



**Fraunhofer Institut für Toxikologie und  
Experimentelle Medizin – Fraunhofer ITEM  
Universitätsklinikum Jena  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

# ImmunAvatar

## Make your immune system GREAT again

**Koordination:**

**Leiter:**

PD. Dr. Alexander Mosig  
Universitätsklinikum Jena

## Inhalt

1.	Kurzdarstellung.....	3
1.1	Aufgabenstellung.....	3
1.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde .....	3
1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens .....	3
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	5
1.5	Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden .....	7
1.6	Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste .....	7
1.7	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	11
2.	Eingehende Darstellung.....	12
2.1	Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele .....	12
2.1.1	Einfluss von pro-inflammatorischen Mediatoren auf intestinale Epithelzellen.....	12
2.1.3	Humane Precision-cut intestinal slices als immunkompetentes <i>ex vivo</i> Modell für die Testung von Medikamenten .....	15
2.2	Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises .....	15
2.3	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	16
2.4	Der voraussichtliche Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans .....	16
2.5	Der während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	20
2.6	Der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.....	21
3.	Kurzgefasster Erfolgskontrollbericht .....	22
3.1	Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen, z.B des Förderprogramms - (ggf. unter Angabe des Schwerpunkts) .....	22
3.2	Das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen.....	22
3.3	Fortschreibung des Verwertungsplans.....	23
3.3.1	Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte.....	23
3.3.2	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende .....	23
3.3.3	Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende.....	23
3.3.4	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse.....	23
3.3.5	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben .....	24

3.3.6	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer.....	24
3.3.7	die Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung .....	24
4	Literaturverzeichnis .....	26

## 1. Kurzdarstellung

### 1.1 Aufgabenstellung

Im Zentrum dieses Antrags standen Immun- und Entzündungsmechanismen, die eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von Erkrankungen wie Lebererkrankungen, Colitis ulcerosa, multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und Diabetes spielen. Sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem sind maßgeblich an der Entwicklung dieser Erkrankungen beteiligt. Derzeit fehlen adäquate In-vitro-Modelle, die diese komplexen immunologischen Prozesse patientennah nachbilden können.

Im Rahmen des ImmunAvatar Projekts sollten spezifisch für die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NASH) und Colitis ulcerosa (IBD) ein Leber-Fettgewebe-Immun-Chip sowie ein Leber-Fettgewebe-Darm-Immunchip entwickelt werden. Diese Chips sollten in der Lage sein, biologische Immunantworten von der Krankheitsentstehung bis zur Therapie vorherzusagen. Geplant war die Entwicklung einer mikrofluidischen Multi-Organ-Plattform, die die Interaktionen zwischen Leber, Fettgewebe und Darm *in vitro* nachbildet. Diese Plattform sollte auf der Basis von primärem Spendermaterial die Durchführung flexibler, personalisierter Tests mit verschiedenen Therapieoptionen für die Behandlung der nichtalkoholischen Steatohepatitis und Colitis ulcerosa ermöglichen.

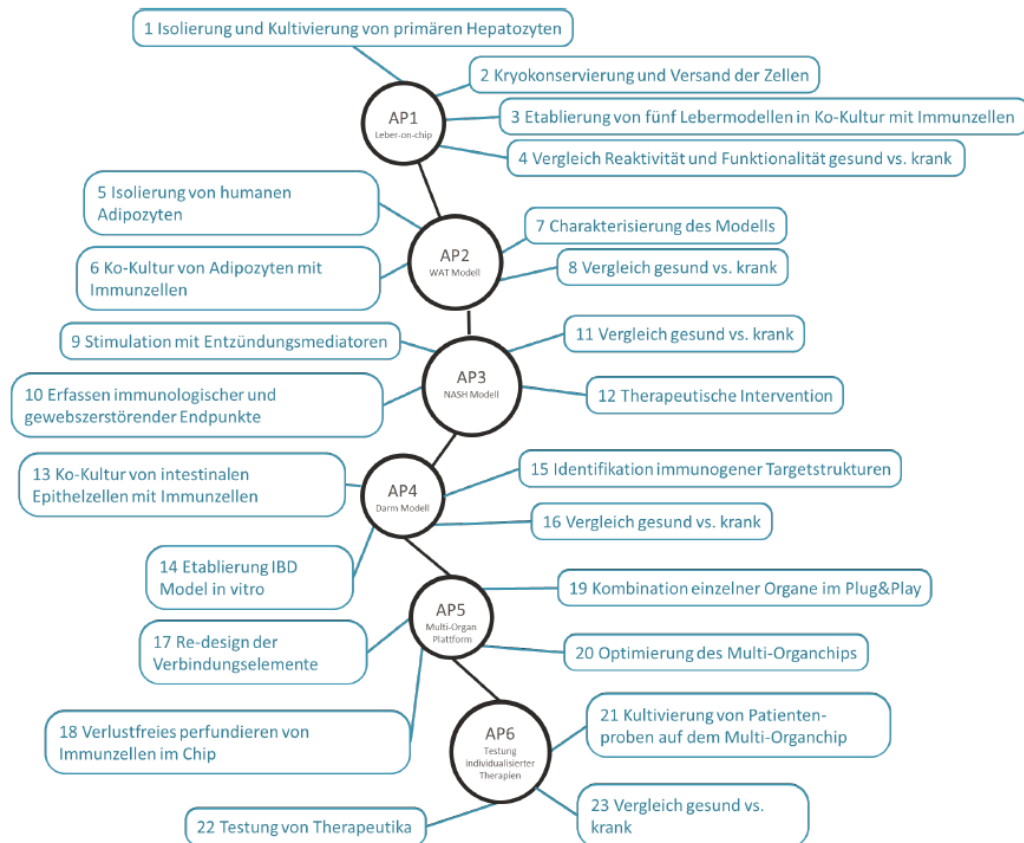
### 1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Beim Kreativ-Workshop „*In Vitro* Challenge“, der 2018 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) veranstaltet wurde, überzeugte das ImmunAvatar Team mit der Präsentation der Idee „Make your immune system GREAT again“. Diese Idee wurde zur Einreichung eines Antrags für eine vertiefende Sondierungsphase empfohlen, mit dem Ziel einer späteren Projektförderung.

Für das Projekt ImmunAvatar wurden daraufhin Fördermittel für eine einjährige Sondierungsphase beantragt und bewilligt, während derer die zuvor genannten Aufgaben bearbeitet wurden. Nach Abschluss der Sondierungsphase wurde der Antrag für das hier berichtete Projekt gestellt und genehmigt. Die im Workshop identifizierten Kernfragen wurden in der Sondierungsphase sowie im daraus resultierenden und hier berichteten Projekt ImmunAvatar weiter verfeinert und den klinischen Anforderungen angepasst.

### 1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Antragssteller identifizierten und planten im Rahmen des Projektes 6 Arbeitspakete und deren jeweiligen Unter Aspekte. Der zeitliche Ablauf, sowie die einzelnen Meilensteine sind dem GANTT Diagramm (s.u.) zu entnehmen. Fraunhofer ITEM war vor allem für die Durchführung des AP4 verantwortlich.



**Abbildung 1: Mindmap zum ImmunAVATAR-Projekt: AP.1 – Leber-on-chip.** Im ersten Arbeitspaket wurde NASH im Leber-on-chip System unter der Verwendung von Spenderzellen von NASH Patienten nachgebildet. **AP.2 – WAT Modell.** Im zweiten Arbeitspaket wurde der an der EKUT bereits entwickelte WAT-on-Chip-Prototyp optimiert und durch Integration von Immunzellen weiterentwickelt werden. **AP.3 – NASH Modell.** Im Arbeitspaket 3 sollte das Krankheitsmodell der NASH auf dem Lebermodell mit primären Spenderzellen etabliert werden. **AP.4 – Darm Modell:** Im Arbeitspaket 4 sollten immunkompetente *in vitro* Darmmodelle aufgebaut werden, die frühe und späte Ereignisse in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen widerspiegeln. **AP.5 – Multi-Organ-Plattform:** Eigene Vorarbeiten mit dem Ansatz der flexiblen plug&play Verbindung von einzelnen Organ-Plattformen sollten zu einer 2- bzw. 3-Organ-Plattform weiterentwickelt und optimiert werden. **AP.6 – Testung individualisierter Therapien:** Lebermodelle sollten auf dem mikrofluidischen Multi-Organchip gemeinsam mit dem WAT- und Darmmodell kultiviert und für die Testung von Therapieoptionen zur Behandlung chronisch entzündlicher Leber- und Darmerkrankungen genutzt werden.

**Tabelle 1.** Gantt-Diagramm zur Laufzeit der Arbeitspakete.

Arbeitspaket	Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
	Q 1	Q 2	Q 3	Q 4	Q 1	Q 2	Q 3	Q 4	Q 1	Q 2	Q 3	Q 4
1 - Entwicklung des Leber-on-chip auf Basis primärer humaner Spenderzellen (UKJ / Charité)				1 ▼								
2 - WAT Model aus primären Spenderzellen (EKUT)				2 ▼								
3 - Etablierung des NASH Models (UKJ / Charité)							3 ▼					
4 - Modellierung entzündlicher Darmerkrankungen (ITEM / UKJ)							4 ▼					
5 - Etablierung einer Multi-Organ-Plattform (EKUT/ UKJ)									5 ▼			
6 - Testung individualisierte Therapieansätze (Charité, UKJ, EKUT, ITEM)												

Meilensteine (▼):

1. Leber-on-chip Modelle auf Basis primärer Zellen etabliert – Projektmonat 12
2. WAT Modelle auf Basis primärer Zellen etabliert – Projektmonat 12
3. NASH Krankheitsmodell etabliert – Projektmonat 21
4. IBD Krankheitsmodell etabliert – Projektmonat 21
5. Multi-Organ-Plattform verfügbar – Projektmonat 27

#### 1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

**Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD):** Primäre humane Zellen, insbesondere Hepatozyten, sind der Goldstandard für die Untersuchung der pathophysiologischen Prozesse bei der Entstehung der nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH), da sie typische NASH-assoziierte Veränderungen wie Fetteinlagerungen und Stressreaktionen nachweisen können. Alternativ können humane pluripotente Stammzellen zu *hepatocyte-like cells* differenziert werden, die den genetischen Hintergrund des Patienten abbilden können, mit dem Nachteil einer geringen Stoffwechselaktivität. Andere Zelllinien wie HepG2 und Huh 7 zeigen ebenfalls eine reduzierte Stoffwechselaktivität und können die genetischen Eigenschaften von NASH-Patienten nicht realitätsnah *in vitro* darstellen. Verschiedene *in vitro* Modelle, darunter perfundierte Zellkulturen und mikrofluidische Plattformen, haben bereits wichtige pathophysiologische Prozesse der NASH, wie die Aufnahme von Fettsäuren und die daraus resultierenden lipotoxischen Effekte, nachgebildet. Trotz dieser Fortschritte reichen die vorhandenen Modelle nicht aus, um die Mechanismen der Krankheit umfassend zu verstehen. Fortschrittlichere Modelle, die nicht nur Hepatozyten, sondern auch andere relevante Zelltypen wie Sternzellen, Immunzellen und Endothelzellen umfassen, sind notwendig, um eine detailliertere und ganzheitlichere Darstellung der Leber und der NASH zu ermöglichen.

**Entzündliche Darmerkrankungen (IBD):** Entzündliche Darmerkrankungen (IBD) sind lebenslange, fortschreitende Erkrankungen, die durch chronische, wiederkehrende Entzündungen der Darmschleimhaut gekennzeichnet sind. Zu den IBD gehören Morbus Crohn, der jeden Abschnitt des Magen-Darm-Trakts befallen kann, und Colitis ulcerosa, die sich vor allem im Dickdarm manifestiert (Sairenji et al. 2017). Häufige Symptome von IBD sind Bauchschmerzen, Durchfall, rektale Blutungen

und Gewichtsverlust (Fakhoury et al. 2014). Darüber hinaus stellt IBD einen hohen Risikofaktor für andere Krankheiten wie Dickdarmkrebs, Herz-Kreislauf- und Atemwegserkrankungen dar, was zu einer höheren Sterblichkeitsrate bei diesen Patienten im Vergleich zur gesunden Bevölkerung führt (Canavan et al. 2006; Olén et al. 2020). Weltweit leiden etwa 5 Millionen Menschen an IBD, wobei die Prävalenz stetig zunimmt (Wang et al. 2023). IBD beginnt typischerweise im frühen Erwachsenenalter und schreitet dann in einem chronischen, rezidivierenden Muster fort, was eine enorme Belastung für das Gesundheitswesen und die Sozioökonomie darstellt (Burisch et al. 2013; Sairenji et al. 2017). Trotz aktueller Fortschritte in der Forschung sind die Ätiologie und Pathogenese von IBD noch immer nicht vollständig verstanden. Klinische und experimentelle Studien deuten darauf hin, dass die Krankheit bei genetisch anfälligen Personen durch eine abnorme Immunreaktion auf Umwelteinflüsse verursacht wird, die zu einer Schädigung der Darmbarriere, einer anhaltenden Entzündung und Gewebeschäden führt (Souza und Fiocchi 2016; Maloy und Powrie 2011). Der entzündliche Phänotyp bei IBD ist durch eine massive Infiltration von Th1- und Th17-Zellen in den Darm gekennzeichnet, zusammen mit erhöhten Zytokinspiegeln wie IL-17, IL-21, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Jiang et al. 2023; Cao et al. 2023). Darüber hinaus wurde bei IBD eine erhöhte Häufigkeit zytotoxischer T-Zellen beobachtet (Kappeler und Mueller 2000; Müller et al. 1998). Proinflammatorische Mediatoren wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie von zytotoxischen T-Zellen freigesetzte Perforine und Granzyme verschlimmern möglicherweise Gewebeschäden, indem sie direkt auf die Epithelbarriere des Darms einwirken (Kappeler und Mueller 2000; Casalegno Garduño und Däbritz 2021).

*In vitro*-Modelle zur Nachbildung der entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) erfassen meist nur Teilaspekte der Erkrankung, was vor allem auf begrenztes Wissen über die physiologischen Interaktionen und die Komplexität der Erkrankungen zurückzuführen ist. Es gibt fünf Hauptkategorien von *in vivo* IBD-Modellen: antigen- oder mikrobiell-induziert, chemisch, immunologisch oder physikalisch induziert, transgene oder knockout, adoptiver Transfer und spontane Kolitis. Ein häufig verwendetes Modell ist die chemisch induzierte Colitis bei Nagern, vor allem mit 2,4,6-Trinitrobenzensulfid Säure (TNBS), die eine Entzündung und typische Merkmale der Morbus Crohn (MC) nachahmt. Ein weiteres Modell verwendet Dextranatriumsulfat (DSS) zur Induktion von epithelalem Schaden. Neben *in vivo*-Modellen gibt es auch zellbasierte *in vitro* und *ex vivo* Modelle, darunter tierische Zellen, veränderte humane intestinale Zelllinien oder isolierte Darmzellen aus Resektionen. Für Kurzzeitstudien können vitale humane Darmepithelzellen aus Biopsien von IBD-Patienten genutzt werden, die bis zu 48 Stunden vital bleiben und wichtige metabolische und immunologische Aspekte des humanen Darmepitheliums widerspiegeln. *Ex vivo* IBD-Modelle wie Mukosale Explant-Gewebekulturen werden ebenfalls weiterentwickelt, um die Gewebevitalität zu erhöhen und eine polarisierte Epithelschicht zu bilden.

Fettgewebe: Obwohl das weiße Fettgewebe (WAT) bis zu 50% des Körpergewichts in Krankheitsfällen ausmacht und eine erhebliche Rolle spielt, wurde es lange Zeit nur als einfaches Speicher- und Energieversorgungsorgan betrachtet. Heutzutage wird es jedoch auch als bedeutendes endokrines Organ anerkannt, das eine Vielzahl von Adipokinen ausschüttet, welche bei vielen menschlichen Krankheiten, insbesondere entzündlichen Erkrankungen der Leber und des Darms, eine Rolle spielen. Die Entwicklung von Arzneimitteln, die direkt auf das Fettgewebe abzielen, gewinnt zunehmend an Bedeutung. In jüngerer Zeit wurden verschiedene Ansätze zur Erzeugung von künstlichem Fettgewebe vorgestellt. Oftmals werden Adipozyten in 3D-Umgebungen aus verschiedenen Biomaterialien wie Kollagen/Alginat und porösen Polymeren eingebettet. Diese Systeme sind vielversprechend für die regenerative Medizin, stoßen jedoch als *in vitro* Modelle aufgrund fehlender Perfusion an Grenzen, die teilweise durch die Integration in Bioreaktoren überwunden werden konnten. Zudem wurden auch erste Versuche unternommen, mikrofluidische Systeme für die Kultivierung oder Differenzierung von

Fettgewebe zu verwenden, wobei die Designs von einfachen Zellkammern bis zu komplexen Gewebekompartimenten reichen.

Eigene Expertisen und Vorarbeiten: Die eigenen Vorarbeiten, so wie eine umfangreiche Expertise der einzelnen Kooperationspartner auf ihren jeweiligen Fachgebieten umfassten Leber-on-chip Modelle (Universitätsklinikum Jena), ein Darm-on-chip Modell (Universitätsklinikum Jena), die Antigen-spezifische und antigen-unspezifische Aktivierung und Expansion von naiven, humane CD4+, CD8+-T-Lymphozyten (Fraunhofer ITEM), White adipose tissue (WAT)-on-chip (Eberhard Karls Universität Tübingen), Multi-Organ-Chip Plattform Fett-Leber-Achse (Universitätsklinikum Jena).

1.5 Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

Von Fraunhofer Seite wurden keine Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte von Dritten für die Durchführung des Projektes verwendet.

1.6 Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Neben dem durch die langjährige Erfahrung angeeignetem Wissen wurden für die Erstellung des Originalantrages die damals aktuellen Fachliteraturquellen aus Datenbanken wie Pubmed, etc. herangezogen (eine Auswahl von eigenen und weiteren Referenzen ist in Abbildung 2 dargestellt)

**Tabelle 2 Auswahl von eigenen und weiteren Referenzen**, die für den Stand der Wissenschaft und Technik die Grundlage des Originalantrages dienten

1. Hundertmark, J., O. Krenkel, and F. Tacke, <i>Adapted Immune Responses of Myeloid-Derived Cells in Fatty Liver Disease</i> . Front Immunol, 2018. <b>9</b> : p. 2418.
2. Sanyal, A.J., B.A. Neuschwander-Tetri, and J. Tonascia, <i>End Points Must Be Clinically Meaningful for Drug Development in Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i> . Gastroenterology, 2016. <b>150</b> (1): p. 11-3.
3. Santhekadur, P.K., D.P. Kumar, and A.J. Sanyal, <i>Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease</i> . J Hepatol, 2018. <b>68</b> (2): p. 230-237.
4. Younossi, Z.M., et al., <i>The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe</i> . Hepatology, 2016. <b>64</b> (5): p. 1577-1586.
5. Cusi, K., <i>Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications</i> . Gastroenterology, 2012. <b>142</b> (4): p. 711-725 e6.
6. Neuschwander-Tetri, B.A., <i>Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites</i> . Hepatology, 2010. <b>52</b> (2): p. 774-88.
7. Puri, P., et al., <i>A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease</i> . Hepatology, 2007. <b>46</b> (4): p. 1081-90.
8. Haas, J.T., et al., <i>Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression</i> . Cell Metab, 2012. <b>15</b> (6): p. 873-84.
9. Lanaspa, M.A., et al., <i>Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver</i> . J Biol Chem, 2012. <b>287</b> (48): p. 40732-44.
10. Feldstein, A.E., et al., <i>Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis</i> . Gastroenterology, 2003. <b>125</b> (2): p. 437-43.

11. Gadd, V.L., et al., <i>The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease</i> . Hepatology, 2014. <b>59</b> (4): p. 1393-405.
12. Marra, F. and F. Tacke, <i>Roles for chemokines in liver disease</i> . Gastroenterology, 2014. <b>147</b> (3): p. 577-594 e1.
13. Ganz, M., et al., <i>Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice</i> . J Transl Med, 2015. <b>13</b> : p. 193.
14. Talukdar, S., et al., <i>Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase</i> . Nat Med, 2012. <b>18</b> (9): p. 1407-12.
15. Rensen, S.S., et al., <i>Neutrophil-derived myeloperoxidase aggravates non-alcoholic steatohepatitis in lowdensity lipoprotein receptor-deficient mice</i> . PLoS One, 2012. <b>7</b> (12): p. e52411.
16. Tacke, F. and H. Yoneyama, <i>From NAFLD to NASH to fibrosis to HCC: role of dendritic cell populations in the liver</i> . Hepatology, 2013. <b>58</b> (2): p. 494-6.
17. Ganz, M. and G. Szabo, <i>Immune and inflammatory pathways in NASH</i> . Hepatol Int, 2013. <b>7 Suppl 2</b> : p. 771- 81.
18. Rau, M., et al., <i>Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver</i> . J Immunol, 2016. <b>196</b> (1): p. 97-105.
19. Tsuchida, T. and S.L. Friedman, <i>Mechanisms of hepatic stellate cell activation</i> . Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. <b>14</b> (7): p. 397-411.
20. Bhattacharjee, J., et al., <i>Hepatic Natural Killer T-cell and CD8+ T-cell Signatures in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis</i> . Hepatol Commun, 2017. <b>1</b> (4): p. 299-310.
21. Caligiuri, A., A. Gentilini, and F. Marra, <i>Molecular Pathogenesis of NASH</i> . Int J Mol Sci, 2016. <b>17</b> (9).
22. Tilg, H. and A.R. Moschen, <i>Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis</i> . Hepatology, 2010. <b>52</b> (5): p. 1836-46.
23. <i>Gastroenterologie: Leber und Darm – eine enge Allianz</i> . Dtsch Arztebl International, 2010. <b>107</b> (10): p. 453.
24. Wehkamp, J., et al., <i>Inflammatory Bowel Disease</i> . Dtsch Arztebl Int, 2016. <b>113</b> (5): p. 72-82.
25. Barros, L.L., A.Q. Farias, and A. Rezaie, <i>Gastrointestinal motility and absorptive disorders in patients with inflammatory bowel diseases: Prevalence, diagnosis and treatment</i> . World J Gastroenterol, 2019. <b>25</b> (31): p. 4414-4426.
26. Tegtmeyer, D., et al., <i>Inflammatory bowel disease caused by primary immunodeficiencies-Clinical presentations, review of literature, and proposal of a rational diagnostic algorithm</i> . Pediatr Allergy Immunol, 2017. <b>28</b> (5): p. 412-429.
27. Lee, S.H., J.E. Kwon, and M.L. Cho, <i>Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease</i> . Intest Res, 2018. <b>16</b> (1): p. 26-42.
28. Lee, S.Y., et al., <i>Metformin Ameliorates Inflammatory Bowel Disease by Suppression of the STAT3 Signaling Pathway and Regulation of the between Th17/Treg Balance</i> . PLoS One, 2015. <b>10</b> (9): p. e0135858.
29. Burisch, J. and P. Munkholm, <i>Inflammatory bowel disease epidemiology</i> . Curr Opin Gastroenterol, 2013. <b>29</b> (4): p. 357-62.
30. Kapoor, A., V. Bhatia, and A. Sibal, <i>Pediatric Inflammatory Bowel Disease</i> . Indian Pediatr, 2016. <b>53</b> (11): p. 993-1002.
31. Abraham, B.P., S. Mehta, and H.B. El-Serag, <i>Natural history of pediatric-onset inflammatory bowel disease: a systematic review</i> . J Clin Gastroenterol, 2012. <b>46</b> (7): p. 581-9.
32. Neurath, M., <i>Current and emerging therapeutic targets for IBD</i> . Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. <b>14</b> (11): p. 688.
33. Olen, O., et al., <i>Increased Mortality of Patients With Childhood-Onset Inflammatory Bowel Diseases, Compared With the General Population</i> . Gastroenterology, 2019. <b>156</b> (3): p. 614-622.

34. Olen, O., et al., <i>Mortality in adult-onset and elderly-onset IBD: a nationwide register-based cohort study 1964- 2014</i> . Gut, 2019.
35. Neurath, M.F., <i>Current and emerging therapeutic targets for IBD</i> . Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. <b>14</b> (5): p. 269-278.
36. Molendijk, I., et al., <i>Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Healing of Refractory Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease</i> . Gastroenterology, 2015. <b>149</b> (4): p. 918-27 e6.
37. Wobser, H., et al., <i>Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells</i> . Cell Res, 2009. <b>19</b> (8): p. 996-1005.
38. Kirovski, G., et al., <i>Hepatic steatosis causes induction of the chemokine RANTES in the absence of significant hepatic inflammation</i> . Int J Clin Exp Pathol, 2010. <b>3</b> (7): p. 675-80.
39. Wanninger, J., et al., <i>Lipid accumulation impairs adiponectin-mediated induction of activin A by increasing TGFbeta in primary human hepatocytes</i> . Biochim Biophys Acta, 2011. <b>1811</b> (10): p. 626-33.
40. Sharma, S., et al., <i>GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy</i> . PLoS One, 2011. <b>6</b> (9): p. e25269.
41. Müller, F.A. and S.J. Sturla, <i>Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease</i> . Current Opinion in Toxicology, 2019. <b>16</b> : p. 9-16.
42. Kostrzewski, T., et al., <i>Three-dimensional perfused human in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease</i> . World J Gastroenterol, 2017. <b>23</b> (2): p. 204-215.
43. Bulutoglu, B., et al., <i>A microfluidic patterned model of non-alcoholic fatty liver disease: applications to disease progression and zonation</i> . Lab Chip, 2019. <b>19</b> (18): p. 3022-3031.
44. Lasli, S., et al., <i>A Human Liver-on-a-Chip Platform for Modeling Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i> . Advanced Biosystems, 2019. <b>3</b> (8): p. 1900104.
45. Ehrlich, A., et al., <i>Microphysiological flux balance platform unravels the dynamics of drug induced steatosis</i> . Lab Chip, 2018. <b>18</b> (17): p. 2510-2522.
46. Li, G.R., X.G. Li, and F.H. Lu, <i>[Effects of neferine on transmembrane potentials of guinea pig myocardium]</i> . Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1989. <b>10</b> (5): p. 406-10.
47. Feaver, R.E., et al., <i>Development of an in vitro human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis</i> . JCI Insight, 2016. <b>1</b> (20): p. e90954.
48. Hoffmann, J.C., et al., <i>Animal models of inflammatory bowel disease: an overview</i> . Pathobiology, 2002. <b>70</b> (3): p. 121-30.
49. Silva, I., R. Pinto, and V. Mateus, <i>Preclinical Study in Vivo for New Pharmacological Approaches in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of Chronic Model of TNBS-Induced Colitis</i> . J Clin Med, 2019. <b>8</b> (10).
50. Eichele, D.D. and K.K. Kharbanda, <i>Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis</i> . World J Gastroenterol, 2017. <b>23</b> (33): p. 6016-6029.
51. Swanson, K.D., E. Theodorou, and E. Kokkotou, <i>Reproducing the human mucosal environment ex vivo: inflammatory bowel disease as a paradigm</i> . Curr Opin Gastroenterol, 2018. <b>34</b> (6): p. 384-391.
52. Albright, A.L. and J.S. Stern, <i>Adipose tissue</i> . Encyclopedia of sports medicine and science, 1998. <b>10</b> : p. 1-4.
53. Tanzi, M.C. and S. Fare, <i>Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches</i> . Expert Rev Med Devices, 2009. <b>6</b> (5): p. 533-51.
54. Trayhurn, P. and J.H. Beattie, <i>Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ</i> . Proc Nutr Soc, 2001. <b>60</b> (3): p. 329-39.
55. Scherer, P.E., <i>Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ</i> . Diabetes, 2006. <b>55</b> (6): p. 1537-45.
56. Kim, S. and N. Moustaid-Moussa, <i>Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte</i> . J Nutr, 2000. <b>130</b> (12): p. 3110S-3115S.

57. Shehzad, A., et al., <i>Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases</i> . Hormones (Athens), 2012. <b>11</b> (1): p. 8-20.
58. Tilg, H. and A.R. Moschen, <i>Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity</i> . Nat Rev Immunol, 2006. <b>6</b> (10): p. 772-83.
59. Rega-Kaun, G., C. Kaun, and J. Wojta, <i>More than a simple storage organ: adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease</i> . Thromb Haemost, 2013. <b>110</b> (4): p. 641-50.
60. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier, <i>Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases</i> . World J Gastroenterol, 2011. <b>17</b> (23): p. 2801-11.
61. Weidinger, C., et al., <i>Adipokines and Their Role in Intestinal Inflammation</i> . Front Immunol, 2018. <b>9</b> : p. 1974. 62. Anneren, G., K.H. Gustavson, and S. Jagell, <i>Partial trisomy for the distal part of chromosome 22 (22q12---- qter) in a mentally retarded girl with congenital birth defects</i> . Hereditas, 1984. <b>100</b> (1): p. 115-9.
63. Nawrocki, A.R. and P.E. Scherer, <i>Keynote review: the adipocyte as a drug discovery target</i> . Drug Discov Today, 2005. <b>10</b> (18): p. 1219-30.
64. Choi, J.H., et al., <i>Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration</i> . Tissue Eng Part B Rev, 2010. <b>16</b> (4): p. 413-26.
65. Yao, R., et al., <i>A biomimetic physiological model for human adipose tissue by adipocytes and endothelial cell cocultures with spatially controlled distribution</i> . Biomed Mater, 2013. <b>8</b> (4): p. 045005.
66. Mauney, J.R., et al., <i>Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds</i> . Biomaterials, 2007. <b>28</b> (35): p. 5280- 90.
67. Wiggenhauser, P.S., et al., <i>Engineering of vascularized adipose constructs</i> . Cell Tissue Res, 2012. <b>347</b> (3): p. 747-57.
68. Wang, L., et al., <i>Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering</i> . Acta Biomater, 2013. <b>9</b> (11): p. 8921-31.
69. Frye, C.A. and C.W. Patrick, <i>Three-dimensional adipose tissue model using low shear bioreactors</i> . In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2006. <b>42</b> (5-6): p. 109-14.
70. Guzzardi, M.A., C. Domenici, and A. Ahluwalia, <i>Metabolic control through hepatocyte and adipose tissue cross-talk in a multicompartmental modular bioreactor</i> . Tissue Eng Part A, 2011. <b>17</b> (11-12): p. 1635-42.
71. Viravaidya, K. and M.L. Shuler, <i>Incorporation of 3T3-L1 cells to mimic bioaccumulation in a microscale cell culture analog device for toxicity studies</i> . Biotechnol Prog, 2004. <b>20</b> (2): p. 590-7.
72. Clark, A.M., et al., <i>Reversibly sealed multilayer microfluidic device for integrated cell perfusion and on-line chemical analysis of cultured adipocyte secretions</i> . Anal Bioanal Chem, 2010. <b>397</b> (7): p. 2939-47.
73. Dugan, C.E. and R.T. Kennedy, <i>Measurement of lipolysis products secreted by 3T3-L1 adipocytes using microfluidics</i> . Methods Enzymol, 2014. <b>538</b> : p. 195-209.
74. Lai, N., et al., <i>Adipocyte induction of preadipocyte differentiation in a gradient chamber</i> . Tissue Eng Part C Methods, 2012. <b>18</b> (12): p. 958-67.
75. Godwin, L.A., et al., <i>A microfluidic interface for the culture and sampling of adiponectin from primary adipocytes</i> . Analyst, 2015. <b>140</b> (4): p. 1019-25.
76. Rennert, K., et al., <i>A microfluidically perfused three dimensional human liver model</i> . Biomaterials, 2015. <b>71</b> : p. 119-131.
77. Groger, M., et al., <i>Monocyte-induced recovery of inflammation-associated hepatocellular dysfunction in a biochip-based human liver model</i> . Sci Rep, 2016. <b>6</b> : p. 21868.
78. Pein, H., et al., <i>Endogenous metabolites of vitamin E limit inflammation by targeting 5-lipoxygenase</i> . Nat Commun, 2018. <b>9</b> (1): p. 3834.
79. Blaurock-Moller, N., et al., <i>CAAP48, a New Sepsis Biomarker, Induces Hepatic Dysfunction in an in vitro Liveron- Chip Model</i> . Front Immunol, 2019. <b>10</b> : p. 273.

80. Fahrner, R., et al., <i>Short-term treatment with taurolidine is associated with liver injury</i> . BMC Pharmacol Toxicol, 2017. <b>18</b> (1): p. 61.
81. Ott, S.J., et al., <i>Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With Clostridium difficile Infection</i> . Gastroenterology, 2017. <b>152</b> (4): p. 799-811 e7.
82. Rogal, J., et al., <i>WAT's up!?!-Organ-on-a-chip integrating human mature white adipose tissues for mechanistic research and pharmaceutical applications</i> . bioRxiv, 2019: p. 585141.
83. Loskill, P., et al., <i>WAT-on-a-chip: a physiologically relevant microfluidic system incorporating white adipose tissue</i> . Lab Chip, 2017. <b>17</b> (9): p. 1645-1654.
84. Rogal, J., C. Probst, and P. Loskill, <i>Integration concepts for multi-organ chips: how to maintain flexibility?! Future Sci OA</i> , 2017. <b>3</b> (2): p. FSO180.
85. Maurer, M., et al., <i>A three-dimensional immunocompetent intestine-on-chip model as in vitro platform for functional and microbial interaction studies</i> . Biomaterials, 2019. <b>220</b> : p. 119396.
86. Loskill, P., et al., <i>muOrgano: A Lego(R)-Like Plug &amp; Play System for Modular Multi-Organ-Chips</i> . PLoS One, 2015. <b>10</b> (10): p. e0139587.
87. Neuhaus, V., et al., <i>Assessment of the Cytotoxic and Immunomodulatory Effects of Substances in Human Precision-cut Lung Slices</i> . J Vis Exp, 2018(135).
88. Danov, O., et al., <i>Human lung tissue provides highly relevant data about efficacy of new anti-asthmatic drugs</i> . PLoS One, 2018. <b>13</b> (11): p. e0207767.

### 1.7 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Arbeitsgruppe von Dr. Mosig (UKJ) befasst sich mit den molekularen und zellulären Mechanismen entzündungsbedingter Organfunktionsstörungen. Die Arbeitsgruppe entwickelt hierfür mikrophysiologische Modelle zur Untersuchung der Funktion des menschlichen Immunsystems und der Steuerung einer angepassten Immunantwort gegenüber endogenen und exogenen Substanzen. Sie hat langjährige Erfahrung im Design von Biochips, der Entwicklung von Tissue Engineering Methoden und im Umgang mit primärem humanem Zellmaterial (inkl. Stammzellen). Die Arbeitsgruppe von Dr. Mosig ist als Partner im Marie-Curie Training Netzwerk EUROoC (812954), dem Exzellenzcluster "Balance of the Microverse" (EXC 2051) und im Forschungscampus "InfectoOptics" (W8/2018) der Leibniz Gesellschaft aktiv. Weitere öffentliche Förderung erhält die Arbeitsgruppe von der EU (853988), dem BMBF (01EO1002, 01EK1612B), der DFG (MO 2968/1-1) und dem BMWi (ZF4330101AJ6). Das UKJ war für die Etablierung des Leber-on-chip Systems aus Primärzellen verantwortlich und entwickelte gemeinsam mit der Charité das darauf aufbauende Krankheitsmodell der NASH. In Zusammenarbeit mit dem ITEM erfolgte die Entwicklung des IBD Darmmodells auf Basis des am UKJ entwickelten Darm-on-chip Systems. Das UKJ trug weiterhin zur Entwicklung der Mikrofluidischen Plattform durch die EKUT bei.

Die Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Dr. Loskill (EKUT) ist fokussiert auf die Entwicklung mikrofluidischer Systeme für die biomedizinische Forschung, speziell auf Organ-on-a-chip Systeme. Derzeit fungiert Dr. Loskill als Vize-Präsident der Europäischen Gesellschaft für Organ-on-Chip-Forschung EUROoCs, als Koordinator des Marie-Curie Training Netzwerk EUROoC (812954) und als PI im H2020 FETOPEN Projekt ORCHID (766884). Daneben ist er Projektleiter und -partner in einer Reihe laufender und abgeschlossener öffentlicher Projekte (DFG, DAAD, Stiftungen) sowie Industrieprojekten in denen die entwickelten Systeme für Auftragsforschung angewandt werden. Das von Dr. Loskill geleitete  $\mu$ Organo-Labor bildete eine Brücke zwischen der EKUT und dem Fraunhofer IGB, Stuttgart, und bietet eine umfassende Expertise und Infrastruktur für die Konzeption, Herstellung und Charakterisierung von (bio-) mikrofluidischen Systemen sowie für die Integration und Kultivierung von menschlichen Stammzell-basierten Geweben. Im ImmuneAvatar Projekt war Dr. Loskill zum einen für die Entwicklung

und Optimierung der mikrofluidischen Plattformen als auch für die Weiterentwicklung des Fettgewebe-Modells verantwortlich.

Die Abteilung von Dr. Sewald (ITEM) befasst sich mit innovativen *in vitro* und *ex-vivo* Zell- und Gewebemodellen in Entzündungs- und chronischen Atemwegserkrankungen zur Entwicklung neuer Therapien, aber auch zur Sicherheitsbewertung von Chemikalien. Dr. Sewald ist stellvertretende Bereichsleiterin der Präklinischen Pharmakologie und *in vitro* Toxikologie Fraunhofer ITEM. Ihr wissenschaftlicher Schwerpunkt liegt auf alternativen *in vitro* und *ex vivo* Modellen zur respiratorischen Sensibilisierung, Mechanismen der respiratorischen Inflammation und Irritation, Entwicklung von Gewebekulturmodellen sowie der Untersuchung immunologischer Mechanismen der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen. Öffentliche Projekte z.B.: Entwicklung neuer Testsysteme in verschiedenen BMBF-Projekten zu “Alternative Methoden zum Tierversuch” (149527, 151130, 144452, 147656); DZL BREATH, Hannover (146200); REBIRTH, Hannover (138703); Industrieprojekte zum Beispiel: Entwicklung von humanen Disease-Modellen *in vitro* (149349, 151319, 148695), einschließlich Infektionsforschung (148296). Durch die Integration der entwickelten Methode der Darmschnitte in das Fraunhofer CIMD cluster, kam es hier zur Synergie zwischen den Projekten.

Die Charité Universitätsmedizin Berlin ist das größte deutsche Universitätsklinikum und gehört mit einem Exzellenzcluster und 16 Sonderforschungsbereichen zu den forschungsintensivsten medizinischen Einrichtungen in Deutschland. Prof. Dr. Frank Tacke hat eine international herausragende klinische und wissenschaftliche Expertise in der Hepatologie, speziell für NASH und Leberfibrose (insgesamt >400 Publikationen, h-Index 64). In der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Direktor: Prof. Dr. Frank Tacke, besteht eine langjährige Expertise in der Charakterisierung und Manipulation von Immunantworten *in vitro* und *in-vivo*. Dies manifestiert sich in zahlreichen Drittmittel-geförderten Projekten zur Rolle von Immunmechanismen in der Fettleber, der Leberfibrose und der Onkologie (u.a. zwei laufende SFB-Projekte, DFG-Einzelanträge, EU-geförderte Verbundprojekte, Industrie-Kooperationen).

## 2. Eingehende Darstellung

### 2.1 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Das Fraunhofer ITEM war in das Teilpaket 4 sowie 6 involviert. Hier ging es um den Aufbau immunkompetenter *in vitro/ex-vivo* Darmmodelle, die frühe und späte Ereignisse in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen widerspiegeln. Die Aufgaben im Arbeitspaket 4 (AP4) wurden zwischen dem Fraunhofer ITEM und dem Universitätsklinikum Jena aufgeteilt. Fraunhofer ITEM war für die Entwicklung von *in vitro/ex vivo* Darmmodellen verantwortlich, während das Universitätsklinikum Jena sich auf die Entwicklung von on-chip Modellen konzentrierte. Das Ziel bestand darin, sowohl akute als auch chronische Entzündungen *in vitro* nachzubilden, um eine potenzielle Plattform für die Testung von Medikamenten zu etablieren.

#### 2.1.1 Einfluss von pro-inflammatorischen Mediatoren auf intestinale Epithelzellen

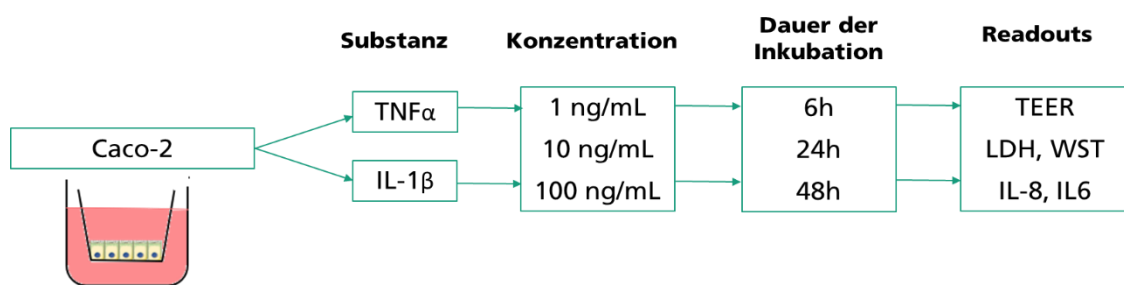
Der Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) spielt eine wichtige Rolle als physikalische Barriere zwischen der luminalen Seite des Verdauungstraktes und den inneren, sterilen Geweben. Auf der einen Seite muss der GI-Trakt als selektive Barriere die Aufnahme von Nährstoffen und Wasser ermöglichen, auf der anderen Seite muss er das Eindringen schädlicher Stressoren verhindern. Die Integrität dieser Barriere

und die daraus resultierende Durchlässigkeit wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Einer davon sind Entzündungen im Gewebe. Bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen liegt somit eine Störung der Darmbarriere vor, bei denen inflammatorische Zytokine eine direkte Rolle spielen (Crawford et al. 2022).

Um den Einfluss proinflammatorischer Mediatoren auf die intestinale Barriere zu untersuchen, wurden Versuche mit Caco-2-Zellen durchgeführt. Hierbei kamen inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) zum Einsatz, da diese Proteine eine zentrale Rolle bei akuten Entzündungsreaktionen spielen. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind Schlüsselmediatoren, die bei Entzündungsprozessen freigesetzt werden und maßgeblich zur Regulation der Immunantwort beitragen. Sie beeinträchtigen die Integrität der intestinalen Epithelbarriere, indem sie die Permeabilität der Zellschichten erhöhen und die Freisetzung weiterer inflammatorischer Zytokine fördern.

Der Fokus dieser Untersuchung lag auf der Analyse der Effekte dieser inflammatorischen Zytokine auf die durchgehende Monoschicht mit Caco-2-Epithelzellen; insbesondere bezüglich der Veränderungen in der Integrität und Erhaltung einer transepithelialen Barriere sowie der Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Für die Versuche wurden Caco-2 Zellen auf Transwell®-Membranen kultiviert und nach 14 Tagen, sobald eine stabile zelluläre Epithelzellbarriere erreicht war, mit IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  in verschiedenen Konzentrationen basolateral stimuliert (Abbildung 1). Sowohl IL-1 $\beta$  als auch TNF- $\alpha$  zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Epithelzellen und deren transepitheliale Barriere sowie auf die Ausschüttung relevanter proinflammatorischer Zytokine (Abbildung 2-4).

Die Wirkung von inflammatorischen Zytokinen auf die intestinale Epithelzellbarriere bildet somit wesentliche Charakteristika einer Darmentzündung nach. Auffällig war jedoch die ungerichtete Sekretion der Mediatoren sowohl apikal als auch basolateral, was in der Literatur kontrovers diskutiert wird (Wang et al. 2018; Eckmann et al. 1993a; Eckmann et al. 1993b; Sonnier et al. 2010). Physiologisch ist die basolaterale Sekretion in Richtung der unter den Epithelzellen gelegenen Immunzellen von größerer Relevanz, da sie eine direkte Kommunikation mit dem Immunsystem bewirkt. Die apikale Freisetzung von IL-8 wird jedoch als physiologische Eigenschaft betrachtet (Wang et al. 2018), da IL-8 im apikalen Bereich gesammelt wird, um im Falle einer Epithelschädigung schnell in das basolaterale Kompartiment einzudringen und somit die Kommunikation mit Immunzellen sicherzustellen.



**Abbildung 2** Der experimentelle Aufbau für die Untersuchung des Einflusses verschiedener immunstimulierender Mediatoren (TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) auf die Ausbildung einer transepithelialen Barriere, sowie der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine im Caco-2 *in vitro* Modell.

### 2.1.2 DSS-induzierte Schädigung der epithelialen Barriere

Modelle für entzündliche Darmerkrankungen (IBD) sind essenziell, um die Pathophysiologie und mögliche therapeutische Ansätze zu verstehen. Zu den etablierten Modellen zählt Dextran-Natriumsulfat (DSS), das eine Schädigung der intestinalen Epithelzellbarriere induziert und deshalb zur

Induktion von entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) in Mäusen eingesetzt wird. DSS verursacht eine Schädigung der Integrität der Darmbarriere, was zu einer erhöhten Permeabilität und Entzündungsreaktionen führt, die den Mechanismen, die bei menschlichen IBD-Patienten beobachtet werden, ähneln.

DSS kann auch *in vitro* verwendet werden, um intestinale Epithelzellen zu untersuchen. *In vitro*-Modelle mit DSS ermöglichen die Untersuchung der direkten Effekte von DSS auf Darmepithelzellen, wie beispielsweise Caco-2 Zellen. Diese Experimente helfen, die Mechanismen der Epithelzellschädigung und die anschließende entzündliche Reaktion besser zu verstehen. Durch die Exposition von Darmepithelzellen mit DSS in kontrollierten Bedingungen können Veränderungen in der Zellintegrität, der Permeabilität der Zellmonolayer und der Produktion proinflammatorischer Zytokine analysiert werden. Daher wurde in diesem Projekt die Wirkung von DSS auf Caco-2 als epitheliale Monozellen untersucht, um eine Barrierschädigung hervorzurufen und somit ein chronisches Modell entzündlicher Darmerkrankungen *in vitro* nachzubilden.

Die in den ersten Experimenten verwendeten Caco-2 Zellen (HTB-37™) sind aufgrund ihrer Heterogenität in der Literatur kontrovers diskutiert (Araki et al. 2006; Hidalgo et al. 1989; Walter und Kissel 1995; Angelis und Turco 2011). Nach Rücksprache mit dem UKJ wurde vergleichend zu den Caco-2 Zellen außerdem ein spezifischer Caco-2 Klon (C2BBE1 bzw. CRL2102™) untersucht, welcher sich in Kultur stärker polarisiert. Diese Polarisation ist durch die Ausbildung des für das Darmepithel typischen Bürstensaums auf apikaler Seite gekennzeichnet. Wir konnten erfolgreich zeigen, dass die beiden Zelllinien nach ca. 10 Tage eine stabile Epithelbarriere ausbilden, jedoch die Caco-2 Zellen im Vergleich zu dem C2bbe1 Zellklon mehrere Zellschichten auf den Transwell®-Membranen ausbilden.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse mit dem Zellklon C2bbe1 wurde für die weiteren Versuche ausschließlich diese Zelllinie verwendet. Um ein, auf Caco-2 Zellen basierendes Entzündungsmodell mittels DSS zu etablieren, wurde nach intensiver Datenbank- und Literaturrecherche die Arbeit von Araki et al. als Referenz hinsichtlich Konzentrationen und Behandlungsdauer herangezogen.

Es lässt vermuten, dass C2bbe1-Zellen über eine gute Regeneration verfügen, weshalb sich der DSS-Effekt auf die epitheliale Barriere nur bei der höchsten Konzentration manifestierte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine einfache DSS-Behandlung der C2bbe1 nur teilweise eine Entzündung des Darms, durch die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (IL-8, IL-6, MMP-9), abbildet und die Schädigung der Epithelbarriere in diesem Modell optimiert werden sollte.

Um einen ausgeprägten Barriere-schädigenden Effekt in C2bbe1 zu erzielen, wurde eine Behandlung aus DSS und Laurinsäure (LS) in Anlehnung an eine Publikation von Laroui *et al.* 2012 getestet. LS ist eine mittelkettige Fettsäure, die im Darm natürlichweise vorkommt. Dort hat sie vielfältige Funktionen, u.a. besitzt sie antimikrobielle Wirkungen, beeinflusst dadurch das Gleichgewicht der Darmflora, zeigt immunmodulatorische Eigenschaften, dient als Energiequelle nach Resorption und trägt zum Schutz der Darmbarriere bei. In Verbindung mit DSS können mittelkettige Fettsäure eine Barrierschädigung begünstigen (Laroui et al. 2012). Dabei DSS wird von Fettsäuren umschlossen und mit deren Hilfe in die Epithelzellen eingeschleust, wo Entzündungsreaktionen induziert werden. Die Behandlung von C2bbe1-Zellen mit 10 mM LS und 3% DSS für 24h führte zu einer signifikanten Reduktion des TEERs. Allerdings führte die kombinierte Behandlung aus LS und DSS zu einem starken Verlust der Viabilität. Die Zellen wiesen gegenüber der unbehandelten Kontrolle sowohl eine erhöhte LDH-Freisetzung als auch eine stark verringerte metabolische Aktivität auf.

### 2.1.3 Humane Precision-cut intestinal slices als immunkompetentes *ex vivo* Modell für die Testung von Medikamenten

Humane Darm-Präzisionsschnitte (Precision-Cut Intestinal Slices, PCIS) sind ein besonders wertvolles Modell in der biomedizinischen Forschung, das tiefere Einblicke in die menschliche Darmphysiologie und -pathologie, u.a. bei IBD, ermöglicht.

Humane PCIS sind dünne Gewebeschnitte des menschlichen Darms, die präzise so hergestellt werden, dass die dreidimensionale Struktur und die Zellarchitektur des Darms *ex vivo* weitgehend erhalten bleibt. Die Gewebeproben werden in der Regel während chirurgischer Eingriffe entnommen. Dabei werden sowohl gesunde als auch erkrankte Darmabschnitte verwendet, um verschiedene Fragestellungen zu adressieren. Die Darmproben werden in mit einem speziellen Mikrotom in gleichmäßige, dünne Scheiben (200-300 µm) geschnitten. Die PCIS werden in geeigneten Kulturmedien unter kontrollierten Bedingungen kultiviert, um die Lebensfähigkeit und Funktionalität der Zellen zu gewährleisten. Das kann mehrere Stunden bis zu Tagen erfolgen, je nach den spezifischen experimentellen Anforderungen.

Diese Methode ermöglicht die Untersuchung der Funktion und Pathologie des menschlichen Darms unter nahezu physiologischen Bedingungen. Gewebe aus Ileostomie- oder Rückverlagerungs-Operation (gesundes/non-IBD Darm) oder bei Resektion des Darms eines an Morbus-Crohn-erkrankten Patienten wurden nach einem angepassten Protokoll von de Graf *et al.* 2010 hergestellt und kultiviert. PCIS sind multizellulär und bilden die komplexe Struktur des Darms in einem dreidimensionalen Modell ab. Dadurch ermöglichen sie es die gewebespezifischen Signale (Zytokin-/Metabolitenfreisetzung) in der natürlichen Zusammensetzung zu untersuchen und somit die Unterschiede zwischen gesundem und IBD-erkranktem Gewebe zu unterscheiden. Die Ergebnisse werden derzeit für eine Veröffentlichung eingereicht (Grieger, Beneke *et al.* „The Calcineurin inhibitor pimecrolimus reduces local immune responses in primary intestinal tissue of inflammatory bowel disease patients *ex vivo*“).

## 2.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Es konnten alle Arbeiten mit dem beantragten Personal- und Sachmitteln planmäßig bearbeitet werden. Investitionen wurde nicht getätigt.

Der größte Posten, der im Projekt beantragten und verbrauchten Mittel, sind die Personalmittel. Diese setzen sich aus den unterschiedlichen Tätigkeiten innerhalb dieser Etablierungs- und Hauptphase des Projektes zusammen (z.B. Literaturrecherche, Etablierung, Auswertung, etc.). Diese Kosten waren notwendig, um die erforderlichen Hypothesen zu entwickeln, die Arbeiten zu konzipieren, im Labor durchzuführen, die Ergebnisse auszuwerten und zu interpretieren, Probleme zu lösen und die Manuskripte zu erstellen. Daran waren Klaudia Grieger und Valerie Beneke als Doktorandin sowie Senior-Wissenschaftlerinnen Vanessa Neuhaus, Susann Dehmel und Katherina Sewald beteiligt. Auf der Techniker\*innen-Seite wurde das Projekt von mehreren Techniker\*innen, je nach Bedarf und Kompetenz unterstützt. Die Mittel wurden für die geistigen und experimentellen Arbeiten aus den Teilarbeitspaket 4 und 6 aufgewendet. Die Notwendigkeit der bewilligten und verwendeten Personal- und Materialmittel wird in diesem Abschlussbericht klar dargestellt.

Der zweite kleinere Teil der beantragten Mittel wurde für die Materialmittel verwendet. Diese ergaben sich folgerichtig innerhalb des Projektes für die Etablierungsarbeiten des Darmmodelles basierend auf primärem humanem Material, sowie der anschließenden Analysen zur Evaluierung und Charakterisierung.

**Personalmittel:**

Wissenschaftler 25,7 Mann-Monate

338.703,70 € Personal

**Sachgemeinkostenkosten und Personalgemeinkosten:**

151.998€

AfA-Kosten: 17.076€

**Materialmittel:**

62.876,15€ Material

1.488,33,-€ Sonstige Leistungen (Reisekosten und sonstige Kosten)

Die geplanten Materialkosten wurden projektspezifisch in diesen Experimenten verwendet. Die Mehrkosten gegenüber dem ursprünglich kalkulierten Projektplan, die durch eine notwendige Verlängerung der Projektlaufzeit entstanden, wurden aus den Eigenmitteln des Fraunhofer ITEMS geleistet.

### 2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Trotz mehrerer kostenneutralen Verlängerungen aufgrund unvorhergesehener Schwierigkeiten (Corona-Krise, Lieferschwierigkeiten, SAP-Umstellung bei Fraunhofer) und Verzögerungen wurden die wesentlichen Punkte in den Arbeitspaketen des Projekts erfolgreich bearbeitet. Ein vielversprechendes Konsortium wurde gebildet, das nicht nur das Projektziel erfolgreich abschloss, sondern auch für zukünftige Anträge erneut zusammenkam, um die gewonnenen Erkenntnisse weiter zu nutzen. Die Neuartigkeit und Komplexität der Ziele in ImmunAvatar führten zu einem generell höheren Aufwand, der jedoch für die Entwicklung, Validierung und Standardisierung der angestrebten Technologien und Verfahren notwendig war.

### 2.4 Der voraussichtliche Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

ImmuneAvatar bot erhebliche Chancen für alle beteiligten Partner. Es eröffneten sich neue strategische Synergien, und das Innovations- sowie IP-Potenzial des beantragten Projekts war äußerst hoch. Besonders bedeutsam war der Beitrag zur Etablierung humaner Testsysteme zur Vorhersage von Sicherheit und Wirksamkeit neuer Arzneistoffe bei chronischen entzündungsassoziierten Leber- und Darmerkrankungen. Die Translation von Testergebnissen aus präklinischen Modellen in die klinische Anwendung sollte dadurch erheblich verbessert werden.

Die wirtschaftliche Verwertung der Biochips lag zunächst in Dienstleistungen bei der Entwicklung, Zulassung und Prüfung von Arzneistoffen (z.B. Impfstoffen). Diese Leistungen könnten in verschiedenen Bereichen der Wertschöpfungskette angewendet werden: vom Screening neuer

Arzneistoffkandidaten bis hin zur Routine in der Qualitätskontrolle, was insbesondere Pharmapartner ansprechen sollte.

Die im Rahmen von ImmuneAvatar entwickelten Kompetenzen und Technologien, wie Biochips, Tissue-Engineering-Konzepte und Gensignaturen, sollen nach der Patentierung in weiteren Forschungsaufträgen genutzt werden. Zudem sollen die direkten Anwendungen der Plattform im Pharmamarkt global dargestellt werden. Für das Fraunhofer ITEM sollen, im Sinne der Verwertung, die etablierten Darmmodelle als komplexe, humanbasierte Systeme zur Testung neuer Medikamente für entzündliche Darmerkrankungen (IBD) dienen. Diese Modelle bieten eine innovative Alternative zu Tierversuchen und sind von großer Bedeutung für die zukünftige Entwicklung therapeutischer Ansätze. Die Sicherheit und Wirksamkeit neuer Medikamente, sind unerlässlich für die Zulassung zu klinischen Studien. Die Ergebnisse, die mit diesen humanen Modellen erzielt werden, ermöglichen effizientere Gestaltung der Medikamentenentwicklung sowie sicherere und effektivere Therapien bei IBD-Patienten.

#### Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Insbesondere für Fraunhofer bedeuten die in diesem Projekt entwickelten Darmmodelle eine Erweiterung des Portfolios für Auftragsforschung im Bereich der Darmerkrankungen. Die Ergebnisse ermöglichen eine direkte Nutzbarkeit in Kooperationen mit öffentlichen und industriellen Partnern, wie öffentlichen Einrichtungen (z.B. Universitäten), Start-ups in der frühen pharmazeutischen Produktentwicklung, KMU und großen Pharmaunternehmen.

Die Möglichkeit einer frühzeitigen Bewertung geeigneter Wirkstoffkandidaten in der Pharma-Entwicklung mittels *ex vivo* Modellen, insbesondere den hier beschriebenen Darmmodellen, hat bereits erstes Interesse bei industriellen Partnern wie Merck, MSD und Sanofi geweckt. Erste Reaktionen und Rückmeldungen zeigen, dass großes Auftrags- und Kooperationspotential in den komplexen humanen Darmmodellen steckt. Diese Modelle bieten präzisere Einblicke in die menschliche Physiologie und Pathologie als Zellkulturmodelle oder Mausmodelle und ermöglichen dadurch zuverlässigere Vorhersagen zur Wirksamkeit und Sicherheit neuer Medikamente.

Darüber hinaus tragen die Darmmodelle zur Reduktion von Tierversuchen im Rahmen der 3R-Prinzipien (Replacement, Reduction, Refinement) in der IBD-Forschung bei.

#### Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

Das Vorhaben war aufgrund der eingesetzten Technik und der Expertise der beteiligten Partner optimal aufgestellt und ermöglichte die Etablierung humaner immunkompetenter Darmmodelle zur Untersuchung immunologischer Prozesse bei IBD sowie zur Medikamententestung. Diese Darmmodelle bieten eine innovative Plattform, um die komplexen Interaktionen zwischen Darmepithel und Immunsystem unter nahezu physiologischen Bedingungen zu analysieren.

Trotz unvorhergesehener Umstände (Corona-Pandemie, Lieferschwierigkeiten, Umstellung auf SAP bei Fraunhofer) und den dadurch entstandenen Verzögerungen sowie notwendigen Verlängerungen der Projektlaufzeit konnten die einzelnen Teilaspekte vertieft und optimiert werden. Insbesondere die Standardisierung der Kulturbedingungen und die Validierung der Modelle hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit stellten wesentliche Fortschritte dar.

Die entstandenen Erkenntnisse, entwickelten Verfahren und Modelle wurden in allen Entwicklungsphasen hinsichtlich einer Ergebnisverwertung sorgfältig geprüft. Dabei wurde besonderer Wert auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse in präklinische und klinische Anwendungen gelegt. Die Darmmodelle zeigten sich als äußerst geeignet für die frühzeitige Bewertung der Wirksamkeit und Sicherheit neuer therapeutischer Ansätze, was sie zu einem wertvollen Werkzeug für die pharmazeutische Forschung und Entwicklung macht. Die Ergebnisse zu dem humanem Darmmodell wurden / werden veröffentlicht. Hier gibt es bereits Manuskripte, die derzeit vorbereitet, bzw. zeitnah eingereicht werden:

#### Akzeptierte Manuskripte:

- Hung L, Celik A, Yin X, Yu K, Berenji A, Kothari A, **Oberholte H**, Upton JEM, Lindholm Bøgh K, Somers GR, Siddiqui I, Grealish M, Quereshy FA, **Sewald K**, Chiu PPL, Eiwegger T. **Precision cut intestinal slices, a novel model of acute food allergic reactions**. Allergy. 2023 Feb;78(2):500-511. doi: 10.1111/all.15579 . Epub 2022 Nov 23. PMID: 36377289 ; PMCID: PMC10098956.
- **Beneke, V., Grieger, K.M.**, Hartwig, C., Müller, J., Sohn, K., Blaudszun, A.-R., Hilger, N., Schaudien, D., Fricke, S., **Braun, A., Sewald, K. and Hesse, C.** (2024), **Homeostatic T helper 17 cell responses triggered by complex microbiota are maintained in ex vivo intestinal tissue slices**. Eur. J. Immunol. 2350946. <https://doi.org/10.1002/eji.202350946>

#### Manuskripte in Arbeit

Grieger KM, Beneke V, Dehmel S, Neuhaus V, Schaudien D, Linge H, Wagner A, Kulik U, Aselmann H, Braun A, Hesse C and Sewald K. **The Calcineurin inhibitor pimecrolimus reduces local immune responses in primary intestinal tissue of inflammatory bowel disease patients ex vivo**. Wird im Juli 2024 eingereicht.

Darüber hinaus wurden die Ergebnisse in Form von **Postern und Vorträgen** einem breiten wissenschaftlichen Publikum zugänglich gemacht.

- **Grieger et al.**
  - o Altered T cell activity in human patient-derived intestinal slices ex vivo, **Poster**, CIMD cluster of mediated immune diseases, 2022
  - o Modulation of early innate and adaptive immune response in precision-cut intestinal slices ex vivo – **Oral presentation**, Alternatives to Animal Testing Workshop, 2022
  - o Patient-derived intestinal tissue slices represent disease specific immunity ex vivo, **Poster**, DGFI autumn immunology school, 2022
  - o Patient-derived intestinal tissue slices represent disease specific immunity ex vivo, **Poster**, DGFI spring immunology school, 2023
  
  - o Modulation of T-cell immune response in precision-cut intestinal slices from IBD patients ex vivo, **Poster**, Alternatives to Animal Testing Workshop, 2022
  - o Calcineurin inhibitor Pimecrolimus reduced activity of T cells in human precision-cut intestinal slices of IBD patients ex vivo – **Poster**, DGPT 9th German Pharm-Tox Summit
  - o Characterization of T cell mediated immune responses in ex vivo intestinal tissue slices from IBD patients – **Poster**, DGFI translational Immune school, 2024
  - o Calcineurin inhibitor Pimecrolimus reduced activity of T cells in human precision-cut intestinal slices of IBD patients ex vivo – **Poster**, Alternatives to Animal Testing Workshop, 2024

- The Jak inhibitor filgotinib concentration-dependently suppresses immune responses in precision cut intestinal tissue slices ex vivo – **Poster**, 7<sup>th</sup> european congress of immunology (ECI), 2024
- T cell mediated immune responses in primary intestinal tissue slices from IBD patients ex vivo– **Oral presentation**, 7<sup>th</sup> european congress of immunology (ECI), 2024
  
- **Beneke et al.**
  - Antibody-based modulation of the intestinal microbiome mediates immunological tolerance – **Poster**, DZL Annual Meeting, 2020
  - Restoring the immune tolerance: specific modulation of the intestinal microbiome – **Poster**, Models of Lung Diseases Workshop, 2020
  - Different microbial compositions in the gut shape the immune response in ex vivo intestinal tissue slices – **Poster**, DGfI Autumn School 2021
  - From gut to lung: Microbiota dependent modulation of relevant mediators in intestinal tissue slices ex vivo – **Poster**, Models of Lung Diseases and CIMD Workshop Alternatives to Animal Testing, 2022
  - Microbiota dependent modulation of immune mediators in intestinal tissue slices ex vivo – **Oral presentation**, EUSAAT, 2022
  - Modulation of early innate and adaptive immune response in precision-cut intestinal slices ex vivo – **Oral presentation**, Alternatives to Animal Testing Workshop, 2022
  - Early innate and adaptive immune responses in human intestinal tissue slices from IBD and non-IBD patients ex vivo – **Oral presentation**, 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 2023
  - Modulation of extracellular matrix markers in human intestinal tissue slices from IBD and non-IBD patients ex vivo – ECM Congress, 2024

Die entwickelten Modelle haben damit für Fraunhofer ITEM das Potenzial, kommerziell verwertet zu werden. Das umfasst Dienstleistungen in der Medikamentenentwicklung, -zulassung und -prüfung, die in Kooperation mit industriellen Partnern angeboten werden können. Pharmapartner, wie Merck, MSD und Sanofi, haben bereits Interesse gezeigt, was weitere Kooperationen und Aufträge in Aussicht stellt. Für das Fraunhofer ITEM liegt die primäre Verwertung der Technologien und Modellsysteme auf der Verwendung als Dienstleistungen für die Entwicklung spezifischer Produkte (z.B. Arzneistoffkandidaten aus der Pharmabranche), deren Wirksamkeit und / oder Toxikologie und Sicherheit bewertet werden muss. Zugang zu ersten Ansprechpartnern ergaben sich aus vorhandenen Netzwerken. So sind Kontakte zu Firmen wie Merck, Sanofi und MSD bereits erfolgt. Die humanen Präzisionsdarmschnitte stellen ein exzellentes Modell dar, das das Verständnis entzündlicher Erkrankungen in einer komplex multizellulären Kultur verbessert und somit die Forschung vorantreibt. Die ausführliche Etablierung und immunologische Charakterisierung der Darmschnitte am Fraunhofer ITEM wird auch in zukünftigen Studien als Standardmethode angewendet, um Medikamente in verschiedenen darmbezogenen Erkrankungen zu testen

Die entwickelten Darmmodelle können in Netzwerke und Transferstellen eingebracht werden, um den Wissens- und Technologietransfer zu fördern. Dies ermöglicht eine breitere Anwendung und Weiterentwicklung der Modelle in verschiedenen Forschungskontexten. Eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Forschungsstellen, Netzwerken oder Institutionen wird angestrebt.

Die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse und entwickelten Technologien bieten eine solide Basis für weiterführende Forschungsprojekte. Dies schließt sowohl grundlagenwissenschaftliche Studien als auch anwendungsorientierte Entwicklungsarbeiten ein.

Insgesamt haben die wissenschaftlichen und technischen Erfolgsaussichten des Vorhabens gezeigt, dass die entwickelten Darmmodelle ein hohes Potenzial besitzen, die Forschung im Bereich der IBD und der Medikamentenentwicklung maßgeblich voranzutreiben. Die enge Zusammenarbeit mit öffentlichen und industriellen Partnern wird dabei helfen, die entwickelten Modelle in verschiedenen Bereichen der biomedizinischen Forschung und Pharmazie anzuwenden und weiter zu verbessern.

#### Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Im Verbundprojekt wurden Erkenntnisse erwartet, die unmittelbar zu Folgeprojekten führen. Voraussetzung dafür war, dass die Ergebnisse regelmäßig intern hinsichtlich ihrer wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Anschlussfähigkeit beurteilt wurden und anschließend öffentlichen und industriellen Partnern, aber auch Meinungsbildnern präsentiert wurden. Wie bereits beschrieben wurde dieser Austausch auf internationalen und nationalen Kongressen erfolgreich betrieben und führte auch über die bestehenden Netzwerke bereits zu ersten weiterführende Projektideen, die im direkten Zusammenhang zu dem Projekt ImmunAvatar stehen, bzw. auf den hier erzielten Ergebnissen und Erkenntnissen aufbauen.

Darüber hinaus wurde das ImmunAvatar Projekt mit dem Fraunhofer Cluster of Excellence Immune-Mediated Diseases (CIMD) verknüpft, in dessen Zusammenhang die Darmschnitte als Modell weiter etabliert und optimiert wurden. In diesem Zusammenhang wurden die Ergebnisse und das Modell der Darmschnitte einem weiteren Fachpublikum auf dem CIMD workshop „Alternativen zum Tierversuch“ präsentiert.

Zusätzlich ist weiterhin geplant, gemeinsam mit Industriepartnern aus der Pharma- und Chemieindustrie Anschlussprojekte für die Darmmodelle in Kombination mit den Chipmodellen durchzuführen, um die Adaptierung der entwickelten Systeme in deren internen Standardverfahren zu etablieren.

#### 2.5 Der während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Seit der Antragstellung für das Verbundprojekt haben sich weitere Fortschritte auf dem dynamischen Gebiet der Alternativmodelle ergeben. Jedoch gibt es nach unserem Wissen keine weiteren Entwicklungen hin zu humanen Darmmodellen mit primärem Patientenmaterial, die den Erkenntnissen und Fortschritten widersprechen könnten, die Fraunhofer ITEM hier generiert und gewonnen hat.

Die neuesten Erkenntnisse und Fortschritte im Bereich der IBD-Forschung werden in die Planung von Folgeanträgen integriert. Daher ist anzunehmen, dass trotz möglicher Innovationen in diesen Bereichen die Forschungsfragen und Methoden auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik bleiben bzw. weiterhin führend sein können.

Diese kontinuierliche Berücksichtigung und Integration aktueller Entwicklungen gewährleistet, dass Fraunhofer ITEM seine Position als Vorreiter in der Erforschung humaner Darmmodelle und deren Anwendung zur Untersuchung von Darmerkrankungen behaupten kann.

2.6 Der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Bei dem hier berichteten Projekt ging es um die Etablierung von human-kompetenten *in vitro* Darmmodellen für die Medikamententestung. Ein erster Teil dieser Arbeit wurde bereits in einem Manuskript verfasst (Kapitel 2.1.3), das Ende Juni eingereicht wird:

- **Titel:** The Calcineurin inhibitor pimecrolimus reduces local immune responses in primary intestinal tissue of inflammatory bowel disease patients *ex vivo*
- **Autoren:** Klaudia Maria Grieger\*, Valerie Beneke\*, Susann Dehmel, Vanessa Neuhaus, Dirk Schaudien, Helena Linge, Alexander Wagner, Ulf Kulik, Heiko Aselmann, Armin Braun, Christina Hesse and Katherina Sewald

Weitere Ergebnisse, insbesondere zu den humanen Präzisionsschnitten, die im Rahmen des Projekts erzielt wurden, sollen zeitnah ebenfalls in weiteren Publikationen zusammengefasst werden.

### 3. Kurzgefasster Erfolgskontrollbericht

#### 3.1 Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen, z.B des Förderprogramms - (ggf. unter Angabe des Schwerpunkts)

“ImmunAvatar - Make your immune system GREAT again“ entstand in erster Linie aus dem In-Vitro Challenge Innovations-Workshop, der 2018 in Berlin stattfand. In einer einjährigen Sondierungsphase wurden Mittel zur ersten Konzeptionierung des Projektes, sowie zu Erhebung erster Vordaten beantragt. Der Workshop und somit auch das Folgeprojekt bauten auf den Fokus des Workshops „Zellkultur- und Tiermodelle – ohne sie kommt die medizinische Forschung bislang nicht aus. Doch nicht alle Erkenntnisse aus diesen Modellen sind auf den Menschen übertragbar. Ein Workshop des BMBF sucht daher nach neuen Lösungsansätzen.“ auf.

Die Ausschreibung zielte darauf ab, innovative Modelle und Konzepte zu fördern, die sowohl zur Lösung medizinischer Fragestellungen als auch zur Verbesserung von Zellkulturmodellen beitragen. Humane primäre Zellen, primäre Gewebekulturen und Chiptechnologien wurden als Basis für diese Modelle verwendet. Das Team von ImmunAvatar erfüllte die Anforderungen in hohem Maße und wurde aufgrund ihrer präsentierten Projektidee dazu eingeladen, einen Antrag für eine einjährige vertiefende Sondierungsphase zu stellen, welche zu dem Projekt ImmunAvatar führte, welches ebenfalls im Sinne der Förderziele der Ausschreibung bewilligt wurde und eine dreijährige Förderung erhielt. Die Bewilligung zeigt, dass die Gutachter der Auffassung waren, dass ImmunAvatar sowohl den Aspekt der Innovation als auch den einer realisierbaren Machbarkeit erfüllte.

ImmunAvatar zielte auf die Entwicklung eines automatisierten Autoimmunchips für Autoimmun- und atopische Erkrankungen, wie nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) ab, der individuelle biologische Reaktionen von der Krankheit bis zur Therapie vorhersagen sollte. Die Idee war und ist besonders innovativ, da bisher keine Technologie existiert, die, aufgrund der biotechnologischen Komplexität und Variabilität zwischen Individuen, menschliche Autoimmunkrankheiten *in vitro* reproduzieren kann. Im Verlauf des Projektes wurden die medizinischen und zell-basierten Anforderungen der ursprünglichen Ausschreibung berücksichtigt.

#### 3.2 Das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Im Rahmen der Teilprojekte 4 und 6 wurde intensiv an der Etablierung von *in vitro* entzündlichen Darmmodellen gearbeitet, die human-basierend sind und für die Testung von neuen Medikamenten verwendet werden sollten. Dieses Vorhaben erwies sich als erfolgreich. Besonders vielversprechend ist das Modell der humanen Präzisionsgeschnittenen-Darmschnitten, das als komplexe multizelluläre Kultur *ex vivo* kultivierbar, stimulierbar und mit Medikamenten modulierbar ist. Das Modell der humanen PCIS stellt ein komplexes zelluläres System dar, das alle wichtigen intestinalen Zellen in ihrer natürlichen Mikroumgebung vereint. Es enthält eine natürliche Komposition an Immunzellen sowie weitere essentielle Zelltypen wie Epithelzellen. Durch die Nutzung dieses Modells können komplexe Fragestellungen im Bereich der Darmerkrankungen und deren Behandlung erforscht werden. Es bietet eine realistische Plattform, um die Wirkungen von Medikamenten unter Bedingungen zu untersuchen, die denen im menschlichen Darmgewebe nahekommen. Somit trägt die Entwicklung dieses Modells maßgeblich zur Weiterentwicklung der Medikamentenforschung und der Erforschung von intestinalen Krankheitsmechanismen bei.

### 3.3 Fortschreibung des Verwertungsplans

#### 3.3.1 Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

Vom Fraunhofer ITEM wurden für das hier berichtete Projekt keine Erfindungen oder Schutzrechte angemeldet oder andere Schutzrechte erteilt.

#### 3.3.2 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse weiter zu vermarkten durch Folgeakquise (öffentliche Projekte und Industrienerfolge) stehen sehr gut. Es gab bereits erste Kontakte zu Industriepartnern, die an dem etablierten Model sehr interessiert waren.

Weitere Projekte aus diesem Gebiet werden erwartet. Die Sichtbarkeit von Fraunhofer ITEM im Kontext Darmerkrankungen, bzw. Darmmodelle, die auf primärem humanem Material basieren, konnte auf zahlreichen Kongressen durch Posterpräsentationen und Vorträgen weiter gesteigert werden. Diese führten zu zahlreichen Gesprächen mit Interessierten und werden voraussichtlich zu weiterer Akquise führen.

Darüber hinaus wurden die neu entwickelten Methoden bereits im Fraunhofer Cluster of Excellence Immune-Mediated Diseases (CIMD) in der Kompetenzplattform »Alternativmethoden für Tierversuche« zum Einsatz gebracht.

#### 3.3.3 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Das Projekt ermöglichte die Etablierung humaner immunkompetenter Darmmodelle zur Erforschung von IBD und Medikamententestung. Trotz unvorhergesehener Umstände wurden die Modelle optimiert und validiert. Sie sind effektiv für die Bewertung neuer Therapien und wurden bereits in wissenschaftlichen Publikationen und auf Konferenzen präsentiert. Kommerzielle Nutzungspotenziale wurden identifiziert, insbesondere durch Partnerschaften mit großen Industriepartnern. Die Präzisionsdarmschnitte des Fraunhofer ITEM verbessern das Verständnis entzündlicher Erkrankungen und bieten eine etablierte Plattform für zukünftige Forschung und Medikamententests.

#### 3.3.4 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse

Wie bereits erwähnt konnten neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der IBD gewonnen werden und ein humanes Darmmodell unter Verwendung von primären Patientenmaterial entwickelt werden. Das primäre Interesse zur Verwertung der Technologien und Modellsysteme für das Fraunhofer ITEM liegt auf der Erweiterung des Portfolios zur Verwendung bei gemeinsamen Projekten mit öffentlichen Einrichtungen oder Industriepartnern. Hier kann das entwickelte Modell bereits zur Entwicklung spezifischer Arzneistoffkandidaten in Bezug auf deren Wirksamkeit und / oder Toxikologie und Sicherheit verwendet werden. Besonders interessant wird eine zukünftige detaillierte Betrachtung verschiedener pharmakologischer Wirkungsmechanismen zur Modulierung von Signalwegen, die zu chronischen Darmerkrankungen betragen. Auch die Charakterisierung der einzelnen Darmgewebe ließe sich weiter vorantreiben. Eine Weiterentwicklung des Modells, auch im Hinblick auf dessen Einbindung in z.B. die in ImmunAvatar entwickelten Chipmodelle würde innovative Ansätze zur weiteren Reduktion im Bereich der Tierversuche im Zusammenhang mit prä-klinischer Forschung

führen. Darüber hinaus könnte das humane Modell auch für die Basisforschung verwendet werden, um hier Faktoren, bzw. Targets für die Behandlung oder auch Früherkennung von IBD zu liefern.

Im Verbundprojekt wurden Erkenntnisse erwartet, die unmittelbar zu Folgeprojekten führen sollten. Voraussetzung dafür war, dass die Ergebnisse regelmäßig intern hinsichtlich ihrer wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Anschlussfähigkeit beurteilt wurden und anschließend öffentlichen und industriellen Partnern, aber auch Meinungsbildnern präsentiert wurden. Wie bereits beschrieben wurde dieser Austausch auf internationalen und nationalen Kongressen erfolgreich betrieben und führte auch über die bestehenden Netzwerke bereits zu ersten weiterführende Projektideen, die im direkten Zusammenhang zu dem Projekt ImmunAvatar stehen, bzw. auf den hier erzielten Ergebnissen und Erkenntnissen aufbauen. Darüber hinaus wurde das ImmunAvatar Projekt mit dem Fraunhofer Cluster of Excellence Immune-Mediated Diseases (CIMD) verknüpft, in dessen Zusammenhang die Darmschnitte als Modell weiter etabliert und optimiert wurden. In diesem Zusammenhang wurden die Ergebnisse und das Modell der Darmschnitte einem weiteren Fachpublikum auf dem CIMD workshop „Alternativen zum Tierversuch“ präsentiert. Zusätzlich ist weiterhin geplant, gemeinsam mit Industriepartnern aus der Pharma- und Chemieindustrie Anschlussprojekte für die Darmmodelle in Kombination mit den Chipmodellen durchzuführen, um die Adaptierung der entwickelten Systeme in deren internen Standardverfahren zu etablieren.

### 3.3.5 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Auf Seiten von Fraunhofer ITEM gab es keine Arbeiten, die zu keiner Lösung führten.

### 3.3.6 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Entfällt

### 3.3.7 die Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die Kosten- und Zeitplanung wurden durch unvorhergesehene Verzögerungen nicht eingehalten und kostenneutrale Verlängerungen wurden beantragt. Die Personal- und Materialkosten wurden ausgeschöpft.

---

Datum und Unterschrift des Projektleiters

## 4 Literaturverzeichnis

- Angelis, Isabella de; Turco, Laura (2011): Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. In: *Current Protocols in Toxicology* Chapter 20 (1), Unit20.6. DOI: 10.1002/0471140856.tx2006s47.
- Araki, Yoshio; Sugihara, Hiroyuki; Hattori, Takanori (2006): In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis. In: *Oncology reports* 16 (6), S. 1357–1362. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17089061/>.
- Burisch, Johan; Jess, Tine; Martinato, Matteo; Lakatos, Peter L. (2013): The burden of inflammatory bowel disease in Europe. In: *Journal of Crohn's & colitis* 7 (4), S. 322–337. DOI: 10.1016/j.crohns.2013.01.010.
- Canavan, C.; Abrams, K. R.; Mayberry, J. (2006): Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 23 (8), S. 1097–1104. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x.
- Cao, Hui; Diao, Jun; Liu, Huosheng; Liu, Suxian; Liu, Jun; Yuan, Jianye; Lin, Jiang (2023): The Pathogenicity and Synergistic Action of Th1 and Th17 Cells in Inflammatory Bowel Diseases. In: *Inflammatory bowel diseases* 29 (5), S. 818–829. DOI: 10.1093/ibd/izac199.
- Casalegno Garduño, Rosaely; Däbritz, Jan (2021): New Insights on CD8+ T Cells in Inflammatory Bowel Disease and Therapeutic Approaches. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 738762. DOI: 10.3389/fimmu.2021.738762.
- Crawford, Charles K.; Lopez Cervantes, Veronica; Quilici, Mary L.; Armién, Aníbal G.; Questa, María; Matloob, Muhammad S. et al. (2022): Inflammatory cytokines directly disrupt the bovine intestinal epithelial barrier. In: *Sci Rep* 12 (1), S. 14578. DOI: 10.1038/s41598-022-18771-y.
- Eckmann, L.; Jung, H. C.; Schürer-Maly, C.; Panja, A.; Morzycka-Wroblewska, E.; Kagnoff, M. F. (1993a): Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. In: *Gastroenterology* 105 (6), S. 1689–1697. DOI: 10.1016/0016-5085(93)91064-o.
- Eckmann, L.; Kagnoff, M. F.; Fierer, J. (1993b): Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. In: *Infection and immunity* 61 (11), S. 4569–4574. DOI: 10.1128/iai.61.11.4569-4574.1993.
- Fakhoury, Marc; Negrulj, Rebecca; Mooranian, Armin; Al-Salami, Hani (2014): Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. In: *Journal of inflammation research* 7, S. 113–120. DOI: 10.2147/JIR.S65979.
- Graaf, Inge A. M. de; Olinga, Peter; Jager, Marina H. de; Merema, Marjolijn T.; Kanter, Ruben de; van de Kerkhof, Esther G.; Groothuis, Geny M. M. (2010): Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. In: *Nature protocols* 5 (9), S. 1540–1551. DOI: 10.1038/nprot.2010.111.
- Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T. (1989): Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. In: *Gastroenterology* 96 (3), S. 736–749. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2914637/>.
- Jiang, Ping; Zheng, Chang; Xiang, Ying; Malik, Sara; Su, Dan; Xu, Guifang; Zhang, Mingming (2023): The involvement of TH17 cells in the pathogenesis of IBD. In: *Cytokine & growth factor reviews* 69, S. 28–42. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2022.07.005.
- Kappeler, A.; Mueller, C. (2000): The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease. In: *Histology and histopathology* 15 (1), S. 167–172. DOI: 10.14670/HH-15.167.
- Laroui, Hamed; Ingersoll, Sarah A.; Liu, Hong Chun; Baker, Mark T.; Ayyadurai, Saravanan; Charania, Moiz A. et al. (2012): Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. In: *PLoS ONE* 7 (3), e32084. DOI: 10.1371/journal.pone.0032084.

- Maloy, Kevin J.; Powrie, Fiona (2011): Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. In: *Nature* 474 (7351), S. 298–306. DOI: 10.1038/nature10208.
- Müller, S.; Lory, J.; Corazza, N.; Griffiths, G. M.; Z'graggen, K.; Mazzucchelli, L. et al. (1998): Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. In: *The American journal of pathology* 152 (1), S. 261–268.
- Olén, Ola; Askling, Johan; Sachs, Michael C.; Neovius, Martin; Smedby, Karin E.; Ekblom, Anders; Ludvigsson, Jonas F. (2020): Mortality in adult-onset and elderly-onset IBD: a nationwide register-based cohort study 1964-2014. In: *Gut* 69 (3), S. 453–461. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-317572.
- Sairenji, Tomoko; Collins, Kimberly L.; Evans, David V. (2017): An Update on Inflammatory Bowel Disease. In: *Primary care* 44 (4), S. 673–692. DOI: 10.1016/j.pop.2017.07.010.
- Sonnier, Dennis I.; Bailey, Stephanie R.; Schuster, Rebecca M.; Lentsch, Alex B.; Pritts, Timothy A. (2010): TNF- $\alpha$  induces vectorial secretion of IL-8 in Caco-2 cells. In: *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 14 (10), S. 1592–1599. DOI: 10.1007/s11605-010-1321-9.
- Souza, Heitor S. P. de; Fiocchi, Claudio (2016): Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 13 (1), S. 13–27. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.186.
- Walter, Elke; Kissel, Thomas (1995): Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 3 (4), S. 215–230. DOI: 10.1016/0928-0987(95)00010-B.
- Wang, Rui; Li, Zhaoqi; Liu, Shaojun; Zhang, Decai (2023): Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. In: *BMJ Open* 13 (3), e065186. DOI: 10.1136/bmjopen-2022-065186.
- Wang, Yuli; Kim, Raehyun; Hwang, Shee-Hwan J.; Dutton, Johanna; Sims, Christopher E.; Allbritton, Nancy L. (2018): Analysis of Interleukin 8 Secretion by a Stem-Cell-Derived Human-Intestinal-Epithelial-Monolayer Platform. In: *Analytical Chemistry* 90 (19), S. 11523–11530. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b02835.