISS	top	rock	0,079	0,087	0,094	0,134	0,167	0,018	0,065	0,000	0,000			
		P-Mars	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000			
		S-Mars	0,000	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
	bottom	rock	0,260	0,366	0,331	0,342	0,364	0,352	0,376	0,392	0,413	0,486	0,469	0,452
		P-Mars	0,014	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
		S-Mars	0,000	0,052	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000			
MGR	top	rock	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000			
		P-Mars	0,025	0,000	0,054	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			0,000
		S-Mars	0,029	0,000	0,048	0,000	0,000	0,000	0,002	0,019	0,014			
	bottom	rock	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
		P-Mars	0,002	0,018	0,006	0,013	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000			
		S-Mars	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
trp	rock	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				
	P-Mars	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				
	S-Mars	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				

3.5 c) Fortsetzung, Recoveryzeiten 34 bis 48 Tage.

		34d	35d	36d	37d	38d	41d	42d	43d	44d	45d	48d
	Friskontrolle	0,689	0,713	0,718	0,723	0,721	0,721	0,699	0,571	0,216	0,131	0
	ISS bottom	rock	0,506	0,518	0,531	0,558	0,568	0,587	0,351	0,165	0,104	0,02

zu 3.6 Kultivierung der Symbiose-Partner

3.6.1 Anzahlen der aus der Frischkontrolle und den BIOMEX Proben isolierten und kultivierten Zellproben (Photobionten, PB und Mycobionten, MB) aus der Flechte *Buellia frigida*, die auf Medium übertragen wurden (=angesetzt) sowie die aus den jeweils "angesetzten" Proben herangewachsenen Kolonien (=gewachsen).

			BIOMEX top			BIOMEX bottom		
Frischkontrolle			rock	P-Mars	S-Mars	rock	P-Mars	S-Mars
PB	angesetzt	31	25	9	10	25	22	20
	gewachsen	31	22	0	0	22	0	0
MB	angesetzt	16	10	9	10	10	9	9
	gewachsen	5	0	0	0	0	0	0

3.6.2 Anzahlen der aus der Mission Ground Reference isolierten und kultivierten Zellproben (Photobionten, PB und Mycobionten, MB) aus der Flechte *Buellia frigida*, die auf Medium übertragen wurden (=angesetzt) sowie die aus den jeweils "angesetzten" Proben herangewachsenen Kolonien (=gewachsen).

Mission Ground Reference:		top			bottom		
		rock	P-Mars	S-Mars	rock	P-Mars	S-Mars
PB	angesetzt	25	9	10	25	22	20
	gewachsen	22	0	0	22	0	0
MB	angesetzt	10	9	10	10	9	9
	gewachsen	0	0	0	0	0	0

3.6.3 Anzahlen der aus der Transportkontrolle isolierten und kultivierten Zellproben (Photobionten, PB und Mycobionten, MB) aus der Flechte *Buellia frigida*, die auf Medium übertragen wurden (=angesetzt) sowie die aus den jeweils "angesetzten" Proben herangewachsenen Kolonien (=gewachsen).

Transportkontrolle:		rock	P-Mars	S-Mars
PB	angesetzt	25	9	10
	gewachsen	22	0	0
MB	angesetzt	10	9	10
	gewachsen	0	0	0

zu 3.8 Raman-Nachweisbarkeit biogener Substanzen

3.8.1 Charakteristische Raman-Spektren der verschiedenen biogenen Substanzen der Quarz-Plättchen (top und bottom layer). Aufgelistet sind die pro Linienscan (1 bis maximal 12 mit jeweils 100 Messpunkten) detektierten spezifischen Raman-Spektren der BIOMEX Proben nach Weltraum-Exposition.

[illegible]

3.8.2 Charakteristische Raman-Spektren der verschiedenen biogenen Substanzen der P-Mars Pellets (top und bottom layer). Aufgelistet sind die pro Linienscan (1 bis maximal 12 mit jeweils 100 Messpunkten) detektierten spezifischen Raman-Spektren der BIOMEX Proben nach Weltraum-Exposition.

[illegible]

zu 3.10 Photosynthetische Aktivität nach UV-C_{254nm}

3.10.1 Normierte photosynthetische Aktivität von Photobionten der Flechte *Buellia frigida* vor (pre), direkt nach (post) sowie nach verschiedenen Recoveryzeiten bis zu 240h nach 0,5/2/4 stündiger Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 7J/cm² UV-C_{254nm}.

normiert:	pre	post	24 h	48 h	120 h	240 h
Frischkontrolle	100,00%	100,00%	100,40%	102,00%	99,40%	98,00%
4h	99,60%	45,70%	44,30%	48,40%	46,20%	48,50%
2h	100,20%	60,70%	60,90%	66,50%	66,70%	68,90%
0.5h	100,20%	70,50%	71,10%	71,20%	68,90%	70,60%

3.10.2 (nicht normierte) F_V/F_M Werte von Photobionten der Flechte *Buellia frigida* vor (pre), direkt nach (post) sowie nach verschiedenen Recoveryzeiten bis zu 240h nach 0,5/2/4 stündiger Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 7J/cm² UV-C_{254nm}.

	pre	post	24 h	48 h	120 h	240 h
4 h	729	350	362	373	402	423
	736	370	339	402	374	421
	731	363	356	417	404	366
	732	327	304	296	246	287
	737	288	272	290	298	303
	738	366	368	402	317	403
	734	279	313	323	315	315
	740	300	277	298	301	266
	733	386	348	412	410	432
2 h	740	446	464	458	489	507
	748	455	477	492	509	516
	740	450	429	531	495	508
	742	425	424	493	502	509
	749	480	505	489	489	523
	730	446	434	507	485	515
	732	450	430	528	487	512
	731	439	426	444	482	490
	735	436	449	468	489	493
0,5 h	735	500	499	517	492	475
	741	516	528	559	512	569
	737	538	498	534	508	522
	737	531	559	493	530	549
	730	514	519	576	521	533
	753	516	527	513	510	514
	742	493	502	530	486	505
	729	530	514	477	505	498
	743	540	568	523	509	519

IX Publikationen

8.1 Characterization of Viability of the Lichen *Buellia frigida* after 1.5 Years in Space on the International Space Station

Autoren: Theresa Backhaus, Joachim Meeßen, René Demets, Jean-Pierre de Vera and Sieglinde Ott

2019- Astrobiology 19(2) 233-241

Impact Faktor: 2,5 (2018)

Der Artikel wurde vollständig vom Erstautor verfasst.

Characterization of Viability of the Lichen *Buellia frigida* After 1.5 Years in Space on the International Space Station

Theresa Backhaus,¹ Joachim Meeßen,¹ René Demets,² Jean-Pierre de Vera,³ and Sieglinde Ott¹

Abstract

The lichen *Buellia frigida* was exposed to space and simulated Mars analog conditions in the BIOlogy and Mars EXperiment (BIOMEX) project operated outside the International Space Station (ISS) for 1.5 years. To determine the effects of the low Earth orbit (LEO) conditions on the lichen symbionts, a LIVE/DEAD staining analysis test was performed. After return from the ISS, the lichen symbionts demonstrated mortality rates of up to 100% for the algal symbiont and up to 97.8% for the fungal symbiont. In contrast, the lichen symbiont controls exhibited mortality rates of 10.3% up to 31.9% for the algal symbiont and 14.5% for the fungal symbiont. The results performed in the BIOMEX Mars simulation experiment on the ISS indicate that the potential for survival and the resistance of the lichen *B. frigida* to LEO conditions are very low. It is unlikely that Mars could be inhabited by this lichen, even for a limited amount of time, or even not habitable planet for the tested lichen symbionts. Key Words: Astrobiology—BIOMEX—Lichen—Space conditions—Mars analog conditions. Astrobiology 19, 233–241.

1. Introduction

LICHENS ARE SYMBIOTIC associations formed by a heterotrophic fungal symbiont (hereafter referred to as a mycobiont [MB]) and a photoautotrophic symbiont (a photobiont [PB]) that is a eukaryotic green alga and/or a cyanobacterium. They are characterized by a unique and evolutionarily successful mode of life. Lichen organisms colonize all biomes on Earth and are dominant in severe ecological niches, especially in polar regions (Kappen *et al.*, 1996; Kappen and Schroeter, 1997; Kappen, 2000; Sadowsky and Ott, 2012). They have a broad range of morphological, anatomical, and physiological adaptations, and secondary metabolites (Henssen and Jahns, 1974; de Vera *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, 2008, 2010, 2014; de la Torre Noetzel *et al.*, 2007; Sancho *et al.*, 2007; Stöffler *et al.*, 2007; Horneck *et al.*, 2008; de la Torre *et al.*, 2010; de Vera and Ott, 2010; Raggio *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2012, 2014; Backhaus *et al.*, 2014; Meeßen *et al.*, 2014b). Lichens are poikilohydric organisms, a peculiar feature and key factor for their dominance in extreme habitats. They can achieve an inactive state of latent life while being desiccated (Crowe *et al.*, 1992), which is called anhydrobiosis or anabiosis, and are able to survive long-term desiccation in their natural habitat. Lichens that

appear to be metabolically inactive can survive long-term storage in a desiccated frozen (−20°C) state for 13 years (Honegger, 2003). The ability to produce secondary metabolites (Huneck and Yoshimura, 1996) is hypothesized as a fundamental means of protection against excess photosynthetically active radiation (PAR) as well as ultraviolet irradiation (UVR) (Solhaug and Gauslaa, 1996; Nybakken *et al.*, 2004; Kranner *et al.*, 2005). Lichens also display a high tolerance to infrequent water supply, long periods of desiccation, extremes of heat and cold (Kappen, 1993), as well as to high levels of PAR and UVR (Lange, 1992; Nybakken *et al.*, 2004).

The high adaptive potential and conspicuous tolerance of lichens to extreme environmental conditions have garnered the interest of astrobiologists with regard to their symbioses (de Vera *et al.*, 2010) and they have consequently become a model organism in astrobiology (Sancho *et al.*, 2008; Meeßen *et al.*, 2013, 2014a, 2017). Interest has increased in the study of these organisms' potential to resist extraterrestrial environmental conditions, and in simulation experiments that address space vacuum, Mars atmosphere, UVR (de Vera *et al.*, 2003, 2004a, 2008, 2010; de la Torre Noetzel *et al.*, 2007; de la Torre *et al.*, 2010; de Vera and Ott, 2010; Sánchez *et al.*, 2012), and meteorite impacts (Stöffler *et al.*,

¹Institute of Botany, Heinrich Heine University, Duesseldorf, Germany.

²European Space Research and Technology Centre (ESTEC), European Space Agency (ESA), Noordwijk, Netherlands.

³Research Group, Astrobiological Laboratories, Institute of Planetary Research, Management and Infrastructure, German Aerospace Center (DLR), Berlin, Germany.

2007; Horneck *et al.*, 2008). Experiments carried out with lichens during space missions include LICHENS II, LITHOPANSPERMIA, and STONE on Biopan-5/6 and lichen and fungi experiment (LIFE) on EXPOSE-E (de la Torre Noetzel *et al.*, 2007, 2010; Sancho *et al.*, 2007; Raggio *et al.*, 2011; Onofri *et al.*, 2012; Scalzi *et al.*, 2012; Brandt *et al.*, 2015). Martian conditions are of special interest because of the climatic history of Mars. A water-rich epoch that dates from 3.95 to 3.7 billion years ago is characterized by an availability of water and energy that could have made the planet habitable (Fairén *et al.* 2010; Palumbo and Head, 2018). This water-rich epoch was followed by a semiarid period (3.7–2.9 billion years ago) in which habitability was restricted to a small number of niches (de Vera *et al.*, 2014; Schirmack *et al.*, 2014). Today Mars is generally an arid planet, despite locations where liquid water may exist (*i.e.*, at atmospheric pressures and temperatures from 6.6 to 10 mb and from 0°C to 7°C, respectively) (Kuznetz and Gan, 2002). It rapidly evaporates because of the dry atmosphere.

For the numerable exposure and simulation experiments, a variety of microorganisms from extreme arid, alpine, and polar regions, including bacteria, biofilms, cryptoendolithic fungi, and lichen symbioses, have been studied (de Vera *et al.*, 2004a, 2004b, 2008; Onofri *et al.*, 2004; Sadowsky and Ott, 2012; Baqué *et al.*, 2013). During the 1.5-year EXPOSE-R2 mission on the International Space Station (ISS), a variety of biological samples and organisms (bacteria [*e.g.*, *Deinococcus radiodurans*], archaea, lichens, plant seeds, microfungi [*e.g.*, *Kombucha*], and mosses [*Grimmia sessitana*], as well as the number of 150 samples of organic compounds) were exposed to space and Mars-like conditions (Rabbow *et al.* 2017).

LIFE was the first space mission astrobiology experiment in the EXPOSE-E facility located on the European Columbus Module outside the ISS that included the cosmopolitan lichen *Xanthoria elegans* (Brandt *et al.*, 2015). LIFE was designed to test the ability of microorganisms to resist the space conditions of low Earth orbit (LEO) and assess the habitability of microorganisms in the martian atmosphere (Rabbow *et al.*, 2012). Three different subsets of lichen samples of *X. elegans* were exposed to space conditions on the ISS. One was exposed to the full spectrum of cosmic radiation, a second was exposed to irradiation that was filtered down to 0.1% insolation, and a third one was kept dark in the interior of the EXPOSE-E facility. In this study, the mean percentage of active PB cells ranged from 60.8% ± 32.5% (standard deviation [SD]) for dark exposed samples to 79.1% ± 12.7% (SD) for exposed 0.1% insolation samples, considered to be Mars analog conditions. For active MB cells, the values ranged from 75.7% ± 18.4% (SD) for dark exposed samples to 89.2% ± 6.2% (SD) for exposed 0.1% insolation samples, considered Mars analog conditions. The experimental design focused on the long-term survival of symbiotic eukaryotes as well as the long-term resistance of eukaryotic microorganisms to the conditions of space exposure (Brandt *et al.* 2015).

Encouraged by the low postflight mortality of *X. elegans* after space exposure of 1.5 years in the BIOlogy and Mars Experiment (BIOMEX) mission, an additional lichen, *Buellia frigida*, was collected at a field site on continental Antarctica and was exposed for 18 months to space and simulated Mars-like conditions at EXPOSE-R2/Zvezda outside the ISS.

In advance of the BIOMEX project, the effects of extra-terrestrial stressors on *B. frigida* had been analyzed in pre-flight simulation tests. The tests assessed the resistance of the lichen *B. frigida* to abiotic stressors (*e.g.*, vacuum, Mars atmosphere, UVC radiation, temperature cycling, and temperature extremes) (Meeßen *et al.* 2015) that occur at simulated space and martian surface conditions. The postflight mortality was determined by LIVE/DEAD staining with FUN[®] 1 and confocal laser scanning microscopy. The results of the simulation experiments indicate a lower mortality for the MB compared with the PB (<17% and <31%, respectively). The preflight test results indicate that *B. frigida* is capable of survival within the simulated space conditions tested.

The results of this study can be correlated to the lithopanspermia hypothesis, which is based on the work of Thomson (1871). The hypothesis suggests that life could survive an interplanetary transfer, from one planet to another (Nicholson *et al.*, 2000; Benardini *et al.*, 2003; Cockell, 2008; Horneck *et al.*, 2008). The expected duration of a hypothetical interplanetary transfer may take, for example, about 2.6 million years for a Mars meteorite (Clark, 2001).

The BIOMEX project is the second long-term space experiment with lichens. As part of the BIOMEX project, samples of the lichen *B. frigida* were placed within the EXPOSE-R2 facility outside the ISS. The aim of the project was to determine the ability of the exposed eukaryotic microorganisms to resist the space conditions in LEO and Mars-like conditions. It has been hypothesized that the lichen *B. frigida* and its bionts, which colonize habitats characterized by severe environmental conditions, such as those found on continental Antarctica, show a stronger fundamental resistance to the extreme conditions outside of the ISS than the lichen *X. elegans*, which was used in the former LIFE.

2. Materials and Methods

2.1. The lichen *B. frigida*

Buellia frigida is an endemic, crustose lichen that colonizes habitats of the maritime and continental Antarctic (Øvstedal and Lewis Smith, 2001). The lichen grows on exposed rock surfaces and is well adapted to high fluxes of PAR, desiccation, and cold temperatures (Sadowsky and Ott, 2012; Backhaus *et al.*, 2014). The samples used in the study were collected in North Victoria Land (74°38'S 164°13'E) during the Antarctic summer season 2009/2010. The lichen thalli were collected dry, air-dried, transported at –20°C, and stored at –20°C until further investigations.

2.2. Sample preparation

At the beginning of the BIOMEX project, three types of samples were prepared for the experiments to be performed on the exposure platform EXPOSE-R2 at the ISS. Disks (12 mm diameter) of rock sample surfaces colonized in nature by the lichen *B. frigida* were carefully drilled from field-collected samples so that the underlying rock remained attached to the lichen. The base of the two other types of samples consisted of pellets of two different synthetic Mars regolith simulants (as described in Böttger *et al.*, 2012) that were pressed to 12-mm-diameter disks. The P-MRS sample pellets represent early acidic Mars regolith and consisted of montmorillonite, chamosite, quartz, iron(III)-oxide, kaolinite, siderite, hydromagnesite, gabbro, and dunite (see de

Vera *et al.*, 2019 this issue, for relative weight percent composition), whereas the S-MRS sample pellets are similar in composition to late basic Mars regolith and consisted of gabbro, gypsum, dunite, hematite, goethite, and quartz (Vera *et al.*, 2019 this issue). Four to five spots were selected on the top of each pressed pellet to serve as attachment points to which four to seven thallus fragments with sizes of about 2–3 mm² per fragment were attached. The thallus fragments covered the artificial Mars regolith and were glued in direct contact to each spot using RTV-S 691 silicone rubber (Wacker), a glue approved for aerospace applications by the European Space Research and Technology Centre. During the entire experiment, all three types of lichen samples were in a dry and anhydrobiotic state. All three setups of our samples (hereafter referred to as rock, P-Mars, and S-Mars samples) were sent to the DLR in Cologne, and they were subsequently integrated into a BIOMEX assigned tray of the EXPOSE-R2 facility for later exposure outside of the ISS. After return from the ISS, all samples were stored at –80°C until further investigation.

2.3. Exposure conditions

A total of eight pellets (four rock, two P-Mars, and two S-Mars samples), equipped with thallus fragments of the lichen *B. frigida*, were transported to Baikonur and launched on July 23, 2014. The sample trays were integrated into the EXPOSE-R2 facility, which was installed outside the ISS at the Zvezda module on August 18, 2014. After 62 days, the cover that protected the samples from UVR was removed (October 22, 2014). These covers were used to protect the samples against any possible undesired photoreactions with gases outgassing from the sample holder and deployment equipment during the space evacuation process (see further discussion in Rabbow *et al.*, 2017).

After complete evacuation (except for samples in the martian atmosphere) and an exposure period of 469 days, the samples were returned to the interior of the ISS on February 3, 2016, and arrived back on Earth on June 18, 2016, by way of the Soyuz 45S rocket. The total experiment duration was 1.5 years (696 days).

Lichen samples were exposed on the EXPOSE-R2 facility to two different types of conditions. The four rock samples were exposed in tray 1 to LEO space vacuum conditions. The P-Mars and S-Mars samples were exposed in tray 2 to a Mars-like atmosphere, such that the sample compartment in

tray 2 was hermetically closed, evacuated, and then flooded with 980 Pa of a synthetic Mars atmosphere (composition: 95.55% CO₂, 2.70% N₂, 1.60% Ar, 0.15% O₂, ~370 ppm H₂O; Praxair Deutschland GmbH).

To test the effect of space radiation on lichen samples, both sample holder compartments in trays 1 and 2 were configured with two stacked sample holders, referred to as the top and bottom layers. The top layer was on the upper site of the EXPOSE-R2 facility and exposed directly to space. The bottom layer was protected against space radiation by the top layer and served as the dark control (see configuration in the introduction article, de Vera *et al.*, 2019 this issue, and Rabbow *et al.*, 2017).

The EXPOSE-R2 facility included passive sensors that measured environmental data and transferred them to Earth so that they could be replicated in the Mars ground radiation (MGR) experiments. These data were also necessary for evaluation of the results. The exposure conditions of the solar radiation were calculated by RedShift, indicating an average of accumulated irradiation doses experienced by the different samples, as shown in Table 1. The level of cosmic radiation doses was measured within the EXPOSE-R2 with passive detectors. The fully insulated lichen samples accumulated an average of 5843 MJ/m² (P-Mars), 6226 MJ/m² (S-Mars), and 6858 MJ/m² (rock). The samples experienced ionizing radiation doses between 340 and 844 µGy per day at the inner radiation belt (South Atlantic anomaly protons) to 2960 µGy per day at the outer radiation belt (electrons). Galactic cosmic rays range from 68 to 82 µGy per day depending on the solar activity (Rabbow *et al.*, 2017).

Samples in both trays had to endure vacuum (which ranged from 1.33 × 10^{–3} to 1.33 × 10^{–4} Pa) or martian atmosphere and pressure, as well as relatively rapid temperature cycling with many freeze/thaw cycles per day (see de Vera *et al.*, 2019 this issue). During the BIOMEX project, a temperature maximum of 46°C and a minimum of –27°C were measured. Temperatures did not drop much lower than –25°C as a result of a heating system that kept the electronics operating (Rabbow *et al.*, 2017; Beuselinck *et al.*, 2018).

2.4. LIVE/DEAD staining

To assess the limits and limitations of life and survival, the lichen samples were treated by LIVE/DEAD staining with FUN 1 and BacLight™ to measure the mortality of the

TABLE 1. EXPERIMENTAL PARAMETERS OF THE BIOLOGY AND MARS EXPERIMENT THAT ACCOUNTED FOR THE CONDITIONS EXPERIENCED BY THE LICHEN SAMPLES USED IN THIS STUDY

	Space conditions		P-Mars-analog conditions		S-Mars-analog conditions	
	10 ^{–4} –10 ^{–7} Pa		10 hPa		10 hPa	
	Top layer	Bottom layer	Top layer	Bottom layer	Top layer	Bottom layer
Full insolation	6858	0	5843	0	6226	0
UVA, %	318 ± 14	—	304 ± 7	—	363 ± 6	—
UVB, %	53.3 ± 20	—	58.0 ± 8	—	69.2 ± 7	—
UVC, %	18.0 ± 38	—	20.8 ± 18	—	24.9 ± 17	—
PAR, %	3026 ± 13	—	2676 ± 14	—	3039 ± 11	—
UV ₄₀₀ , %	388 ± 16	—	383 ± 8	—	456 ± 7	—

The averages of irradiation doses were calculated by RedShift. The UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm), UVC (100–280 nm), and PAR (300–700 nm) are given in MJ/m². Note the overlap between UVA and PAR. The last row shows the UV_{200–400nm} fluence.

symbiont cells. Cells of both symbionts, mycobiont (MB) and photobiont (PB), were analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Because of the limited amount of BIOMEX samples available, only one to a maximum of two thallus fragments of *B. frigida* of every experimental sample setup (top and bottom layer of rock, P-Mars, and S-Mars samples) were analyzed by LIVE/DEAD staining. Depending on the respective samples, 1385–8487 MB cells and 764–4580 PB cells were counted to determine the postflight mortality of the lichen organism. The fragments were removed from the substrates under sterile conditions. To avoid temperature stress, the fragments were transferred in daily cycles. The first day they were transferred from -80°C to -20°C , and remained at -20°C for 24 h. The second day, they were transferred from -20°C to 4°C and then stored at 4°C for 24 h. Subsequently, the different thallus fragments were sliced with a cryotome (Reichert-Jung) into 6–12 pieces (depending on the size of the fragment) of 120 μm thickness and were immediately stained with the dyes mentioned above, which are described below.

FUN1 (Molecular Probes, Eugene, OR, 2001) was used for LIVE/DEAD staining, in which dead cells and cells that are still metabolically active display different colors after staining. Only metabolically active cells are able to actively deposit the dye into their vacuoles. In a first step, the dye marks every cell with a bright, diffuse, green-yellow fluorescence (counted as “dead”). Subsequently, the fluorescence properties of the dye are changing and switch to an orange-red or yellow-orange color (counted as “live”). This allows differentiation between metabolically active and inactive cells (Molecular Probes, 2004). The dye was used according to the manufacturer’s protocol: 1.5 μL FUN 1 was diluted in 0.5 mL HEPES buffer. The prepared lichen samples were incubated for 1 h with 40 μL of the diluted dye solution. At the CLSM (Carl Zeiss LSM 710), FUN 1 was excited by a 488 nm argon laser. The green fluorescence was detected by a bandpass filter with a range between 505 and 550 nm, and the red fluorescence between 575 and 615 nm. In addition, the PB’s autofluorescence was detected with a

bandpass filter between 660 and 750 nm. Six to 10 images per sample setup were taken by CLSM. The cells were counted manually (as described in Brandt *et al.*, 2015).

BacLight was used as the second dye for LIVE/DEAD staining. This is a two-color fluorescence assay (containing SYTO[®]9 and propidium iodide) that can be used for LIVE/DEAD staining for lichens (*e.g.*, Sancho *et al.*, 2007). SYTO9 labels all PB cells (counted as “live”), whereas propidium iodide only penetrates cells with damaged membranes (counted as “dead”). The manufacturer’s protocol was followed (Molecular Probes, 2004): 1.5 μL of SYTO9 (and of propidium iodide, respectively) was diluted in 1 mL HEPES buffer. Cuts of the lichen samples were incubated with 20 μL of each diluted dye for 30 min. At the CLSM, the dyes were excited with two lasers with wavelengths between 488 nm (argon) and 543 nm. SYTO9 is detectable with a bandpass filter between 475 and 525 nm, whereas propidium iodide is detectable with a bandpass filter between 575 and 615 nm. In addition, the PB’s autofluorescence was detected with a bandpass filter between 660 and 750 nm. Six to 12 images per sample setup were taken by the CLSM. The cells were counted manually (as described in Brandt *et al.*, 2015).

3. Results

To determine the symbionts’ mortality rates after the experiment, the cells were stained with two different dyes and analyzed by CLSM. The first dye, FUN 1, successfully stained both symbionts, the MB and PB. Note that a lichen fragment was prepared as a laboratory control (hereafter referred to as “fresh control”) from the frozen Antarctic rock sample for the CLSM analysis. The MB of the fresh control showed mortality rates of $14.5\% \pm 11.5\%$ (SD). This is significantly lower compared with all other sample setups from the ISS.

The MB cells of the ISS top layer samples showed mortality rates between 94.1% and 97.8% (rock $95.5\% \pm 2.8\%$ [SD], S-Mars $94.1\% \pm 5.0\%$ [SD], and P-Mars $97.8\% \pm 2.6\%$ [SD]) (Fig. 1a). For the MB cells in the bottom layer of the ISS

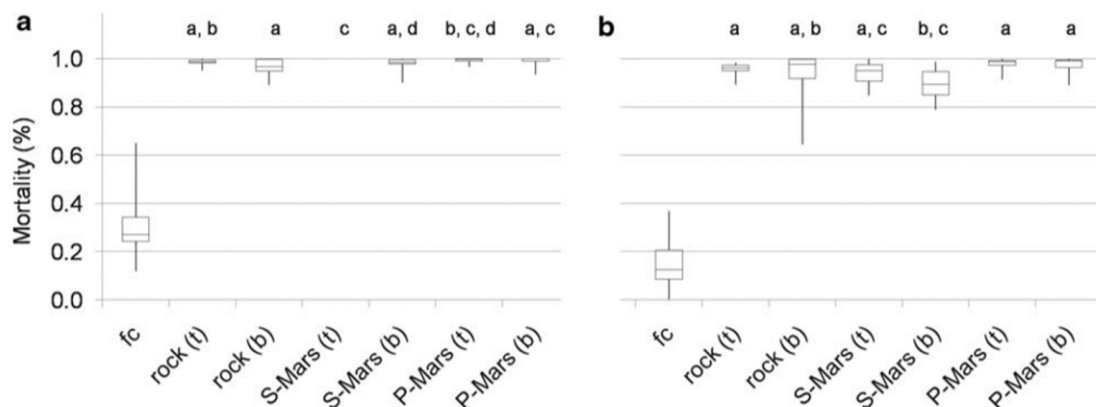


FIG. 1. Boxplots of the mean mortality values of (a) PB cells and (b) MB cells in lichen fragments sampled from control and flight samples stained with FUN[®] 1 (LIVE/DEAD stain) as determined by CLSM analysis. Lichen fragments were sampled from the “fresh” control (fc) and the different types of BIOMEX samples: rock pellets with indigenous lichen (rock), P-MRS (P-Mars) pellets, and S-MRS (S-Mars) pellets. Fragments sampled from exposed and dark control BIOMEX pellets are differentiated by the notation top (t) and bottom (b), respectively. BIOMEX, BIOlogy and Mars EXperiment; CLSM, confocal laser scanning microscope; MB, mycobiont; PB, photobiont.

samples, lower mortality rates between 89.5% and 96.9% (rock $92.8\% \pm 11.3\%$ [SD], S-Mars $89.5\% \pm 6.4\%$ [SD], and P-Mars $96.9\% \pm 4.5\%$ [SD]) were detected. The cells of the top layer demonstrated higher mortality rates compared with those in the bottom layer.

After staining with FUN 1, the PB of the fresh control showed mortality rates of $31.9\% \pm 15.4\%$ (SD). This is significantly lower compared with all ISS samples. The postflight mortality of the PB from the ISS samples ranged between $100.0\% \pm 0.0\%$ (SD) for the S-Mars top layer and $96.5\% \pm 3.6\%$ (SD) for the bottom layer of the rock samples. The PB cells in the top layer exhibited higher mortality rates compared with those in the bottom layer (Fig. 1b).

To verify the results of the FUN 1 staining, a second LIVE/DEAD staining with BacLight was performed. The dye was successfully used for the PB cells only. The PB of the fresh control stained with BacLight showed mortality rates of $10.3\% \pm 8.4\%$ (SD), significantly lower compared with the experiments of all other exposed setups (Fig. 2). The mortality rates detected by BacLight differ clearly from the mortality rates demonstrated by FUN 1 staining (e.g., ground control after FUN 1 staining: $31.9\% \pm 15.4\%$ [SD]). The mortality rates of the ISS samples varied from $76.4\% \pm 18.8\%$ (SD) for the top rock samples to $97.4\% \pm 3.6\%$ (SD) for the top P-Mars samples. Within the S- and P-Mars samples, those in the sample holders of the top layers exhibited higher mortality rates compared with those in the sample holders of the bottom layers (Student's *t* test, $p=0.003$).

4. Discussion

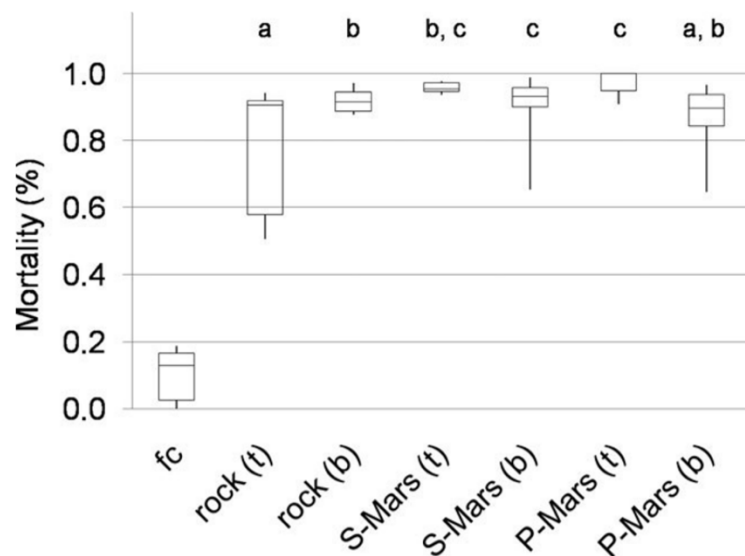
A number of simulation and real space experiments have been carried out with a variety of organisms in recent decades (de Vera *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, 2008, 2010, 2014; de la Torre Noetzel *et al.*, 2007; Sancho *et al.*, 2007; Stöffler *et al.*, 2007; Horneck *et al.*, 2008; de la Torre *et al.*, 2010; de Vera and Ott, 2010; Raggio *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2012, 2014; Backhaus *et al.*, 2014; Meeßen *et al.*, 2014a; Brandt *et al.*, 2015), with a focus on the potential of viability toward most

extreme nonterrestrial conditions such as LEO-cosmic radiation, lack of atmosphere shielding, and intense solar radiation (Berger *et al.*, 2012; Rabbow *et al.*, 2012). The present study focuses on the viability of the lichen *B. frigida* and its symbionts after 469 days of space exposure as part of the BIOMEX project. Preflight tests analyzed the lichen's resistance to abiotic stressors such as vacuum, Mars atmosphere, temperature cycling, and monochromatic UVC_{254nm} fluences for up to 38 days (Meeßen *et al.*, 2015). While *B. frigida* demonstrated a high resistance to these simulated stressors, the exposure to real space stressors in combination for 1.5 years strongly impaired the survival potential of this lichen.

Some of the space conditions, such as drought and temperature cycling, might be comparable with the conditions of the natural habitat of *B. frigida*, for example, concerning the freeze and thaw cycles that occur regularly at the colonization site and were characteristic of the space environment on the ISS. Lichens such as *B. frigida* have the capability to tolerate these conditions as well as the long-time "minus temperature" regime such as that of Antarctica (Kappen, 1985; Sadowsky and Ott, 2012). Honegger (2003) demonstrated the ability of lichens to survive even shock freezing in liquid nitrogen. Freezing cannot be described as a limiting factor for the survival of the lichen symbionts toward space conditions (Brandt *et al.*, 2015).

In addition, lichens are very well adapted to long-term desiccation, a stressor that also occurs in space. Experiments verified that lichens may survive desiccation for up to 13 years at -20°C (Honegger, 2003). *B. frigida* can be described by a wide variety of adaptation strategies considering the severe environmental conditions at the respective Antarctic habitats (Nybakken *et al.*, 2004; de Vera *et al.*, 2008; Backhaus *et al.*, 2014; Meeßen *et al.*, 2015). Regarding the stress factor desiccation, lichens are able to activate repair mechanisms, for example, DNA repair processes (Eker *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 1999; Sinha and Häder, 2002; Buffoni Hall *et al.*, 2003). Based on the particular characteristic of anhydrobiosis, desiccated lichen symbiotic organisms are not sensitive to some of the real

FIG. 2. Boxplots of the mean mortality values of PB cells prepared from *Buellia frigida* lichen fragments sampled from control and flight samples stained with BacLight™ (LIVE/DEAD stain) as determined by CLSM analysis. Lichen fragments were sampled from the "fresh" control (fc) and the different types of BIOMEX samples: rock pellets with indigenous lichen (rock), P-MRS (P-Mars) pellets, and S-MRS (S-Mars) pellets. Fragments sampled from exposed and dark control BIOMEX pellets are differentiated by the notation top (t) and bottom (b), respectively.



space conditions, such as high and low temperature and drought. Anhydrobiosis can be described as a key feature when considering the resistance and life strategy of lichens toward simulated as well as real space and Mars-like conditions. Several simulation experiments were performed with desiccated as well as wet lichen thalli and isolated PB. These experiments demonstrate that, when in the dry state, the organisms are clearly more resistant, for example, toward UVC radiation (de Vera and Ott, 2010; Backhaus *et al.*, 2014; Meeßen *et al.*, 2014a; Sánchez *et al.*, 2014).

Extraterrestrial conditions, such as vacuum and space radiation, have a damaging effect on cells (de Vera *et al.*, 2003, 2004a, 2008, 2010; de la Torre Noetzel *et al.*, 2007, 2010; de Vera and Ott, 2010; Sánchez *et al.*, 2012; Brandt *et al.*, 2015). Cells can be damaged directly by morphological deformation affected by vacuum or indirectly, for example, by formation of reactive oxygen species (ROS) (Kovács and Keresztes, 2002). The accumulation of ROS can essentially damage cell functions (Kranmer *et al.*, 2005; Wieners *et al.*, 2012) and may result in cell death (Horneck, 1981). In the state of anhydrobiosis, lichens are able to prevent the accumulation of ROS by deactivation of processes of photosystem II (Lange *et al.*, 1989).

Radiation can act as a very harmful stressor under space conditions. The impact of cosmic radiation on the lichen samples can be difficult to assess due to the relatively low accumulated doses. Many simulation experiments have been carried out with the intent to detect the effects of, for example, UVC radiation and ionic radiation on lichens (de Vera *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, 2010, 2014; de la Torre Noetzel *et al.*, 2007; de Vera and Ott, 2010; Sánchez *et al.*, 2012, 2014; Backhaus *et al.*, 2014; Meeßen *et al.*, 2014a; Brandt *et al.*, 2015).

On the EXPOSE-R2 facility, the lichens were exposed in two different trays with discriminating insolation conditions. Tray 1 included the rock samples. Tray 2 included the P- and S-Mars pellets. The fully space-exposed top layer showed, on average, higher mortality rates of the lichen samples compared with the samples in the shadowed dark control bottom layers. Even when taking into account the presence of melanin, a secondary metabolite encrusted in the lichen cortex that acts as a screening compound against UVR (Henson *et al.*, 1999; Meredith and Riesz, 2004; Wang *et al.*, 2006), the radiation doses seem to be a limiting factor on the viability of the *B. frigida* samples.

Considering the performance of the three substrates used for *B. frigida*, the rock pellets demonstrated lower mortality rates of the superposed lichen organisms compared with the S-Mars and P-Mars samples. The artificial substrates of the S-Mars and P-Mars pellets might have affected the mortality of the lichen samples. It can be hypothesized that the effect is caused by unknown toxicity of the regolith. UVR may induce a decomposition of molecules that are part of the composition of the pellets (Noblet *et al.*, 2012; Poch *et al.*, 2013, 2014) or the UVR induces the formation of radicals in the Mars substrates (Shkrob *et al.*, 2010). An additional effect could be that the lichen samples had to be removed from their natural substrate to be affixed with glue onto the pressed pellets of Mars regolith simulants. Further studies have already demonstrated the effect of removing the upper cortex, which leads to a decrease of thallus viability (de Vera and Ott, 2010). It may be that there is also a negative effect when the lower side that includes the medulla of a

lichen has been damaged and the contact to the original natural substrate is interrupted.

With regard to this latter hypothesis, a previous space exposure experiment at the outside of the ISS, called LIFE, was performed in 2008 and 2009. During this experiment, samples of the cosmopolitan lichen *X. elegans* were exposed to space and Mars analog conditions on the ISS for 18 months. In this experiment, Mars analog conditions were simulated by a martian atmosphere comparable with that used in the BIOMEX experiment, but no martian regolith was used. After return of the LIFE samples, the analysis of the mortality of the lichen was carried out by LIVE/DEAD staining with FUN 1 and CSLM. The results demonstrate lower mortality values (Brandt *et al.*, 2015) compared with the results of this EXPOSE-R2 study. The martian atmosphere itself seems not to affect cell survivability. Because of the high mortality of *B. frigida* samples placed on artificial Mars regolith in the BIOMEX experiment, it may be that the S-Mars and P-Mars pellets had either a toxic influence on the lichen samples or alteration of the lichens, due to the mechanism used to attach them to the pressed regolith simulant pellets, played a role in their survivability.

As mentioned before, radiation could act as a limiting factor when considering the survival of lichens in space. Especially, UVC radiation is one of the lethal factors in space for living organisms and imposes a dramatic threat to life (Horneck, 1999; Nicholson *et al.*, 2005). Studies on the PB of *B. frigida*, which is described to be the more sensitive partner of the symbiosis compared with the MB (Ahmadjian, 1993; de Vera and Ott, 2010), showed that the PB can survive by treatment of UVC doses up to 41.7 J/cm² for a limited time of about a few weeks when desiccated (Backhaus *et al.*, 2014). In the present study, the MB showed, by trend, lower mortality values after LIVE/DEAD staining with FUN 1 when compared with the PB.

In general, the reactivation time of lichens takes about 5–20 min (Lange *et al.*, 1989; Dyer and Crittenden, 2008) depending on species and dry state. For the LIVE/DEAD staining, a reactivation time of 24 h at 4°C was necessary because of the extreme long-term desiccation during the space experiment. The restart of the cell metabolism of *B. frigida* might need more time to reinitiate photosynthetic activity and to run repair processes. When running a cell cycle, the cells are checked by cell intern “checkpoints.” Depending on the intensity of cell damage, cells may die by a necrosis or apoptosis pathway (Reape *et al.*, 2008) or be repaired by cell repair mechanisms (e.g., DNA or protein repair mechanisms) (Eker *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 1999; Buffoni Hall *et al.*, 2003).

In conclusion, the BIOMEX project demonstrates the fundamental feature of anhydrobiosis in correlation with the survival potential of the lichen *B. frigida* after 18 months of space exposure. The preflight tests, which were carried out for a rather short experimental time, demonstrated a minor mortality rate of the thallus fragments of *B. frigida*, while a duration of 1.5 years of exposure to a variety of space conditions increased the mortality substantially. In comparison with the results of the LIFE, which was carried out only with the lichen, *X. elegans*, that is distributed worldwide (Brandt *et al.*, 2015), the Antarctic endemic lichen *B. frigida* and its symbionts displayed a lower resistance but a clear minor survival potential to the severe space conditions.

The lichen *B. frigida* with its symbionts seems to be characterized by life strategies well adapted to severe environmental conditions, especially at continental Antarctic habitats, but the range of adaptation mechanisms obviously is lower compared with the cosmopolitan alpine lichen species *X. elegans*. It can be stated that much more research and knowledge of details of adaptation mechanisms of the symbiotic organism lichen will be needed to understand the limits of life strategies and the different levels among lichen species, depending on the environmental conditions of the respective habitats. Space experiments such as BIOMEX are crucial to fundamental clarification of these features.

Acknowledgments

The authors thank the German Federal Ministry of Economics and Technology. The authors also express their sincere gratitude to the German Federal Ministry of Economics and Technology for funding of the project (BMWi, 50WB1153), for support by ESA during the BIOMEX experimental phase (ESA-ILSRA 2009-0834), and DLR for the DLR-FuW-Project BIOMEX (2474128). They particularly acknowledge also ESA for covering the costs of launch of the samples, transfer to the ISS, operations of the astronauts during extravehicular activity (EVA), and retrieval from the ISS with transfer back to Earth. The authors specially thank R.D. for providing the RedShift data and the anonymous reviewers for their comments. The results are included in the doctoral thesis of T.B.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Ahmadjian, V. (1993) A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia* 6:127–160.
- Backhaus, T., de la Torre, R., Lyhme, K., de Vera, J.-P., and Meeßen, J. (2014) Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC_{254nm} in the photobiont of the astrobologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. *Int J Astrobiol* 14:479–488.
- Baqué, M., Scalzi, G., Rabbow, E., Rettberg, P., and Billi, D. (2013) Biofilm and planktonic lifestyles differently support the resistance of the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under space and Martian simulations. *Orig Life Evol Biosph* 43:377–389.
- Berger, T., Hajek, M., Bilski, P., Körner, C., Vanhavere, F., and Reitz, G. (2012) Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* 12: 387–392.
- Benardini, J., Sawyer, J., Venkateswaran, K., and Nicholson, W. (2003) Spore UV and acceleration resistance of endolithic *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* isolates obtained from Sonoran desert basalt: implications for lithopanspermia. *Astrobiology* 3:707–717.
- Beuselinck, T., van Bavinchove, C., Hatton, J., and Demets, R. (2018) EXPOSE: solar irradiation by calculation, EXPOSE-R2 simulation results. Redshift Design and Engineering BVBA. Ref. no. EXPR2-RP-002-RS.
- Böttger, U., de Vera, J.P., Fritz, J., Weber, I., Hübers, H.W., and Schulze-Makuch, D. (2012) Optimizing the detection of carotene in cyanobacteria in a martian regolith analogue with a Raman spectrometer for the ExoMars mission. *Planet Space Sci* 60:356–362.
- Brandt, A., de Vera, J.P., Onofri, S., and Ott, S. (2015) Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. *Int J Astrobiol* 14:411–425.
- Buffoni Hall, R.S., Paulsson, M., Duncan, K., Tobin, A.K., Widell, S., and Bornmann, J.F. (2003) Water- and temperature dependence of DNA damage and repair in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. *mitis* exposed to UV-B radiation. *Physiol Plant* 118:371–379.
- Clark, B.C. (2001) Planetary interchange of bioactive material: probability factors and implications. *Orig Life Evol Biosph* 31:185–197.
- Cockell, C. (2008) The interplanetary exchange of photosynthesis. *Orig Life Evol Biosph* 38:87–104.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., and Crowe, L.M. (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579–599.
- de la Torre, R., Sancho, L.G., Horneck, G., de los Ríos, A., Wierzbos, J., Olsson-Francis, K., Cockell, C.S., Rettberg, P., Berger, T., de Vera, J.P., Ott, S., Frías, J.M., Melendi, P.G., Lucas, M.M., Reina, M., Pintado, A., and Demets, R. (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions—results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208:735–748.
- de la Torre Noetzel, R., Sancho, L.G., Pintado, A., Rettberg, P., Rabbow, E., Panitz, C., Deutschmann, U., Reina, M., and Horneck, G. (2007) BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Adv Space Res* 40: 1665–1671.
- de Vera, J.P. and Ott, S. (2010) Resistance of symbiotic eukaryotes. Survival to simulated space conditions and asteroid impact catalysis. In *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 17, edited by J. Seckbach and M. Grube, Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 595–611.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P., and Ott, S. (2003) The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space-I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *Int J Astrobiol* 1:285–293.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P., and Ott, S. (2004a) The potential of lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Adv Space Res* 33:1236–1243.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P., and Ott, S. (2004b) In the context of panspermia: may lichens serve as shuttles for their bionts in space? In *Proceedings of the Third European Workshop on Astrobiology*. ESA SP-545. ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, the Netherlands, pp 197–198.
- de Vera, J.P., Rettberg, P., and Ott, S. (2008) Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Orig Life Evol Biosph* 38:457–468.
- de Vera, J.P., Möhlmann, D., Butina, F., Lorek, A., Wernecke, R., and Ott, S. (2010) Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* 10:215–227.
- de Vera, J.P., Schulze-Makuch, D., Khan, A., Lorek, A., Koncz, A., Möhlmann, D., and Spohn, T. (2014) Adaptation of an Antarctic lichen to Martian niche conditions can occur within 34 days. *Planet Space Sci* 98:182–190.

- de Vera, J.-P., Alawi, M., Backhaus, T., Baqué, M., Billi, D., Böttger, U., Berger, T., Bohmeier, M., Cockell, C., Demets, R., de la Torre Noetzel, R., Edwards, H.G.M., Elsaesser, A., Faglierone, C., Fiedler, A., Foing, B., Foucher, F., Fritz, J., Hanke, F., Herzog, T., Horneck, G., Hübers, H.-W., Huwe, B., Joshi, J., Kozyrovska, N., Kruchten, M., Lasch, P., Lee, N., Leuko, S., Leya, T., Lorek, A., Martínez-Frías, J., Moritz, S., Moeller, R., Olsson-Francis, K., Onofri, S., Ott, S., Pacelli, C., Podolich, O., Rabbow, E., Reitz, G., Rettberg, P., Reva, O., Rothschild, L., Sancho, L.G., Schulze-Makuch, D., Selbmann, L., Serrano, P., Szewzyk, U., Verseux, C., Wagner, D., Westall, F., Wolter, D., and Zucconi, L. (2019) Limits of life and the habitability of Mars—the ESA space experiment BIOMEX on the ISS. *Astrobiology* 19:145–157.
- Dyer, P. and Crittenden, P. (2008) Antarctic lichens: life in the freezer. *Microbiol Today* 35:74.
- Eker, A.P., Yajima, H., and Yasui, A. (1994) DNA photolyase from the fungus *Neurospora crassa*. Purification, characterization and comparison with other photolyases. *Photochem Photobiol* 60:125–133.
- Fairén, A.G., Davila, A.F., Lim, D., Bramall, N., Bonaccorsi, R., Zavaleta, J., Uceda, E. R., Stoker, C., Wierzchoes, J., Dohm, J.M., Amils, R., Andersen, D., and McKay, C.P. (2010) Astrobiology through the ages of Mars: the study of terrestrial analogues to understand the habitability of Mars. *Astrobiology* 10:821–843.
- Henson, J.H., Butler, M.J., and Day, A.W. (1999) The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 37:447–471.
- Henssen, A. and Jahns, H.M. (1974) *Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Honegger, R. (2003) The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biol* 5: 324–330.
- Horneck, G. (1981) Survival of microorganisms in space: a review. *Adv Space Res* 1:39–48.
- Horneck, G. (1999) European activities in exobiology in earth orbit: results and perspectives. *Adv Space Res* 23:381–386.
- Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J.P., Fritz, J., Schade, S., and Artemieva, N.A. (2008) Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8:17–44.
- Huneck, S. and Yoshimura, I. (1996) Data of lichen substances (chapter 3). In *Identification of Lichen Substances*. Springer Verlag, Berlin, pp 125–446.
- Kappen, L. (1985) Lichen-habitats as micro-oases in the Antarctic—the role of temperature. *Polarforschung* 55:49–54.
- Kappen, L. (1993) Plant activity under snow and ice, with particular reference to lichens. *Arct Inst North Am* 46:297–302.
- Kappen, L. (2000) Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarct Sci* 12:314–324.
- Kappen, L. and Schroeter, B. (1997) Activity of lichens under the influence of snow and ice. *Proc NIPR Symp Polar Biol* 10:163–168.
- Kappen, L., Schroeter, B., Scheidegger, C., Sommerkorn, M., and Hestmark, G. (1996) Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0°C. *Adv Space Res* 18:119–128.
- Kovács, E. and Keresztes, A. (2002) Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron* 33:199–210.
- Kranner, L., Cram, W.J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheimer, E., and Peifhofer, H.W. (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3141–3146.
- Kuznetsov, L.H. and Gan, D.C. (2002) On the existence and stability of liquid water on the surface of Mars today. *Astrobiology* 2:183–195.
- Lange, O. (1992) *Pflanzenleben Unter Stress*. Rostra Universitatis Wirceburgensis, Würzburg.
- Lange, O.L., Bilger, W., Rimke, S., and Schreiber, U. (1989) Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water. *Plant Biol* 102:306–313.
- Meeßen, J., Sánchez, F.J., Brandt, A., Balzer, E.M., de la Torre, R., Sancho, L.G., de Vera, J.P., and Ott, S. (2013) Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research. I. Morphological and anatomical characteristics. *Orig Life Evol Biosph* 43:283–303.
- Meeßen, J., Backhaus, T., Sadowsky, A., Mrkalj, M., Sánchez, F.J., de la Torre, R., and Ott, S. (2014a) Effects of UVC_{254nm} on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. *Int J Astrobiol* 13:340–352.
- Meeßen, J., Sánchez, F.J., Sadowsky, A., de Vera, J.P., de la Torre, R., and Ott, S. (2014b) Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five lichen species used in astrobiological research II. Secondary lichen compounds. *Orig Life Evol Biosph* 43:501–526.
- Meeßen, J., Wuthenow, P., Schille, P., Rabbow, E., de Vera, J.P., and Ott, S. (2015) Resistance of the lichen *Buellia frigida* to simulated space conditions during the preflight tests for BIOMEX—viability assay and morphological stability. *Astrobiology* 15:601–615.
- Meeßen, J., Backhaus, T., Brandt, A., Raguse, M., Böttger, U., de Vera, J.P., and de la Torre, R. (2017) The effect of high-dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiologie* 17:154–162.
- Meredith, P. and Riesz, J. (2004) Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol* 79:211–216.
- Molecular Probes. (2001) Product information, probes for yeast viability, LIVE/DEAD FUN1.
- Molecular Probes. (2004) Product information, LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kits.
- Nicholson, W., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H., and Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:548–572.
- Nicholson, W., Schuerger, A., and Setlow, P. (2005) The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutat Res* 571:249–264.
- Noblet, A., Stalport, F., Guan, Y.Y., Poch, O., Coll, P., Szopa, C., Cloix, M., Macari, F., Raulin, F., Chaput, D., and Cottin, H. (2012) The PROCESS experiment: amino and carboxylic acids under Mars-like surface UV radiation conditions in low-Earth orbit. *Astrobiology* 12:436–444.
- Nybakken, L., Solhaug, K.A., Bilger, W., and Gauslaa, Y. (2004) The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* 140:211–216.
- Onofri, S., Selbmann, L., Zucconi, L., and Pagano, S. (2004) Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planet Space Sci* 52:229–237.

- Onofri, S., de la Torre, R., de Vera, J.P., Ott, S., Zucconi, L., Selbmann, L., Scalzi, G., Venkateswaran, K.J., Rabbow, E., Sánchez, I., and Horneck, G. (2012) Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space. *Astrobiology* 12:508–516.
- Øvstedal, D.O. and Lewis Smith, R.I. (2001) *Lichens of Antarctica and South Georgia. A Guide to Their Identification and Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 361–363.
- Palumbo, A.M. and Head, J.W. (2018) Early Mars climate history: characterizing a “warm and wet” Martian climate with a 3-D global climate model and testing geological predictions. *Geophys Res Lett* 45:1–10.
- Petersen, J.L., Lang, D.W., and Small, G.D. (1999) Cloning and characterization of a class II DNA photolyase from *Chlamydomonas*. *Plant Mol Biol* 40:1063–1071.
- Poch, O., Noblet, A., Stalport, F., Correia, J.J., Grand, N., Szopa, C., and Coll, P. (2013) Chemical evolution of organic molecules under Mars-like UV radiation conditions simulated in the laboratory with the “Mars Organic Molecule Irradiation and Evolution” (MOMIE) setup. *Planet Space Sci* 85: 188–197.
- Poch, O., Kaci, S., Stalport, F., Szopa, C., and Coll, P. (2014) Laboratory insights into the chemical and kinetic evolution of several organic molecules under simulated Mars surface UV radiation conditions. *Icarus* 242:50–63.
- Rabbow, E., Rettberg, P., Barczyk, S., Bohmeier, M., Parpart, A., Panitz, C., Horneck, G., von Heise-Rotenburg, R., Hoppenbrouwers, T., Willnecker, R., Baglioni, P., Demets, R., Dettmann, J., and Reitz, G. (2012) EXPOSE-E: an ESA astrobiology mission 1.5 years in space. *Astrobiology* 12:374–386.
- Rabbow, W., Rettberg, P., Parpart, A., Panitz, C., Schulte, W., Molter, F., Jaramillo, E., Pereira, C., Weiß, P., Willnecker, R., Demets, R., Dettmann, J., and Reitz, G. (2017) EXPOSE-R2: the Astrobiological ESA Mission on Board of the International Space Station. *Front Microbiol* 8:1–14.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., de la Torre, R., de los Ríos, A., Wierzbos, J., Horneck, G., and Sancho, L.G. (2011) Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11:281–292.
- Reape, T.J., Molony, E.M., and McCabe, P. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J Exp Bot* 59:435–444.
- Sadowsky, A. and Ott, S. (2012) Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis* 58: 81–90.
- Sánchez, F.J., Mateo-Martí, E., Raggio, J., Meeßen, J., Martínez-Frías, J., Sancho, L., Ott, S., and de la Torre, R. (2012) The resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (nom. prov.) towards simulated mars conditions—a model test for the survival capacity of a eukaryotic extremophile. *Planet Space Sci* 72:102–110.
- Sánchez, F.J., Meeßen, J., Ruiz, M., Sancho, L., Ott, S., Vilchez, C., Horneck, G., Sadowsky, A., and de la Torre, R. (2014) UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *Int J Astrobiol* 13:1–18.
- Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Ríos, A., Pintado, A., Wierzbos, J., and Schuster, M. (2007) Lichens survive in space: results from 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7:443–454.
- Sancho, L., de la Torre, R., and Pintado, A. (2008) Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biol Rev* 22:103–109.
- Scalzi, G., Selbmann, L., Zucconi, L., Rabbow, E., Horneck, G., Albertano, P., and Onofri, S. (2012) LIFE experiment: isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Orig Life Evol Biosph* 42:253–262.
- Schirmack, J., Böhm, M., Brauer, C., Löhmansröben, H.G., de Vera, J.P., Möhlmann, D., and Wagner, D. (2014) Laser spectroscopic real time measurements of methanogenic activity under Martian subsurface analogue conditions. *Planet Space Sci* 98:198–204.
- Shkrob, I.A., Chmerisov, S.D., and Marin, T.W. (2010) Photocatalytic decomposition of carboxylated molecules on light-exposed martian regolith and its relation to methane production on Mars. *Astrobiology* 10:425–435.
- Sinha, R. and Häder, D.P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1:225–236.
- Solhaug, K.A. and Gauslaa, Y. (1996) Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia* 108:412–418.
- Stöffler, D., Horneck, G., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J.P., Fritz, J., and Artemieva, N.A. (2007) Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like Planets. *Icarus* 189:585–588.
- Thomson, W. (1871) Presidential address to the British Association for the Advancement of Science. *Nature* 4:262–270.
- Wang, H., Pan, Y., Tang, X., and Huang, Z. (2006) Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans* seeds. *LWT Food Sci Technol* 39:469–502.
- Wieners, P.C., Mudimu, O., and Bilger, W. (2012) Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae. *Photosynth Res* 113:239–247.

Address correspondence to:
 Sieglinde Ott
 Institute of Botany
 Heinrich Heine University
 Universitätsstr. 1
 40225 Duesseldorf
 Germany
 E-mail: otts@hhu.de

Submitted 27 April 2018
 Accepted 8 January 2019

Abbreviations Used

BIOMEX = BIOlogy and Mars EXperiment
 CLSM = confocal laser scanning microscope
 ISS = International Space Station
 LEO = low Earth orbit
 LIFE = lichen and fungi experiment
 MB = mycobiont
 PAR = photosynthetically active radiation
 PB = photobiont
 ROS = reactive oxygen species
 SD = standard deviation
 UVR = ultraviolet radiation

8.2 DNA damage of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in Space using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique

Autoren: Theresa Backhaus, Joachim Meeßen, René Demets, Jean-Pierre de Vera and Sieglinde Ott

Planetary and Space Science (2019)

Impact Faktor: 1,8 (2017/2018)

Der Artikel wurde vollständig vom Erstautor verfasst.

DNA damage of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in Space using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique

Theresa Backhaus¹, Joachim Meeßen¹, René Demets², Jean-Pierre Paul de Vera³ and Sieglinde Ott¹

¹Institute of Botany, Heinrich Heine University, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

²European Space Research and Technology Centre (ESTEC), European Space Agency (ESA), Noordwijk, Netherlands

³German Aerospace Center (DLR), Institute of Planetary Research, Management and Infrastructure, Researchgroup Astrobiological Laboratories, Rutherfordstr. 2 12489 Berlin, Germany

Abstract

The lichen *Buellia frigida* has been exposed to space and simulated Mars analogue conditions as part of the ESA space experiment BIOMEX (Biology and Mars Experiment) on the expose facility EXPOSE-R2 placed outside the Russian Zvezda module on the International Space Station (ISS) for 1.5 years. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique has been carried out to study the effect of space conditions on the DNA integrity as well as to assess DNA damage. The RAPD profiles of the space exposed lichen samples demonstrate conspicuous changes compared to the control profiles. For the survival of cells and entire organisms the DNA integrity is an essential prerequisite. The results of the study presented indicate a minor resistance potential-of the lichen *Buellia frigida* towards Low Earth Orbit and Mars analogue conditions effecting the survival potential and the resistance of the symbiotic organism.

Keywords

Astrobiology, BIOMEX, space conditions, Mars-analogue conditions, DNA, RAPD

1 Introduction

Lichens are one of the most successful biological symbiotic associations on Earth. They are formed by two organisms, the heterotrophic fungal partner (mycobiont) and the photoautotrophic partner (photobiont) that is an eukaryotic green alga and/or a prokaryotic cyanobacterium. About 18800 species are known distributed worldwide (Feuerer 2006) and about 8% of the Earth's terrestrial surface is dominated by lichens (Larson 1987). Based on their life strategies and considering their great variety of

morphological, anatomical and physiological adaptations as e.g. secondary lichen compounds (Henssen & Jahns 1974) lichens are able to colonize habitats worldwide and tolerate extreme environmental conditions. They can cope with high levels of (toxic) metal ions (Bačkor & Fahselt 2008), cold and long-term snow coverage (Kappen & Friedmann 1983; Dyer & Crittenden 2008), heat, intense insolation with high levels of UVR (Lange & Kappen 1972; Nybakken *et al.* 2004, de la Torre *et al.* 2010), low water availability, infrequent water supply and long-term desiccation as it has been recognized in cold and hot deserts as e.g. the Dry Valleys in continental Antarctica (Marchant & Head 2007; Harańczyk *et al.* 2008; Sun *et al.* 2010) as well as in the Andean Atacama Desert (McKay *et al.* 2003). Honegger has performed experiments which demonstrated that lichens can survive desiccation and freezing under laboratory conditions for up to 13 years at -20°C (Honegger 2003).

The lichen's ability of anhydrobiosis, a desiccated state of life, can be described as a key strategy for the resistance of the symbiotic organism towards extreme stressors. Re-hydration activates the lichen metabolism and therefore may start repair mechanisms to repair desiccation induced damage (Bewley & Oliver 1992; Kranner *et al.* 2008; Meeßen *et al.* 2013). These repair processes may also be able to regenerate UVC-induced effects. Several experiments demonstrated that desiccated lichen organisms are more resistant towards e.g. UVC radiation than moist thalli (de Vera & Ott 2010; Sánchez *et al.* 2014; Meeßen *et al.* 2014; Backhaus *et al.* 2015).

Based on their potential of high resistance lichens became model organisms for astrobiological research (Sancho *et al.* 2007). In the past, several simulation experiments have been performed with different lichen species exposed to combinations of extraterrestrial conditions as e.g. vacuum, space radiation (as e.g. ultraviolet and ionizing radiation), Martian atmosphere, subzero temperatures, meteorite impacts) as well as short term real space exposure experiments as LICHENS II, STONE, LITHOPANSPERIMA, BIOPAN-6 (Lange & Kappen 1972; Kappen 1985; de Vera *et al.* 2003 2004a 2004b 2008 2010 2014; de la Torre Noetzel *et al.* 2007; Sancho *et al.* 2007; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008; de la Torre *et al.* 2010; de Vera & Ott 2010; Raggio *et al.* 2011; Sánchez *et al.* 2012 2014; Meeßen *et al.* 2014; Backhaus *et al.* 2015). Several simulation experiments with the lichen species *Buellia frigida* have been carried out to analyze the lichens potential to survive space conditions as e.g. UVC radiation and subzero

temperatures as well as on the molecular level considering DNA damage (Kruchten *et al.* in prep; Backhaus *et al.* 2015; Meeßen *et al.* 2015).

Studies on investigations under Martian conditions increased the interest in astrobiology especially regarding the climate history of Mars. About 3.95 to 3.7 billion years ago, Mars was characterized by a water-rich epoch. During this epoch water and energy were available on the Martian surface causing potentially habitable conditions on the planet (Fairén *et al.* 2010). The water-rich epoch was followed by a semi-arid epoch about 3.7 to 2.9 billion years ago in that the Martian surface dried out and became inhabitable for life as we know it (de Vera *et al.* 2014; Schirmack *et al.* 2014).

Considering the survival capacity of lichen symbiotic organisms in space, samples of the lichen *Buellia frigida* were exposed to space conditions within the EXPOSE-R2 facility at the outside of the Zvezda Module on the ISS for 1.5 years as part of the international astrobiological Biology and Mars Experiment (BIOMEX) project. During this project more than 600 biological samples (bacteria, archaea, lichens, plant seeds, microfungi, mosses, biofilms) have been exposed to space and Mars-like conditions (Rabbow *et al.* 2017). *Buellia frigida* was chosen because it demonstrated a high potential of survival after preflight simulation tests exposed to vacuum, Martian atmosphere, UVC radiation, temperature cycling and temperature extremes (Meeßen *et al.* 2015). The BIOMEX project is the second long-term experiment (>12 months) carried out with lichens on board the ISS.

Analysis of the thalli of *Buellia frigida* by LIVE/DEAD staining with BacLight™ and FUN® 1 using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) has already been accomplished after the space exposure during the BIOMEX project. Viability rates of the photobiont between 0.0 ± 0.0 (SD) % to 23.6 ± 18.8 (SD) % and of mycobiont cells between 97.8 ± 0.03 (SD) % to 89.5 ± 0.06 (SD) % have been detected (Backhaus *et al.* 2019).

In the first long term space experiment at the ISS named LIFE which started in 2014 lichen samples of *Xanthoria elegans* have been exposed for 1.5 years to space and Martian analogue conditions. The results of this study demonstrated significantly higher viability values for both the symbionts (between 60.8 ± 32.5 (SD) % and 89.2 ± 6.2 (SD) %) after being exposed to space and Martian analogue conditions compared to *Buellia frigida* (Brandt *et al.* 2015).

To verify the results of the space exposed samples of *Buellia frigida* after LIVE/DEAD staining and CLSM analysis (Backhaus *et al.* 2019) the recent study presents investigations on the genomic stability of the lichen thalli that have been exposed to space and Mars-like conditions for 1.5 years. Analysis of the DNA was performed with Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR. The method is one of the most used techniques for detecting DNA damages (Lalrotuluanga & Gurusubramanian 2011). DNA integrity can be described as essential for survival of cells and organisms (Maldonado *et al.* 2016). The space radiation conditions of Low Earth Orbit, especially UVC, X- and Y radiation, are known to directly affect genomic integrity of organisms (Huettermann *et al.* 1978; Harm 1980; Ravanat *et al.* 2001). Subsequently, the study presented focuses on the survival capacity of the lichen *Buellia frigida* by analyzing effects of space conditions on DNA level.

2 Material and Methods

2.1 The lichen *Buellia frigida*

Buellia frigida Darb. (1910) is an endemic crustose lichen with an distribution across Antarctica. The photoautotrophic symbiont has been genetically identified as *Trebouxia* sp. clade S (also referred to *Trebouxia jamesii*, Sadowsky & Ott 2012). It largely colonizes exposed rock surfaces and boulders of different size. The lichen is well adapted to high levels of photosynthetic active radiation (PAR), desiccation and cold temperatures at its colonization site (Kappen & Friedmann 1983; Schroeter *et al.* 1992; Sadowski & Ott 2012; Backhaus *et al.* 2015). The lichen samples used in the study have been collected in North Victoria Land (74°38'S 164°13'E) during the Antarctic summer season 2009/2010. They were collected and transported as well as stored at -20°C until further investigations.

2.2 Sample preparation

Three different sample setups have been prepared for the BIOMEX project. First, thallus fragments were drilled out of their natural rock substrate with a pellet diameter of 12mm (mentioned as "rock" samples). For the second and third experimental setup two different artificial Mars-analogue substrates have been prepared. One was similar to the early, acidic Mars substrate ("P-Mars") and the second was similar to late and basic Mars regolith substrate ("S-Mars"). For more details about the artificial Mars-analogue regolith

see Böttger *et al.* 2012. Both Mars substrates were prepared and pressed into pellets with a diameter of 12mm at the German Aerospace Center (DLR) in Berlin.

A number of thallus fragments of *Buellia frigida* were fixed and glued (RTV-S 691 silicone rubber, wacker, admitted for aerospace applications by European Space Research and -technology Centre) on the artificial P- and S-Mars pellets. All samples prepared (rock, S-Mars, P-Mars) were sent to the German Aerospace Center (DLR) in Cologne and have been integrated into the EXPOSE-R2 facility. This facility got exposed on the Zvezda Module on the outside of the ISS for 1.5 years. After the samples returned to Earth, the lichen samples were stored at -80°C until further investigations.

2.3 Exposure conditions

The EXPOSE-R2 facility in which the lichen samples of *Buellia frigida* have been exposed to space and Mars-like conditions was divided in three different trays. The first tray was used to expose the samples to direct space conditions of the Low Earth Orbit (LEO). In this tray, the rock pellets with *Buellia frigida* samples have been exposed to space conditions during the BIOMEX experiment on the ISS. The second tray was hermetically closed, evacuated and then flooded with 980 Pa Martian atmosphere (composition: 95.55 % CO₂ 2.70 % N₂ 1.60 % Ar, 0.15 % O₂, ~ 370 ppm H₂O, Praxair Deutschland GmbH). The P- and S-Mars pellets with samples of *Buellia frigida* have been exposed within this tray to Mars-like conditions. The third tray of the EXPOSE-R2 facility has not been used for the analysis of the *Buellia frigida* samples. In every tray two stacked layers of biological samples have been exposed to space on the ISS. Samples within the top layer have been exposed directly to the space conditions of LEO. Samples of the bottom layer were protected against solar and in particular to UV radiation by the top layer. The bottom layer experiences space radiation as e.g. galactic cosmic radiation and γ rays.

The EXPOSE-R2 facility got launched on 23rd July 2014 in Baikonur and has been installed by cosmonauts through Extra-Vehicular Activities (EVA) at the Zvezda Module on 18th August 2014. On 22nd October 2014, after an evacuation phase eliminating remaining gas and water of the samples preventing further outgassing during the experimental phase, the covershield of the facility was removed and the exposition of the biological samples towards space and Martian conditions started. After an exposure

period of approximately 1.5 years (469 days) the samples were returned into the interior of the ISS on 3rd February 2016 and arrived back on Earth on 18th June 2016.

Active and passive sensors were installed within the EXPOSE-R2 facility which measured the environmental data during the experiment. The data achieved were transferred to Earth. The exposure conditions of solar radiation experienced by the different samples were calculated according to the obtained data by RedShift which have been given by averages of accumulated irradiation doses. The lichen samples in the top layer experienced UVA doses between 301 and 359 MJ/m², UVB doses between 51 and 69 MJ/m², UVC doses between 19 and 28 MJ/m² and PAR doses between 2660 and 3020 MJ/m² for the duration of the BIOMEX project. The ionizing radiation doses of the top layer accumulates between 340 and 844 µGy per day at the inner Radiation Belt (South Atlantic Anomaly protons) and to 2960 µGy per day at the outer Radiation Belt (electrons). The Galactic cosmic rays range from 68 to 82 µGy per day depending on the solar activity (Rabbow *et al.* 2017).

Except to the radiation conditions, the biological samples had to deal with regular temperature cycling during the 1.5 years of the BIOMEX project. The temperature cycles were characterized by regularly occurring freeze and thaw cycles per day during the exposure time. The highest temperature of 57.98°C and the lowest temperature of -20.9°C have been measured in tray 3. Temperatures lower than -20°C were determined by Feeder B and a heating system (Rabbow *et al.* 2017).

2.4 DNA Extraction

DNA extraction was performed with one lichen fragment of each experimental setup of *Buellia frigida* (top and bottom layer of rock, P-Mars and S-Mars) as well as with a fresh control. The DNA was immediately extracted after the samples were taken out of the freezer (-80°C). For the DNA extraction a CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) protocol has been followed. Each fragment was put in a 1,5ml Eppendorf tube. CTAB buffer (500 µl) and quartz sand (VWR, sand for analysis, 40-100 mesh) have been added and the samples were pestled for two min by hand with a mortar. Afterwards, 8.3 µl 2-Mercaptoethanol and 50 µl Proteinase K were appended and the samples were incubated for 30 min at 55°C. The mixture was blended with 250 µl chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v). The Eppendorf tubes have been inverted carefully for 2 min. A centrifugation step for 5 min at 13000 rpm followed. The upper phase was transferred into a 1,5ml

Eppendorf tube. 50 µl ammonium acetat (7.5M) as well as 500 µl cold ethanol (100%) were added. Samples were mixed carefully for 2 min and then stored at -20°C for one hour. Afterwards, the samples were centrifuged for 5 min at 13000 rpm and the supernatant was discarded. This centrifugation step was repeated three times. The remaining pellet was air dried and then dissolved in 50µl TE buffer. DNA concentration was quantified by the NanoDrop spectrometer (fresh-control: 172,4ng/µl, BIOMEX samples: rock (top layer): 199,9ng/µl, S-Mars (top layer): 159,6ng/µl, P-Mars (top layer): 108,8ng/µl, rock (bottom layer): 100,5ng/µl, S-Mars (bottom layer): 105,6ng/µl, P-Mars (bottom layer): 123,9ng/µl).

2.5 RAPD-PCR

RAPD-PCR was performed for every experimental setup (top and bottom layer of rock, S-Mars, P-Mars, as well as the fresh control) with 5 different primers (sequences shown in Table 1). Primer OPAJ04 and primer 4 as well as primer OPA11 and OPA03 have been used together in one PCR assay. Each RAPD assay was carried out with a 25 µl PCR mix, containing 5 µl primer (or 2x 2.5 µl primer) 12.5 µl Jumpstart (JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix for PCR, Sigma), 6.5 µl ddH₂O and 1 µl DNA extraction product containing 100ng DNA. The RAPD-PCR was performed three times for every primer setup and each sample (top and bottom layer of rock, P-Mars and S-Mars as well as fresh control). The prepared PCR tubes were loaded on a thermal cycler. The PCR amplification process started with an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 45 cycles with 95°C for 1min for DNA denaturation, 40.7°C for 1min annealing phase and an extension phase at 73°C for 2min. 10 µl of each amplification product were analyzed by gel-electrophoresis which was performed for 1.5 hours at 80V in a 1% (w/v) agarose gel. The assessment of the RAPD profiles and the genomic template stability for the exposed lichen samples were carried out as described by Atienzar *et al.* 2000: Each change (appearance of new bands, disappearance of control bands, increase or decrease of band intensities) was given a +1 arbitrary score (Atienzar *et al.* 2000).

Table 1 Sequences of five different 10-mer primers (5' → 3') used for the RAPD analysis. All these primers have been used in former studies on lichens (Kranner *et al.* 2005).

Primer	Sequence
primer 2	5'-GTTTCGCTCC-3'
primer 4	5'-AAGAGCCCGT-3'
OPA 3	5'-AGTCAGCCAC
OPAJ04	5'-GAATGCGACC
OPA11	5'-CAATCGCCGT

3 Results

Analysis of RAPD-PCR shows reproducible amplicons for each primer setup (primer 4+OPAJ04, primer OPA11+OPA03, primer 2) for every sample (fresh control as well as top and bottom layer of rock, P-Mars and S-Mars as well as fresh control). RAPD-PCR assays of the fresh control with a combination of primer 4 and primer OPAJ04 resulted in 2 amplicons (approximately 680 bp and 420 bp). Primer 2 as well as the combination of primer OPA11 and OPA03 show three amplicons after performance of RAPD-PCR (approximately 700 bp, 420 bp and 80 bp for primer setup OPA11 + OPA03; 1400 bp 1100 bp and 700 bp for primer 2) (Fig. 1).

In the RAPD-PCR profiles of the lichen samples that have been exposed to space and Martian analogue conditions variations in band intensities, disappearance of bands shown for the fresh control and appearance of new bands have been recognized. A detailed overview on changes in band intensities and (dis)appearance of bands for the different sample setups is given in Table 2. E.g. the RAPD-PCR profile of lichen samples of the P-Mars top layer performed with primer 2 shows two new bands, two bands with increased intensities in contrast to the control profile. One PCR product that was amplified in the fresh control is not present in the sample of the P-Mars top layer. For the RAPD-PCR profile of the P-Mars bottom sample only two disappeared bands have been observed compared to the fresh control. No difference could be detected considering the amount of DNA damage of the rock samples compared to the Mars-samples.

By trend, the RAPD profiles of the directly space exposed samples of the top layer (rock, P- and S-Mars) show slightly increased losses of genomic template stability compared to the samples of the non solar and UV-irradiated bottom layer. Within the samples of the top layer there are 10 to 11 points estimated for the genomic instability calculated by

RAPD-PCR profiles (10 for rock and S-Mars; 11 for P-Mars, see Table 2). For the samples of the bottom layer there are lower values detected by trend (8 for S-Mars and 9 for rock and P-Mars).

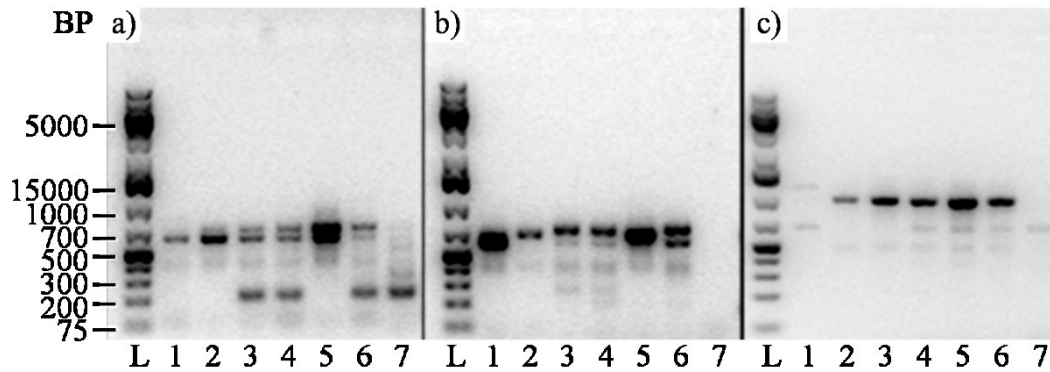


Fig. 1 RAPD profiles of genomic DNA. From left to right: ladder (L) , fresh control (1), then BIOMEX samples: Tray 1: rock top (2), Tray 2: S-Mars top (3), P-Mars top (4), Tray 1: rock bottom (5), Tray 2: S-Mars bottom (6), P-Mars bottom (7) for each profile with a) primer OPA11 + OPA03, b) primer 4 + OPAJ04, c) primer 2.

Table 2 Estimation of RAPD profiles and genomic template instability of BIOMEX samples (Tray 1: rock top and bottom, Tray 2: P- and S-Mars, top and bottom). Each change (appearance of new bands, disappearance of control bands, increase or decrease of band intensities) was given a +1 arbitrary score (Atienzar *et al.* 2000). a- appearance of new bands, b- increase in band intensity, c- disappearance of control bands, d- decrease in band intensity.

		OPA11 + OPA03					primer4 + OPAJ04					primer2					
		bands	a	b	c	d	bands	a	b	c	d	bands	a	b	c	d	Total
fresh control		3					2					3					
top	rock	3	1	1	1	0	2	1	0	1	1	2	1	1	2	0	10
	S-Mars	5	2	0	0	1	4	2	0	0	1	2	1	1	2	0	10
	P-Mars	5	2	0	0	0	5	3	0	0	1	4	2	2	1	0	11
bottom	rock	3	1	1	0	0	2	1	0	1	0	4	2	2	1	0	9
	S-Mars	5	2	0	0	1	3	1	0	0	1	3	1	1	1	0	8
	P-Mars	5	4	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	2	0	9

4 Discussion

Several studies demonstrate relevant adaptation mechanisms of the lichen organism *Buellia frigida* to tolerate harsh environmental conditions at respective Antarctic habitats (Lange & Kappen 1972; Kappen 1985; Kappen *et al.* 1998; Barták *et al.* 2007; Meeßen *et al.* 2015). Different environmental conditions of Antarctica e.g. high levels of solar radiation, drought and temperature cycling may be resembling the conditions of LEO (Honegger 2003; Nybakken *et al.* 2004; de Vera *et al.* 2008; Sadowsky & Ott 2012; Backhaus *et al.* 2015). Considering the survival potential of *Buellia frigida* the known harsh conditions of its original habitat may not succeed as limiting factors under space exposure conditions. Based on the recent knowledge it has been postulated that the lichen *Buellia frigida* might be able to resist space exposure conditions of LEO to preserve its viability.

The conditions of LEO such as especially space-radiation like e.g. x-, γ - and UV-radiation are known to be strong harmful stressors for life, responsible to affect and to damage organisms also on the genetic level. DNA directly absorbs UVC_{254nm} radiation (Girard *et al.* 2011).

The study presented focuses on effects on the DNA of the entire lichen thallus of *Buellia frigida* after 1.5 years of space exposure. The Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR is a simple and nonexpensive tool to detect DNA stability in organisms (Weisling *et al.* 1994; Boiteux *et al.* 1999; Atienzar *et al.* 2000). The method is based on the amplification of genomic DNA with short primers (10 bp) of random nucleotide sequence which anneal to multiple regions of the genomic DNA (Atienzar *et al.* 2002). The RAPD-PCR profiles may be altered when DNA damages occur.

The RAPD-PCR method was successfully carried out to detect DNA damages induced by conditions of LEO. The effects of space exposure to the genome have been reflected by changes in RAPD-PCR profiles for every experimental setup of the lichen samples (top and bottom layer of rock, P-Mars and S-Mars) as e.g. variations in band intensities as well as disappearances and appearances of amplicons. Space conditions e.g. UV and ionizing radiation are known to interfere with the genome directly and cause DNA damages (Harm 1980; Ravant *et al.* 2001; Rastogi *et al.* 2010). Cellular DNA is the main target of solar UV radiation (Rastogi *et al.* 2010). This radiation can produce different types of DNA lesions, e.g. cyclobutane-type pyrimidine dimers and the 6-4 photoproduct (Hollósy

2002). Protein cross-links, DNA strand breaks, deletion or insertion of base pairs can also be induced by UV, infrared and gamma irradiation (Danylchenko & Sorochinsky 2005; Rastogi *et al.* 2010). DNA damages as oxidation of nucleotides can also be induced by space radiation (Nawkar *et al.* 2013; Keresztes & Kovács 2002), what leads to altered RAPD profiles. RAPD-PCR has already been successfully performed to analyze UV- and X-ray induced genetic damage in e.g. plants and macroalgae (Kuroda *et al.* 1999; Atienzar *et al.* 2000).

Regarding the RAPD profiles of the space exposed lichen samples of the top and bottom layer, the samples from the top layer generally demonstrate more intense DNA damages exhibited by higher values of the genomic instability (10 to 11). The top layer samples are effected by stronger space radiation than the bottom ones which are protected by the top layer. The method by RAPD provides semi-quantitative data and the kind of DNA damages can only be speculated. To improve the knowledge on the DNA damages the RAPD-PCR amplicons have to be analyzed by sequencing or probing (Calvo *et al.* 2001; Lalrotuluanga *et al.* 2011; Zahid *et al.* 2011). Supplementary molecular investigations on DNA could not be realized because of the limited lichen material available. The RAPD profiles are related to the level of DNA damage and demonstrate the efficiency of DNA repair and replication processes (Atienzar *et al.* 2000 2002). RAPD PCR amplification products of the lichen samples investigated could not reflect DNA repair processes because the DNA was extracted from frozen thallus fragments. Changes observed in RAPD profiles as described in detail are caused by space radiation as well as further space conditions as e.g. vacuum. Alterations in RAPD profiles can be explained by changes in primer binding sites and by structural changes due to DNA damages as e.g. breaks, transpositions, deletions (Danylchenko & Sorochinska 2002; Lalrotuluanga *et al.* 2011). The appearance and disappearance of PCR products may be induced by the genomic template instability as well as by altered DNA sequences due to mutations or deletions of the lichen samples that have been exposed to space and Martian conditions (Unal *et al.* 2009). The sequence interruptions lead to different annealing events of the primers compared to the control sample (Atienzar *et al.* 2002). Supplementary, the altered RAPD profiles of the space exposed lichen samples may be correlated to the level of DNA photoproducts as e.g. pyrimidine dimers as well as 6-4 photoproducts. The photoproducts are known to inhibit the polymerisation of DNA in the PCR (Donahue *et al.* 1994, Nelson *et al.* 1996; Danylchenko & Sorochinsky 2002).

The rock samples are characterized by DNA damage scores of 9 (bottom) or 10 (top) in the study presented (Table 2). Experiments on cultivation of both symbionts have been carried out for all experimental setups but only the experiments performed with the rock samples succeeded (Backhaus *et al.* in prep) although the DNA damage scores of 9 and 10 demonstrated quite high values. In contrast, S-Mars bottom samples display a lower DNA damage score of 8 but have not been cultivatable after space exposure. Based on these results, it can be demonstrated that analysis of the survival potential of the lichen symbionts after space exposure needs definitely a range of methods to get a differentiated indication to viability.

5 Conclusions

The study presented emphasizes on the DNA integrity of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years of space exposure during the BIOMEX project. Space as well as Mars-like conditions induce DNA damages in the lichen samples of *Buellia frigida* successfully demonstrated by polymorphisms in RAPD profiles. DNA integrity can be described as essential for survival of cells and organisms (Maldonado *et al.* 2016). RAPD technique provides semi-quantitative data that have to be proofed by additional investigations as mentioned above. As a result it can be stated that the resistance and survival potential of the lichen *Buellia frigida* to LEO space conditions can be described to be limited.

6 Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to the German Federal Ministry of Economics and Technology for funding of the project (BMWi, 50WB1153) for support by ESA during the BIOMEX experimental phase (ESA-ILSRA 2009-0834) and DLR for the DLR-FuW-Project BIOMEX (2474128). We particularly acknowledge also ESA for covering the costs of launch of the samples, transfer to the International Space Station (ISS), operations of the astronauts during EVA and retrieval from the ISS with transfer back to Earth Special thanks to Rene Demets for providing the RedShift data and to the anonymous reviewers for their comments. The results are included in the doctoral thesis of Theresa Backhaus.

7 References

- Atienzar, F. A., Cordi, B., Donkin, M. E., Evenden, A. J., Jha, A. N., Depledge, M. H. (2000). Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic Toxicology* 50, pp. 1-12
- Atienzar, F. A., Venier, P., Jha, A. N., Depledge, M. H. (2002). Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research* 521, pp. 151-163
- Backhaus, T., de la Torre, R., Lyhme, K., de Vera, J.-P., Meeßen, J. (2015). Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC_{254nm} in the photobiont of the astrobiologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. *International Journal of Astrobiology* 14, pp. 479-488
- Backhaus, T., Meeßen, J., Demets, R., de Vera, J. P., Ott, S. (2019). Characterization of viability of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in space on the international space station. *Astrobiology* 19(2), pp. 233-241
- Bačkor, M. & Fahselt, D. (2008). Lichen photobionts and metal toxicity. *Symbiosis* 46, pp. 1-10
- Barták, M., Váczi, P., Hájek, J., Smykla, J. (2007). Low-temperature limitation of primary photosynthetic processes in Antarctic lichens *Umbilicaria antarctica* and *Xanthoria elegans*. *Polar Biology* 31(1), pp. 47-51
- Bewley, J. D. & Oliver, M. J. (1992). Desiccation tolerance in vegetative plant tissues and seeds: protein synthesis in relation to desiccation and a potential role for protection and repair mechanisms. In *Water and Life*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 141-160
- Böttger, U., de Vera, J.-P., Fritz, J., Weber, I., Hübers, H.-W., Schulze-Makuch, D. (2012). Optimizing the detection of carotene in cyanobacteria in a Martian regolith analogue with a Raman spectrometer for the ExoMars mission. *Planetary and Space Science* 60, pp. 356–362
- Boiteux, L. S., Fonseca, M. E. N., Simon, P. W. (1999). Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124(1), pp. 32-38
- Brandt, A., de Vera, J. P., Onofri, S., Ott, S. (2015). Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of Space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. *International Journal of Astrobiology* 14(3), pp. 411-425
- Calvo, J. H., Zaragoza, P., & Osta, R. (2001). Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pate. *Poultry Science*, 80(4), pp. 522-524
- Danylchenko, O. & Sorochinsky, B. (2005 (5) 1). Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-B and γ-rays. *BMC Plant Biology*, pp. 1-2

- de la Torre Noetzel, R., Sancho, L. G., Pintado, A., Rettberg, P., Rabbow, E., Panitz, C., Deutschmann, U., Reina, M., Horneck, G. (2007). BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: Pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Advances in Space Research*, pp. 1665-1671
- de la Torre, R., Sancho, L. G., Horneck, G., de los Ríos, A., Wierzchos, J., Olsson-Francis, K., Cockel, C. S., Rettberg, P., Berger, T., de Vera, J. P., Ott, S., Frías, J. M., Melendi, P. G., Lucas, M. M., Reina, M., Pintado, A., Demets, R. (2010). Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions - results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208, pp. 735-748
- de Vera, J. P., Möhlmann, D., Butina, F., Lorek, A., Wernecke, R., Ott, S. (2010). Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* 18(2), pp. 215-227
- de Vera, J.-P. & Ott, S. (2010). Resistance of symbiotic eukaryotes. Survival to simulated space conditions and asteroid impact catalysms. In J. Seckbach, & M. Grube, *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 17 (pp. 595-611). Dordrecht, the Netherlands: Springer
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2004b). In the context of panspermia: may lichens serve as shuttles for their bionts in space? *Proceedings of the Third European Workshop on Astrobiology, ESA SP-545, ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, the Netherlands*, pp. 197-198
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2004a). The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Advances in Space Research* 33, pp. 1236-1243
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2003). The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* 1, pp. 285-293
- de Vera, J.-P., Rettberg, P., Ott, S. (2008). Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 38, pp. 457-468
- de Vera, J.-P., Schulze-Makuch, D., Khan, A., Lorek, A., Koncz, A., Möhlmann, D., Spohn, T. (2014). Adaptation of an Antarctic lichen to Martian niche conditions can occur within 34 days. *Planet and Space Science* 98, pp. 182-190
- Donahue, B. A., Yin, S., Taylor, J. S., Reines, D., Hanawalt, P. C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, pp. 8502-8506
- Dyer, P., Crittenden, P. (2008). Antarctic lichens: life in the freezer. *Microbiology Today* 35(2), pp. 74-77
- Fairén, A. G., Davila, A. F., Lim, D., Bramall, N., Bonaccorsi, R., Zavaleta, J., Uceda, E. R., Stocker, C., Wierzchoes, J., Dohm, J. M., Amils, R., Andersen, D., McKay, C. P. (2010). Astrobiology through the ages of Mars: the study of terrestrial analogues to understand the habitability of Mars. *Astrobiology* 10, pp. 821-843

- Feurerer, T. (2007). Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodiversity and Conservation* 16(1), pp. 85-98
- Girard, P. M., Francesconi, S., Pozzebon, M., Graindorge, D., Rochette, P., Drouin, R., Sage, E. (2011). UVA-induced damage to DNA and proteins: direct versus indirect photochemical processes. In *Journal of Physics: Conference Series* 261(1). IOP Publishing, p. 012002
- Harańczyk, H., Baciór, M., Olech, A. (2008). Deep dehydration of *Umbilicaria aprina* thalli observed by proton NMR and sorbiton isotherm. *Antarctic Science. Cambridge University Press* 20(6), pp. 527-535
- Harm, W. (1980): Biological effects of ultraviolet radiation
- Henssen, A. & Jahns, H. M. (1974). *Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Hollósy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33(2), pp. 179-197
- Honegger, R. (2003). The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biology* 5(3), pp. 324-330
- Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C. S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J. P., Fritz, J., Schade, S., Artemieva, N. A. (2008). Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8, pp. 17-44
- Huettermann, J., Koehnlein, W., & Teoule, R. (1978). Effects of ionizing radiation of DNA: physical, chemical, and biological aspects
- Kappen, L. (1985). Lichen-habitats as micro-oases in the Antarctic - the role of temperature. *Polarforschung* 55(1), pp. 49-54
- Kappen, L., Friedmann, E. I. (1983): Ecophysiology of lichens in the Dry Valleys of Southern Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology* 1, pp. 227-232
- Kappen, L., Schroeter, B., Green, T. G. A., Seppelt, R. D. (1998). Microclimatic conditions, meltwater moistening, and the distributional pattern of *Buellia frigida* on rock in a southern continental Antarctic habitat. *Polar biology* 19(2), pp. 101-106
- Keresztes, E., Kovács, Á. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plants cells. *Micron* 33(2), pp. 199-210
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash III, T. H. (2008). Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* 111(4), pp. 576-593
- Kranner, L., Cram, W. J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheimer, E., Pfeifhofer, H. W. (2005). Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(8), pp. 3141-3146
- Kuroda, S., Yano, H., Koga-Ban, Y., Tabei, Y., Takaiwa, F., Kayano, T., Tanaka, H. (1999). Identification of DNA polymorphism induced by X-ray and UV irradiation in plant cells. *Japan Agricultural Research Quarterly* 33, pp. 223-226

- Lalrotuluanga, N. & Gurusubramanian, G. (2011). Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage in mosquito larvae treated with plant extracts. *Science Vision* 11(3), pp.155-158
- Lange, O. L. & Kappen, L. (1972): Photosynthesis of lichens from Antarctica. In: *Antarctic research series*, Vol. 20 (*Antarctic terrestrial biology*), ed. Llano, A., pp. 83-95. American Geophysical Union
- Larson, D. W. (1987): The absorption and release of water by lichens. *Bibliotheca Lichenologica* 25, pp. 351-360
- Maldonado, A. P., O'Connell, D., Welch, E., Vann, R., van der Woude, M. W. (2016). Spatial dependence of DNA damage in bacteria due to low-temperature plasma application as assessed at the single cell level. *Scientific Reports* 6, pp. 1-10
- Marchant, D. R., Head, J. W., (2007). Antarc dry valleys: microclimate zonation, variable geomorphic processes, and implications for assessing climate change on Mars. *Icarus* 192, pp. 187-222
- McKay, C. P., Friedmann, E. I., Gomez-Silva, B., Caceres-Villanueva, L., Andersen, D. T., Landheim, R. (2003). Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: Four years of observations including the El Nino of 1997-1998. *Astrobiology* 3(2), pp. 393-406
- Meeßen, J., Sánchez, F. J., Brandt, A., Balzer, E., M., de la Torre, R., Sancho, L. G., de Vera, J. P., Ott, S. (2013). Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research I. morphological and anatomical characteristics. *Origin of Life and Evolution of Biospheres* 43(3), pp. 283-303
- Meeßen, J., Sánchez, F. J., Sadowsky, A., de Vera, J. P., de la Torre, R., Ott, S. (2014). Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five lichen species used in astrobiological research II. Secondary lichen compounds. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 43, pp. 501-526
- Meeßen, J., Wuthenow, P., Schille, P., Rabbow, E., de Vera, J. P., Ott, S. (2015). Resistance of the lichen *Buellia frigida* to simulated space conditions during the preflight tests for BIOMEX - Viability assay and morphological stability. *Astrobiology* 15(8), pp. 601-615
- Nawkar, G. M., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3), pp. 548-572.
- Nelson, J. R., Lawrence, C. W., Hinkle, D. C. (1996). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA-polymerase-zeta. *Science* 272, pp. 1646-1649
- Nybakken, L., Solhaug, K. A., Bilger, W., Gauslaa, Y. (2004). The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* 140(2), pp. 211-216
- Rabbow, W., Rettberg, P., Parpart, A., Panitz, C., Schulte, W., Molter, F., Jaramillo, E., Pereira, C., Weiß, P., Willnecker, R., Demets, R., Dettmann, J., Reitz, G. (2017).

- EXPOSE-R2: The Astrobiological ESA Mission on Board of the International Space Station. *Frontiers in Microbiology*, pp. 1-14
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., de la Torre, R., de los Ríos, A., Wierzechos, J., Horneck, G., Sancho, L. G. (2011). Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11, pp. 281-292
- Rastogi, R. P., Kumar, A., Tyagi, M. B., Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, pp. 1-32
- Ravanat, J. L., Douki, T., Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63(1-3), pp. 88-102
- Sadowsky, A. & Ott, S. (2012). Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis* 58(1-3), pp. 81-90
- Sánchez, F. J., Meeßen, J., Ruiz, M., Sancho, L., Ott, S., Vilchez, C., Horneck, G., Sadowsky, A., de la Torre, R. (2014). UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *International Journal of Astrobiology* 13, pp. 1-18
- Sánchez, F., Mateo-Martí, E., Raggio, J., Meeßen, J., Martínez-Frías, J., Sancho, L., Ott, S., de la Torre, R. (2012). The resistance of the lichen *Circinaria gyorsa* (nom. provis) towards simulated mars conditions - a model test for the survival capacity of a eukaryotic extremophile. *Planetary and Space Science* 72, pp. 102-110
- Sancho, L. G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Ríos, A., Pintado, A., Wierzechos, J., Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7, pp. 443-454
- Schirmack, J., Böhm, M., Brauer, C., Löhmansröben, H. G., de Vera, J. P., Möhlmann, D., Wagner, D. (2014). Laser spectroscopic real time measurements of methanogenic activity under Martian subsurface analogue conditions. *Planetary and Space Science* 98, pp. 198-204
- Schroeter, B., Green, T. G. A., Seppelt, R. D., Kappen, L. (1992): Monitoring photosynthetic activity of crustose lichen using a PAM-2000 fluorescence system. *Oecologia* 92, pp. 457-462
- Stöffler, D., Horneck, G., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C. S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J. P., Fritz, J., Artemieva, N. A. (2007). Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like Planets. *Icarus* 189, pp. 585-588
- Sun, H. J., Nienow, J. A., McKay, C. P. (2010). The antarctic cryptoendolithic microbial ecosystem. In: Doran PT, Lyons WB, McKnight DM (eds). Life in Antarctic deserts and other cold dry environments - astrobiological analogs. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 110-138

- Unal, D., Tuney, I., Esiz-Dereboyu, A., Sukatar, A. (2009). The effect of UV-A (352 nm) stress on chlorophyll fluorescence, chlorophyll a content, thickness of upper cortex and determinate DNA damage in *Physcia semipinnata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 94, pp. 71-76
- Weisling, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W. (1994): DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press
- Zahid, R. A., Sulaiman, B. K., & Abd, B. A. (2011). Molecular investigation of genetic polymorphisms in type 2 diabetic patients using random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Age*, 52, p. 56

8.3 Results of BIOMEX: Effects on growth and ultrastructure of the lichen *Buellia frigida* and its symbionts (in prep.)

Autoren: Theresa Backhaus, Joachim Meeßen, René Demets, Jean-Pierre de Vera and Sieglinde Ott

Der Artikel wurde vollständig vom Erstautor verfasst.

Results of BIOMEX: Effects on Growth and Ultrastructure of the Lichen *Buellia frigida* and its Symbionts

Theresa Backhaus¹, Joachim Meeßen¹, René Demets², Jean-Pierre de Vera³ and Sieglinde Ott¹

¹Institute of Botany, Heinrich Heine University, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

²European Space Research and Technology Centre (ESTEC), European Space Agency (ESA), Noordwijk, Netherlands

³German Aerospace Center (DLR), Institute of Planetary Research, Management and Infrastructure, Researchgroup Astrobiological Laboratories, Rutherfordstr. 2, 12489 Berlin, Germany

Abstract

Lichens are symbiotic associations formed by a mycobiont (fungus) and a photobiont (algae or cyanobacterium or both) and are known to be distributed worldwide even in harsh environments as alpine and polar regions. Due to their huge resistance potential, lichens became model organisms in astrobiological research. Samples of *Buellia frigida*, an extremotolerant endemic Antarctic lichen, were exposed to space and Martian analogue conditions as part of the international astrobiology Biology and Mars Experiment (BIOMEX) on the ISS for 1.5 years. Aim of the study presented was to establish the survival potential of the lichen to space conditions. The lichens and its symbionts post-flight viability were analyzed by cultivation assay and sporulation assay. Some of the lichen samples investigated are characterized by ability of growth and colony formation after space exposure on the ISS. Lichens anatomical and ultrastructure traits can be described as crucial factors considering the resistance potential towards extreme conditions. Transmission and scanning electron microscopy were used to determine the lichens morphology after space exposure. The main observation that was shown for all samples exposed to space or Martian analogue conditions is a loss of cell integrity, as collapsed protoplasts and deformed cell walls. The lichens post-flight viability after exposure to space and Martian analogue conditions is discussed in the context of particular protective mechanisms as morphological traits.

Keywords: astrobiology, BIOMEX, lichens, ultrastructure, morphology, cultivation

1 Introduction

Astrobiological research aims to understand the limits of life as well as the resistance potential of organism as e.g. lichens and their respective symbionts. Lichens have been studied within numerable simulation experiments with lichens originating from extreme regions (e.g. arid, alpine or polar regions) (de Vera *et al.* 2004, 2008; Hájek *et al.* 2012; Sadowsky & Ott 2012; Baqué *et al.* 2013) as well as in the real space experiment LIFE on the ISS (Brandt *et al.* 2015). Lichens colonize all biomes on Earth and often form the dominant vegetation at habitats characterized by harsh environmental conditions especially in deserts, high alpine and polar regions (Kappen *et al.* 1996; Kappen & Schroeter 1997; Kappen 2000). They are adapted to cope with extreme conditions by a broad range of anatomical, morphological and physiological adaptations (Lange & Kappen 1972; Ott & Sancho 1991; Sadowsky & Ott 2015; Meeßen *et al.* 2013a, b) and are known to show a high resistance to extreme environmental conditions (Lange & Kappen 1972; Kappen 1985; Hawksworth 1988; Lange 1990). Anhydrobiosis can be described as a relevant key factor of the lichen's ability to survive extreme conditions (Crowe *et al.* 1992; Kranner *et al.* 2008) and is a key feature considering the lichen's resistance potential to extraterrestrial conditions as well as maintaining fundamental freeze and desiccation tolerance (Kranner *et al.* 2008). In the desiccated state, no radiolysis of intracellular water can take place, which is the most significant source of hazardous reactive oxygen species (Keresztes & Kovács 2002). Anhydrobiotic organisms show a fast regeneration potential after rehydration (Kranner *et al.* 2008).

Due to the broad range of adaptation strategies, lichens became model organisms in astrobiological research by a variety of studies (e.g. de Vera *et al.* 2003, 2004, 2008, 2010; de Vera & Ott 2010; de la Torre *et al.* 2007; Sancho *et al.* 2007; Meeßen *et al.* 2013b; Sánchez *et al.* 2014). Some of these astrobiological studies focus on the analysis of the possibility of habitability of the Martian surface and its micro-niches (de Vera *et al.* 2014).

A number of studies with symbiotic lichen organisms have been carried out under simulated space conditions (e.g. desiccation, vacuum of 10^{-5} Pa, subzero temperatures, solar irradiation, cosmic irradiation and shock pressure impacts) (de Vera *et al.* 2003, 2004; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008; Sancho *et al.* 2008; de Vera & Ott 2010; Meyer *et al.* 2011). Furthermore, a number of studies had been performed under real space conditions on the ISS (e.g. LIFE experiment, Brandt *et al.* 2015, 2016; Scalzi *et al.* 2012

as well as LITHOPANSPERMIA on BIOPAN 6, de la Torre *et al.* 2010; Raggio *et al.* 2011). The temperature regime of space may not be assumed as a lethal stressor for desiccated lichen samples of especially Antarctic and polar habitats because they are adapted to freezing and temperature variations experienced by their natural habitat (Kappen 1985, 1993; Dyer & Crittenden 2008; Sadowsky & Ott 2012). Results of these studies demonstrated a high resistance potential for different lichen species towards extreme conditions. The potential of the extremotolerant endemic Antarctic lichen *Buellia frigida* to survive exposure towards space and Martian conditions was analyzed in the study presented. Samples of the lichen *Buellia frigida* were exposed to space and Martian analogue conditions (atmosphere and radiation) as part of the international astrobiological Biology and Mars Experiment (BIOMEX) on the ISS for 1.5 years (Rabbow *et al.* 2017). BIOMEX is the second long-time (>12 months) experiment on board the ISS that exposed lichens to low earth orbit (LEO) conditions of space.

The study presented focuses on two aspects to assess the potential of the lichen's survivability. First, the ability of the lichen symbionts for reproduction, growth and colony formation was tested, which may be described as a "gold standard" to assess the survival potential of lichens after space exposure. Cultivation assays of the isolated symbionts can be performed by a standardized method. In a second part, the study focused on alterations considering the morphology and ultrastructure of the lichen *Buellia frigida* after space exposure. As all lichens, *Buellia frigida* is formed by two organisms: a heterotrophic mycobiont (fungi) and a photoautotrophic photobiont which is a eukaryotic green alga and/or a cyanobacterium (Henssen & Jahns 1973). Lichens are adapted to different environments by variations of morphological and anatomical traits (Jahns 1988; Büdel & Scheidegger 1996). These adaptive traits effect the lichen's resistance by influencing physiological processes (e.g. photosynthesis or nutrient uptake) or water uptake and retention (Lange *et al.* 2001). Morphological and anatomical characteristics can be described as crucial factors on the extremotolerance of the lichen symbiotic organism (Meeßen *et al.* 2013b). Damages of the ultrastructure of the respective symbionts may influence the lichen's resistance and survival potential fundamentally.

The aim of the study presented is to test the ability of growth and colony formation of the lichen symbionts as well as to give insights into the post-flight morphology and anatomy of the entire lichen *Buellia frigida* and the ultrastructure of its symbionts after LEO-exposure including Martian analogue conditions on the ISS.

2 Material and Methods

The lichen Buellia frigida

Samples of the lichen *Buellia frigida* Darb (1910) were collected in Antarctica, North Victoria Land (74°38'S 164°13'E) during the Antarctic summer season in 2009/2010. The lichen is an endemic black colored crustose species colonizing exposed rock surfaces largely across continental Antarctica. The photobiont genus of this lichen is *Trebouxia* sp. (clade A, /OTU A02 (Sadowsky & Ott 2012, Determeyer-Wiedmann *et al.* 2018). The lichen samples have been collected dry, air-dried transported at -20°C and stored at -20°C until further preparation.

Sample preparation

Three different sample setups of the lichen *Buellia frigida* were prepared for the BIOMEX project: 1) Rock fragments overgrown by the lichen have been drilled out of a diameter of 12mm. 2) Artificial phyllosilicatic Martian substrate powder has been pressed for 10-15min by a pressure of 5 to 7t into pellets of a diameter of 12mm (named P-Mars, the composition is described in detail in Böttger *et al.* 2012). 3) Another artificial but sulfatic Martian substrate has been pressed into pellets by the procedure mentioned above (named S-Mars, composition is described in detail in Böttger *et al.* 2012). Between 15 to 20 thallus fragments (2-3mm²) of *Buellia frigida* have been fixed on each of the prepared P- and S-Mars pellets (with RTV-S 691 silicone rubber, WACKER, admitted for aerospace applications by European Space Research and - technology Centre ESTEC). The two different Mars regolith compositions are similar to two different Martian epochs: a hydrothermal epoch (P-Mars, 3.95 to 3.7 billion years ago) and a semi-arid epoch (S-Mars, 3.7 to 2.9 billion years ago) (Böttger *et al.* 2012; de Vera *et al.* 2014; Schirmack *et al.* 2014).

During the BIOMEX project lichen samples were in an anhydrobiotic state. The prepared sample setups (rock, P-Mars, S-Mars) have been sent to DLR (Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt) in Cologne and integrated into different trays which later were installed into the EXPOSE-R2 facility on the ISS. After return from the ISS the samples have been stored at -80°C until further investigations. For comparison, a fresh control of *Buellia frigida* originating from the same collection as the BIOMEX samples was prepared for analysis.

Exposure conditions

Samples of the lichen *Buellia frigida* were exposed to space and Martian conditions in the EXPOSE-R2 facility outside the Svezda module at the ISS. Thallus fragments were prepared on rock samples, P-Mars pellets and S-Mars pellets as already described above. Rock samples were directly exposed to space conditions at LEO vacuum (10^{-4} to 10^{-7} Pa). Trays including P- and S-Mars samples were hermetically evacuated, closed and flooded with Martian atmosphere (composition: 95.55% CO₂, 2.70% N₂, 1.60% Ar, 0.15% O₂, ~ 370 ppm H₂O, Praxair Deutschland GmbH) with a pressure of 980 Pa.

The EXPOSE-R2 facility is divided into two layers: a top and a bottom layer. Samples of the top layer were directly exposed to space during the whole experiment. The bottom layer is located beneath the top layer and thereby protected by the upper layer. EXPOSE-R2 includes sensors that measure environmental parameter at the outside of the ISS. The accumulated radiation doses of the top layer were calculated by RedShift Company. Full insolation accumulated to an average of approximately 6170MJ/m, UV-A radiation to ca. 322MJ/m² for the different samples. UV-B radiation accumulated to approximately 59MJ/m² for every sample and UV-C radiation to ca. 23MJ/m². Photosynthetic active radiation ranged to an average of about 2800 MJ/m² for all samples of the top layer (see Rabbow *et al.* 2017). Depending on the solar activity, all BIOMEX samples experienced galactic cosmic rays between 68 and 82μGy per day. Ionizing radiation doses range between 340 and 844μGy per day at the inner Radiation Belt (South Atlantic Anomaly protons). At the outer Radiation Belt, radiation doses reach values up to 2960μGy per day (electrons) (Rabbow *et al.* 2017).

All samples of the top and bottom layer were influenced by temperature cycling several times per day. Maximum temperature of 57.98°C as well as minimum temperature of -20.9 °C were measured inside the EXPOSE-R2 facility. Temperatures far below -20°C were determined by a heating system to keep electronics running (Rabbow *et al.* 2017).

Scanning Electron Microscopy

The morphology of the BIOMEX lichen fragments (top and bottom layer of rock, P-Mars and S-Mars samples) after return from the ISS as well as of an air-dried fresh control was investigated by scanning electron microscopy (SEM). Caused by the tiny size of the BIOMEX samples, only one fragment of every experimental setup was prepared. For SEM analysis, thallus fragments of fresh control and rock samples (both top and bottom layer)

were removed from the rocks and investigated by SEM. Before, prepared lichen fragments were sliced into small pieces of a thickness of 120µm by cryotome (Reichert-Jung, Germany), fixed on specialized sample holder and stored under evacuated conditions for 24 hours before being sputtered with a thin gold layer. The surface of the lichen samples was analyzed by SEM (LEO1430VP, LEO Electron Microscopy Ltd.). This kind of analysis is an established method for the characterization of lichen's morphology (e.g. Honegger 1986; Brown *et al.* 1987) and has already been used for lichen samples after being exposed to space conditions (Sancho *et al.* 2007; Raggio *et al.* 2011).

Transmission Electron Microscopy

One thallus fragment of each experimental setup (top and bottom layer of rock, P- and S-Mars) as well as an air-dried fresh control were fixed in 2.5% glutaraldehyde (in 200mM cacodylate-buffer) and contrasted in 4% OsO₄ (in 0.8% potassium ferrocyanide). Subsequently, the samples were embedded in Epon812 resin following the manufacturer's protocol. Ultrathin cross-sections of 100nm were examined by a Zeiss E902 Transmission Electron Microscope (TEM). The degree of ultrastructural damage as e.g. collapsed protoplasts and deformed cell walls was performed manually.

Cultivation assay

By the cultivation assay the viability as well as the ability of growth and colony formation of the respective symbionts of the lichen *Buellia frigida* after space exposure for 1.5 years has been tested. Before isolating the symbionts for cultivation, thallus fragments of the space exposed lichen samples have been transferred in daily cycles (24h) from -80°C to -20°C, from -20°C to 4°C and from 4°C to 8°C to minimize temperature stress. Cell clusters of the lichen's photobiont (PB) and hyphal cells of the mycobiont (MB) were isolated separately from thallus sections according to the method of Yoshimura *et al.* (2002). Between 9 and 23 PB cell clusters were isolated for every experimental setup (top and bottom layer of rock, P-Mars and S-Mars) and have been cultivated on *Trebouxia* Organic Medium (TOM, according to Ahmadjian, 1967) and on BGII medium agar plates. For the cultivation assay of the MB between 9 and 16 fungal mycelia have been isolated and cultivated on malt-yeast (MY) medium (Ahmadjian 1961) agar plates. The axenic cultures were kept at low light intensity (20µmol photons m⁻² s⁻¹ with diurnal cycles of 10h of darkness) and 8°C in a growth chamber (Rubarth Apparate GmbH,

Germany) for about three months. Cultures were checked regularly to assess colony formation and growth of the lichen's symbionts.

Sporulation assay

Sporulation assay was performed to test whether the spores formed in the apothecia can be distributed and are still able to germinate what will be a clear indication for viability after space exposure. At the natural habitat *Buellia frigida* forms high numbers of apothecia where the spores get developed for distribution (Kappen 1997).

Depending on the number of apothecia on the BIOMEX samples, between 3 and 11 fruiting bodies have been isolated from thallus fragments for each experimental setup (top and bottom layer of rock, P- and S-Mars). For the fresh control 10 apothecia have been prepared. The isolated apothecia of the different samples have been fixed on the lid of petri dishes (with Terostat-IX, Teroson) that were filled with BGII medium. For recognition of spores petri dishes were checked daily for 4 weeks.

For a second sporulation experiment, one apothecium of every experimental setup (rock, P- and S-Mars of top and bottom layer) and one apothecium of the fresh control were carefully crushed between two microscope slides. Single spores have been carefully isolated and placed on MY medium. Germination of spores was examined daily for 4 weeks.

3 Results

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was performed to analyze the morphological state of the BIOMEX lichen fragments. The crustose lichen *Buellia frigida* consists of numerous small units (areolae) and placoid lobes formed by both symbionts, photobiont and mycobiont. The black cortex is well developed by gelatinized hyphae. The medulla is characterized by internal air spaces that are necessary for the gas exchange of algal cells (Sojo *et al.* 2003).

The upper cortical layer of the fresh control is characterized by a few small fissures (Fig. 1a) caused by the naturally occurring desiccation process. The mycobiont cells form a coherent pseudotissue, called plectenchyma. In contrast to the fresh control the samples exposed to space/Martian condition of the top as well as bottom layer demonstrate an impaired surface of the upper cortical layer by a high number of fissures (Fig. 1b-f).

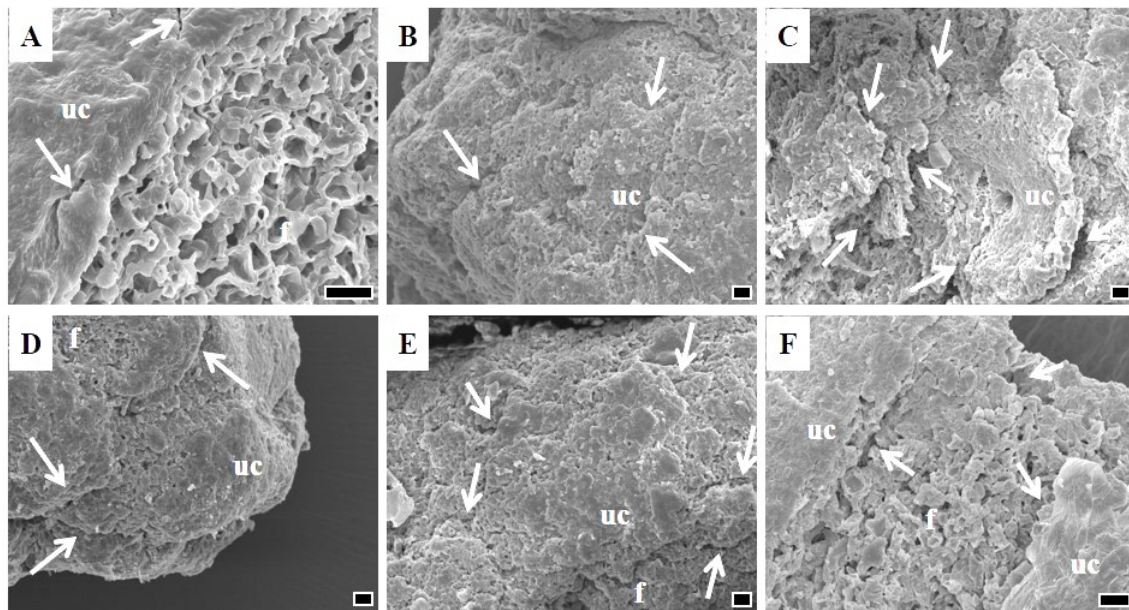


Fig. 1 SEM images of *Buellia frigida* samples of a) air dried fresh control and of space exposed samples b) P-Mars top, c) S-Mars top, d) rock top, e) P-Mars bottom, f) S-Mars bottom. Fresh control with appearance of fissures induced by desiccation occurring naturally (marked by arrows). b-f) Exposed samples with impairment of upper cortex and a higher number of fissures (arrows). Abbreviations: uc- upper cortex, f-fungal cells. Scale bars indicate 10 µm.

Transmission Electron Microscopy

Transmission electron microscopy was performed to analyze ultrastructural damage in photobiont and mycobiont cells after being exposed to space and Martian analogue conditions. P- and S-Mars samples were difficult to prepare by ultrathin cross-sections because of the loss of tissue structure by cell damage (Fig. 2b, c). Photobiont cells of the fresh control are formed by a well developed central protoplast containing a central pyrenoid. The protoplasts of *Trebouxia* spec. are characterized by a small lobed structure (see Fig. 2a). About 33% of the photobiont cells of the fresh control investigated are characterized by ultrastructural damage (30.0 ± 37.6 (SD) % collapsed protoplasts and 0.28 ± 0.03 (SD) % deformed cell walls, Fig. 2, Fig. 3). The percentage of ultrastructural damage of photobiont cells of the exposed samples (top and bottom layer of rock, P- and S-Mars samples) is significantly higher compared to the fresh control (Fig. 3).

Fundamental changes have been detected of the ultrastructure of the bionts of the BIOMEX samples. Considering the PB the cell damage of 97.9% could be confirmed for the top layer of the S-Mars samples (69.5 ± 22.9 (SD) % collapsed protoplasts and 28.4 ± 22.6 (SD) % deformed cell walls). Photobiont damage of the top layer of rock and P-Mars samples shows no significant difference (83.1% rock top, 80.7% P-Mars top,

student's t-test, $P > 0.05$). The photobiont cells of the bottom layer of the rock sample were damaged by 74.0% (71.2 ± 15.1 (SD) % collapsed protoplasts and 2.8 ± 7.7 (SD) % deformed cell walls). The damage detected on the ultrastructure of photobionts of P-Mars and S-Mars samples of the bottom layer shows no significant difference (91.3 % P-Mars bottom, 91.5 % S-Mars bottom, student's t-test, $P > 0.05$)

For the fresh control an ultrastructural damage of 2.2 % of mycobiont cells have been detected by TEM analysis (1.1 ± 1.5 (SD) % collapsed protoplasts and 1.1 ± 1.9 (SD) % deformed cell walls). The mycobiont cells of the rock sample of the bottom layer showed ultrastructural damage of 4.2 % (4.2 % damaged cells, 3.4 ± 2.8 (SD) % collapsed protoplasts and 0.8 ± 1.3 (SD) % deformed cell walls) not differing significantly from the fresh control (student's t-test, $P > 0.05$). For the rock samples of the top layer a higher value of 6.3 % damaged cells could be detected (5.6 ± 3.5 (SD) % collapsed protoplasts and 0.7 ± 1.8 (SD) % deformed cell walls). The damage on ultrastructure of mycobiont cells of the exposed sample setups of top and bottom layer of P- and S-Mars samples does not differ significantly from each other (student's t-test) but is significantly higher compared to the fresh control. The highest intensity of ultrastructural damage of mycobiont cells of 38.5% has been detected for the top layer of the P-Mars sample (24.1 ± 10.1 (SD) % collapsed protoplasts and 14.4 ± 12.0 (SD) % deformed cell walls).

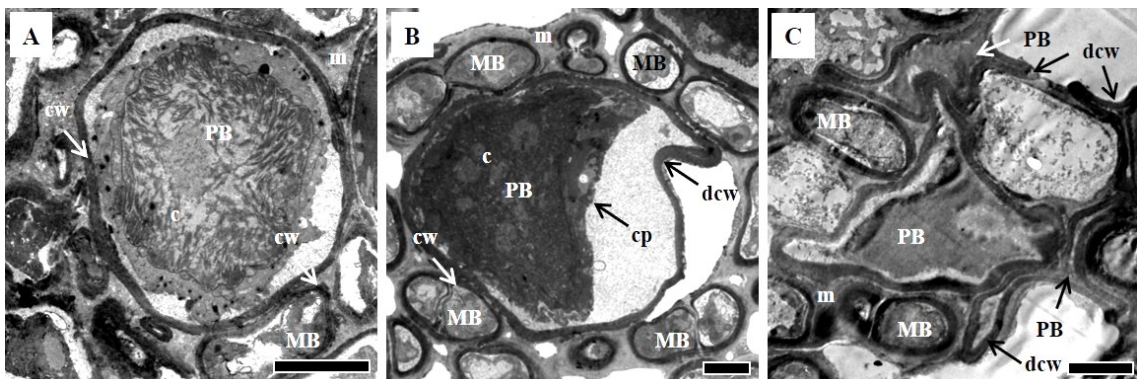
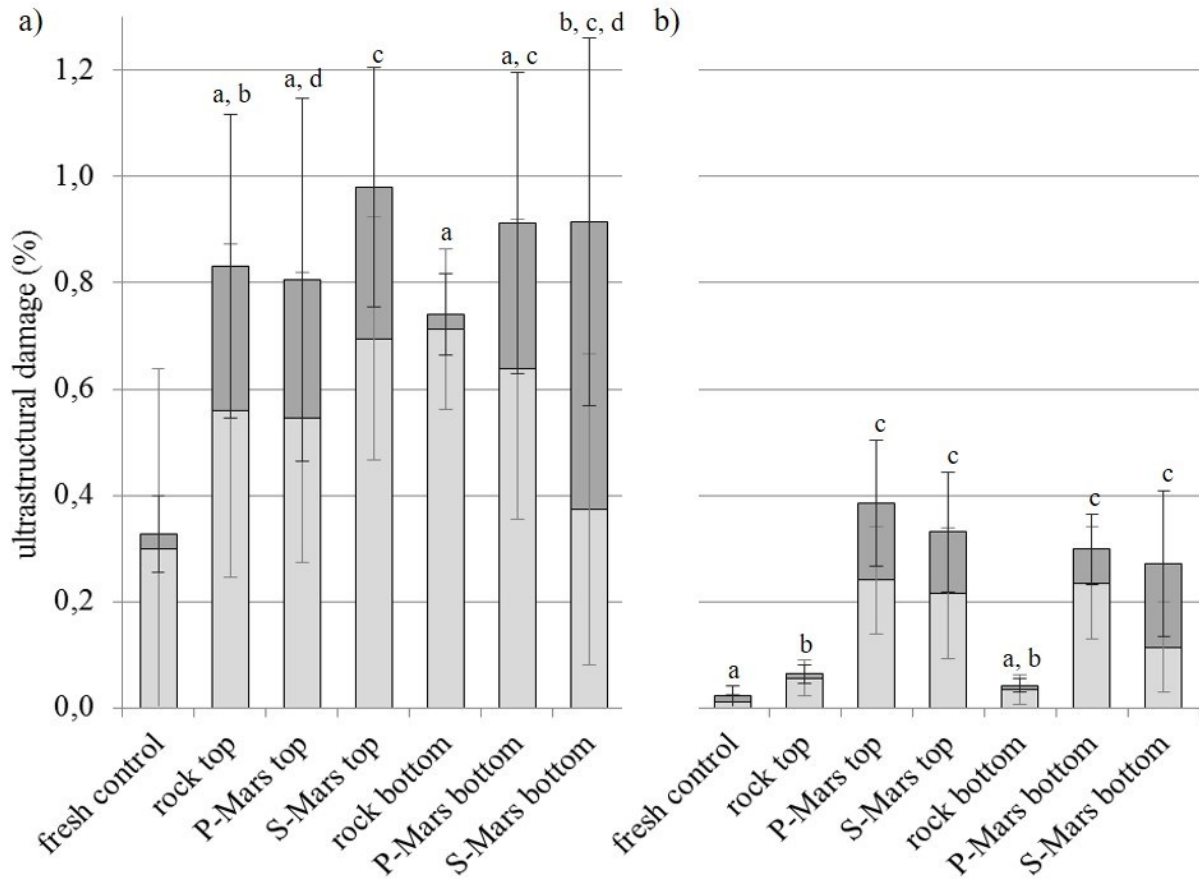


Fig. 2 TEM images of the photobiont of *Buellia frigida* a) fresh control, b) P-Mars bottom layer, c) S-Mars bottom layer. a) Fresh control with typical photobiont and mycobiont cells, b-d) photo- and mycobiont cells show damages of the ultrastructure. Abbreviations: pb-photobiont, mb-mycobiont, cw-cell wall, c-chloroplast, m-mucilage, cp-collapsed protoplast. Scale bars indicate 2.5 μm .

Fig. 3 Percentage of ultrastructural damages as collapsed protoplasts (light grey) and deformed cell walls (dark grey) calculated by TEM analysis. a) Shows values determined for the photobiont cells, b) for the mycobiont cells of *Buellia frigida*. Values are presented for fresh control and for samples being exposed to space/Martian analogue conditions on the ISS for 1.5 years.



Cultivation assay

Cultivation assay was performed to test the viability of the lichen symbionts. The experiments of the fresh control showed high ability of growth and colony formation within the cultivation assay for both PB and MB. After two weeks of cultivation, growth of the mycobiont hyphae could be observed. After eight weeks, five out of 16 prepared bundles of hyphae formed a well developed fungus mycelium (31%, Table 1). 100% (23 out of 23) of the PB clusters of the fresh control prepared have grown and developed cell colonies after one week of cultivation. PB cells of the top and bottom layer of the rock sample setup displayed a time delay of growth of 3 weeks. 22 out of 25 prepared PB clusters have formed cell colonies for each experimental layer (88%, Table 1). MB growth could not be detected for the rock samples. For the P- and S-Mars lichen samples of the top or bottom layer, no growth or colony formation of both bionts could be detected within three months cultivation assay.

Table 1 Percentage of grown algal and fungal clusters after space exposure on the ISS

	control	top			bottom		
		rock	P-Mars	S-Mars	rock	P-Mars	S-Mars
Photobiont	100%	88%	0%	0%	88%	0%	0%
Mycobiont	31%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Grown clusters in percentage, refer to the total number of prepared lichen fragments. Control: freshly isolated PB and MB cells from frozen unirradiated *Buellia frigida* thalli

Sporulation assay

Sporulation assay performed with five apothecia of the fresh control on MY medium has been successful (distributed spores after one day). Germination of the spores could be observed within ten days. Separated and isolated spores of the fresh control that have been cultured on BGII medium were germinating after ten days, too. Sporulation tests failed for all samples exposed to space and Martian analogue conditions on the ISS as part of the BIOMEX project. None of the apothecia tested of these sample setups were able to distribute spores. Germination of the spores isolated by crushing preparation of apothecia of the space/Martian analogue conditions exposed samples could not be observed.

4 Discussion

Previous studies of *Buellia frigida* demonstrated a high resistance and survival potential after exposure towards simulated space and Martian analogue conditions (de Vera & Ott 2010; Meeßen *et al.* 2013b, 2014, 2015; Backhaus *et al.* 2015). The study presented focused on the post-flight viability on reproduction, growth and germination capacity as well as on anatomical and morphological traits of the entire lichen and the respective bionts. Survival capacity of lichens after space exposure is important regarding the search for biosignatures, planetary protection and speculations of life being dispersed from one planet to another.

Analysis of the morphological structure of the symbionts of the exposed lichen samples by scanning electron microscopy (SEM) displayed a strongly impaired surface of the upper cortical layer compared to the control sample. Small fissures in the upper cortex of lichens occur usually caused by the repeated terrestrial desiccation induced processes in the fresh control (Honegger *et al.* 1996; Honegger 2003, de los Ríos *et al.* 2004, 2010;

Brown *et al.* 1987). The anatomical structure of the upper cortex (approximate thickness 12µm) crucially contributes to the lichen's resistance potential. Protection of the PB cells is considered to be the main function of the cortex (Ertl, 1951; Jahns 1988; Kappen, 1988) supported by the secondary metabolite melanin in the lichen *B. frigida*. An intact surface structure of lichens provides a shielding effect of the symbionts against e.g. UV-C radiation, which is able to penetrate organic matter only 35-40µm deep (Jasinghe & Perera, 2005). The BIOMEX samples show a number of strong fissures and deformation of the upper cortex. Stronger fissures of exposed thallus fragments may be explained by the extreme desiccation by vacuum and very low pressure conditions, respectively. The damage of the upper cortex by substantial fissures of the exposed lichen samples may lead to an increased accumulation of radiation doses into the inner parts of the thallus affecting the algal layer and may induce damages of the photobiont as well as the mycobiont cells present in this layer.

Analysis of ultrastructural characteristics of the bionts of the lichen samples exposed to space/Martian analogue conditions by transmission electron microscopy (TEM) showed a number of damages of the photobiont as well as mycobiont cells. Collapsed protoplasts and deformed cell walls have been observed for both symbionts of the exposed lichen samples. It appeared more frequent for the photobiont cells than for the mycobiont cells because photobionts are the more sensitive partner of the lichen symbiosis (Kinraide & Ahmadjian, 1970; Ahmadjian, 1993). Photobiont cells of lichens are known to collapse temporarily upon terrestrial dehydration (Brown *et al.* 1987, Honegger *et al.* 1996, de los Ríos *et al.* 2004) and to recover their shape after rehydration (Honegger *et al.* 1996, 2003). It may be supposed that a high percentage of collapsed cells have been generated due to excessive desiccation by vacuum or low pressure (980Pa, Martian conditions). Horneck *et al.* (2010) assumed vacuum desiccation may be the main stressor affecting biological samples that are exposed to space. It may be postulated that P- and S-Mars lichen samples exposed to space under Martian pressure of 980Pa are less affected compared to the rock samples exposed to space vacuum. This protective effect could not be proofed by the study presented.

The cultivation assay was performed to test the symbiont's ability of growth and colony formation after the exposition in space. Studies demonstrated that lichens and their symbionts may lose their viability after 6 years of dry storage but frozen PB keep their viability up to 9 years (Honegger *et al.* 1996; Honegger, 2003). Cultivation assay of fresh

control (stored for 8 years in a frozen state) successfully proofed viability, reproduction and the ability of growth of the lichen samples used for the BIOMEX experiment.

Cultivation assay performed by the BIOMEX samples demonstrated strongly impaired viability of the symbionts by all conditions tested (top and bottom layer of rock samples under LEO space conditions as well as P- and S-Mars samples under Martian conditions). The highest survival rate of the symbionts of the lichen samples being exposed to space conditions on their original rock substrate was already observed in simulation experiments by Meeßen *et al.* (2015). The viability of PB cells of the BIOMEX rock samples was reduced and delayed compared to the fresh control. A delayed regeneration potential was already shown for lichen samples being stored in a dry or frozen state for several weeks (Kranner *et al.* 2003; Gasulla *et al.* 2009; Backhaus *et al.* 2015) and is caused by repair- and regeneration processes (Kranner *et al.* 2008; Gasulla *et al.* 2009). A limited survival potential for the PB cells of the rock samples can be postulated for the lichen investigated.

As mentioned before, it could be hypothesized that the martian analogue samples were less affected. The lichen fragments of the Mars samples displayed no reproduction, growth or colony formation. This may be explained by an unknown long time toxicity of the artificial P- and S-Mars substrates possibly caused by space radiation (Backhaus *et al.* 2019). A potentially habitability of early Mars may not be estimated by the results obtained in this study. Even if organisms may survive under space or Martian conditions, there is no proof they can flourish on Mars (Joseph *et al.* 2019).

The sporulation assay carried out focuses on the viability and germination capacity of the ascospores of the mycobiont embedded in fruiting bodies. Ascospores of apothecia of the fresh control got distributed onto the MY medium after one day, germinated and subsequently formed mycelia after 10 days. This is a relevant process characteristic for lichen species reproducing sexually. Although apothecia of the lichen samples exposed to space or Martian analogue conditions encompassed ascospores, none of these spores could be distributed.

The LIFE experiment was the first long-time space experiment carried out outside of the ISS for 1.5 years. Within this experiment, lichen samples of the species *Xanthoria elegans* were exposed to space and Martian analogue conditions. Analysis of ultrastructural damage that may be caused by space conditions also was performed by transmission

electron microscopy. Results showed 85% collapsed protoplasts and 79% deformed cell walls for the space exposed photobiont of *Xanthoria elegans* (Brandt *et al.* 2015) whereas lichen samples exposed to Martian atmosphere showed minor damage of the photobiont cells (51% collapsed protoplasts and 35% deformed cell walls). Additionally, the cultivation assay was successfully performed of the two bionts of the LIFE samples investigated. Considering the LIFE experiment, a protective effect of the Martian analogue conditions could be determined because the ultrastructure of the photo- and mycobiont cells of the lichen *X. elegans* was less damaged (Brandt *et al.* 2015). Furthermore, every lichen sample of the LIFE experiment showed ability to reproduction, growth and colony formation.

Conclusions

The current study demonstrates the survival capacity of the lichen *Buellia frigida* and its symbionts after 1.5 years exposure to space and Martian analogue conditions. Ultrastructural damages which are putatively caused by space exposure have been shown by SEM and REM analysis. Cultivation assay proofed the ability of photobionts of the rock samples to reproduction, growth and colony formation of cells after exposition to space conditions on the ISS. The ultrastructure damages of the bionts of thallus fragments affected by real space conditions (including the rock samples) indicate a minor resistance potential towards space conditions of the low earth orbit of lichen *Buellia frigida* despite of the successfully performed cultivation assay. *Xanthoria elegans*, as a cosmopolitan lichen, demonstrated a higher resistance as well as survival potential in the LIFE project (Brandt *et al.* 2015). It can be postulated that the Antarctic endemic lichen *Buellia frigida* developed adaptation mechanisms restricted to the environmental conditions of the respective habitat in this region. Subsequently, the life strategies to resist to a broader range of environmental conditions might be limited compared to *Xanthoria elegans*.

5 Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to the German Federal Ministry of Economics and Technology for funding of the project (BMWi, 50WB1153) for support by ESA during the BIOMEX experimental phase (ESA-ILSRA 2009-0834) and DLR for the DLR-FuW-Project BIOMEX (2474128). We particularly acknowledge also ESA for covering the costs of launch of the samples, transfer to the International Space Station (ISS), operations of the astronauts during EVA and retrieval from the ISS with transfer

back to Earth. Special thanks to Rene Demets for providing the RedShift data and to the anonymous reviewers for their comments. The results are included in the doctoral thesis of Theresa Backhaus.

6 References

- Ahmadjian, V. (1993). The lichen symbiosis. *New York: Wiley*
- Ahmadjian, V. (1967). A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia* 6(2), 127-160
- Ahmadjian, V. (1961). Studies on lichenized fungi. *The Bryologist* 62(2-3), 168-179
- Backhaus, T. de la Torre, R. Lyhme, K. de Vera, J.-P. Meeßen, J. (2015). Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC_{254nm} in the photobiont of the astrobiologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. *International Journal of Astrobiology* 14, 479-488
- Backhaus, T. Meeßen, J. Demets, R. de Vera, J. P. Ott, S. (2019). Characterisation of viability of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in Space on the International Space Station. *Astrobiology* 19(2), 233-241
- Baqué, M. S. (2013). Biofilm and planktonic lifestyles differently support the resistance of the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under space and Martian simulations. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 43(4-5), 377-389
- Böttger, U. de Vera, J. P. Fritz, J. Weber, I. Hübers, H.-W. Schulze-Makuch, D. (2012). Optimizing the detection of carotene in cyanobacteria in a Martian regolith analogue with a Raman spectrometer for the Exo Mars mission. *Planetary and Space Science* 60, 356-362
- Brandt, A. de Vera, J. P. Onofri, S. Ott, S. (2015). Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated mars conditions on the ISS. *International Journal of Astrobiology* 14(3), 411-425
- Brandt, A. Posthoff, E. de Vera, J. P. Onofri, S. Ott, S. (2016). Characterisation of growth and ultrastructural effects of the *Xanthoria elegans* photobiont after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. *Origin of life and evolution of biospheres* 46, 311-321
- Brown, D. H. Ascaso, C. Rapsch, S. (1987). Ultrastructural changes in the pyrenoid of the lichen *Parmelia sulcata* stored under controlled conditions. *Protoplasma* 136(2), 136-144
- Büdel, B. Scheidegger, C. (1996). Thallus morphology and anatomy. Nash TH III (ed) *Lichen biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 37-64
- Crowe, J. H. Hoekstra, F. A. Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54(1), 579-599
- de la Torre, R. Sancho, L. G. Horneck, G. de los Ríos, A. Wierzchos, J. Olsson-Francis, K. Cockel, C. S. Rettberg, P. Berger, T. de Vera, J. P. Ott, S. Frías, J. M. Melendi,

- P. G. Lucas, M. M. Reina, M. Pintado, A. Demets, R. (2010). Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions - results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208, 735-748
- de la Torre Noetzel, R. Sancho, L. G. Pintado, A. Rettberg, P. Rabbow, E. Panitz, C. Deutschmann, U. Reina, M. Horneck, G. (2007). BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: Pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Advances in Space Research*, 1665-1671
- de los Ríos, A. Ascaso, C. Wierzechos, J. (2010). Study of lichens with different state of hydration by the combination of low temperature scanning electron and confocal laser scanning microscopies. *International Microscopy* 2(4), 251-257
- de los Ríos, A. Wierzechos, J. Sancho, L. G. Ascaso, C. (2004). Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 50(3), 143-152
- de Vera, J.-P. Horneck, G. Rettberg, P. Ott, S. (2004). The potential of lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Advances in Space Research* 33, 1236-1243
- de Vera, J.-P. Horneck, G. Rettberg, P. Ott, S. (2003). The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* 1, 285-293
- de Vera, J. P. Möhlmann, D. Butina, F. Lorek, A. Wernecke, R. Ott, S. (2010). Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* 18(2), 215-227
- de Vera, J. P. Ott, S. (2010). Resistance of symbiotic eukaryotes. Survival to simulated space conditions and asteroid impact catalysms. In J. Seckbach, & M. Grube, *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 17 (pp. 595-611). Dordrecht, the Netherlands: Springer
- de Vera, J.-P. Rettberg, P. Ott, S. (2008). Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 38, 457-468
- de Vera, J.-P. Schulze-Makuch, D. Khan, A. Lorek, A. Koncz, A. Möhlmann, D. Spohn, T. (2014). Adaptation of an Antarctic lichen to martian niche conditions can occur within 34 days. *Planet and Space Science* 98, pp. 182-190
- Determeyer-Wiedmann, N., Sadowsky, A., Convey, P., Ott, S. (2019). Physiological life history strategies of photobionts of lichen species from Antarctic and moderate European habitats in response to stressful conditions. *Polar Biology*, 42(2), 395-405
- Dyer, P. Crittenden, P. (2008). Antarctic lichens: life in the freezer. *Microbiology Today* 35(2), 74

- Ertl, L. (1951). Über die Lichtverhältnisse in Laubflechten. *Planta* 39, 245-270
- Gasulla, F. de Nova, P. G. Esteban-Carrasco, A. Zapata, J. M. Barreno, E. Guéra, A. (2009). Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichenic algae *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231(1) , 195-208
- Hájek, J. Váczi, P. Barták, M. Jahnová, L. (2012). Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology* 64(3), 215-222
- Hawksworth, D. L. (1988). The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society* 96(1), 3-20
- Henssen, A. Jahns, H. M. (1974). Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde. Georg Thieme, Stuttgart
- Honegger, R. (2003). The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biology* 5(3), 324-330
- Honegger, R. (1986). Ultrastructural studies in lichens. *New phytologist* 103(4), 797-808
- Honegger, R. Peter, M. Scherrer, S. (1996). Drought-induced structural alterations at the mycobiont-photobiont interface in a range of foliose macrolichens. *Protoplasma* 190(3), 221-232
- Horneck, G. Klaus, D. M. Mancinelli, R. L. (2010). Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(1), 121-156
- Horneck, G. Stöffler, D. Ott, S. Hornemann, U. Cockell, C. S. Moeller, R. Meyer, C. de Vera, J. P. Fritz, J. Schade, S. (2008). Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8, 17-44
- Jahns, H. M. (1988). The lichen thallus. Galun M (ed) CRC handbook of lichenology. Vol I. CRC Press, BOCA Ranton, 95-143
- Jasinghe, V. J. Perera, C. O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D 2 by UV irradiation. *Food chemistry* 92(3), 541-546
- Joseph, R. G., Dass, R. S., Rizzo, V., Cantasano, N., Bianciardi, G. (2019). Evidence of life on Mars? *Journal of Astrobiology and space science reviews* (1), 40-81
- Kappen, L. (2000). Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science* 12(3), 314-324
- Kappen, L. (1997). Flechten in der Antarktis. In H. Schöller, *Flechten. Geschichte, Biologie, Systematik, Ökologie, Naturschutz und kulturelle Bedeutung* (pp. 149-156). Kleine Senckenberg-Reihe 27
- KappenET AL!!!! (1996). Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0°C. *Advances in Space Research* 18(12), 119-128

- Kappen, L. (1993). Plant activity under snow and ice, with particular reference to lichens. *Arctic* 46(4), 297-302
- Kappen, L. (1988). Ecophysiological relationships in different climatic regions. Galun M (ed) CRC handbook of lichenology, Vol II. CRC Press, Boca Ranton, 37-99
- Kappen, L. (1985). Lichen-habitats as micro-oases in the Antarctic - the role of temperature. *Polarforschung* 55(1), 49-54
- Kappen, L. S. Schroeter, B. (1997). Activity of lichens under the influence of snow and ice. *Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Biology*, 163-168
- Keresztes, E. Kovács, Á. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron* 33, 199-210
- Kinraide, W. T. Ahmadjian, V. (1970). The effects of usnic acid on the physiology of two cultured species of the lichen alga *Trebouxia* Puym. *Lichenologist* 4, 234-247
- Kranner, I. , Zorn, M. Turk, B. Wornik, S. Beckett, R. P. Batic, F. (2003). Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance. *New Phytologist* 160(1), 167-176
- Kranner, L. Beckett, R. Hochman, A. H. Nash III, T. (2008). Desiccation-tolerance in lichens: a review. *Bryologist* 111(4), 576-593
- Lange, O. L. (1990). Twenty-three years of growth measurements on the crustose lichen *Caloplaca aurantia* in the central Negev Desert. *Israel Journal of Botany* 39(4-6), 383-394
- Lange, O. L. Green, T. G. A. Heber, U. (2001). Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance. *Journal of Experimental Botany*, Special Issue: Plants under Stress 52(363), 2033-2042
- Lange, O. L. Kappen, L. (1972). Photosynthesis of lichens from Antarctica. In A. Llano, *Antarctic terrestrial biology* (pp. 83-95). American eophysical Union
- Meeßen, J. Backhaus, T. Sadowsky, A. Mrkali, M. Sánchez, F. J. de la Torre, R. Ott, S. (2014). Effects of UVC_{254nm} on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. *International Journal of Astrobiology* 13(4), 340-352
- Meeßen, J. Eppenstein, S. Ott, S. (2013a). Recognition mechanisms during the pre-contact state of lichens: II. Influence of algal exudates and ribitol on the response of the mycobiont of *Fulgensia bracteata*. *Symbiosis* 59(3), 131-143
- Meeßen, J. Sánchez, F. J. Brandt, A. Balzer, E. M. de la Torre, R. Sancho, L. G. de Vera, J. P. Ott, S. (2013b). Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research. I. Morphological and anatomical characteristics. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 43, 283-303
- Meeßen, J. Wuthenow, P. Schille, P. Rabbow, E. de Vera, J. P. Ott, S. (2015). Resistance of the lichen *Buellia frigida* to simulated Space conditions during the preflight

- tests for BIOMEX - viability assay and morphological stability. *Astrobiology* 15(8), 601-615
- Meyer, C. Fritz, J. Misgaiski, M. Stoeffler, D. Artemieva, N. A. Hornemann, U. Moeller, R. de Vera, J. P. Cockel, C. S. Horneck, G. Ott, S. Rabbow, E. (2011). Shock experiments in support of the Lithopanspermia theory: the influence of host rock composition, temperature, and shock pressure on the survival rate of endolithic and epilithic microorganisms. *Meteoritics and Planetary Science* 46(5), 701-718
- Ott, S. Sancho, L. G. (1991). Structure and adaptation of lichens to extreme environmental conditions in the maritime Antarctic (Livingston Island, South Shetland Island). In J. Castellvi, *Actas del cuarto simposio espanol de estudios antarcticos* (pp. 251-256). Madrid: Comision Interministerial de ciencia y tecnologia
- Rabbow, W. Rettberg, P. Parpart, A. Panitz, C. Schulte, W. Molter, F. Jaramillo, E. Demets, R. Weiß, P. Willnecker, R. (2017). EXPOSE-R2: The astrobiological ESA mission on board of the International Space Station. *frontiers in Microbiology*, 1-14
- Raggio, J. Pintado, A. Ascaso, C. de la Torre, R. de los Ríos, A. Wierzechos, J. Horneck, G. Sancho, L. G. (2011). Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11, 281-292
- Sadowsky, A. Ott, S. (2012). Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis* 58(1-3), 81-90
- Sánchez, F. J. Meeßen, J. Ruiz, M. Sancho, L. Ott, S. Vilchez, C. Horneck, G. Sadowsky, A. de la Torre, R. (2014). UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *International Journal of Astrobiology* 13, 1-18
- Sancho, L. G. de la Torre, R. Horneck, G. Ascaso, C. de los Rios, A. Pintado, A. Wierzechos, J. Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7(3), 443-454
- Sancho, L. G. de la Torre, R., Pintado, A. (2008). Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biology Reviews* 22(3), 109-109
- Scalzi, G. S. Selbmann, L. Zucconi, L. Rabbow, E. Horneck, G. Albertano, P. Onofri, S. (2012). LIFE experiment: isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 42(2-3), 253-262
- Schirmack, J. Böhm, M. Brauer, C. Löhmannsröben, H. G. de Vera, J. P. Möhlmann, D. Wagner, D. (2014). Laser spectroscopic real time measurements of methanogenic activity under Martian subsurface analogue conditions. *Planetary and Space Science* 98, 198-204

- Sojo, F. R. J. Romeike, J. Ott, S. (2003). *Himantormia lugubris* (Hue) M. Lamb - vegetative and reproductive habit: adaptations of an Antarctic endemic. *Flora* 198, 118-126
- Stöffler, D. Horneck, G. Ott, S. Hornemann, U. Cockell, C. S. Moeller, R. Meyer, C. de Vera, J. P. Fritz, J. Artemieva, N. A. (2007). Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like Planets. *Icarus* 189, 585-588
- Yoshimura, I. Yamamoto, Y. Nakano, T. Finnie, J. (2002). Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts. In *Protocols in lichenology* (pp. 3-33). Berlin, Heidelberg: Springer

8.4 Chlorophyll *a* fluorescence of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. (in prep.)

Autoren: Theresa Backhaus, Joachim Meeßen, René Demets, Jean-Pierre de Vera and Sieglinde Ott

Der Artikel wurde vollständig vom Erstautor verfasst.

Chlorophyll *a* fluorescence of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years of space exposure on the International Space Station

Theresa Backhaus¹, Joachim Meeßen¹, René Demets², Jean-Pierre de Vera³ and Sieglinde Ott¹

¹Institute of Botany, Heinrich Heine University, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

²European Space Research and Technology Centre (ESTEC), European Space Agency (ESA), Noordwijk, Netherlands

³German Aerospace Center (DLR), Institute of Planetary Research, Management and Infrastructure, ResearchgroupAstrobiological Laboratories, Rutherfordstr. 2, 12489 Berlin, Germany

Abstract

The lichen *Buellia frigida* was exposed to space and Mars-like conditions as part of the biology and Mars experiment (BIOMEX) on the International Space Station for 1.5 years. Two experimental setups of *Buellia frigida* have been carried out. Samples have been prepared on rock pellets, exposed to real space conditions as well as on artificial Mars regolith under Martian atmosphere and pressure. Each sample setup (rock and artificial Mars samples) was exposed in the top layer of the EXPOSE-R2 facility directly to space conditions and additionally, in the bottom layer. The lichen fragments of the bottom layer were not affected by low energetic radiation types (e.g. UV). The lichen samples experienced a broad range of space conditions as cosmic radiation, extreme temperature fluctuations and space vacuum. After the samples returned to earth, their viability was analyzed by chlorophyll *a* fluorescence to examine the photosynthetic activity. One out of six experimental sample setups (the rock bottom sample) recovered its photosynthetic activity after space exposure. The results achieved indicate to a minor resistance potential of the PB on the physiological level to space conditions.

X Danksagung

Eine Danksagung zu verfassen, in der ich jedem gerecht werde, der mich während meiner Promotionszeit unterstützt hat, scheint mir zum Abschluss dieser Arbeit eine besondere Herausforderung zu sein. Ich möchte hier niemanden vergessen, aber alle aufzulisten, denen mein Dank gilt, würde den Rahmen dieser Danksagung sprengen. Daher folgt nun eine Auswahl einiger besonderer Menschen, auf deren Unterstützung ich mich in den letzten Jahren jederzeit verlassen konnte.

An erster Stelle ist sicherlich Prof. Dr. Sieglinde Ott zu nennen. Ihre Fähigkeit die Faszination und Motivation, die sie ihrer eigenen Arbeit entgegenbringt, auf ihre Studenten zu übertragen, ist mir in all den Jahren oftmals zugutegekommen. Trotz ihrer vielen eigenen Angelegenheiten habe ich bei ihr immer ein offenes Ohr und entsprechenden Rat für meine Anliegen gefunden. Darüber hinaus ist hier ein großes Dankeschön dafür fällig, dass sie mir die Bearbeitung der BIOMEX Proben ermöglicht hat.

Prof. Dr. Martin möchte ich für die Übernahme der Aufgabe des Zweitgutachters danken.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus auch meinen Kollegen an der Universität, denen ich während meiner Promotionszeit begegnen durfte und die mir die Anwendung verschiedener Methoden ermöglicht haben – namentlich zu nennen sind hier Marion Nissen, Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters, Dr. Sebastian Hänsch und Steffen Köhler. Vor allem aber hat mir die Arbeitsgruppe von Prof. Ott während meiner Zeit an der Universität tatkräftige und einfallsreiche Unterstützung auf unterschiedliche Weise entgegengebracht, für die ich sehr dankbar bin! Insbesondere Ody sorgte stets für erfolgreiche Stressbewältigung und gute Laune! Namentlich nennen möchte ich hier gerne Martha, Nadine, Stella, Fillippos und Annika.

Jean-Pierre de Vera, Mickael Baqué und weiteren Mitarbeitern aus dem DLR Berlin möchte ich für die Möglichkeit und Einarbeitung in die Methode der Raman-Spektroskopie sowie für eine äußerst spannende Zeit mit zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen in Berlin danken, die in interessanten Ergebnissen resultierte. Für eine gute Zusammenarbeit bedanken möchte ich mich auch bei Ralf Möller, Elke Rabbow und weiteren Mitarbeitern aus dem DLR Köln.

Mein Dank gilt auch dem gesamten BIOMEX Team. Die exzellente Kommunikation und der fachliche Austausch in dieser internationalen Gruppe von Wissenschaftlern haben meine Arbeit in diesem faszinierenden Projekt für mich zu einer unvergesslichen Zeit gemacht.

Neben Kollegen aus der Universität möchte ich an dieser Stelle auch meinen Freunden danken, die mich in meiner Freizeit von dem stressigen Arbeitsalltag abgelenkt haben. Namentlich zu nennen ist hier außerdem Carina, die mir für Fragen zur englischen Sprache stets zur Verfügung stand.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich in all den Jahren blind vertrauen konnte. Ich verdanke euch sehr viel! Besonderen Dank möchte ich hier meinem Vater widmen, der mich zusätzlich auf wissenschaftlicher Ebene in zahlreichen Diskussionen mit fachlichem Rat unterstützen konnte.

Abschließend möchte ich dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWi) für die finanzielle Unterstützung des Projekts (50WB1153), der ESA für die Unterstützung während des BIOMEX Experiments (ESA-ILSRA 2009-0834) und dem deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) danken.

XI Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass diese Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ an der HHU erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen.

Düsseldorf, März 2019

Theresa Backhaus