Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen



# Tätigkeitsbericht 2022

Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen



Mainzer Landstraße 55 60329 Frankfurt/Main Telefon 069-2556-1226 www.stiftung-set.de info@stiftung-set.de

www.stiftung-set.de

## Tätigkeitsbericht der Stiftung set für das Jahr 2022



Die Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (set) unterstützt das Anliegen, Tierversuche wo immer möglich durch moderne und zuverlässige tierversuchsfreie Methoden zu ersetzen, diese Versuche einzuschränken oder, wo das nicht möglich ist, die Versuchsbedingungen im Hinblick auf das Wohl der Tiere weiter zu verbessern. In den Gremien der Stiftung arbeiten Vertreter aus Tierschutz, Industrie, Wissenschaft und Behörden. Finanziert durch Gelder aus der Industrie und vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft sowie Spenden werden von der Stiftung Projekte gefördert, die sich mit der Erforschung und Etablierung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen sowie Methoden zur Verbesserung der Versuchsbedingungen und zur Verminderung der zu verwendenden Tierzahlen beschäftigen.

Auf dem Gebiet der Lebenswissenschaften sind kontinuierlich erhebliche Fortschritte zu verzeichnen. Diese eröffnen im Bereich der Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch neue Möglichkeiten, die noch vor wenigen Jahren undenkbar gewesen wären.

Es mangelt nicht an innovativen Ideen. Oft fehlt es aber an den Möglichkeiten, derartige Projekte in die Tat umzusetzen oder fortzuführen, denn diese Arbeiten sind wegen ihres oft großen technischen und personellen Aufwands nur mit entsprechender finanzieller Unterstützung möglich. Die Stiftung set hat sich daher seit nunmehr über 35 Jahren der Förderung solcher Projekte verschrieben. Im Vordergrund stehen dabei Anschubfinanzierungen und die Förderung in Nischen, die von den großen Forschungsförderungsorganisationen nicht bedient werden.

#### Inhalt

Aktivitäten der Stiftung set	Seite 3
Projektförderung	Seite 3
Weitere Förderungen	Seite 15
Sitzungen der Gremien	Seite 15
Finanzen	Seite 16
Vorstellung der Stiftung set	Seite 18
3R-Forschung	Seite 18
Forschungsförderung	Seite 19
Gründung	Seite 19
Gremien	Seite 20
Weitere Angaben	Seite 22



## Aktivitäten der Stiftung set



#### **Projektförderung**

Die Stiftung set unterstützt ein breites Spektrum wissenschaftlicher Projekte, die gezielt und nachweisbar einen Beitrag zur Verminderung, Vermeidung oder Verbesserung von Tierversuchen leisten. Dabei bietet die Stiftung eine sinnvolle Ergänzung zur Förderung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden anderer Institutionen.

Die nachfolgenden Projekte konnten 2022 abgeschlossen werden:

# P-069 Alternativen zu Matrigel - Evaluierung und Entwicklung neuer Beschichtungen zur Kultivierung von Stammzellen

(PD Dr. Anja Wilmes, Vrije Universiteit Amsterdam)

Das aus Mäusetumoren gewonnene Matrigel wird verwendet, um Stammzellen im Labor zu kultivieren. Alternative Produkte könnten die wissenschaftliche Reproduzierbarkeit verbessern und Tierleid verringern.

Humane Zellkultursysteme, insbesondere solche mit humanen pluripotenten Stammzellen (iPSC) sind ein großer Hoffnungsträger in der Entwicklung von relevanteren, Tierversuchs-freien Testsystemen. So können diese z.B. in der Toxikologie gezielt genutzt werden, um die Wirkungsmechanismen von Medikamenten oder Giftstoffen zu bestimmen. iPCS können aus adulten Zellen, z.B. Blutzellen, hergestellt und theoretisch in alle Zellen des Körpers differenziert werden. Im Vorfeld wurden z.B. iPSC in verschieden Zellen der Niere (u.a. Podozyten) differenziert, um Substanzen auf Nierentoxizität zu prüfen.

Allerdings ist für die Kultivierung von iPSC eine Beschichtung mit einer spezifischen, extrazellulären Matrix notwendig, ohne die Zellen im Labor nicht anwachsen können. Hierzu wird überwiegend die Substanz "Matrigel" verwendet. Für die Gewinnung von Matrigel müssen Mäuse mit Sarkoma-Tumoren induziert werden. Das Gewicht des Tumors beträgt dabei bis zu 20% des gesamten Körpergewichtes der Maus, bevor diese letztendlich geopfert wird.

Matrigel ist momentan eine der meistverwendeten Beschichtungen für iPS-Zellkulturen. Ein Ersatz wäre aus verschiedenen Gründen erstrebenswert, u. a. um bessere Standarisierungen zu erzielen und natürlich aus ethischen Gründen. Obwohl bereits einige alternative Produkte kommerziell verfügbar sind, werden diese nur sehr spärlich in der Forschung eingesetzt. Neben anderen Gründen liegt das u.a. an höheren Kosten sowie an nur eingeschränkt vorhandenen unabhängigen Studien, die die Produkte der verschiedenen Anbieter systematisch vergleichen.





Mit diesem Projekt sollte eine gründliche Evaluierung der vorhandenen Produkte mit dem Fokus auf iPSC-Qualität und -Stabilität vorgenommen werden: iPSC müssen ihre Pluripotenz beibehalten und dürfen keine genetischen Veränderungen aufzeigen. Des Weiteren sollte eine kostengünstige, neue Alternative entwickelt werden, nämlich die Herstellung von Beschichtungen durch humane Zelllinien.

Ein drittes Ziel des Projektes bestand darin, diese verschiedenen Beschichtungen für das Differenzieren von iPSC in Nierenzellen (z.B. Podozyten) zu testen, so dass auch hier von Matrigel unabhängige Differenzierungsmethoden entwickelt werden können. Hier lag der Fokus auf der Evaluierung von Podozyten-typischen Markern, wie z.B. Synaptopdin und WT1.

Das Projekt wurde erfolgreich abgeschlossen und es konnte gezeigt werden, dass das Kultivieren von iPS-Zellen auf den humanen rekombinanten Protein-Beschichtungen Vitronectin, Laminin-511 und Laminin-521 sowie auf der extrazellulären Matrixbeschichtung, welche von human Fibroblasten hergestellt wurde, sehr gut funktioniert. Undifferenzierte iPS-Zellen dreier Spender haben ähnliche Pluripotenzmarker exprimiert wie Zellen, welche auf dem in Mäusen hergestellten Matrigel kultiviert wurden. Außerdem waren die Karyotyp-Stabilität und das Differenzierungspotential in die drei Keimblätter bei allen getesteten Beschichtungen vergleichbar.

Differenzierungen in Podozyten-artige Zellen konnten ebenfalls auf den humanen rekombinanten Protein-Beschichtungen Vitronectin, Laminin-511 und Laminin-521 und der extrazellulären Matrixbeschichtung der Fibroblasten nachgewiesen werden. Sie waren vergleichbar mit Differenzierungen auf Matrigel.

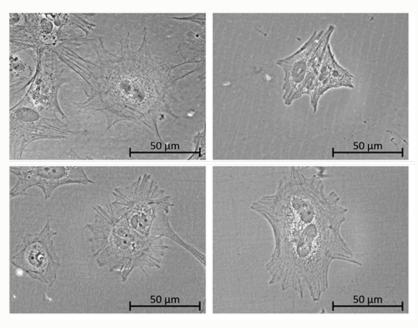


Abb. 1: iPSC-abgeleitete Podozyten, welche entweder auf Matrigel (A) oder auf verschiedenen Matrigel-freien Beschichtungen wachsen (B-D).





Zusätzlichen wurde auch die Differenzierung in renale proximale Tubular-ähnliche Zellen getestet. Hier konnten die besten Ergebnisse mit extrazellulärer Matrix Beschichtungen, welche von humanen Fibroblasten oder humanen Nierenzellen (RPTEC/TERT1) hergestellt wurden, gezeigt werden, die genauso gut funktionierten wie Matrigel. Die rekombinanten Proteine Vitronectin und Laminin-511 waren in diesem Fall nicht überzeugend.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Matrigel nicht notwendig ist, um iPS-Zellen zu kultivieren oder diese in renale Podozyten oder proximalen Tubularzellen zu differenzieren und dass es alternative Beschichtungen gibt, welche mit dieser Arbeit detailliert beurteilt wurden.

#### Publikation:

Cormac Murphy, Elisabeth Naderlinger, Amber Mater, Roelof J. C. Kluin, Anja Wilmes. Comparison of human recombinant protein coatings and fibroblast-ECM to Matrigel for induced pluripotent stem cell culture and renal podocyte differentiation ALTEX, Vol. 40 No. 1 (2023), 141-159, https://doi.org/10.14573/altex.2112204

#### Symposien:

Die Arbeitsgruppe um Anja Wilmes führte im September 2021 ein ganztägiges, internationales Online-Symposium zum Thema "Alternatives to Matrigel" durch.

# P-070 VitroInfect – Etablierung eines in vitro Biofilm-Plattformmodells für Gewebeinfektionen

(Prof. Dr. Maike Windbergs, Goethe-Universität, Frankfurt/M)

Man geht davon aus, dass etwa 80 % aller chronischen Gewebeinfektionen mit dem Befall durch bakterielle Biofilme einhergehen. Wegen der ausgeprägten Widerstandsfähigkeit von Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen sind solche Infektionen in der Klinik schwer zu therapieren und mit einer starken Belastung für die Patienten verbunden. Um die Entwicklung und Therapie Biofilm-assoziierter Gewebeinfektionen zu untersuchen, werden deshalb dringend aussagekräftige Infektionsmodelle benötigt. Bisher beruht die Forschung in diesem Feld standardmäßig auf dem Einsatz von Tiermodellen. Eine mangelnde Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus sowie vorhandene ethische Bedenken verdeutlichen die Notwendigkeit der Entwicklung eines robusten und universell einsetzbaren in-vitro-Modells eines bakteriellen Biofilms als valide Alternative zu Tierversuchen. Bekannte in-vitro-Biofilm-Modelle basieren vorwiegend auf flachen, abiotischen Oberflächen und beinhalten meist keine humanen Zellen, wodurch sie in ihrer klinischen Relevanz stark eingeschränkt sind.





In diesem Projekt wurde ein Biofilm-Modell entwickelt, welches auf einem dreidimensionalen Gerüst elektrogesponnener Fasern beruht. Ziel ist die Imitation der Mikroumgebung nativer Biofilme und eine Übertragbarkeit auf humane Gewebemodelle.

Aus Biopolymeren wurden mittels Elektrospinning Fasern entwickelt, welche in ihrem Durchmesser an die Größe relevanter Infektionskeime angepasst wurden. Im Zusammenhang mit der Einstellung einer geeigneten Benetzbarkeit soll dadurch die bakterielle Adhäsion erleichtert werden. Die Fasergerüste wurden außerdem so designt, dass sie eine hohe mechanische Stabilität aufweisen, um einen späteren Transfer zu ermöglichen. Die Kolonisation mit ein oder mehreren klinisch relevanten bakteriellen Erregern (z.B. *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*) zeigte sich anschließend sehr erfolgreich und resultierte in einer gleichmäßigen Verteilung, Ausbildung von Kolonien und schließlich der Formierung ausgereifter Biofilme, die wichtige Eigenschaften nativer Biofilme aus Gewebeinfektionen aufwiesen. Im Folgenden wurden 3D-Modelle der menschlichen Haut mit dem separat-kultivierten Biofilm-Modell infiziert, um eine chronische Wundinfektion zu simulieren und gleichzeitig das Gewebe über den Analysezeitraum nur minimal zu schädigen (Abb. 1).

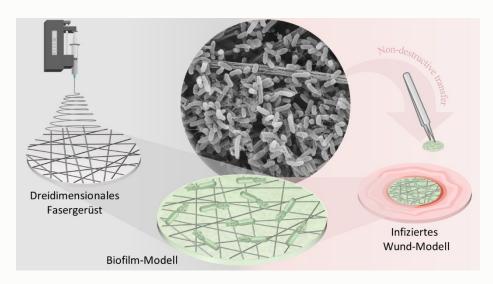


Abb. 1: Darstellung der Umsetzung des in-vitro-Biofilm-Plattformmodells zur standardisierten und kontrollierten Induzierung einer manifesten Gewebeinfektion mit Biofilm.

Das entwickelte Biofilm-Modell spiegelt die in-vivo-Situation biofilm-assoziierter Gewebeinfektionen präzise wider und ist damit durch hohe klinische Relevanz gekennzeichnet. Hierdurch werden die Möglichkeiten der Untersuchung von Pathomechanismen einer manifesten, bakteriellen Infektion sowie die Entwicklung neuer wirksamer Therapien eröffnet.





# P-071 Gehirn-Organoid-Tumor Hybride – ein in vitro Modell zur Untersuchung menschlicher Hirntumoren und zur Medikamententestung

(Prof. Philipp Koch & Prof. Frank Winkler, Hector Institute for Translational Brain Research, Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Universitätsklinikum Heidelberg, Deutsches Krebsforschungszentrum, Mannheim & Heidelberg)

Menschliche Hirntumore lassen sich nur schlecht in Zellkultur modulieren. In diesem Projekt sollte ein Alternativsystem vorgestellt werden, bei dem die Hirntumore statt in Versuchstieren in Organoiden (3D-Gewebestrukturen aus Stammzellen) kultiviert werden.

Das Glioblastom (GB) gehört zu den häufigsten und aggressivsten menschlichen Hirntumoren. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt nach wie vor bei etwa einem Jahr. Glioblastome sind nur sehr eingeschränkt in Zellkulturmodellen untersuchbar, da in vitro kultivierte Tumorzelllinien nur unzureichend die biologischen Eigenschaften der Tumore abbilden. Hierfür scheint die spezielle in vivo Umgebung des Gehirns (Zellen und extrazelluläre Matrix, idealerweise die des Menschen) notwendig zu sein. So konnten wir in der Vergangenheit nachweisen, dass GB Zellen im Gehirn funktionelle Netzwerke ausbilden, welche über Zell-Zell Verbindungen kommunizieren – ein biologisches Verhalten, welches man in vitro so mit Standardverfahren nicht findet. Entsprechend werden bei der Erforschung von Hirntumoren und insbesondere Glioblastomen sehr hohe Versuchstierzahlen eingesetzt. Da die Tumoren sich aggressiv im Gehirn der Tiere ausbreiten, führen solche Versuche zu einer vergleichbar starken Belastung der Versuchstiere.

Wir haben ein in vitro Zellkultur Modell etabliert, welches Tierversuche in der Hirntumorforschung ersetzten soll. Hierzu werden GB-Zellen statt in Tieren in dreidimensionalen Gehirn-Organoiden (sogenannten "Mini-Gehirnen") kultiviert, welche aus induziert pluripotenten Stammzellen hergestellt werden. Diese Gehirn-Organoide beinhalten alle wichtigen Zellen, welche sich auch im menschlichen Gehirn finden, und werden als vollständig humane Gewebemodelle (Inkubatoren) für die Hirntumoren eingesetzt. Wir konnten zeigen, dass die GB-Zellen in diesem Hybrid-Modell alle wichtigen neurobiologischen Eigenschaften ausprägen, die man sonst nur im Tier findet, und dass die Tumorzellen auch die Heterogenität wie im lebenden Organismus annehmen. Unter Zuhilfenahme das Modells konnten wir neue GB-Schlüsselmechanismen validieren und konnten zeigen, dass das Modell geeignet ist, um Medikamente und innovative Therapieoptionen zu testen.





#### P-072 Culture of Care als Grundstein einer effektiven 3R-Implementierung

(Dr. Katharina Ameli, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Im Jahre 2010 verabschiedete die Europäische Union die Richtlinie 2010/63/EU [1] und schuf darüber für die europäischen Mitgliedstaaten ein Instrument, mit dem es möglich wird, wirksame Maßnahmen zur Reglementierung des Tierversuchs gesetzlich umzusetzen. Eine überragende Bedeutung wird dabei dem 3R-Prinzips von Russell und Burch (1959) [2] beigemessen, welches durch das Instrument der Culture of Care (Erwägungsgrund 31, EU-Direktive) implementiert werden sollte.

Wesentliche Komponenten der Culture of Care bilden dabei Kommunikation, sowie die Wertschätzung von Mensch und Tier, aber auch die Haltung und Professionalität der Fachkräfte gegenüber der Culture of Care ab. Die nachhaltige Etablierung des 3R-Konzeptes in der biomedizinischen Grundlagenforschung erfordert einen Paradigmenwechsel. Existente Normen müssen aufgebrochen, überwunden und durch neue ersetzt werden. Die Etablierung der Culture of Care skizziert dabei in hervorragender Weise, welcher Weg beschritten werden muss, um den geforderten rechtlichen, aber auch ethischen Forderungen zu genügen. Aktuell können wir beobachten, dass das 3R-Konzept einen hohen Bekanntheitsgrad erlangt hat. Allerdings impliziert die alleinige Kenntnis von einem Sachverhalt nicht unmittelbar eine menschliche Handlung. Es genügt demnach nicht, lediglich die Theorie des 3R-Konzeptes zu vermitteln, vielmehr benötigt man weitere Anstöße, die ihrerseits die eigentliche Handlung (Aktion) initiieren. Gerade hier liegt das Potential der Culture of Care, also der Entwicklung einer Anschauung, die zu einer Norm werden kann und somit zur selbstverständlicheren Aktion (=Überdenkung eines Tier-basierten Vorhabens und die bewusste Entscheidung für die Alternative) beitzutragen. Unklar ist jedoch, welche Bedeutung einer Culture of Care im Kontext der 3R-Strategie tatsächlich zukommt und welche Kennzeichen in diesem Kontext zukünftig relevant sind.

Das von der Stiftung set geförderte Forschungsvorhaben setzt mithilfe der qualitativen Sozialforschung bei der Analyse aller beteiligten Ebenen an und reflektiert darüber einen interdisziplinären Ansatz, ganz im Sinne des 3R-Konzepts von Russell und Burch.

Das im ersten Projektteil erarbeitete Forschungsdesign erlaubt, mithilfe der Forschungsfrage ein systematisches und differenziertes Bild abzubilden. Die erhobenen Daten beruhen auf einem nichtstandardisierten Erhebungsverfahren (themenorientierte, leitfadengestützte Experteninterviews) und wurden in der Leitungsebene, der Wissenschaftsebene, der überwachenden Ebene und der Pflegeebene durchgeführt. Dieser qualitative Ansatz erlaubt "theoretische, methodologische und methodische Zugänge zur sozialen Wirklichkeit" herzustellen und das Konzept einer Culture of Care möglichst komplett und ganzheitlich abzubilden. Das qualitative Vorgehen soll zunächst keine zähloder messbaren Resultate generieren. Vielmehr ist das Ziel, den individuellen Sicht- und den subjektiven Erlebnisweisen der Expert\*innen Raum zu verleihen und die Kontexte, Bedingungen, Strategien und Konsequenzen für die Culture of Care zu verstehen und als theoretisches Modell abzubilden.





Die folgenden Projekte wurden in 2022 weitergeführt.

# P-068 Ein humanes Gewebemodell zur Untersuchung von Verbrennungsbehandlungen bei geriatrischen Patienten

(PD Dr. Mahtab Nourbakhsh, Uniklinik RWTH Aachen)

Verbrennungen führen insbesondere bei älteren Menschen zu erhöhter Morbidität und Mortalität. Die Häufigkeit von Verbrennungsverletzungen ist bei älteren Menschen aufgrund ihrer verminderten körperlichen Kraft, Sehstörungen und geringeren Reaktionszeiten signifikant erhöht. Die altersbedingte Verschlechterung des Immunsystems, Immunoseneszenz oder chronische Entzündungen beeinträchtigten die Geweberegeneration geriatrischer Verbrennungspatienten und führen häufig zur Anfälligkeit gegenüber Infektionen und Sepsis. Aufgrund der Zunahme der älteren Bevölkerung ist die verbesserte altersspezifische Versorgung von Verbrennungen für diese Patienten erstrebenswert.

Die meisten Verbrennungsverletzungen betreffen das kutane und subkutane Fettgewebe und induzieren eine lokale Entzündungsreaktion, welche die Regeneration des Gewebes und die Wundheilung fördert. Das subkutane Fettgewebe enthält neben Adipozyten eine Reihe verschiedener Stamm- und Immunzellen, die zur Wundheilung und zur strukturellen Integrität des Gewebes nach Verbrennungen beitragen. Diese Zellen umfassen stromalvaskuläre Zellen, Fettstammzellen, Makrophagen und Fibrozyten. Fettgewebsmakrophagen bilden eine wichtige Fraktion der immunmodulatorischen Zellen, die an der Gewebehomöostase und an der Auflösung oder Nichtauflösung von Entzündungen beteiligt sind.

Bisher wurden vor allem Nagetiere für die präklinische Untersuchung von Verbrennungswunden eingesetzt. Nagetiere unterscheiden sich jedoch signifikant von menschlichen Systemen und ihre generelle Akzeptanz in der Verbrennungsforschung nimmt kontinuierlich ab. Darüber hinaus sind Verbrennungsexperimente an Tieren sehr grausam, ungenau, teuer und im Allgemeinen weit entfernt von der Pathophysiologie und Anatomie der Verbrennung am Menschen. Daher muss die Verbrennungsforschung neue Methoden entwickeln, um Verbrennungen zu untersuchen und Behandlungen zu testen, die diese Experimente an Tieren ersetzen und tatsächlich für das humane System relevant sind.

Im Vorfeld erfolgte bereits die Entwicklung einer Methode, mit der gezielt und reproduzierbar Verbrennungen ex vivo gesetzt werden konnten. Mit der ethischen Genehmigung der örtlichen Behörden und der Einwilligung der Patienten wurden dafür menschliche Gewebeabschnitte aus normalen chirurgischen Eingriffen verwendet, die sonst verworfen worden wären. Für die experimentellen Verbrennungsverletzungen wurde ein modifizierter McKenna-Brenner mit flacher Flamme eingesetzt, der eine genauere, stabile und wiederholbare Einstellung der Temperatur und der Expositionszeit erlaubt.

In diesem Projekt sollen nun konservative Behandlungen für Verbrennungswunden geriatrischer Patienten verbessert und weiterentwickelt werden.





# P-073 D-Druck bakterieller Biofilme auf Monolayer humaner Lungenzellen als in virtro Modell einer Chronischen Lungeninfektion (BACTO-PRINT)

(Prof. Claus-Michael Lehr, Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS))

Zur Bekämpfung von Lungeninfektionen erforscht die Wissenschaft Krankheitsverläufe und entwickelt neue Anti-Infektiva und therapeutische Ansätze.

Biofilm-bildende Bakterien stellen dabei eine große medizinische Herausforderung dar. Solche Bakterien können sich besonders bei Risikogruppen, wie z.B. Menschen mit Mukoviszidose, im krankheitsbedingt viskoseren Mukus in der Lunge ansiedeln und dort Biofilme bilden.

Im Rahmen dieser Forschung gelten Tiere trotz bekannter Nachteile immer noch als Standardmodell. In der Regel werden in der Forschung die Versuchstiere (Ratten, Mäusen, Katzen, Meerschweinchen, Schweine, Affen) über die intratracheale oder intranasale Route mit Bakterien-beladenen Agar-Beads infiziert. Solche Tiermodelle sind jedoch nicht nur ethisch, sondern auch wissenschaftlich in Frage zu stellen.

Fortschrittliche, der pathophysiologischen Situation in vivo besser angenäherte in vitro Modelle könnten somit nicht nur einen Ersatz, sondern sogar eine bessere Alternative bieten, um relevante vorklinische Daten zur Wirksamkeit neuer Anti-Infektiva zu erhalten. Die Problematik besteht jedoch darin, dass Biofilme nicht direkt auf humanen Zellen gezüchtet werden können, da die Zellen durch das rapide Bakterienwachstum rasant absterben würden. Ein anderer Ansatz besteht darin, die Biofilme vorab zu bilden, anschließend abzuschaben und auf die Zellen zu übertragen/pipettieren. Hierbei kann der Biofilm jedoch weder definiert noch reproduzierbar auf die Zellen überführt werden.

In diesem Projekt soll deshalb die 3D-Bioprinting-Technologie genutzt werden, um bakterielle Biofilme in einem Hydrogel reproduzierbar und modellierbar auf humane Epithelzellen aus modernen in vitro Systemen zu drucken (Abb. 1). Anschließend, soll das Modell als Plattform zur Untersuchung neuer Anti-Infektiva verwendet werden.

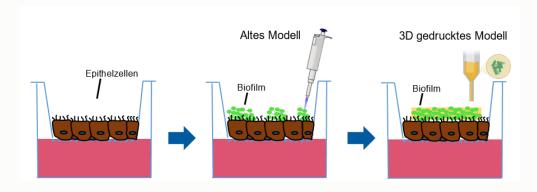


Abbildung 1: Schematische Darstellung des weiterentwickelten Modells zum Transfer von bakteriellen Biofilmen auf humane Lungenepithelzellen. Die Biofilme sollen dabei im Gegensatz zum alten Modell auf die Zellen gedruckt werden.



Dafür wird das Bakterium Pseudomonas aeruginosa (z.B. PA14) zunächst in einem druckbaren Hydrogel gezüchtet, um Biofilme zu bilden. Die Biofilme sollen dann in dem Hydrogel auf humane Lungenepithelzellen definiert und reproduzierbar gedruckt werden. Anschließend soll das Modell charakterisiert werden. Dabei interessieren unter anderem die Viabilität und Barriereeigenschaften der Zellen sowie die Ausschüttung von Zytokinen. Die Anwendbarkeit einer Behandlung mit geeigneten Anti-Infektiva ((z.B. Tobramycin, Colistin oder QS-Inhibitoren) und neuartigen (Nano-) formulierungen soll demonstriert werden, indem die Wirksamkeit bei veränderten Barriereeigenschaften und Zytokinausschüttungen beobachtet wird.



#### P-075 Biodruck eines 3D-Tumormodells

(Prof. Jens Kurreck, TU Berlin)

Gerade im Bereich der Krebsforschung ist die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen besonders schlecht. Rund 97% der onkologischen Wirkstoffkandidaten, die sich in präklinischen Studien im Tiermodell bewährt haben, scheitern dann in klinischen Studien am Menschen. Eine wichtige Ursache für die geringe Erfolgschance sind die Spezies-spezifischen Unterschiede zwischen Tieren und Menschen. Gleichzeitig sind In-vivo-Versuche in der Krebsforschung besonders belastend für die Tiere.

In diesem Projekt sollen daher humane Tumormodelle durch Biodruck erzeugt werden. Hierbei wird ein Tumor in eine Tumor-Mikroumgebung eingebettet, die aus gesunden menschlichen Zellen besteht (Abb. 1).

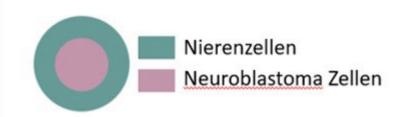


Abb. 1: Aufbau des Tumormodells.

Neuroblastomzellen (IMR-32) werden von Nierenzellen umgeben. Anfänglich werden hierfür HEK293 bzw. HEK293-GFP-Zellen genutzt, in späteren Versuchen auch primäre Nierenfibroblasten.

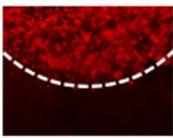
Dadurch können die sehr wichtigen Interaktionen zwischen dem Tumor und den ihn umgebenden Zellen untersucht werden. Exemplarisch soll ein Tumor aus Neuroblastomzellen gedruckt werden, der von Nierenzellen umgeben ist. Die Niere stellt einen - wenn auch selten, aber doch gelegentlich vorkommenden - Ort für Metastasen von Neuroblastomen dar.

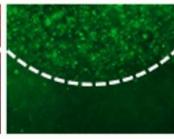
In einem weiteren Schritt wird das Tumormodell mit verschiedenen Substanzen behandelt. In Vorversuchen konnten wir bereits zeigen, dass das Krebsmedikament Panobinostat selektiv die Krebszellen durch Induktion der Apoptose abtötet, während die gesunden Zellen der Tumorumgebung unbehelligt bleiben (Abb. 2).











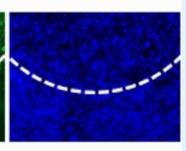


Abb. 2: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Tumormodells nach Behandlung mit einem Krebsmedikament (Panobinostat).

Die rote Fluoreszenz stammt von einem Marker (GD2) für die Neuroblastomzellen. Diese Zellen gehen nach Behandlung mit Panobinostat in den programmierten Zelltod (Apoptose). Der Apoptose-Marker "Cleaved Caspase-3" ist grün angefäbt. Die blaue Färbung der Zellkerne zeigt die Verteilung sämtlicher Zellen an.

Schließlich soll auch das Metastasierungspotenzial des Tumors untersucht werden. Hierzu wird das Migrationsverhalten der Zellen studiert. Insgesamt soll das Projekt also dazu beitragen, durch Entwicklung eines humanen Tumormodells eine Alternative zum Tierversuch in der Krebsforschung zu entwickeln.

#### **Publikation**

Wu, D.; Berg, J.; Arlt, B.; Röhrs, V.; Al-Zeer, M.A.; Deubzer, H.E.; Kurreck, J. Bioprinted Cancer Model of Neuroblastoma in a Renal Microenvironment as an Efficiently Applicable Drug Testing Platform. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 122. https://doi.org/10.3390/ijms23010122





# P-076 Tissue-engineered 3D-Cornea-Modell zur Simulation von Wundheilung und Narbenbildung der Hornhaut des Auges

(Dr. Daniel Kampik, Universität Würzburg, Fraunhofer ISC Würzburg)

Traumata, Infektionen und Wundheilungsstörungen der Hornhaut (Cornea) können Narben in der optischen Achse hinterlassen, die das Sehvermögen erheblich beeinträchtigen und - im schlimmsten Fall - zur Erblindung führen. Wirksamere Therapien zur Behandlung von Hornhautwunden und insbesondere zur Behandlung von Wundheilungsstörungen wären ein großer Fortschritt in der Augenheilkunde.

Es existieren bereits zahlreiche Methoden zur Testung der Reaktion der Hornhaut auf Chemikalien, Arzneimittel, Kosmetika oder andere Konsumprodukte. Der derzeitige Standard zur Untersuchung auf Augentoxizität ist der Draize-Augentest, bei dem eine Substanz an einem Kaninchenauge getestet wird. Hierbei handelt es sich um eine standardisierte Methode, bei welcher verschiedene Konzentrationen einer Substanz auf das Auge des lebendigen Tiers appliziert werden und anschließend der Befund der Augen zu verschieden Zeitpunkten evaluiert wird. Die Versuchstiere werden nach Abschluss der Testung geopfert.

Das von uns entwickelte 3D-Cornea-Modell besteht aus Epithel und Stroma (Abb. 1), den beiden Schichten, in denen sich die Narbenbildung der Hornhaut hauptsächlich abspielt.

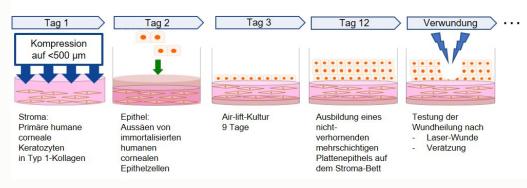


Abb. 1: Aufbau des 3D-Cornea-Modells.

Für das Stroma werden primäre humane Keratozyten in Typ-1-Kollagen kultiviert. Dieses Hydrogel wird auf eine Dicke von 500 µm komprimiert, um darauf immortalisierte oder primäre humane Epithelzellen auszusäen. Nach einem Tag Wachstum submers im Medium wird die Kultur für 9 Tage als air-lift fortgesetzt. Währenddessen bildet sich ein mehrschichtiges, nicht-verhornendes Plattenepithel aus, das dem Stroma-Ersatz aus Kollagen-Hydrogel fest aufliegt. Ab Tag 12 kann das fertige Modell für das zu untersuchende Szenario verwendet werden, zum Beispiel zur Infektion mit Pathogenen oder zur Simulation eines Wundheilungsprozesses.

Die Besonderheit dieses Modells liegt in der hohen Ähnlichkeit zur natürlichen humanen Hornhaut: Die Oberfläche bildet ein mehrschichtiges nicht-verhornendes Plattenepithel, das histologisch der humanen Hornhaut sehr ähnlich ist und zudem Hornhaut-Epithel-



spezifische Marker exprimiert. Die so generierten Cornea-Modelle können für weitere 20 Tage in Kultur gehalten werden. In Vorarbeiten konnten wir eine Unterscheidung aller UNGHS-Kategorien erreichen.

Ziel dieses Projektes ist eine Adaptation unseres bestehenden 3D-Cornea-Modells zur besseren Untersuchung der Wundheilung der Hornhaut. Hierbei streben wir langfristig die Entwicklung eines standardisierten Testsystems an, aber auch allgemein ein besseres Verständnis der Wundheilung und Narbenbildung der Hornhaut. Dieses Testsystem könnte eine Untersuchung potenzieller Wundheilungs-modulierender Substanzen, deren weitere Erforschung bisher nur im Tierversuch möglich war, ohne ethische Bedenken ermöglichen.

#### P-077 Xeno-freie in vitro 3D-Modellierung der Synovitis

(Dr. Timo Gaber, Charité Berlin)

Ziel des Projektes ist die Entwicklung eines komplexen, xeno-freien und human-basierten in vitro 3D-Synovialmembranmodells zur Simulation von Pathomechanismen bei Arthritiden am Beispiel der rheumatoiden Arthritis, um die präklinische Forschung im Sinne der 3R voranzutreiben. Die rheumatoide Arthritis ist eine entzündlich degenerative Gelenkerkrankung, die durch Bewegungseinschränkung, beträchtliche Schmerzen und damit einhergehende psychische Belastung der Patienten gekennzeichnet ist. Aufgrund der limitierten Behandlungsmöglichkeiten und der medizinischen Versorgungslücke leitet sich ein deutlicher, klinischer und präklinischer Handlungsbedarf ab, der sich durch verstärkte Forschung auf dem Gebiet bemerkbar macht. In der präklinischen Forschung werden derzeit Tiermodelle (meist Mäuse und Ratten) als Goldstandard eingesetzt, obwohl die spezies-spezifischen Unterschiede zwischen Mensch und Tier im Hinblick auf die Vergleichbarkeit pathophysiologischer Prozesse als auch auf die Aussagen zur Wirksamkeit und Effizienz neuer therapeutischer Ansätze limitierend wirken. Alternativmethoden im Bereich der Arthritis-Forschung, die es ermöglichen die komplexen Zusammenhänge der Erkrankung abzubilden, sind derzeit noch rar und basieren zudem meist auf der Verwendung tierischer Komponenten. Daher soll in diesem Projekt ein humanes, xeno-freies 3D-Modell als eine Alternative zum Tiermodell in der Grundlagenforschung und angewandten biomedizinischen Forschung entwickelt werden. um i) pathophysiologische Prozesse zu studieren, ii) potentielle Zielmoleküle zu identifizieren und iii) neue therapeutische Strategien zu testen und schließlich Tierversuche zu reduzieren oder gar zu ersetzen.

Ein Projekt wurde 2022 neu genehmigt, wird aber erst in 2023 begonnen.





### **Weitere Förderungen**

Die Stiftung set unterstützt weiterhin die einschlägige Zeitschrift ALTEX, die vierteljährlich Ergebnisse aus dem Bereich der Alternativmethodenforschung publiziert. Ebenso wurde in 2022 der EUSAAT-Kongress direkt und mit der Finanzierung des Young-Scientists-Travel-Awards unterstützt.



Abb: Verleihung des Young Scientists Travel Awards anlässlich des EUSAAT-Kongresses 2022 in Linz.

### Sitzungen der Gremien

In 2022 tagte der Stiftungsrat zweimal, der Wissenschaftliche Beirat dreimal und das Kuratorium einmal. Alle Sitzungen fanden online statt.



# Finanzen der Stiftung set



Durch die im Jahr 2022 erfolgten Zuwendungen der Industrieverbände sowie durch die Unterstützung durch das BMEL konnten wieder mehrere Projekte gleichzeitig gefördert werden.

#### Einnahmen

Spenden der Industrieverbände	222.500,00 €
Zuschuss vom BMEL	100.000,00€
Zinsen und Ausschüttungen	8.965,20 €
Sonstige Spenden	15.220,00 €
Summe der Einnahmen	346.685,20 €

Die Stiftung set erhielt in 2022 von der Firma Lornamead eine Spende in Höhe von 10.000 €.

### Ausgaben

Projektförderung (Rückstellungen)	261.000,00€
Sonstiges	150,00 €
ALTEX	10.000,00€
Kongresse, Reisestipendien	12.000,00 €
Verwaltung	57.860,72 €
Summe der Ausgaben	341.010,72 €

### **Kapital**

Die Stiftung wurde ursprünglich mit einem Kapital von 1 Mio. DM ausgestattet, was 511.292 € entspricht.





## Vermögensstatus

Vanital	zum 31.12.2021	zum 31.12.2022
Kapital Fonds (Wert zum Stichtag)	520.240,50€	429.831,00€
Flüssige Mittel Bankkonto Fonds (Wert zum Stichtag)	665.380,32 € 247.991,27 €	704.951,64 € 204.902,68 €
Rückstellungen für laufende Projekte	634.754,46 €	668.651,30 €

Im Berichtszeitraum nahm das Vermögen der Stiftung um 37.414,11 € ab.



## **Vorstellung der Stiftung set**



Die Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (set) verfolgt das zentrale Anliegen, Tierversuche nach Möglichkeit zu ersetzen, sie einzuschränken oder die Versuchsbedingungen im Hinblick auf das Wohl der Tiere weiter zu verbessern. Die Vertreter der Stiftung stammen aus Industrie, Tierschutz, Wissenschaft und Behörden. Hand in Hand fördern sie Projekte, die sich mit der Erforschung und Etablierung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen beschäftigen.

### **3R-Forschung**

Bereits vor knapp sechzig Jahren wurde das Prinzip der "3R" als Leitlinie vorgeschlagen, um Tierversuche bzw. das Leid der Versuchstiere zu vermeiden oder zu verringern. Die 3 R stehen dabei für folgende Ansätze:

Replacement: Ersatz von Tierversuchen durch tierversuchsfreie Alternativmethoden

Reduction: Reduzierung der Zahl der notwendigen Tierversuche und der Menge der dafür eingesetzten Versuchstiere

Refinement: Verfeinerung und Verbesserung der Versuchsabläufe, so dass die Leiden der eingesetzten Versuchstiere gemindert werden und mehr sowie gezieltere Informationen aus Experimenten gewonnen werden können

Diesem Konzept folgend bemühen sich Gesetzgeber, Industrie, Forschung und Tierschutz um die Entwicklung und Etablierung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden im gesamten tierexperimentellen Spektrum. Die 3R-Forschung erstreckt sich vor allem auf drei Bereiche:

Gebiete, in denen Tierversuche gesetzlich vorgeschrieben sind, also beispielsweise die Zulassung von Medikamenten und chemischen Stoffen oder die Routineprüfung von Impfstoffen

Die Entwicklung tierversuchsfreier Methoden für die Grundlagenforschung

Die Verwendung tierverbrauchsfreier Methoden in der Lehre

Um zur Anerkennung als behördliche Prüfrichtline der EU und der OECD zu gelangen, müssen die Ersatz- und Ergänzungsmethoden anhand internationaler Validierungsstudien erweisen, dass sie in ihrer Aussagekraft geeignet sind, vorhandene, gesetzlich vorgeschriebene Methoden abzulösen.





#### Forschungsförderung durch die Stiftung set

Zur Vermeidung und Verringerung von Tierversuchen bzw. der Belastung von Versuchstieren ist die Stiftung set aktiv durch

Förderung wissenschaftlicher Projekte mit 3R-Fokus

Förderung der Kommunikation in diesem Bereich

Unterstützung der Aus- und Fortbildung

#### Gründung der Stiftung set

Angeregt durch die Initiative des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten wurde die Stiftung am 21. März 1986 gegründet. Als damals revolutionäre Neuerung vereinte sie die Vertreter unterschiedlicher Interessensverbände, deren gemeinsames Anliegen die Einschränkung und Vermeidung von Tierversuchen ist:

Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI)

Verband der forschenden Arzneimittelhersteller e.V. (vfa)

Industrieverband Agrar e.V. (IVA)

Industrieverband Körperpflege- und Waschmittel e.V. (IKW)

Bundesverband Tierschutz e.V.

Deutscher Tierschutzbund e.V.

Das Stiftungsvermögen betrug bei der Gründung der Stiftung eine Million DM und wurde von den beteiligten Industrieverbänden zur Verfügung gestellt. Forschungsprojekte werden mit Hilfe regelmäßig eingehender Spenden in erster Linie aus der Industrie und aus der Verzinsung des Stiftungsvermögens gefördert. Seit 2010 wird die Stiftung auch vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft finanziell unterstützt. Bisher konnten beinahe sechzig erfolgreich abgeschlossene Projekte gefördert werden.



## **Gremien der Stiftung set**



#### **Stiftungsrat**

Der Stiftungsrat leitet die Stiftung und entscheidet über die Förderungsprojekte. Er ist paritätisch mit acht Mitgliedern (je zwei aus den beiden Tierschutzverbänden, je ein Vertreter der vier Industrieverbände) besetzt. Die Vorstände des Stiftungsrats werden gewählt.

Ende 2022 gehörten dem Stiftungsrat folgende von ihren Verbänden berufene Mitglieder an:

Dr. Joachim Coenen, Merck KGaA (Darmstadt), für den Verband forschender Arzneimittelhersteller e.V., Vorsitzender des Stiftungsrats

Kristina Wagner, Akademie für Tierschutz (Neubiberg), für den Deutschen Tierschutzbund e.V., stellv. Vorsitzende des Stiftungsrats

Frank Gemmer, Industrieverband Agrar e.V. (Frankfurt/Main)

Dr. Claudia Gerlach, für den Bundesverband Tierschutz e.V. (Jena)

Dr. Christiane Hohensee, für den Bundesverband Tierschutz e.V. (Berlin)

Thomas Keiser, Industrieverband Körperpflege und Waschmittel e.V. (Frankfurt/Main)

Dr. Esther Müller, Akademie für Tierschutz (Neubiberg), für den Deutschen Tierschutzbund e.V.

Dr. Gerd Romanowski, Verband der chemischen Industrie e.V. (Frankfurt/Main)

Außerdem nehmen noch die Vorsitzenden des Kuratoriums und des Wissenschaftlichen Beirats sowie die Geschäftsführung der Stiftung ohne Stimmrecht an den Stiftungsratssitzungen teil.

#### **Wissenschaftlicher Beirat**

Der Wissenschaftliche Beirat berät die Stiftung in wissenschaftlichen Fragen und begutachtet die Anträge auf Forschungsförderung. Arbeiten, die als förderungswürdig erachtet werden, werden dem Stiftungsrat zur Förderung vorgeschlagen. Dem Wissenschaftlichen Beirat gehören Wissenschaftler an, die das Vertrauen von Industrie, Behörden und Tierschutzorganisationen haben. Sie werden vom Kuratorium vorgeschlagen. Im Jahr 2022 wurde die Anzahl der wissenschaftlichen Beiräte auf neun erhöht. Je nach Art der beantragten Projekte können weitere, ausgewählte Experten an den Beratungen des Beirates teilnehmen.

Ständige Mitglieder des Wissenschaftlichen Beirats waren zum Ende des Jahres 2022:

Prof. Dr. Claus-Michael Lehr, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Saarbrücken), Sprecher des Beirats

Dr. Heike Behrensdorf-Nicol, Paul-Ehrlich-Institut (Langen), stellv. Sprecherin

Dr. Philip Hewitt, Merck Healthcare KGaA (Darmstadt)

Dr. Petra Kern (Procter & Gamble Services NV, Belgien)

Prof. Dr. Jens Kurreck, TU Berlin





PD Dr. Robert Landsiedel, BASF SE (Ludwigshafen)

Dr. Dirk Petersohn, Henkel AG & Co. KGaA (Düsseldorf)

PD Dr. Elke Röhrdanz, BfArM (Bonn)

Prof. Dr. Gilbert Schönfelder, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und ZEBET (Berlin)

#### Kuratorium

Das Kuratorium der Stiftung setzt sich aus Vertretern von Institutionen des öffentlichen Lebens, wie Kirchen, Gewerkschaften, Tierschutzorganisationen, Bundes- und Länderministerien, sowie der Wissenschaft und Wirtschaft zusammen. Aufgabe des Kuratoriums ist es, kritische Fragen zwischen Tierschutz, Wissenschaft und Gesellschaft aufzugreifen, um zu einem Konsens in einer breiten, öffentlichen Diskussion zu gelangen.

Ende 2022 bestand das Kuratorium der Stiftung set aus folgenden Mitgliedern:

Dr. Katharina Kluge, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (Bonn), Vorsitzende des Kuratoriums

Dr. Rolf Fautz, Kao Germany GmbH (Darmstadt), für den Industrieverband Körperpflege und Waschmittel e.V. (Frankfurt/Main)

Dr. Regina C. Fischer, Industrieverband Agrar e.V. (Frankfurt/Main)

Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (Frankfurt am Main), für die Fraunhofer-Gesellschaft

Dr. Kerstin Kämpf, Bundesministerium für Bildung und Forschung (Berlin)

Bettina Locklair, Kommissariat der deutschen Bischöfe (Berlin), für die Kirchen

Dr. Thorsten Ruppert, Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V. (Berlin)

Silke Strittmatter, Bund gegen Missbrauch der Tiere e.V. (Freiburg), für den Tierschutz

Dr. Yasemin Süzer, Paul-Ehrlich-Institut (Langen), für das Bundesministerium für Gesundheit

Prof. Dr. René Tolba, RWTH Aachen

Dr. Rita Weber, IG Bergbau, Chemie, Energie (Hannover), für die Gewerkschaften

Prof. Dr. Sibylle Wenzel, Regierungspräsidium Gießen, für die Bundesländer





## Geschäftsführung

Dr. Christiane Buta, Stiftung set (Frankfurt/Main)

### **Stiftungsaufsicht**

Regierungspräsidium Köln

## Satzung der Stiftung set

Die Satzung der Stiftung kann über die Website der Stiftung eingesehen werden.

## Öffentlichkeitsarbeit

Die Außendarstellung der Stiftung set erfolgt über die Internetseite www.stiftung-set.de.

## **Stiftungskonto**

HypoVereinsbank Wiesbaden IBAN DE48510201860004361423, SWIFT (BIC) HYVEDEMM

