

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt



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

-Helitec-

Pierre Schneider

Dr. med. vet Martin Frettlöh

Förderkennzeichen: 16GW0352

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen: 16GW0352 gefördert. Die Verantwortung liegt bei den Autoren.



Abschlussbericht

HeliTec

ZE: Quh-Lab Lebensmittelsicherheit

Förderkennzeichen: 16GW0352

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

Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2021 – 31.09.2024

Berichtszeitraum: 01.02.2021 – 31.09.2024

1. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse.

AP 1: Identifizierung nutzbarer Phagen (01.02.2021 – 31.07.2022)

Das **AP 1** wird durch die Verbundpartner PTC und UKE durchgeführt.

AP 2: Identifizierung effektiver Bakterizide (01.02.2021 - 31.07.2021)

Inhalt AP2:

AP 2.1: Etablierung der Kultivierung von *H. pylori* (Quh-Lab)

Die Kultivierung von *H. pylori* aus **AP 2.1** wurde aus technischen Gründen ans IME verlegt.

AP 2.2: Literatursuche nach nutzbaren Bakteriziden gegen *H. pylori* (Quh-Lab, IME)

Das **AP 2.2** wurde planmäßig abgeschlossen.

AP 2.3: Charakterisierung der inhibitorischen Effekte der gefundenen Bakterizide und Identifizierung der Gen-Sequenzen (Quh-Lab, IME)

Das **AP 2.3** wurde planmäßig abgeschlossen.

Festgelegte Resultate:

Im Rahmen des **AP 2** sollten mehrere bakterizid wirkende Peptide und oder Proteine gegen *H. pylori* identifiziert, getestet und deren Gen-Sequenz für eine spätere Expression herausgesucht werden.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

Bei der Literatursuche aus **AP 2.2** wurden mehrere Bakterizide für *H. pylori* identifiziert (Tabelle 1). Nach einem Ausschluss mit verschiedenen Kriterien wie Vorhandensein von *in vivo* Studien, beschriebenen Nebenwirkungen und ein niedriger MIC-Wert, wurden Nisin A und LL-37 zur weiteren Verwendung von Quh-Lab ausgewählt.

Tabelle 1: Gegen *H. pylori* wirksame Peptide und deren Wirksamkeit.

Peptid	MIC [µg/ml] Literatur	Hemmhoftest wirksam	MIC [µg/ml] experimentell
Tilapia piscidin 3	8 - 12	-	
SolyC	10 - 15	-	
PGLa-AM1	1	-	
Nisin A	0,07 - 25	ja	32
Pediocin P02	6,25 - 50	-	
Leucocin K	25	-	
Lacticin A164	0,097 - 12,5	-	
Lacticin BH5	0,097 - 12,5	-	
Lacticin JW3	0,195 - 25	-	
Lacticin NK24	0,097 - 25	-	
Mutacin B-Ny266	0,03 - 0,4	-	
Pediocin BA28	100	-	
Cbf-K ₁₆	16 - 32	-	
NST1	1,5 - 12,5	-	
LL-37	6	ja	32

Für Nisin A und LL-37 wurde im **AP 2.3** mit Hilfe von Hemmhoftests eine antibakterielle Wirksamkeit gegen *H. pylori* bestätigt. Die Charakterisierung der antibakteriellen Wirkung der Substanzen gegen *H. pylori* geschah mittels Aufnahme von Wachstumsraten via optischer Dichte (OD₆₀₀). Eine mögliche Wirksamkeit gegenüber probiotischen Bakterien und die Toxizität für einen therapeutischen Einsatz wurden, Aufgrund von benötigten Geräten die nur am IME vorhanden sind, durch den Verbundpartner IME durchgeführt und im entsprechenden Zwischenbericht behandelt. Die Peptide LL-37 und Nisin A wurden durch Quh-Lab zur Verfügung gestellt.

AP 3: Identifizierung *H. pylori* spezifischer Autoinducer und deren induzierbaren Promotoren und Repressoren (01.03.2021 – 28.02.2022)

Inhalt AP3:

AP 3.1: Detektion von *H. pylori* spezifischen Autoinducern mittels GC/MS (IME)

Das **AP 3.1** wurde vom Verbundpartner IME durchgeführt.

AP 3.2: Detektion von *H. pylori* spezifischen Autoinducern mittels LC/MS (IME)

Das **AP 3.2** wurde durch den Verbundpartner IME durchgeführt.

AP 3.3: Identifizierung Autoinducer induzierbarer Promotoren (Quh-Lab)

Das **AP 3.3** wurde planmäßig abgeschlossen (Siehe hierzu **AP 3.4**).

AP 3.4: Identifizierung Autoinducer induzierbarer Repressoren (Quh-Lab)

Das **AP 3.4** wurde planmäßig abgeschlossen.

Festgelegte Resultate:

Im Rahmen des **AP 3** sollten spezifische *H. pylori* Autoinducer mittels GC/MS und LC/MS gefunden werden. Weiterhin sollten Promotoren und Repressoren für Autoinducer von *H. Pylori* identifiziert werden.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

Im **AP 3.3** und **AP 3.4** wurden Promotoren und Repressoren für verschiedene Autoinducer in der Literatur herausgesucht und bioinformatisch für die spätere Nutzung in einem Plasmid aufbereitet. Weiterhin wurden die entsprechenden Plasmide geplant. Versuche zur Charakterisierung dieser sind für die Autoinducer der Klasse 2 gelaufen. Diese detektieren die entsprechenden Autoinducer zuverlässig. Die Versuche zu den Autoinducern der Klasse 1 und 3 wurden aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit der Autoinducer während der **AP 3.1** und **AP 3.2** bei durch das IME durchgeführten Messungen, nicht durchgeführt.

AP 4: Identifizierung von *H. pylori* Autoinducern unter Nutzung eines etablierten bakteriellen Autoinducer Erkennungssystems (01.04.2021 – 31.07.2022)

Im Rahmen des **AP 4** sollte mittels eines bakteriellen Lumineszenz-basierten Detektor Systems bestätigt werden, dass *H. pylori* mittels Autoinducer der Klasse 2 kommuniziert. Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob *H. pylori* Autoinducer der Klasse 1 und oder 3 verwendet.

Inhalt AP4:

AP 4.1: Adaption der Lumineszenz-basierten Autoinducer Detektion für *H. pylori* (Quh-Lab)

Das **AP 4.1** wurde planmäßig abgeschlossen.

AP 4.2: Verifizierung der Produktion von Autoinducern der Klasse 2 durch *H. pylori* mittels dem Lumineszenz-basierten Detektor Systems (Quh-Lab)

Das **AP 4.2** wurde planmäßig abgeschlossen.

AP 4.3: Verifizierung der Produktion von Autoinducern der Klasse 1 durch *H. pylori* mittels dem Lumineszenz-basierten Detektor Systems / Identifikation der Produktion anderer Autoinducer durch *H. pylori* (Quh-Lab)

Das **AP 4.3** wurde planmäßig abgeschlossen.

Festgelegte Resultate:

Im Rahmen des **AP 4** sollte mittels eines bakteriellen Lumineszenz-basierten Detektor Systems bestätigt werden, dass *H. pylori* mittels Autoinducer der Klasse 2 kommuniziert. Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob *H. pylori* Autoinducer der Klasse 1 und oder 3 verwendet.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

Im **AP 4.1** konnte nachgewiesen werden, dass das etablierte Detektorbakterium *E. coli* in den für *H. pylori* verwendeten Medien Brucella und Columbia wächst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das etablierte System in *E. coli* in diesen Medien bei Zugabe von künstlichen Autoinducersersatz der Klasse 2 ein vergleichbares Signal zeigt.

Im **AP 4.2** konnte ähnlich wie in dem **AP 3.1** und **AP 3.2** in ersten Versuchen gezeigt werden das *H. pylori* Autoinducer der Klasse 2 produziert.

Da der Projektpartner IME im Rahmen der **AP 3.1** und **AP 3.2** keine Autoinducer der Klasse 1 oder 3 identifizieren konnte, wurde sich primär auf die Optimierung des Nachweises der Autoinducer der Klasse 2 konzentriert. Dafür wurde mit bioinformatischen Methoden der Lsr-Promotor, an den, der durch Autoinducer der Klasse 2, gelöste Repressor LsrR bindet, untersucht. Durch zusätzliche Literaturrecherchen wurden 8 Mutanten dieses Promotors erstellt und untersucht. Die Deletion der ersten 124 Basen des Promotors führte zu einer signifikanten Verdopplung des Signals und somit zu einer besseren Auflösung. Andere Mutanten sorgten für eine Abschwächung oder einem gänzlichen Verschwinden des Signals. Weitere Verbesserungen am Erkennungs- und Expressionssystem sind aus außerhalb des Rahmens dieses Projektes geplant.

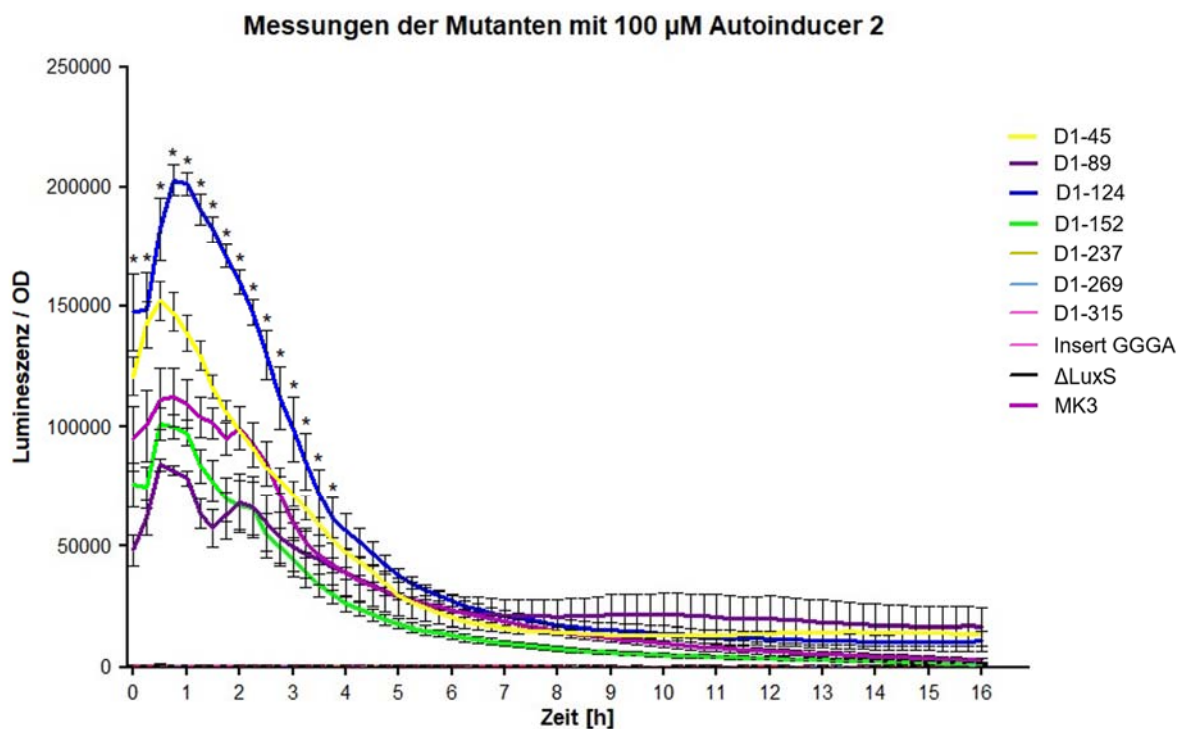


Abbildung 1: Die Mutante 124.2 zeigt ein verdoppeltes Signal im Vergleich zu dem Ausgangsplasmid MK3. Die verschiedenen Mutanten des Promotors wurden über 16 Stunden mit 100 μ M des künstlichen AI-2 Ersatzes DPD. Daten angegeben in \pm S.E.M.; N=3; * $p < 0,05$.

AP 5: Generierung eines nicht pathogenen *H. pylori* Stammes zur Verwendung als Trojanisches Pferd (01.10.2021 – 30.04.2023)

Inhalt AP5:

AP 5.1: Literaturrecherche zur Identifizierung von *H. pylori* Pathogenitätsfaktoren und Bereitstellung eines apathogenen *H. pylori* Stammes (Quh-Lab, IME)

Das **AP 5.1** wurde planmäßig abgeschlossen.

AP 5.2: Generierung eines apathogenen *H. pylori* Stammes zur Produktion von Phagen (Quh-Lab)

Das **AP 5.2** konnte Aufgrund von fehlenden Phagen nicht begonnen werden.

AP 5.3: Etablierung von Pathogenitätstest (Quh-Lab, IME)

Das **AP 5.3** wurde planmäßig abgeschlossen.

AP 5.4: Screening auf Apathogenität der generierten *H. pylori* Stämme (Quh-Lab, IME)

Das **AP 5.4** wurde mit Verzögerung bis zum 31.12.2023 abgeschlossen.

AP 5.5: Knockout der Pathogenitätsfaktoren und Autoinducersynthese in *H.pylori* (IME)

Das **AP 5.5** wird vom Verbundpartner IME durchgeführt.

AP 5.6: Charakterisierung und Kultivierung des trojanischen Stammes (IME, Quh-Lab)

Das **AP 5.6** wurde planmäßig abgeschlossen.

Festgelegte Resultate:

Im Rahmen des **AP 5** sollte ein nicht oder schwach pathogener Stamm generiert werden in dem die Autoinducersynthese eliminiert ist. Weiterhin sollte der nicht pathogene Stamm zur Produktion von in **AP 1** identifizierten Phagen verwendet werden.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

Im **AP 5.1** wurden durch IME und Quh-Lab verschiedene Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* in der Literatur recherchiert. Zur Suche wurden Faktoren zur korrekten Ansiedlung einer *H. pylori* Population, Motilität und gleichbleibendes Wachstum, mitberücksichtigt. Die Quh-Lab Auswahl ist in **Tabelle 2** aufgestellt.

Tabelle 2: Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* die für einen knock-out genutzt werden könnten

Pathogenitätsfaktor	Wirkprinzip
CagA	Änderung der Proliferation umgebender Gewebe
cag TFSS	CagA Sekretierung
OipA	Bindung an Magenzellen und Aktivierung der Apoptose

Bezüglich **AP 5.2** betrachten Sie bitte, dass dieses aufgrund von fehlenden Phagen nicht begonnen werden konnte.

Für das **AP 5.3** wurden Versuchspläne aus vorhandener Literatur herausgearbeitet und etabliert. Eine Co-Infektion mit einer multiple of infection (MOI) von 20 stellte sich in verschiedenen Vorversuchen als die Infektionskonzentration mit den am besten zu interpretierenden Effekten heraus.

Für das **AP 5.4** wurden die durch das IME erstellten Knockoutmutanten der Pathogenitätsfaktoren in mit den in **AP 5.3** etablierten Pathogenitätstests auf ihre Apathogenität untersucht. Für die Messung der Viabilität wurde das CellTiter-Blue® Reagenz verwendet (siehe Abbildung 2 und 3).

Viabilitätsmessungen der *H. pylori* Mutanten infizierten AGS Zellen

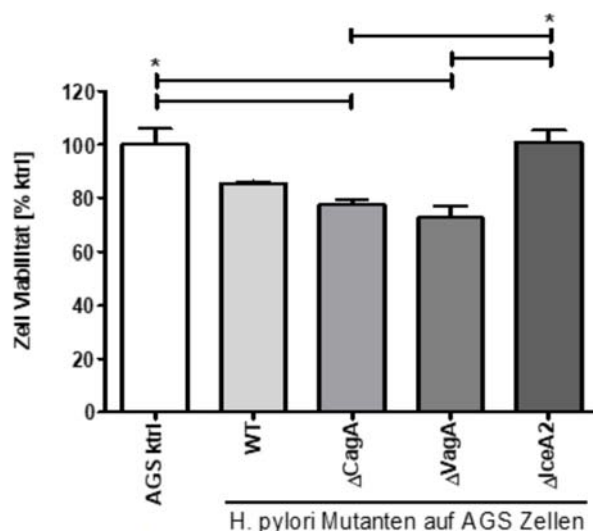


Abbildung 2: Die Viabilität der AGS Zellen wird nur durch die *H. pylori* Knockoutmutante ΔIceA2 nicht beeinträchtigt

Konfluente AGS Zellen wurden mit *H. pylori* in einer multiplicity of infection (MOI) von 20 infiziert. Nach einer Präinkubation von 3 Stunden wurde das CellTiter-Blue® Reagenz für 4 Stunden hinzugegeben und anschließend in einem Plate Reader die Fluoreszenz mit 535 nm und 590 nm Emission vermessen. Daten angegeben in ± S.E.M.; N=3; *p<0,05.

Nach einer insgesamten Infektionszeit von 7 Stunden zeigten nur die Knockoutmutanten ΔCagA und ΔVagA eine signifikante Reduktion der Viabilität.

AGS Viabilität nach 7 Stunden Co-Inkubation

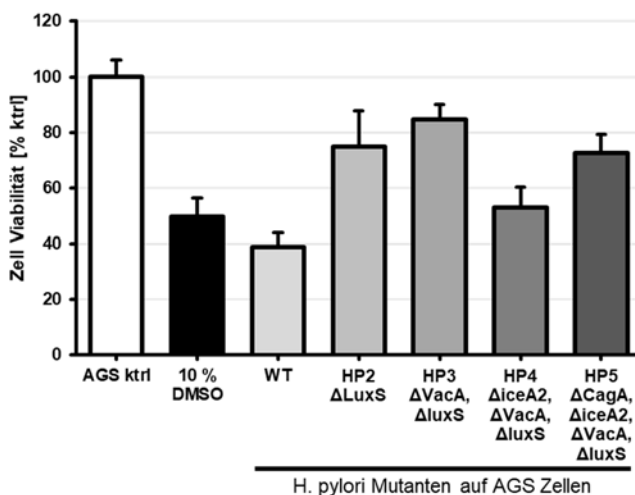


Abbildung 3: Viabilitätstests der *H. pylori* mehrfach Knockout-Mutanten

Konfluente AGS Zellen wurden mit *H. pylori* in einer multiplicity of infection (MOI) von 20 infiziert. Nach einer Präinkubation von 3 Stunden wurde das CellTiter-Blue® Reagenz für 4 Stunden hinzugegeben und anschließend in einem Plate Reader die Fluoreszenz mit 535 nm und 590 nm Emission vermessen. Daten angegeben in ± S.E.M.; N=3; *p<0,05.

Nach einer insgesamten Infektionszeit von 7 Stunden zeigten die Knockoutmutanten HP4, sowie der WT und die DMSO Kontrolle die deutlichste Reduktion der Viabilität. Die Knockoutmutanten HP2, HP3 und HP5 zeigen eine reduzierte Viabilität gegenüber den AGS Zellen, aber eine verstärkte Viabilität gegenüber dem WT.

Für die Apoptosetests wurde versucht ein Propidium-Iodid Assay zu etablieren. Dieser erwies sich als unpraktikabel und wurde daher durch einen RealTime-Glo®-Assay ersetzt.

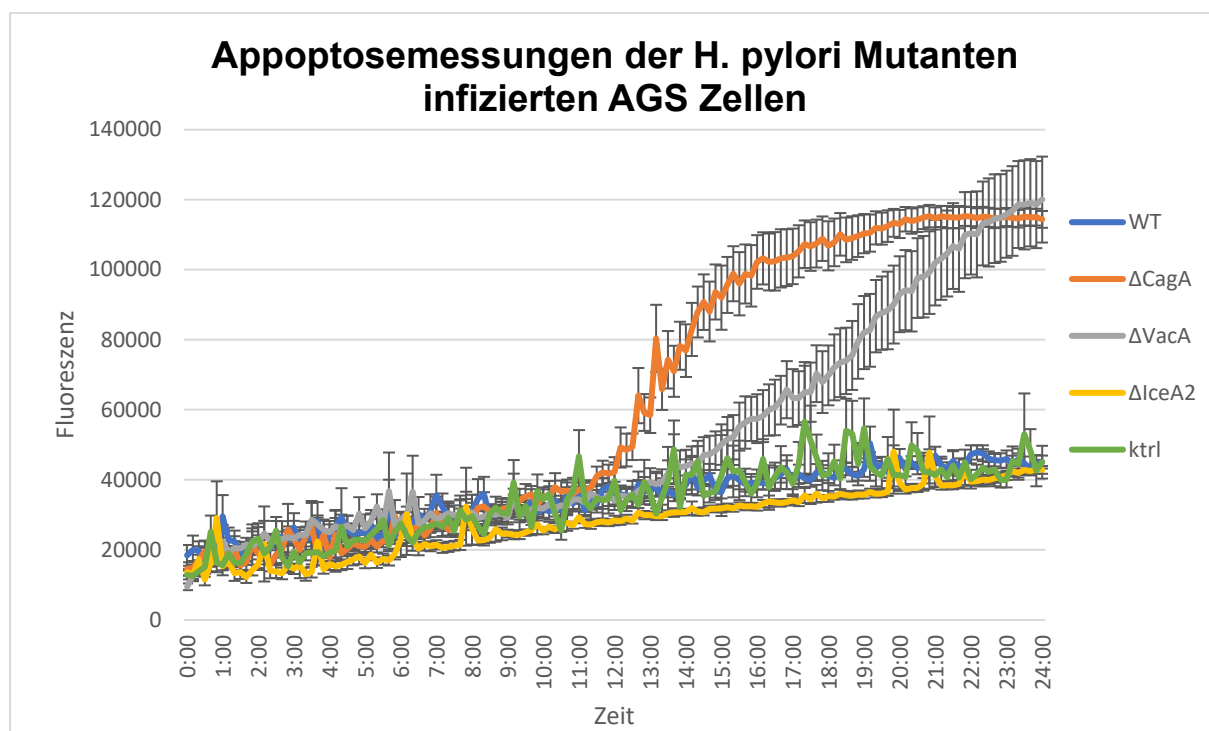


Abbildung 4: Die Apoptose der AGS Zellen wird nur durch die *H. pylori* Knockoutmutante Δ IceA2 nicht beeinträchtigt

Konfluente AGS Zellen wurden mit *H. pylori* in einer multiplicity of infection (MOI) von 20 infiziert. Das RealTime-Glo® Reagenz wurde direkt hinzugegeben und anschließend in einem Plate Reader die Lumineszenz für 24 h vermessen. Daten angegeben in \pm S.E.M.; N=3.

Ähnlich zu dem Viabilitätsassay zeigten nur die Knockoutmutanten Δ CagA und Δ VagA einen signifikanten Anstieg der Apoptose im Gegensatz zur Kontrolle (siehe Abbildung 5).

Apoptosemessungen der *H. pylori* Mutanten infizierten AGS Zellen

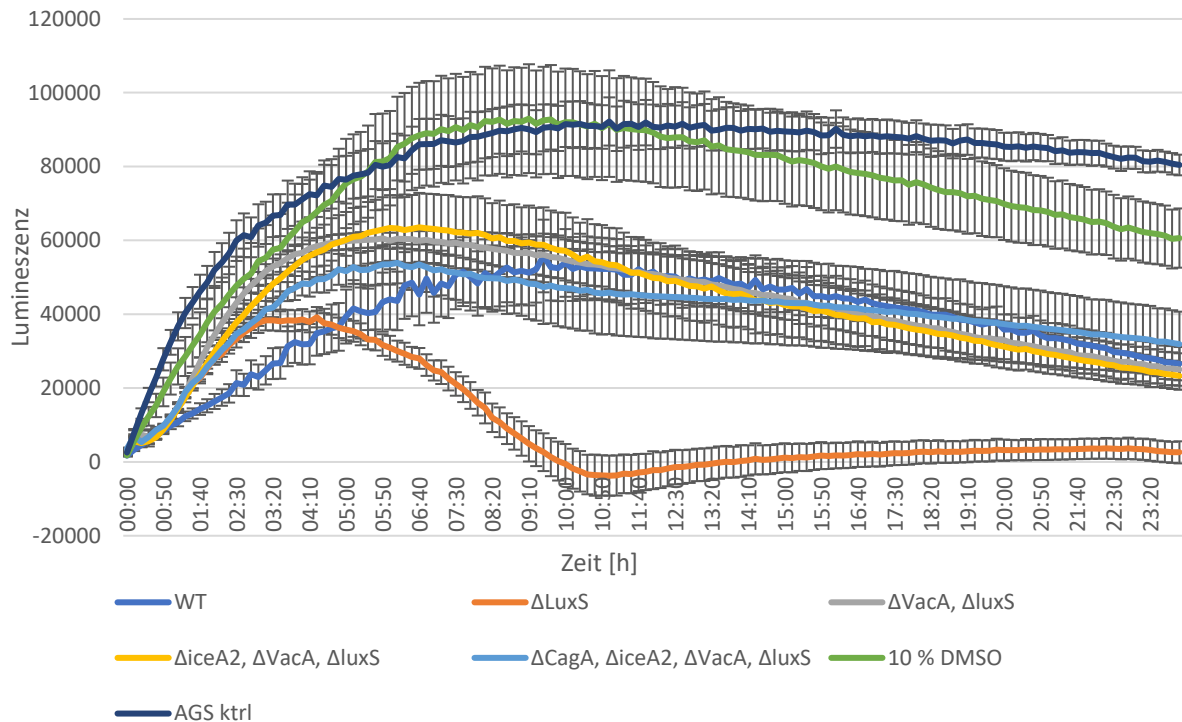


Abbildung 5: Apoptostests der *H. pylori* mehrfach Knockout-Mutanten

Konfluente AGS Zellen wurden mit *H. pylori* in einer multiplicity of infection (MOI) von 20 infiziert. Das RealTime-Glo® Reagenz wurde direkt hinzugegeben und anschließend in einem Plate Reader die Lumineszenz für 24 h vermessen. Daten angegeben in \pm S.E.M.; N=3.

Alle *H. pylori* Mutanten zeigen eine geringere Apoptoserate als die Kontrollen. Dies kann 2 mögliche Gründe haben:

1. *H. pylori* ist in der Lage die Bindungsstellen von Annexin V zu maskieren, welches in diesem Versuch zur Detektion von Apoptose verwendet wird.
2. *H. pylori* versucht die durch ihn infizierten Zellen am Leben zu halten.

Für die Messung der Nekrose wurde das RealTime-Glo®-Assay verwendet.

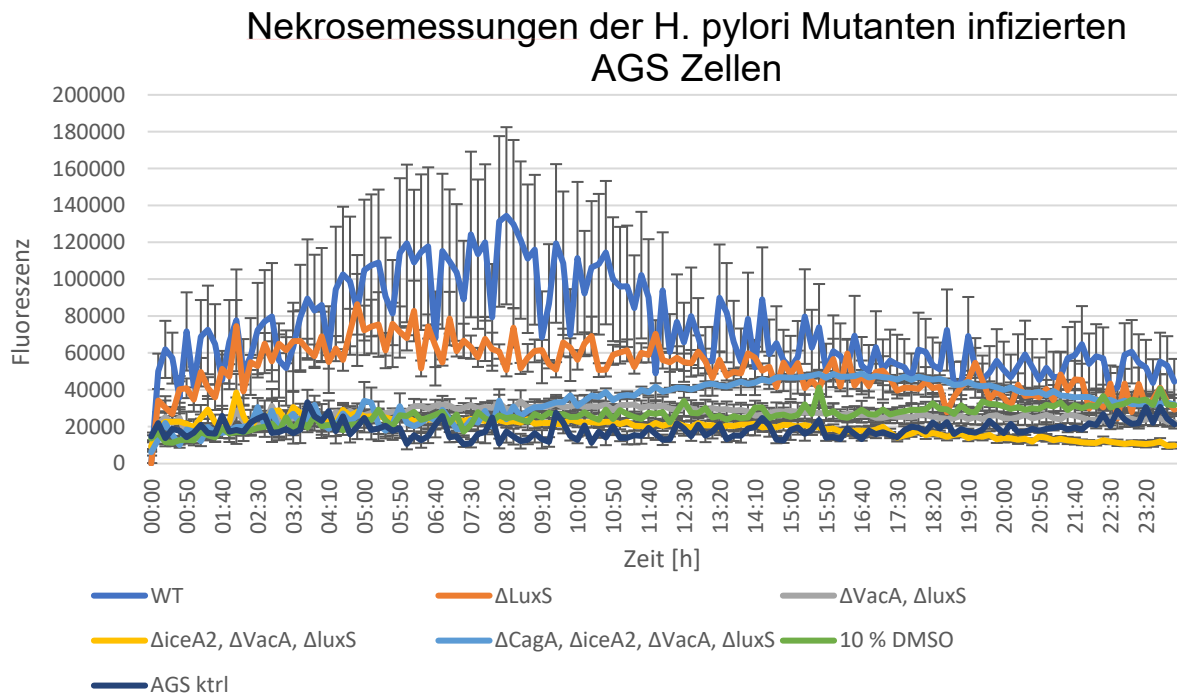


Abbildung 6: Nekrosetests der *H. pylori* mehrfach Knockout-Mutanten

Konfluente AGS Zellen wurden mit *H. pylori* in einer multiplicity of infection (MOI) von 20 infiziert. Das RealTime-Glo® Reagenz wurde direkt hinzugegeben und anschließend in einem Plate Reader die Lumineszenz für 24 h vermessen. Daten angegeben in \pm S.E.M.; N=3.

Keine der *H. pylori* Knockout-Mutanten zeigt eine klare Indikation von Nekrose der AGS Zellen. Der WT und die Δ LuxS Mutante zeigen einen leichten Anstieg der Nekroseindikation. Dieser geht allerdings wieder zurück und ist eher auf eine Öffnung der Zellmembran zurück zu führen, als dass eine Nekrose der Zellen zu erkennen wäre.

AP 6: Pagentherapie (01.08.2022 – 31.03.2023)

Das AP 6 wird von den Verbundpartnern PTC und IME durchgeführt.

AP 7: Generierung und Integration der Expressionskassetten für die bakteriziden Peptide (01.08.2022 – 30.04.2023)

Inhalt AP7:

AP 7.1: Erstellung einer bakteriziden Expressionskassette (Quh-Lab, IME)

Das AP 7.1 wurde planmäßig beendet.

AP 7.2: Expression und Sekretion von bakteriziden Substanzen (IME)

Das **AP 7.2** wird vom Verbundpartner IME durchgeführt.

AP 7.3: In-vitro Effektivitätstests (Quh-Lab)

Leider konnte aufgrund mannigfaltiger Verzögerungen noch kein fertiger trojanischer *H. pylori* Stamm durch den Projektpartner IME bereitgestellt werden. Infolgedessen konnte dieses Arbeitspaket nicht bearbeitet werden.

Festgelegte Resultate:

Im Rahmen des **AP 7** sollte überprüft werden, ob der trojanische Stamm funktional ist und in der Präsenz von Autoinducern Bakterizide freigibt.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

Die in **AP 7.1** erstellten Modifikationen an dem Promotor und Repressor des Lumineszenz-basierten Detektor Systems konnten auch ohne das Vorhandensein der bakterizid gegen *H. pylori* wirkenden Peptide durchgeführt werden.

Da sowohl das IME als auch Quh-Lab bis Ende 2022 keine Autoinducer der Klassen 1 und 3 identifizieren konnten, wurde sich auf die Optimierung des Nachweises der Autoinducer der Klasse 2 konzentriert. Dafür wurde der Lsr-Promotor, welcher durch das Binden von Autoinducer der Klasse 2 an den Repressor LsrR induziert wird, verwendet. Im Berichtszeitraum wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen, um die Regulierbarkeit des Promotors deutlich zu verbessern.

Bei der Optimierung des bisher verwendeten *E. coli* Stammes BL21 Δ LuxS wurde das Fehlen, des nativen Repressors LsrR, der Bestandteile des Autoinducer Tunnelproteins LsrA und LsrC, sowie der Kinase LsrK, festgestellt. Aus diesem Grund wurde überprüft ob die Möglichkeit besteht einen anderen Bakterienstamm zu verwenden. Dabei stellte sich heraus, dass der *E. coli* Stamm BL21 die besten Resultate in der Auflösung der Signale zeigte (siehe Abbildung 7).

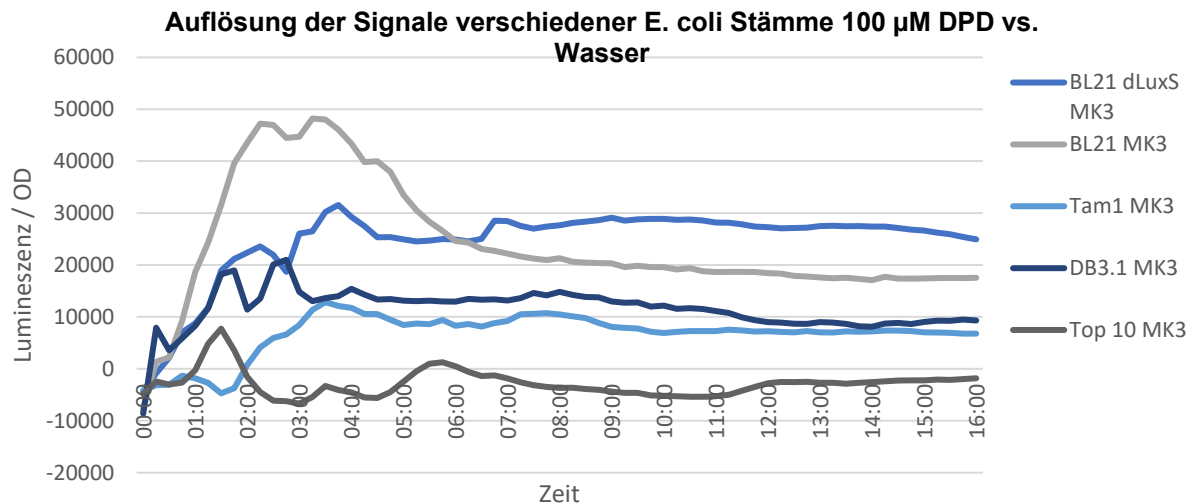


Abbildung 7: Der E. coli Stamm BL21 zeigt die größte Auflösung zu seinem Backgroundsignal

Die E. coli Stämme mit dem Lumineszenz-basierten Detektor System MK3 wurden über 16 Stunden mit 100 μ M des künstlichen AI-2 Ersatzes DPD vermessen. Der durch die Zugabe von Wasser ermittelte Background wurde von den durch DPD Zugabe erhaltenen Werten abgezogen, um die Auflösung zu bestimmen. N=3.

Der E. coli Stamm BL21 zeigt die beste Signalauflösung. Mit dem Stamm BL21 kann jedoch nicht gearbeitet werden, da der Detektorstamm sich nicht selbst durch die Produktion von Autoinducern durch die Autoinducer Synthase LuxS aktivieren können sollte. Daher wurde stattdessen der Stamm BL21 Δ LuxS verwendet.

Im Weiteren wurde daran gearbeitet die fehlenden Bestandteile des Lsr Regulons (der native Repressors LsrR, der Bestandteile des Autoinducer Tunnelproteins LsrA und LsrC, sowie der Kinase LsrK) hinzuzufügen.

Es wurde sich zuerst auf die Ergänzung des Repressors LsrR konzentriert (siehe Abbildung 8).

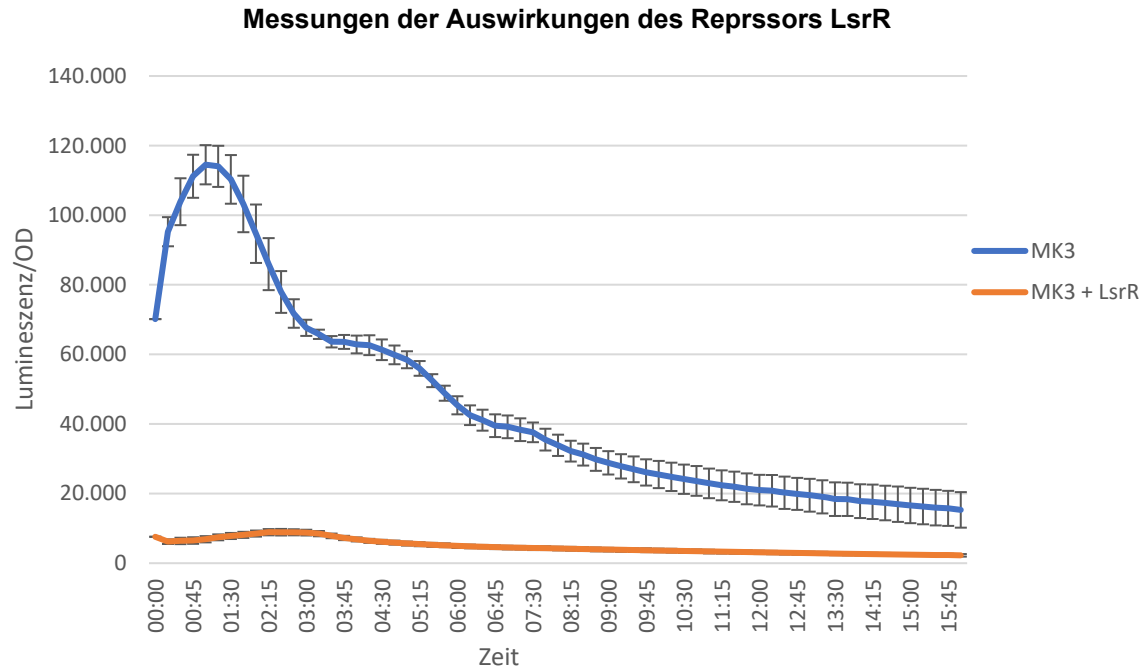


Abbildung 8: Die Zugabe des Repressors LsrR sorgt für eine Reduktion des Signals

Das Lumineszenz-basierte Detektorsystem wurde mit und ohne den zusätzlichen Repressor LsrR über 16 Stunden mit 100 µM des künstlichen AI-2 Ersatzes DPD, vermessen. Daten angegeben in ± S.E.M.; N=7.

Die Messungen des Detektorsystems mit Zusatz des Repressors LsrR zeigten eine bis zu 12 fache Reduktion des Signals, aber keine Regulierbarkeit durch Zugabe des künstlichen AI-2 Ersatzes DPD.

Da für das Ablösen des Repressors die Kinase LsrK nötig ist wurde als nächstes die Auswirkungen dieser untersucht (siehe Abbildung 9).

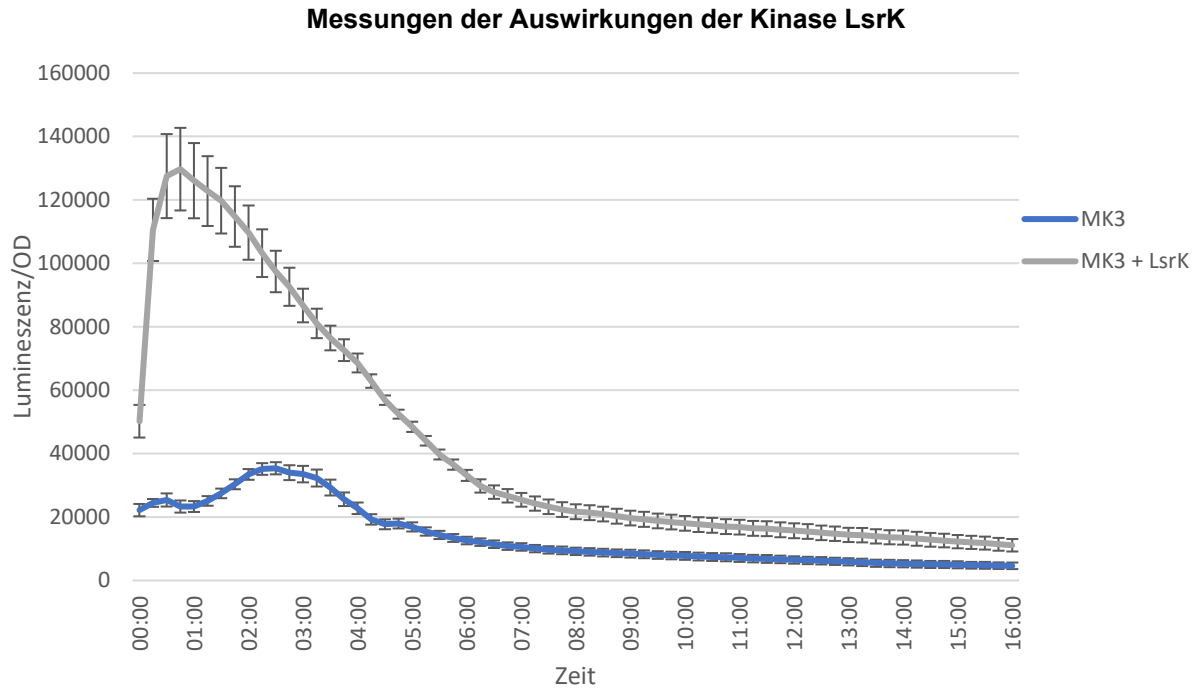


Abbildung 9: Die Zugabe des Repressors LsrR sorgt für eine Reduktion des Signals

Das Lumineszenz-basierte Detektorsystem wurde mit und ohne die zusätzliche Kinase LsrK über 16 Stunden mit 100 µM des künstlichen AI-2 Ersatzes DPD, vermessen. Daten angegeben in ± S.E.M.; N=5.

Die Messungen des Detektorsystems mit Zusatz der Kinase LsrK zeigen eine bis zu 6 fache Steigerung des Signals. Allerdings konnte keine signifikante Änderung der Auflösung des Signals festgestellt werden. Die ist aufgrund des fehlenden Repressors erwartbar.

Das weitere Ziel ist die Reduktion des Signals durch den Repressor LsrR mit dem erhöhten Signal der Kinase LsrK zu kombinieren.

Für die Erstellung eines trojanischen Stammes wurden vom IME Plasmide zur Genomintegration in *H. pylori* erstellt. Diese Plasmide wurden als Teil von **AP 7.1** mit einer Lumineszenzkassette auf ihre Effizienz getestet. Dafür wurden diese zunächst in *E. coli* BL21 Δ LuxS kloniert. In diesen beiden *E. coli* Stämmen wurde die Lumineszenz der Plasmide als Indikator der Effektivität kontrolliert (siehe Abbildung 10).

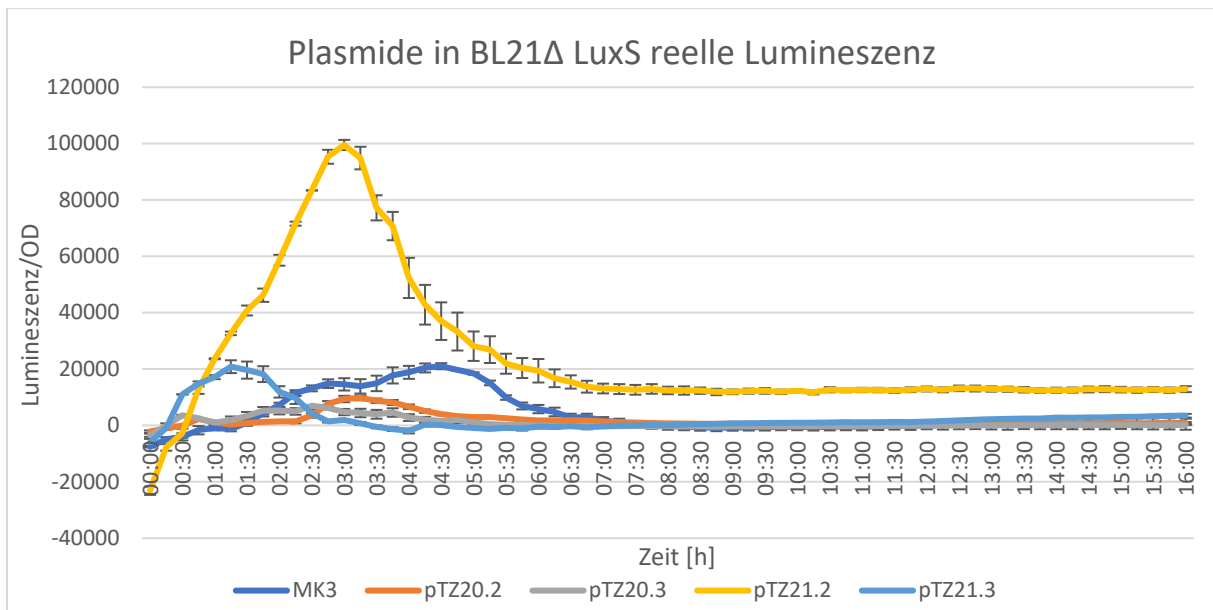


Abbildung 10: Lumineszenz der *H.pylori* Genomintegrations-Plasmiden pTZ20 und pTZ21

Die *E. coli* Stämme mit dem Lumineszenz-basierten Detektor System MK3 oder den *H. pylori* Genomintegrations-Plasmiden pTZ20 und pTZ21 wurden über 16 Stunden mit 100 μ M des künstlichen AI-2 Ersatzes DPD vermessen. Der durch die Zugabe von Wasser, ermittelte Background wurde von den durch DPD Zugabe erhaltenen Werten abgezogen, um das reelle Signal zu bestimmen. Daten angegeben in \pm S.E.M.; N=3.

Betrachten wir Abbildung 10, so können wir erkennen, dass die Plasmide pTZ20 und pTZ21 ähnliche Signale zu dem Kontrollplasmid MK3 zeigen. Ausnahme ist der Klon pTZ21.2 bei dem nach Sequenzierung des Plasmides Teile des Promoters fehlen und somit keine korrekte Funktionalität mehr gegeben ist.

Weiterhin wurden die Plasmide in *E. coli Top10* kloniert.

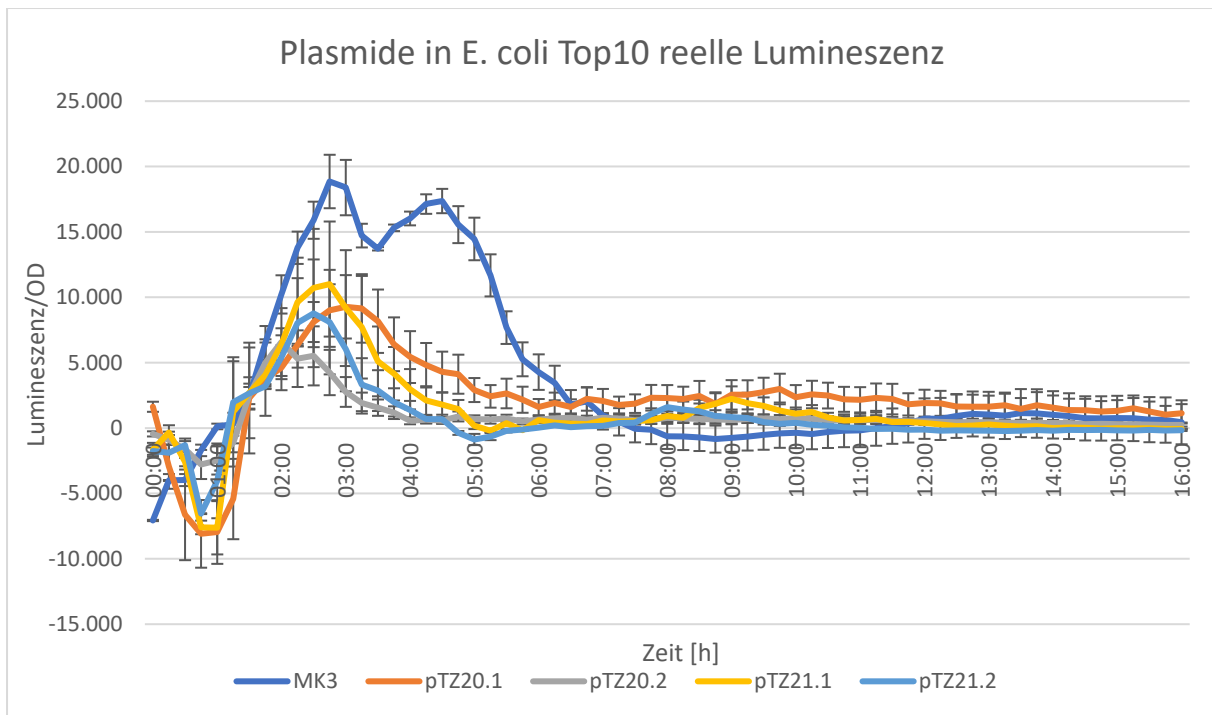


Abbildung 11: Lumineszenz der *H. pylori* Genomintegrations-Plasmide pTZ20 und pTZ21
 Die *E. coli* Stämme mit dem Lumineszenz-basierten Detektor System MK3 oder den *H. pylori* Genomintegrations-Plasmiden pTZ20 und pTZ21 wurden über 16 Stunden mit 100 μ M des künstlichen AI-2 Ersatzes DPD vermessen. Der durch die Zugabe von Wasser ermittelte Background wurde von den durch DPD Zugabe erhaltenen Werten abgezogen, um das reelle Signal zu bestimmen. Daten angegeben in \pm S.E.M.; N=3.

Die Plasmide pTZ20 und pTZ21 zeigen ähnliche Signale zu dem Kontrollplasmid MK3.

Beide Plasmide könnten somit in *H. pylori* integriert werden.

Die geplanten Arbeiten aus **AP 7.3** wurden noch nicht begonnen. Dies lässt sich durch die Verzögerungen, die in **AP 2** geplanten, Identifikation der gegen *H. pylori* wirksamen Peptide, bis Ende 2022, erklären. Der Beginn des **AP 7.3** soll Anfang 2023 stattfinden. Die Verzögerung beeinträchtigt den Erfolg des Projektes nicht. Der planmäßige Abschluss des **AP 7.3** verzögert sich voraussichtlich bis zum 30.06.2023.

Wie bereits im Obigen erwähnt, konnten die Arbeiten für **AP 7.3** leider nicht begonnen werden.

AP 8: Kombierter Ansatz (Strategie 3) (01.11.2022 – 01.08.2023)

Das **AP 8** konnte aufgrund der nicht zu Verfügung stehenden Phagen gegen *H. pylori* nicht begonnen werden.

AP 9: Untersuchung der Effektivität des trojanischen Pferd *H. pylori* (01.02.2023 – 31.12.2023)

Das **AP 9** wurde aufgrund von Verzögerungen in den vorherigen Projektteilen nicht begonnen. Ohne einen trojanischen *H. pylori* des Projektpartners IME, welcher in **AP 7.3** hätte überprüft werden sollen, konnte dieses AP nicht begonnen werden.

AP 10: Vorbereitung und behördliche Zulassung (01.02.2021 – 31.01.2022 und 01.08.2023 – 31.01.2024)

AP 10.1: Anfangsvoraussetzungen für die Bewerbung (UKE, Quh-Lab, IME, PTC)

Die in **AP 10.1** geplanten behördlichen Zulassungen für den Umgang mit pathogenen Bakterien wurden eingeholt.

AP 10.2: Anforderungen an klinische Studien und Zulassung (UKE, Quh-Lab, IME, PTC)

Eine klinische Studie steht aufgrund der Verzögerungen im Projekt nicht zur Debatte (siehe Berichte UKE)

2. Vergleich des Vorhabenstands mit der ursprünglichen (bzw. mit Zustimmung des ZG geänderten) Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung.

AP 2.1 wurde wegen technischen Problemen an den Verbundpartner IME übergeben und zusammen mit **AP 2.2** planmäßig abgeschlossen. Die Untersuchungen des **AP 2.3** wurden aufgrund von vorhandenen Geräten ans IME verlegt. Quh-Lab lieferte nur noch Teile der Peptide.

Die Versuche zur Charakterisierung der Promotoren und Repressoren für die Autoinducer der Klasse 2 sind bereits im Berichtszeitraum 2021 gelaufen. Die Arbeiten für die Charakterisierung der durch Autoinducer der Klassen 1 und 3 regulierbaren Promotoren und Repressoren wurden aufgrund der nicht nachweisbaren Autoinducer in den **AP 3.1** und **AP 3.2** nicht weiterverfolgt.

Die Versuche in **AP 4.1** und **AP 4.3** sind planmäßig abgeschlossen. Es wurde sich im Berichtszeitraum primär auf die Untersuchung des etablierten, durch Autoinducer der Klasse 2 ausgelösten, Promotor und Repressor konzentriert. Die zu **AP 4.2** gehörende Verifizierung der Produktion der Autoinducer der Klasse 2 durch *H. pylori* wurde planmäßig abgeschlossen. Die anfänglichen Untersuchungen und Modifikationen des für die Detektion ausgewählten Isr-Promotors und des Isr-Repressors LsrR wurden als Teil von **AP 7.1** weitergeführt.

Es hat sich herausgestellt, dass für die Vitalität der *H. pylori* Stämme in **AP 5.6** eine Kultivierung im Exsikkator nötig ist. Dieser musste, zusammen mit einem speziellen Gasmisch, bestellt werden. Weiterhin konnten die mehrfach Knockoutmutanten von *H. pylori* erst im September 2023 durch das IME zur Verfügung gestellt werden. Daher verschob sich die Beendigung des Arbeitspaketes bis zum 31.12.2023. Dies

gefährdet den Erfolg des Projektes nicht. Da das **AP 7.3** aufgrund der bereits erklärten Punkte erst Ende 2023 beendet werden konnte, hat die Verzögerung in **AP 5.6** in Verbindung mit der fehlenden Integration der in **AP 7.1** überprüften Bakterizidkassette eine Auswirkung auf das **AP 7.3**, welches aufgrund des fehlenden fertigen Trojanischen Bakteriums nicht beendet werden konnte.

Die Vorbereitungen zum Ausgleich der Verzögerung aus **AP 2** wurden frühzeitig getroffen, sodass die Expressionskassetten in Zusammenarbeit mit dem IME in **AP 7.1** bereitgestellt werden konnte. Aufgrund von fehlenden Daten aus **AP 2** und dem fehlenden trojanischen Stamm aus **AP 7.3** konnten diese Arbeiten nicht abgeschlossen werden. Dies ändert das Ziel des Projektes auf ein Proof of concept System. Eine in-vitro Effektivität kann ermittelt werden, wenn ein trojanischer Stamm mit einer Bakterizidkassette durch den Projektpartner IME bereitgestellt wird.

Die Versuche in **AP 8** konnten nicht begonnen werden, da der Kooperationspartner PTC keine Phagen zur Verfügung stellen konnte.

Die **AP 9** und **AP 10.2** konnten ohne einen trojanischen Stamm aus **AP 7.3** nicht begonnen werden. Diese Arbeitspakete konnten nicht abgeschlossen werden.

Aufgrund der mannigfaltigen Verzögerungen waren die Vorbereitung für **AP 10** unnötig.

3. Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert (Begründung)?

Für die Erreichung der **AP 5.3**, **AP 5.4**, **AP 5.6** und **AP 7.3** hat sich herausgestellt, dass eine direkte Co-Kultur von Magenschleimzellen und *H. pylori* nötig ist. Eine quantitative Bestimmung der einzelnen Pathogenitätsfaktoren hätte keine genauen Daten der Auswirkungen auf humane Zellen gezeigt. Um diese Daten zu erhalten, musste eine Zellkultur aufgebaut werden. Mit dieser konnten genauere Daten zu der Viabilität und Apoptose in Wechselwirkung mit *H. pylori* erzielt werden. Weiterhin zeigte sich, dass für eine langfristige Kultivierung der *H. pylori* Knockoutmutanten ein Exsikkator und ein Gasgemisch nötig sind. Durch Lieferzeiten dieser und die verzögerte Bereitstellung der Knockout-Mutanten konnte **AP 5** erst im Herbst 2024 abgeschlossen werden.

Aufgrund des aktuell fehlenden Phagen für *H. pylori* wurden die Arbeiten aus den **AP 5.2** und **AP 8** noch nicht gestartet. Der Fokus des Projektes lag daher auf den gegen *H. pylori* wirksamen Peptiden.

Durch das Fehlen eines trojanischen *H. pylori* Stammes konnten die Arbeiten in **AP 7.3** noch nicht begonnen werden. Die dadurch entstehenden Verzögerungen können bis September nicht mehr vollständig aufgeholt werden. Die in-vitro Tests in **AP 9.3** können bei zeitiger Bereitstellung eines trojanischen *H. pylori* Stammes, voraussichtlich bis Projektende abgeschlossen werden. Dieser wurde jedoch bis Projektende nicht gefunden.

Aufgrund der Corona Pandemie besaßen verschiedene benötigte Arbeitsmaterialien verlängerte Lieferzeiten. Außerdem gab es mehrere längere Corona-Ausfälle im Team. Aus diesen Gründen gab es an mehreren Stelle Verzögerungen von jeweils 1-2 Wochen, die keinem Arbeitspaket direkt zuzuordnen sind. Des Weiteren war es einzelnen Projektteilnehmern über längere Zeit nicht möglich Ihre Labore zu nutzen, geschweige denn zu betreten. Dies führte zu erheblichen unausweichlichen Verzögerungen im gesamten Projekt.

4. Sind inzwischen von dritter Seite (jemand außerhalb des Projektes) FE(Forschung und Entwicklung)-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

Es wurden keine relevanten Ergebnisse von dritter Seite bekannt.

5. Sind oder werden Änderungen in der Zielsetzung notwendig?

Durch die zeitliche Verschiebung wird das Projekt wahrscheinlich keine integrierte Bakterizidkassette mit Effektivitätsnachweis hervorbringen können. Daher konzentriert sich das Projekt erstmal auf ein proof of concept System, in dem der trojanische Stamm kein Bakterizid oder einen Phagen exprimiert, sondern nur eine Lumineszenzsignal produziert. So kann getestet werden, ob der trojanische Stamm funktionieren würde. Da eine Funktionalität des Detektorsystem in *H. pylori* noch nicht nachgewiesen werden konnte, könnte eine Expression des Bakterizids möglich sein. Über den Weg des Lumineszenzsignals könnte man eine Funktionalität des Detektorsystems in *H. pylori* nachweisen, ohne sich dem Problem des Absterbens des trojanischen Stammes durch das eigens exprimierte Bakterizides zu stellen. Diese Probleme würden den proof of concept deutlich verzögern. Zumindest die Funktion der lumineszierenden Integrationskassette konnte jedoch in **AP 7** nachgewiesen werden.

6. Jährliche Fortschreibung des Verwertungsplans. Diese soll, soweit im Einzelfall zutreffend, Angaben zu folgenden Punkten enthalten (Geschäftsgeheimnisse des ZE brauchen nicht offenbart zu werden):

Gegenüber dem Projektantrag haben sich bisher keine Änderungen bzgl. einer späteren Verwertungsstrategie ergeben. Die Strategie des trojanischen Bakterienstamms gilt für das Konsortium nach wie vor als vielversprechend und soll auch nach dem Projekt weiterverfolgt und patentiert werden. Nach einem erfolgreichen Weiterverfolgen des grundsätzlichen Projektzieles ist eine Verwertung der entwickelten Therapieformen in Form von klinischen Studien vorgesehen.