

Abschlussbericht:

„MukoBact - *In vitro* Biofilm-Modelle der humanen Mukosa in Darm und Lunge für Grundlagenforschung und Arzneimitteltestung“

Durchführung und Ergebnisse des Projekts

1. Design und Entwicklung eines mukosamimetischen Polymer-Trägersystems

1.1 Rationales Design des Trägersystems

Das Projekt „MukoBact – *In vitro* Biofilm-Modelle der humanen Mukosa in Darm und Lunge für Grundlagenforschung und Arzneimitteltestung“ wurde im September 2023 mit einer umfangreichen Recherche zum Hintergrund bakterieller Biofilme und Mukosa-assoziierten Infektionen begonnen, wobei sowohl physiologische Grundlagen als auch pathophysiologische Besonderheiten im Vordergrund standen. Um ein Modell zu entwickeln, welches einerseits physiologisch relevant ist, andererseits aber auch eine robuste und reproduzierbare Anwendung im präklinischen Kontext erlaubt, wurde ein elektrogesponnenes Trägersystem auf Basis von Gelatine und Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) konzipiert. Diese Materialkombination vereint eine hohe strukturelle Nähe zum nativen Gewebe mit mechanischer Stabilität und ermöglicht damit den reproduzierbaren Einsatz in sowohl prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellkultursystem. Während PCL die strukturelle Integrität des Trägers gewährleistet, dient Gelatine als Substrat für bakterieller Adhäsion und Biofilm-Reifung, aber auch als funktionelle Komponente für potenzielle Post-Funktionalisierung des Trägersystems.

Die Technologie des Elektrosplennens ermöglicht die Herstellung polymerer Fasern im Mikro- bis Nanometerbereich, deren Morphologie präzise durch Prozessparameter wie der Feldstärke, dem Abstand zwischen Spritzenpumpe und Rotationskollektor sowie über Umgebungsparametern wie relativer Luftfeuchtigkeit und Temperatur gesteuert werden kann. Durch kontrollierte Variation dieser Parameter lassen sich gezielt Faserarchitekturen erzeugen, die sowohl die initiale Adsorption planktonischer Bakterien als auch die anschließende Reifung strukturierter bakterieller Biofilme begünstigen. Insbesondere die hohe Porosität sowie die biomimetische Topografie sind dabei für ein robustes bakterielles Wachstum essenziell.

Um die Relevanz dieses Modells für mukosale Infektionen weiter zu erhöhen, wurde porciner Mukus auf dem elektrogesponnenen Träger immobilisiert. Hierfür wurden im Rahmen einer systematischen Studie geeignete Konzentrationen und Inkubationszeiten evaluiert, um eine reproduzierbare und funktionelle Beschichtung der Fasermatte zu erreichen.

1.2 Physikochemische Charakterisierung des Trägersystems

Mithilfe der Elektronenmikroskopie wurde sowohl die Reproduzierbarkeit des Herstellungs- und Kopplungsprozess als auch das Quellverhalten des faserbasierten Systems systematisch untersucht. Die Aufnahmen zeigten Fasern im mittleren Nanometerbereich, die durch eine gleichmäßige Morphologie, eine glatte Oberflächenstruktur sowie eine ungerichtete Anordnung charakterisiert waren (Abbildung 1A). Die gekoppelten Fasern wiesen eine homogene Bedeckung der Faserarchitektur mit Strukturen des porcinen Mukus auf und sprechen für einen robusten und reproduzierbaren Herstellungsprozess (Abbildung 1B).

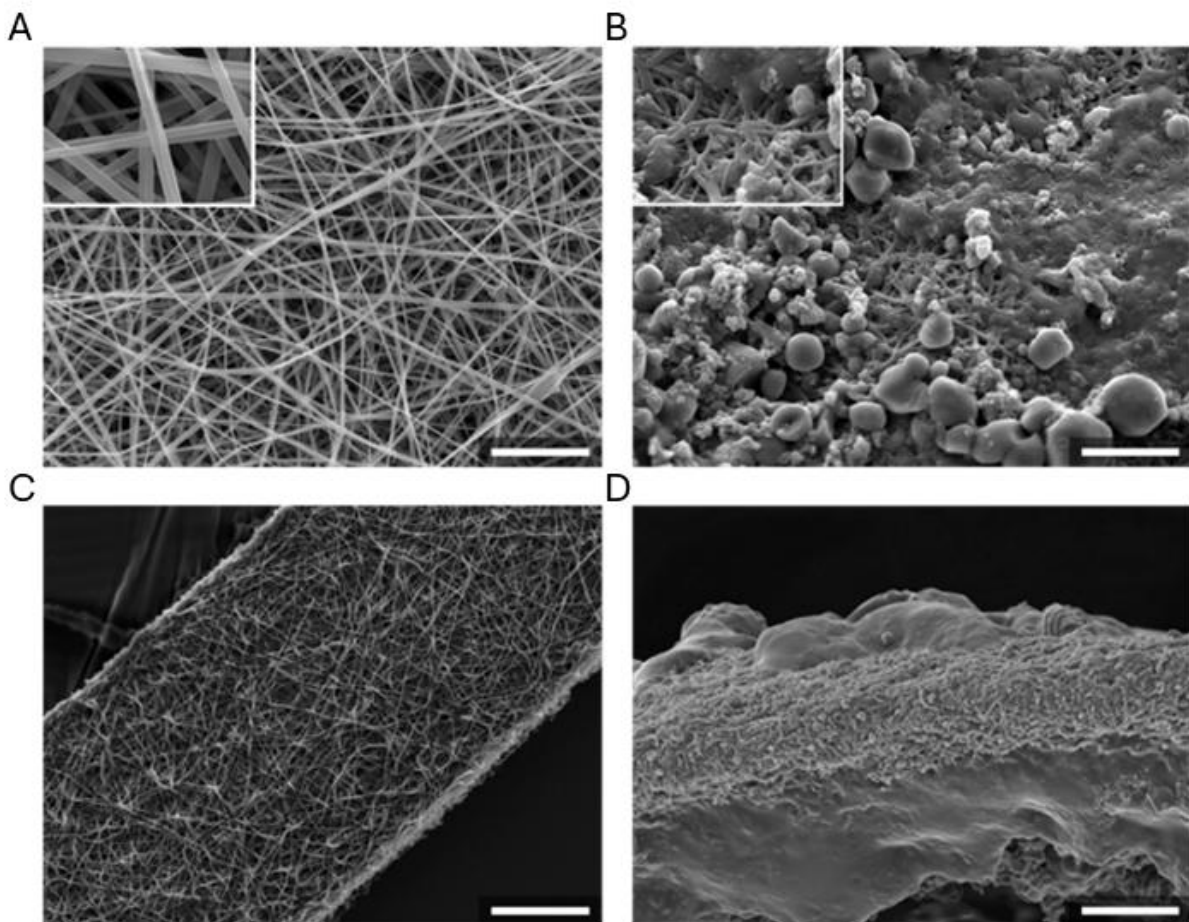


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der A) unbehandelten Fasern und B) des Mukus-funktionalisiertem Trägersystems. C) Querschnitt einer unbehandelten Fasermatte. D) Querschnitt eines mit Mukus-funktionalisiertem. Gesamtübersicht mit x 1,000 mit vergrößerter Detailansicht mit x 5,000. Maßstabsbalken = 10 μm .

Die durch Agarose-Einbettung und Compressstome-Schnitte gewonnenen Querschnitte der Fasermatten ermöglichten zudem die Beurteilung innenliegender Strukturen sowie die Visualisierung des finalen Trägersystems (Abbildung 1C und D).

Zur Bewertung struktureller Veränderungen unter physiologischen Bedingungen, wurde das Quellverhalten der Fasermatten mittels Elektronenmikroskopie untersucht (Abbildung 2). Hierzu wurden Fasermatten für 1 bis 24 Stunden inkubiert und anschließend Veränderungen im Faserdurchmesser analysiert. Dabei zeigte sich über die Zeit eine konstante Zunahme der Faserdurchmesser (Abbildung 3).

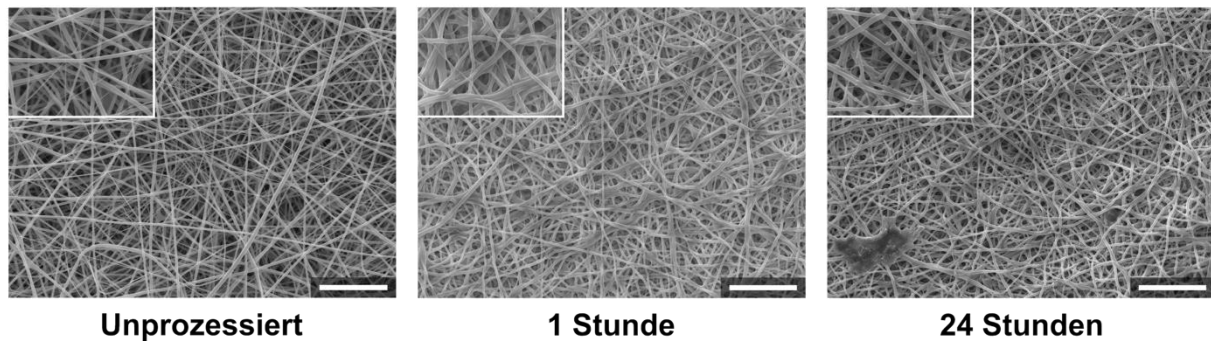


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten Fasern nach Inkubation Gesamtübersicht mit x 1,000 mit vergrößerter Detailansicht mit x 5,000. Maßstabsbalken = 10 µm.

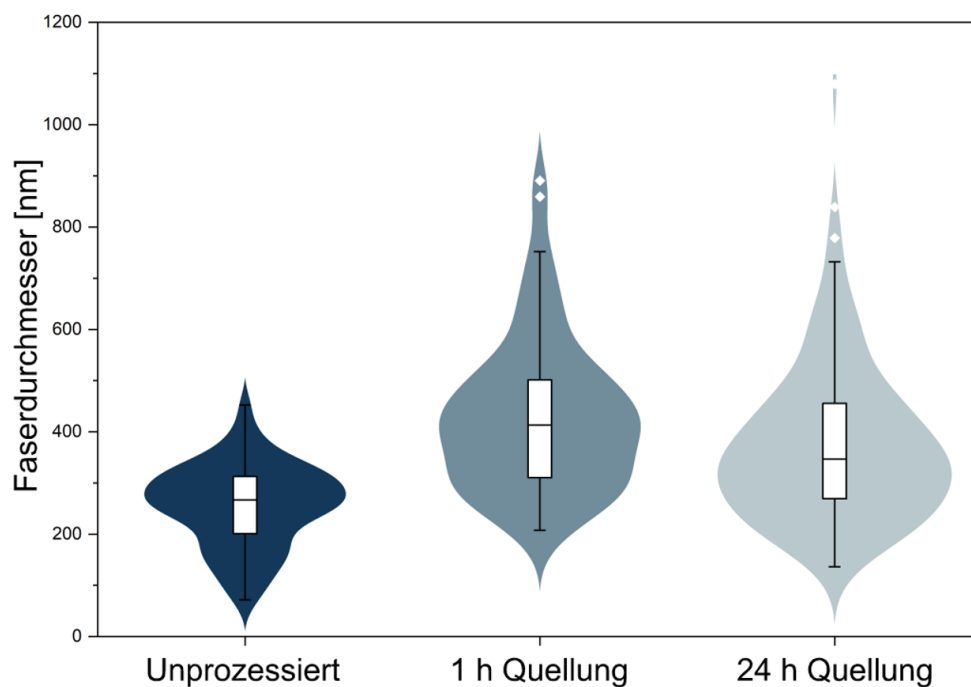


Abbildung 3: Faserdurchmesser (FD) -verteilung nach Inkubation der Fasermatten in PBS, basierend auf der Analyse von jeweils 100 Fasern mit der Software FIJI.

Die homogene Immobilisierung von porcinem Mukus auf den elektrogesponnenen Fasermatten wurde zusätzlich mittels Alcian-Blau-Färbung verifiziert. Dieser Farbstoff bindet spezifisch an Mukopolysaccharide und Glykosaminoglykane und eignet sich deshalb besonders zur Visualisierung mukushaltiger Strukturen (Abbildung 4).

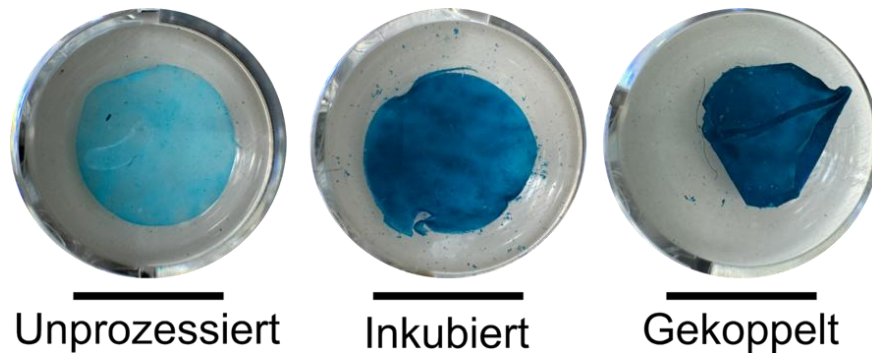


Abbildung 4: Makroskopische Visualisierung von Fasermatten mit und ohne Funktionalisierung mit porcinem Mukus nach Anfärbung mit 1% Alcian-Blau (15 min) und anschließendem Waschen mit PBS.

Die physikochemische Charakterisierung des Trägersystems umfasste eine systematische Untersuchung mechanischer, oberflächenchemischer und struktureller Eigenschaften. Hierzu wurden Zugprüfungen zur Bestimmung der mechanischen Stabilität, Kontaktwinkelmessungen zur Bewertung der Oberflächenbenetzbarkeit sowie die Attenuated Total Reflection Infrarot (ATR-IR) Spektroskopie zur Analyse der chemischen Zusammensetzung durchgeführt.

Die mechanische Stabilität der Fasermatten wurde mittels Zugprüfung im unprozessierten Zustand als auch nach der Kopplung mit porcinem Mukus beurteilt, um ihre Eignung für den Einsatz in experimentellen Laborarbeiten sicherzustellen. Die Fasern wiesen während den Analysen vergleichbare Elongationen sowohl in Spinnrichtung des Walzenkollektors als auch orthogonal dazu. Dies deutet auf eine homogene Abscheidung der Fasern während des Produktionsprozesses und dementsprechend auf eine weitgehend isotrope mechanische Struktur. Die Oberflächenbenetzbarkeit der Fasermatten wurden mittels Kontaktwinkelmessung charakterisiert, da sie als relevanter Parameter für die initiale bakterielle Adhäsion gilt. Extrem hydrophile ebenso wie stark hydrophobe Oberflächen werden in der Literatur mit verminderter bakterieller Adsorption in Verbindung gebracht, während Oberflächen mit moderater Hydrophobie als begünstigend beschrieben sind. Das unbehandelte Fasersystem zeigte einen leicht hydrophoben, stumpfen Kontaktwinkel, der sich im Verlauf der Messung rasch in Richtung hydrophiler Benetzung verschob. Demgegenüber wiesen die mit porcinem Mukus beschichteten Fasermatten über den gesamten Messzeitraum hinweg ein hydrophileres Benetzungsverhalten auf (Abbildung 5 D).

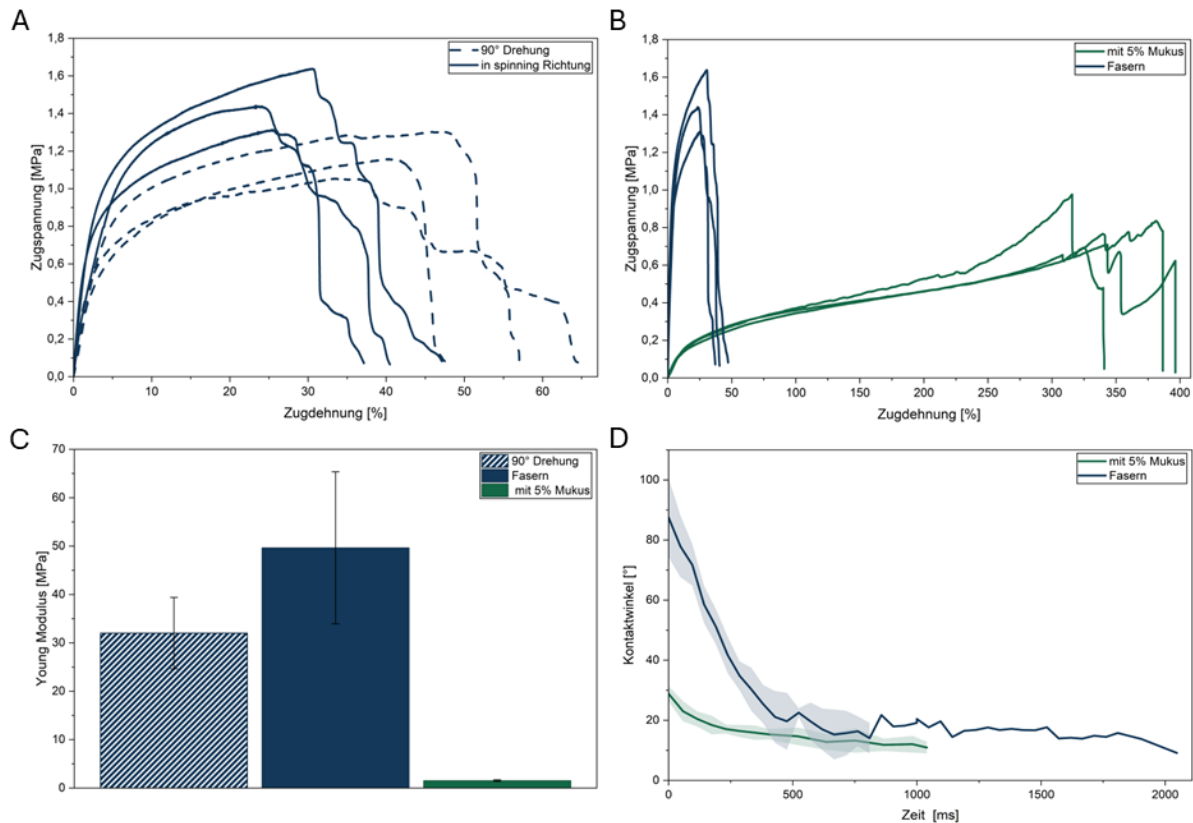


Abbildung 5: Physikochemische Charakterisierung der elektrogesponnenen Trägersysteme. A-C) Mechanischen Eigenschaften der Fasermatten, mittels Zugversuchen bestimmt und dargestellt als Spannungs-Dehnungskurven. A) Spannungs-Dehnungskurven von unbehandelten Fasermatten in Spinning-Richtung und orthogonal zur Spinning-Richtung. B) Spannungs-Dehnungskurven von Fasermatten in Spinning-Richtung mit und ohne Mukusfilm. C) Abgeleiteter Young'scher Modul als Maß für die Steifigkeit der Fasermatten. D) Zeitaufgelöste Kontaktwinkelmessungen unbehandelter und Mukus-funktionalisierter Trägersysteme.

Vergleichende spektroskopische Analysen zwischen Ausgangsstoffen und den faserbasierten Trägersystemen zeigten alle charakteristischen Banden der verwendeten Polymere und verifizierten zudem die erfolgreiche Kopplung des porcinen Mukus auf dem Trägersystems, durch die Präsenz der Kohlenhydrat-assoziierten Schwingungen im Bereich von 1050^{-1} Wellenzahlen bei den gekoppelten Fasern (Abbildung 6).

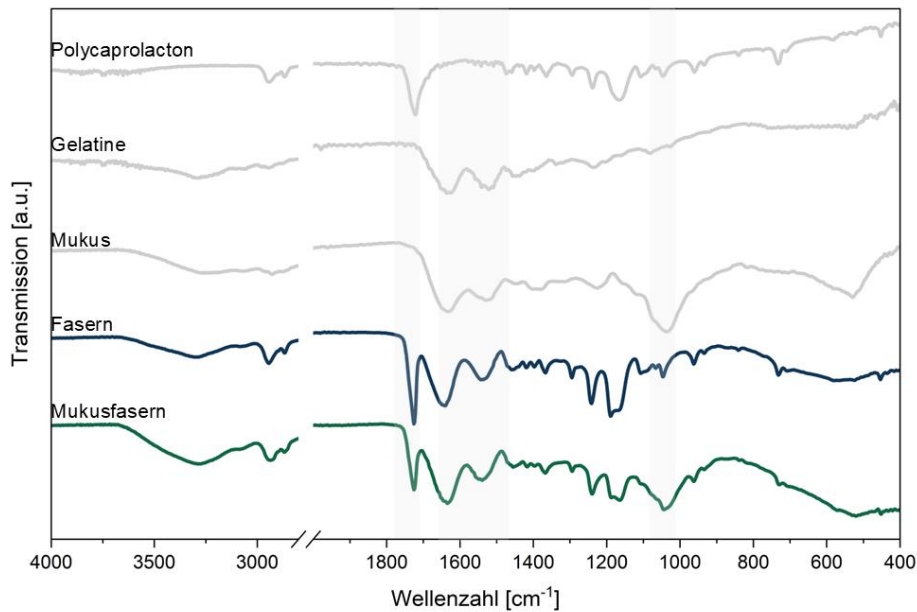


Abbildung 6: ATR-IR Spektren der Ausgangsstoffe (grau) und produzierten Fasermatten (blau und grün). Charakteristische Spektralbanden sind grau hinterlegt.

2. Kultivierung des Biofilm-Modells

Nach der Etablierung des Trägersystems wurden die elektrogesponnen Fasermatten zur Kultivierung bakterieller Biofilme verwendet. Proben (Ø 10 mm) wurden mittels Biopsiestanze präpariert, auf Nähragarplatten überführt und mit planktonischen Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase inokuliert. Die Kultivierung der Biofilme erfolgte anschließend über mehrere Tage bei 37 °C.

Zur Abbildung der Pathophysiologie mukosa-assoziierten Infektionen wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) als Modellorganismus ausgewählt. *E. coli* ist in der Fachliteratur hinsichtlich Biofilmbildung, Anpassung an mukosale Milieus und antimikrobieller Toleranz umfassend charakterisiert und zeichnet sich zusätzlich durch eine hohe klinische Relevanz aus. Pathogenen Subtypen, darunter enterohämorrhagischen oder enteropathogene Stämme, sind weltweit für ausgeprägte Mortalitäten in allen Altersgruppen verantwortlich und zählen deshalb auch zu den erweiterten ESKAPE-E Keimen. Diese Gruppe an klinisch hoch relevanten Keimen zeichnet sich durch besonders schnelle Resistenzentwicklung und allgemein schwer kontrollierbare Infektionen aus. Die Kombination aus guter experimenteller Zugänglichkeit und klinischer Bedeutung macht *E. coli* deshalb zu einem idealen und übertragbaren Modellsystem für die Untersuchung mukosa-assoziierten, intestinaler Infektionen.

Zur Etablierung der Biofilmkultivierung wurde ein statisches Modell auf Nähragar gewählt, um eine effiziente bakterielle Adhäsion zu ermöglichen und grundlegende Aspekte der Biofilmbildung zu untersuchen. Biofilme wurden zu definierten Zeitpunkten (24 h, 48 h und

72 h) mittels analytischer und bildgebender Verfahren charakterisiert. Zur Erfassung der Biofilm-Morphologie wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierfür erfolgte zunächst eine chemische Fixierung der Proben auf Basis von Glutaraldehyd, Wasseraustausch mit einer aufsteigenden Ethanolreihe, gefolgt von einer strukturerhaltenden Trocknung mittels überkritischer Punkttrocknung. Auf diese Weise konnten sowohl die Verteilung der Bakterien auf den Fasermatten als auch die Ausbildung charakteristischer Biofilmstrukturen beurteilt werden.

Bereits nach 24 h Inkubationszeit zeigte sich eine ausgeprägte, dreidimensionale Besiedlung der Fasermatten. Bakterielle Kolonien drangen tief in die poröse Struktur des Fasernetzwerks ein und führten zu einer nahezu vollständigen Überwachsung. Charakteristische Merkmale der Fasern waren zu diesem Zeitpunkt bereits kaum noch erkennbar, lediglich oberflächennahe Strukturen des porcinen Mukus blieben partiell sichtbar. Mit zunehmender Dauer der Inkubation verdichtete sich die Architektur weiter. Parallel dazu konnte eine deutliche Zunahme extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) beobachtet werden, die als strukturgebende Matrixkomponente den Zusammenhalt der bakteriellen Biofilme verstärkt. Die fortschreitende Akkumulation der EPS deutet nicht nur auf eine zunehmende Reifung der bakteriellen Kultur, sondern auch auf eine mechanische Stabilisierung des Biofilms im Laufe der Kultivierung hin. Nach 72 Stunden Inkubation präsentierten sich die finalen Biofilme mit einer ausgereiften Struktur, die eine dreidimensionale Morphologie, dichte Mikroclustern sowie lockeren Bereichen umfasst und auf eine funktionelle Differenzierung innerhalb des bakteriellen Biofilms hindeutet.

Um die Robustheit und womöglich erhöhte Toleranz der bakteriellen Zellen gegenüber Antibiosen zu untersuchen, wurden Time-Kill-Assays durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden die faserbasierten Biofilme als auch planktonische Bakteriensuspensionen mit dem Antibiotikum Gentamicin behandelt. Die gewählte Konzentration betrug dabei bereits ein Zehnfaches der Mindesthemmkonzentration ($10 \times \text{MHK}$) von *E. coli*.

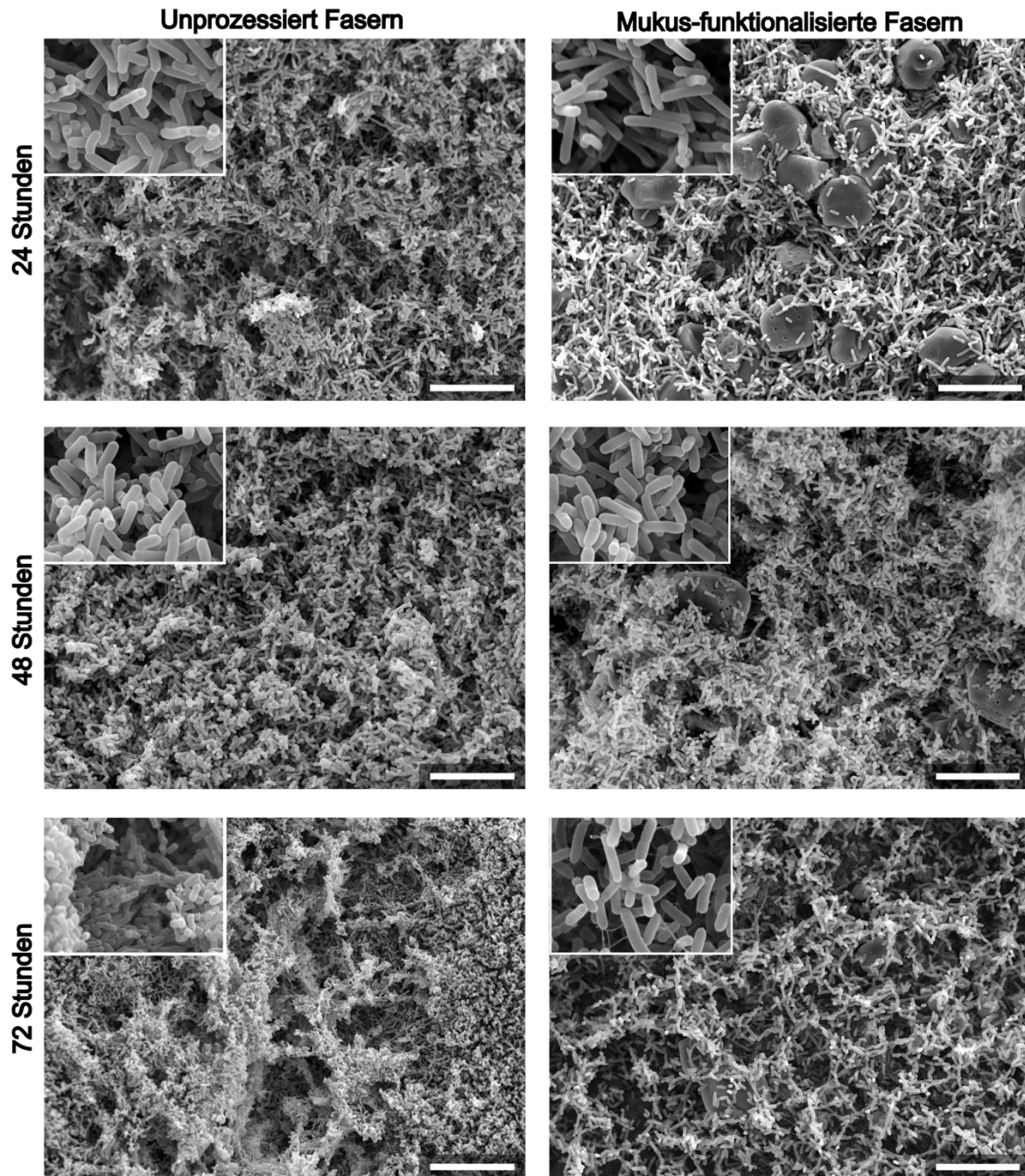


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von faser-assoziierten *E. coli* Biofilmen nach Inkubation auf unprozessierten bzw. Mukus-funktionalisierten Fasern für 24 h, 48 h oder 72 h. Gesamtübersicht mit $\times 500x$ mit vergrößerter Detailansicht mit $\times 5,000$. Maßstabsbalken = $20\ \mu\text{m}$.

Die Quantifizierung lebensfähiger Bakterien erfolgte nach 2, 6 und 24 Stunden Inkubation im Gentamicin-versetztem Medium. Die bakteriellen Zellen zeigten auf beiden Fasersystemen eine erhöhte Toleranz gegenüber der Antibiose, während die Zahl der planktonischen Bakterien durch die Behandlung deutlich reduziert wurde. Die Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien sank im Fall der biofilm-assoziierten Proben nur gering und erholt sich teilweise sogar innerhalb des Beobachtungszeitraum wieder (Abbildung 7).

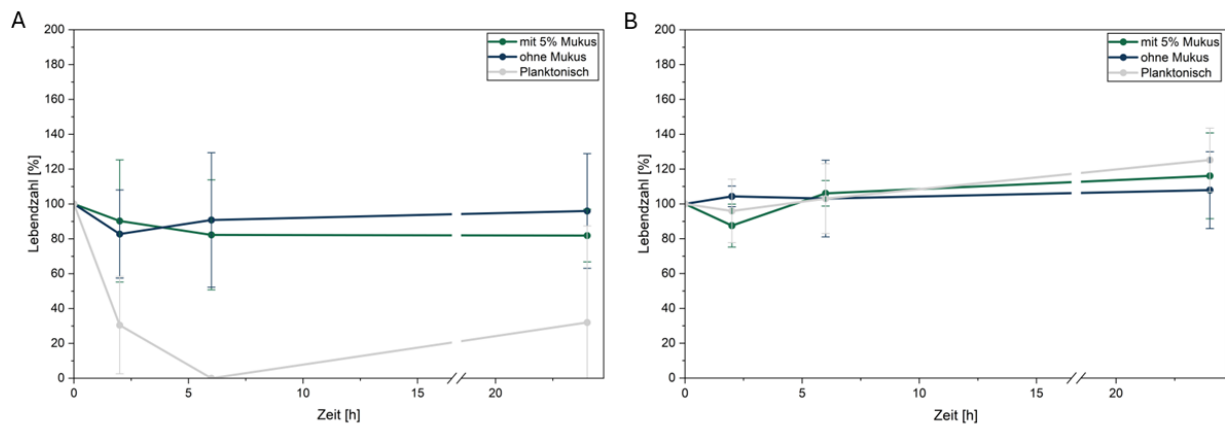


Abbildung 8: Lebendzahlbestimmung von planktonischen und biofilm-assoziierten Kulturen. Behandlung A) mit Gentamicin und B) ohne Antibiose als Kontrollgruppe.

Eine zentrale Eigenschaft ausgeprägter Biofilme ist ihre Toleranz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen, die über die klassischen Resistenzmechanismen hinausgeht. Diese gesteigerte Toleranz beruht nicht nur auf einer komplexen Biofilmarchitektur und dem Vorhandensein einer schützenden extrazellulären Matrix, sondern auch auf der Differenzierung zu physiologisch und metabolisch heterogenen bakteriellen Subpopulationen. Infolgedessen stellen biofilm-assoziierte Bakterien eine der zentralen Herausforderungen im Management klinischer Infektionen dar, da sie die Wirksamkeit konventioneller antimikrobieller Therapien erheblich einschränken und die Entwicklung persistierende Infektionen begünstigen.

Vor diesem Hintergrund unterstreichen die Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie sowie der Time-Kill-Assays die Eignung des entwickelten Systems als relevantes und robustes Modellsystem zur Untersuchung mukosa-assoziiierter Biofilminfektionen.

Zur Optimierung von Nährstoffversorgung und damit zur Förderung der Modellviabilität sowie der Ausbildung charakteristischer Biofilmstrukturen wurde in einer systematischen Studie unterschiedliche Agararten, Kultivierungstemperaturen und Versorgungsintervalle untersucht. Aufbauend auf etablierte Literaturberichte zur Biofilmbildung unter nährstofflimitierten Bedingungen und zur Rolle von Curli-Fasern wurde die Kultivierung bei Raumtemperatur und auf YESCA-Agarplatten untersucht. Curli-Fasern stellen ein zentrales Strukturelement von *E. coli* Biofilmen dar, indem sie als amyloides Protein Adhäsion an biotischen und abiotischen Oberflächen vermitteln. Darüber hinaus fördern sie maßgeblich Zell-Zell-Interaktionen und tragen damit zur gesteigerten Stabilisierung und langfristigen Persistenz bakterieller Gemeinschaften bei. YESCA-Agar enthält im Vergleich zu klassischen Nährmedien zusätzlich Casaminosäuren sowie definierte Nährstoffkomponenten, die gezielt die Expression von

Adhäsionsstrukturen und extrazellulären Matrixbestandteilen, wie z.B. Curli-Fasern, begünstigen und damit die Entwicklung biofilmassoziiertter Strukturen unterstützen.

Durch tägliches Umsetzen der Biofilme auf frische Platten konnte zudem eine kontinuierliche Versorgung der Biofilme mit Nährstoffen erreicht und somit einer lokalen Erschöpfung des Mediums entgegengewirkt werden. Unter diesen optimierten Bedingungen konnten dichter, stärker ausgeprägter und dicker bewachsener Biofilm ausgebildet werden.

3. Kultur mit Darmgewebe

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen bakteriellen Biofilmen und einem ausdifferenziertem *in vitro* Darmmodell wurden auf YESCA-Agarplatten maturierte *E. coli*-Biofilme mittels 3 mm Biopsiestanzen präpariert und in Ko-Kultur mit dem Darmmodell gebracht. Die Modelle wurden zu definierten Zeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h und 24 h) entnommen, um bakteriellen Kolonisation sowie die Integrität des Darmmodells zu evaluieren.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen nach 2 h Ko-Kultivierung weitgehend intakte zelluläre Verbände, die von extrazellulären Strukturen des Mukus bedeckt sind. Hinweise auf einen ausgeprägten bakteriellen Befall der Zelloberfläche war zu diesem Zeitpunkt morphologisch nicht erkennbar. Die quantitative Bestimmung planktonischer Bakterien aus dem apikalen sowie aus dem basolateralen Kompartiment ergaben jedoch, dass bereits zu diesem Zeitpunkt in sämtlichen Modellen planktonische *E. coli* nachweisbar waren. Nach 4-6 h Inkubation ist eine Adhäsion einzelner *E. coli* Zellen an die Oberflächen eukaryotischen Zellen erkennbar, wobei der eukaryotische Zellverbund noch keine morphologischen Defekte aufweist. Die Zahl der planktonischen Bakterien stieg parallel dazu stetig an (Abbildung 10).

Nach 12 h Ko-Kultivierung wiesen die Modelle einen dichten bakteriellen Bewuchs auf den zellulären Oberflächen auf, begleitet von ersten sichtbaren strukturellen Defekten des epithelialen Zellverband. Nach 24 h waren auf den Membranen der Transwell®-Inserts nur noch vereinzelte eukaryotisch Zellen aufzufinden, die von dichten bakterielle Mikrocluster umgeben bzw. überwachsen waren. Die Anzahl planktonischer Bakterien im Modell entsprach am Ende der Inkubation jener von ausgewachsenen Flüssigkulturen (Abbildung 10).

Die Ko-Kulturen wurden vollumfänglich mit den im Projekt etablierten Charakterisierungstechniken analysiert und die Kultivierung optimiert. Der geplante Transfer auf kommerzielle Modelle konnte nicht im geplanten Umfang durchgeführt werden, da die Firma MatTek im Spätsommer 2025 von der Firma Sartorius übernommen wurde und es dadurch zu erheblichen Verfügbarkeitsproblemen bei den benötigten Modellen kam. Da der Transfer der Biofilme auf die im eigenen Labor generierten Ko-Kulturmodelle des Darms keinerlei Probleme ergab und diese genau wie kommerzielle Modelle in Transwell®-Inserts

kultiviert werden, kann geschlussfolgert werden, dass der Transfer auf kommerzielle Modelle ebenfalls problemlos möglich ist.

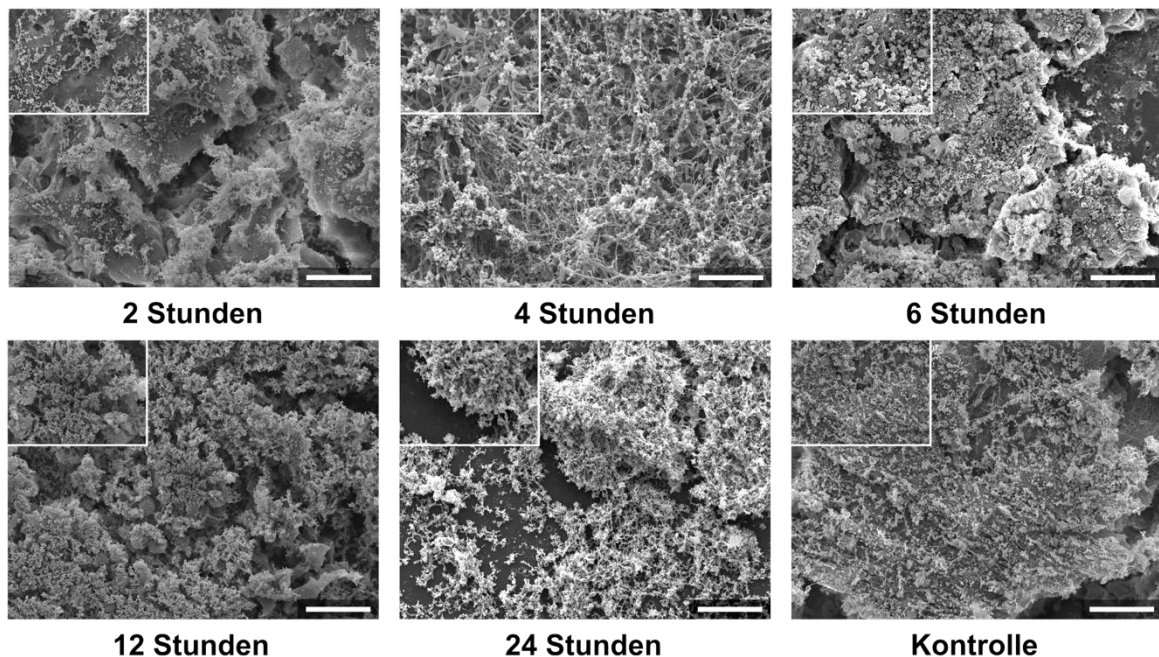


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der zeitabhängigen Interaktion von maturierten *E. coli* Biofilmen mit einem in vitro Darmmodell im Verlauf von 24 Stunden. Gesamtübersicht mit x 500 mit vergrößerter Detailansicht mit x 5,000. Maßstabsbalken = 20 μm .

4. Proof-of-Concept Studie zur Übertragbarkeit auf andere Epithelien

Nach der erfolgreichen Kultivierung von *E. coli* Biofilmen auf dem faserbasierten Trägersystem zur Modellierung intestinaler Infektionen wurde im nächsten Schritt die Transferierbarkeit auf pulmonale Biofilme überprüft. Im Kontext von pulmonalen Infektionen werden weitaus flachere Architekturen mit dünneren Biofilmen beschrieben, weshalb die Dicke des elektrogewebenen Trägers angepasst und das System erneut charakterisiert wurde. Hierbei konnten keine Unterschiede zu dem bereits optimierten Träger gefunden werden.

Zur Übertragung auf den respiratorischen Kontext wurde *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) als Modellorganismus für pulmonale, mukosa-assoziierte Infektionen gewählt. *A. baumannii* ist in der Fachliteratur hinsichtlich Biofilmbildung, Persistenz auf epithelialen Oberflächen sowie einer ausgeprägten Toleranz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen umfassend beschrieben und besitzt zudem eine hohe klinische Relevanz, insbesondere im Zusammenhang mit nosokomialen Atemwegsinfektionen. Multiresistente Stämme zählen weltweit zu den problematischsten Erregern in der Intensivmedizin und sind mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert. Aufgrund seiner Fähigkeit, unter widrigen Umweltbedingungen stabile Biofilme zu etablieren, sowie seiner klinischen Bedeutung eignet

sich dieser Keim als komplementäres Modellsystem zur Untersuchung mukosa-assoziierten Infektionen im pulmonalen Milieu. Bakterielle Biofilme wurden für diese Kondition analog zum bereits beschriebenen Procedere auf Nähragarplatten für mehrere Tage bei 37 °C kultiviert (Abbildung 10).

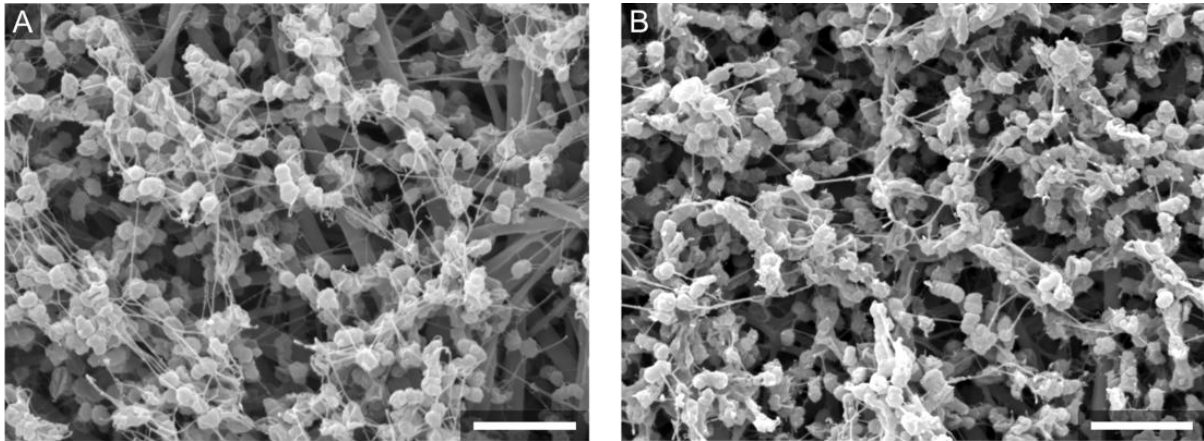


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von maturierten *A. baumannii* Biofilmen nach 72 h Inkubation. A) Biofilme auf unbehandelten Fasermatten B) Biofilme auf mukus-funktionalisierten Trägersystemen. Gesamtübersicht x 5,000. Maßstabsbalken = 4 µm.

Die Untersuchung der antimikrobiellen Empfindlichkeit von *A. baumannii* zeigte, dass biofilmassoziierte Zellen im Vergleich zu planktonischen Kulturen eine erhöhte Toleranz aufwiesen. Über den Versuchszeitraum hinweg konnte zudem eine Erholung der zellulären Viabilität für die planktonischen und biofilm-assoziierten Zellen auf unbehandelten Fasermatten beobachtet werden. Mukus-assoziierte Biofilme hingegen wiesen gegen Ende der Inkubation eine deutlich reduzierte Viabilität auf (Abbildung 11).

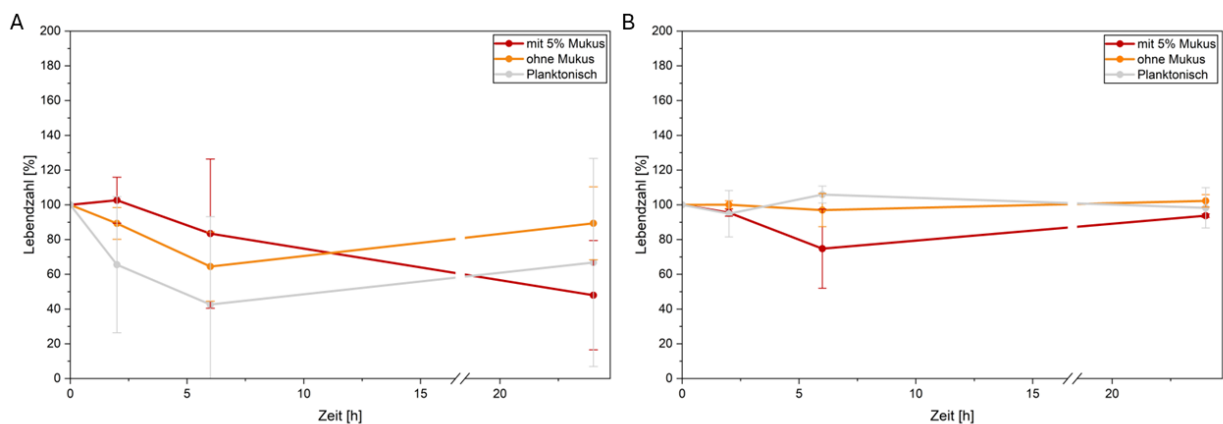


Abbildung 11: Lebendzahlbestimmung nach Behandlung A) mit Gentamicin und b) ohne Antibiose als Kontrollgruppe

Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse sowie der Time-Kill-Assays beweisen erneut die Eignung des faserbasierten Trägersystems als geeignetes Substrat für die Modellierung maturierter bakterieller Biofilme.

5. Aufarbeitung der Ergebnisse

Im Verlauf dieses Projekts wurde ein experimentelles Biofilmmodell entwickelt, das basierend auf elektrogesponnenen Fasern die physiologischen Bedingungen mukosaler Infektionen sowohl im intestinalen als auch pulmonalen Kontext realitätsnahe abbildet. Während der Förderperiode wurden maßgebliche Herstellungsparameter systematisch identifiziert und Protokolle für GMP-konformes Upscaling erarbeitet, um einen reibungslosen Methodentransfer zu gewährleisten. Das entwickelte System erlaubt eine reproduzierbare Kultivierung und Analyse komplexer bakterieller Biofilme unter biorelevanten Bedingungen und erwies sich für unterschiedliche Pathogene und Fragestellungen als vielseitig einsetzbar.

Die Ergebnisse liefern essenzielle Einblicke in die Mechanismen der Biofilmbildung und -stabilisierung sowie in die dynamischen Wechselwirkungen zwischen bakteriellen Gemeinschaften und dem Wirtsmilieu. Darüber hinaus bietet das Modell eine belastbare Grundlage für die präklinische Bewertung neuartiger antimikrobieller Wirkstoffe, Formulierungen und kombinatorischer Therapiekonzepte und eignet sich gleichermaßen für grundlagenorientierte Untersuchungen zur Entstehung mukosaler Biofilme.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten experimentellen Daten stellen eine valide Grundlage für die Einbindung in öffentliche Datenbanken zur Erfassung und Bewertung alternativer *in vitro*-Modelle, beispielsweise AnimAL-ZEBET, dar. Damit leisten die Ergebnisse einen Beitrag zur Weiterentwicklung tierfreier Teststrategien und zur Stärkung translationaler *in vitro* Ansätze.

Die zentralen Ergebnisse des Projekts werden derzeit in Form eines wissenschaftlichen Manuskripts finalisiert, um eine zeitnahe Open-Access-Veröffentlichung und eine uneingeschränkte Zugänglichkeit, sicherzustellen.

In zukünftigen Arbeiten sollen metabolische und physiologische Differenzierungen innerhalb der maturierten bakteriellen Gemeinschaft mit fortgeschrittenen Methoden wie der Durchflusszytometrie, differentiellen Fluoreszenzfärbungen sowie der RT-qPCR systematisch charakterisiert werden. Ergänzend dazu werden mechanische Veränderungen während der Reifungsphase mittels zeitaufgelöster Nanoindentierung untersucht, um funktionelle Zusammenhänge zwischen Struktur, Metabolismus und Materialeigenschaften zu etablieren.

Auf dieser Grundlage sollen Validierungsstudien mit weiteren klinisch relevanten Referenzstämmen sowie multiplen bakteriellen Spezies durchgeführt werden, um die Anwendungsbreite des Modells zu prüfen und komplexe mikrobielle Interaktionen innerhalb polymikrobieller Gemeinschaften abzubilden. Ziel ist es, das System als standardisierte, anwendungsnahe Plattform für pharmakologische Testungen und mechanistische Untersuchungen weiterzuentwickeln.

Ein zentraler Aspekt zukünftiger Arbeiten wird zudem die systematische Untersuchung von Wirkstofftransportprozessen innerhalb maturierter Biofilme sein. Insbesondere soll geklärt werden, inwieweit antimikrobielle Wirkstoffe in der Lage sind, dichte, physiologisch gereifte Biofilmstrukturen zu permeieren und in funktionell relevante Tiefen vorzudringen. Hierzu sollen standardisierte Prüfbedingungen identifiziert werden sowie Protokolle erarbeitet werden für die Integration in etablierte präklinische Testpipelines. Dazu sind kombinierte Ansätze aus bildgebender Analytik, quantitativer Penetrationsmessung und funktionellen Wirksamkeitsassays geplant, um Zusammenhänge zwischen Biofilmarchitektur, Matrixzusammensetzung und Wirkstoffverteilung zu entschlüsseln. Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, Barrieren der Biofilmpерmeation besser zu verstehen und gezielt Strategien zur Verbesserung der antiinfektiven Therapie, beispielsweise durch optimierte Formulierungen oder kombinatorische Behandlungsansätze, zu entwickeln.

6. Finales Statement

Das Forschungsvorhaben leistet einen substanziellen Beitrag zur Umsetzung der 3R-Prinzipien, indem ein biorelevantes *In-vitro* Modellsystem als tierfreie Alternative zur Untersuchung mukosa-assoziiierter Infektionen etabliert wurde. In der präklinischen Infektionsforschung werden derzeit überwiegend säugetierbasierte Tiermodelle eingesetzt, um Infektionen auf Schleimhautoberflächen zu untersuchen. Allein im vergangenen Jahr wurden hierfür laut Angaben des Deutschen Zentrums zum Schutz von Versuchstieren mehr als fünf Prozent der rund 1,33 Millionen genutzten Tiere in wissenschaftlichen Versuchen eingesetzt. Die aus solchen Modellen gewonnenen Ergebnisse bieten jedoch aufgrund grundlegender anatomischer, physiologischer und immunologischer Differenzen zwischen Tier und Mensch häufig nur beschränkte translationale Aussagekraft. Darüber hinaus sind die im Tiermodell induzierten Pathologien nicht nur zwischen Mensch und Tier, sondern häufig auch innerhalb einer Versuchsgruppe hoch variable, da individuelle Variationen im Infektionsverlauf, der Immunantwort und der Gewebereaktion zu einer hohen biologischen Streuung führen. Das entwickelte Modell adressiert diese Limitationen, indem es wesentliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften mukosaler Gewebe reproduzierbar sowie realitätsnahe nachbildet. Das Modell ist sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die präklinische Testung neuer

Arzneistoffe und Arzneimittel einsetzbar. Dadurch ermöglicht es die Untersuchung infektiologischer Fragestellungen unter kontrollierten und physiologisch relevanten Bedingungen ohne Einsatz von Tiermodellen und trägt somit in erheblichem Maße zur Reduktion von Tierleid als auch zur methodischen Weiterentwicklung präklinischer Testsysteme bei.