

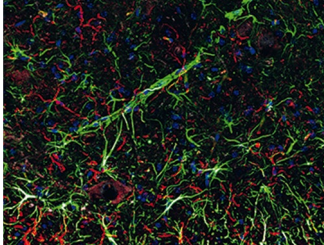
SONDERDRUCK

aus

1 | 2026

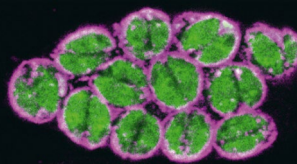
VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland



NEUROBIOLOGIE

Gliazellen als Netz-
werkregulatoren



PARASITOLOGIE

3R Prinzipien in der
Infektionsforschung



GENETIK

„Übergroße“ Genome

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT

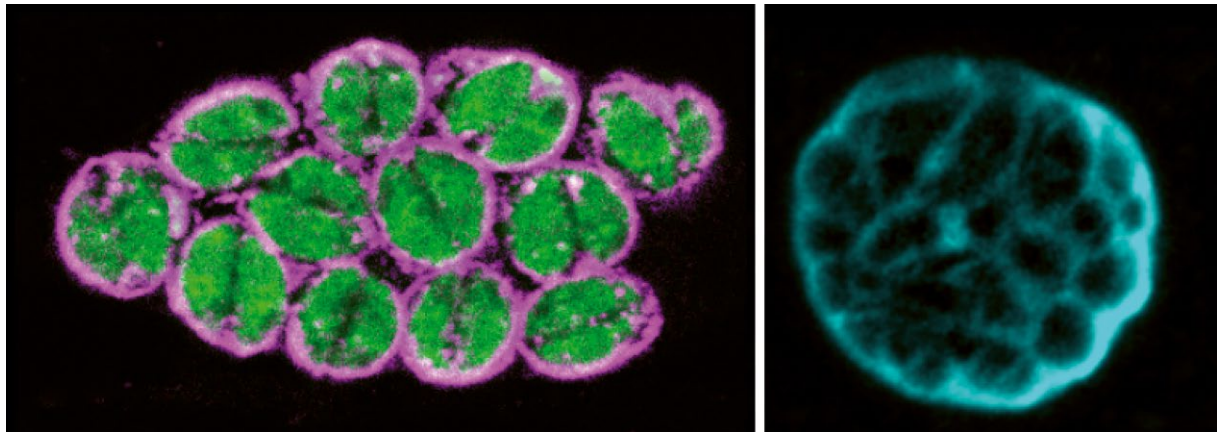


Neue
genomische
Techniken

Neuere Methoden zur Reduzierung von Tierversuchen

Das 3R-Konzept und der Parasit *Toxoplasma gondii*

FRANK SEEBER



Tachyzoiten (grün) und Bradyzoiten (blau) von *Toxoplasma*. Abb.: D. Warschkau.

*Was haben einzellige Parasiten mit Fleisch aus dem Reagenzglas und Organoiden als Ersatzmethoden für Tierversuche zu tun? Jeder mag Katzenvideos, trotzdem gibt es wissenschaftliche Fragestellungen, in denen Katzenversuche kaum ersetzbar erscheinen. Kann man das ändern? Anhand der Forschung am humanpathogenen Einzeller *Toxoplasma gondii* wird deutlich, welche komplexen Probleme in der Forschung bestehen, wenn auf Tierversuche weitgehend verzichtet werden soll. Darüber hinaus ist sie ein gutes Beispiel dafür, wie unterschiedliche Forschungsschwerpunkte eine gemeinsame Lösung haben können, um damit tierproduktfreie Zellkulturen zu ermöglichen.*

In Deutschland dürfen Tierversuche nur durchgeführt werden, wenn keine Alternativen zur Verfügung stehen. Nur dann kann ein Genehmigungsantrag für einen Tierversuch durch die zuständigen Behörden bewilligt werden. Dies zwingt die Forschenden, sich kritisch und

intensiv mit der Projektdurchführung auseinanderzusetzen und nach möglichen Ersatzmethoden zu suchen. Das Deutsche Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) stellt dazu ein Tool bereit: SMAFIRA („SMARt Feature basiertes Interaktives RANKing“). Dies ist „eine virtuelle Suchmaschine, die es Forschenden erlaubt, geeignete Vorschläge für Alternativmethoden zu einem Versuch zu finden“ (<https://smafira.bf3r.de>). Entsprechend ist in letzter Zeit die Gesamtzahl an Tierversuchen leicht gesunken, obwohl die Ausgaben für Forschung in Deutschland stetig zunahm. Allerdings wurden 2023 in Deutschland ca. 672.000 Tiere ausschließlich zur Gewebe- oder Organentnahme getötet, ohne zuvor Teil eines Versuchs gewesen zu sein, wobei auch diese Zahl zuletzt gesunken ist. Es wird vermutet, dass dies mit der zunehmenden Suche nach Alternativmethoden zu Tierversuchen im Zusammenhang steht [1]. Eine Vielzahl an vergleichenden Versuchen ist nötig, um eine Alternative zu Tierversuchen zu etablieren und deren Eignung an Stelle eines entsprechenden Tiermodells zu demonstrieren. Dies bedingt daher zunächst den vergleichenden Einsatz von Tieren bzw. deren Organen.

Das 3R-Konzept: Tierversuche ersetzen, reduzieren oder verbessern

Das Konzept von „3R“ wurde erstmals 1959 vorgestellt und steht für die drei englischen Begriffe *replace*, *reduce*, *refine* (Ersetzen, Reduzieren, Verbessern) im Zusammen-

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar auf Seite 85 erklärt.

hang mit Tierversuchen [2]. Dabei ist nach Möglichkeit das Ersetzen von Experimenten an/mit Tieren dem Reduzieren oder Verbessern/Verfeinern vorzuziehen (Abbildung 1). Ist beides nicht erreichbar, um eine wissenschaftliche Aussage gleicher Qualität treffen zu können, sollte wenigstens versucht werden, eine Verbesserung der Haltungsbedingungen sowie die Anwendung von schmerzlindernden sowie weniger invasiven Methoden (z.B. bei der Blutentnahme oder der Infektion mit Pathogenen) zu erreichen. Die genauen Vorgehensweisen sind dabei natürlich von vielen Parametern (Tierart, Anzahl, Versuchsaufbau, -durchführung und -dauer, Aussage des Experiments etc.) abhängig und müssen entsprechend berücksichtigt und angepasst werden. Auf eine Internetseite zur umfangreichen, informativen und wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit der komplexen Thematik Tierversuche sei hier hingewiesen (<https://www.tierversucheverstehen.de>).

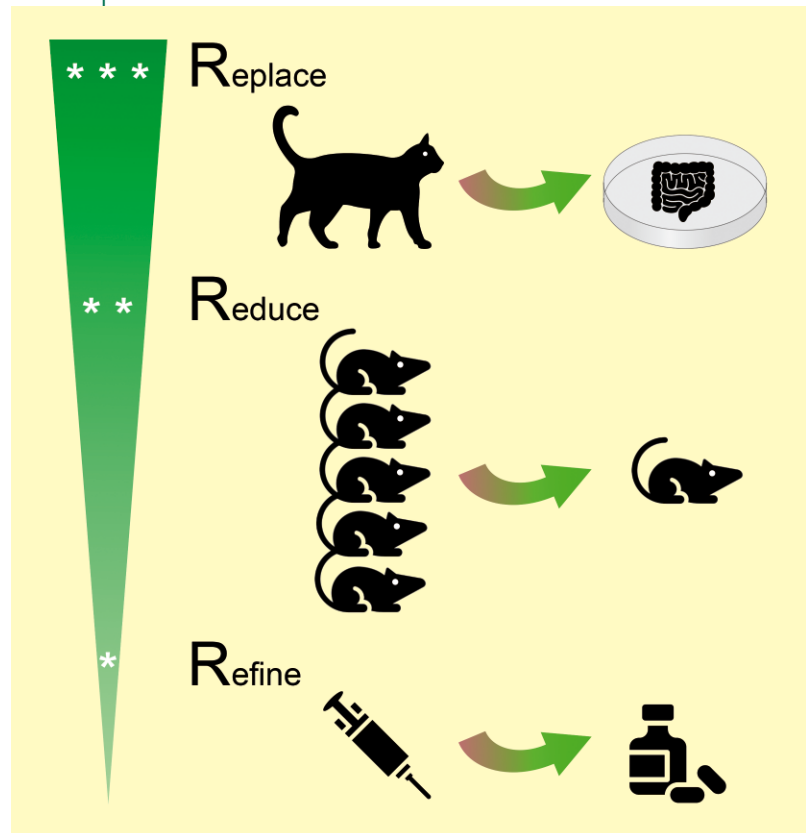
Prinzipiell kommen als Alternativen mehrere, jedoch unterschiedliche Ansätze in Frage, alleine oder in Kombination: bildgebende Methoden (z.B. Magnetresonanztomographie, MRT), *In-silico*-Analysen (z.B. Computermodelle und -simulationen zur Wirkstoffentwicklung), *In-vivo*-Versuche an Einzellern, Insekten oder Ähnliches oder *In-vitro*-Versuche, basierend auf Zell- oder Gewebekulturen. In diesem Artikel werde ich mich auf letztere konzentrieren.

Zell- und Gewebekulturen als Tierersatz: gut, aber noch nicht optimal

Versuche mit Zellen und Geweben *in vitro* sind seit Jahrzehnten Standard und stehen auch häufig am Anfang von Fragestellungen, bevor Tierversuche ins Auge gefasst werden. Allerdings basieren viele etablierte Zelllinien auf transformierten Zellen aus Tumoren, sind also nicht mit gesunden Zellen gleichzusetzen. Dies limitiert ihren Einsatz als Alternative für Tierversuche häufig stark. Auch sind die Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen, spezifischen Zellen, die ein Gewebe bzw. einen ganzen Organismus ausmachen, in zwei- oder auch dreidimensionalen Kulturen mit einer Zelllinie nicht darzustellen. Deshalb haben in den letzten Jahren sogenannte ► Organoidkultursysteme sehr stark zugenommen und werden in absehbarer Zeit viele klassische zellbasierte Methoden ersetzen [3]. Dies wird dadurch verdeutlicht, dass der Tierschutzforschungspreis des Bundesministeriums für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat für herausragende Forschungsleistungen zum Ersatz und zur Verminderung von Tierversuchen 2025 an Prof. Hans Clevers (Professor am *Hubrecht Institute* der Universität Utrecht, Niederlande, und bis Ende August 2025 zudem Leiter Roche Forschung und Frühe Entwicklung (pRED)) für seine wegweisenden Versuche zur Etablierung der Darmorganoidkultur ging [4].

Generell gibt es verschiedene Formate von Organoidkulturen, wobei solche im Miniaturformat („*organ-on-a-chip*“) prinzipiell miteinander koppelbar sind. Damit

ABB. 1 | DAS 3R-KONZEPT ZUM ERSATZ VON TIERVERSUCHEN



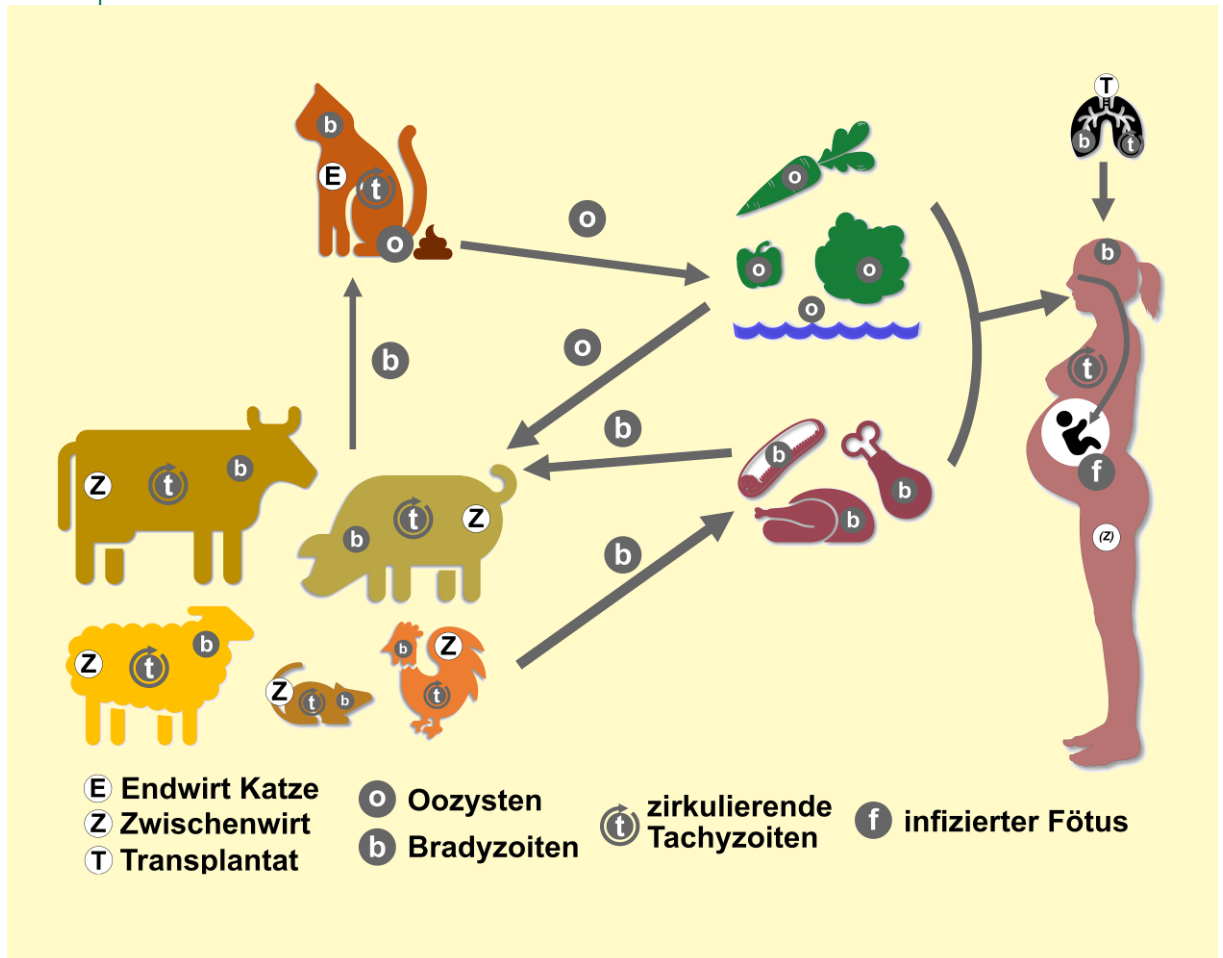
3R steht für **Replace, Reduce, Refine**, d. h. Ersetzen, Reduzieren, Verbessern. Dabei markiert die Anzahl der Sterne das Maß der Verbesserung.

scheint es in Zukunft möglich zu sein, das Zusammenspiel vieler Organe eines ganzen Organismus darzustellen. Ein Nachteil ist aber, dass solche Chip-basierten Systeme nicht sehr gut skalierbar sind; d. h. sie sind gut für analytische Fragestellungen, aber nur begrenzt geeignet, wenn größere Zellmengen benötigt werden. Solche Kulturen werden weiter unten beschrieben. Natürlich können aber auch komplexe Multi-Organoidsysteme weiterhin nicht alle Tierversuche ersetzen, z. B. wenn es um neurologische Prozesse und deren Auswirkungen im ganzen Organismus (Verhalten etc.) geht.

IN KÜRZE

- **Tierversuchszahlen** sind in Deutschland dank neuer *In-vitro*-Methoden rückgängig.
- Der einzellige Parasit *Toxoplasma gondii* ist in der deutschen Bevölkerung **weit verbreitet, aber nahezu unbekannt**.
- Sein **komplexer Lebenszyklus** in verschiedenen Wirten erschwert dessen Nachstellung *in vitro* und somit die Forschung.
- Neue **Darmorganoidmodelle könnten Infektionsversuche** in Mäusen und Katzen zu Forschungszwecken **reduzieren**.
- Forschung an **künstlichem Fleisch** ermöglicht auch die **Reduzierung von tierischen Produkten** für den Einsatz in *In-vitro*-Modellen von *Toxoplasma*.

ABB. 2 | INFEKTIONSZYKLUS VON *TOXOPLASMA GONDII*



Der Infektionszyklus von *Toxoplasma* ist sehr komplex, da neben Katzen als Endwirt (E) mehrere Zwischenwirte (Z) auftreten können. Menschen können sich über Fleisch infizierter Tiere, mit Katzenkot verunreinigtem Gemüse oder Organtransplante (T) infizieren. Eine detaillierte Beschreibung findet sich im Abschnitt „Infektionszyklus von *Toxoplasma*“.

Der Parasit *Toxoplasma gondii*: Jeder Zweite hat ihn, kaum einer kennt ihn

Der einzellige, intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* kommt weltweit sowohl in allen warmblütigen Tieren als auch im Menschen vor und kann dort alle Organe besiedeln. Damit handelt es sich um einen ► zoonotischen Erreger, wobei seine Verbreitung in Nutztieren für die Infektion des Menschen von besonderer Bedeutung ist. Die von ihm verursachte Infektionskrankheit wird Toxoplasmose genannt, wobei die Ausprägung von Krankheitssymptomen bei den meisten Menschen mit funktionierendem Immunsystem nur mild ist (z. B. Fieber, Müdigkeit, Muskelschmerzen und geschwollene Lymphknoten). Entsprechend wissen die meisten der 25–30 Prozent weltweit Infizierten (in Deutschland 50 % der Erwachsenen) nicht, dass sie infiziert wurden und damit den Parasiten chronisch in sich tragen. Ist das Immunsystem jedoch durch Krankheit oder durch die Einnahme von Immunsuppressiva geschwächt (z. B. AIDS-Patienten oder Transplantatempfänger), kann die Infektion unbehandelt zu ernsthaften medizinischen Symptomen wie Verwirrtheit, Sehstö-

rungen und anderen neurologischen Problemen bis hin zur Enzephalitis führen. Infiziert sich eine Schwangere zum ersten Mal mit *Toxoplasma*, so ist dies besonders gefährlich, da auch das ungeborene Kind infiziert und dadurch geschädigt werden kann. Abhängig vom Zeitpunkt dieser sogenannten „Primärinfektion“ können die Folgen für den Fötus dramatisch sein (z. B. bleibende Fehlbildungen, Augenschäden, Gehirnentzündungen etc.) und in schweren Fällen unbehandelt auch zur Fehlgeburt führen. Glücklicherweise gibt es bei frühzeitiger Erkennung recht gut wirkende Medikamente gegen die akute Infektion [5].

Infektionszyklus von *Toxoplasma*

Wie bei vielen anderen Parasiten sind auch der Infektions- und Lebenszyklus von *Toxoplasma* recht komplex (Abbildungen 2 und 3). Den Infektionszyklus zeigt Abbildung 2: Infizierte Katzen und andere Feliden scheiden mit dem Kot Millionen von ► Oozysten aus (Dauerstadium in der Umwelt, o). Damit kann der Erreger durch kontaminierte Nahrung bzw. Oberflächenwasser sowohl auf Nutztiere als auch auf den Menschen übertragen werden (o, wobei

prinzipiell alle als Zwischenwirt (Z) dienen können, sofern sie vom Endwirt (E) gefressen werden). Infizierte Beutetiere von Katzen bringen *Toxoplasma* dadurch zurück in den Endwirt (b). Der Verzehr von ungenügend gegartem Fleisch oder Wurst infizierter Tiere ist der zweite Weg, mit dem sich der Mensch infizieren kann (b). Dies erfolgt durch das zweite infektiöse Stadium, die sogenannten ► Bradyzoiten in Gewebssystemen (b). Eine besondere Bedeutung hat beim Menschen die Übertragung auf das Ungeborene während der Schwangerschaft (kongenitale Infektion, f). Auch Organtransplantate Infizierter sind eine mögliche Infektionsquelle (T). Ein drittes Stadium sind die ► Tachyzoiten (t). Diese sich schnell vermehrende Form verbreitet sich nach einer Infektion im gesamten Wirt und wandelt sich in das chronische Bradyzoiten-Stadium um.

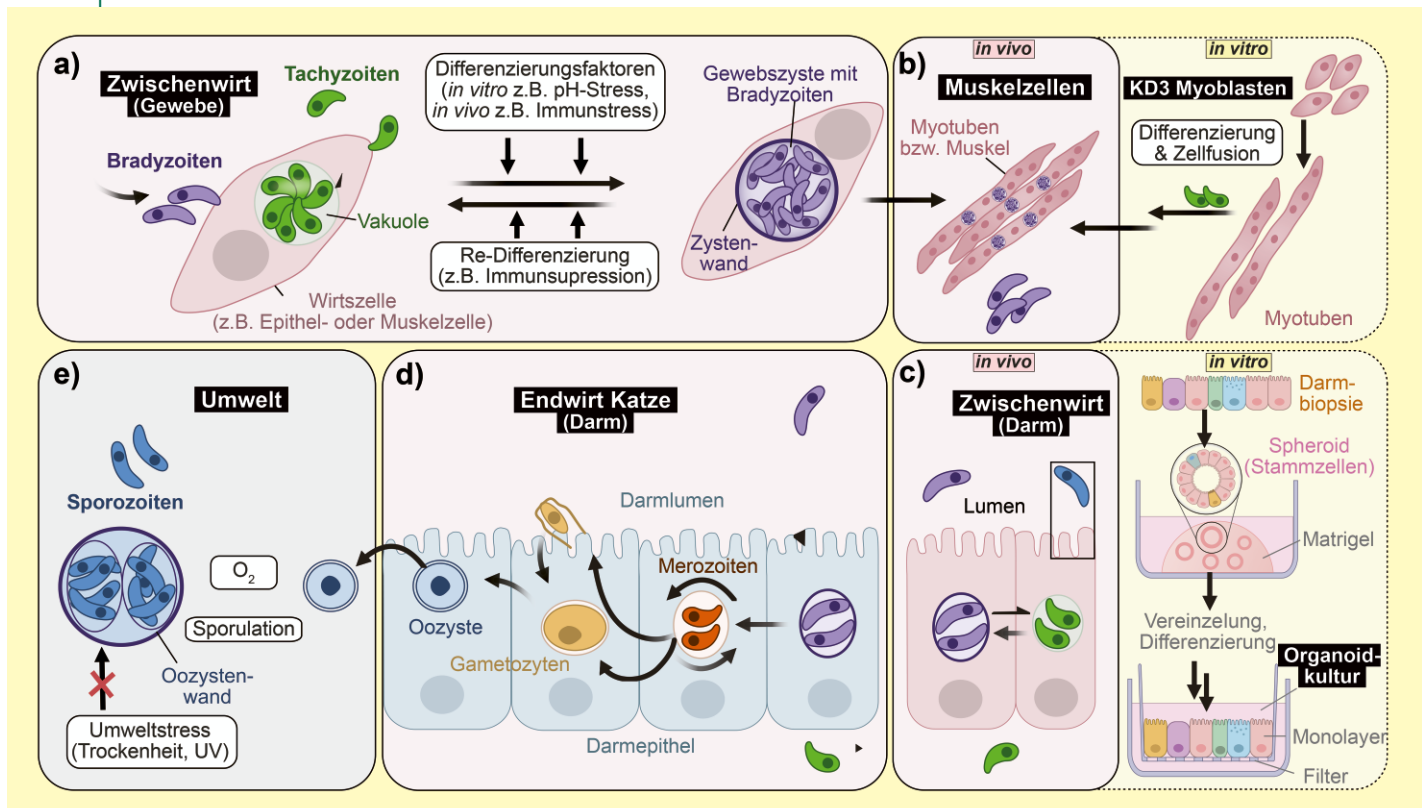
Intrazellulärer Lebenszyklus

Bradyzoiten sind innerhalb einer Wirtszelle von einer Zystenwand umgeben (Abbildung 3a). Sie können in allen

Geweben vorkommen, finden sich aber häufig in Muskelzellen (Abbildung 3b), was ihre Verbreitung durch Fleischverzehr erklärt. Dabei ist die vorhandene Resistenz von Bradyzoiten gegen den sauren pH des Magens entscheidend, damit eine anschließende Infektion über die Darmwand stattfinden kann (Abbildung 3c). Im Darmepithel wandeln sie sich schnell in Tachyzoiten um.

Zusätzlich zu dieser ungeschlechtlichen Vermehrung kann bei allen Katzenartigen (Felidae), den einzigen Endwirten, eine sexuelle Fortpflanzung stattfinden (Abbildung 3d). Die dabei entstehenden Oozysten können harschen Umwelteinflüssen wie ultravioletter Strahlung, hohen und niedrigen Temperaturen und Austrocknung widerstehen. So können sie über viele Monate (nach dem Vorgang der sogenannten Sporulation) als ► Sporozoiten, dem vierten Entwicklungsstadium, innerhalb der Oozyste in der Umwelt infektiös bleiben (Abbildung 3e). Deren orale Aufnahme über den Magen/Darm schließt damit den Infektionszyklus ab (Abbildung 3c).

ABB. 3 | LEBENSZYKLUS VON TOXOPLASMA AUF ZELLULÄRE EBENE



a) Tachyzoiten und Bradyzoiten bilden nach dem Eindringen in eine Wirtszelle eine von einer Membran umgebene Vakuole und teilen sich. Bradyzoiten differenzieren dabei zu Tachyzoiten. Das chronische Bradyzoitenstadium bildet sich aus Tachyzoiten unter dem Einfluss von Stressfaktoren, und aus der Vakuole wird eine Gewebszyste. b, in vivo) Dies geschieht in allen Geweben, häufig aber im Muskelgewebe. b, in vitro) In vitro kann man dies in Muskelfaserzellen (Myotuben) erreichen. c, in vivo) Nach der Aufnahme von Gewebssystemen (s. Abb. 3) dringen Bradyzoiten in das Darmepithel ein und wandeln sich wieder in Tachyzoiten um. Diese passieren das Darmepithel und verbreiten sich im gesamten Wirt. c, in vitro) In vitro kann man dies zu einem gewissen Grad nachstellen (s. Abb. 5). d) Der sexuelle Entwicklungsweg aus Bradyzoiten startet nur im Darmepithel von Katzen. Über mehrere Stadien entstehen daraus Oozysten. e) Diese werden von der Katze ausgeschieden und sporulieren („reifen“) in der Umwelt nach Tagen. Dadurch entstehen Sporozoiten, die hochinfektiös sind und ebenfalls zur Infektion führen können (Kasten in c). Abb. verändert nach [12].

Warum ist Forschung an Bradyzoiten und Oozysten von *Toxoplasma* notwendig?

Da bei der überwiegenden Mehrheit der Infizierten *Toxoplasma* lebenslang in Form von Bradyzoiten innerhalb einer Gewebssysteme verbleibt, besteht ein großes Interesse, dieses Stadium zu eliminieren. Die Zystenwand schützt aber sowohl vor einer Immunantwort als auch vor Medikamenteneinfluss relativ gut. Bislang gibt es keine Medikamente oder Substanzen, die in der Lage sind, einen Wirt von Bradyzoiten zu befreien, womit prinzipiell dauerhaft die Gefahr einer erneuten akuten Infektion aufgrund einer Re-Differenzierung besteht (Abbildung 3a). Gerade in einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung mit einem nachlassenden Immunsystem ist so mit Komplikationen zu rechnen.

Dem Oozystenstadium kommt eine große, bislang aber wenig erforschte Bedeutung im Infektionsgeschehen zu, was auch an einem fehlenden *In-vitro*-System liegt. Dies erschwert nicht nur Untersuchungen zur allgemeinen Biologie dieses Erregers, sondern auch zu mehr angewandten Fragen, wie z. B. welche Moleküle oder Proteine für die Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse verantwortlich sind (Abbildung 3e) [6]. Solche Erkenntnisse könnten aber wichtig sein, um z. B. bessere Methoden zur Inaktivierung von Oozysten in landwirtschaftlichen Betrieben zu entwickeln, wo Katzen und Schlachtvieh in enger Nachbarschaft leben (Stichwort „Zoonose“).

Forschung an den infektiösen Stadien von *Toxoplasma* benötigt oft Tierversuche

Bislang wird Forschung an *Toxoplasma* hauptsächlich am schnell wachsenden Tachyzoitenstadium betrieben, das recht einfach in großen Mengen in Zellkultur gewonnen werden kann. Tachyzoiten haben viele experimentelle Vorteile – auch im Vergleich zum verwandten Malariaerregers *Plasmodium falciparum*, weswegen *Toxoplasma* auch hierfür bei einigen Fragestellungen als Modell benutzt wird. Tachyzoiten können beispielsweise problemlos in Fibroblasten kultiviert werden und behalten ihre hauptsächlichsten Eigenschaften bei, wie sie auch *in vivo* in Versuchstieren zu beobachten sind. Anders sieht es für Oozysten und Bradyzoiten aus, die bislang von bzw. aus infizierten Tieren stammen.

Bislang sind viele Versuche im Labor mit Bradyzoiten davon abhängig, dass diese zuvor in Mäusen „produziert“ werden müssen. Anders als für Tachyzoiten ist dies *in vitro* für Bradyzoiten bisher wesentlich weniger effizient möglich. Vor allem waren solchermaßen gewonnene Bradyzoiten in wichtigen Merkmalen (z. B. Dicke der Zystenwand, Widerstandsfähigkeit gegen erhöhte Temperatur bzw. chemischen Inhibitoren) denen von Mäusen nicht ebenbürtig. Dies lag vor allem daran, dass die Differenzierung vom Tachyzoiten- zum Bradyzoitenstadium mit dem Auslösen von Stress (z. B. erhöhtem pH-Wert des Kulturmediums, Nährstoffmangel etc.) in der Zellkultur eingeleitet werden musste (Abbildung 3a). In der Maus geschieht

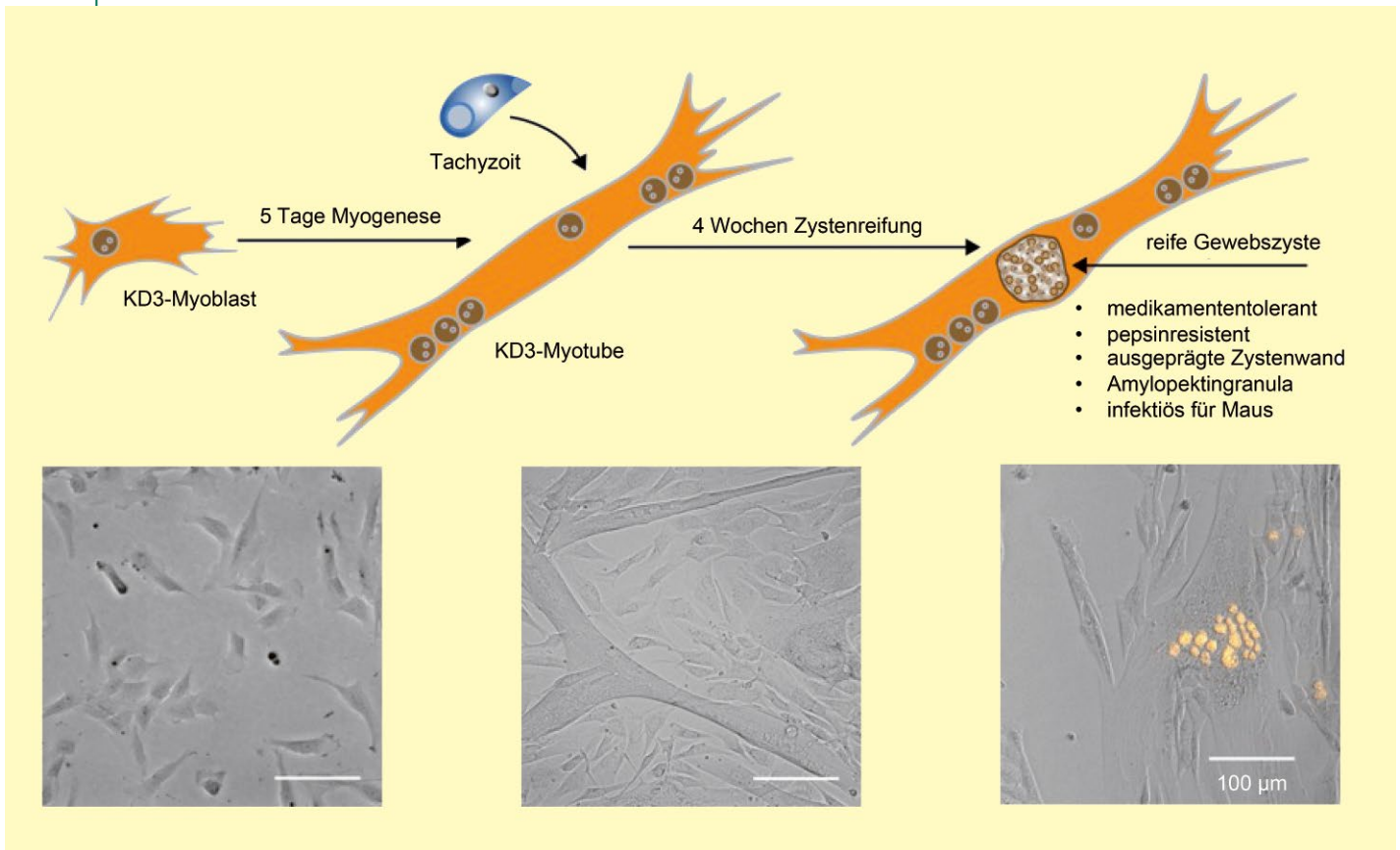
dies quasi automatisch durch eine Vielzahl an Signalen (z. B. zelluläre Umgebung, Immunantwort), deren Zusammenspiel aber noch wenig verstanden ist (Abbildung 3b). Die Stressbehandlung führte aber letztlich dazu, dass die Bradyzoitenkultur nach maximal zwei Wochen aufgrund des Zelltodes der Wirtszelle beendet werden musste. Somit konnten auch Versuchsergebnisse mit solchen *in vitro* erzeugten Bradyzoiten nicht direkt mit denen aus der Maus (*in vivo*) verglichen werden, da hier mehrere Wochen bis Monate verstreichen können, bevor die Parasiten isoliert werden.

In-vitro-Bradyzoiten aus Muskelzellkulturen und Organoiden

Seit kurzer Zeit steht nun aber ein *In-vitro*-Kultursystem zur Verfügung, das entscheidende Vorteile bietet und das Potenzial hat, viele Mausversuche überflüssig zu machen [7] (Abbildung 3b, *in vitro*; Abbildung 4). Es basiert auf humanen, immortalisierten („unsterblichen“) Skelettmuskelzellen (genannt KD3) als Wirtszelle für Tachyzoiten, die sich dann unter entsprechenden Kulturbedingungen in Bradyzoiten differenzieren (Abbildung 3b, *in vitro*; Abbildung 4). Diese differenzierten Muskelzellen (► Myotuben) können sechs Wochen und länger die Reifung der Bradyzoiten hin zu Gewebssystemen mit den gewünschten Eigenschaften unterstützen [7]. Dabei geschieht die Differenzierung in den Muskelzellen – anders als z. B. in Fibroblasten – spontan (Abbildung 4, [8]). Ein Vorteil dieser Methode ist (verglichen mit Bradyzoiten aus der Maus), dass damit eine handhabbare Möglichkeit existiert, ganze Banken an chemischen Substanzen auf deren Fähigkeit hin zu überprüfen, das Wachstum von Bradyzoiten zu stoppen. Damit konnten mit dem beschriebenen KD3-Kultursystem einige Substanzen identifiziert werden, die gegen Bradyzoiten wirken [9]. Dieser Ansatz wäre mit *In-vivo*-Bradyzoiten kaum möglich gewesen.

Der nächste Schritt, der zur Einsparung von Versuchen mit Mäusen führen soll, ist die Nachahmung der Darmwand *in vitro*. Bradyzoiten und Sporozysten benutzen dieses Organ als Haupteintrittspforte in den Wirt (Abbildung 3c), womit ein Kultursystem für Darmorganoiden von großer Bedeutung ist [10]. Dabei spiegeln die aus Stammzellen gewonnenen „Mini-Organ“ weitgehend die zelluläre Komplexität des Darmgewebes wider. Sie stellen damit eine potenziell unbegrenzt zur Verfügung stehende Quelle für nicht-transformierte, komplexe Gewebe dar (Abbildung 3c, *in vitro*). Die verschiedenen Zelltypen werden durch die Zugabe bestimmter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren induziert und können als dreidimensionale Gebilde, aber auch als Zellrasen ausgesät werden (Abbildung 5a, b). Letzteres erleichtert die Arbeit mit Pathogenen, die in das Darmepithel eindringen müssen. Allerdings fehlen Immunzellen und Mikroorganismen des Darms in diesem System, können aber in Ko-Kulturen hinzugefügt werden.

ABB. 4 | IN-VITRO-ERZEUGUNG VON BRADYZOITEN IN HUMANEN MYOTUBEN



Die Bradyzoiten differenzieren unter geeigneten Kulturbedingungen aus Myoblasten. Nach Infektion mit Tachyzoiten und wochenlanger Inkubation entstehen reife Gewebszysten mit Eigenschaften, die denen aus einer infizierten Maus gleichen. Unten: Mikroskopische Aufnahmen der drei Phasen. KD3-Myotuben = immortalisierte Skelettmuskelzellen. Abb. verändert nach [8].

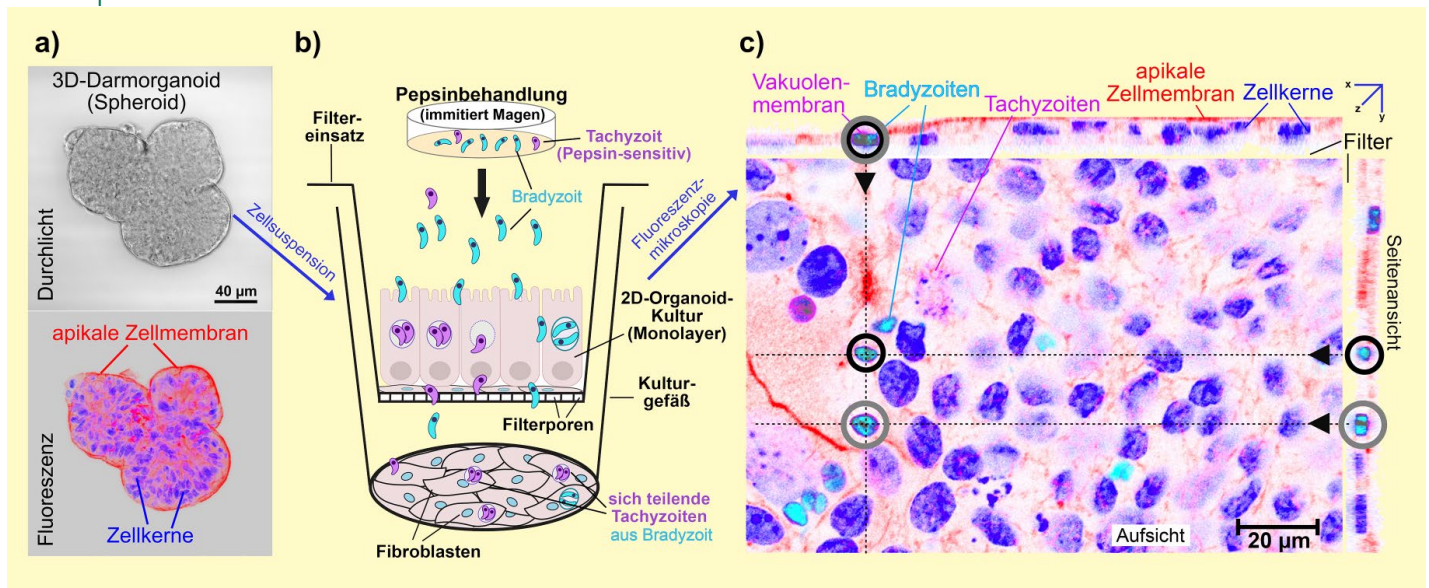
Damit der Infektionsprozess im Darm, wie er auch in der Maus oder dem Menschen stattfindet (Abbildung 3c, [10]), simuliert werden kann, sollen Zellen aus Darmorganoiden auf einem Filter wachsen und eine dichte Epithelschicht ausbilden. Nach einem Pepsinverdau, der die Magenpassage nachstellt, werden Bradyzoiten aus KD3-Myotuben auf die Darmzellen gegeben (Abbildung 5c). Die Fibroblasten unterhalb des Filters ersetzen dabei die Lamina Propria des Darmepithels, welche zu erreichen eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion durch Bradyzoiten ist. Dies ist in dem geschilderten *In-vitro*-System mikroskopisch leicht zu verfolgen. Damit sollten z. B. Versuche mit genetisch veränderten Parasiten, von denen vermutet wird, dass sie in diesem essentiellen Schritt der Infektion beeinträchtigt sind, nicht mehr notwendigerweise in Mäusen durchgeführt werden müssen, wie das bislang der Fall ist [11]. Entsprechende Versuche werden zurzeit verfolgt.

Im Gegensatz zur asexuellen Vermehrung ist die sexuelle Entwicklung von *Toxoplasma* auf das Darmepithel von Katzen beschränkt (Abbildung 3d). Für Oozysten steht noch gar kein „Produktionssystem“ außer Katzen zur Verfügung [12]. Deren Infektion mit *Toxoplasma* ist nicht

nur ethisch bedenklich, sondern macht es auch sehr schwer, dafür genetisch modifizierte Parasiten zu benutzen, da der Aufwand zum sicheren Arbeiten mit solchermaßen infizierten Katzen deutlich erhöht und nur in wenigen Laboren weltweit möglich ist. In eigenen Arbeiten konnten erste Schritte unternommen werden, um dauerhafte (mehrere Monate lange) Darmorganoidkulturen aus Katzen zu erhalten und mit *Toxoplasma* zu infizieren. Allerdings ist es bislang nicht gelungen, damit sexuelle Stadien oder Oozysten zu erzeugen. Neueste Arbeiten lassen vermuten, dass dies prinzipiell möglich sein wird, dass aber neben dem Darmepithel noch andere, bislang unbekannte Faktoren eine Rolle spielen [13].

Tierproduktfreie Zellkulturen sind immer häufiger möglich

Denkt man das 3R-Konzept konsequent zu Ende, dann werden auch Zell- und Organoidkulturen nicht ohne den Einsatz von Tieren durchgeführt. Die meisten Zelllinien benötigen die Zugabe von fötalem Rinderserum (*fetal bovine/calf serum*, FBS/FCS) für optimales Wachstum. Wie der Begriff vermuten lässt, wird dieses Serum aus noch lebenden Föten trächtiger Rinder bei deren Schlachtung



a) Dreidimensionale Sphäroid-Kultur in der Durchlicht- (oben) bzw. Fluoreszenzmikroskopie (unten). b) Aufbau eines Darmorganoidsystems zur funktionellen Beurteilung von *In-vitro*-Bradyzoiten bezüglich ihrer Fähigkeit, im Darmepithel zu differenzieren und es erfolgreich zu durchdringen. Die Tachyzoiten in den Fibroblasten dienen dafür als Nachweis. c) Mikroskopische Aufnahme eines infizierten Zellrasens (s. b), gewonnen aus Sphäroiden. Es handelt sich dabei um eine Projektion einer dreidimensionalen Aufnahme. Die grauen bzw. schwarzen Kreise markieren zwei Bradyzoiten in den drei Ebenen. Fotos und Bild: E. Delgado Betancourt.

gewonnen, was ethische Fragen aufwirft. Auch andere Bestandteile von Kulturmedien basieren auf tierischen Produkten, wie z.B. Kollagene und Wachstumsfaktoren sowie Rinder-Serumalbumin (BSA) (Abbildung 6). Diese werden oft zum Anhaften der Zellen an die Oberflächen der Kulturgefäße benötigt. Allerdings sind sie oft Nebenprodukte, die bei der Schlachtung von Rindern oder Schweinen für die Fleischgewinnung anfallen und daher meist ohne zusätzliche Tötung von Tieren verfügbar sind.

Die Tachyzoitenkultur in humanen Fibroblasten ist für längere Zeit auch mit einem chemisch definierten Wachstumsmedium möglich, wobei FBS durch 0,5 % BSA und pflanzliche Lipide ersetzt wurde [14]. Dagegen benötigt die KD3-Kultur in der bisherigen Art 20 % FBS sowie einen weiteren Zusatz, der aus FBS gewonnen wird. Daher ist die Suche nach einem alternativen Medium ohne diese Komponenten vorrangiges Ziel, um dem 3R-Konzept noch besser entsprechen zu können.

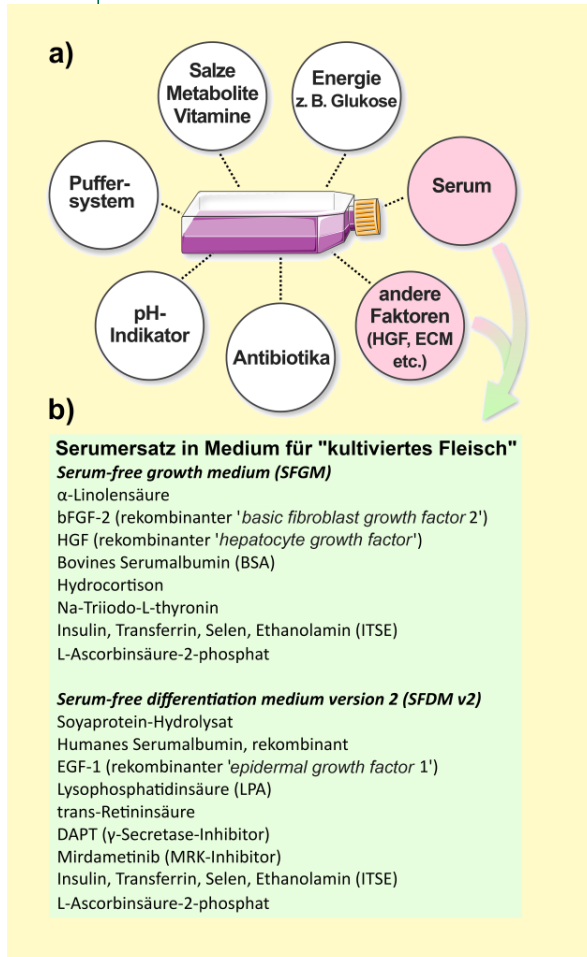
Recht problematisch ist auch die Verwendung von löslicher Basalmembranmatrix, auch extrazelluläre Matrix genannt (bekannt unter den Markennamen ▶ Matrigel® oder Cultrex®), die von Engelbreth-Holm-Swarm-(EHS)-Maus-Sarkomzellen abgegeben wird. Diese komplexe Mischung aus unterschiedlichen Zellbestandteilen ist gerade für das Wachstum in drei Dimensionen (3D-Kultur) von Organoidkulturen von entscheidender Wichtigkeit. Allerdings wächst der EHS-Tumor nur in Mäusen, was ethisch problematisch ist. Dementsprechend ist Matrigel/Cultrex nicht in beliebigen Mengen verfügbar. Auch kann die Zusammensetzung zwischen verschiedenen Präparationen und Herstellern variieren, was die Reproduzierbarkeit von

Experimenten beeinflussen kann. All dies sowie die sehr hohen Kosten sprechen für Alternativen. Gleiches gilt auch für FBS. Daher werden schon seit längerem Ersatzstoffe für diese essentiellen Zellkulturzusätze gesucht (siehe auch die *Fetal Calf Serum-free Database*; <https://fcs-free.sites.uu.nl>).

Damit sind auch Darmorganoidkulturen nach 3R-Regeln, wie viele andere Stammzell-basierte *In-vitro*-Modelle, letztlich nicht tierversuchsfrei, da sie auf Matrigel/Cultrex angewiesen sind, um das dreidimensionale extrazelluläre Matrixmilieu herzustellen, das ▶ Sphäroide zum optimalen Wachstum benötigen. Auch das Anhaften von daraus generierten Zell-Monolayern benötigt zu einem geringeren Prozentsatz dieses oder ähnliche Hydrogele. Entsprechend groß sind die Anstrengungen, EHS-basierte Hydrogele durch synthetische Stoffe zu ersetzen bzw. auf Matrices auf Kollagen- oder Gelatinebasis (als kleinerem Übel) auszuweichen. Die Fortschritte sind beachtlich, allerdings sind die Alternativen sehr teuer und auch nicht immer für jeden Ansatz geeignet. Dagegen ist das Kulturmedium für Darmorganoiden bei der Verwendung ausschließlich rekombinanter Wachstumsfaktoren FBS-frei. Viele Protokolle benutzen aber weiterhin aus Kostengründen die aus FBS-haltigen Zellkulturen stammenden Proteine.

An dieser Stelle sei bemerkt, dass das Arbeiten mit den genannten Kulturmodellen generell sehr kostenintensiv ist und entsprechenden Zugang zu den oben genannten Komponenten voraussetzt, was zurzeit wohl nur mit entsprechenden Mitteln ausgestatteten Institutionen möglich ist. Versuchsmäuse werden daher leider für Viele zunächst weiterhin die erste Option bleiben.

ABB. 6 | ZELLKULTURMEDIUMERSATZ NACH DEM 3R-PRINZIP



a) Zusammensetzung eines üblichen Wachstumsmediums für Zellen. Die Komponenten in den weißen Kreisen sind chemischer Natur, wogegen die in roten aus Tieren gewonnen werden. b) Serumerersatz für die Kulturmedien von Myoblasten (SFGM) und Myotuben (SFDM) aus dem Rind, welcher für *cultured meat* genommen wird [16]. Mit Ausnahme von BSA sind alle Bestandteile nicht-tierischen Ursprungs. ECM = extrazelluläre Matrix (engl. *extracellular matrix*).

Wo sich Forschung zu kultiviertem Muskelfleisch und *Toxoplasma* treffen

Vor einiger Zeit ist ein Biotechnologiezweig entstanden, der ein neues Produkt verkaufen möchte – „kultiviertes Fleisch“ (*cultured meat*). Darunter versteht man die Herstellung von hauptsächlich Muskelfleisch aus Vorläuferzellen von Myoblasten (Satellitenzellen) in größerem Maßstab, um damit die Aufzucht und das Töten von Tieren zur Fleischgewinnung zu vermeiden [15]. Diese Produktion sollte daher nach Möglichkeit ohne tierische Zusätze erfolgen, so dass das Produkt entsprechend vermarktet werden kann. Das gemeinsame Ziel der Bradyzoitenkultur in KD3-Muskelzellen und der *cultured meat*-Industrie ist also die Tierprodukt-freie Kultivierung von Muskelzellen,

GLOSSAR

- Tachyzoit:** schnell teilende Form von *Toxoplasma gondii* während akuter Infektion.
- Bradyzoit:** infektiöse chronische Form des Parasiten in Gewebezysten.
- Oozyste:** im Katzenkot ausgeschiedene Dauerform des Parasiten.
- Sporozoit:** infektiöse Form in Oozysten nach Reifung.
- Organoid:** Stammzell-basiertes Miniaturorgan aus Zellen mit unterschiedlichen Funktionen.
- Sphäroid:** 3D-Zellaggregat, Ausgangsstruktur für differenziertere Organoido.
- Matrigel/Cultrex:** Gelartige extrazelluläre Matrix zur Unterstützung von Organoidkulturen, kommerziell aus Maus-Tumorzellen gewonnen.
- Myotuben:** mehrkernige differenzierte Muskelzellen, die durch Fusion von Vorläuferzellen (Myoblasten) entstanden sind.
- zoonotischer Erreger:** zwischen Tier und Mensch übertragbarer Erreger einer Infektionskrankheit (Zoonose).

wenn auch aus unterschiedlichen primären Interessen. Aus wissenschaftlichen Publikationen sowie Patenten sind entsprechende Rezepturen bekannt (Abbildung 6). Sie beschreiben die Reduktion auf einige wenige Komponenten wie z. B. rekombinant hergestellte Protein-Wachstumsfaktoren aus Bakterien oder Hefe sowie ebenfalls rekombinantes Serumalbumin [16]. Zusammen sollen sie als Serumerersatz dienen. Die berichteten Erfolge sind vielversprechend, und diese und andere Ansätze werden derzeit auch in eigenen Arbeiten verfolgt. So lässt sich z. B. die Anzahl an Myotuben durch Zugabe von Inhibitoren für bestimmte Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, die in der Differenzierung der Myoblasten involviert sind, erheblich erhöhen. Damit einhergehend ist eine Einsparung an FBS zu erreichen, was dem 3R-Prinzip weiter entgegenkommt.

Zusammenfassung

In diesem Artikel werden einige der Möglichkeiten als auch der Probleme aufgezeigt, die sich ergeben, wenn man die 3R-Prinzipien in der Infektionsforschung einführen möchte. Parasiten – aufgrund ihrer komplexen Lebensweise in mehreren Wirten –, sind dabei besonders anspruchsvoll, wenn als Ziel ein Lebenszyklus vollständig in vitro abgebildet werden soll [12]. Durch die Erfolge der letzten Jahre – sowohl mit Organoid-basierten Kultursystemen als auch in permanenten Muskelzellsystemen – werden viele Tierversuche für *Toxoplasma* (wie hier dargestellt) und verwandte Parasiten in Zukunft entweder verringert oder, je nach Forschungsfrage, sogar ersetzt werden können [17].

Summary

Newer methods for reducing animal testing: The 3R concept and the parasite *Toxoplasma gondii*

This article highlights some of the opportunities as well as problems that arise when attempting to introduce the 3R

principles to infection research. Due to their complex life-style in multiple hosts, parasites are particularly challenging when the goal is to completely replicate a life cycle in vitro [12]. Thanks to successes of the past years with both organoid-based culture systems and permanent muscle cell systems, many animal experiments involving *Toxoplasma* (as described here) and related parasites will either be reduced or, depending on the research question, will even be replaced in the future [17].

Danksagung

Die hier vorgestellten Arbeiten wurden hauptsächlich im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Graduiertenkollegs (251133687/GRK 2046) sowie in enger Kooperation mit den Gruppen von Martin Blume am Robert Koch-Institut (RKI) sowie Dominique Soldati (*Université de Genève*) im Rahmen des Projekts NRP 79 (Advancing 3R; 407940_206441) durchgeführt. Weitere finanzielle Unterstützung kam vom Robert-Koch-Institut (RKI). Den Geldgebern gebührt unser Dank, ebenso Martin Blume und Toni Aebischer für Kommentare zum Manuskript. Maßgeblich für die Erfolge der Arbeiten waren Celine Christiansen, Estefania Delgado Betancourt, Deborah Maus, Joël Marchesan und David Warschkau, denen mein besonderer Dank gilt, da es ohne ihr Engagement und Tun keinen Fortschritt gegeben hätte.

Schlagworte

Toxoplasma gondii, Darmorganoide, Tiersatzmethoden *In-vitro*-Kultur, 3R-Konzept

Literatur

- [1] S. Treue et al. (2025). Kompass Tierversuche 2025. S. 25, Tierversuche Verstehen. <https://doi.org/10.17617/1.cfaw-ft12>
- [2] R. C. Hubrecht, E. Carter (2019). The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals (Basel)* 9, 754.
- [3] C. Mikalo (2023). Können Stammzellen Tierversuche ersetzen? <https://www.spektrum.de/news/kultur-statt-kaninchen-mit-stammzellen-tierversuche-ersetzen/2149965>
- [4] S. Bartfeld (2021). Realizing the potential of organoids – an interview with Hans Clevers. *J Mol Med* 99, 443–447.
- [5] U. Pleyer et al. (2019). Toxoplasmose in Deutschland. *Dtsch Arztebl Int* 116, 435–444.
- [6] D. Arranz-Solis et al. (2023). Late Embryogenesis Abundant Proteins Contribute to the Resistance of *Toxoplasma gondii* Oocysts against Environmental Stresses. *mBio* 14, e0286822.
- [7] C. Christiansen et al. (2022). In vitro maturation of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in human myotubes and their metabolomic characterization. *Nat Comm* 13, 1168.
- [8] D. Maus et al. (2024). Generation of Mature *Toxoplasma gondii* Bradyzoites in Human Immortalized Myogenic KD3 Cells. *Bio Protoc* 14, e4916.
- [9] D. Maus et al. (2024). Screening the MMV Pathogen Box reveals the mitochondrial bc1-complex as a drug target in mature *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *eLife* 13, RP102511.
- [10] E. Delgado Betancourt et al. (2019). From Entry to Early Dissemination-*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter With Its Host. *Front Cell Infect Microbiol* 9, 46.
- [11] C. J. Giuliano et al. (2024). CRISPR-based functional profiling of the *Toxoplasma gondii* genome during acute murine infection. *Nat Microbiol* 9, 2323–2343.
- [12] D. Warschkau, F. Seeber (2023). Advances towards the complete in vitro life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Fac Rev* 12, 1.
- [13] A. V. Antunes et al. (2024). In vitro production of cat-restricted *Toxoplasma* pre-sexual stages. *Nature* 625, 366–376.
- [14] C. M. Ufermann et al. (2017). *Toxoplasma gondii* plaque assays revisited: Improvements for ultrastructural and quantitative evaluation of lytic parasite growth. *Exp Parasitol* 180, 19–26.
- [15] F. Fiebelkorn et al. (2022). Fleisch(r)evolution: Produktion, Nachhaltigkeit und Akzeptanz von kultiviertem Fleisch. *BiuZ* 52, 248–261.
- [16] L. Melzener et al. (2024). Optimisation of cell fate determination for cultivated muscle differentiation. *Commun Biol* 7, 1493.
- [17] C. J. Ramirez-Flores et al. (2022). Transcending Dimensions in Apicomplexan Research: from Two-Dimensional to Three-Dimensional In Vitro Cultures. *Microbiol Mol Biol Rev* 86, e0002522.

Verfasst von:



Frank Seeber studierte Molekularbiologie und Biochemie in Heidelberg, wo er auch am Tropeninstitut promovierte. Seit seiner Postdoktorandenzeit in Stanford (1993–95) beschäftigt er sich mit *Toxoplasma gondii*. Nach einem kurzen Aufenthalt in Würzburg wechselte er an die Universität Marburg (1997 bis 2008), wo er habilitierte. Seit 2009 ist er stellvertretender Leiter der Abteilung für mykotische und parasitäre Erreger und Mykobakterien am Robert Koch-Institut (RKI) in Berlin. Neben der Entwicklung und Anwendung neuer diagnostischer Tests für große serologische Studien zur Epidemiologie der Toxoplasmose befasst sich seine Forschung mit der Biochemie von parasitenspezifischen Stoffwechselwegen sowie der Biologie des Oozystenstadiums, wozu verschiedene Organoid-Zellkulturmodelle entwickelt wurden und werden.

Korrespondenz

Prof. Dr. Frank Seeber
Robert Koch-Institut
FG16
Seestr. 10
13353 Berlin
E-Mail: seeberf@rki.de



Ihnen gefällt diese Ausgabe der *Biologie in unserer Zeit (BiuZ)*? Sie möchten die *BiuZ* regelmäßig lesen? Dann werden Sie Mitglied im VBIO, dem größten Dachverband für Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin in Deutschland. Unsere Mitglieder erhalten viermal im Jahr die *BiuZ* und darüber hinaus weitere Informationsangebote und Vergünstigungen. Werden Sie noch heute Mitglied im VBIO – wir freuen uns auf Sie!





Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

