

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Verbundprojekt:

Antibiotika-freie *Helicobacter*-Therapie basierend auf
innovativen Behandlungsstrategien und neuartigen
Arzneimittelgabe-Technologien

Akronym: HeliTec

Teilvorhaben: IME - Generierung trojanischer *Helicobacter*
zur gezielten Abgabe von Bakteriziden

Schlussbericht

Berichtszeitraum: 01.02.2021 – 30.09.2024

FKZ: 03GW0350

Autoren

Dr. Florian Schröper
Tel. 0241/6085-13012
Email: florian.schroeper@ime.fraunhofer.de

Tobias Zumbusch

I Kurzbericht

I.1 Aufgabenstellung

I.1.1 Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele des Vorhabens

Der Erreger *Helicobacter pylori* ist die Hauptursache für chronische Entzündungen der Magenschleimhaut und ein Auslöser für Magenkarzinome beim Menschen. Die große Zahl von Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums und zunehmende Resistenzen gegen Antibiotika erschweren eine wirksame Behandlung in der Magen Umgebung. Ziel von HeliTec war die Entwicklung einer neuen Antibiotika-freien Behandlungsstrategie, die das Bakterium direkt am Ort der Infektion, d.h. in der Magenschleimhaut, eliminiert. Zu diesem Zweck sollten modifizierte, nicht-pathogene *H. pylori*-Stämme erzeugt und für die orale Verabreichung formuliert werden, die als Trojanische Pferde direkt in der Magenschleimhaut ihre Wirkung entfalten. Drei Strategien (Abbildung 1) sollten untersucht werden, um den Erreger durch genetische Modifikation nicht-pathogener *H. pylori*-Stämme abzutöten: (1) Gezielte Bildung und Freisetzung von bioziden Proteinen oder Peptiden induziert durch *H. pylori*-spezifische Autoinduktoren, (2) Gezielte Abgabe von *H. pylori*-spezifischen lytischen Phagen und ein kombinatorischer Ansatz (3), bei dem lytische Phagen nur in Gegenwart von *H. pylori*-spezifischen Autoinduktoren produziert und von den Trojanischen Bakterien freigesetzt werden. Das Fraunhofer IME fokussierte sich im Verbundprojekt vor allem auf die Identifizierung funktioneller Bakterizide und spezifischer Autoinduktoren, die Herstellung induzierbarer Expressionskassetten sowie Knockout-Experimente mit komplexen molekularbiologischen Techniken. Hauptziel war die Generierung eines funktionellen Trojanischen Bakterien-Stammes zur gezielten Abgabe von entweder Bakteriziden oder lytischen Phagen.

I.1.2 Stand von Wissenschaft und Technik zu Projektbeginn

Helicobacter pylori ist das einzige bekannte Bakterium, das sich langfristig im Magen ansiedeln kann. Seine besondere Anpassungsfähigkeit beruht auf der Fähigkeit, die Magensäure zu neutralisieren und mittels spezieller Adhäsine an der Magenwand zu haften. Die Bildung von Zytotoxinen führt zu Schleimhautschädigungen und chronischen Entzündungen, die ein Risiko für Magenkarzinome darstellen. Zunehmende Antibiotikaresistenzen erschweren die Behandlung, weshalb alternative Therapieansätze erforderlich sind.

Zu den bisher erforschten Alternativen gehören probiotische Behandlungen, der Einsatz neuer Antibiotika, Impfstoffe und experimentelle Methoden wie photodynamische Inaktivierung oder pflanzliche Extrakte. Phagen-basierte Therapieansätze haben sich für verschiedene bakterielle Infektionen als vielversprechend erwiesen, jedoch gibt es derzeit keine zugelassenen Phagenprodukte zur Behandlung von *H. pylori*. Erste spezifische Phagen für *H. pylori* wurden identifiziert, jedoch fehlen bisher geeignete therapeutische Kandidaten. Das HeliTec-Projekt zielte u.a. darauf ab, spezifische Phagen zu isolieren, zu charakterisieren und für eine potenzielle Therapie weiterzuentwickeln.

Die beteiligten Partner verfügen über umfangreiche Vorerfahrungen in relevanten Bereichen. Das Universitätsklinikum Essen (UKE) besitzt langjährige Expertise in der Isolierung und Charakterisierung von *H. pylori*-Stämmen sowie in der Antibiotikasensitivitätsprüfung. Dort wurde von Frau Dr. Heintschel von Heinegg bereits vor über 25 Jahren einer der ersten *H. pylori*-Phagen beschrieben [1]. Fraunhofer IME und Quh-Lab haben in vorangegangenen Projekten autoinduzierbare Promotoren identifiziert, die als Grundlage für AI-gesteuerte Genexpressionssysteme dienen. Das Phage Technology Center (PTC) hat eine Plattformtechnologie für die Hochdurchsatz-Isolation und Charakterisierung von Phagen entwickelt, die für *H. pylori* adaptiert werden kann. Diese Expertise bildete die Basis für die Entwicklung innovativer Strategien zur gezielten Bekämpfung von *H. pylori* im Rahmen des HeliTec-Projekts.

I.2 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Projektarbeiten waren in 11 Arbeitspakete (AP) unterteilt, deren ursprünglich geplanter Inhalt nachfolgend kurz zusammengefasst wird. Fett dargestellt sind Arbeitspakete die im Rahmen dieses Teilvorhabens unter direkter Beteiligung des Fraunhofer IME bearbeitet wurden:

AP1: Identifizierung geeigneter Bakteriophagen: Aufbau einer *H. pylori*-Stammsammlung; Identifizierung temperenter Phagen innerhalb dieser Stammsammlung mittels PCR sowie Isolierung, Sequenzierung und detaillierte Charakterisierung neuer lytischer und temperenter Phagen.

AP2: Identifizierung effektiver Bakteriozide: Kultivierung von *H. pylori* unter mikroaerophilen Bedingungen; Literaturrecherche zur Identifizierung geeigneter Bakterizide; Charakterisierung der hemmenden Wirkung antimikrobieller Peptide und Proteine, einschließlich potenzieller Off-Target-Effekte.

AP3: Identifikation von *H. pylori*-spezifischen Als und induzierbaren Promotoren/Repressoren: Etablierung geeigneter analytischer Protokolle, um *H. pylori*-Kulturen mittels LC-MS zu analysieren und die Bildung spezifischer Autoinduktoren (AI) nachzuweisen; Identifikation von Promotoren und/oder Repressoren, die durch den spezifischen AI induziert werden können.

AP4: Identifizierung von *H. pylori* Als mit einem auf Bakterien basierenden AI-Sensing-Ansatz: Weiterentwicklung des Quh-Lab AI-2 Reportersystems, um zu untersuchen, ob *H. pylori* AI-2 zur Kommunikation nutzt; Identifizierung AI-induzierbarer Elemente durch Lumineszenzbasierten Assay.

AP5: Erzeugung eines nicht-pathogenen *H. pylori*-Stammes als trojanisches Pferd: Erzeugung eines trojanischen Bakterienstammes, der nicht mehr oder nur vermindert pathogen ist; Identifizierung relevanter Virulenzfaktoren und Gen-Knockout; Ausschalten der Bildung spezifischer Autoinduktoren (Als) im trojanische Bakterienstamm.

AP6: Phagen-Therapie: Produktion der zuvor identifizierten Bakteriophagen; ggf. Modifikation von temperenten Phagen, sodass sie ausschließlich lytisch aktiv sind; Entwicklung von Strategien, um die produzierten Phagen in Vesikeln zu verkapseln und sie mit dem trojanischen *H. pylori* zu konjugieren.

AP7: Herstellung und Integration von Expressionskassetten für biozide Wirkstoffe: Untersuchungen zur Expression und Sekretion bakterizider Peptide; Modifikation des trojanischen Stammes, sodass Expression unter Kontrolle eines Als induzierbaren Promotors steht. Wirksamkeitstests der Bakterizide mithilfe mikrobiologischer Wachstumshemmungstests.

AP8: Kombinatorischer Ansatz: Kombination der Strategie 1 und Strategie 2 für gemeinsamen therapeutischen Ansatz; Erzeugung eines trojanischen Stammes, der einen dormanten Prophagen trägt und in Gegenwart spezifischer Als aktiviert wird; Idealerweise Integration des Phagen-Genoms in das trojanische Genom unter der Kontrolle eines Autoinduktor-induzierbaren Promotors.

AP9: Wirksamkeitsnachweis: Untersuchungen zur erforderlichen Dosis des Trojanischen *Helicobacter*-Stammes, um Infektionsort zu erreichen; In-vitro Experimente zur Induzierbarkeit der Bakterizidsynthese in Anwesenheit von *H. pylori*; Wirksamkeitsstudie bzgl. der Phagen und/oder Bakterizide sowohl in vitro als auch in einer kleinen Tierstudie (UKE); Überprüfung des Therapieerfolgs durch PCR, histologische Untersuchungen und kulturellen Nachweis in Stuhlproben sowie zusätzliche Biopsien.

AP10: Verbreitung und behördliche Voraussetzungen für Zulassung: Betrachtung der Risiken im Hinblick auf die anschließende klinische Zulassung; Ermittlung und Beachtung von Bedingungen für eine humanmedizinische Zulassung; Betrachtung, welche klinischen Studien nach Abschluss des Projekts notwendig sind und welche Hürden dabei überwunden werden müssen.

AP11: Projektmanagement und -controlling.

I.3 Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit im Verbund

Das Verbundprojekt HeliTec wurde vom Fraunhofer IME zusammen mit den Verbundpartnern Uniklinikum Essen (UKE) als Koordinator, der Firma Quh-Lab Lebensmittelsicherheit aus Siegen und der Phage Technology Center GmbH (PTC) aus Bönen durchgeführt. Nachfolgend sind die Wesentlichen Ergebnisse des Teilvorhabens am IME, gegliedert nach Arbeitspaketen an denen das Fraunhofer IME beteiligt war, aufgeführt:

AP2: Am IME wurden 49 antimikrobielle Peptide (AMPs) mit potenzieller Wirksamkeit gegen *H. pylori* identifiziert und anhand spezifischer Kriterien auf 13 vielversprechende Kandidaten eingegrenzt, wobei insbesondere LL-37 und Nisin A durch Dosis-Wirksamkeitsstudien als besonders effektiv bestätigt wurden. Diese Peptide zeigten keine signifikante Toxizität gegenüber menschlichen Magenepithelzellen oder Erythrozyten, wurden jedoch durch Pepsin innerhalb einer Stunde abgebaut, weshalb zukünftige Arbeiten Strategien zur Stabilisierung und gezielten Freisetzung im Magen weiterentwickeln müssen.

AP3: Am IME wurde untersucht, welche bakteriellen Autoinduktoren (AIs) von *H. pylori* gebildet werden, wobei mittels LC-MS/MS ausschließlich die Produktion von AI-2 nachgewiesen werden konnte, dessen Konzentration mit steigender Zellzahl zunimmt. Da keine weiteren AIs detektiert wurden, musste für die gezielte Expression antimikrobieller Substanzen ein AI-2-induziertes Expressionssystem entwickelt und in den Trojaner integriert werden.

AP5: Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurde ein attenuierter *H. pylori*-Stamm als potenzieller therapeutischer Trojaner entwickelt, wobei verschiedene Pathogenitätsfaktoren gezielt ausgeschaltet wurden. Der resultierende Stamm HP5 weist Deletionen in mehreren relevanten Genen auf, einschließlich *luxS*, *vacA*, *iceA2* und *cagA*, um die Pathogenität zu reduzieren. Die Charakterisierung der Mutanten erfolgte durch biochemische und molekularbiologische Analysen, die eine erfolgreiche Knock-out-Generierung bestätigten, jedoch zeigten In-vitro-Versuche zur Immunantwort bisher keine signifikante Reduktion der Zytokin-Titer. Die erzielten Ergebnisse stellen den Hauptumfang des Projekts dar, erfordern jedoch weitere Untersuchungen, um die Eignung des HP5-Stamms als therapeutisches Mittel endgültig zu bewerten.

AP6: Die Arbeiten zur Etablierung einer Phagentherapie konnten im Projekt nicht durchgeführt werden, da es trotz intensiver Bemühungen nicht gelungen ist *H. pylori* spezifische Phagen zu identifizieren und zu isolieren.

AP7: Zur Umgehung der Pepsin-Hydrolyse wurden vier Expressionsstrategien für antimikrobielle Peptide (AMPs) entwickelt, darunter die Präsentation an der Zelloberfläche, die Akkumulation im Periplasma, eine Fusion mit einem Köderprotein zur verzögerten Hydrolyse sowie ein Trojaner-unabhängiger Ansatz mit Slow-Release-Materialien. Alle Konstrukte wurden kloniert, jedoch konnten aufgrund von Projektverzögerungen weder die Effektivität gegen Pepsin noch die Integration in den finalen Stamm untersucht werden. Parallel wurde ein AI-2-induzierbares Reportersystem zur späteren Substitution durch AMP-Sequenzen entwickelt, wobei verschiedene Reporter-kassetten mit *lux*- oder GFP-Genen erstellt, aber nicht erfolgreich in das Genom integriert wurden. Die Weiterentwicklung dieser Strategien und des Reportersystems wird im Rahmen zukünftige Forschung angestrebt.

AP8: Da keine *H. pylori*-spezifischen Bakteriophagen identifiziert wurden, konnte die kombinatorische Therapie nicht realisiert werden.

AP9: Aufgrund unzureichender Pathogenitätsreduktion der Trojaner-Stämme wurden weder geplante in-vivo-Studien im Mausmodell noch weiterführende in-vitro-Tests durchgeführt.

AP10: Wegen ausbleibender vielversprechender Projektergebnisse wurden behördliche Beratungen zur Zulassung nicht eingeleitet.

II Eingehende Darstellung der Projektergebnisse

II.1 Ergebnisse und Ziele

Zielsetzung und Hintergrund:

Helicobacter pylori ist die Hauptursache für chronische Magenschleimhautentzündungen und spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Magenkarzinomen. Die Vielzahl an Pathogenitätsfaktoren und die zunehmende Antibiotikaresistenz erschweren eine effektive Behandlung in der Magenschleimhaut. Das Ziel des Projekts HeliTec war die Entwicklung einer innovativen, antibiotikafreien Therapie, die *H. pylori* direkt am Infektionsort in der Magenschleimhaut bekämpft.

Strategie:

Zur Bekämpfung des Erregers sollten modifizierte, nicht-pathogene *H. pylori*-Stämme entwickelt werden, die als Trojanische Pferde fungieren und ihre therapeutische Wirkung direkt in der Magenschleimhaut entfalten. Drei strategische Ansätze (Abbildung 1) wurden untersucht:

1. Gezielte Bildung und Freisetzung von bioziden Proteinen oder Peptiden, die durch *H. pylori*-spezifische Autoinduktoren induziert werden.
2. Gezielte Abgabe von *H. pylori*-spezifischen lytischen Phagen zur Bekämpfung des Erregers.
3. Kombination beider Ansätze, bei der lytische Phagen nur in Anwesenheit von *H. pylori*-spezifischen Autoinduktoren produziert und freigesetzt werden.

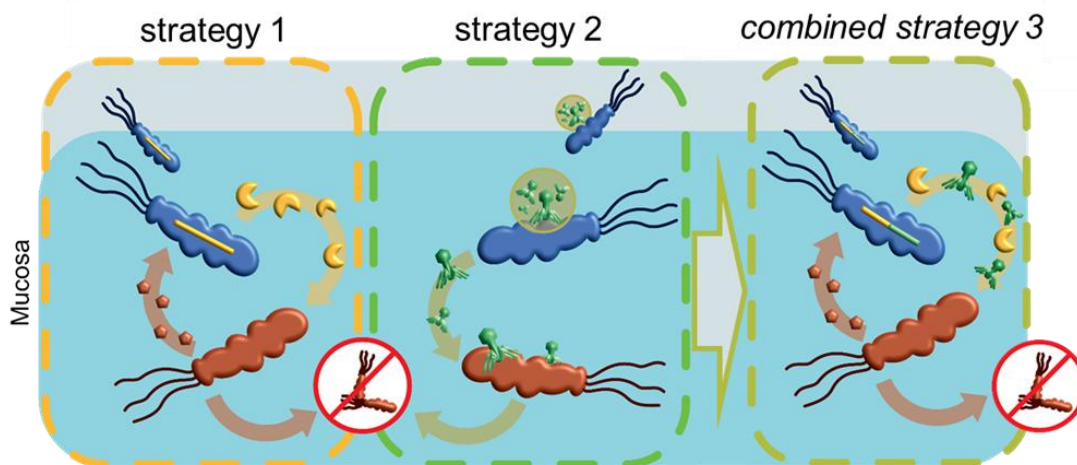


Abbildung 1: Ursprünglich geplante Behandlungsstrategien gegen *H. pylori* im HeliTec-Projekt. Bei therapeutischer Strategie 1 werden Trojanische-Pferd-Bakterien (blau) oral in den Magen eingebracht und gelangen in die Schleimhaut, wo sie in Kontakt mit den infizierten, pathogenen *H. pylori* (braun) treten. Die pathogenen *H. pylori* sezernieren Autoinduktoren (AIs) (braune Partikel), die in den Trojanischen Bakterien die Synthese und Freisetzung biozider Metaboliten (gelb) auslösen. In der ergänzenden Strategie 2 werden die Trojanischen Bakterien mit vesikulären "Rucksäcken" beladen, die spezifische Bakteriophagen gegen *H. pylori* enthalten. Diese Bakteriophagen werden in der sauren Umgebung der Magenschleimhaut freigesetzt (grüner Pfeil) und eliminieren gezielt die pathogenen Bakterien. Bei Strategie 3 wird die Replikation lytischer Bakteriophagen direkt in das Genom der Trojanischen Bakterien integriert. Dadurch können die Trojanischen Bakterien am Infektionsort selbst lytische Phagen produzieren und freisetzen, die gezielt *H. pylori* eliminieren.

Durchführung und Fokus des Fraunhofer IME:

Im Rahmen des Verbundprojekts konzentrierte sich das Fraunhofer IME auf die Identifikation funktioneller Bakterizide und spezifischer Autoinduktoren, die Entwicklung induzierbarer Expressionskassetten sowie die Durchführung von Knockout-Experimenten mit molekularbiologischen Techniken. Das Hauptziel war die Entwicklung eines funktionalen

Trojanischen Bakterienstammes, der in der Lage ist, gezielt Bakterizide oder lytische Phagen abzugeben, um *H. pylori* direkt am Infektionsort zu eliminieren.

II.1.1 Arbeitspakete

Die Projektarbeiten waren in 11 Arbeitspakete (AP) unterteilt, die eng miteinander verzahnt waren und eine enge Zusammenarbeit aller Projektpartner erforderten. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die Arbeitspakete und die Vernetzung der Arbeiten, Abbildung 3 zeigt den Arbeits- und Zeitplan unter Berücksichtigung von Verzögerungen in den Arbeitspaketen und der zuwendungsneutralen Laufzeitverlängerung.

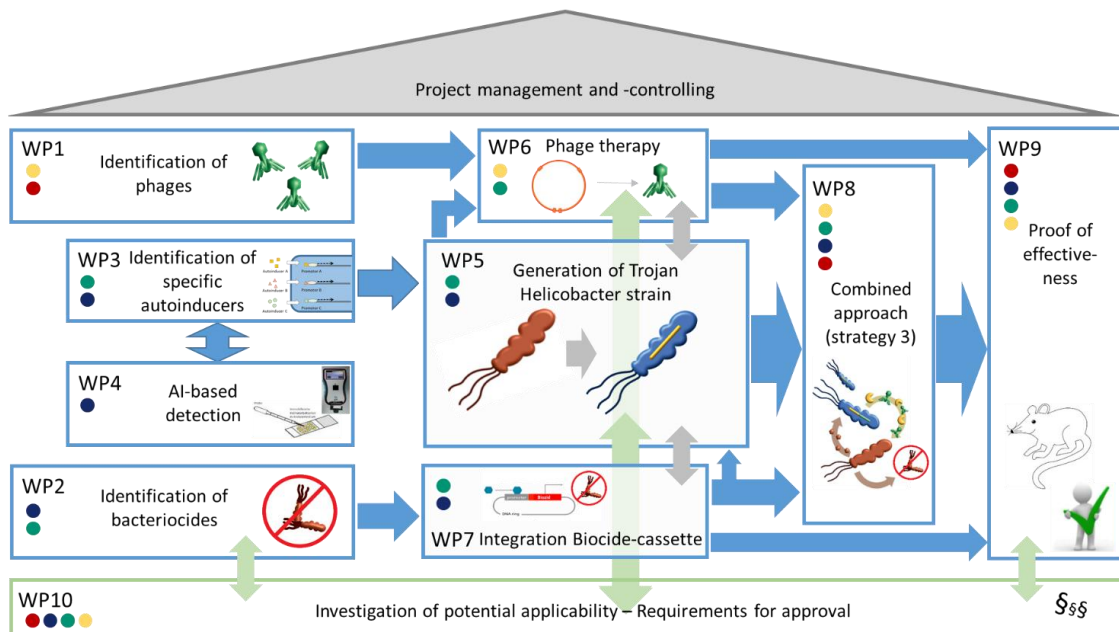


Abbildung 2: Netzdiagramm mit den Arbeitspaketen und den Verknüpfungspunkten zwischen den einzelnen Arbeitspaketen. Die Beteiligung der Verbundpartner ist farblich gekennzeichnet (● UKE, ● IME, ● Quh-Lab, ● PTC). Pfeile symbolisieren die Interaktionen zwischen den Arbeitspaketen und den Workflow innerhalb des Projektes. Grün markierte Arbeitspakete und Pfeile symbolisieren regulatorische Aspekte, die für die spätere Verwertung der Projektergebnisse relevant sind

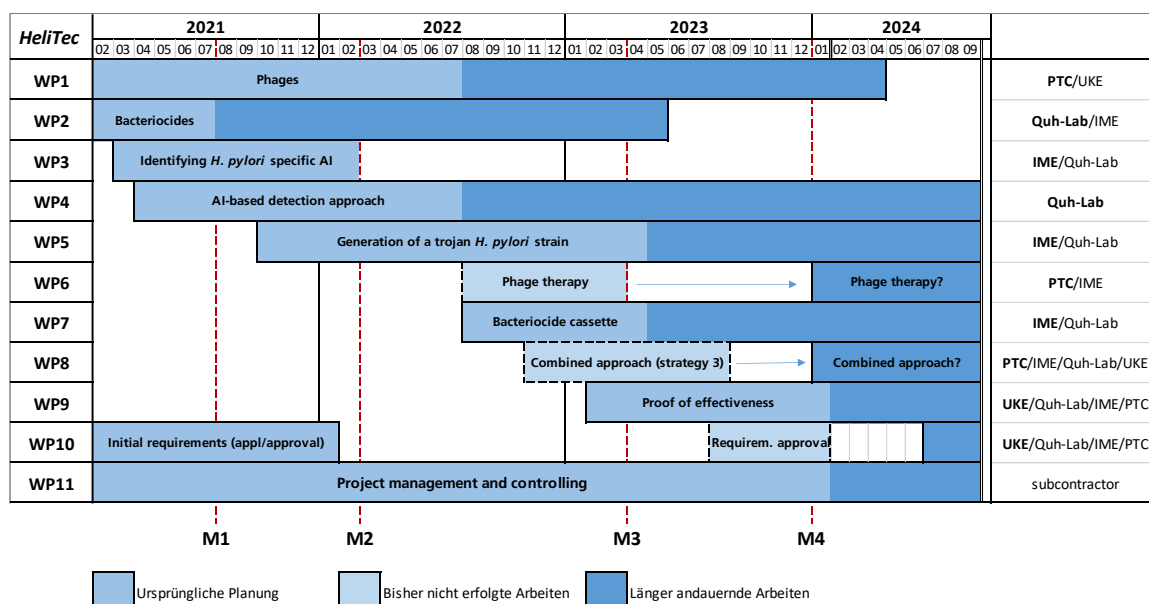


Abbildung 3: Angepasster Arbeits- und Zeitplan als Gantt-Diagramm. Das Fraunhofer IME war für AP3, AP5 und AP7 hauptverantwortlich. Die ursprünglich geplanten Laufzeiten der Arbeitspakete (hellblaue Balken) mussten im Projektverlauf mehrfach angepasst werden (dunkelblaue Balken). Aufgrund der Verzögerungen wurde im letzten Projektjahr eine zuwendungsneutrale Verlängerung des Projektes um acht Monate beantragt und bewilligt.

Die in den jeweiligen Arbeitspaketen ursprünglich geplanten Arbeiten und angestrebten Ergebnisse sind nachfolgend kurz aufgeführt, Arbeitspakete mit IME Beteiligung sind fett markiert:

AP1: Identifizierung geeigneter Bakteriophagen: Aufbau einer *H. pylori*-Stammsammlung auf Basis klinischer Proben sowie bestehender mikrobiologischer Sammlungen und relevanter klinischer Isolate durch das UKE. Es sollten temperente Phagen innerhalb dieser Stammsammlung mittels PCR identifiziert werden. PTC sollte sich auf die Isolierung, Sequenzierung und detaillierte Charakterisierung (Bioinformatik und Wirtsspektrum) neuer lytischer und temperenter Phagen gegen *H. pylori* aus Umweltproben, z. B. Abwasser, konzentrieren.

AP2: Identifizierung effektiver Bakteriozide: Die Kultivierung reiner *H. pylori*-Kulturen unter mikroaerophilen Bedingungen wurde bei allen Verbundpartnern etabliert. Anhand einer umfangreichen Literaturrecherche wurden am IME Bakterizide identifiziert, die das Wachstum von *H. pylori* hemmen können. Zur Charakterisierung der hemmenden Wirkung antimikrobieller Peptide und Proteine wurden die Wachstumsraten mittels OD-Messung im Plattenreader erfasst. Zudem wurde die Wirksamkeit der Substanzen in verschiedenen Konzentrationen durch kulturelle Hemmungsmethoden, einschließlich potenzieller Off-Target-Effekte getestet. Das IME identifizierte die Gensequenzen, die für die Expression der antibakteriellen Substanzen erforderlich sind. Darüber hinaus wurde die Toxizität im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung untersucht.

AP3: Identifikation von *H. pylori*-spezifischen Als und induzierbaren Promotoren/Repressoren: Das IME etablierte geeignete analytische Protokolle, um *H. pylori*-Kulturen mittels LC-MS zu analysieren und die Bildung spezifischer Als nachzuweisen. Aus der Literatur ist bekannt, dass *H. pylori* Al-2 bildet. Es wurde untersucht, ob zudem artspezifische Als des Typs 1 oder 3 gebildet werden. Quh-Lab befasste sich mit der Identifikation von Promotoren und/oder Repressoren, die durch den spezifischen AI induziert werden können, um so die Genexpression bakterizider Peptide oder Proteine gezielt zu steuern.

AP4: Identifizierung von *H. pylori* Als mit einem auf Bakterien basierenden AI-Sensing-Ansatz: Quh-Lab fokussierte sich hier auf die Weiterentwicklung seines AI-2 Reportersystems in *E. coli*, um zu untersuchen, ob *H. pylori* Al-2 zur Kommunikation nutzt und ob weitere bekannte Autoinduktoren wie Al-1 eine Rolle spielen. AI-induzierbare Elemente sollten dabei durch lumineszenzbasierte Assays identifiziert und bestätigt werden.

AP5: Erzeugung eines nicht-pathogenen *H. pylori*-Stammes als trojanisches Pferd: Ein trojanischer Bakterienstamm sollte erzeugt werden, der nicht mehr oder nur vermindert pathogen ist, sich jedoch im Magen in direkter Nähe zu seinen pathogenen Verwandten ansiedeln kann. Hierzu wurden verschiedene Stämme auf ihre Pathogenität getestet und am IME die Stämme mit der geringstmöglichen Pathogenität für weitere Modifikationen genutzt. Die in der Literatur beschriebenen Virulenzfaktoren sollten, falls sie in den identifizierten Stämmen noch vorhanden sind, soweit wie möglich durch Methoden wie Gen-Knockout vollständig entfernt werden. Gleichzeitig wurde die Bildung spezifischer Autoinduktoren (Als) im trojanische Bakterienstamm ausgeschaltet. Zusätzlich sollte ein weiterer, nicht-pathogener Stamm für die Produktion und Vermehrung von Bakteriophagen erzeugt werden.

AP6: Phagen-Therapie: Die in AP1 identifizierten Bakteriophagen sollten hier in ausreichender Menge produziert werden. Falls erforderlich, sollten am IME temperente Phagen genetisch modifiziert werden, sodass sie ausschließlich lytisch aktiv sind. Ziel sollte sein, dass Bakteriophagen in einem Maßstab produziert werden, der über die Laborgröße hinausgeht. Von PTC sollte eine geeignete Strategie entwickelt werden, um die produzierten Phagen in Vesikeln zu verkapseln und sie mit dem trojanischen *H. pylori* zu konjugieren. IME und PTC sollten untersuchen, wie und in welcher Menge die Phagenvesikel angewendet werden müssen, um in Kombination mit dem trojanischen *Helicobacter*-Stamm ein optimales therapeutisches Ergebnis zu erzielen.

AP7: Herstellung und Integration von Expressionskassetten für biozide Wirkstoffe: Hier sollte am IME untersucht werden, ob und wie sich die in AP2 identifizierten bakteriziden Peptide

exprimieren und ggf. sekretieren lassen. Dazu sollte der trojanische Stamm genetisch so modifiziert werden, dass die Expression dieser Bakterizide unter der Kontrolle eines durch *H. pylori*-spezifische Als induzierbaren Promotors steht. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Bakterizide nur am Infektionsort und in Anwesenheit des pathogenen *H. pylori* sowie der Als freigesetzt werden. Die Wirksamkeit der Bakterizide sollte von Quh-Lab mithilfe mikrobiologischer Wachstumshemmungstests überprüft werden. Falls ein Phage identifiziert wurde, der zuverlässig gegen *H. pylori* wirkt, sollte Quh-Lab erste Experimente durchführen, um zu testen, ob die Phagen-DNA in das Genom des trojanischen Bakteriums integriert und gezielt aktiviert werden kann.

AP8: Kombinatorischer Ansatz: Kombination der Strategie 1 und Strategie 2 für einen gemeinsamen therapeutischen Ansatz. Das Ziel sollte hier sein, einen trojanischen Stamm zu erzeugen, der einen dormanten Prophagen trägt, der in Gegenwart spezifischer Als aktiviert wird (lytischer Zyklus). Es sollte untersucht werden, wie ein dormanter Prophage (z. B. lysogene Variante) in die lytische Phase überführt werden kann, wenn bakterielle Als vorhanden sind. Idealerweise sollte das Phagen-Genom in das Trojanische Genom integriert werden und unter der Kontrolle eines Autoinduktor-induzierbaren Promotors stehen.

AP9: Wirksamkeitsnachweis: Hier sollten Untersuchungen zur erforderlichen Dosis des Trojanischen *Helicobacter*-Stamms, um den Infektionsort zu erreichen erfolgen. Die Induzierbarkeit der Bakterizidsynthese in Anwesenheit von *H. pylori* sollte zunächst durch in-vitro-Experimente belegt werden. Schließlich sollte die Wirksamkeit der Phagen und/oder Bakterizide sowohl in-vitro als auch in einer kleinen Tierstudie (UKE) nachgewiesen werden. Hierfür war am UKE die Entwicklung eines Mausmodells mit C57BL/6-Mäusen geplant. Nach oraler Gabe von *H. pylori* und entsprechender Kolonisierung mit dem Pathogen sollten die Tiere mit verschiedenen Behandlungsstrategien co-infiziert werden. Der Therapieerfolg sollte durch PCR, histologische Untersuchungen und kulturellen Nachweis in Stuhlproben sowie zusätzlichen Biopsien belegt werden.

AP10: Verbreitung und behördliche Voraussetzungen für Zulassung: Die im Projekt zu entwickelnden Behandlungsansätze bergen einige Risiken im Hinblick auf die anschließende klinische Zulassung. Neben dem Einsatz von Phagen muss auch der Einsatz genetisch modifizierter Organismen zur Therapie von *H. pylori* kritisch betrachtet werden. Es sollte hier untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen eine humanmedizinische Zulassung möglich wäre. Die identifizierten Voraussetzungen sollten in den zu bearbeitenden Arbeitspaketen berücksichtigt und adressiert werden. Es sollten auch Überlegungen dazu angestellt werden, welche klinischen Studien nach Abschluss des Projekts notwendig sind und welche Hürden dabei überwunden werden müssen.

AP11: Projektmanagement und -controlling: Das Projektmanagement erfolgte durch einen Subunternehmer, der für die Kontrolle und Überwachung des gesamten Projekts verantwortlich war.

II.1.2 Ergebnisse

Im Folgenden werden die im vom Fraunhofer IME bearbeiteten Teilvorhaben in den jeweiligen Arbeitspaketen erzielten Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Zusätzlich wird kurz auf die Ergebnisse der anderen Arbeitspakete eingegangen, auch wenn das IME hier nicht direkt beteiligt war, sich daraus aber Folgen für die Bearbeitung der eigenen, darauf aufbauenden Arbeiten ergab:

AP1: Identifizierung geeigneter Bakteriophagen: Dieses Arbeitspaket wurde von PTC und UKE bearbeitet mit dem Ziel geeignete Phagen gegen *H. pylori* zu identifizieren. Der erfolgreiche Abschluss dieses Arbeitspaketes war somit essentielle Voraussetzung für die Arbeitspakete AP6 und AP8. Trotz intensiver Bemühungen ist es innerhalb der Projektlaufzeit nicht gelungen *H. pylori* spezifische Phagen zu identifizieren und zu isolieren. Auch Literaturrecherchen zu den bisher beschriebenen Phagen gegen *H. pylori* konnten nicht dazu beitragen einen *H. pylori* spezifischen Bakteriophagen zu identifizieren. Daher musste die Phagen-basierte Strategie letztendlich

aufgegeben werden. Der Projektfokus richtete sich somit primär auf die Entwicklung eines möglichst apathogenen Trojanischen *H. pylori* Stammes, der Identifizierung wirksamer antimikrobieller Peptide und der Entwicklung eines über bakterielle Autoinducer induzierbaren Expressionssystems.

AP2: Identifizierung effektiver Bakteriozide: Am IME wurde untersucht welche AMPs eine antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori* zeigen, um diese nachfolgend für den Trojaner-basierten Therapieansatz verwenden zu können. Hierzu wurden auf Basis einer Literaturrecherche Publikationen, Patente und die Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides nach *H. pylori* wirksamen AMPs durchsucht und 49 AMPs identifiziert. Die Anzahl der in dieser Arbeit näher betrachtenden AMPs wurde durch die nachfolgenden Kriterien reduziert:

1. Die beschriebene minimale Hemmkonzentration (MHK) sollte möglichst gering sein.
2. Wenn möglich, sollten keine posttranslationalen Modifikationen für die Aktivität des Peptids notwendig sein.
3. Falls möglich, sollten die AMPs nicht sensitiv gegenüber Pepsin sein, da die enzymatische Hydrolyse der AMPs die Aktivität beeinflusst.
4. Falls unterschiedliche Derivate eines AMPs gegenüber *H. pylori* getestet wurden, wird die AMP-Sequenz ausgewählt, welche am effizientesten ist.

Letztlich ergaben sich für das Projekt 13 näher zu prüfenden AMPs deren Wirksamkeit gegen *H. pylori* anhand von Wachstumskinetiken ermittelt wurde (Abbildung 4).

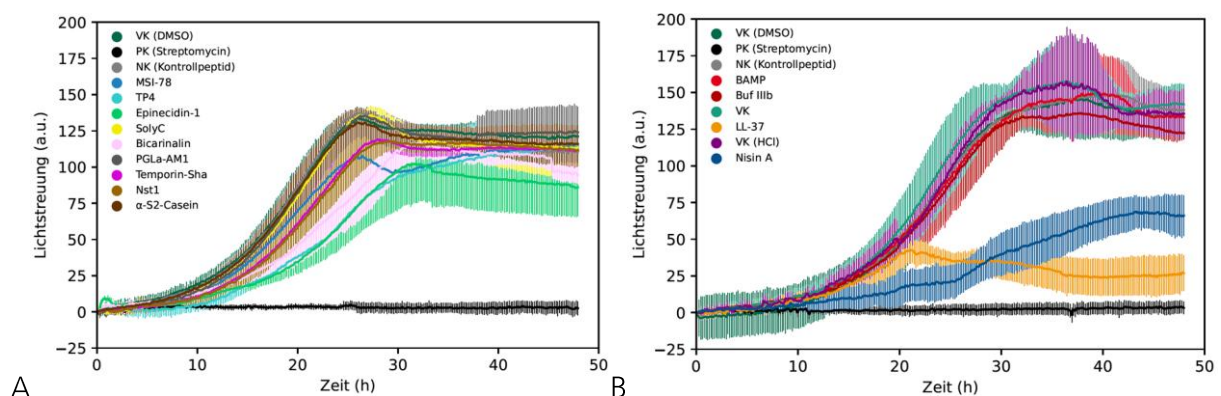


Abbildung 4: *H. pylori* Wachstumskinetiken unter Einfluss unterschiedlicher AMPs. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Kinetiken auf zwei Diagramme aufgeteilt. *H. pylori* DSM 21031 wurde für 48 h im BioLector® Pro System bei 800 rpm und 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert. Der Einfluss unterschiedlicher AMPs auf das Wachstumsverhalten wurde mittels Light Scatter aufgezeichnet. Das Antibiotikum Streptomycin wurde als Positivkontrolle (PK) und als Negativkontrolle (NK) wurde ein Kontrollpeptid mitgeführt. Für AMPs in DMSO gelöst vorlagen (A), wurde eine entsprechende Vehikelkontrolle (VK) mit DMSO mitgeführt. In Diagramm (B) wurde für Nisin A zusätzlich eine VK mit HCl mitgeführt. Da LL-37 in DPBS gelöst wurde, diente die VK bestehend aus Kulturmedium ohne Lösungsmittel als Wachstumskontrolle. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt in drei technischen Replikaten ($n = 3$). a.u. = Arbitrary Unit.

Die Untersuchungen ergaben, dass insbesondere LL-37 und Nisin A vielversprechende antimikrobielle Peptide sind. Das wurde im Rahmen von Dosis-Wirksamkeitskurven bestätigt (Abbildung 5).

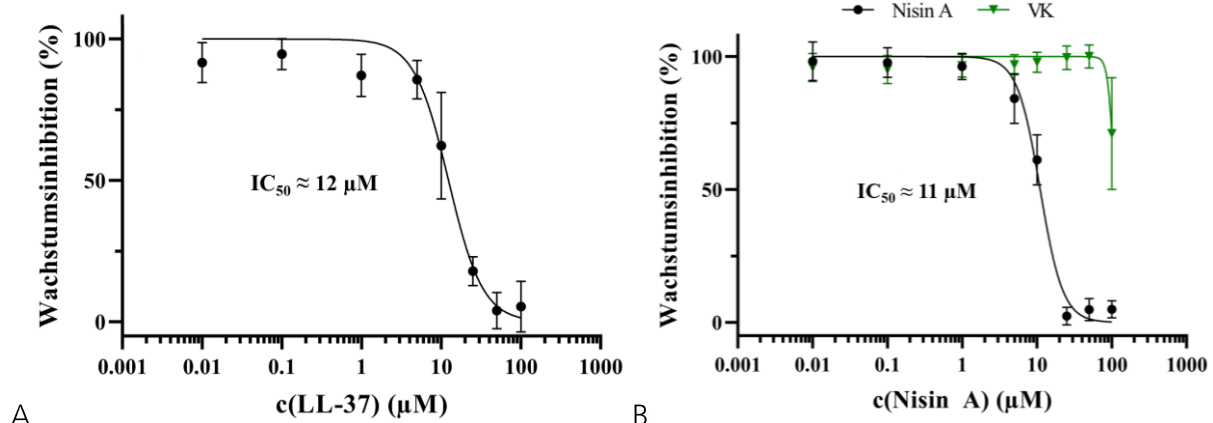


Abbildung 5: Dosis-Wirksamkeitskurven von (A) LL-37 gegenüber *H. pylori* DSM 21031 sowie (B) Nisin A gegenüber *H. pylori* DSM 21031. *H. pylori* DSM 21031 wurde unter Zugabe des jeweiligen antimikrobiellen Peptids in unterschiedlichen Konzentrationen für 40 h unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert und die OD600 wurde gemessen. Die Messwerte wurden unter Berücksichtigung der Peptidabsorption auf eine Wachstumskontrolle (100% Wachstum) und eine Sterilkontrolle (0 % Wachstum) in GraphPad Prism normalisiert. Da das Peptid Nisin A (B) in HCl gelöst vorlag, wurde eine entsprechende Vehikelkontrolle (VK) mitgeführt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt in drei technischen Replikaten ($n = 3$).

Die im Projekt näher betrachteten antimikrobiellen Peptide wurden im Hinblick auf Off-Target Effekte untersucht. Um die AMPs hinsichtlich ihrer Toxizität für humane Anwendungen zu bewerten, wurden humane Magenschleimhautepithelzellen, nachfolgend AGS-Zellen genannt, mit den jeweiligen AMPs in einer definierten Stoffmengenkonzentration äquimolar inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6A dargestellt. Aufgrund der gemessenen Standardabweichung des Fluoreszenzsignals wurde definiert, dass ein Einfluss auf die Viabilität vorliegt, wenn diese um $> 15\%$ reduziert wird. Die meisten AMPs, darunter die vielversprechenden AMPs LL-37 und Nisin A zeigten bei der getesteten Konzentration keine zytotoxische Aktivität. Darüber hinaus wurde untersucht was passiert, wenn die AMPs bei einer schweren Läsion im Magenbereich in Kontakt mit humanen Erythrozyten (hE) treten. Zu diesem Zweck wurden hE aus Vollblut aufgereinigt, äquimolar mit $10 \mu M$ des jeweiligen AMPs inkubiert und die hämolytische Aktivität experimentell bestimmt (Abbildung 6B).

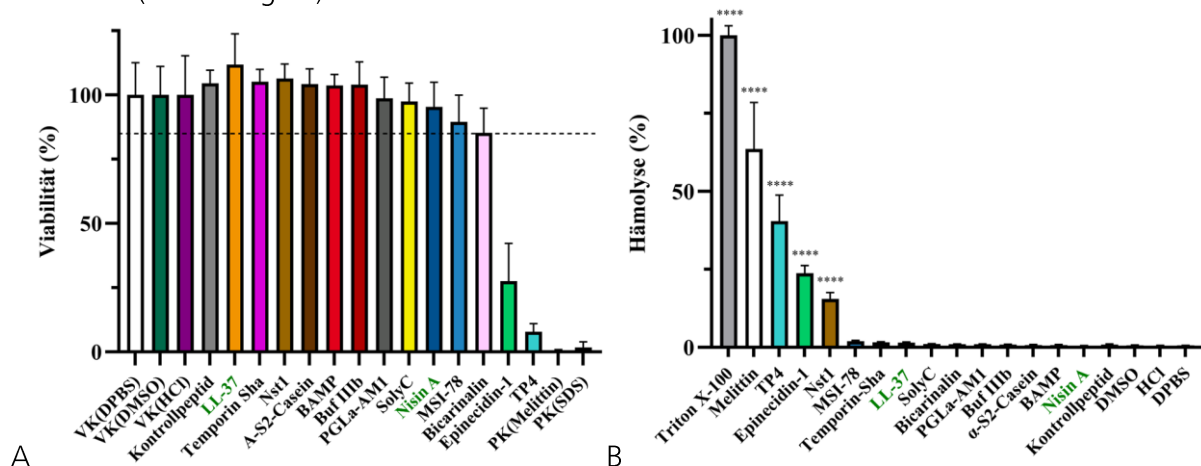


Abbildung 6: (A) Die zytotoxische Aktivität der AMPs wurde mit einer Konzentration von $10 \mu M$ anhand von AGS-Zellen getestet. Natriumdodecylsulfat (SDS) und das AMP Melittin wurden als Positivkontrolle (PK) und als Vehikelkontrolle (NK) wurden die Lösungsmittel der jeweiligen Peptide DMSO, HCl und DPBS in entsprechender Konzentration mitgeführt. Die AMPs LL-37 und Nisin A (grün) zeigten bereits eine starke antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori*. Die Daten wurden zu entsprechenden Vehikelkontrollen relativiert und repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt in acht technischen Replikaten ($n = 3$). Ein Einfluss auf die Viabilität der AGS-Zellen liegt vor, wenn diese unter den Schwellenwert (gestrichelte schwarze Linie) von 85% reduziert wird.

(B) Die hämolytische Aktivität der AMPs gegenüber humanen Erythrozyten wurde mit einer Konzentration von 10 μM getestet. Triton™ X-100 (100 %) wurde als Positivkontrolle und als Vehikelkontrolle wurden die Lösungsmittel der jeweiligen Peptide DMSO, HCl und DPBS mitgeführt. Weiterhin wurde das Peptid Melittin als eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Daten wurden zur entsprechenden Vehikelkontrolle normiert und repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt in drei technischen Replikaten ($n = 3$).

Die beiden AMPs LL-37 und Nisin A waren damit die vielversprechendsten gegen *H. pylori* wirksamen AMPs und sollten im Hinblick auf Strategie 1 verstärkt im Projektfokus bleiben. Neben der Toxizität der AMPs für humane Anwendungen wurde untersucht, ob die AMPs durch das im menschlichen Magen vorliegende Enzym Pepsin hydrolysiert werden. Eine enzymatische Hydrolyse der Peptide würde dazu führen, dass die AMPs fragmentiert werden und somit bei einer Anwendung im Magenbereich ihre antimikrobielle Wirkung nicht oder nur kurzzeitig entfalten könnten. Hierzu wurden alle Peptidsequenzen mittels ExPASy PeptideCutter in silico einer Pepsin-Hydrolyse unterzogen. Hierbei stellte sich heraus, dass alle AMPs außer das Peptid Buf IIIb mehrfach hydrolysiert werden. Es wurden Versuche unter Magen-ähnlichen Bedingungen durchgeführt, um zu prüfen, ob die AMPs nach einer Inkubationszeit von 1 h bzw. 24 h durch Pepsin in-vitro hydrolysiert werden. Die Proben wurden im Anschluss mittels LC-MS analysiert. Während Buf IIIb keine Sensitivität gegenüber Pepsin und BAMP zumindest innerhalb von 1 h keine Fragmentierung zeigte, wurde für alle übrigen Peptide, darunter auch die AMPs LL-37 und Nisin A die Hydrolyse durch Pepsin bereits innerhalb 1 h nachgewiesen.

Die Wirksamkeit von LL-37 und Nisin A muss im Hinblick auf einen späteren Einsatz und die gezielte Freisetzung durch den Trojaner dahingehend untersucht werden, wie lange eine eradizierende Wirkung unter den Bedingungen im Magen anhalten kann und wie hoch die freigesetzte Dosis sein muss, um trotz Pepsin-Hydrolyse eine ausreichend eradizierende Wirkung zu erreichen. In dem Zusammenhang muss auch geprüft werden, wie der Trojaner selber vor einer autototoxischen Wirkung geschützt werden kann. Diese Untersuchungen konnten im Rahmen dieses Projektes nicht mehr durchgeführt werden, es wurden aber einige Strategien entwickelt, mit denen zukünftig eine Pepsin-Hydrolyse verlangsamt und die Selbst-Eradizierung des Trojaners reduziert werden kann (siehe Hierzu Ergebnisse AP7).

AP3: Identifikation von *H. pylori*-spezifischen AIs und induzierbaren Promotoren/

Repressoren: Ziel des Projektes war es einen Trojanischen *H. pylori* Stamm zu entwickeln, der in Gegenwart von bakteriellen Botenstoffen, die vom pathogenen *H. pylori* gebildet werden, mit der Expression und Sezernierung antimikrobiell wirkender Substanzen (AMPs, Phagen) beginnt. Hierzu wurde am IME untersucht, welche bakteriellen Botenstoffe von *H. pylori* grundsätzlich gebildet werden. Es existieren vier verschiedene Typen an AI, welche für die Regulation verwendet werden könnten: AI-1, AI-2, AI-3 und AIPs. Letztere sollten nicht untersucht werden, da AIPs hauptsächlich durch Gram-positive Bakterien gebildet werden und es sich bei *H. pylori* um ein Gram-negatives Bakterium handelt. Nach aktuellem Stand der Literatur ist nur die Synthese von AI des Typ AI-2 durch *H. pylori* beschrieben [2]. Mittels LC-MS/MS wurden Bakterienkulturüberstände auf das Vorhandensein von AI-1, AI-2 und AI-3 untersucht. Dabei konnte nur die Bildung von AI-2 bzw. seines Gleichgewichtsproduktes 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD) eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 7). Darüber hinaus konnte durch Kultivierungsexperimente demonstriert werden, dass die AI-2 Konzentration mit steigender Zellzahl zunimmt (Abbildung 8).

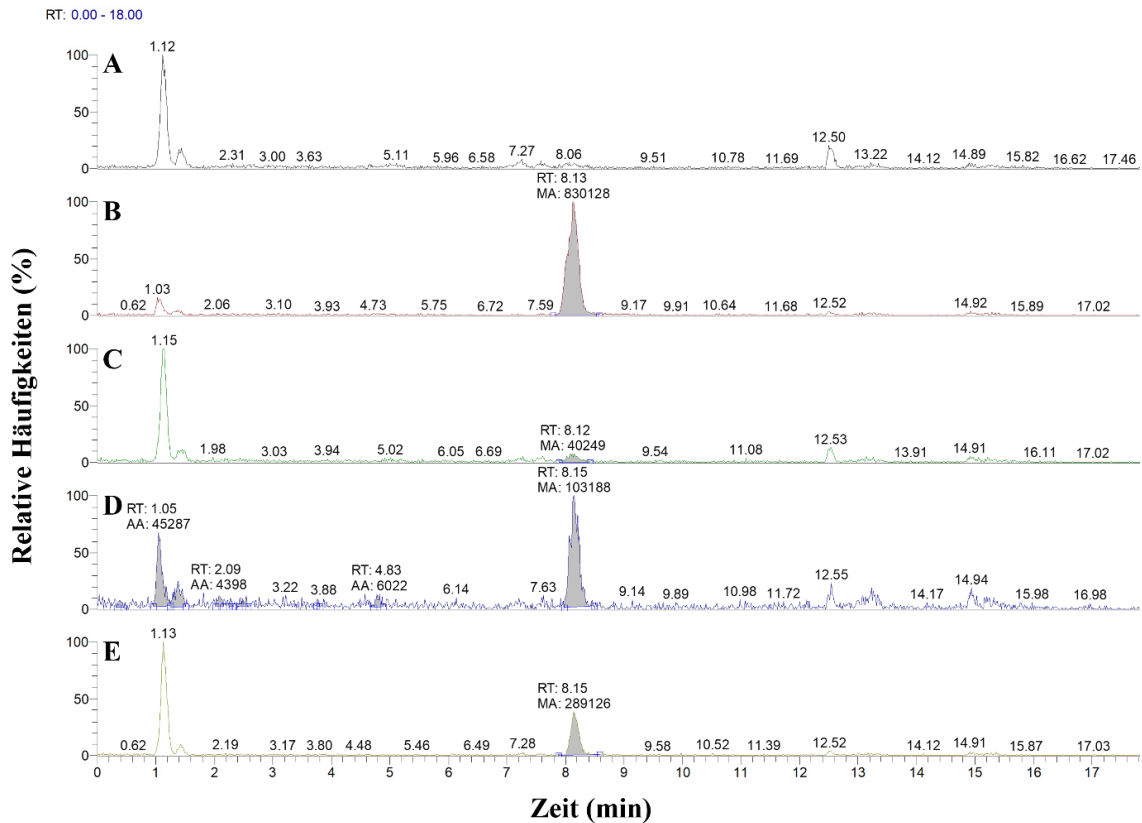


Abbildung 7: Chromatogramm für den indirekten Nachweis von AI-2 in *H. pylori*-Kulturüberständen. *H. pylori* DSM 21031 und *H. pylori* HP2 ($\Delta luxS$) wurden in Flüssigkultur angezogen und die im Überstand enthaltene AI-2 Vorläufermoleküle wurden extrahiert, derivatisiert und mittels LC-MS/MS analysiert. Als Negativkontrolle wurde reines *H. pylori*-Kulturmedium verwendet (A) und als Positivkontrolle der Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 (B). Als Negativkontrolle wurde Kulturüberstand des der im Projekt generierten *luxS*-Deletionsstamms *H. pylori* HP2 eingesetzt (C). 10 μ M 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD) wurde in den Kulturüberstand von *H. pylori* HP2 ($\Delta luxS$) (D) und in PBS (E) formuliert, um als Spikekontrolle zu dienen. Das Derivat mit einem m/z 205,1 eluierte bei einer Retentionszeit (RT) zwischen 8,12 und 8,15 min. m/z = Masse zu Ladungsverhältnis; AA = Automatic Integration; MA = Manual Integration.

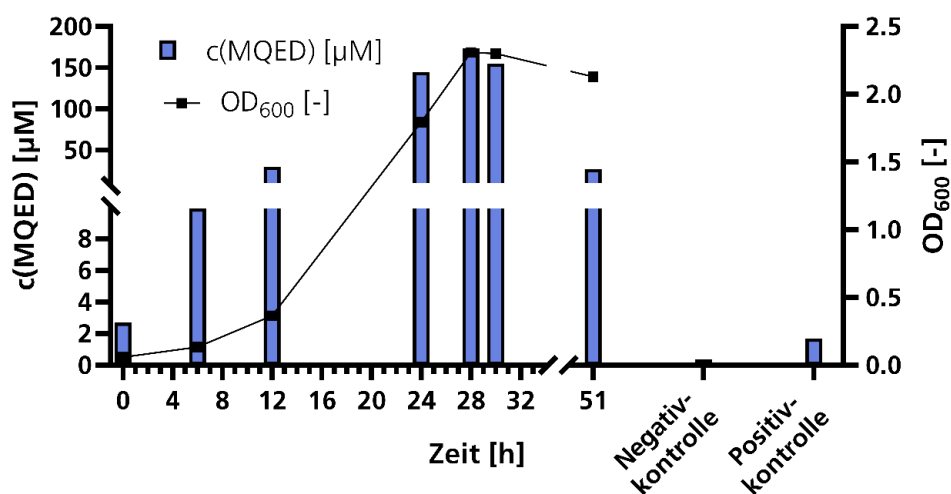


Abbildung 8: Nachweis der Bildung von AI-2 durch *H. pylori* DSM 21031. Die OD₆₀₀ einer Flüssigkultur von *H. pylori* DSMv 21031 wurde über einen Zeitraum von 51 h gemessen. Der Kulturüberstand wurde für den indirekten Nachweis von AI-2 über das Molekül MQED in einer LC-MS/MS-Messung verwendet. Als Negativkontrolle wurde das Kulturmedium verwendet und als Positivkontrolle wurde die AI-2 Vorstufe DPD in Kulturmedium formuliert.

Die Ergebnisse belegten, dass *H. pylori* AI-2 zur Zellkommunikation bildet. Es konnten darüber hinaus keine anderen Autoinducer nachgewiesen werden. Für die zielgerichtete Expression und Sezernierung antimikrobiell wirkender Substanzen musste somit ein AI-2 induzierbares Expressionssystem identifiziert und in den Trojaner integriert werden (siehe AP7).

AP4: Identifizierung von *H. pylori* Als mit einem auf Bakterien basierenden AI-Sensing-Ansatz:
Dieses Arbeitspaket wurde schwerpunktmäßig vom Verbundpartner Quh-Lab bearbeitet. Dort wurde ein Sensorsystem entwickelt, mit dem sich der Botenstoff AI-2 anhand eines Lumineszenzsignals nachweisen lässt. Hintergrund ist ein spezielles *E. coli* basiertes Sensorbakterium, welches eine AI-2-regulierbare Reporter-kassette trägt. Diese besteht aus einem LsrR-regulierbaren Promotor P_{Lsr} und einer nachgeschalteten Reporter-kassette. In Gegenwart von AI-2 bindet dieses an den Repressor LsrR, wodurch dieser inaktiviert wird [3] und die Expression der Reporter-kassette ermöglicht wird. Dabei entsteht ein Lumineszenzsignal, die Sensorbakterien beginnen zu leuchten. Anhand von Experimenten konnte vom Verbundpartner Quh-Lab grundsätzlich auch auf diese Weise die Bildung von AI-2 durch *H. pylori* nachgewiesen werden, wobei sich zeigte, dass die Regulation recht komplex und durch eine relativ hohe Basalexpression die Versuchsergebnisse nicht einfach interpretierbar waren.

AP5: Erzeugung eines nicht-pathogenen *H. pylori*-Stammes als trojanisches Pferd:
Inspiriert von der Geschichte des Trojanischen Pferdes, mit dessen Hilfe den Griechen unbemerkt der Transport von Soldaten in die Stadt Troja gelang und diese so den Sieg erlangten, war ein elementares Ziel dieses Projektes einen scheinbar harmlosen attenuierten Trojanischen *H. pylori* zur Bekämpfung einer *H. pylori*-Infektion zu entwickeln. Dieser bakterielle Trojaner sollte sich unbemerkt neben den Pathogenen Bakterien im Magen ansiedeln und in unmittelbarer Nähe eine eradizierende Substanz freisetzen. Entscheidend hierbei ist, dass der Trojaner bei Anwendung im menschlichen Magen eine reduzierte Immunantwort auslöst, jedoch weiterhin in der Lage ist, den menschlichen Magen zu kolonisieren. Hierfür war es erforderlich verschiedene Pathogenitätsfaktoren zu entfernen. Hierzu wurden bekannte Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* mittels Literaturrecherche identifiziert (Tabelle 1) und eine Strategie zum gezielten Gen-Knock-out entwickelt.

Tabelle 1: Verschiedene Loci von *H. pylori* für Knockouts und ihre Funktion

Lokus	Beschreibung
<i>cagA</i>	• Codiert für das Protein Cytotoxin-assoziierte Gen A (CagA) • CagA verursacht morphologische Veränderungen der Wirtszelle sowie Entzündungsreaktionen • Hauptpathogenitätsfaktor
<i>vacA</i>	• Codiert für das Protein vakuolisierendes Cytotoxin A (VacA) • Endotoxin, welches Vakuolen in eukaryotischen Zellen erzeugt • Hauptpathogenitätsfaktor
<i>iceA2</i>	• Codiert für das Magenepithelzellen kontaktinduzierte Protein (IceA2) • Funktion unbekannt, aber assoziiert mit Magengeschwüren
<i>luxS</i>	• Codiert für ein Enzym, welches die Synthese einer Vorstufe von AI-2 katalysiert
<i>rpsL</i>	• Codiert für das Protein S12, welches Teil der 30S ribosomalen Untereinheit ist • Mutationen im <i>rpsL</i>-Allel führen zur Resistenz gegenüber Streptomycin (notwendiger Selektionsmarker für gentechnische Arbeiten)

Aufgrund der Strategie die Freisetzung der eradizierenden Substanz durch AI-2 Induktion zu ermöglichen, musste sichergestellt werden, dass der Trojaner selber nicht mehr in der Lage ist AI-2 zu bilden, da diese ansonsten zur Selbstinduktion führen würden. Durch die Deletion des *luxS*-Lokus, sollte der zunächst am IME genierte Stamm *H. pylori* HP2 nicht mehr in der Lage sein AI-2 zu bilden. Dieser Stamm sollte dann für die Generierung weiterer Knock-out Mutanten dienen. Für die Charakterisierung des Knock-outs bei HP2 wurde analog zur Methode in AP3 ein LC-

MS/MS basierter quantitativer Nachweis zur Bestimmung der im Kulturüberstand enthaltenen AI-2 durchgeführt (Abbildung 9). Hierfür wurde der Wildtyp-Stamm mit dem Knock-Out Stamm HP2 verglichen. Als Kontrolle wurde ein AI-2 Standard in den Überstand von HP2 formuliert. Hierbei stellte sich heraus, dass durch die Deletion des *luxS*-Lokus eine signifikante Reduktion der AI-2 Konzentration im Überstand von *H. pylori* HP2 relativ zum Wildtyp erzielt wurde. Der Knock-out der AI-2 Synthase war somit erfolgreich.

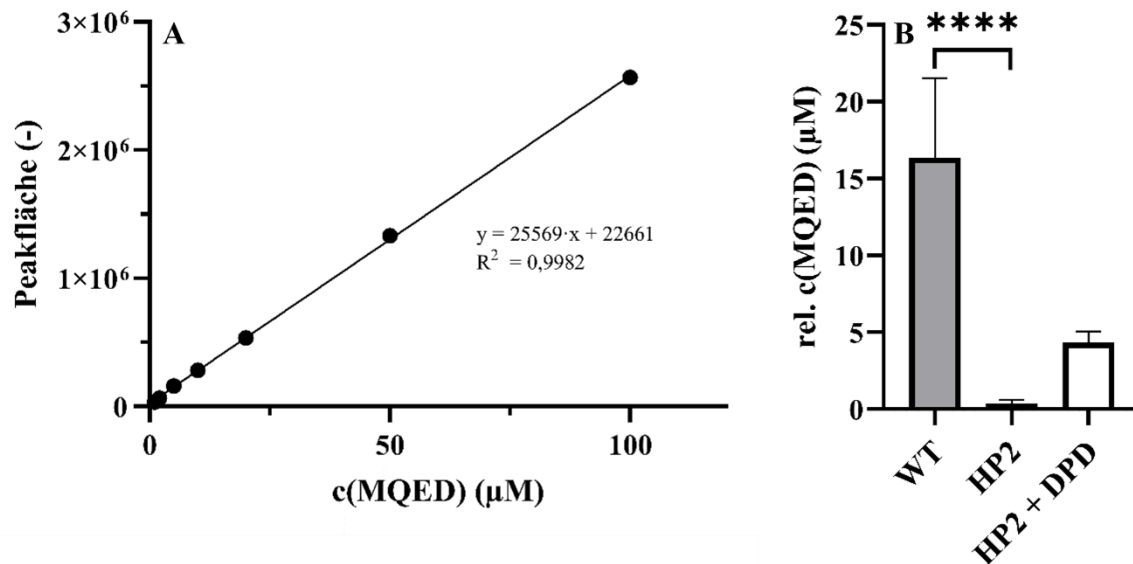


Abbildung 9: Indirekte Quantifizierung der AI-2-Konzentration mittels LC-MS/MS. Für die indirekte Quantifizierung von AI-2 wurde eine Kalibriergerade erstellt (A). Hierfür wurde die Vorstufe 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD) zu dem stabilen Molekül 1-(3-Methyl-2-chinoxalanyl)-1,2-ethandiol (MQED) derivatisiert, anschließend extrahiert und die gelösten Extrakte mittels LC-MS/MS gemessen. Für den Nachweis der AI-2 Defizienz des *luxS* Knockout-Stamms wurde der Kulturüberstand von *H. pylori* HP2 verwendet. Als Positivkontrolle wurde der Überstand des Wildtyps *H. pylori* DSM 21031 verwendet und für eine Spikekontrolle wurden 10 µM DPD in den Überstand des Knockout-Stamms formuliert. Die in den Überständen enthaltene DPD-Moleküle wurden zu MQED derivatisiert, extrahiert und anschließend mittels LC-MS/MS gemessen (B). Die MQED-Konzentration wurde auf die OD600 der jeweiligen Kultur normalisiert und ist als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Kultivierung der Stämme *H. pylori* DSM 21031 und HP2 erfolgte in drei technischen Replikaten in Form von drei biologischen Replikaten ($n = 3$). Jedes Extrakt eines Kulturüberstandes wurde nachfolgend einfach mittels LC-MS/MS gemessen. Die Formulierung von DPD in den Kulturüberstand des Knockout-Stamm HP2 erfolgte anhand eines biologischen Replikats in Form von drei technischen Replikaten.

Zur schrittweisen Reduzierung der Pathogenität des Trojaners wurden weitere Knock-out Mutanten generiert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Stammsammlung der gentechnisch veränderten *H. pylori*-Stämme

<i>H. pylori</i> -Stamm	Genotyp
HP1	<i>rpsL</i> (Str ^R)
HP2	<i>rpsL</i> (Str ^R), $\Delta luxS$
HP3	<i>rpsL</i> (Str ^R), $\Delta luxS$, $\Delta vacA$
HP4	<i>rpsL</i> (Str ^R), $\Delta luxS$, $\Delta vacA$, $\Delta iceA2$
$\Delta luxS$	<i>rpsL</i> (Str ^R), $\Delta luxS$

Die erzeugten Mutanten wurden im Hinblick auf den Erfolg des Knock-outs charakterisiert. Hierzu wurde für jede Knock-out Mutante ein entsprechender Nachweis etabliert:

VacA ist einer der Hauptpathogenitätsfaktoren von *H. pylori*. Das VacA-Protein kann Lipid-Doppelschichten perforieren [4], kann zelluläre Veränderungen wie die Inaktivierung des Energiemetabolismus der Mitochondrien auslösen [5] und hat eine immunomodulatorische Funktion [6]. Zur Charakterisierung der Auswirkung der Deletion des *vacA*-Lokus wurde Kulturüberstand des Wildtyps und des Stamms HP3 ($\Delta vacA$) verwendet, da VacA in das Medium sekretiert wird. Der Nachweis der Präsenz des Proteins VacA wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) und einem VacA-spezifischen Antikörper durchgeführt. Durch die Deletion des $\Delta vacA$ -Lokus konnten im Stamm HP3 keine VacA Proteine im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abbildung 10). Der Knock-out von VacA im Stamm HP3 war somit erfolgreich.

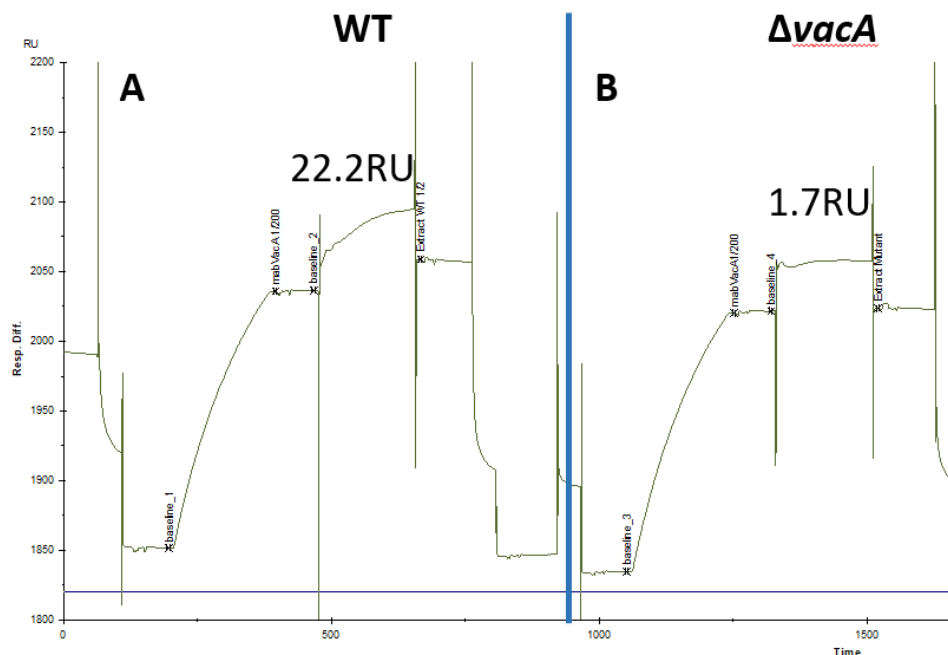


Abbildung 10: SPR-basierte Charakterisierung der Bildung von VacA durch *H. pylori*. (A) Bindung eines VacA-spezifischen Antikörpers auf einem RAM-FC SPR-Chip gefolgt von Zugabe und Bindung des im Kulturüberstand des *H. pylori* Wildtypstamms (WT) enthaltenen VacA. (B) Analoger Versuchsablauf, wobei hier Kulturüberstand des Stamms *H. pylori* HP3 ($\Delta vacA$) zugegeben wurde. Es lässt sich mittels SPR keine spezifische Bindung von VacA nachweisen. Die Bindung von VacA an den spezifischen Antikörper wird in Response Units (RU) ausgedrückt.

Bei dem Ausgangsstamm DSM 21031 handelt es sich bereits um einen Stamm mit reduzierter Pathogenität. Ihm fehlt das *iceA1* Allel, über das bekannt ist, dass es in Assoziation mit der Ausbildung von Magengeschwüren steht [7]. Dafür enthält der Stamm aber das Allel *iceA2*. Obwohl die Funktion des IceA2-Proteins bisher noch nicht bekannt ist [8], wird angenommen, dass IceA2 ebenfalls eine ähnliche Rolle in der Pathogenese spielen könnte wie IceA1. Daher sollte der *iceA2*-Locus im Rahmen des Projektes ebenfalls deletiert werden. Ein quantitativer Nachweis des IceA2-Proteins war nicht möglich, da keine entsprechenden Antikörper für die Detektion zum Beispiel mittels SPR oder Western-Blot zur Verfügung standen. Ein direkter Nachweis des Proteins und Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm konnte daher nicht durchgeführt werden. Daher erfolgte die Überprüfung des *iceA2*-Knockouts nur im Rahmen einer Sequenzierung, welche bestätigte, dass die codierende Sequenz im Stamm HP4 deletiert wurde.

Der attenuierte Stamm HP4 wurde im weiteren Projektverlauf hinsichtlich seiner grundsätzlichen Eignung als Trojaner untersucht. Hierzu wurde im Rahmen von in-vitro Versuchen die

Kolonisierungseffizienz untersucht. Hier ergab sich durch Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Silja Wessler an der Paris-Lodron University Salzburg die Gelegenheit im Rahmen dort durchgeführter Experimente die Kolonisierungseffizienz in einem in-vitro Magenschleimhautmodell zu untersuchen (Abbildung 11A). Hierzu wurden von zwei unterschiedlichen Spendern humane Magenschleimhautzellen passagiert und anschließend jeweils mit dem Stamm *H. pylori* HP4 und *H. pylori* DSM 21031 als Wildtypkontrolle infiziert. DPBS wurde als Vehikelkontrolle eingesetzt. Nach 24 h bzw. 72 h wurde das Kulturmedium der Ansätze gesammelt, die RNA isoliert und in einem Kit-basierten RT-PCR-Ansatz eingesetzt und amplifiziert, bei dem die RNA direkt in die entsprechenden DNA-Amplifikate umgeschrieben und nachfolgend detektiert wird. Um die Kolonisierungseffizienz von *H. pylori* anhand der Zellkultur zu bestimmen, wurden spezifische Primer für die 16S rRNA von *H. pylori* und die RNA von RPLP0 der humanen mukogenen Magenschleimhautepithelzellen verwendet. Nach 24 h bzw. 72 h zeigte sich kein sichtbarer Unterschied hinsichtlich der Kolonisierungseffizienz des Trojaners *H. pylori* HP4 gegenüber der des Wildtyp-Stamms (Abbildung 11B). Der generierte Trojaner sollte somit in der Lage sein sich in der Magenschleimhaut anzusiedeln.

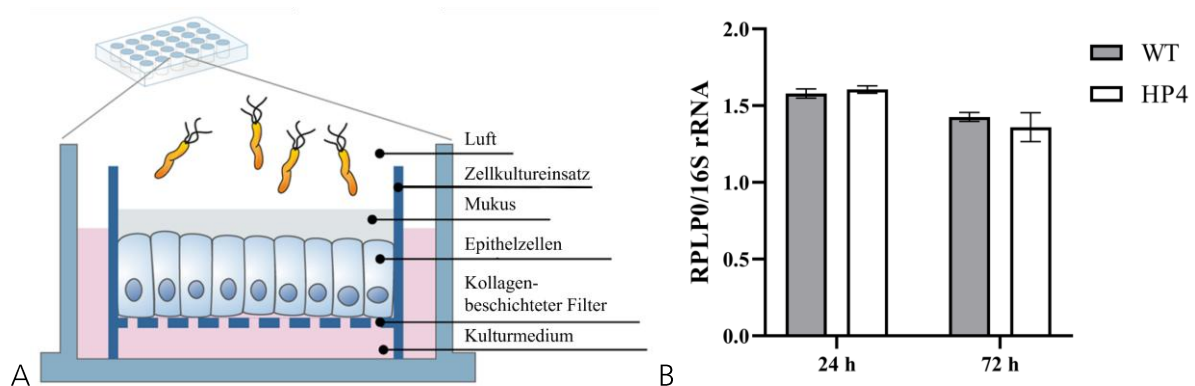


Abbildung 11: (A) Infektion von humanen mukogenen Magenschleimhautzellen mit *H. pylori*. Humane mukogene Magenschleimhautzellen werden bis zur Konfluenz auf einem Kollagen-beschichteten Polykarbonat-Filter in einem Zellkultureinsatz in einer 24-Well-MTP kultiviert. Nachfolgend können die Zellen mit einer definierten Multiplicity of Infection von Bakterien-Zellen apikal infiziert werden. (B) Vergleich der Kolonisierungseffizienz der *H. pylori*-Stämme DSM 21031 und HP4. Humane mukogene Magenschleimhautzellen wurden mit den Stämmen *H. pylori* DSM 21031 (WT) bzw. *H. pylori* HP4 jeweils mit einer MOI = 100 infiziert, in dem eine bakterielle Suspension in DPBS auf die Zellkultur-Ansätze pipettiert wurde. Die RNA wurde nach 24 h bzw. 72 h isoliert und nachfolgend wurde mittels qPCR der Ct-Wert des sauren ribosomalen 60S-Proteins P0 (RPLP0) der humanen Zelllinie sowie die 16S rRNA für *H. pylori* detektiert. Die Kolonisierungseffizienz des jeweiligen *H. pylori*-Stamms wurde anhand der Zellkultur aus dem Verhältnis der gemittelten Ct-Werte von RPLP0 zu 16S rRNA gebildet. Für den Infektionsversuch wurden je Infektionsansatz jeweils zwei unterschiedliche humane Spender verwendet. Die qPCR-Messung erfolgte in jeweils drei technischen Replikaten in Form von einem biologischen Replikat ($n = 1$). MOI = Multiplicity Of Infection; WT = Wildtyp.

Neben der Bestimmung der Kolonisierungseffizienz wurde bewertet, ob die Deletion entsprechender Pathogenitätsfaktoren zu einer Reduktion der durch den Trojaner ausgelösten Immunantwort führt. *H. pylori* induziert bei Infektionen die Sekretion einer großen Bandbreite an Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ und TNF- α . IL-6 und TNF- α gelten als wichtige Marker einer Infektion. Daher wurde der Zytokin-Titer aus den *in vitro* Infektionsversuchen ermittelt. Die Quantifizierung des Zytokin-Titers infizierter und nicht-infizierter humaner mukogener Magenschleimhautepithelzellen von zwei unterschiedlichen Spendern erfolgte direkt aus dem gesammelten Zellkulturmedium mittels Human Luminex® Discovery Assay (Abbildung 12)

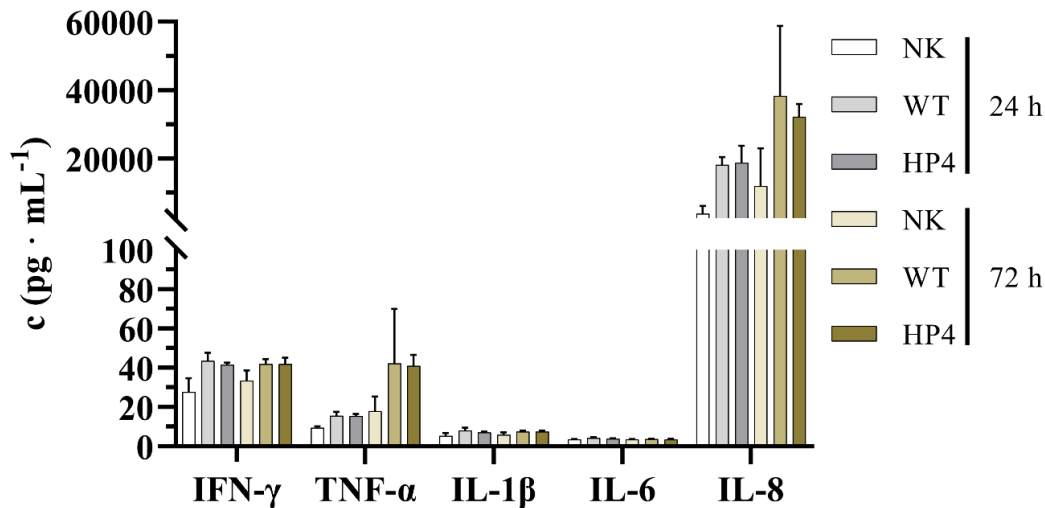


Abbildung 12: Zytokin-Titer nach der Infektion einer Magenschleimhautzelllinie mit *H. pylori*-Stämmen. Humane mukogene Magenschleimhautepithelzellen wurden für 24 h bzw. 72 h mit den *H. pylori*-Stämmen DSM 21031 (WT) und dem Trojaner *H. pylori* HP4 mit einer MOI = 100 infiziert. Für eine Negativkontrolle (NK) wurden DPBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zytokin-Titer von IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 mittels Human Luminex® Discovery Assay durch Christian Fehring (Universitätsklinikum Essen, Essen, DE) quantifiziert. Pro Infektionsversuch wurden zwei unterschiedliche Spender infiziert, wobei jede Probe in zwei technischen Replikaten gemessen wurde. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD eines biologischen Replikats ($n = 1$). WT = Wildtyp; MOI = Multiplicity Of Infection.

Die Versuche zeigten, dass durch die erfolgten Deletionen von Pathogenitätsfaktoren keine signifikante Veränderung der Zytokin-Titer erkennbar ist. Im weiteren Projektverlauf sollten daher weitere Pathogenitätsfaktoren ausgeschaltet und der Einfluss auf die Immunantwort untersucht werden. Neben VacA stellt CagA einen weiteren Hauptpathogenitätsfaktor von *H. pylori* dar, welcher indirekt an der Freisetzung bestimmter proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist [9] und im Zusammenhang mit einem erhöhten Magenkrebsrisiko steht [10]. Da die Pathogenität des Trojaners bisher nicht ausreichend reduziert werden konnte, wurde entschieden zusätzlich auch den *cagA*-Locus zu deletieren. Ausgehend von einem Zellextrakt des Trojaners *H. pylori* HP5 wurde anschließend mittels Western-Blot bestätigt, dass der Knockout des Locus die Expression von CagA verhindert (Abbildung 13). Neben dem CagA-Protein wurde als Kontrollprotein die essenzielle Serinprotease HtrA detektiert, welche unabhängig von dem Deletionsansatz durch den Wildtyp- und den Knockout-Stamm gebildet wird und im Western-Blot als Beladungskontrolle diente.

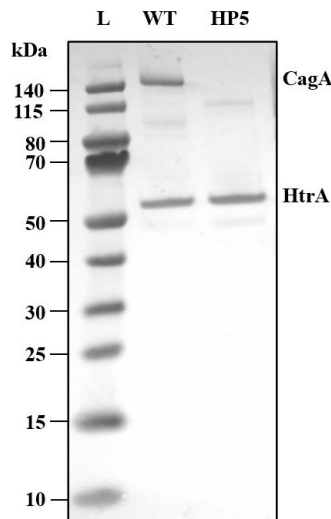


Abbildung 13: Detektion des CagA-Proteins mittels Western-Blot. 15 µg Zellextrakt von *H. pylori* DSM 21031 (WT) und *H. pylori* HP5 ($\Delta cagA$) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot hinsichtlich der Bildung des CagA-Proteins (~ 140 kDa) analysiert. Die Protease HtrA (~ 55 kDa) von *H. pylori* wurde als Beladungskontrolle detektiert. L = Protein-Größenmarker; kDa = Kilodalton

Die erfolgreich generierte Mutante HP5 konnte aus Zeitgründen im Projekt nicht mehr im Hinblick auf Kolonisierungseffizienz und Immunantwort untersucht werden. HP5 stellt daher zum aktuellen Zeitpunkt den am stärksten attenuierten *H. pylori* Stamm von allen im Projekt generierten Knock-out Mutanten (Tabelle 3) dar, der zugleich als Trojaner für den späteren Einsatz in Betracht kommt. Es müssen aber weitere Charakterisierungsarbeiten erfolgen, um entscheiden zu können, ob die Pathogenität stark genug reduziert wurde, um ihn für einen Therapieansatz als Trojaner einsetzen zu können.

Tabelle 3: Stammsammlung der gentechnisch veränderten *H. pylori*-Stämme

<i>H. pylori</i> -Stamm	Genotyp
HP1	<i>rpsL</i> (Str ^R)
HP2	<i>rpsL</i> (Str ^R), $\Delta luxS$
HP3	<i>rpsL</i> (Str ^R), $\Delta luxS$, $\Delta vacA$
HP4	<i>rpsL</i> (Str ^R), $\Delta luxS$, $\Delta vacA$, $\Delta iceA2$
HP5	<i>rpsL</i> (Str ^R), $\Delta luxS$, $\Delta vacA$, $\Delta iceA2$, $\Delta cagA$

AP6: Phagen-Therapie: Da in AP1 keine geeigneten Phagen gegen *H. pylori* identifiziert und isoliert werden konnten, war es nicht möglich im Rahmen des Projektes einen Phagen-Therapie-Ansatz zu entwickeln. Diese Strategie wurde mit Beginn der kostenneutralen Verlängerungsphase endgültig verworfen und stattdessen der Fokus auf die Therapie durch AMPs gelegt.

AP7: Herstellung und Integration von Expressionskassetten für biozide Wirkstoffe: Da die mögliche Problematik der Pepsin Hydrolyse bereits relativ früh als Off-Target erkannt wurde, wurden für den späteren Einsatz unterschiedliche Expressionsstrategien und Ansätze zur Wirkstofffreisetzung am Infektionsort entwickelt.

Die erste Expressionsstrategie beruht auf der Präsentation eines antimikrobiellen Peptids (AMP) an der Zelloberfläche des Trojanischen Bakteriums. Hierzu wird ein Tandem-Konstrukt aus einer AMP-Sequenz mit einem N-terminalen Leucin-Rest erstellt und an das chimäre Zellankerprotein LppOmpA fusioniert. Wird durch Autoinducer die Expression induziert, so wird das Tandem-Konstrukt an der Oberfläche des Trojaners präsentiert. Das im Magen vorliegende Enzym Pepsin ermöglicht die Freisetzung des AMPs indem dieses die Peptid-Sequenz zwischen dem Leucin-Rest

und der AMP-Sequenz hydrolysiert (Abbildung 14 Strategie 1). Für eine alternative zweite Strategie wurde eine Expressionskassette entwickelt, welche die Akkumulation des AMP im Periplasma durch eine vorangestellte pelB-Leadersequenz ermöglicht (Abbildung 14 Strategie 2). Eine dritte Expressionsstrategie beruht auf der vorherigen Strategie mit der Ausnahme, dass das AMP an ein Köderprotein fusioniert wird, sodass ein Abbau des AMP durch Pepsin deutlich langsamer stattfinden kann aufgrund der sterischen Verhältnisse von AMP zu Köderprotein (Abbildung 14 Strategie 3). Alle drei Konstrukte wurden kloniert und für erste Expressionsversuche verwendet. Aufgrund der Verzögerungen im Projekt war es aber nicht möglich die Effektivität dieser Schutzmaßnahmen im Hinblick auf die Pepsin-Hydrolyse näher zu untersuchen. Auch eine Integration in den finalen Trojaner-Stamm unter Kontrolle eines AI-2 induzierbaren Promotors war aus Zeitgründen nicht mehr möglich. Eine vierte Strategie wurde entwickelt, bei der die AMPs auch ohne Trojaner an den Wirkort gelangen und dort freigesetzt werden können (Abbildung 14 Strategie 4). Welche dieser Strategien sich tatsächlich für eine zielgerichtete Freisetzung von AMPs und einem möglichst geringen Aktivitätsverlust durch Pepsin-Hydrolyse eignen, muss im Rahmen weiterer Forschung näher untersucht werden, aus Zeitgründen konnte das im Projekt nicht mehr realisiert werden.

AMP Expressions-Strategien

- **Strategie 1:** Präsentation eines Tandem-Peptids auf der Zell-Oberfläche des Trojaners
- **Strategie 2:** Periplasmatische Akkumulation
- **Strategie 3:** AMP fusioniertes Köder-Protein + periplasmatische Akkumulation
- **Strategie 4:** Slow Release Material + *H. pylori* spezifische Rezeptoren

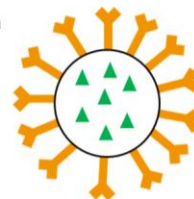
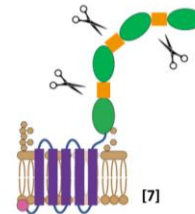


Abbildung 14: Strategien zur gezielten Freisetzung von AMPs am Ort der Infektion. Strategie 1: Die Expression der AMPs erfolgt als Tandem-Peptid auf der Zelloberfläche des Trojaners. Durch Einbau von Leucin-Resten kommt es unter Einwirkung von Pepsin zunächst zur Abspaltung der AMP-Einheiten, wodurch eine antimikrobielle Wirkung in unmittelbarer Umgebung des Trojaners ermöglicht werden könnte. Strategie 2: Eine Expressionskassette mit einer pelB-Leadersequenz für die Akkumulation eines AMPs mit His-Tag Downstream eines AI-regulierbaren Promotors führt in Gegenwart des pathogenen Bakteriums zur Bildung und Freisetzung des AMP, wobei aber eine Hydrolyse durch Pepsin zu erwarten ist, wodurch die antimikrobielle Wirksamkeit eingeschränkt wird. Strategie 3: Analog zu Strategie 2 kommt es zur AMP Expression und Freisetzung in Gegenwart von AI-2, wobei durch Co-Expression eines fusionierten Köderproteins mit multiplen Leucin-Resten zunächst bevorzugt das Köderprotein hydrolysiert werden soll. Strategie 4: Alternativansatz ohne Trojaner unter Einsatz eines Slow-Release-Materials (z.B. Vesikels) in das die AMP eingebettet werden. Durch Oberflächenfunktionalisierung mit *H. pylori* spezifischen Rezeptoren soll eine Bindung an die pathogenen Bakterien und damit die Freisetzung der AMPs in unmittelbarer Umgebung erreicht werden.

Da sich herausstellte, dass die Expression eines für *H. pylori* toxischen Peptids in *H. pylori* selbst äußerst komplex ist (siehe Abbildung 14) und dabei stets auch eine zumindest teilweise Eradizierung des Trojaners selbst erfolgen würde, wurde der Fokus zuerst auf ein AI-2 regulierbares Reportersystem gelegt (Abbildung 15). Dabei sollte die AI-2 vermittelte Induktion der Expression durch ein Lumineszenz- (A, B) oder Fluoreszenzprodukt (C) angezeigt werden. Anstelle also in Gegenwart von AI-2 das AMP zu bilden, sollten die Trojaner-Bakterien in Gegenwart von AI-2 an zu leuchten fangen. Die Konstrukte sollten für den *Proof of Concept* in das Genom des Trojaners integriert werden. Sofern dieses System funktional wäre, könnte die Reporter DNA-Sequenz nachfolgend durch eine AMP DNA-Sequenz (analog zu Abbildung 14) ersetzt werden. Hierfür wurden im letzten Projektjahr Plasmid-Systeme mit einem AI-2 induzierbaren Promotor und einem nachgeschalteten entsprechenden Reporter unterschiedlicher Größe kloniert (Abbildung 15). Die Integration dieser Expressionskassetten in das Genom des Trojaners war aber trotz mehrfacher Versuche letztlich nicht erfolgreich. Das AI-2 induzierbare Reportersystem konnte somit im Projektzeitraum nicht realisiert werden. Es wird aber angestrebt den Ansatz im Rahmen zukünftiger Forschung weiterzuverfolgen.

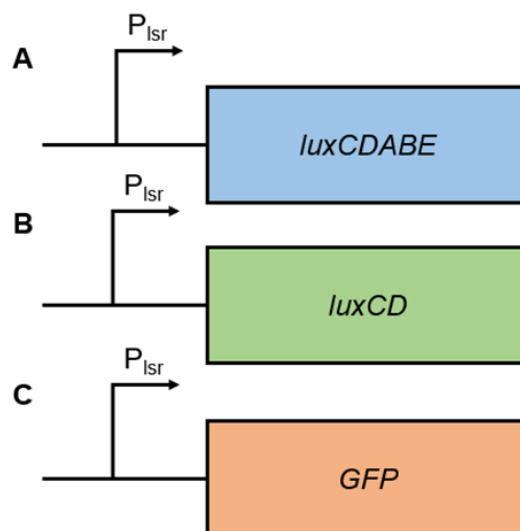


Abbildung 15: AI-2 induzierbare Reporterkassetten für die Integration in das Genom von *H. pylori*. Drei Reporterkassetten mit einem AI-2 induzierbaren Promotor (P_{Isr}) wurden entwickelt, welche in das Genom von *H. pylori* integriert werden können. Diese unterscheiden sich ausschließlich in der Größe der DNA-Sequenz des jeweiligen Reporters: eine vollständige *lux*-Reporterkassette bestehend aus *luxCDABE* mit ca. 5,7 kbp (A), eine unvollständige *lux*-Reporterkassette bestehend aus *luxCD* mit ca. 2,3 kbp (B) und ein GFP-Reporter mit ca. 0,7 kbp (C). Um die Integration der gesamten *lux*-Kassette zu erleichtern, folgt nach der Integration der unvollständigen Reporterkassette (B) ein zweiter Integrationsschritt von *luxABE* (nicht abgebildet), um die *lux*-Kassette zu komplementieren. kbp = Kilobasenpaare

AP8: Kombinatorischer Ansatz: Da letztlich keine *H. pylori* spezifischen Bakteriophagen identifiziert werden konnte, war auch die Realisierung einer kombinatorischen Therapie im Projekt nicht realisierbar.

AP9: Wirksamkeitsnachweis: Ursprünglich sollte die Wirksamkeit der beiden Behandlungsstrategien sowie des kombinatorischen Ansatzes durch in-vitro und in-vivo Experimente untersucht werden. Abschließend sollte anhand eines Mausmodells belegt werden, ob und wie effektiv der Trojaner im Mäusemagen eingesetzt werden kann. Die entsprechenden Tierversuchsanträge wurden vom UKE beantragt und entsprechende Versuche mit den generierten Trojaner-Stämmen geplant. Im Vorfeld wurden in-vitro Tests zur Kolonisierungseffizienz und Immunantwort mit humanen Magenschleimhautzellen durchgeführt

(siehe AP5). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde letztlich entschieden die in-vivo Versuche mit den generierten Trojaner-Varianten nicht durchzuführen. Es hatte sich gezeigt, dass die Pathogenität noch nicht weit genug reduziert wurde, um mit diesen Bakterien in ein Mäusemodell zu gehen. Auch andere in-vitro Versuche wurden zurückgestellt, bis ein entsprechend optimierter Trojaner verfügbar war. Der Trojaner HP5 stand erst zum Ende der Projektlaufzeit zur Verfügung und konnte daher nicht mehr umfassend charakterisiert werden. Auch für weiterführende in-vitro Versuche reichte die Projektlaufzeit trotz der zuwendungsneutralen Projektverlängerung letztlich nicht mehr aus.

AP10: Verbreitung und behördliche Voraussetzungen für Zulassung: Die in diesem Arbeitspaket geplanten Aktivitäten sowie die Beratung durch externe Experten wurde zu Projektbeginn zunächst weitestgehend zurückgestellt, da eine Beratung einen konkreten Therapieansatz voraussetzt. Entsprechend war geplant die Beratung im Hinblick auf die behördlichen Anforderungen für eine spätere Zulassung erst mit Erreichen der ersten vielversprechenden Projektergebnisse zu betrachten. Da der Verbund aufgrund der Rückschläge und Verzögerung letztlich keine der ursprünglich geplanten Strategien umsetzen konnte, wurde sich gegen die Einbeziehung entsprechender behördlicher oder beratender Stellen entschieden.

II.2 Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Ursprünglich wurde eine Zuwendung von 702.580,- € für die Projektkosten bewilligt. Die Förderquote lag bei 100%. Bei der Bearbeitung der Arbeitspakete AP2, AP3 und insbesondere AP5 ergab sich aufgrund der Corona-Pandemie, damit verbundener Lieferengpässe und einiger Rückschläge und Verzögerungen ein personeller Mehraufwand, der aber dadurch kompensiert werden konnte, dass Arbeiten im Rahmen von AP6, AP8 und AP9 nicht anfielen. Die Verzögerungen im Projekt machten es erforderlich eine Laufzeitverlängerung um 8 Monate zu beantragen, die auch bewilligt wurde. Aufgrund von Einsparungen konnten die Projektarbeiten im Rahmen der Verlängerung zuwendungsneutral geleistet werden. Insgesamt betrugen die Projektkosten zum Ende des Projektzeitraumes 702.684,- €. Von den beantragten Mitteln wurden 702.580,- € beim BMBF für das Fraunhofer IME abgerufen. Die tatsächlichen Projektkosten lagen damit um 104,- € über den bewilligten Mitteln. Dieser Betrag wurde aus Eigenmitteln des Fraunhofer IME aufgewendet.

Tabelle 4: Übersicht zu den Projektkosten in Relation zu den ursprünglich kalkulierten Kosten.

	Kosten gemäß Vorkalkulation	Ist-Kosten
Personalkosten inkl. Gemeinkosten	663.080,- €	666.172,- €
Verbrauchsmaterial	34.500,- €	31.772,- €
Reisekosten	5.000,- €	4.740,- €
Summe	702.580,- €	702.684,- €

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Alle Arbeiten erfolgten unter Berücksichtigung des aktuellen Wissensstandes und unter Berücksichtigung eigener Ergebnisse, wie auch der Ergebnisse und Erkenntnisse der beteiligten Projektpartner. Die Arbeiten entsprachen im Wesentlichen den im Arbeitsplan vorgesehenen Aufgaben. Bei dem Forschungsvorhaben handelte es sich um eine Hochrisikoforschung, da die angestrebten Therapiestrategien vollkommen neue und hochinnovative Ansätze darstellten, zugleich aber ein hohes Risiko bestand, dass sich die Behandlungsstrategien in der angedachten Form nicht oder nur teilweise umsetzen lassen. Letztlich konnte kein *H. pylori* spezifischer Bakteriophage gefunden werden, so dass diese Behandlungsstrategie verworfen werden musste. Der Fokus wurde daher stärker auf die Trojaner-vermittelte Expression von AMPs gelegt. Auch hier zeigte sich die hohe Komplexität des Vorhabens. Es wurden wertvolle neue Erkenntnisse über *H. pylori*, die Bildung von Autoinducern und die eradizierende Wirkung von Antimikrobiellen Peptiden gesammelt. Erfolgreich konnte schrittweise ein Trojaner entwickelt werden, bei dem wesentliche Pathogenitätsfaktoren ausgeschaltet wurden, der aber offenbar immer noch in der Lage ist im Magen zu kolonisieren. Die damit verbundenen Arbeiten waren aber zeitaufwändiger als ursprünglich kalkuliert, so dass sie in der Projektlaufzeit nicht zur Entwicklung eines finalen, apathogenen Trojaners geführt haben. Die am IME erzielten Ergebnisse stellen aber dennoch eine solide Basis für weitere Forschungsarbeiten dar und sollen in nachfolgenden Projekten weitergeführt werden.

Alle Arbeiten erfolgten in enger Absprache mit den anderen Partnern. Erzielte Ergebnisse, erarbeitete Protokolle und Daten wurden regelmäßig zwischen den Partnern ausgetauscht.

II.4 Verwertung

Die im Rahmen des Gesamtprojektes erzielten Ergebnisse sollen nach Projektende in unterschiedlicher Weise verwertet werden.

Eine unmittelbare kommerzielle Verwertung als neue Therapieform kommt zunächst nicht in Betracht, da

- a.) Keine Phagen gegen *H. pylori* identifiziert werden konnten
- b.) Die identifizierten AMPs im Magen anfällig für Pepsin-Hydrolyse sind und für einen wirksamen Einsatz zunächst weitere Forschungsfragen geklärt werden müssen
- c.) Der generierte Trojaner noch nicht final charakterisiert bzw. die Pathogenität noch nicht weit genug reduziert werden konnte

Dennoch sollen die gewonnenen Erkenntnisse genutzt werden, um weitere Fördergelder zu akquirieren und die Forschung fortsetzen zu können.

Die Zusammenarbeit mit den Projektpartnern hat darüber hinaus Ideen für weitere gemeinsame Forschungsaktivitäten initiiert. So arbeiten IME, Quh-Lab und PTC aktuell gemeinsam am BMBF geförderten Verbundvorhaben Fast Meat Control – FMC (FKZ: 13N15797), bei dem Bakteriophagen gegen Salmonellen und *Campylobacter* für eine spezifische Pathogenanreicherung eingesetzt werden und ein AI-2 induziertes Sensorbakterium zum sensitiven Nachweis der Bakterien entwickelt wird. Hier wird somit das in HeliTec angestrebte Reportersystem, welches dafür sorgt, dass Sensorbakterien in Gegenwart von Pathogenen und deren Autoinducern zu leuchten beginnen, fortgeführt. Im BLE geförderten Projekt MAGniFlex (FKZ: 281C406A21) wird ein ähnlicher Ansatz verfolgt, um pathogene Bakterien im veterinärmedizinischen Kontext im Geflügelstall nachweisen zu können.

Zusammen mit dem UKE wurde Anfang 2025 ein Projektantrag bei Gesünder.IN.NRW eingereicht, bei dem es um den spezifischen Nachweis von Sepsiserregern in humanen Blutproben geht, auch hier sollen ggf. Phagen für eine spezifische Anreicherung eingesetzt werden.

Es ist davon auszugehen, dass die Projektergebnisse und Partnerschaften zur Akquise weiterer öffentlicher Förderprojekte beitragen und so auch nicht abschließend in HeliTec betrachtete Forschungsarbeiten in diesem Kontext fortgeführt werden können.

Eine Verwertung der Projektergebnisse erfolgt darüber hinaus auch im Rahmen von wissenschaftlichen Publikationen. Während der Projektlaufzeit wurden Ergebnisse im Rahmen zweier wissenschaftlicher Fachkonferenzen vorgestellt (Poster: Living Materials 2022, Saarbrücken; Vortrag: 14th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections, Helsingør) Es ist davon auszugehen, dass Teile der Projektergebnisse auch nach Projektabschluss noch im Rahmen von Fachbeiträgen und wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht werden. Darüber hinaus sind die Projektergebnisse Teil einer Dissertation, die im April 2025 eingereicht werden soll.

II.5 Fortschritt Dritter während des Projektzeitraums

Während der Projektdurchführung wurden regelmäßig Literaturrecherchen durchgeführt, um zu prüfen, ob auf dem Forschungsgebiet relevante Veröffentlichungen erfolgten. Darüber hinaus wurde auch beobachtet, welche anderen öffentlich geförderten Projekte mit ähnlichen Zielvorgaben durchgeführt werden und sofern möglich, wie dort der Fortschritt ist.

In Rahmen der Literaturrecherche wurde ein iGem-Projekt von 2015 identifiziert, welches die Verwendung von *Escherichia coli* als Trojanisches Bakterium zur Antibiotika-freien Therapie von *H. pylori* thematisiert. Dieses sollte ebenfalls mit einer AI-2 regulierbaren Expressionskassette versehen werden, welche die Expression eines antimikrobiellen Peptids vorsieht. Dieses Projekt unterscheidet sich dahingehend von dem HeliTec-Projekt, dass der Fokus auf *E. coli* als Trojaner gelegt wird und im HeliTec-Projekt auf *H. pylori*. Weiterhin grenzt sich das HeliTec-Vorhaben durch die Phagenkonjugation sowie Phagenexpression von dem iGem-Projekt ab. Darüber hinaus scheint das iGem-Projekt eingestellt zu sein und es liegen keine verwertbaren Ergebnisse vor bzw. keine Publikationen oder Patente.

II.6 Erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse

Ausgewählte wissenschaftliche Ergebnisse des Gesamt- und Teilvorhabens wurden während der Projektlaufzeit der Öffentlichkeit im Rahmen von Konferenzteilnahmen durch ein wissenschaftliches Poster und einen wissenschaftlichen Fachvortrag vorgestellt. Die im Rahmen des Projektes gewonnenen Ergebnisse fließen darüber hinaus in eine Dissertation ein. Die Einreichung der Dissertation ist für April 2025 geplant. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass Projektergebnisse auch nach Abschluss des Projektes noch im Rahmen wissenschaftlicher Fachartikel veröffentlicht werden.

Übersicht zu den das Teilprojekt betreffenden Veröffentlichungen:

T. Zumbusch, A. Croon, F. Schröper (2022) - Antibiotic-free *Helicobacter* therapy based on the combination of innovative treatment strategies and novel drug delivery technologies – Poster: Living Materials 2022, Saarbrücken

T. Zumbusch, F. Schröper (2022) - HeliTec - Antibiotic-free *Helicobacter* therapy based on the combination of innovative treatment strategies and novel drug delivery technologies – Presentation: 14th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections, Helsingør

T. Zumbusch – Dissertation: Entwicklung und Charakterisierung eines Trojanischen *Helicobacter pylori* - Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University: Einreichung voraussichtlich 04/2025

Literatur

- [1] Heintschel von Heinegg, E. *et al.* (1993) Characterisation of a *Helicobacter pylori* phage. *Med Microbiol.*: 38(4), 245-249
- [2] Forsyth, M. H.; Cover, T. L. **(2000)**: Intercellular communication in *Helicobacter pylori*: *luxS* is essential for the production of an extracellular signaling molecule. In: *Infection and Immunity* 68 (6), S. 3193–3199.
- [3] Xavier, K. B.; Bassler, B. L. **(2005)**: Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 187 (1), S. 238–248.
- [4] Tombola, F.; Carlesso, C.; Szabò, I.; Bernard, M. de; Reytrat, J. M.; Telford, J. L. *et al.* **(1999)**: *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. In: *Biophysical journal* 76 (3), S. 1401–1409.
- [5] Kimura, M.; Goto, S.; Wada, A.; Yahiro, K.; Niidome, T.; Hatakeyama, T. *et al.* **(1999)**: Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. In: *Microbial pathogenesis* 26 (1), S. 45–52.
- [6] Gebert, B.; Fischer, W.; Weiss, E.; Hoffmann, R.; Haas, R. **(2003)**: *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. In: *Science (New York, N.Y.)* 301 (5636), S. 1099–1102.
- [7] Huang, X.; Deng, Z.; Zhang, Q.; Li, W.; Wang, B.; Li, M. **(2016)**: Relationship between the *iceA* gene of *Helicobacter pylori* and clinical outcomes. In: *Therapeutics and clinical risk management* 12, S. 1085–1092
- [8] Cho, H. Y.; Cho, H.; Song, W. S.; Yoon, S.-I. **(2022)**: Structural analysis of the virulence gene protein IceA2 from *Helicobacter pylori*. In: *Biochemical and biophysical research communications* 612, S. 162–168.
- [9] Backert, S.; Naumann, M. **(2010)**: What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. In: *Trends in microbiology* 18 (11), S. 479–486.
- [10] Blaser, M. J.; Perez-Perez, G. I.; Kleanthous, H.; Cover, T. L.; Peek, R. M.; Chyou, P. H. *et al.* **(1995)**: Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. In: *Cancer research* 55 (10): 2111-2115